

**Entwicklung eines rekombinanten
Antibiotikaseensorstammes von *E. coli* mittels gezielter
Mutagenese und Reportergentechnologie**

Dissertation

zur Erlangung des naturwissenschaftlichen Doktorgrades

der Universität Hamburg

Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften

vorgelegt von

Katja Carstens

– Hamburg 2017 –

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von März 2011 bis Mai 2015 unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Peter Heisig in der Abteilung für Pharmazeutische Biologie und Mikrobiologie im Institut für Biochemie und Molekularbiologie am Fachbereich Chemie der Universität Hamburg angefertigt.

1. Gutachter: Prof. Dr. Peter Heisig

2. Gutachter: Prof. Dr. Bernward Bisping

Disputationstermin: 19.12.2017

Für Boris und Sophie

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Charakterisierung gramnegativer Problemkeime am Beispiel von <i>Escherichia coli</i>	2
1.1.1	<i>E. coli</i> als pathogener Erreger und als Laborstamm	2
1.1.2	Bakterielle Effluxpumpen	3
1.1.3	Das äußere Membranprotein TolC.....	6
1.2	Reaktive Sauerstoffspezies.....	9
1.2.1	Endogene und exogene Ursachen der ROS-Bildung.....	10
1.2.2	Schäden durch ROS	13
1.2.3	Enzymatische Detoxifizierung von ROS	15
1.2.4	Das OxyR- und SoxRS-System: Aktivierung von Schutzsystemen als Antwort auf oxidativen Stress	16
1.2.5	ROS als Ursache der letalen Wirkung bakterizider Antibiotika	17
1.3	Klassifizierung von Antibiotika	19
1.3.1	Einteilung nach Wirkungstyp.....	19
1.3.2	Einteilung nach Zielstruktur.....	20
1.4	β-Laktamasen	27
1.4.1	Klinische Relevanz und Klassifizierung von β-Laktamasen	28
1.4.2	AmpC-β-Laktamase	29
1.5	Ziel der Arbeit.....	31
2	Material und Methoden.....	32
2.1	Material	32
2.1.1	Bakterienstämme	32
2.1.2	Plasmide	32
2.1.3	Oligonukleotide	34
2.1.4	Enzyme	38
2.1.5	Größenmarker für DNA	39
2.1.6	Nährmedien.....	39

2.1.7	Puffer und Lösungen	40
2.1.8	Chemikalien	41
2.1.9	Kits	43
2.1.10	Geräte und Verbrauchsmaterial	44
2.1.11	Software	47
2.2	Methoden	48
2.2.1	Lagerung und Kultivierung von Bakterienstämmen	48
2.2.2	Bestimmung der Keimzahl	48
2.2.3	Bestimmung der Minimalen Hemmkonzentration mittels Mikrodilutionsverfahren	49
2.2.4	Morphologische Betrachtung von Bakterien	50
2.2.5	Isolierung von DNA	51
2.2.6	Polymerase-Kettenreaktion	52
2.2.7	Agarose-Gelelektrophorese	58
2.2.8	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	59
2.2.9	Reinigung und Konzentrierung von Nukleinsäuren	61
2.2.10	Enzymatische Behandlung von Nukleinsäuren	61
2.2.11	Transfer von DNA	63
2.2.12	Ortsspezifische Mutagenese	65
2.2.13	Sequenzierung	70
2.2.14	Quantitative Real-time PCR	72
2.2.15	Fluoreszenzmessung	79
3	Ergebnisse	83
3.1	Entwicklung eines Messsystems zum Nachweis bakterizider Antibiotika	84
3.1.1	Konstruktion des Sensorstammes	84
3.1.2	Konstruktion der Reporterplasmide des Messsystems	120
3.1.3	Messungen der Fluoreszenz von <i>E. coli</i> R7-Zellen mit pHPKC3-03, pHPKC3-05 und pHPKC3-04	137

3.1.4	Zusammenfassung der Ergebnisse zum Messsystem für den Nachweis bakterizider Antibiotika	140
3.2	Erweiterung um drei individuelle Messsysteme zum spezifischen Nachweis von DNA-Schäden, Zellhüllstress und Störungen der Zellwandsynthese.....	141
3.2.1	Messsystem zum Nachweis von DNA-Schäden.....	141
3.2.2	Messsystem zum Nachweis von Zellhüllstress.....	145
3.2.3	Messsystem zum Nachweis von Störungen der Zellwandsynthese	156
3.2.4	Zusammenfassung der Resultate von Versuchen zur Erweiterung des Messsystems um individuelle Reportersysteme	165
3.3	Etablierung eines kombinierten Messsystems auf Basis der individuellen Reportersysteme	165
3.3.1	Vorversuche zu Messungen mit dem roten Fluoreszenzprotein mCherry und dem blauen Fluoreszenzprotein mTagBFP2	166
3.3.2	Erweiterung der individuellen Messsysteme um die Plasmide pHPKC3-07 und pHPKC3-12...	176
3.3.3	Konstruktion des kombinierten Messsystems	182
3.3.4	Anwendung des kombinierten Messsystems auf unbekannte Proben.....	186
4	Diskussion.....	189
4.1	Der Sensorstamm	189
4.1.1	Auswahl des Sensorstammes	189
4.1.2	Konstruktion der $\Delta toIC$ -Mutante von <i>E. coli</i> C600.....	190
4.1.3	Charakterisierung von <i>E. coli</i> R7	192
4.2	Prinzip und Aufbau des biosensorischen Messsystems zum Nachweis bakterizider Antibiotika	196
4.2.1	Konstruktion des Reporterplasmides pHPKC3-04	197
4.2.2	Fluoreszenzmessungen mit dem biosensorischen Messsystem	201
4.3	Etablierung eines biosensorischen Messsystems auf Grundlage individueller Antibiotika induzierter Stressreaktionen	205
4.3.1	Messsystem zum Nachweis von DNA-Schäden.....	205
4.3.2	Messsystem zum Nachweis von Zellhüllstress.....	207

4.3.3	Messsystem zum Nachweis von Störungen der Zellwandsynthese	211
4.3.4	Zusammenfassung zur Erweiterung des Messsystems um individuelle Reportersysteme	215
4.4	Erweiterung der individuellen Messsysteme zu einem kombinierten Messsystem auf Basis der Antibiotika induzierten Stressantworten	216
4.4.1	Konstruktion der auf mCherry und mTagBFP2 basierten Reporterplasmide	217
4.4.2	Fluoreszenzmessungen mit den auf mCherry und mTagBFP2 basierten Kontrollplasmiden ..	217
4.4.3	Fluoreszenzmessungen mit den auf mCherry und mTagBFP2 basierten Plasmiden pHPKC3-07 und pHPKC3-12	219
4.4.4	Konstruktion des kombinierten Reporterplasmides pHPKC3-14	222
4.4.5	Anwendung des kombinierten Messsystems mit pHPKC3-14 im verblindeten Versuch	223
4.5	Fazit und Ausblick	224
5	Zusammenfassung	226
6	Summary	229
7	Danksagung	231
8	Anhang	232
8.1	Elektropherogramme der Originalsequenzen zum Nachweis der <i>tolC</i> -Deletion in <i>E. coli</i> R7 ..	232
8.1.1	Sequenzierung des intergenetischen Bereichs von <i>nudF</i> und <i>ygiB</i> in <i>E. coli</i> R7	232
8.1.2	Sequenzierung der Übergänge	242
8.2	Abkürzungsverzeichnis	244
8.3	Gefahrstoffverzeichnis	247
8.3.1	Auflistung der verwendeten KMR-Substanzen	247
8.3.2	Auflistung der verwendeten Gefahrstoffe	248
8.4	Lebenslauf	252
8.5	Publikationen	253
8.6	Eidesstattliche Versicherung	253
8.7	Erklärung über frühere Promotionsvorhaben	254
9	Literaturverzeichnis	255

1 Einleitung

Antibiotika bilden seit ihrer Entdeckung und Entwicklung vor über 70 Jahren eine der wichtigsten und meist eingesetzten Arzneimittelgruppen weltweit. Ihr unsachgemäßer und unnötiger Gebrauch fördert die Bildung und Verbreitung von Resistenzen und schwächt damit zunehmend ihre Wirksamkeit im Kampf gegen Infektionskrankheiten. Die Behandlung hieraus hervorgegangener resistenter Erreger ist sowohl schwierig als auch kostspielig und fordert jedes Jahr zahlreiche Menschenleben. Nach Angaben eines Reports des ECDC (*European Centre for Disease Prevention and Control*) starben im Jahr 2007 in der Europäischen Union etwa 25.000 Menschen an einer Infektion durch multiresistente Erreger. Hiervon waren etwa zwei Drittel den Gramnegativen zuzuordnen (ECDC/EMA, 2009).

Die Übertragung genetischer Resistenzinformation kann sowohl innerhalb der Gruppe humaner Erreger, der Gruppe tierischer Erreger, als auch zwischen beiden Gruppen sowie im Austausch mit Bakterien in der Umwelt erfolgen. Ein Umdenken des Antibiotikaeinsatzes, wodurch Selektionsdruck auf resistente Erreger ausgeübt wird, ist demnach sowohl im humanmedizinischen Bereich als auch in der Veterinärmedizin zwingend erforderlich. Allein in Deutschland wurden im ambulanten humanmedizinischen Sektor nach Angaben des Wissenschaftlichen Institutes der AOK (WiDO) im Jahr 2014, bezogen auf den GKV-Anteil der deutschen Bevölkerung von 85%, etwa 45 Mio. Antibiotikaverordnungen mit 448 Mio. definierten Tagesdosen getätigt (Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit, 2012). Der Gesamtverbrauch im humanmedizinischen Sektor in Deutschland wurde für das Jahr 2015 auf 700 - 800 Tonnen geschätzt (Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit, 2012). Besonders bedenklich ist der hohe Verbrauch an Fluorchinolonen und Cephalosporinen sowohl im ambulanten als auch stationären Bereich, da diese Antibiotikaklassen einen hohen Druck zugunsten der Selektion multiresistenter Erreger ausüben (Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit, 2012). Während vor allem die 80er und 90er Jahre vermehrt durch das Vorkommen multiresistenter grampositiver Kokken, wie MRSA (*Methicillin-resistente Staphylococcus aureus*) geprägt waren, wird in den letzten Jahren die Zunahme gramnegativer Stäbchen, wie z.B. *E. coli* oder *Klebsiella pneumoniae*, mit Resistenzen insbesondere gegenüber Cephalosporinen der Gruppe 3 oder Fluorchinolonen beobachtet (Stand 03/15, RKI). Ebenfalls kritisch ist die Zunahme von Isolat-ten mit Extended-Spektrum- β -Laktamasen (ESBLs). Hierbei handelt es sich um spezielle bakterielle Enzyme, die eine Resistenz gegen mehrere β -Laktamantibiotika vermitteln. Stämme, die eine Resistenz gegen drei bzw. vier der definierten Antibiotikagruppen der Acylaminopenicilline, Cephalosporine der Gruppe 3 und 4, Carbapeneme und Chinolone aufweisen, werden als 3MRGN und 4MRGN bezeichnet (MRNG= multiresistente gramnegative Stäbchen).

Für den veterinärmedizinischen Bereich wurden seit 2011 aufgrund der DIMDI-Arzneimittelverordnung (DIMDI – *Deutsches Institut für medizinische Dokumentation und Information*) erstmals auch detaillierte Daten zur Antibiotikamengenabgabe in der Veterinärmedizin verzeichnet. Diese Verordnung verpflichtet

pharmazeutische Betriebe zur Registrierung der Abgabemengen von Tierarzneimitteln, insbesondere von Antibiotika, beim Deutschen Institut für Medizinische Dokumentation und Information. Die Auswertung der Daten durch das Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (BVL) ergab für das Jahr 2014 in Deutschland eine Abgabemenge von 1.238 Tonnen Antibiotika, wobei seit der Einführung der DIMDI-Verordnung diese kontinuierlich abnahm. Verglichen mit der Antibiotikaabgabemenge von 2011 konnte bereits für 2014 eine Reduktion von 27 %, entsprechend einer absoluten Menge von 468 Tonnen, verzeichnet werden. Spitzenreiter der in der Veterinärmedizin eingesetzten Antibiotika bilden Penicilline, Tetracycline, Sulfonamide, Makrolide und Polypeptidantibiotika. Eine Reduktion von für den Menschen von Bedeutung eingestufte Antibiotikaklassen, wie Fluorchinolone und Cephalosporine der 3. und 4. Gruppe, wurde jedoch nicht erreicht (Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit, 2012).

1.1 Charakterisierung gramnegativer Problemkeime am Beispiel von *Escherichia coli*

1.1.1 *E. coli* als pathogener Erreger und als Laborstamm

Das Bakterium *Escherichia coli* ist ein gramnegatives und fakultativ anaerobes Stäbchen aus der Familie der *Enterobacteriaceae*. Die Humanpathogenität von *E. coli* ist stammspezifisch und kann sowohl fakultativ als auch obligat sein. Die fakultativ pathogenen Stämme sind Teil der humanen Darmflora und führen nur außerhalb ihres natürlichen Habitats oder bei Personen mit Immunschwäche zu Infektionen (Kaper, Nataro, & Mobley, 2004). Hierzu zählen insbesondere Harnwegsinfekte, aber auch Wundinfektionen, Pneumonien, Peritonitis und Cholezystitis sowie Säuglings-Meningitiden (Baenkler, 2015; Darai, 2012). Die obligat pathogenen Vertreter gehören nicht zur natürlichen Darmflora des Menschen und werden über Schmierinfektionen übertragen (Darai, 2012). Sie führen zu schweren Durchfällen und Entzündungen im Darmtrakt und werden in die fünf Gruppen der enteropathogenen *E. coli* (EPEC), enterohämorrhagischen *E. coli* (EHEC), enterotoxischen *E. coli* (ETEC), enteroaggregativen *E. coli* (EAEC) und enteroinvasiven *E. coli* (EIEC) eingeteilt (Baenkler, 2015; Darai, 2012; Kaper et al., 2004; M. Bühlte, 2014). Die Einteilung erfolgt anhand des Serotyps, welcher auf spezifische Oberflächenmerkmale zurückzuführen ist. Die Pathogenität der obligat pathogenen *E. coli*-Stämme wird vermittelt durch die Adhärenz an Epithelzellen und die Zerstörung von Mikrovilli mit gestörter Elektrolytaborption (EPEC), die Anheftung über Fimbrien an Epithelzellen und die Bildung zweier Enterotoxine, die zu Störungen des Elektrolyt- und Wassertransportes führen (ETEC), die Invasion und Zerstörung von Epithelzellen des Kolons mit zusätzlicher Toxinbildung (EIEC), die Expression aggregativer Adhärenzfimbrien, die an spezifischen Epithelzellen aggregieren und über Protein- und Hämolysinbildung eine Aktivierung der membranständigen Adenylatcyclase mit verstärkter Elektrolytsekretion bewirken (EAEC) und die Bildung von Zytotoxinen und Hämolysinen (EHEC) (Darai, 2012). Die von EHEC gebildeten Zytotoxine werden aufgrund ihrer Ähnlichkeit zum Toxin von *Shigella dysenteriae* als *Shigella like toxin I* und II (SLT I und II) bezeichnet und führen nach erfolgter Endozytose durch die Bindung an die ribosomale

RNA zur Hemmung der Proteinbiosynthese und zum Tod der Epithelzelle. Ein bei manchen Stämmen zusätzlich plasmidkodiertes Hämolysin bewirkt eine Lyse der Erythrozyten und wird im Zusammenhang mit dem hämolytisch-urämischem Syndrom (HUS), einer lebensbedrohlichen Komplikation der EHEC-Infektion, vermutet (Darai, 2012).

Aufgrund des hohen Erfahrungs- und Wissenstands, des geringen Nährstoffbedarfs, der kurzen Generationszeit unter optimalen Bedingungen und der einfachen genetischen Modifizierbarkeit ist *E. coli* seit Mitte des 20. Jahrhunderts ein beliebter Laborkeim für mikro- und molekularbiologische Untersuchungen sowie für die biotechnologische Industrie. Verwendet werden vorwiegend Stämme, die auf den Stammhintergrund *E. coli* K-12 zurückgehen, welcher 1922 aus dem Stuhl eines an Diphtherie erkrankten Soldaten isoliert wurde. Nach diversen Untersuchungen und Modifikationen erkannte man ab Mitte der 70er Jahre, dass der Stamm weder den humanen Darmtrakt besiedeln konnte noch bekannte Pathogenitätsfaktoren besaß (Anderson, 1975; Levy et al., 1980; Muhldorfer & Hacker, 1994; Smith, 1975). Der Stamm bildete daher den Prototyp eines apathogenen Stammes und den Ausgangsstamm zahlreicher heute existierender *E. coli* K-12-Varianten (Kuhnert, Nicolet, & Frey, 1995).

Einen typischen und aufgrund nur geringer genetischer Veränderungen häufig genutzten Vertreter, stellt beispielsweise der 1997 von Blattner et al. vollständig sequenzierte Stamm *E. coli* K-12 MG1655 dar (Blattner et al., 1997).

Einen weiteren Vertreter mit K-12-Hintergrund bildet der Stamm *E. coli* C600, welcher über Behandlung mit Röntgen- und UV-Strahlung über mehrere Stufen aus dem K-12-Wildtyp erhalten wurde (Bachmann, 1996). Genotypisch weist *E. coli* C600 Defekte in Genen der Leucin- (*leuB6*), der Threonin- (*thr-1*) und der Thiaminsynthese (*thi-E1*) auf. Des Weiteren ist der Stamm aufgrund einer Mutation in der Laktosepermease (*lacY1*) unfähig zur Laktoseaufnahme in die Zelle. Die Mutation im äußeren Membranprotein FhuA (*fhuA21*) vermittelt eine Resistenz gegenüber den Phagen T1, T5 und f80. Zusätzlich besitzt *E. coli* C600 das Suppressorgen *glnV44*, wodurch die vorzeitige Termination der Proteinbiosynthese bei Anwesenheit von Amber-Mutationen verhindert wird.

1.1.2 Bakterielle Effluxpumpen

Effluxpumpen sind in prokaryotischen als auch eukaryotischen Zellen ubiquitär verbreitete Transportsysteme zur energieabhängigen Eliminierung toxischer Substanzen (Van Bambeke, Balzi, & Tulkens, 2000). Durch den Efflux antibakterieller Substanzen aus der Zelle und der dadurch verringerten intrazellulären Antibiotikakonzentration leisten die Pumpen einen entscheidenden Beitrag zur Vermittlung von Resistenzen. Die Ausprägung von Antibiotikaresistenz erfolgt vor allem durch die erhöhte Expression der Effluxpumpen

oder aufgrund von Mutationen in Genen für Strukturproteine der Effluxpumpe, die aufgrund einer veränderten Proteinstruktur zu einem effizienteren Efflux führen (Piddock, 2006). Die Pumpen können substratspezifisch sein oder ein weites Spektrum von Substanzen unterschiedlicher Struktur aufweisen. Hinsichtlich ihrer Struktur, der Energiequelle und der zu transportierenden Substrate werden bakterielle Effluxpumpen in fünf Familien eingeteilt: RND-Familie (*Resistance Nodulation Division*), MF-Superfamilie (*Major Facilitator Superfamily*), MATE-Familie (*Multidrug And Toxic Efflux*), SMR-Familie (*Small Multidrug Resistance*) und ABC-Familie (*ATP Binding Cassette*). Der Transport erfolgt aktiv und wird über die protonenmotorische Kraft gesteuert. Ausnahmen stellen hierbei die ABC-Transporter dar, welche ihre Energie aus der Hydrolyse von ATP beziehen und die Transporter der MATE-Familie, welche über einen Na^+/H^+ -Antiporter betrieben werden. Aufgrund des weiten Substratspektrums und der Eliminierung verschiedener, strukturell nicht miteinander verwandter Antibiotika nehmen die Effluxpumpen der RND-Familie einen besonderen Stellenwert im Rahmen der multiplen Antibiotikaresistenz (MDR – *multiple antibiotic resistance*) gramnegativer Bakterien ein. Diese Effluxpumpen bestehen aus drei Komponenten: einem Transportprotein, einem äußeren Membranprotein (OMP - *outer membrane protein*) und einem periplasmatischen Membranfusionsprotein. Die Pumpenkomplexe erstrecken sich von der Innenseite der Cytoplasmamembran bis durch die äußere Membran hindurch und ermöglichen den Transport von Substanzen durch beide Membranen. Ein Transport von Substanzen aus dem Periplasma nach außen ins Medium ist ebenfalls möglich. Das Transportprotein ist in der inneren Membran lokalisiert und wird über das Membranfusionsprotein mit dem in der äußeren Membran verankerten OMP verbunden. Das Transportprotein mit der größten klinischen Relevanz für *E. coli* stellt AcrB aus dem AcrAB-TolC-Effluxkomplex dar.

Der AcrAB-TolC-Effluxkomplex in *E. coli*

Der AcrAB-TolC-Effluxkomplex setzt sich aus dem Transportprotein AcrB, dem äußeren Membranprotein TolC und dem periplasmatischen Membranfusionsprotein AcrA zusammen (Abb. 1.1). Ergänzend hierzu fungiert das kürzlich entdeckte Protein AcrZ, ein kleines Protein der inneren Membran von 49 Aminosäuren, als Bindungspartner von AcrB und führt zur Erweiterung des Substratspektrums des Effluxkomplexes (Hobbs et al., 2012). Das Protein AcrB stellt ein Homotrimer dar, dessen einzelne Protomere aus einer transmembranen und einer periplasmatischen Region bestehen. Die transmembrane Region bildet mit 12 α -Helices den kleineren Anteil des Proteins. Die größere, periplasmatische Region wird aus einer *porter domain*, bestehend aus vier Subdomänen und einer *funnel domain*, bestehend aus zwei Subdomänen, gebildet (Murakami et al., 2002). Die *funnel domain* besitzt eine trichterartige Öffnung, welche den gleichen Durchmesser wie der periplasmatische Kanal von TolC aufweist und lässt eine direkte Interaktion zwischen AcrB und TolC vermuten (Koronakis et al., 2000; Murakami et al., 2002; Tamura et al., 2005; Tikhonova, Yamada, & Zgurskaya, 2011). Dem entgegen wurden alternative Modelle des AcrAB-TolC-Effluxkomplexes

postuliert, bei denen keine direkte Verbindung zwischen AcrB und TolC existiert und die Komponenten ausschließlich über AcrA miteinander verbunden sind (Du et al., 2014; Kim et al., 2015). Das Membranfusionsprotein AcrA ist aus vier Domänen aufgebaut: einer proximalen Membrandomäne und einer β -Barrel-Domäne, welche an der Interaktion mit AcrB beteiligt sind, einer α -helikalen Haarpin-Domäne, die mit TolC interagiert sowie einer Lipoyl-Domäne, die an der periplasmatischen Kanalbildung beteiligt ist (Du et al., 2014). Das stochastische Verhältnis der Protomere von AcrAB-TolC steht bisweilen zur Diskussion. Entgegen der früheren Annahme eines Trimers lassen aktuelle elektronenmikroskopische Aufnahmen sowie Ergebnisse der Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie AcrA als Hexamer und ein stochastisches Verhältnis der Protomere von 3:6:3 (AcrB:AcrA:TolC) vermuten (Du et al., 2014; Jeong et al., 2016; Tikhonova et al., 2011; Xu et al., 2011).

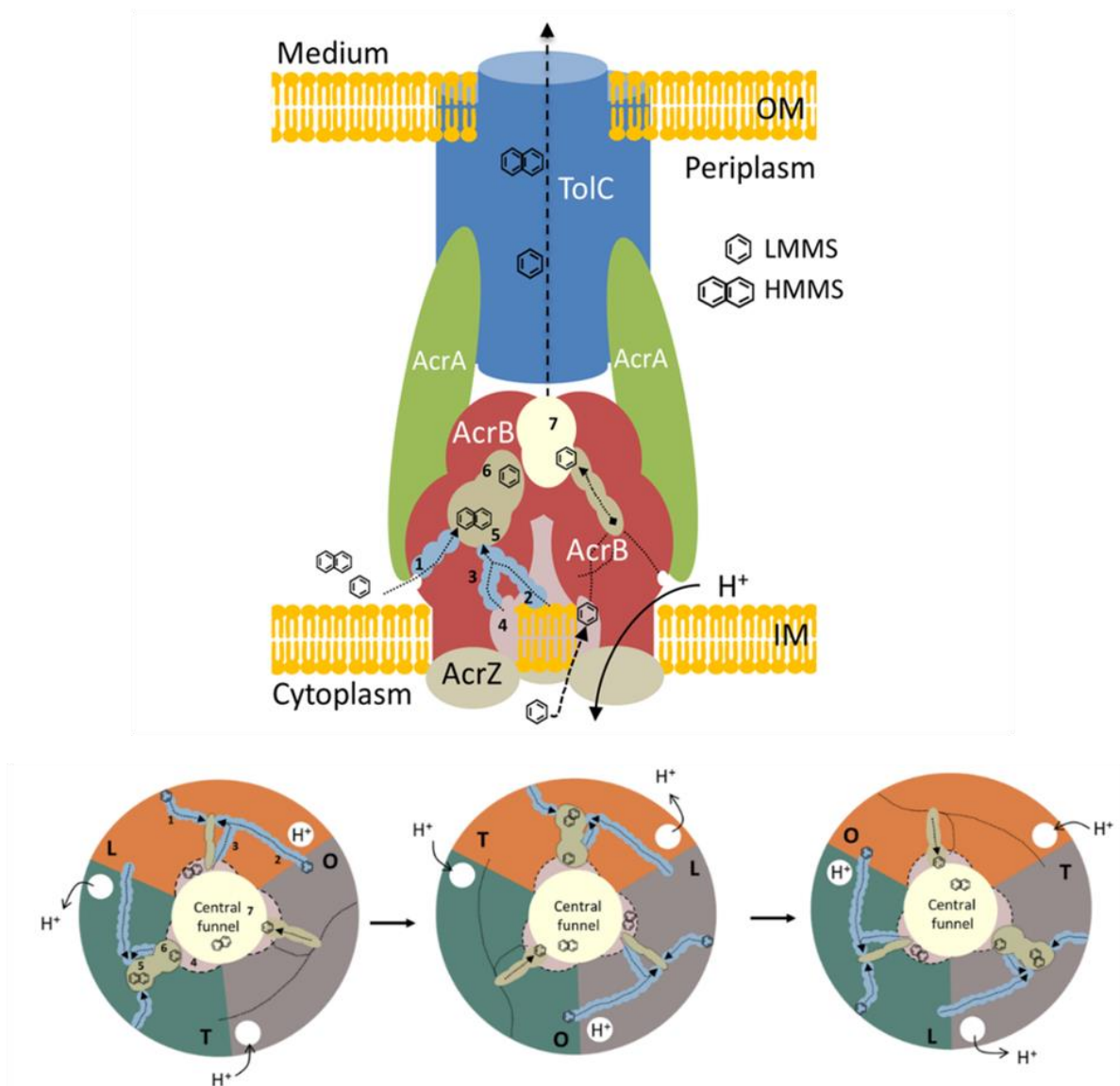


Abbildung 1.1: Schematische Darstellung von AcrABZ-TolC (oben) und Darstellung des Pumpmechanismus von AcrB (unten) (Anes et al., 2015); LMMS = niedermolekulare Substanzen, HMMS = hochmolekulare Substanzen, IM = innere Membran, OM = äußere Membran; L, T und O = Konformationen der einzelnen Protomere; Nr. 1-7 = Eintritts- und Transportwege für Substrate im AcrABZ-TolC-Komplex

Der Pumpmechanismus von AcrB basiert auf einem rotierenden Mechanismus, welcher ausgehend von einer asymmetrischen Struktur durch unterschiedliche Konformationen jedes einzelnen Protomers gebildet wird (Abb. 1.1) (Murakami et al., 2006). Bei den Konformationen handelt es sich um die L-Konformation (*loose*), in der die Substanzen eintreten, der T-Konformation (*tight*), in der die Bindung des Substrates erfolgt und der O-Konformation (*open*), in der der Zugang zum Kanal geöffnet wird. In der L-Konformation kann die Substanz über drei Eingänge in die Proteinstruktur eintreten: über die untere Vertiefung (Abb. 1.1 Nr. 1), welche an der periplasmatischen Seite liegt, über einen Bereich zwischen den Protomeren (Abb. 1.1 Nr. 2) oder über einen Eingang direkt an dem zentralen Hohlraum (Abb. 1.1 Nr. 3 und 4), welcher für den Transport cytosolischer Substanzen fungiert. Nach dem Eintritt der Substanz erfolgt die Bindung im Inneren der periplasmatischen Domäne. Während hochmolekulare Substanzen in der proximalen Bindungstasche (Abb. 1.1 Nr. 5) binden, binden niedermolekulare Substanzen auf der anderen Seite, in der sogenannten distalen Bindungstasche (Abb. 1.1 Nr. 6). Anschließend erfolgen in der O-Konformation durch die Protonierung der zentralen Helix die Schließung der Eintrittskanäle und die Öffnung zum zentralen Kanal. Die Bindungstaschen weichen zurück, das Substrat bindet an die TolC-Domäne und wird über das äußere Membranprotein aus der Zelle eliminiert.

1.1.3 Das äußere Membranprotein TolC

1.1.3.1 Struktur und Regulation von TolC

Das Protein TolC und seine Homologen gehören zu den äußeren Membranproteinen und sind bei gramnegativen Bakterien verbreitet (Andersen, Hughes, & Koronakis, 2000; Koronakis, Eswaran, & Hughes, 2004; Paulsen et al., 1997). In *E. coli* fungiert TolC als Komponente von Effluxpumpkomplexen in Kombination mit Transportproteinen aus der RND-Familie (z.B. AcrAB-TolC, AcrEF-TolC, MdtABC-TolC), der ABC-Familie (MacAB-TolC) und der MF-Superfamilie (z.B. EmrAB-TolC) sowie als Komponente von Typ-I-Sekretionssystemen (HyBD-TolC, CvaBA-TolC), wobei das Transportprotein und das äußere Membranprotein über ein Membranfusionsprotein miteinander verbunden sind (Koronakis et al., 2004; Nagakubo et al., 2002). TolC liegt als Homotrimer vor, welche zusammen ein 12-strängiges β -Barrel, eine α -helikale Domäne und eine gemischten äquatoriale α/β -Domäne ausbilden (Abb. 1.2) (Koronakis et al., 2000). Die β -Barrel-Domäne ist in der äußeren Membran eingebettet und grenzt an die α -helikale Domäne, welche einen etwa 100 Å langen und 30 Å breiten Kanal ins Periplasma bildet (Vaccaro, Scott, & Sansom, 2008). Ein für äußere Membranproteine charakteristisches Merkmal ist das Strukturmotiv des Coiled-Coil, welches eine Helix in einer Helix beschreibt und vergleichbar mit der Form einer gewundenen Schraube ist (Johnson & Church, 1999). Das Strukturmotiv findet sich in der α -Domäne von TolC wieder. Das Innere des Kanals ist vorwiegend unpolar, wird jedoch zum periplasmatischen Ende hin zunehmend elektronegativer (Koronakis et al., 2000). Der Öffnungsmechanismus am periplasmatischen Ende von TolC wird als allosterischer Mechanismus postuliert

(Koronakis et al., 2000). Hierbei wird im geschlossenen Zustand die Öffnung des Kanals durch die inneren Helices (H7/H8) der drei Protomere verengt, während sich diese im geöffneten Zustand zu den äußeren Helices (H3/H4) ausrichten und den Eingang für den Transport von Substanzen freigeben (Zgurskaya et al., 2011). Eine Besonderheit von TolC im Vergleich zu anderen äußeren Membranproteinen ist die Bildung eines gemeinsamen Kanals der Protomere [26].

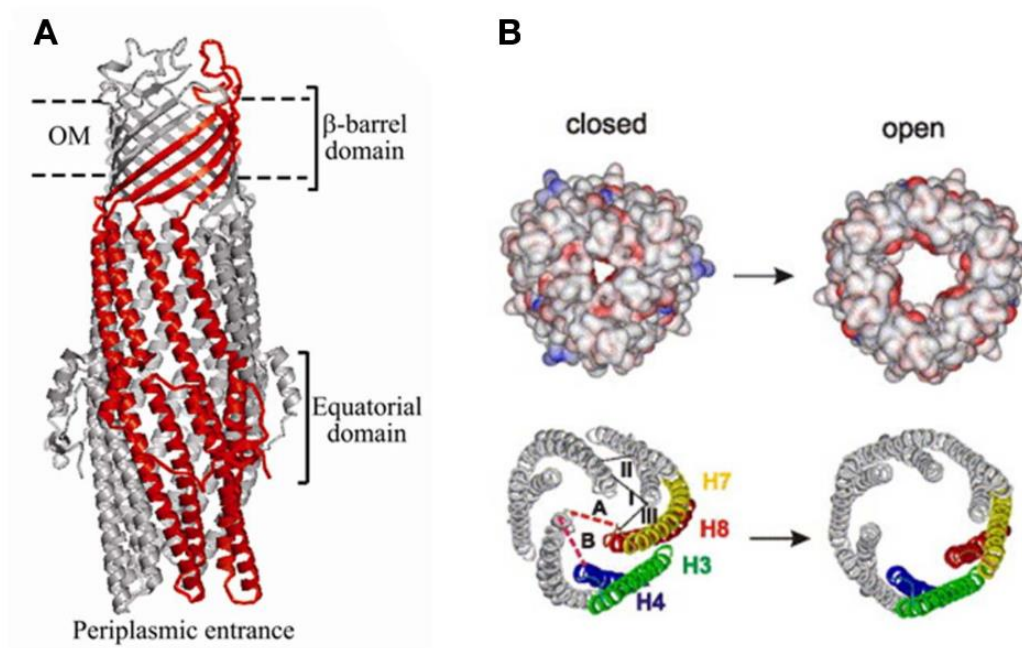


Abbildung 1.2: (A) Ribbon-Darstellung von TolC, ein Protomer ist rot dargestellt, OM = äußere Membran; (B) Modell von TolC im geöffneten und geschlossenen Zustand, dargestellt als Ansicht ausgehend vom periplasmatischen Ende (Zgurskaya et al., 2011)

Das Gen *tolC* ist, unabhängig vom *acrAB*-Locus, gemeinsam mit den Genen *ygiB* und *ygiC*, vier Promotoren (p1 – p4), einer *marbox* und einer PhoP-Bindestelle in einem Operon organisiert. Die Transkription über die Promotoren p3 und p4 wird über die *marbox* reguliert, der Bindungsstelle für die globalen Transkriptionsfaktoren MarA, SoxS und Rob (Zhang, Rosner, & Martin, 2008). Das *marA/soxS/rob*-Regulon schließt über 40 Gene ein und ist an der Resistenz gegenüber multiplen Antibiotika, Xenobiotika und Hyperoxid beteiligt (Rosner & Martin, 2009). Die Transkription über den Promotor p2 erfolgt in Abhängigkeit der Zwei-Komponenten-Systeme EvgAS und PhoPQ (Eguchi et al., 2003). Eine Regulation von p1 über die Transkriptionsfaktoren oder die beiden Zwei-Komponenten-Systeme liegt nicht vor (Zhang et al., 2008).

1.1.3.2 Charakteristika von *tolC*-Mutanten

Wie in Abbildung 1.3 dargestellt, ist TolC als essentielle Komponente diverser Effluxpumpkomplexe direkt und indirekt an zahlreichen Prozessen in der Zelle beteiligt, wodurch der vielseitige Phänotyp von *tolC*-Mutanten begründet ist. Durch den verringerten Efflux, welcher vorwiegend durch den Funktionsverlust von AcrAB-TolC hervorgerufen wird, weisen *tolC*-Mutanten eine erhöhte Empfindlichkeit gegenüber Gallensalzen, einer Vielzahl an Antibiotika, Farbstoffen, organischen Lösungsmittel und Detergenzien auf. Beispiele hierfür umfassen β -Laktamantibiotika, Chloramphenicol, Fluorchinolone, Novobiocin, Tetracycline, SDS, Acriflavin und viele weitere (Sulavik et al., 2001). Darüber hinaus zeigen *tolC*-Mutanten eine verringerte Virulenz, basierend auf der direkten Beteiligung von TolC an der Sekretion von Toxinen, wie α -Hämolsin oder den hitzestabilen Enterotoxinen I und II (Wandersman & Delepelaire, 1990; Yamanaka et al., 2008; Yamanaka et al., 1998; Zgurskaya et al., 2011). Aufgrund der Beteiligung von TolC am CvaAB-TolC-Komplex und an der Funktion der YojI-Effluxpumpe sind sie außerdem unfähig zur Sekretion der antibiotischen Peptide Colicin V und Microcin J25 (Delgado et al., 2005; Gilson, Mahanty, & Kolter, 1990). Ein weiteres Charakteristikum stellt die erhöhte Säureempfindlichkeit dar, welche auf die TolC-abhängige Expression der Glutamat-Decarboxylase zurückgeführt wird, einem an der Säureresistenz beteiligten Enzym (AR2 – *acid resistance system 2*) (Deininger et al., 2011; Foster, 2004). Zusätzlich stellt TolC eine Komponente der EmrAB-TolC- und der MdtABC-TolC-Komplexe dar, Effluxpumpkomplexe, die zum Überleben in saurem Milieu beitragen. Neben dem Export exogener Substanzen, wie z.B. Antibiotika, ist TolC auch am Transport endogener Substanzen, wie Porphyrine und Siderophore (Enterobactin) beteiligt (Bleuel et al., 2005; Tatsumi & Wachi, 2008). Eine erhöhte Empfindlichkeit gegenüber mit Cystein supplementiertem Medium ist für *tolC*-Mutanten ebenfalls beschrieben (Wiriyathanawudhiwong et al., 2009). Ein noch nicht vollständig geklärtes Charakteristikum von *tolC*-Mutanten stellt das Wachstumsdefizit in Glukose-haltigem M9-Medium dar (Dhamdhare & Zgurskaya, 2010; Vega & Young, 2014). Während $\Delta tolC$ -Mutanten in dem Komplexmedium LB ein im Vergleich zum Wildtyp normales Wachstum aufweisen, führt in M9-Medium der Verlust von TolC zu Zellteilungsdefekten, einer reduzierten Wachstumsrate, einer verlängerten Lag-Phase und einer veränderten Morphologie (Dhamdhare & Zgurskaya, 2010; Vega & Young, 2014). Die morphologischen Veränderungen umfassen die Verlängerung der Zellen, variable Durchmesser und kugelförmige Ausbuchtungen vorwiegend in der Zellmitte (Vega & Young, 2014). Dhamdhare et al. beschreiben die Ursachen des Wachstumsdefizites in einer Erschöpfung von NAD^+ , welches in einem hohen $NADH/NAD^+$ -Verhältnis resultiert sowie als Folge von Stress an der Cytoplasmamembran. Das hohe $NADH/NAD^+$ -Verhältnis wird mit der mangelnden Oxidation von NADH durch die NADH-Dehydrogenasen begründet und führt zu einer Reduktion der protonenmotorischen Kraft. Als zusätzlicher Effekt hoher NADH-Konzentrationen werden Enzyme des Citratzyklus, wie die Citratsynthase und die Malat-Dehydrogenase gehemmt (Pruss et al., 1994). Der Membranstress wird durch die hohen Konzentrationen an PspA (Phagen Shock Protein A), einem Protein, das bei Membranstress und Abnahme der PMF induziert wird, widerspiegelt. Die Vorgänge in einer $\Delta tolC$ -Mutante in M9-Medium führen zum „metabolischen Abschalten“ der Zelle (Dhamdhare & Zgurskaya, 2010).

Eine weitere Eigenschaft von *tolC*-Mutanten ist die erhöhte Expression von *marRAB* und *soxS* sowie die erhöhte Aktivität des Transkriptionsfaktors Rob (Rosner & Martin, 2009). Die Aktivierung des *mar/sox/rob*-Regulons führt durch die erhöhte RNA-Synthese von MicF, einer regulatorischen antisense-RNA, zu Veränderungen der Porinanteile von OmpC und OmpF in der äußeren Membran. Während in *tolC*-Mutanten nur geringe Mengen an OmpF vorliegen, stellt OmpC das bevorzugte Porin dar (Chubiz & Rao, 2011; Misra & Reeves, 1987). Das periplasmatische Chaperon Spy ist ebenfalls in *tolC*-Mutanten überexprimiert.

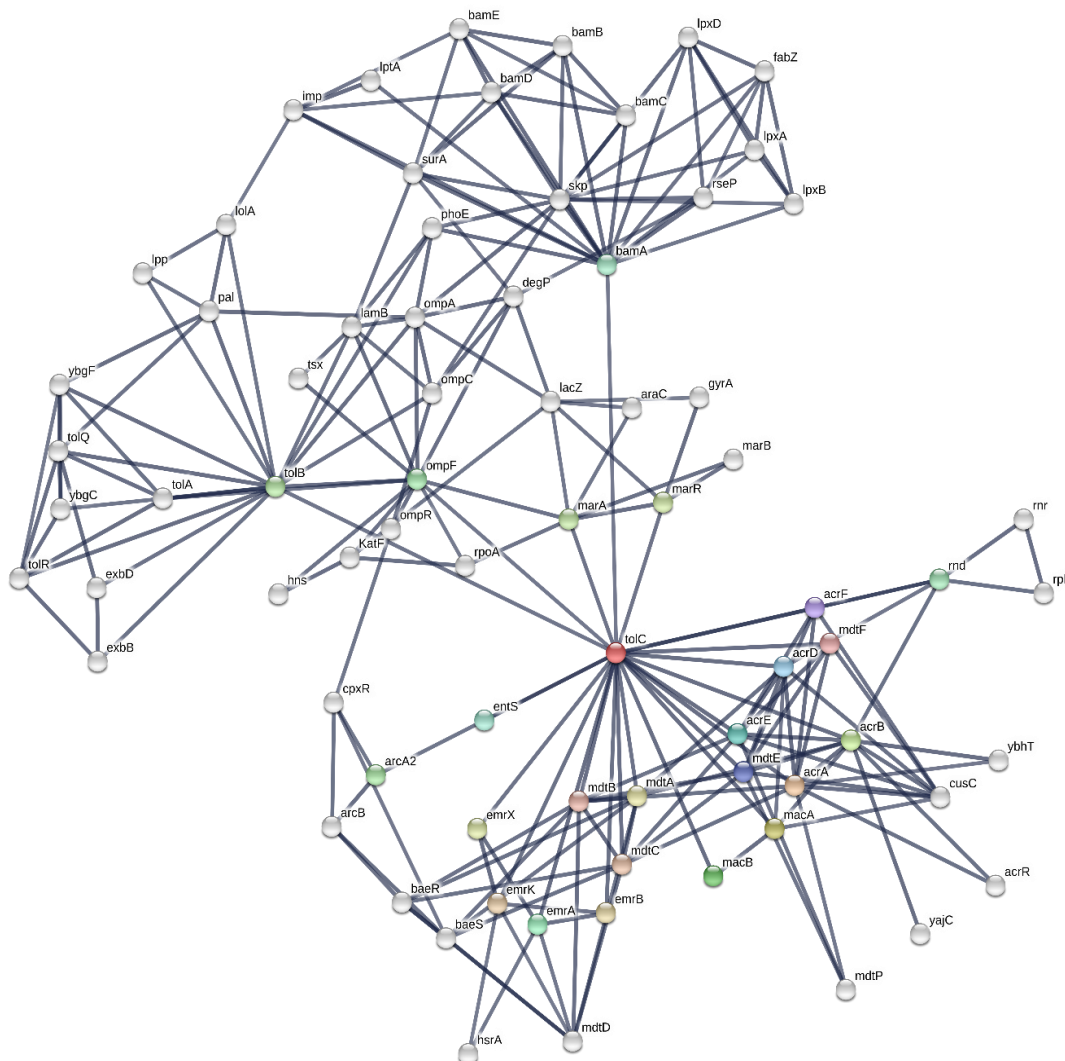


Abbildung 1.3: Direkte und indirekte Interaktionen von TolC in *E. coli* MG1655 (Jensen et al., 2009); maximale Anzahl der Interaktionen in der Darstellung begrenzt auf 50; direkte Interaktionen = farbige Kreise, indirekte Interaktionen = graue Kreise

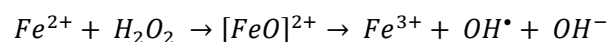
1.2 Reaktive Sauerstoffspezies

Reaktive Sauerstoffspezies (ROS) sind toxische Formen des Sauerstoffs, die aufgrund ihrer hohen Reaktivität zu Schäden an DNA, RNA, Lipiden oder Proteinen bzw. bei Überschreiten zellulärer Detoxifizierungs- und Reparaturmaßnahmen zu Mutationen oder zum Zelltod führen können. Die Beteiligung von ROS an der

Wirksamkeit von Antibiotika stellt eine kontrovers diskutierte Thematik dar, worauf auch in dieser Arbeit Bezug genommen wird. Im Folgenden werden daher die Ursachen und primäre Bildungsorte von ROS in der Zelle, die durch ROS verursachten Schäden, die Detoxifizierung von ROS und die bei oxidativem Stress aktivierten Schutzsysteme sowie die Hypothese eines gemeinsamen Wirkmechanismus bakterizider Antibiotika basierend auf einer gesteigerten ROS-Bildung beschrieben.

1.2.1 Endogene und exogene Ursachen der ROS-Bildung

Die ROS von größter Bedeutung für die Zellschädigung stellen das Hyperoxid-Anion ($O_2^{\bullet-}$), das Hydroxyl-Radikal ($OH^\bullet$) sowie Wasserstoffperoxid (H_2O_2) dar. Sie entstehen vermehrt unter oxidativem Stress oder als Nebenprodukte im Rahmen metabolischer Prozesse durch die Übertragung von Elektronen auf O_2 . Aufgrund seiner Elektronenpaarkonfiguration ist O_2 gezwungen einzelne Elektronen nach einander aufzunehmen. Die Aufnahme des ersten Elektrons führt zur Bildung von $O_2^{\bullet-}$, die eines weiteren zu H_2O_2 . In den meisten Fällen erfolgt die Aufnahme des zweiten Elektrons unmittelbar, sodass nur wenig $O_2^{\bullet-}$ von den aktiven Zentren der Enzyme wegdiffundiert (Seaver & Imlay, 2004). Die enzymkatalysierte Umwandlung von $O_2^{\bullet-}$ zu H_2O_2 durch die Superoxiddismutase reduziert darüber hinaus weiter den Pool an $O_2^{\bullet-}$. Ausgehend von H_2O_2 erfolgt über die Eisen-katalysierte Fenton-Reaktion die Bildung von $OH^\bullet$ (Formel 1.1).



Formel 1.1: Fenton-Reaktion

Die Ein-Elektronen-Reduktion sowie das leicht negative Reduktionspotential (-0,16 V) sind ursächlich dafür, dass O_2 für die erste Elektronenaufnahme univalente Elektronendonatoren mit einem möglichst hohen positiven Reduktionspotential benötigt. Gute Elektronendonatoren, die mittels Autoxidation diese Kriterien erfüllen, bilden Metallzentren, Flavine und Chinone, wie sie beispielsweise als essentielle Komponenten in den Enzymen der Elektronentransportkette vorkommen. Diesbezüglich stellen die NADH-Dehydrogenase II, die Sulfit-Reduktase, die Succinat-Dehydrogenase und die Fumarat-Dehydrogenase relevante Elektronendonatoren dar (Imlay, 1995; Messner & Imlay, 1999, 2002). Während die größte Menge an $O_2^{\bullet-}$ über die Elektronentransportkette gebildet wird, liegt der primäre Bildungsort für H_2O_2 außerhalb hiervon (Korshunov & Imlay, 2006). Untersuchungen mit Knockout-Mutanten respiratorischer Enzyme zeigten, dass die Menge an gebildetem H_2O_2 in den Mutanten im Vergleich zum Wildtyp nicht signifikant reduziert war. Hieraus resultierte die Schlussfolgerung, dass der primäre Bildungsort von H_2O_2 nicht die Enzyme der Elektronentransportkette, sondern nicht-respiratorische Flavoproteine darstellen (Korshunov & Imlay, 2010; Seaver & Imlay, 2004).

Neben der endogenen ROS-Bildung als Nebenprodukt metabolischer Prozesse existieren weitere exogene Ursachen für die Entstehung von ROS. Hierzu zählen unter anderem Hyperoxie, Redoxreaktionen eingehende Substanzen, die externe Zugabe von H_2O_2 und Schwermetalle. Darüber hinaus wird derzeit die verstärkte Bildung von ROS als Ursache der letalen Wirkung bakterizider Antibiotika diskutiert (Kapitel 1.2.5).

1.2.1.1 Die Elektronentransportkette von *E. coli*

Als fakultativ anaerober Erreger ist *E. coli* in der Lage sowohl bei Anwesenheit von Sauerstoff als auch unter anoxischen Bedingungen zu überleben. Ist Sauerstoff vorhanden, nutzt *E. coli* die aerobe Atmung, den Stoffwechselweg der höchsten Energiegewinnung. Bei Abwesenheit von Sauerstoff wird auf die weniger energieliefernden Wege der anaeroben Atmung oder der gemischten Säuregärung zurückgegriffen. Die Verwendung der jeweiligen Energiequelle ist abhängig vom Angebot an Elektronenakzeptoren, wobei immer der Stoffwechselweg mit der möglichst größten ATP-Ausbeute und Energiegewinnung genutzt wird. Das Umschalten auf den jeweiligen Stoffwechselweg erfolgt in Abhängigkeit der vorliegenden Elektronenakzeptoren durch die Regulation auf transkriptionaler Ebene.

Bei der Elektronentransportkette von *E. coli* handelt es sich um eine verzweigte Form, die je nach Sauerstoffangebot und Vorliegen entsprechender Elektronenakzeptoren und –donatoren, ein Überleben unter verschiedenen Umweltbedingungen ermöglicht. Die Komponenten der Elektronentransportkette bilden Dehydrogenasen, die cytoplasmatische Elektronendonatoren oxidieren und Elektronen in die Transportkette einspeisen, membranassoziierte Chinone, welche die Elektronen weiterleiten und terminale Reduktasen, die die zu Chinolen reduzierten Chinone wieder oxidieren und die terminalen Elektronenakzeptoren reduzieren. Die Cytochrom-c-Reduktase bzw. der Cytochrom-*bc₁*-Komplex, wie in der mitochondrialen Atmungskette vorhanden, liegt in *E. coli* nicht vor. Für die Elektronentransportkette kann *E. coli* auf insgesamt 15 verschiedene primäre Dehydrogenasen, drei Chinone sowie 10 terminale Reduktasen zurückgreifen, wobei im Folgenden nur auf die dominierenden Vorgänge und Enzyme unter aeroben Bedingungen eingegangen wird (Unden & Bongaerts, 1997). Die wichtigsten Dehydrogenasen unter aeroben Bedingungen bilden die NADH-Dehydrogenasen I und II sowie die Succinat-Dehydrogenase, die eine direkte Verbindung zwischen dem Citratzyklus und der Atmungskette vermittelt (Henkel et al., 2014). Entscheidende terminale Oxidoreduktasen sind die Cytochrom-*bo₃*-Oxidase, die Cytochrom-*bdl*-Oxidase und die Cytochrom-*bdII*-Oxidase (Henkel et al., 2014). Als Chinon der aeroben Atmung wird Ubichinon verwendet. Die einzigen Protonen translozierenden Enzyme, die somit zur Ausbildung eines Protonengradienten führen, stellen die NADH-Dehydrogenase I und die Cytochrom-*bo₃*-Oxidase dar.

Die NADH-Dehydrogenase I ist ein aus 13 Untereinheiten bestehender Komplex, homolog zum Komplex I der mitochondrialen Atmungskette, der durch das 15 kb große *nuo*-Operon kodiert wird. Das Enzym wird

sowohl unter aeroben als auch unter anaeroben Bedingungen exprimiert. Der Komplex besitzt eine L-förmige Proteinstruktur, bestehend aus einem peripheren ins Cytosol hineinreichenden Arm und einer in der Membran eingelagerten hydrophoben Basis (Guenebaut et al., 1998). Innerhalb dieser L-förmigen Proteinstruktur lässt sich der Komplex der NADH-Dehydrogenase in drei Module einteilen: das hydrophile NADH-Dehydrogenasemodul, kodiert durch die Gene *nuoEFG*, welches den Elektroneneingang darstellt und das Flavoprotein FMN sowie sechs Eisen-Schwefel-Cluster (FeS-Cluster) trägt, das amphiphile Hydrogenasemodul, welches aus dem Verbindungsfragment (NuoBCDI) mit drei weiteren FeS-Clustern und den zwei membranständigen Untereinheiten NuoH und NuoN besteht sowie das Transportmodul, kodiert durch die Gene *nuoAJKLM*, dessen Beteiligung an der Translokation der Protonen vermutet wird (Friedrich, Dekovic, & Burschel, 2016). Der Elektronentransfer beginnt mit der Bindung von $\text{NADH} + \text{H}^+$ an der Untereinheit NuoF und der Übertragung von jeweils zwei Elektronen und zwei Protonen auf FMN. Die Elektronen werden weiter entlang der FeS-Cluster auf Ubichinon übertragen, wodurch dieses zu Ubichinol reduziert wird. An der NADH-Dehydrogenase I findet pro Molekül $\text{NADH} + \text{H}^+$ eine Translokation von vier Protonen über die Cytoplasmamembran statt, entsprechend einem H^+/e^- -Verhältnis von zwei (Unden, Steinmetz, & Degreif-Dunnwald, 2014). Der hierbei stattfindende Mechanismus der Translokation ist noch nicht vollständig geklärt (Friedrich & Pohl, 2007).

Im Gegensatz zur komplexen Struktur der NADH-Dehydrogenase I handelt es sich bei der NADH-Dehydrogenase II um ein einzelnes membranständiges Protein, kodiert durch das Gen *ndh*. Das Enzym besitzt weder FeS-Cluster noch FMN, einziger Cofaktor ist FAD. Da die NADH-Dehydrogenase II auch keine metallischen prosthetischen Gruppen trägt, wird eine direkte Übertragung der Elektronen vom reduzierten FADH_2 auf Ubichinon vermutet. Eine Translokation von Protonen findet nicht statt. Während die Expression nur unter aeroben Bedingungen erfolgt, ist sie unter anaeroben Bedingungen durch den Transkriptionsaktivator FNR reprimiert (Green & Guest, 1994; Spiro, Roberts, & Guest, 1989). Entsprechend liegen beide NADH-Dehydrogenasen unter aeroben Bedingungen vor.

Die Succinat-Dehydrogenase stellt eine weitere unter aeroben Bedingungen exprimierte Dehydrogenase der Elektronentransportkette dar. Den Elektronendonator bildet hier Succinat, das unter Reduktion von Ubichinon zu Fumarat oxidiert wird. Die Succinat-Dehydrogenase wird durch das *sdh*-Operon kodiert und besteht aus den vier Untereinheiten SdhA, SdhB, SdhC und SdhD. Während die hydrophilen Untereinheiten SdhA und SdhB für die Oxidationsreaktion von Succinat essentiell sind, bilden die hydrophoben Untereinheiten SdhC und SdhD die entscheidenden Domänen der Chinon-Oxidoreduktase-Aktivität sowie den Anker in der Cytoplasmamembran (Tomasiak, Cecchini, & Iverson, 2007). Als Cofaktoren dienen FAD, welches kovalent gebunden mit der SdhA-Untereinheit vorliegt, ein Häm-Molekül vom Typ b, das in der Membrandomäne lokalisiert ist sowie drei FeS-Cluster innerhalb von SdhB.

Als terminale Reduktasen nutzt *E. coli* die Cytochrom-*bo*₃-Oxidase und die Cytochrom-*bd*-Oxidasen, wobei Erstere bei hohem Sauerstoffangebot und zur Oxidation von Ubichinol bevorzugt wird. Bei Abnahme der Sauerstoffkonzentration wird die Cytochrom-*bdI*-Oxidase verstärkt exprimiert, die zusätzlich die Fähigkeit zur Oxidation von Menachinol besitzt, das bei geringem Sauerstoffangebot vermehrt vorliegt. Für die Reduktion von O₂ zu zwei H₂O werden vier Elektronen, welche von zwei Molekülen Ubichinol auf der periplasmatischen Seite der Membran geliefert werden sowie vier Protonen aus dem Cytosol benötigt. Die hierbei freiwerdende Energie wird von der Cytochrom-*bo*₃-Oxidase zur Translokation von vier Protonen aus dem Cytosol genutzt, sodass ein H⁺/e⁻-Verhältnis von zwei resultiert. Im Gegensatz zur Cytochrom-*bo*₃-Oxidase ist die Cytochrom-*bd*-Oxidase nicht zur Translokation von Protonen fähig und überträgt die Elektronen von NADH + H⁺ über FAD auf die respiratorischen Chinone (Friedrich & Pohl, 2007; Uden et al., 2014).

Neben der Cytochrom-*bdI*-Oxidase wurde in *E. coli* eine zweite Oxidase, die Cytochrom-*bdII*-Oxidase nachgewiesen, die durch die Gene *cyxA* und *cyxB* kodiert wird. Bedingungen für die Expression der Cytochrom-*bdII*-Oxidase sind Phosphatmangel, der Übertritt in die stationäre Phase sowie anaerobe Bedingungen (Atlung & Brondsted, 1994; Brondsted & Atlung, 1996).

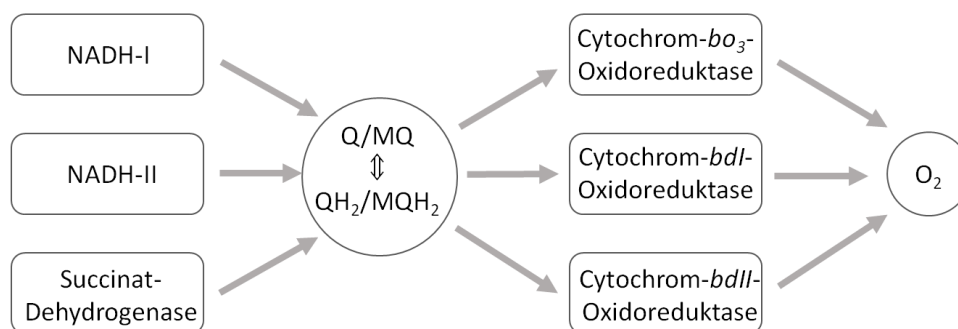


Abbildung 1.4: Vereinfachte Darstellung der Elektronentransportkette von *E. coli* unter aeroben Bedingungen nach (Borisov et al., 2011); Q = Ubichinon, QH₂ = Ubichinol, MQ = Menachinon, MQH₂ = Menachinol

1.2.2 Schäden durch ROS

ROS-bedingte Schäden der Zelle sind vielseitig und reichen von Mutationen, Störungen von Biosynthesewegen oder Stoffwechselwegen bis hin zum Zelltod. Das Ausmaß der Schädigung ist dabei von der jeweiligen ROS abhängig. Ein direktes Ziel von O₂^{•-} und H₂O₂ stellen die FeS-Cluster von Dehydratasen dar, deren [4Fe-4S]²⁺-Cluster direkt an der Substratbindung und Dehydratisierungsreaktion beteiligt sind und daher frei zugänglich und somit angreifbar für ROS sind. Beispiele hierfür bilden die Dihydroxysäure-Dehydratase aus dem Biosyntheseweg verzweigter Aminosäuren und Enzyme des TCA, wie die Aconitase B und die

Fumarasen A und B (Flint, Tuminello, & Emptage, 1993). Die Fumarase C, die im Gegensatz zu den Fumarasen A und B keine FeS-Cluster enthält, sowie die gegen $O_2^{\bullet-}$ unempfindlichere Aconitase A ersetzen bei oxidativem Stress daher die sensitiveren Enzyme (Imlay, 2013; Liochev & Fridovich, 1992; Varghese, Tang, & Imlay, 2003). Die Oxidation des $[4Fe-4S]^{2+}$ -Clusters durch $O_2^{\bullet-}$ führt unter Bildung von H_2O_2 über das instabile Zwischenprodukt $[4Fe-4S]^{3+}$ zur Freisetzung von Fe^{2+} und zum $[3Fe-4S]^+$ -Cluster. Das freigesetzte Fe^{2+} bildete im Cluster das katalytische Fe-Atom und vermittelt die Substratbindung des Enzyms. Die Freisetzung von Fe^{2+} hat die Inaktivierung des Enzyms und die Störung des jeweiligen Signal- oder Stoffwechselweges zur Folge (Flint et al., 1993; Imlay, 2013; Varghese et al., 2003). Bei der Oxidation durch H_2O_2 werden dem $[4Fe-4S]^{2+}$ -Cluster zwei Elektronen entzogen, sodass H_2O_2 zu Wasser reduziert und unter Freisetzung von Fe^{3+} ebenfalls, wie unter der Oxidation durch $O_2^{\bullet-}$, der $[3Fe-4S]^+$ -Cluster gebildet wird. Durch Reduktion und unter Anwesenheit von Fe^{2+} sind sowohl durch $O_2^{\bullet-}$ als auch durch H_2O_2 geschädigte Cluster wieder vollständig regenerierbar (Imlay, 2013). Im Gegensatz zu den ungeschützt lokalisierten Clustern der Dehydratasen sind die FeS-Cluster respiratorischer Enzyme von dem Angriff durch $O_2^{\bullet-}$ und H_2O_2 weitestgehend geschützt.

Die Inaktivierung von Enzymen mit einem zweiwertigen Eisenatom als prosthetische Gruppe stellt ein weiteres direktes Ziel von ROS dar. Analog der Dehydratasen ist das Fe^{2+} bei den entsprechenden Enzymen an der Substratbindung beteiligt. Die Inaktivierung kann sowohl durch $O_2^{\bullet-}$ als auch durch H_2O_2 erfolgen. Die Oxidation durch $O_2^{\bullet-}$ führt zur Freisetzung von Fe^{2+} und der Bildung von H_2O_2 ohne das Fe^{2+} -lose Apoenzym irreversibel zu schädigen. Durch Metallisation kann das Enzym wieder vollständig regeneriert werden, wobei der sich wiederholende Prozess aus Oxidation und Regenerierung die Wahrscheinlichkeit zur Substitution von Fe^{2+} gegen Zn^{2+} erhöht. In Abhängigkeit des jeweiligen Enzyms kann dieses zu einer reduzierten Enzymaktivität führen (Imlay, 2013; Sobota & Imlay, 2011). Die Oxidation der Enzyme durch H_2O_2 verläuft als Fenton-Reaktion (Kapitel 1.2.1) und führt zur Bildung von Fe^{3+} sowie OH^- und $OH^\bullet$. Eine Inaktivierung des Enzyms kann durch die Oxidation des katalytischen Fe^{2+} zu Fe^{3+} sowie aus der teilweisen Zerstörung von Polypeptiden durch das gebildete $OH^\bullet$ erfolgen. Im Gegensatz zur Oxidation durch $O_2^{\bullet-}$ ist eine vollständige Regenerierung des Enzyms nur bedingt möglich und von der Beteiligung zusätzlicher Fe^{2+} -koordinierender Cysteinreste abhängig. Diese werden durch das Zwischenprodukt der Fenton-Reaktion $[FeO]^{2+}$ zu Sulfensäuren oxidiert, wodurch die Reaktion vor der proteinschädigenden $OH^\bullet$ -Bildung unterbrochen wird (Anjem & Imlay, 2012; Imlay, 2013). Nach Reduktion der Sulfensäuren durch zelluläre Reduktionsmittel und Remetallisierung kann das Enzym in seiner Aktivität wiederhergestellt werden. Die längere Exposition mit H_2O_2 führt, vermutlich aufgrund der weiteren Oxidation zu Sulfin- und Sulfonsäuren, zu irreversiblen Schäden (Anjem & Imlay, 2012).

Die Cystein- und Methioninreste von Proteinen ohne Cluster oder Fe^{2+} stellen vermutlich kein primäres Ziel der ROS dar. Obwohl die Reste oxidierbar sind, ist die Geschwindigkeitskonstante der Oxidation sowohl für Cystein- als auch für Methioninreste zu gering um Wachstumsdefizite erklären zu können (Imlay, 2013).

Eine Ausnahme hiervon bilden die Thiole des Regulatorproteins OxyR (Kapitel 1.2.4), die eine ungewöhnlich hohe Reaktivität aufweisen und durch H_2O_2 leicht oxidiert werden können (Aslund et al., 1999). Die Ursachen hierfür sind bisweilen ungeklärt.

Im Gegensatz zu $\text{O}_2^{\bullet-}$ und H_2O_2 , die DNA nicht direkt schädigen, reagiert $\text{OH}^\bullet$ mit nahezu allen organischen Molekülen, inklusive den Basen und Riboserechten der DNA. Hiervon ist insbesondere Guanin betroffen, das aufgrund seines niedrigen Reduktionspotentials leichter als die anderen Basen oxidierbar ist. Eines der häufigsten Produkte bei der Oxidation von Guanin ist 8-Oxo-Guanin (7,8-Dihydro-8-Oxoguanin), das aufgrund seiner möglichen Fehlpaarung mit Adenin ein hohes mutagenes Potential aufweist (Foti et al., 2012; Neeley & Essigmann, 2006). Die Folgen der Basenfehlpaarung sind je nachdem, ob es sich bei dem Guanin um freies oder bei der Replikation im Matrizenstrang gebundenes Guanin handelt, eine Transversion von A nach C bzw. von G nach T.

In Eukaryoten stellt die Peroxidation von Lipiden eine häufige Konsequenz von oxidativem Stress dar. Im Gegensatz hierzu sind die meisten Prokaryoten, einschließlich *E. coli*, zur Synthese mehrfach ungesättigter Fettsäuren, welche leicht der Peroxidreaktion unterliegen, unfähig (Nichols & McMeekin, 2002). Die Peroxidation von Lipiden in *E. coli* durch ROS wurde daher zunächst als unwahrscheinlich betrachtet (Imlay, 2003; Imlay, 2013). Untersuchungen zur Reaktivität von mehrfach ungesättigten Fettsäuren und der einfach ungesättigten Ölsäure mit Peroxid-Radikalen unterstützten zusätzlich diese Hypothese (Bielski, Arudi, & Sutherland, 1983). Weiterführende Ergebnisse, die einen direkten Zusammenhang zwischen dem Anteil an einfach ungesättigten Fettsäuren in der Membran und oxidativem Stress aufzeigen sowie Ergebnisse mit dem Nachweis von Abbauprodukten der Lipidperoxidation sprechen jedoch für eine ROS-bedingte Lipidperoxidation (Joshi et al., 2011; Pradenas et al., 2012).

1.2.3 Enzymatische Detoxifizierung von ROS

Die kontinuierliche Reduzierung von ROS, hervorgerufen durch metabolische Prozesse als auch bedingt durch oxidativen Stress, stellt eine unverzichtbare Voraussetzung für das Überleben unter aeroben Bedingungen dar. Die Detoxifizierung der ROS erfolgt durch Superoxiddismutasen (SODs), die $\text{O}_2^{\bullet-}$ abfangen und in H_2O_2 überführen sowie durch Peroxidasen bzw. Katalasen, die H_2O_2 zu Wasser reduzieren. Enzyme zur Inaktivierung von $\text{OH}^\bullet$ sind nicht bekannt, wodurch neben der hohen Reaktivität auch das Ausmaß der starken Schädigung begründet ist. Zur Inaktivierung von $\text{O}_2^{\bullet-}$ besitzt *E. coli* drei Superoxiddismutasen: die cytoplasmatischen Isoenzyme MnSOD (SodA) und FeSOD (SodB) sowie die periplasmatische Cu-ZnSOD (SodC). Während es sich bei der FeSOD um eine konstitutiv exprimierte SOD handelt, die sowohl unter anaeroben als auch aeroben Bedingungen vorhanden ist, wird die MnSOD nur unter aeroben Bedingungen und oxida-

tivem Stress induziert und ist als Mitglied des SoxRS-Regulons (Kapitel 1.2.4) aktiv an der oxidativen Stressantwort beteiligt. Die Cu-ZnSOD wird aufgrund ihrer Lokalisation als Schutz gegen periplasmatisches $O_2^{\bullet-}$ vermutet (Korshunov & Imlay, 2006).

Die Detoxifizierung von H_2O_2 in *E. coli* erfolgt durch die Alkyl-Hydroperoxid-Reduktase (Ahp) sowie durch die Katalasen KatG und KatE. Die Alkyl-Hydroperoxid-Reduktase überträgt Elektronen von $NADH + H^+$ auf H_2O_2 , wodurch dieses zu Wasser reduziert wird. Das Enzym ist sowohl zur Reaktion mit organischen Hydroperoxiden fähig, als auch mit H_2O_2 und stellt unter normalen Wachstumsbedingungen das primäre Enzym zur Eliminierung von endogenem H_2O_2 dar (Seaver & Imlay, 2001). Die Katalase KatG besitzt im Gegensatz zu KatE bifunktionale Eigenschaften, indem sie sowohl eine Katalase- als auch eine Peroxidaseaktivität aufweist. Gemeinsam mit der Ahp wird die Expression der KatG unter oxidativem Stress stark über das OxyR-System (Kapitel 1.2.4) induziert. KatE wird dagegen in der stationären Phase oder unter hyperosmotischen Bedingungen vermehrt exprimiert.

1.2.4 Das OxyR- und SoxRS-System: Aktivierung von Schutzsystemen als Antwort auf oxidativen Stress

Als Antwort auf oxidativen Stress besitzt *E. coli* zwei primäre Schutzsysteme, das OxyR- und das SoxRS-System, welche die Expression von Genen zur Detoxifizierung von ROS, zur Reparatur entstandener Schäden, zum Erhalt bzw. Wiederherstellung der Redox-Balance und zur Adaption metabolischer Prozesse induzieren.

Das OxyR-System wird über den durch Anwesenheit von H_2O_2 stimulierten Transkriptionsaktivator OxyR aktiviert, welcher die Transkription der Gene des Regulons induziert. Die Aktivierung erfolgt durch die Oxidation eines Cysteinrestes zur Sulfensäure, der mit einem weiteren Cysteinrest unter Ausbildung einer intramolekularen Disulfidbrücke kondensiert und zur Konformationsänderung von OxyR führt. Das oxidierte OxyR bindet als Tetramer an die DNA und induziert darüber die Transkription der Gene des OxyR-Regulons. Zu den Mitgliedern des Regulons zählen etwa 40 Proteine, wie zum Beispiel die Hydrogenperoxidase I, die Alkylhydroperoxidase, die Glutathion-Reduktase und Glutaredoxin I. Darüber hinaus aktiviert OxyR die Synthese von OxyS, einer nicht-kodierenden regulatorischen sRNA (*small RNA*), welche als Komplex mit dem RNA-bindenden Protein Hfq an die Ribosomenbindestelle der regulierten Gene bindet (Zhang et al., 1998). Eine Zielstruktur von OxyS stellt RpoS dar, wodurch eine Verbindung zur generellen Stressantwort vermittelt wird.

Das SoxRS-System ist ein Zwei-Komponenten-System, bestehend aus dem Sensorprotein SoxR und dem Transkriptionsaktivator SoxS, welches bei Anwesenheit $O_2^{\bullet-}$ generierender Redox-Cycling-Substanzen, wie zum Beispiel Paraquat oder Menadion sowie Stickstoffmonoxid (NO) aktiviert wird (Gu & Imlay, 2011; Imlay,

2008). Untersuchungen mit SOD^- -Mutanten und *sodB*-Überexpressionsplasmiden zeigten, dass entgegen vorheriger Annahmen $\text{O}_2^{\bullet-}$ selbst nicht den direkten Induktor des Systems darstellt (Gu & Imlay, 2011). SoxR liegt als Homodimer vor, mit je einem [2Fe-2S]-Cluster pro Monomer. Bei Anwesenheit entsprechender Stimuli unterlaufen die Cluster eine reversible Ein-Elektronen-Oxidation, wodurch die Transkription von *soxS* aktiviert wird. Der Transkriptionsaktivator SoxS induziert daraufhin die Transkription der Gene des SoxRS-Regulons. Hierzu zählen unter anderem die MnSOD (SodA), die Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase (Zwf), die Fumarase C (FumC), die Aconitase A (AcnA), die sRNA MicF, der Eisenrepressor Fur sowie die Komponenten der Effluxpumpe AcrAB-TolC (Imlay, 2008; Zheng & Storz, 2000). Nach Beendigung des oxidativen Stresses wird SoxR reduziert und SoxS durch Proteolyse degradiert (Griffith, Shah, & Wolf, 2004; Koo et al., 2003). Als Teil des *marRAB/soxS/rob*-Regulons ist SoxS neben der Abwehr von oxidativem Stress zusätzlich an Prozessen zur Antibiotikaresistenz beteiligt.

1.2.5 ROS als Ursache der letalen Wirkung bakterizider Antibiotika

Im Jahr 2007 veröffentlichten Kohanski et al. einen neuen, revolutionären und zum Teil stark umstrittenen Ansatz zum Verständnis des Wirkmechanismus bakterizider Antibiotika (Kohanski et al., 2007). Die Verifizierung dieser Hypothese würde zu einem weiterführenden Verständnis der letalen Wirkung beitragen und eine Möglichkeit zur Entwicklung neuer Zielstrukturen aus Reparatur- und Schutzsystemen sowie zur Potenzierung der Wirkung bereits eingesetzter Antibiotika bieten. Die Grundlage der Hypothese bildet ein gemeinsamer, von der primären Zielstruktur unabhängiger, Wirkmechanismus bakterizider Antibiotika, welcher als Endprodukt einer metabolischen Kaskade in einer verstärkten Bildung von $\text{OH}^\bullet$ resultiert. Die erhöhte Konzentration intrazellulärer hochreaktiver $\text{OH}^\bullet$ führt zur irreparablen Schädigung an Biomolekülen und wird als Ursache für die letale Wirkung angesehen. Die Untersuchungen wurden vorwiegend mit *E. coli* und den bakteriziden Antibiotika Ampicillin, Norfloxacin und Kanamycin als Vertreter der umfangreichen und relevanten Antibiotikaklassen der β -Laktame (Kapitel 1.3.2.4), Chinolone (Kapitel 1.3.2.1.1) und Aminoglykoside (Kapitel 1.3.2.2.1) durchgeführt. Als Negativbeispiel für die Abwesenheit einer verstärkten $\text{OH}^\bullet$ -Bildung wurden die bakteriostatischen Antibiotika Spectinomycin, Erythromycin (Kapitel 1.3.2.2.3), Chloramphenicol (Kapitel 1.3.2.2.2), Tetracyclin und das ebenfalls von Kohanski et al. den bakteriostatischen Antibiotika zugeordnete Rifampicin (Kapitel 1.3.2.1.3), verwendet. Nach Ansicht der Autoren liegt die Ursache der verstärkten $\text{OH}^\bullet$ -Bildung in einem massiven temporären Verbrauch an NADH und einem hierdurch provozierten Anstieg an $\text{O}_2^{\bullet-}$ durch die Elektronentransportkette. Ergebnisse eines NAD^+/NADH -Assays zeigten für mit bakteriziden Antibiotika versetzte Proben eine halbe Stunde nach Zugabe, im Vergleich zu einer uninduzierten und einer mit Spectinomycin versetzten Probe, ein mehr als 5-fach erhöhtes NAD^+/NADH -Verhältnis. Dieses sank jedoch nach einer weiteren halben Stunde wieder auf das Niveau der uninduzierten Kontrolle zurück. Unterstützt wurde dieser Ansatz zusätzlich durch einen Mikroassay, der

eine erhöhte Expression nach Behandlung mit bakteriziden Antibiotika im Vergleich zu einer mit Spectinomycin behandelten Probe für die Untereinheiten NuoC/DEF der NADH-Dehydrogenase I nachwies. Des Weiteren zeigten Knockout-Mutanten des TCA ($\Delta icdA$, $\Delta acnB$) nach Zugabe von Ampicillin, Norfloxacin und Kanamycin im Vergleich zu einer uninduzierten Kontrolle eine erhöhte Überlebensrate, was mit der Reduzierung des allgemeinen NADH-Pools begründet wird. Das durch den hohen Umsatz an NADH in der Elektronentransportkette vermehrt gebildete $O_2^{\cdot-}$ führt anschließend zur Schädigung von Eisen-Schwefel-Clustern (FeS-Cluster) und zur erhöhten Freisetzung von Fe^{2+} . Mithilfe von Deletionsmutanten, die Defekte in der FeS-Synthese und -Reparatur ($\Delta iscS$) bzw. der externen Aufnahme von Fe^{3+} aus dem Medium ($\Delta tonB$) aufweisen, zeigten Kohanski et al., dass es sich bei dem vermehrten Fe^{2+} um intrazelluläres und nicht um externes Eisen handelt. Dieses führt über die Stimulierung der Fenton-Reaktion (Kapitel 1.2.1) zu einer vermehrten Bildung von $OH^{\cdot}$ und zum Tod der Zellen.

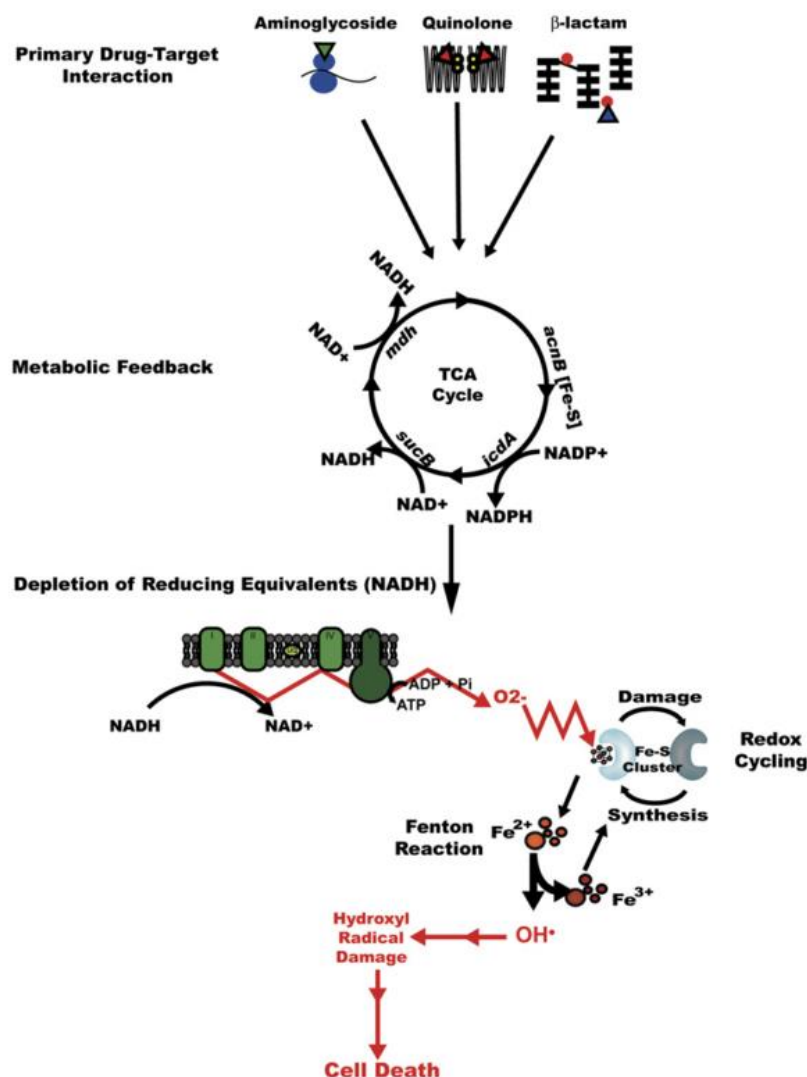


Abbildung 1.5: Postulierte Hypothese zur letalen Wirkung bakterizider Antibiotika durch ROS (Kohanski et al., 2007)

1.3 Klassifizierung von Antibiotika

1.3.1 Einteilung nach Wirkungstyp

Eine Möglichkeit zur Klassifizierung von Antibiotika stellt die Einteilung anhand ihres Wirkungstyps dar. Hierbei wird unterschieden zwischen bakteriostatischen Antibiotika, die lediglich eine Hemmung, jedoch keine Abtötung der Bakterien erzielen und bakteriziden Antibiotika, die eine direkte abtötende Wirkung besitzen und zur Reduktion der Keimzahl führen. Bakterizide Antibiotika können einen konzentrationsabhängigen oder zeitabhängigen bakterizid wirkenden Effekt aufweisen. Ein Beispiel für eine zeitabhängig bakterizide Antibiotikaklasse stellen die β -Laktamantibiotika dar, die ihre stärkste Wirkung bei einer drei- bis vierfachen MHK über eine konstante Zeit vermitteln. Der Einsatz höherer Konzentrationen bringt hierbei keinen therapeutischen Nutzen. Anders als bei zeitabhängigen bakteriziden Antibiotika führt die Erhöhung der Antibiotikakonzentration bei konzentrationsabhängigen Antibiotika, unter Berücksichtigung der Zunahme unerwünschter Arzneimittelwirkungen, zu einer Steigerung der Wirksamkeit. Beispiele hierfür stellen die Aminoglykoside als auch die Gruppe der Fluorchinolone dar. Eine andere Möglichkeit zur Einteilung von Antibiotika erfolgt anhand der Zielstrukturen (Kapitel 1.3.2). Die Tabelle 1.1 gibt einen Überblick über den Wirkungstyp der in dieser Arbeit eingesetzten Antibiotikaklassen.

Tabelle 1.1: Einteilung unterschiedlicher Antibiotikaklassen nach Wirkungstyp; entsprechende Vertreter der Antibiotikaklassen sind in Klammern dargestellt

Antibiotikaklasse	Wirkungstyp
<i>β-Laktamantibiotika (Ampicillin, Cefoxitin)</i>	zeitabhängig bakterizid
<i>Fluorchinolone (Norfloxacin)</i>	konzentrationsabhängig bakterizid
<i>Aminoglykoside (Kanamycin)</i>	konzentrationsabhängig bakterizid
<i>Ansamycine (Rifampicin)</i>	bakterizid
<i>Aminocumarine (Novobiocin)</i>	in geringen Konzentrationen bakteriostatisch, in hohen Konzentrationen bakterizid
<i>Polypeptid-Antibiotika (Polymyxin B)</i>	bakterizid
<i>Makrolide (Erythromycin)</i>	bakteriostatisch
<i>Oxazolidinone (Linezolid)</i>	bakteriostatisch
<i>Chloramphenicol</i>	bakteriostatisch

1.3.2 Einteilung nach Zielstruktur

1.3.2.1 Störungen der DNA-Replikation und der RNA-Synthese

1.3.2.1.1 Fluorchinolone: Norfloxacin

Fluorchinolone sind vollsynthetisch hergestellte Antibiotika mit Chinolin bzw. vom Chinolin abgeleiteten Aza-Analoga als Grundgerüst. Die Ausgangssubstanz der heutigen Fluorchinolone stellt die 1962 entwickelte Nalidixinsäure dar, die mittlerweile therapeutisch als obsolet gilt. Nalidixinsäure selbst weist keine Fluorierung auf und zählt daher chemisch betrachtet zur Gruppe der Chinolone, den Vorläufern der Fluorchinolone. Mit der Entwicklung von Norfloxacin gelangte 1982 das erste in Position 6 fluorierte Chinolon und damit das erste eigentliche Fluorchinolon auf den Markt. Als Fluorchinolon der ersten Generation weist Norfloxacin, im Vergleich zu den Fluorchinolonen folgender Generationen, ein schmales, nur auf gramnegative Bakterien beschränktes Erregerspektrum auf.

Die Angriffspunkte der Fluorchinolone stellen die bakteriellen Typ-II-Topoisomerasen Gyrase und Topoisomerase IV dar. Hierbei handelt es sich um Enzyme, die unter ATP-Verbrauch durch Spaltung und Wiederverknüpfung des DNA-Doppelstranges die Topologieänderung der DNA bei Prozessen wie der Replikation, der Transkription oder der Rekombination katalysieren. Die Gyrase katalysiert die Relaxierung positiver Überspiralisierung und ist zusätzlich zur Einführung negativer Überspiralisierung in relaxierte DNA fähig (Nollmann et al., 2007; Sissi & Palumbo, 2010). Letzteres stellt ein einmaliges Charakteristikum der Gyrase unter den Topoisomerasen dar (Higgins, 2007; Knippers, 2006; Sissi & Palumbo, 2010). Darüber hinaus existiert für die Gyrase ein ATP-unabhängiger Mechanismus zur Relaxierung negativer Überspiralisierung (Gellert et al., 1977; Higgins, 2007; Nollmann et al., 2007; O'Dea, Tamura, & Gellert, 1996; Reece & Maxwell, 1991). Die Aufgaben der Topoisomerase IV umfassen die Trennung der Catenane nach erfolgter Replikation sowie die Relaxierung positiv und negativ überspiralisierter DNA (Sissi & Palumbo, 2010). Typ-II-Topoisomerasen von *E. coli* liegen als Heterotetramere (X_2Y_2) vor, wobei die Untereinheiten der Gyrase durch die Gene *gyrA* und *gyrB* bzw. die der Topoisomerase IV durch die Gene *parC* und *parE* kodiert werden. Die Hemmung der Topoisomerasen durch die Fluorchinolone erfolgt durch die Bindung des Fluorchinolons an den aus gespaltener DNA und Enzym gebildeten Komplex, welcher zusätzlich durch Mg^{2+} stabilisiert wird. Die Bildung dieses ternären Komplexes führt zur Konformationsänderung des Enzyms und zur Komplexstabilisierung, welche die für das Überleben der Zelle essentiellen Abläufe, wie die Transkription und Replikation inhibiert. Die Präferenz, mit der die jeweiligen Topoisomerasen gehemmt werden, ist dabei substanzabhängig. Bezogen auf die Wirksamkeit zeigen in der Regel Substanzen, die primär die Topoisomerase IV hemmen, eine stärkere Wirkung bei grampositiven Erregern, während die Hemmung der Gyrase einen Wirkungsvorteil gegenüber Erregern aus dem gramnegativen Bereich erzielt.

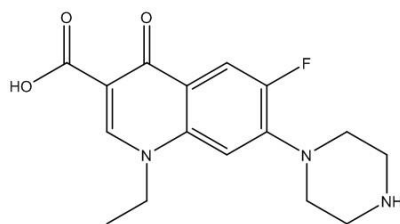


Abbildung 1.6: Strukturformel von Norfloxacin

1.3.2.1.2 Aminocumarine: Novobiocin

Das Antibiotikum Novobiocin ist ein Vertreter der Aminocumarine, eine Antibiotikaklasse, die über die Hemmung der Gyrase und mit geringerer Affinität der Topoisomerase IV, die Replikation inhibiert (Fujimoto-Nakamura et al., 2005; Peng & Mariani, 1993). Die primäre Zielstruktur der Aminocumarine bildet die GyrB-Untereinheit der Gyrase (Lewis et al., 1996; Maxwell & Lawson, 2003). Dort konkurrieren sie mit ATP um die Bindungsstelle und inhibieren die ATP-abhängige Spaltung des Doppelstranges. Strukturell charakteristisch für diese Gruppe ist das 3-Amino-4,7-DihydroxycumarinGrundgerüst, welches an Position 7 mit einem Zucker und an Position 3 mit einem Benzoessäurederivat substituiert ist. Die einzige in Deutschland für die Humanmedizin zugelassene Substanz bildet das Novobiocin. Novobiocin wird vom Stamm *Streptomyces spheroides* produziert und für Infektionen mit grampositiven Erregern, wie zum Beispiel *Staphylococcus aureus* eingesetzt. Aufgrund des Nebenwirkungsprofils, der geringen oralen Resorption und schlechten Wasserlöslichkeit der Substanz findet Novobiocin jedoch nur eingeschränkt klinische Anwendung.

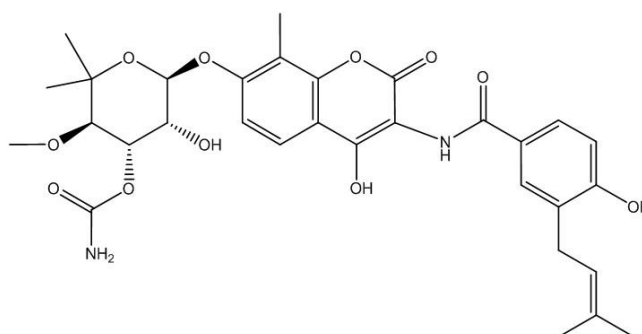


Abbildung 1.7: Strukturformel von Novobiocin

1.3.2.1.3 Ansamycine: Rifampicin

Ansamycine, auch als Rifamycine bezeichnet, sind eine Gruppe antibakterieller Substanzen, die ursprünglich als Stoffwechselprodukte von *Amiclatopsis rifamycinica* mittels Fermentation erhalten wurden. Von dem hieraus hervorgegangenen Rifamycin B, welches als einzige Verbindung eine ausreichende Stabilität

bei Isolierung aufwies, wurden weitere Derivate halbsynthetisch mit verbesserter Aktivität entwickelt. Heutzutage relevante Vertreter stellen das 1966 als erstes orales Ansamycin auf den Markt gebrachte Rifampicin dar sowie das später entwickelte Rifabutin. Wegen seiner Wirksamkeit gegenüber grampositiven Bakterien sowie insbesondere gegen Mykobakterien, wird Rifampicin vor allem zur Behandlung der Tuberkulose und Lepra eingesetzt sowie prophylaktisch bei Meningokokken-Meningitis. Des Weiteren besitzt es eine Aktivität gegenüber einigen gramnegativen und atypischen Erregern. Strukturell zeichnen sich die Ansamycine durch einen planaren aromatischen Kern mit aliphatischer Brücke aus. Ihr Wirkmechanismus basiert auf der Hemmung der RNA-Polymerase und der dadurch inhibierten Transkription. Hierfür bindet Rifampicin an die β -Untereinheit der RNA-Polymerase und verhindert durch sterische Effekte die Elongation nach zwei bis drei Nukleotiden (Campbell et al., 2001).

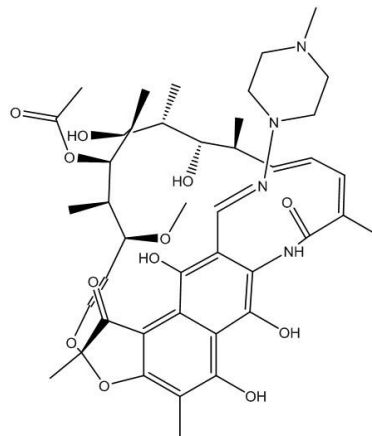


Abbildung 1.8: Strukturformel von Rifampicin

1.3.2.2 Inhibitoren der Proteinbiosynthese

1.3.2.2.1 Aminoglykoside: Kanamycin

Aminoglykoside sind biosynthetisch oder semisynthetisch aus Bakterien der Gattung *Streptomyces* oder *Micromonospora* gewonnene antibakterielle Substanzen mit einem mit Aminogruppen substituiertem Cyc-litol als Aglykon, welches mit Aminozuckern glykosidisch gebunden vorliegt. Sie zählen zu den Breitbandantibiotika und weisen eine konzentrationsabhängige Bakterizidie mit postantibiotischem Effekt auf. Das Wirkungsspektrum umfasst vor allem gramnegative *Enterobacteriaceae* sowie Staphylokokken. Die meisten grampositiven Erreger wie beispielsweise B-Streptokokken und Enterokokken sowie alle Anaerobier weisen nur eine mäßige Sensibilität auf bzw. besitzen eine natürliche Resistenz gegenüber Kanamycin (Aktories, 2005). Die Aufnahme in die Bakterienzelle erfolgt direkt durch die Lipiddoppelschicht der äußeren Membran durch die Verdrängung von Mg^{2+} und Ca^{2+} , die zur Stabilisierung der Quervernetzung von Lipopolysaccharidmolekülen beitragen sowie mittels Diffusion durch Poren der äußeren Membran (Aktories, 2005; Craig, 2004; Hancock et al., 1991; Mingeot-Leclercq, Glupczynski, & Tulkens, 1999; Nakae & Nakae, 1982).

Anschließend wird die Cytoplasmamembran in Abhängigkeit von einem hohen Potentialgefälle als protonierte Form überwunden (Aktories, 2005; Mingeot-Leclercq et al., 1999). Im Cytosol hemmen die Aminoglykoside die Proteinbiosynthese durch Bindung an die Aminoacyldomäne der 30S-Untereinheit. Die Bindung führt zu Störungen bei der Elongation der entstehenden Polypeptidkette und zur Bildung fehlerhafter oder verkürzter Proteine. Diese werden unter anderem in die Zellmembran eingebaut und führen zu einer veränderten Zellpermeabilität, welche die Aufnahme weiterer Aminoglykosidmoleküle in die Zelle begünstigt und die Hemmung der Proteinbiosynthese verstärkt (Mingeot-Leclercq et al., 1999; Vaara, 1992).

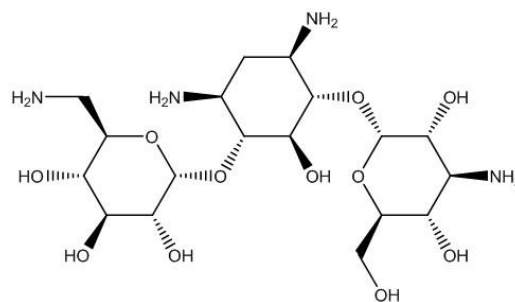


Abbildung 1.9: Strukturformel von Kanamycin

1.3.2.2.2 Chloramphenicol

Chloramphenicol ist ein bakteriostatisch wirkendes Breitbandantibiotikum, welches 1947 erstmals aus *Streptomyces* gewonnen wurde. Das Erregerspektrum umfasst sowohl grampositive Erreger, wie zum Beispiel Streptokokken oder Pneumokokken als auch gramnegative Erreger wie *Salmonella typhi* und *Haemophilus influenzae*. Aufgrund seines Nebenwirkungsprofils mit zum Teil lebensbedrohlichen Knochenmarksschädigungen und neurotoxischen Reaktionen wird Chloramphenicol systemisch nur noch in begründeten Ausnahmefällen als Reserveantibiotikum eingesetzt.

Chloramphenicol bindet an das Peptidyltransferasezentrum der 50S-Untereinheit der Ribosomen und inhibiert die Elongation der Peptidkette. Dies führt zur Blockierung der Translation essentieller Proteine und zur Hemmung des Bakterienwachstums.

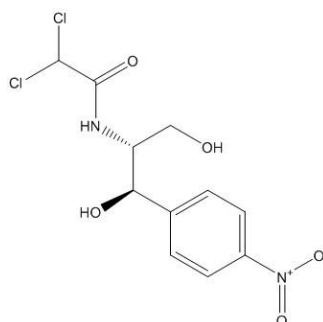


Abbildung 1.10: Strukturformel von Chloramphenicol

1.3.2.2.3 Makrolidantibiotika: Erythromycin

Bei den Makrolidantibiotika handelt es sich um eine bakteriostatisch wirkende Antibiotikaklasse, welche biosynthetisch aus *Streptomyces* oder semisynthetisch gewonnen wird. Ihr struktureller Aufbau, ein mindestens 12-gliedriger makrozyklischer Lactonring, ein sogenannter Makrolid, welcher glykosidisch an Zucker gebunden ist, bildet das charakteristische Strukturelement und die Grundlage zur Namensgebung dieser Antibiotikaklasse. Die erste Substanz stellt das 1952 erstmalig isolierte Erythromycin dar, von dem ausgehend chemisch optimierte Derivate mit verbesserter Säurestabilität und Bioverfügbarkeit entwickelt wurden. Makrolidantibiotika wirken vorwiegend gegen grampositive Erreger, sind aber auch gegen Anaerobier und einige gramnegative Erreger wirksam. Der Wirkmechanismus basiert nach Bindung an die 50S-Untereinheit auf der Hemmung der Translokation der Peptidyl-tRNA von der Akzeptor- zur Donorstelle und führt zur Inhibierung der Proteinbiosynthese.

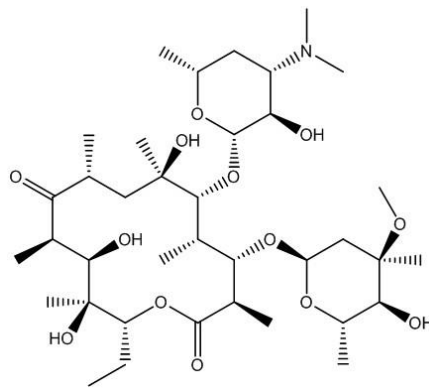


Abbildung 1.11: Strukturformel von Erythromycin

1.3.2.2.4 Oxazolidinone: Linezolid

Oxazolidinone sind eine in der Humanmedizin eingesetzte vergleichsweise junge Antibiotikaklasse synthetisch hergestellter Verbindungen, bestehend aus der Leitsubstanz Linezolid und der erst 2015 in der EU und Schweiz zugelassenen Substanz Tedizolid. Namensgebend und für die antibakterielle Wirksamkeit essentiell, ist der 1,3-Oxazolidinon-2-on-Heterozyklus, der mit einer fluorierten Arylkomponente N-substituiert vorliegt. Linezolid wirkt ausschließlich gegen grampositive Erreger, wie Streptokokken, Staphylokokken und Enterokokken. Die natürliche Resistenz gegenüber gramnegative Bakterien beruht auf der Eliminierung durch Effluxpumpen. Durch die Bindung an die 50S-Untereinheit der Ribosomen hemmt Linezolid die Bildung des Initiationskomplexes bei der Translation (Livermore, 2003).

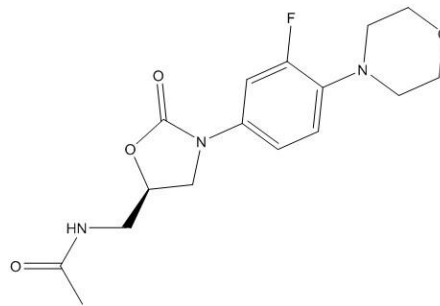


Abbildung 1.12: Strukturformel von Linezolid

1.3.2.3 Störung der Permeabilität der Cytoplasmamembran: Polypeptid-Antibiotika

Das bakterizide Antibiotikum Polymyxin B gehört zur Klasse der Polypeptid-Antibiotika und wird als Gemisch verschiedener Polymyxine mit der Hauptkomponente Polymyxin B1 aus dem Bakterium *Bacillus polymyxa* biosynthetisch gewonnen. Die Struktur der Polymyxine basiert auf einem zyklischen Heptapeptid mit einer Tripeptid-Seitenkette, welche mit einer Fettsäure acetyliert vorliegt [171]. Das Wirkungsspektrum umfasst mit Ausnahme der Gattung *Neisseria* alle gramnegativen Erreger; gegen grampositive Erreger sind Polymyxine dagegen wirkungslos. Als Wirkmechanismus werden zwei Wege postuliert: der klassische und allgemein anerkannte Membran-Lysis-Weg und der alternative Vesikel-Vesikel-Kontakt-Weg [171, 172]. Polymyxin bindet über protonierte freie Aminreste an negativ geladene Phosphatreste vom Lipid A der Lipopolysaccharide (LPS) der äußeren Membran. Dies führt zur Verschiebung von Ca^{2+} und Mg^{2+} , die zur Stabilisierung beieinanderliegender LPS dienen und ermöglicht das Überwinden der äußeren Membran. An der inneren Membran zerstört Polymyxin die Integrität der Phospholipid-Bilayer-Struktur, welches zur Lyse und zum Zelltod der Bakterien führt (Membran-Lyse-Weg) [171, 172]. Nach dem alternativen Wirkmechanismus (Vesikel-Vesikel-Weg) verursacht Polymyxin B eine Verbindung zwischen den dem Periplasma zugewandten Monolayer der Lipiddoppelschicht von äußerer und innerer Membran und führt zum Austausch von Phospholipiden. Der Austausch von Phospholipiden aus innerer und äußerer Membran über einen direkten Vesikel-Kontakt bewirkt einen Verlust der spezifischen Phospholipidzusammensetzung und führt zur osmotischen Disbalance und zur Zelllyse [171, 173].

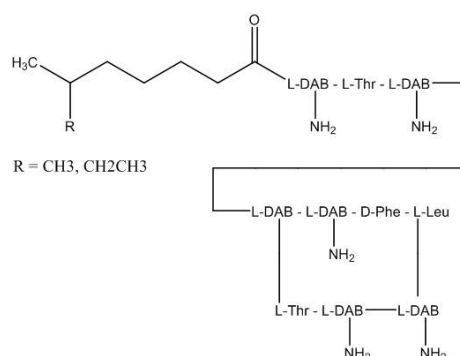


Abbildung 1.13: Strukturformel von Polymyxin

1.3.2.4 Inhibitoren der Zellwandsynthese: die β -Laktamantibiotika Ampicillin und Cefoxitin

Die β -Laktamantibiotika bilden die größte Gruppe innerhalb der Antibiotika. Kennzeichnend für diese Substanzklasse ist der β -Laktamring, welcher für die antibakterielle Wirkung essentiell ist. β -Laktamantibiotika werden unterteilt in Penicilline, Cephalosporine, Monobactame und Carbapeneme. Untergruppen der Penicilline bilden die Oralpenicilline, die Penicillinasen-festen Isoxazolympenicilline, die Acylamino- sowie Aminopenicilline, wobei Ampicillin Letzteren zugeordnet wird. Aufgrund seines umfassenden Wirkungsspektrums, welches grampositive Erreger wie Streptokokken, *Staphylococcus aureus* und Enterokokken sowie gramnegative Erreger wie zum Beispiel *Haemophilus* und *E. coli* beinhaltet, wird Ampicillin zu den Breitbandantibiotika gezählt. Eine Besonderheit in der Klassifizierung stellt das Cefoxitin (Mefoxin) dar, ein Cephalosporin-artiges Antibiotikum, welches semisynthetisch aus Cephamycin C hergestellt wird und häufig der Gruppe 2 der Cephalosporine zugeordnet oder als Cephamycin-Antibiotikum bezeichnet wird. Das Wirkungsspektrum von Cefoxitin ist sehr umfangreich und umfasst mit Ausnahme von *Pseudomonas aeruginosa* und Enterokokken, die meisten gramnegativen und grampositiven Erreger sowie diverse Anaerobier (Nair & Cherubin, 1978).

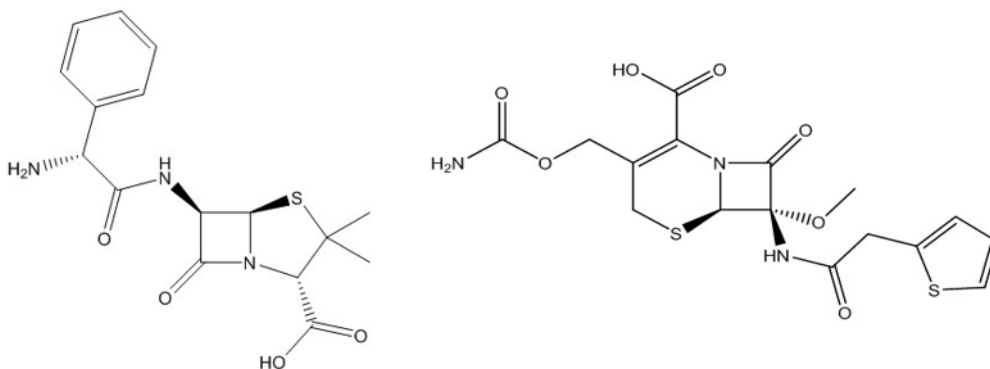


Abbildung 1.14: Strukturformel von Ampicillin (links) und Cefoxitin (rechts)

β -Laktamantibiotika besitzen eine bakterizide Wirkung, welche auf eine Störung der Zellwandsynthese zurückzuführen ist. Ihre Zielstruktur stellen Transpeptidasen dar, bakterielle Enzyme, die die Quervernetzung im Peptidoglykan der Zellwand katalysieren und essentiell zum Aufbau und zur Stabilisierung der Zellwand beitragen. Die Struktur des Peptidoglykans bilden Glykanketten, aufgebaut aus sich abwechselnden Bausteinen an N-Acetylmuraminsäure und N-Acetylglucosamin, die über von N-Acetylmuraminsäure ausgehende Oligopeptide miteinander quervernetzt sind. Die Proteinsequenz der quervernetzten Oligopeptide ist hierbei abhängig von der jeweiligen Bakterienspezies, wobei die Abfolge bei den meisten gramnegativen Bakterien L-Alanin - γ -D-Glutaminsäure - *meso*-1,6-Diaminopimelinsäure - D-Alanin - D-Alanin beträgt. Bezogen auf die Zellwandsynthese bei *E. coli* erfolgt die Quervernetzung über die Verknüpfung zwischen der Aminogruppe der *meso*-1,6-Diaminopimelinsäure des einen Glykanstranges mit der Carboxylgruppe des nicht endständigen D-Alanins des anderen Glykanstranges. Nach erfolgter Quervernetzung wird der

endständige D-Alaninrest abgespalten. Die strukturelle Ähnlichkeit des D-Alanyl-D-Alaninrestes vor der Quervernetzung mit den β -Laktamantibiotika führt zur Acylierung eines enzymatischen Serinrestes und zur irreversiblen Bindung des Antibiotikums an das Enzym (Johnson, Fisher, & Mobashery, 2013; Konaklieva, 2014). Im Rahmen der kontinuierlichen Zellwanderneuerung führt der die Hemmung der Zellwandsynthese bei gleichzeitigem Abbau zur Lyse der Bakterien (Konaklieva, 2014).

1.4 β -Laktamasen

Der Resistenzmechanismus von größter Bedeutung gegenüber β -Laktamantibiotika ist die Bildung von β -Laktamasen. β -Laktamasen sind bakterielle Enzyme, die plasmid-kodiert oder chromosomal vorliegen und den für die Wirkung der β -Laktamantibiotika essentiellen β -Laktamring hydrolysieren (Abbildung 1.15). Die Hydrolyseeffektivität ist dabei von der jeweiligen β -Laktamase und dem zu hydrolysierenden β -Laktamantibiotikum abhängig. Für die Einteilung der β -Laktamasen existieren zwei gängige Systeme: die Klassifikation nach Ambler anhand der Aminosäuresequenz und die Klassifikation nach Bush et al. auf Basis der Funktionalität, welche auf die Substrat- und Inhibitorprofile zurückgeht (Ambler, 1980; Bush & Jacoby, 2010). Ambler unterteilt die β -Laktamasen in die vier Klassen A-D. Während es sich bei den Klassen A, C und D um Serin- β -Laktamasen handelt, besitzen die Vertreter der Klasse B Zink-Ionen als aktives Zentrum und werden daher als Metallo- β -Laktamasen bezeichnet. Im Gegensatz zur Einteilung nach Ambler erfolgt die Einteilung nach Bush et al. in die Gruppen 1 bis 3, die jeweils zur genaueren Spezifizierung der β -Laktamasen zusätzlich in verschiedene Subgruppen unterteilt werden. Hierbei umfasst die Gruppe 1 (entsprechend der Klasse C nach Ambler) Cephalosporinasen, die Gruppe 2 (entsprechend den Klassen A und D nach Ambler) Inhibitor resistente ESBLs (Kapitel 1.4.1) sowie Serin-Carbapenemasen und die Gruppe 3 (entsprechend Klasse B nach Ambler) die Metallo- β -Laktamasen.

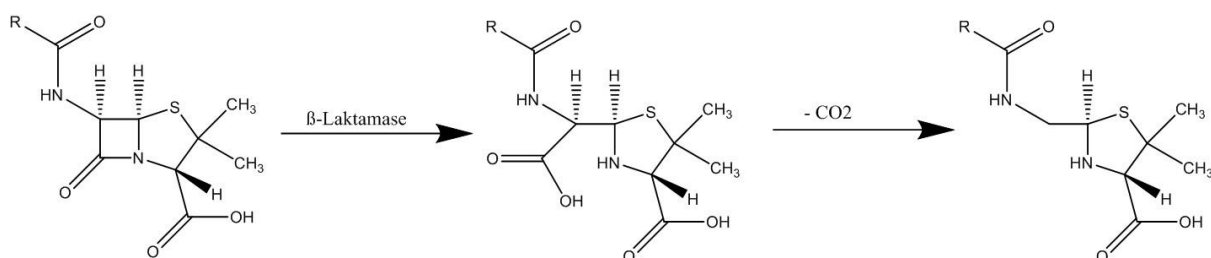


Abbildung 1.15: Hydrolysereaktion von β -Laktamasen

1.4.1 Klinische Relevanz und Klassifizierung von β -Laktamasen

Eine in den vergangenen Jahren stetig zunehmende Problematik bilden β -Laktamasen mit einem im Vergleich zu klassischen β -Laktamasen erweitertem Substratspektrum, die als sogenannte ESBLs (*Extended Spectrum β -Lactamases*) bezeichnet werden. Ihr Wirkspektrum reicht von Aminopenicillinen und Cephalosporinen, inklusive der dritten und vierten Gruppe bis zu Aztreonam [123]. Die Entstehung von ESBLs beruht vorwiegend auf Punktmutationen klassischer β -Laktamasen, die zur Veränderung des aktiven Zentrums des Enzyms führen. Abkömmlinge vom Typ TEM, SHV und CTX-M bilden den größten klinischen Anteil an ESBLs. Die Resistenzgene liegen vorwiegend auf mobilen Elementen, wie Transposons oder Plasmiden vor. Die erste plasmid-kodierte β -Laktamase, TEM-1, wurde Anfang der 60er entdeckt und vermittelt eine Resistenz gegenüber Penicillinen und den frühen Cephalosporinen [124]. Mutationen in TEM-1 führten zur TEM-2B, welche das gleiche Resistenzprofil wie TEM-1 aufweist, sowie zur TEM-3, die den ersten Vertreter der ESBLs dieses Typs darstellt. Mittlerweile existieren über 200 Varianten der TEM- β -Laktamasen, wobei der größte Anteil den ESBLs zugeordnet werden kann [125, 126]. β -Laktamasen vom TEM-Typ sind Serinproteasen und zählen nach der Klassifizierung nach Ambler zur Gruppe A [127].

Der Ursprung der SHV- β -Laktamasen wird in der SHV-1 aus *Klebsiella* vermutet, die wahrscheinlich ursprünglich chromosomal vorlag und sich im Laufe der Evolution als plasmid-kodierte Varianten verbreitet hat. Nach Angaben der Datenbank der Lahey-Clinic Burlington existieren mittlerweile fast 200 verschiedene β -Laktamasen vom SHV-Typ [125].

Eine, im Vergleich zu den TEM- und SHV- β -Laktamasen, neuere Gruppe an ESBLs bilden die Ende der 80er erstmalig entdeckten CTX-M- β -Laktamasen. Die rasante Entwicklung neuer Varianten an CTX-M und der einer weltweiten Pandemie gleichenden Verbreitung dieser Enzyme führt zur Verdrängung von TEM- und SHV-ESBLs und rückt die CTX-M zunehmend in den Fokus der aktuellen Resistenzlage [128]. Anhand ihrer Aminosäuresequenz werden die CTX-M in Cluster eingeteilt, innerhalb derer mittlerweile über 170 Varianten bekannt sind [125]. Analog der TEM- handelt es sich auch bei den SHV- und den CTX-M- β -Laktamasen um Serinproteasen. Phylogenetische Analysen lassen vermuten, dass CTX-M- β -Laktamasen nicht durch Punktmutationen klassischer β -Laktamasen entstanden sind, sondern auf der Mobilisierung von chromosomalen β -Laktamasegenen aus *Kluyvera* spp. zurückzuführen sind.

Eine weitere große Gruppe an β -Laktamasen stellen die OXA- β -Laktamasen dar. Sie gehören der Gruppe D nach Ambler an. Ihr Resistenzspektrum kann von einem schmalen Spektrum mit Penicillinen, inklusive Oxacillin und frühen Cephalosporinen bis zum erweiterten Spektrum mit späteren Cephalosporinen und Carbapenemen reichen. Ausgehend von der Aminosäuresequenz Carbapenem-hydrolysierender β -Laktamasen (CHDL – *Carbapenem-Hydrolyzing Class D β -Lactamases*) wurde eine Untergruppierung vorgenommen, in der β -Laktamasen der Untergruppen OXA-23, OXA-24/40, OXA-48, OXA-51, OXA-58 und OXA-143 die größte klinische Relevanz aufwiesen [129].

Darüber hinaus existieren noch weitere Gruppen an ESBLs mit geringerem Vorkommen, wie zum Beispiel GES, BES, PER, TLA und VEB [130].

1.4.2 AmpC- β -Laktamase

Eine weitere, häufig in gramnegativen Bakterien vorkommende β -Laktamase, stellt die AmpC- β -Laktamase dar. Das Enzym kann sowohl plasmid-kodiert als auch chromosomal vorliegen und ist mit Ausnahme von *Psychrobacter immobilis* im Periplasma lokalisiert. Bezogen auf die Klassifizierung nach Ambler wird die AmpC- β -Laktamase der Klasse C zugeordnet bzw. nach Bush et al. der Gruppe 1 (Ambler, 1980; Bush & Jacoby, 2010). AmpC- β -Laktamasen sind wirksam gegenüber Penicillinen und Cefamycinen (Cefoxitin) mit einem Schwerpunkt gegenüber Cephalosporinen. Im Vergleich zu den β -Laktamasen der Klasse A sind AmpC- β -Laktamasen gegenüber β -Laktamaseinhibitoren wie Tazobactam oder Sulbactam verhältnismäßig unempfindlich.

1.4.2.1 Induzierbarkeit der AmpC- β -Laktamase

Die Expression von AmpC ist, in Abhängigkeit der produzierenden Bakterienspezies und der genetischen Ausstattung, konstitutiv oder induzierbar. Gut untersuchte Beispielorganismen für eine Induzierbarkeit von AmpC stellen die Enterobakterien *Citrobacter freundii* und *Enterobacter cloacae* dar. Die Induktion von AmpC erfolgt durch Zellwandbausteine, den sogenannten Anhydromuropeptiden, die im Rahmen des natürlichen Zellwandrecyclings oder vermehrt bei der Behandlung mit β -Laktamantibiotika anfallen und durch die Permease AmpG ins Cytoplasma transportiert werden. Untersuchungen zur Substratspezifität von AmpG zeigten, dass für den Transport das Motiv des N-Acetylglucosamin-anhydro-N-Acetylmuraminsäure-Disaccharids (GlcNAc-anhMurNAc-Disaccharids) essentiell ist (Cheng & Park, 2002). AmpG vermittelt daher effizient den Transport von GlcNAc-anhMurNAc und seinen Tri-, Tetra- und Pentapeptiden. Im Cytoplasma werden die Peptide des Disaccharids entweder direkt durch die Amidase AmpD abgespalten oder nach erfolgter Hydrolyse durch die Glucosaminidase NazG. Über anschließende Reaktionen erfolgt aus GlcNAc-anhMurNAc und dem Monosaccharid Anhydro-N-Acetylmuraminsäure die Bildung der Vorläufermoleküle für die Zellwandsynthese. Der verstärkte Antibiotika induzierte Zellwandabbau führt zur Akkumulation der Anhydromuropeptide im Cytoplasma, die mit dem Zellwandvorläufermolekül UDP-Muraminsäure-Pentapeptid (UDP-MurNAc-Pentapeptid) um die Bindungsstelle an AmpR, dem Repressor der *ampC*-Expression, konkurrieren (Johnson et al., 2013). Das genaue Signalmolekül ist nicht bekannt, vermutet wird jedoch, dass es sich hierbei um das AnhMurNAc-Tri- oder das –Pentapeptid bzw. um das freie Pentapeptid handelt. Wird

UDP-MurNac-Pentapeptid durch das Signalmolekül von AmpR verdrängt, durchläuft AmpR eine Konformationsänderung, welche zur Transkription von *ampC* führt (Johnson et al., 2013). Die Gene von AmpR und AmpC liegen als divergent organisiertes Operon vor und werden beide über AmpR reguliert.

Für die Induktion von AmpC, werden neben dem Regulator AmpR, sowohl die Amidase AmpD als auch die Permease AmpG sowie die Glucosaminidase NazG benötigt. Mutationen in diesen Genen können zu einer veränderten Induzierbarkeit der β -Laktamase führen, wobei Mutationen in *ampD* die häufigste Ursache für eine Überexpression der chromosomal kodierten AmpC darstellen (Juan et al., 2005; Kaneko et al., 2005; Lindberg, Lindquist, & Normark, 1987).

Im Gegensatz zu vielen anderen Enterobakterien ist die chromosomale AmpC in *E. coli* nicht induzierbar, sondern erfolgt als schwache konstitutive Expression ohne Vermittlung einer β -Laktamresistenz. Die Ursache hierfür liegt in dem Fehlen des Regulatorproteins AmpR sowie aufgrund eines schwachen Promotors und der Regulation über einen Attenuatormechanismus. Neben der erworbenen β -Laktamresistenz über mobile Elemente, wie zum Beispiel Plasmide, sind in *E. coli* in der Regel Mutationen in der Promotor- oder Attenuatorsequenz der chromosomal kodierten AmpC ursächlich für eine Überexpression der β -Laktamase. Des Weiteren wurden Mutationen in dem Gen *ampC* nachgewiesen, die zu einer veränderten Sekundärstruktur des Enzyms führen und eine Resistenz gegenüber β -Laktamen, einschließlich Carbapenemen, vermitteln (Alonso et al., 2016; Guillon, Tande, & Mammeri, 2011).

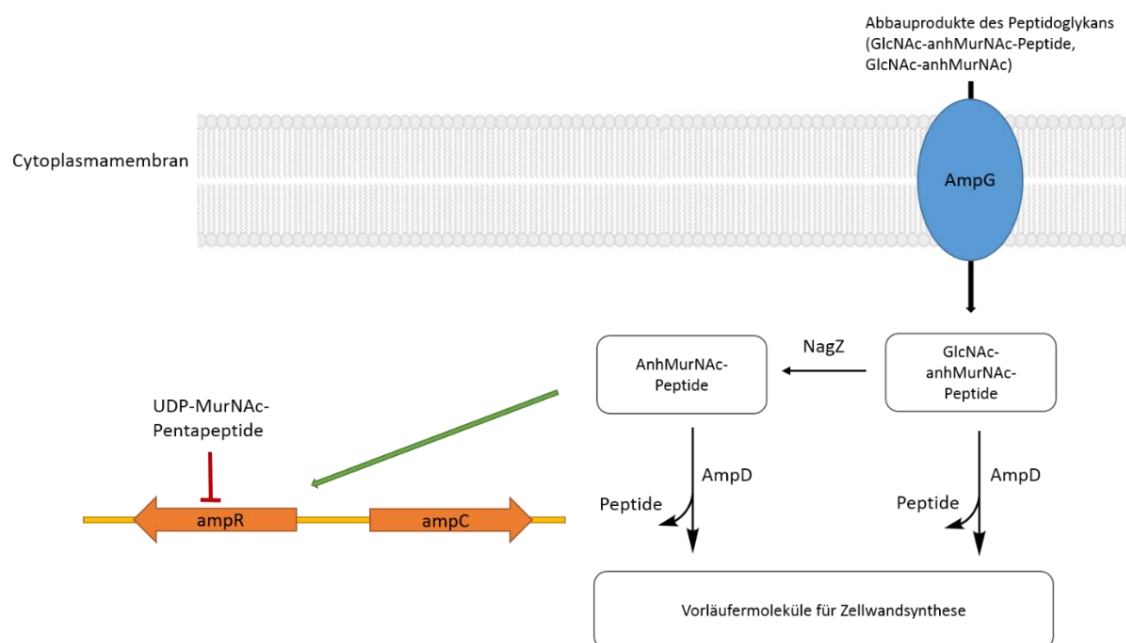


Abbildung 1.16: Induktion von AmpC (Johnson et al., 2013); AmpR = Regulatorprotein; AmpC = β -Laktamase, NazG = Glucosaminidase, AmpG = Permease; GlcNAc = N-Acetylglucosamin, anhMurNac = Anhydro-N-Acetylmuraminsäure

1.5 Ziel der Arbeit

Die steigende Anzahl resistenter, vor allem multiresistenter Erreger, sowohl im humanen als auch veterinärmedizinischen Bereich ist alarmierend. Aufgrund der in den letzten Jahren nur geringen Anzahl neuer antibakterieller Wirkstoffe ist der Erhalt der antimikrobiellen Wirksamkeit derzeitiger Antibiotika sowie das weitere Bestreben nach der Entdeckung und Entwicklung neuer Substanzen mehr denn je von Bedeutung. Das Ziel dieser Arbeit bestand in der Entwicklung eines biosensorischen Messsystems zum Nachweis von antibiotischen Wirkungen, wodurch Beiträge sowohl zur Entdeckung neuer antibakterieller Substanzen geleistet werden sollen, als auch zur Detektion antibiotischer Kontaminationen in der Umwelt.

Dieses Messsystem sollte die folgenden Eigenschaften aufweisen:

- eine hohe Sensitivität für antibiotische Aktivität,
- eine breite Anwendungsmöglichkeit auf verschiedene Wirkstoffgruppen
- sowie eine einfache und schnelle Anwendbarkeit

Die Basis des Nachweissystems soll dabei ein gegenüber Antibiotika hypersensitiver Sensorstamm sein, welcher die Wirksamkeit mittels Fluoreszenz-basierter Reporterplasmide anzeigen und über Änderungen der Fluoreszenzintensität die Anwesenheit von Antibiotika aufzeigen sollte. Als Sensorstamm wurde eine $\Delta toIC$ -Mutante von *E. coli* C600 konstruiert, welche aufgrund des Funktionsverlustes des zentralen äußeren Membranproteins TolC und dem daraus resultierenden reduzierten Efflux, eine intrazelluläre Akkumulation der Antibiotika und eine erhöhte Sensitivität gegenüber diesen aufweist (Rosner & Martin, 2013). Der Vergleich der Fluoreszenzintensität einer mit Antibiotika behandelten Probe mit der einer uninduzierten Kontrolle stellt das Prinzip des Messsystems dar.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Bakterienstämme

In Tabelle 2.1 sind die in dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme aufgeführt. Dargestellt sind die stammspezifische Bezeichnung, die laborinterne Nummerierung (GK-Nr.), der Genotyp sowie die Referenz bzw. Herkunft.

Tabelle 2.1: Verwendete Bakterienstämme in dieser Arbeit

Bezeichnung	GK-Nr.	Genotyp	Referenz/ Herkunft
<i>E. coli</i> C600	617	<i>F</i> , <i>thr-1</i> , <i>leuB6</i> , <i>thi-1</i> , <i>lacY1</i> , <i>glnV44</i> , <i>tonA21</i>	Prof. Schuster, MPI Berlin; (Appleyard, 1954)
<i>E. coli</i> R7	4085	Δ <i>tolC</i> -Mutante von <i>E. coli</i> C600	diese Arbeit
<i>E. coli</i> JM109	623	<i>endA1</i> , <i>recA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi</i> , <i>hsdR17</i> (<i>rk⁻</i> , <i>mk⁺</i>), <i>relA1</i> , <i>supE44</i> , Δ (<i>lac-proAB</i>), [<i>F'</i> <i>traD36</i> , <i>proAB</i> , <i>laqI^qZΔM15</i>]	Promega
<i>E. coli</i> SN03	65	<i>ampA1</i> , <i>ampC8</i> , <i>recA</i> , <i>rpsL</i> , <i>pyrB</i>	(Normark & Burman, 1977)
<i>E. coli</i> SN0302	64	<i>ampD2</i> -Derivat von <i>E. coli</i> SN03	(Lindberg et al., 1987)
<i>E. coli</i> MG1655	2110	<i>F</i> , λ -, <i>ilvG</i> -, <i>rfb-50</i> , <i>rph-1</i>	Universität Danzig, Polen, J.Potyleus
<i>E. coli</i> RFM443	915	<i>rpsL</i> , <i>galk2</i> , <i>dlac74</i>	(Drolet et al., 1995)
<i>E. coli</i> DE112	914	Isogene <i>TolC</i> -Mutante von <i>E. coli</i> RFM443 (<i>tolC</i> ::miniTn10)	(Van Dyk et al., 1994)
<i>E. coli</i> ATCC 25922	1114	Klinisches Isolat aus Seattle (1946); Sero- typ O6	(Lehn et al., 1996)
<i>Citrobacter freundii</i> Strain III-1-3	100	-	Laboreigene Stammsammlung

2.1.2 Plasmide

In Tabelle 2.2 sind die in dieser Arbeit verwendeten Plasmide aufgeführt. Dargestellt sind die Bezeichnung, die Größe, Charakteristika sowie die Referenz bzw. Herkunft. Die in dieser Arbeit konstruierten Plasmide wurden anhand der laborinternen Nomenklatur pHPKCX-YY bezeichnet. Hierbei steht p für Plasmid, HP für Hamburg Pharmazie, KC für Katja Carstens, X für die laborinterne Nummerierung des für die Konstruktion

verwendeten Ausgangsplasmides und YY für die fortlaufende Nummerierung des Plasmides im Rahmen des Projektes.

Tabelle 2.2: Verwendete Plasmide in dieser Arbeit

Bezeichnung	Größe [bp]	Charakteristika	Referenz/ Herkunft
<i>pACBSCE</i>	ca. 7000	Clm ^R , λ-Red-Rekombinasesystem (<i>gam</i> , <i>bet</i> , <i>exo</i>), <i>araC</i> , <i>I-SceI</i>	(Lee et al., 2009)
<i>pBAD-mTagBFP2</i>	4701	Amp ^R , <i>mTagBFP2</i> , <i>araC</i>	Addgene, (Subach et al., 2011)
<i>pBR322</i>	4361	Amp ^R , Tet ^R	(Bolivar et al., 1977)
<i>pCP20</i>	9400	Amp ^R , Clm ^R , <i>flp</i>	(Cherepanov & Wackernagel, 1995)
<i>pDOC-K</i>	7233	Amp ^R , Kan ^R , <i>sacB</i> , FRT-Sequenzen	(Lee et al., 2009)
<i>pET-mCherry LIC cloning vector</i>	5472	Amp ^R , <i>mCherry</i>	Addgene
<i>pHPJufo3</i>	5389	Tet ^R , <i>precA-gfpmut2</i>	Dr. A. Heisig
<i>pHPKC12-02a</i>	7714	pDOC-K::H1-Fragment	diese Arbeit
<i>pHPKC12-02b</i>	8136	pHPKC12-02a::H2-Fragment	diese Arbeit
<i>pHPKC3-02</i>	5115	Tet ^R , pBR322::leuB	diese Arbeit
<i>pHPKC3-03</i>	6076	pHPKC3-02::srp-gfpmut2	diese Arbeit
<i>pHPKC3-04</i>	6935	pHPKC3-02::psdhB-gfpmut2	diese Arbeit
<i>pHPKC3-05</i>	5842	pHPKC3-02::gfpmut2 (ohne Promotor)	diese Arbeit
<i>pHPKC3-06</i>	6138	pHPKC3-02::precA-gfpmut2	diese Arbeit
<i>pHPKC3-07</i>	6541	pHPKC3-02::pcpxP-mCherry	diese Arbeit
<i>pHPKC3-08</i>	6299	pHPKC3-02::pcpxP-gfpmut2	diese Arbeit
<i>pHPKC3-09</i>	8220	pHPKC3-06::pampC-ampR-mTagBFP2	diese Arbeit
<i>pHPKC3-10</i>	6267	pHPKC3-02::srp-mCherry	diese Arbeit
<i>pHPKC3-11</i>	6090	pHPKC3-02::mCherry (ohne Promotor)	diese Arbeit
<i>pHPKC3-12</i>	7197	pHPKC3-02::pampC-ampR-mTagBFP2	diese Arbeit
<i>pHPKC3-13</i>	6906	pHPKC3-02::pampC-ampR-gfpmut2	diese Arbeit
<i>pHPKC3-14</i>	9646	pHPKC3-09::pcpxP-mCherry	diese Arbeit
<i>pHPKC3-15</i>	6316	pHPKC3-02::srp-mTagBFP2	diese Arbeit
<i>pHPKC3-16</i>	6139	pHPKC3-02::mTagBFP2 (ohne Promotor)	diese Arbeit
<i>pKENGfpmut2</i>	3531	Amp ^R , <i>srp-gfpmut2</i>	(Cormack, divia, & Falkow, 1994; Ezaz-Nikpay et 1994)

2.1.3 Oligonukleotide

Die in Tabelle 2.3 aufgeführten Oligonukleotide wurden über Invitrogen bezogen und in dieser Arbeit verwendet (Thermo Fisher Scientific). In der Tabelle sind die Bezeichnung, die Basenanzahl, Sequenz sowie der Verwendungszweck der Oligonukleotide dargestellt.

Tabelle 2.3: Verwendete Oligonukleotide in dieser Arbeit

Bezeichnung	Länge [bp]	Sequenz (5' → 3')	Verwendung
<i>aceA_E.coli_fw_+1058_RT</i>	19	CAGGTATCCACAGCATGTG	qRT-PCR
<i>aceA_E.coli_rv_+1189_RT</i>	20	ACTTCCTGCTGGTGAGATAC	qRT-PCR
<i>acnA_fw_+2223_RT</i>	20	TTTACCTGACAGCGACGTAG	qRT-PCR
<i>acnA_rv_+2357_RT</i>	20	CACACGAATACCAAGCAGAC	qRT-PCR
<i>acnB_E.coli_fw_+2469_RT</i>	19	GGAAGAGTACCAGACCTAC	qRT-PCR
<i>acnB_E.coli_rv_+2553_RT</i>	19	ATCGGCTTTCTCGGTGTAC	qRT-PCR
<i>ampC_Cf_rv_+36</i>	22	AAACGTGGAGAAAGAGGCTGTC	Sequenzierung
<i>ampR_Cf_fw_+910</i>	30	CGTAGTCTCGGGACCATCTAAGTACAT GCG	Klonierung
<i>ampR_Cf_fw_+910_Aval</i>	30	CGTAGTCTCGGGACCATCTAAGTACAT GCG	Klonierung
<i>ampR-gfpmut2_-109_rv</i>	48	GAAAAGTTCTTCTCCTTTACTCATGAA ATCAGTTCGGTAATTAAGC	Klonierung
<i>ampR-mTagBFP2_-109_rv</i>	48	GTGATGGTGTGTTGGCTCCCATGA AATCAGTTCGGTAATTAAGC	Klonierung
<i>ampR-mTagBFP2_-109_rv</i>	48	GTGATGGTGTGTTGGCTCCCATGA AATCAGTTCGGTAATTAAGC	Klonierung
<i>arcA_E.coli_fw_+596_RT</i>	20	GTACTGTAGACGTGACGATC	qRT-PCR
<i>arcA_E.coli_rv_+696_RT</i>	20	AATCTTCCAGATCACCAGCAG	qRT-PCR
<i>clpB_E.coli_fw_+2485_RT</i>	20	CTGGCACAGCAAATACTGTC	qRT-PCR
<i>clpB_E.coli_rv_+2535_RT</i>	21	CGGTCTTCATTAATTCCAGG	qRT-PCR
<i>cpxP_E.coli_fw_+346_RT</i>	20	GTCCGCAACCAAATGTATCG	qRT-PCR
<i>cpxP_E.coli_fw_-451_Nsil</i>	34	ATTGCAATGCATGGTTTCGGGAGATA GTCATCTG	Klonierung
<i>cpxP_E.coli_rv_+416_RT</i>	19	TCACGCAACTGCTCCATTC	qRT-PCR
<i>cpxP_Eco_rv_+41</i>	22	GCGTGGCTTAATGAACTGACTG	Sequenzierung
<i>cpxP_EcoK12_5_-451</i>	34	ATTGCACTGCAGGGTTTCGGGAGATA GTCATCTG	Klonierung/ Sequenzierung
<i>cpxP-gfpmut2_3_+25</i>	50	TGAAAAGTTCTTCTCCTTTACTCATCAT TTGCTCCCAAATCTTTCTGTC	Klonierung
<i>cpxP-gfpmut2_5_-25</i>	50	GACAGAAAGATTTTGGGAGCAAATGA TGAGTAAAGGAGAAGAACTTTTCA	Klonierung

<i>cpxP-mCherry_3_+25</i>	50	TGTTATCCTCCTCGCCCTTGCTCACCAT TTGCTCCCAAAATCTTTCTGTC	Klonierung
<i>cpxP-mCherry_5_-25</i>	50	GACAGAAAGATTTTGGGAGCAAATGG TGAGCAAGGGCGAGGAGGATAACA	Klonierung
<i>cyoD_E.coli_fw_+156_RT</i>	20	AATGGCAGTGGTACAGGTTC	qRT-PCR
<i>cyoD_E.coli_rv_+253_RT</i>	20	AGGATAGCGATGATTAGCAC	qRT-PCR
<i>cysG_fw_+932_RT</i>	22	GCGAAGAGCTGGAAACACTGTG	qRT-PCR
<i>cysG_rv_+1019_RT</i>	23	GAATAGGCAGAGCAACCAGAAGC	qRT-PCR
<i>del_tolC_E.coli_rv_+66H2</i>	21	GGAAGAATGCGGCAGATAACC	Sequenzierung
<i>dinB_E.coli_fw_+763_RT</i>	20	CACTGGTCTGAATGTGAAGC	qRT-PCR
<i>dinB_E.coli_rv_+835_RT</i>	20	CGAGCAATCAGTAAATCAGG	qRT-PCR
<i>dnaK_E.coli_fw_+1019_RT</i>	20	TTGGTGGTCAGACTCGTATG	qRT-PCR
<i>dnaK_E.coli_rv_+1115_RT</i>	19	TGAACAGCAGCACCGATTG	qRT-PCR
<i>gapA_E.coli_fw_+712_RT</i>	22	GTATCTGTAGTTGACCTGACCG	qRT-PCR
<i>gapA_E.coli_rv_+788_RT</i>	22	CCTTTCATTTGCCTTCAGCAG	qRT-PCR
<i>gdhA_E.coli_fw_+1187_RT</i>	20	AGAAAGTTGACGCACGTTTG	qRT-PCR
<i>gdhA_E.coli_fw_+1250_RT</i>	19	GTTTGCTCACCTTCACCAC	qRT-PCR
<i>GFP_fw_-178_PstI</i>	34	CTGGACCTGCAGCGATTAAGTTGGGT AACGCCAG	Klonierung/ Sequenzierung
<i>GFP_rv_+757_PstI</i>	34	TGCAAGCTGCAGAGGCTGAAAATCTTC TTCATC	Klonierung
<i>gfpmut2_Eco_rv_+58</i>	20	TTGTGCCCATTAACATCACC	Sequenzierung
<i>gfpmut2-ampR_-23_fw</i>	48	GCTTTTAATTACGGAAGTATTTCATG AGTAAAGGAGAAGAACTTTTC	Klonierung
<i>groL_E.coli_fw_+1287_RT</i>	19	GCGTGGTCAGAACGAAGAC	qRT-PCR
<i>groL_E.coli_rv_+1363_RT</i>	20	TCTTCGCCGCAGTTCAATAC	qRT-PCR
<i>hslV_E.coli_fw_+355_RT</i>	20	GCCTTTTCAGCAATTTACG	qRT-PCR
<i>hslV_E.coli_rv_+436_RT</i>	20	GATCTTATTGCTATCGGCTC	qRT-PCR
<i>htpG_E.coli_fw_+1521_RT</i>	19	ACTGACTCCGTTCATCGAC	qRT-PCR
<i>htpG_E.coli_rv_1638_RT</i>	20	GTTTCGCCATCTGAGTGCTC	qRT-PCR
<i>ibpB_E.coli_fw_+274_RT</i>	21	CCATTTAGCCTGAGCTTTACG	qRT-PCR
<i>ibpB_E.coli_rv_+436_RT</i>	20	GATGGGTTCAGGCTCATTAC	qRT-PCR
<i>iscS_fw_+892_RT</i>	20	CCGAACATTCTCAACGTCAG	qRT-PCR
<i>iscS_rv_+985_RT</i>	20	GAACCTGAAGAACTGCGAG	qRT-PCR
<i>leuB_rv_+1274</i>	34	CGATATCTGCAGGGTAGAGACGTTGT GATCCATG	Klonierung
<i>marA_for+253_EcoK12_RT PCR</i>	20	GCTTCGAGTCGCAACAACT	qRT-PCR
<i>marA_rev+342_EcoK12_RT PCR</i>	20	GGATGTAAAAAGCGGATTC	qRT-PCR

<i>mCherry_Eco_rv_+948_Nsil</i>	34	AGCATAATGCATACTTGGAGCCACTAT CGACTAC	Klonierung
<i>mCherry_EcoK12_3_+948</i>	34	AGCATACTGCAGACTTGGAGCCACTAT CGACTAC	Klonierung
<i>mCherry_fw_+1_PstI</i>	34	ATCGTTCTGCAGGTGAGCAAGGGCGA GGAGGATA	Klonierung
<i>mCherry_rv_+60</i>	21	TTCACGGAGCCCTCCATGTGC	Sequenzierung
<i>mTagBFP2_fw_+1_PstI</i>	35	CATGGACTGCAGATGGGGAGCCACCA TCACCATCA	Klonierung
<i>mTagBFP2_fw_+201</i>	22	GAAGCTAGTAGCCAGGATGTCTG	Sequenzierung
<i>mTagBFP2_rv_+1018_Aval</i>	30	CTTGACCCCGAGTTCACCGACAAACAA CAG	Klonierung
<i>mTagBPF2-ampR_fw_-23</i>	48	GCTTTTAATTACGGAAGTATTTCATG GGGAGCCACCATCACCATCAC	Klonierung
<i>nuoF_E.coli_fw_+933</i>	20	CGAAAGTATCGGTAAAGCGG	qRT-PCR
<i>nuoF_E.coli_rv_+1015</i>	20	AACTCTTCCAGGTTACGCAC	qRT-PCR
<i>pBR322_fw_+3977_BamHI</i>	34	GATTACATTCAAGCGTAGAGGATCCAC AGGACGG	Klonierung
<i>pBR322-leuB_fw_SOEing</i>	50	TCAATAATATTGAAAAAGGAAGAGTA TGTCGAAGAATTACCATATTGCCG	Klonierung
<i>pBR322-leuB_rv_SOEing</i>	50	CGGCAATATGGTAATTCTTCGACATAC TCTTCCTTTTCAATATTATTGA	Klonierung
<i>pDK4Kanares_[K2]_5_+162_pKD4</i>	20	CGGTGCCCTGAATGAACTGC	PCR
<i>pDOC-K_fw_+2178</i>	22	CACACAGGAAACAGCTATGACC	Sequenzierung
<i>pDOC-K_fw_+7584</i>	22	GGATCTCATGCTGGAGTTCTTC	Sequenzierung
<i>pDOC-K_rv_+2365</i>	21	TACGTGTCCGCTTCCTTTAG	Sequenzierung
<i>pDOC-K_rv_+88</i>	22	GATGTGCTGCAAGGCGATTAAG	Sequenzierung
<i>phoA_E.coli_fw_+1312_RT</i>	22	CAGTTGCGTATTGCGGCGTATG	qRT-PCR
<i>phoA_E.coli_rv_+1383_RT</i>	22	CAGAGCGGCTTTCATGGTGATG	qRT-PCR
<i>pHPKC3-02_fw_-413</i>	20	GATAACTACGATACGGGAGG	Sequenzierung
<i>proC_E.coli_fw_+675_RT</i>	22	GAAAGATATGGTCTGCTACCG	qRT-PCR
<i>proC_E.coli_rv_+759_RT</i>	22	CATACACTTCGTCATCGCTTCG	qRT-PCR
<i>proC_EcoK12_3_+387_RT</i>	21	TTTGGCGTTACGGAGGTCATC	qRT-PCR
<i>proC_EcoK12_5_+272_RT</i>	21	CTCTGGTCGTTTCTATTGCTG	qRT-PCR
<i>Rollingcircle_fw_E.coli_Neg</i>	48	GTTTGCGCAACGTTGTTGCCATTGATG AGTAAAGGAGAAGAACTTTTC	Klonierung
<i>Rollingcircle_rv_E.coli_Neg</i>	48	CAATGGCAACAACGTTGCGCAAACAT TAACTGGCGAACTACTTACTC	Klonierung
<i>sdhB_E.coli_fw_+525_RT</i>	20	GTTAGCGGCATATCGTTTCC	qRT-PCR
<i>sdhB_E.coli_rv_+636_RT</i>	19	CTTCGGACATACACTGACG	qRT-PCR

<i>sdhB_Eco_fw_-679</i>	21	CTGTTCAAGGATAAAACCCGAC	Sequenzierung
<i>sdhB_fw_-1047_PstI</i>	33	CTTAGCTGCAGCGCACATCAACCTGGC TTTACC	Klonierung/ Sequenzierung
<i>sdhD_Eco_rv_+113</i>	22	TATGTCAGCTCGCCACTGGTAG	Sequenzierung
<i>[sodA_for(rt)]_5'_+321_SalTyph</i>	20	CGGTTCCGTTGACAACTTCA	qRT-PCR
<i>[sodA_rev(rt)]_3'_+412_SalTyph</i>	18	TGTCGCCTTTCAGCACCA	qRT-PCR
<i>SOE_gfp_sdhB_fw</i>	50	TTTCACTTCTCGCAGGAGTCCTCGTAT GAGTAAAGGAGAAGAACTTTTCA	Klonierung
<i>SOE_sdhB_gfp_rv</i>	50	TGAAAAGTTCTTCTCCTTTACTCATACG AGGACTCCTGCGAGAAGTGAAA	Klonierung
<i>soxS_E.coli_fw_+141_RT</i>	19	TCAGACGCTTGGCGATTAC	qRT-PCR
<i>soxS_E.coli_rv_+242_RT</i>	19	GTCTGCTGCGAGACATAAC	qRT-PCR
<i>srp-mCherry_EcoK12_3_+25</i>	50	TGTTATCCTCCTCGCCCTTGCTCACATG TATATCTCCTTCTTAAATCTAG	Klonierung
<i>srp-mCherry_EcoK12_5_-25</i>	50	CTAGATTTAAGAAGGAGATATACATGT GAGCAAGGGCGAGGAGGATAACA	Klonierung
<i>srp-mTagBFP2_3_+25</i>	50	GGTGATGGTGATGGTGGCTCCCCATA TGTATATCTCCTTCTTAAATCTAG	Klonierung
<i>srp-mTagBFP2_5_-25</i>	50	CTAGATTTAAGAAGGAGATATACATAT GGGGAGCCACCATCACCATCACC	Klonierung
<i>sucA_E.coli_fw_+2269_RT</i>	19	GTTTACCACATGCTGCGTC	qRT-PCR
<i>sucA_E.coli_rv_+2334_RT</i>	19	ATGACGCAGCAGGGATTTC	qRT-PCR
<i>tolC_E.coli_fw_+1297</i>	22	GATCTGCTGGCACTGAACAATG	PCR/ Sequenzierung
<i>tolC_E.coli_fw_+1471bp</i>	34	ACTATGCTCGAGTTCCGTAAGTATGA CGACGAC	Klonierung
<i>tolC_E.coli_fw_-468bp</i>	32	CTCGATGAATTCAACATCTCCAGTAGC CAAGG	Klonierung
<i>tolC_E.coli_fw_-576</i>	21	GGTCCGTTTGACTATCAGTCC	Klonierung/ Sequenzierung
<i>tolC_E.coli_rv_+1881</i>	34	GCTTCAGTCGACTTCAGCAACACAGTC TTCACGG	Klonierung
<i>tolC_E.coli_rv_+1972</i>	22	AGAAACTCCCGCTGGATTGCTG	Klonierung/ Sequenzierung
<i>tolC_E.coli_rv_+41</i>	22	TGGCTCAACGAACTGAACCCAG	Sequenzierung
<i>tolC_E.coli_rv_-2</i>	30	TAGGTAGATCCCATTCTGTGGTGAAG CAG	Klonierung
<i>yegV_+596_fw_RT</i>	20	GTCACCTCAATCGTCAAGAGG	qRT-PCR
<i>yegV_+725_rv_RT</i>	20	CCTTCTTTATCGAGGCGAAC	qRT-PCR
<i>zwf_E.coli_fw_+1329_RT</i>	20	AGAAGCCTGGAAATGGGTAG	qRT-PCR
<i>zwf_E.coli_rv_+1447_RT</i>	20	TCATTCCAGGAACGACCATC	qRT-PCR

2.1.4 Enzyme

In Tabelle 2.4 sind die in dieser Arbeit verwendeten Enzyme sowie die benötigten Puffer und der Hersteller aufgeführt.

Tabelle 2.4: Verwendete Enzyme und Puffer in dieser Arbeit

Enzym	Puffer	Hersteller
<i>Antartic Phosphatase</i>	10 x Antartic Phosphatase Reaction Buffer	New England BioLabs
<i>Dream Taq® DNA Polymerase</i>	10 x Dream Taq® Buffer	Thermo Scientific
<i>Exonuclease I</i>	-	Thermo Scientific
<i>Fast AP Alkaline Thermosensitive Phosphatase</i>	-	Thermo Scientific
<i>FastDigest Aval (Eco88I)</i>	10 x FastDigest Buffer	Thermo Scientific
<i>FastDigest BamHI</i>	10 x FastDigest Buffer	Thermo Scientific
<i>FastDigest DpnI</i>	10 x FastDigest Buffer	Thermo Scientific
<i>FastDigest EcoRI</i>	10 x FastDigest Buffer	Thermo Scientific
<i>FastDigest HincII</i>	10 x FastDigest Buffer	Thermo Scientific
<i>FastDigest NdeI</i>	10 x FastDigest Buffer	Thermo Scientific
<i>FastDigest NsiI</i>	10 x FastDigest Buffer	Thermo Scientific
<i>FastDigest PstI</i>	10 x FastDigest Buffer	Thermo Scientific
<i>FastDigest Sall</i>	10 x FastDigest Buffer	Thermo Scientific
<i>FastDigest XhoI</i>	10 x FastDigest Buffer	Thermo Scientific
<i>Lysozym</i>	-	Carl Roth
<i>Maxima® Reverse Transcriptase</i>	5 x RT Buffer	Thermo Scientific
<i>Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase</i>	5 x HF Buffer, 5 x GC Buffer	Thermo Scientific
<i>RiboLock® RNase Inhibitor</i>	-	Thermo Scientific
<i>RNase A (10 mg/ml)</i>	-	Fermentas
<i>T4 DNA-Ligase</i>	10 x T4 Ligase Buffer	Thermo Scientific

2.1.5 Größenmarker für DNA

In Tabelle 2.5 sind die in dieser Arbeit verwendeten Größenmarker für DNA sowie deren Größenbereich und der Hersteller aufgeführt.

Tabelle 2.5: Verwendete Größenmarker für DNA in dieser Arbeit

Bezeichnung	Größenbereich [bp]	Hersteller
<i>GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder</i>	100 – 3000	Thermo Scientific
<i>GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder</i>	75 – 20000	Thermo Scientific
<i>100 bp DNA Ladder H3 RTU</i>	100 – 3000	GeneDirex

2.1.6 Nährmedien

In Tabelle 2.6 sind die in dieser Arbeit verwendeten Nährmedien sowie die Zusammensetzung und der Hersteller angegeben. Die Nährmedien wurden mit Wasser aus der Wasseraufbereitungsanlage RIOs™ 5 Millipore hergestellt und bei 121 °C und 2 bar für 15 min autoklaviert.

Tabelle 2.6: Verwendete Nährmedien in dieser Arbeit

Nährmedium	Zusammensetzung	Hersteller
<i>LB-Agar (Miller)</i>	Trypton (10 g/L), Hefeextrakt (5 g/L), NaCl (10 g/L), Agar-Agar (15 g/L)	Carl Roth
<i>LB-Medium (Miller)</i>	Trypton (10 g/L), Hefeextrakt (5 g/L), NaCl (10 g/L)	Carl Roth
<i>M9-Agar mit Glukose</i>	1 M MgSO ₄ ¹ (2 ml/L), 1 M CaCl ₂ ¹ (0,1 ml/L), 10 x M9-Salze ¹ (100 ml/L), 20 %ige Glukose-Lösung ¹ (20 ml/L), Agar-Agar (18 g/L)	eigene Herstellung
<i>M9-Medium mit Glukose</i>	1 M MgSO ₄ ¹ (2 ml/L), 1 M CaCl ₂ ¹ (0,1 ml/L), 10 x M9-Salze ¹ (100 ml/L), 20 %ige Glukose-Lösung ¹ (20 ml/L)	eigene Herstellung
<i>Müller-Hinton-Bouillon</i>	Rinder-Infus (2 g/L), Pepton aus Casein (saures Hydrolysat) (17,5 g/L), Maisstärke (1,5 g/L)	Carl Roth
<i>SOC-Medium</i>	Trypton (20 g/L), NaCl (0,58 g/L), KCl (0,18 g/L), MgCl ₂ (0,95 g/L), MgSO ₄ (2,47 g/L), Hefeextrakt (5 g/L), Glukose (3,6 g/L)	eigene Herstellung
<i>Standard-Nährmedium I</i>	Pepton (15 g/L), Hefeextrakt (3 g/L), NaCl (6 g/L), Glukose (1 g/L)	Carl Roth

¹ siehe Puffer und Lösungen

2.1.7 Puffer und Lösungen

In Tabelle 2.7 sind die in dieser Arbeit verwendeten Puffer und Lösungen sowie deren Zusammensetzung aufgeführt. Die Puffer und Lösungen wurden bei 121 °C und 2,1 bar für 15 min autoklaviert oder über Minisart-Filter mit einem Porendurchmesser von 0,2 µm steril filtriert.

Tabelle 2.7: Verwendete Puffer und Lösungen in dieser Arbeit

Bezeichnung/ Anwendung	Zusammensetzung
<u>Alkalische Lyse</u> GTE-Puffer	50 µl 1 M Glukose, 25 µl 1 M Tris/HCl (pH 8), 20 µl 0,5 M EDTA (pH 8), 20 µl RNase A (10 µg/µl) ad 1000 µl H ₂ O
Lysepuffer	200 µl 1 M NaOH, 100 µl SDS (10 %) ad 1000 µl H ₂ O
Neutralisationspuffer (pH 4,8)	60 ml 5 M KaAc, 11,5 ml Eisessig ad 100 ml H ₂ O
<u>Puffer für die Gelelektrophorese</u> 50 x TAE Puffer	2 M Tris-Base, 50 mM EDTA, eingestellt mit Essigsäure auf pH 8
5 x DNA-Ladepuffer	0,25 % Bromphenolblau, 0,25 % Xylencyanol, 15 % Polysucroselösung
<u>Herstellung kompetenter Zellen</u> TFB 1	0,5 g KaAc, 1 g MgCl ₂ , 0,75 g KCl, 1,6 ml 1 M CaCl ₂ , 17 ml Glycerin 87 % ad 100 ml H ₂ O (autoklaviert)
TFB 2	1 g MOPS, 3,8 ml 1 M CaCl ₂ , 0,0375 g KCl, 8,5 ml Glycerin 87 % ad 50 ml H ₂ O (autoklaviert)
<u>Antibiotika-Stammlösungen</u>	
Ampicillin-Stammlösung	1 mg/ml in H ₂ O (steril filtriert)
Cefoxitin-Stammlösung	2 mg/ml in H ₂ O (steril filtriert)
Chloramphenicol-Stammlösung	5 mg/ml in Ethanol abs.
Ciprofloxacin-Stammlösung	1 mg/ml in H ₂ O (steril filtriert)
Erythromycin-Stammlösung	1 mg/ml in H ₂ O (steril filtriert)
Gentamicin-Stammlösung	1 mg/ml in H ₂ O (steril filtriert)
Kanamycin-Stammlösung	1 mg/ml in H ₂ O (steril filtriert)
Linezolid-Stammlösung	1 mg/ml in H ₂ O (steril filtriert)
Nalidixinsäure-Stammlösung	1 mg/ml in H ₂ O + wenige Tropfen 0,1 N NaOH (steril filtriert)
Norfloxacin-Stammlösung	1 mg/ml in H ₂ O (steril filtriert)
Novobiocin-Stammlösung	5 mg/ml in H ₂ O (steril filtriert)
Polymyxin-Stammlösung	1 mg/ml in H ₂ O (steril filtriert)

<i>Rifampicin-Stammlösung</i>	1 mg/ml in DMSO (steril filtriert)
<i>Tetracyclin-Stammlösung</i>	5 mg/ml in Ethanol abs.
<u><i>Herstellung von M9-Medium (inkl. Glukose und Supplemente)</i></u>	
<i>10 x M9-Salze</i>	5 g NaCl, 128 g Na ₂ HPO ₄ x 7 H ₂ O, 10 g NH ₄ Cl, 30 g KH ₂ PO ₄ ad 1 L, eingestellt mit NaOH auf pH 7,4 (autoklaviert)
<i>1 M CaCl₂-Lösung</i>	5,55 g in 50 ml H ₂ O (steril filtriert)
<i>1 M MgSO₄-Lösung</i>	6,02 g in 50 ml H ₂ O (steril filtriert)
<i>20 %ige Glukoselösung</i>	50 g in 250 ml H ₂ O (steril filtriert)
<i>Thiamin-Stammlösung</i>	20 mg/ml in H ₂ O (steril filtriert)
<i>Threonin-Stammlösung</i>	20 mg/ml in H ₂ O (steril filtriert)
<i>Uracil-Stammlösung</i>	5 mg/ml in H ₂ O (steril filtriert)
<u><i>Sonstige Lösungen</i></u>	
<i>Arabinose-Lösung</i>	50 mg/ml in H ₂ O (steril filtriert)
<i>Fällungsreagenz (EtOH-Fällung)</i>	pro Probe: 2 µl 3 M NaAc (pH 5,2), 2 µl 100 mM EDTA (pH 8,0), 1 µl Glykogen
<i>Isotonische Kochsalzlösung</i>	9 g NaCl ad 1 L H ₂ O (autoklaviert)

2.1.8 Chemikalien

In Tabelle 2.8 sind die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien sowie der jeweilige Hersteller aufgeführt.

Tabelle 2.8: Verwendete Chemikalien in dieser Arbeit

Bezeichnung	Hersteller
<i>2-Mercaptoethanol</i>	Merck
<i>3-(N-Morpholino)propansulfonsäure (MOPS)</i>	Sigma-Aldrich
<i>Agar-Agar</i>	Carl Roth
<i>Ammoniumchlorid</i>	Merck
<i>Ampicillin-Natrium</i>	Sigma-Aldrich
<i>Bromphenolblau</i>	Bio-Rad
<i>Calciumchlorid-Dihydrat</i>	Merck
<i>Cefoxitin-Natrium</i>	MSD Sharp & Dohme
<i>Chloramphenicol</i>	Sigma-Aldrich
<i>Ciprofloxacin-HCl</i>	Bayer
<i>Desoxynukleosidtriphosphate (dNTPs)</i>	Thermo Scientific
<i>Dimethylsulfoxid (DMSO)</i>	Finnzymes
<i>di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat</i>	Merck
<i>Erythromycin</i>	ABBOTT Laboratories

<i>Essigsäure konz.</i>	VWR Prolabo®
<i>Ethanol 70 %</i>	Merck
<i>Ethanol abs.</i>	Merck
<i>Ethidiumbromid 1 %</i>	Merck
<i>Ethylendiamintetraacetat (EDTA)</i>	Carl Roth
<i>Gentamicinsulfat</i>	Sigma-Aldrich
<i>Glukose-Monohydrat</i>	Merck
<i>Glycerin 99,5 %</i>	Carl Roth
<i>Glykogen</i>	Thermo Scientific
<i>Hefeextrakt, granuliert</i>	Merck
<i>Kaliumacetat</i>	Merck
<i>Kaliumchlorid</i>	Merck
<i>Kaliumdihydrogenphosphat</i>	Merck
<i>Kanamycinsulfat</i>	Sigma-Aldrich
<i>L-Alanin</i>	Sigma-Aldrich
<i>L-Arabinose</i>	Fluka
<i>L-Arginin</i>	Sigma-Aldrich
<i>L-Asparagin</i>	Sigma-Aldrich
<i>L-Asparaginsäure</i>	Sigma-Aldrich
<i>L-Cystein</i>	Sigma-Aldrich
<i>L-Glutamin</i>	Sigma-Aldrich
<i>L-Glutaminsäure</i>	Sigma-Aldrich
<i>L-Glycin</i>	Sigma-Aldrich
<i>L-Histidin</i>	Sigma-Aldrich
<i>LiChrosolv® Wasser</i>	Merck Millipore
<i>Linezolid</i>	Pfizer
<i>L-Leucin</i>	Sigma-Aldrich
<i>L-Lysin</i>	Sigma-Aldrich
<i>L-Methionin</i>	Sigma-Aldrich
<i>L-Phenylalanin</i>	Sigma-Aldrich
<i>L-Prolin</i>	Sigma-Aldrich
<i>L-Serin</i>	Sigma-Aldrich
<i>L-Threonin</i>	Carl Roth
<i>L-Tryptophan</i>	Sigma-Aldrich
<i>L-Tyrosin</i>	Sigma-Aldrich
<i>L-Valin</i>	Sigma-Aldrich
<i>Magnesiumchlorid-Hexahydrat</i>	Merck
<i>Magnesiumsulfat-Heptahydrat</i>	Merck
<i>Nalidixinsäure</i>	Sigma-Aldrich
<i>Natriumacetat</i>	Merck
<i>Natriumchlorid</i>	VWR Prolabo®

<i>Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat</i>	Merck
<i>Natriumdodecylsulfat (SDS)</i>	Serva
<i>Natriumhydrogencarbonat</i>	Merck
<i>Natriumhydrogensulfat</i>	Merck
<i>Natriumhydroxid</i>	Grüssing
<i>Norfloxacin</i>	Sigma-Aldrich
<i>Novobiocin-Natrium</i>	Sigma-Aldrich
<i>Polymyxin B Sulfat</i>	Carl Roth
<i>Polysucrose</i>	Sigma-Aldrich
<i>Rifampicin</i>	Fluka
<i>RNase Away</i>	MBP Molecular BioProducts
<i>Roti-Phenol/ Chloroform/ Isoamylalkohol (25:24:1)</i>	Carl Roth
<i>Saccharose</i>	Carl Roth
<i>Tetracyclin-HCl</i>	Sigma-Aldrich
<i>Thiamin-HCl</i>	Sigma-Aldrich
<i>Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris-Base)</i>	Carl Roth
<i>Trypton/ Pepton aus Casein</i>	Carl Roth
<i>Uracil</i>	Interne Abfüllung der Pharmazie
<i>Xylencyanol</i>	Merck

2.1.9 Kits

In Tabelle 2.9 sind die in dieser Arbeit verwendeten kommerziell erhältlichen Kits sowie deren Verwendung und Hersteller angegeben. Die Durchführung erfolgte nach den Angaben der Hersteller und ist dem Methodenteil (Kapitel 2.2) sowie den jeweiligen Handbüchern zu entnehmen.

Tabelle 2.9: Verwendete kommerziell erhältliche Kits in dieser Arbeit

Bezeichnung	Verwendung	Hersteller
<i>Agilent RNA 6000 Nano Kit</i>	Konzentrations-/ Reinheitsmessung von RNA	Agilent Technologies
<i>GenomeLab DTCS Quick Start Kit</i>	Sequenzierung	Beckmann Coulter
<i>Hi Yield® Plasmid Mini DNA Isolierungskit</i>	Plasmidisolierung	Südlabor
<i>Maxima® SYBR Green qPCR Mastermix, ROX provided</i>	Quantitative Real-time PCR	Thermo Scientific
<i>NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up</i>	Reinigung von DNA-Fragmenten	Macherey-Nagel
<i>NucleoSpin® RNA II</i>	Isolierung von RNA	Macherey-Nagel

2.1.10 Geräte und Verbrauchsmaterial

In Tabelle 2.10 sind die in dieser Arbeit verwendeten Geräte und Verbrauchsmaterialien sowie die Hersteller aufgeführt.

Tabelle 2.10: Verwendete Geräte und Verbrauchsmaterialien in dieser Arbeit

Bezeichnung		Hersteller
<i>96-Well-Mikrotiterplatten</i>	Mikrotiterplatten für MHK	VWR
<i>96-Well-Mikrotiterplatten, schwarz</i>	Mikrotiterplatte für Mithras LB 940	Nunc A/S
<i>Agilent Bioanalyzer 2100</i>	Bioanalyzer	Agilent Technologies
<i>BioDoc Analyze</i>	Geldokumentationssystem	Biometra
<i>Biofuge pico</i>	Zentrifuge	Heraeus
<i>Biofuge stratos</i>	Zentrifuge	Heraeus
<i>Biometra® T Gradient</i>	Thermocycler	Analytik Jena
<i>Biometra® T personal</i>	Thermocycler	Analytik Jena
<i>Biometra® T3</i>	Thermocycler	Analytik Jena
<i>Biosphere Filter Tips (10 µl/ 100 µl/ 200 µl/ 1000 µl)</i>	gestopfte Pipettenspitzen	Sarstedt
<i>C25 incubator shaker</i>	Schüttelinkubator	New Brunswick Scientific (Eppendorf Vertrieb)
<i>Cary 100 UV-Vis</i>	UV-Vis-Spektralphotometer	Agilent Technologies
<i>Cary 50</i>	UV-Vis-Spektralphotometer	Varian
<i>Certomat®</i>	Schüttelinkubator	B. Braun Biotech International
<i>ComPhor Midi</i>	Gelelektrophoresekammer	Bioplastics BV
<i>ComPhor Mini</i>	Gelelektrophoresekammer	Bioplastics BV
<i>ComPhor Mt Maxi</i>	Gelelektrophoresekammer	Bioplastics BV
<i>Consort E 143</i>	Spannungsgeber	Biozym
<i>CryoPure Tubes</i>	Kryoröhrchen	Sarstedt
<i>Dispensette® Organic</i>	Dispensierpipette	Brand
<i>Einmal-Küvetten</i>	UV-Küvetten	Brand
<i>Electroporation Cuvette 2 mm</i>	Elektroporationsküvetten	Eurogentec
<i>Emission filter 40096</i>	Emissionsfilter für Mithras LB 940 (610 nm)	Berthold Technologies
<i>Emission filter 40273</i>	Emissionsfilter für Mithras LB 940 (535 nm)	Berthold Technologies

<i>Emission filter 40272</i>	Emissionsfilter für Mithras LB 940 (460 nm)	Berthold Technologies
<i>Excitation filter 37997</i>	Anregungsfilter für Mithras LB 940 (550 nm)	Berthold Technologies
<i>Excitation filter 40088</i>	Anregungsfilter für Mithras LB 940 (405 nm)	Berthold Technologies
<i>Excitation filter 40271</i>	Anregungsfilter für Mithras LB 940 (485 nm)	Berthold Technologies
<i>GenePulser II/ Pulse Controller II</i>	Elektroporationsgerät	Biorad
<i>GenomeLab™ GeXP</i>	Sequenziergerät	Beckmann Coulter
<i>Glasperlen</i>	Glasperlen für Glycerinkulturen	Bastelbedarf
<i>Glasstäbe</i>	Glasstäbe zum Ausstreichen	Glasbläserei Uni Hamburg
<i>Heraeus function line B12, B20</i>	Brutschränke	Heraeus
<i>Heraeus™ Pico 17 Centrifuge</i>	Zentrifuge	Thermo Scientific
<i>Heraguard®</i>	Sicherheitswerkbank	Heraeus
<i>Herasafe®</i>	Sicherheitswerkbank	Heraeus
<i>Hitzesterilisator</i>	Trockenschrank/ Hitzesterilisation	Heraeus
<i>IKA® MS 3</i>	Vortexer	IKA
<i>inoLab pH Level 1</i>	pH-Meter	WTW
<i>Julaba MWB</i>	Wasserbad	Julaba Labortechnik GmbH
<i>Kern PJ 2100-2M</i>	Waage	Kern & Sohn
<i>Kimtech Sciences Wipers</i>	Labortücher	Kimberly-Clark® Professional
<i>Klebefolien, optisch klar</i>	Verschlussfolie für qRT-Platten	Sarstedt
<i>Labmate Discovery comfort (2 µl, 20 µl)</i>	Kolbenhubpipette	Abimed/ HTL
<i>Labopette</i>	Multistep-Pipette	Hirschmann® EM Techcolor
<i>Microamp Fast 96 Well Reaction Plate</i>	qRT-Platte mit 96 Vertiefungen	Applied Biosystems
<i>Milli-Q® Reference A+ System</i>	Wasseraufbereitungsanlage (Wasserqualität Typ 1)	Millipore
<i>Minifuge T</i>	Zentrifuge	Sepatech
<i>Minisart 0,2 µm, 26 mm</i>	Sterilfilter	Sartorius stedim biotech
<i>Mithras LB 940</i>	Multitechnologie Mikroplattenleser	Berthold Technologies

MR2	Magnetrührer	Heidolph
Multiply Biosphere Pro® (0,2 ml/ 0,5 ml)	Reaktionsgefäße (Eppendorf-Caps)	Sarstedt
Nanodrop ND-1000, Nanodrop 2000	UV-Vis-Spektralphotometer	Thermo Scientific
Navigator™	Waage	Ohaus Corporation
Omnifix (5 ml/ 10 ml/ 20 ml)	Einmalspritzen	B. Braun/ VWR
Parafilm „M“	Parafilm	Bemis
Peqlab primus 25 advanced®	Thermocycler	peqlab
Perfect spin P	Plattenzentrifuge	peqlab
Petrischalen mit Nocken, 92 x 16 mm	Petrischalen	Sarstedt
Pipetman P100, P1000	Kolbenhubpipette	Gilson
Pipettenspitzen (2 µl/ 10 µl/ 20 µl/ 100 µl/ 1000 µl)	Pipettenspitzen	Sarstedt
PS304 Power Supply	Spannungsgeber	Biometra
RCT basic IKAMAG® safety control	Magnetrührer	IKA
Reax top	Vortexer	Heidolph
RIOs™5	Wasseraufbereitungsanlage (Wasserqualität Typ 3)	Millipore
Safe Seal Gefäße (1,5 ml/ 2,0 ml)	Reaktionsgefäße (Eppendorf-Caps)	Sarstedt
Sartorius LA120S	Analysenwaage	Sartorius AG
Scanspeed 1524M	High-Speed Mikrozentrifuge	LaboGene
Schraubröhren (15 ml/ 50 ml, Spitz- und Flachboden)	Falcons	Sarstedt
Sprout™	Tischzentrifuge	Heathrow Scientific LLC
Sterican ⅈ 0,90 x 70 mm	Kanülen	B. Braun
Sterile polystyrene loop (10 µl)	Einmalimpfösen	Kuhnle GmbH
Systec 3870 ELV, V-95, Mediaprep	Autoklaven	Systec
ViiA™ 7 Real-time PCR System	qRT-Gerät	Applied Biosystems
Vortex-Genie 2	Vortexer	Scientific Industries

2.1.11 Software

In Tabelle 2.11 ist die in dieser Arbeit verwendete Software sowie die Verwendung und der Anbieter bzw. die Referenz aufgeführt.

2.11: Verwendete Software in dieser Arbeit

Bezeichnung	Verwendung	Anbieter/ Referenz
<i>Nanodrop® ND-1000 V3.5.2</i>	Nanodrop ND-1000	Thermo Scientific
<i>Nanodrop 2000/ 2000c Software</i>	Nanodrop 2000	Thermo Scientific
<i>Varian Cary Series WinUV</i>	Cary 50	Varian
<i>Vector NTI Advance™ 11</i>	Planung für Klonierungen, Auswertung von Sequenzdaten	Invitrogen
<i>Endnote X7.2</i>	Literaturverwaltung	Thomson Reuters
<i>Office 2010/ 2013</i>	Textverarbeitung	Microsoft
<i>ViiA™ 7 Software</i>	ViiA™ 7 Real-time PCR System	Invitrogen
<i>Agilent Bioanalyzer 2100 Software</i>	Agilent Bioanalyzer 2100	Agilent Technologies
<i>BiodocAnalyze Software</i>	BioDocAnalyze	Biometra
<i>PCR Miner 4.1</i>	Auswertung von qRT-Daten	(Zhao & Fernald, 2005)
<i>LinReg PCR 2014.5</i>	Auswertung von qRT-Daten	(Pfaffl, 2017; Ruijter et al., 2009)
<i>MikroWin 2000</i>	Erfassung von Fluoreszenzdaten	Mikrotek Laborsysteme GmbH
<i>GenomeLab Software</i>	GenomeLab™ GeXP	Beckmann Coulter Inc.
<i>Cary WinUV Software</i>	Cary 100 UV-Vis	Agilent Technologies
<i>ChemDraw Professional 16 Trial Version</i>	Zeichnen von Strukturformeln	PerkinElmer

2.2 Methoden

2.2.1 Lagerung und Kultivierung von Bakterienstämmen

Für die langfristige Aufbewahrung von Reinkulturen wurden die Bakterien mittels Kryokonservierung bei -80 °C gelagert. Hierfür wurden Kryoröhrchen mit ca. 15 Kunststoffperlen sowie einer Mischung aus Standard-Nährmedium I und 87 % Glycerin im Verhältnis 1:1 hergestellt und bei 121 °C und 2 bar für 20 min autoklaviert. In die Kryoröhrchen wurden von einer frischen Platte einer Reinkultur drei bis vier Kolonien mit einem sterilen Glasstab eingerührt und 30 min unter der Sicherheitswerkbank bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde das Glycerin-Medium-Gemisch vollständig mit einer Pipette abgezogen und die Zellen bei -80 °C gelagert.

Bei Bedarf einer frischen Bakterienkultur wurde aus den Kryoröhrchen unter sterilen Bedingungen mit einer Einmalimpföse eine Perle entnommen und auf LB-Agar, gegebenenfalls unter Zugabe von Antibiotika, ausgestrichen. Die Platten wurden bei 37 °C im Brutschrank über Nacht inkubiert. Die Lagerung auf Platte erfolgte im Kühlschrank bei 4 °C für maximal 2 - 4 Wochen.

Für das Anlegen von Übernachtskulturen (ÜNKs) wurde direkt aus dem Kryoröhrchen eine Perle verwendet oder eine Kolonie mit einem sterilen Glasstab von einer frischen LB-Platte gepickt und in das entsprechende Medium eingerührt. Anschließend erfolgte die Inkubation über Nacht im Schüttelinkubator bei 37 °C und 130 rpm bzw. 180 rpm.

2.2.2 Bestimmung der Keimzahl

2.2.2.1 Bestimmung der Lebendkeimzahl

Die Lebendkeimzahl, auch als KBE/ml (Koloniebildende Einheiten/ml) bezeichnet, gibt die Anzahl an vermehrungsfähigen Bakterien pro Milliliter an. Abgestorbene und lysierte Zellen werden nicht erfasst. Die Bestimmung basiert auf der Erstellung einer Verdünnungsreihe der zu untersuchenden Bakteriensuspension und dem anschließenden Auszählen der nach Inkubation gebildeten Kolonien pro Verdünnung. Von einer Bakteriensuspension wurde eine serielle Verdünnung von 10^0 bis 10^{-8} in physiologischer Kochsalzlösung hergestellt und 50 µl der Verdünnungen auf jeweils einem Drittel einer LB-Agarplatte ausgestrichen. Die Platten wurden über Nacht bei 37 °C im Brutschrank inkubiert und die Anzahl der Kolonien am nächsten Tag für jede Verdünnung gezählt. Die Berechnung der KBE/ml erfolgte mit der Formel 2.1.

$$\text{KBE/ml} = \frac{\text{Anzahl der Kolonien}}{0,05 \text{ ml} \times \text{Verdünnungsstufe}}$$

Formel 2.1: Berechnung der KBE/ml

2.2.2.2 Näherung mittels Optischer Dichte

Im Gegensatz zur KBE/ml umfasst die Näherung der Keimzahl über die Optische Dichte (OD) die Gesamtkeimzahl und schließt neben den vermehrungsfähigen Bakterien auch die abgestorbenen und lysierten Zellen ein. Effekte, wie die Filamentierung von Bakterien oder die Zellgröße beeinflussen zusätzlich das Ergebnis der OD-Bestimmung. Aus diesem Grund wird die Methode auch lediglich als Näherung der Keimzahl betrachtet. Der Vorteil der Näherung über die Optische Dichte liegt in der schnellen und einfachen Abschätzung der Keimzahl während eines Wachstumsvorganges.

Für die optische Dichtemessung wurde 1 ml Bakteriensuspension entnommen und die Absorption bei 600 nm in einer Einmalküvette gegen das verwendete Medium als Leerwert vermessen. Die Abschätzung der Keimzahl erfolgte nach McFarland (Mc Farland, 1907). Verwendet wurden die UV-Vis-Spektralphotometer Cary 100 UV-Vis und Cary 50.

Die Methode wurde bei der Anzucht von Flüssigkulturen für die zeitliche Abschätzung der Antibiotikazugabe sowie zur Kontrolle des Wachstumsverlaufs verwendet. Des Weiteren wurde die optische Dichte zur Nivellierung der Fluoreszenzdaten herangezogen (Kapitel 2.2.15.2).

2.2.3 Bestimmung der Minimalen Hemmkonzentration mittels Mikrodilutionsverfahren

Die Minimale Hemmkonzentration (MHK) ist definiert als die niedrigste Konzentration einer antibakteriellen Substanz, die unter festgelegten Bedingungen ein sichtbares Bakterienwachstum verhindert. Die Durchführung nach dem Mikrodilutionsverfahren erfolgte nach den Standards des CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2012, 2014). Abweichend hiervon wurde ein Inokulum von $7,5 \times 10^5$ KBE/ml eingesetzt sowie in M9-Medium die Inkubationszeit aufgrund der verringerten Wachstumsgeschwindigkeit auf 24 h verlängert. Als Kohlenstoffquelle für das M9-Medium wurde Glukose verwendet.

Die Empfindlichkeitsbestimmung nach dem Mikrodilutionsverfahren wurde in einer 96-Well-Mikrotiterplatte durchgeführt. Hierfür wurde eine serielle 1:1-Verdünnung einer Lösung des zu untersuchenden Antibiotikums mit M9-Medium bzw. Müller-Hinton-Bouillon (MH-Bouillon) angesetzt und 50 µl jeder Verdünnung in jeweils drei Kavitäten der Platte vorgelegt (Dreifachbestimmung). Als Wachstumskontrolle dienten drei Kavitäten mit Medium ohne antibakteriellen Zusatz. Durch das Einrühren von Kolonien einer frisch angesetzten Agarplatte oder ausgehend von einer ÜNK wurde in physiologische Kochsalzlösung der McFarland-Standard 0,5 entsprechend einer Keimzahl von etwa $1,5 \times 10^8$ KBE/ml eingestellt. Die eingestellte Bakteriensuspension wurde mit Medium 1:100 verdünnt und 50 µl der Verdünnung zu den mit Antibiotika ver-

sehenen Kavitäten bzw. den Wachstumskontrollen gegeben. Die Mikrotiterplatte wurde mit einer Klebefolie verschlossen und bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Die Inkubationszeit für MHK-Bestimmungen in MH-Bouillon betrug 16 h – 20 h, für Bestimmungen in M9-Medium 24 h. Als Kontrolle für die Versuchsdurchführung und der zugesetzten Antibiotikakonzentrationen diente der Referenzstamm *E. coli* ATCC 25922.

2.2.4 Morphologische Betrachtung von Bakterien

Die Lichtmikroskopie ermöglicht durch die bis zu 1500-fache Vergrößerung die morphologische Betrachtung und Differenzierung von Bakterien. Zur bildlichen Darstellung und Abhebung der Bakterien vom Hintergrund wurden diese auf einem Objektträger mittels Hitze fixiert und nach Gram angefärbt. Die von dem Bakteriologen Hans Christian Gram entwickelte Färbemethode differenziert die Bakterien anhand eines unterschiedlichen Zellwandaufbaus in die zwei Gruppen der grampositiven und der gramnegativen Bakterien. Grampositive Bakterien besitzen eine dicke Peptidoglykanschicht, welche aus bis zu 40 Schichten bestehen kann und von Lipoteichonsäuren und Teichonsäuren durchzogen ist. Die Peptidoglykanschicht gramnegativer Bakterien ist mit bis zu drei Schichten wesentlich dünner und wird zusätzlich von einer äußeren Membran umgeben, auf deren Oberfläche Lipopolysaccharide verankert sind. Der unterschiedliche Zellwandaufbau bestimmt dabei das Färbeverhalten der Bakterien.

Im ersten Schritt der Gram-Färbung wird zu den auf einem Objektträger fixierten Bakterien eine basische Karbol-Gentianaviolett-Lösung gegeben. Durch Zugabe eines Tropfens Lugolscher Lösung bilden sich größere Farbkomplexe aus, wodurch grampositive und gramnegative Bakterien blau angefärbt werden. Anschließend erfolgt durch Zugabe von Ethanol 96 % die differenzierende Entfärbung. Bei den grampositiven Bakterien bleibt aufgrund der Ansammlung von Farbkomplexen in den Zwischenräumen des vielschichtigen Peptidoglykans die blaue Färbung erhalten, wohingegen bei gramnegativen Bakterien diese durch den Alkohol entfernt wird. Die Zugabe von Fuchsin- oder Safraninlösung führt zur rötlichen Färbung der zuvor entfärbten gramnegativen Bakterien, die blaue Färbung der grampositiven Bakterien bleibt unbeeinflusst.

In dieser Arbeit wurde ausschließlich *E. coli* als gramnegatives Bakterium unter dem Mikroskop betrachtet, sodass auf die Färbung mit Karbol-Gentianaviolett und Lugolscher Lösung sowie der Entfärbung durch Ethanol verzichtet wurde. Die Zellen wurden direkt nach der Fixierung mit Safranin-Lösung für 1 min inkubiert, welche anschließend vom Objektträger abgegossen wurde. Der Objektträger wurde vorsichtig mit Leitungswasser abgespült, an der Luft getrocknet und die angefärbten Bakterien bei 400-facher Vergrößerung unter dem Lichtmikroskop betrachtet.

2.2.5 Isolierung von DNA

2.2.5.1 Isolierung von chromosomaler DNA mittels Kochlysate-Methode

Die Kochlysate-Methode stellt eine schnelle und einfache, jedoch qualitativ nicht besonders hochwertige Isolierungsmethode der Gesamt-DNA dar. Für die Isolierung wurden von einer frischen Bakterienkultur vier bis fünf Kolonien mit einem sterilen Glasstab gepickt und in 100 µl demineralisiertem Wasser (LiChrosolv®) resuspendiert. Die Bakteriensuspension wurde im Thermocycler für 15 min bei 99 °C erhitzt und anschließend für 5 min bei 13.000 rpm und RT abzentrifugiert. Durch die hohen Temperaturen werden die Zellen beschädigt, sodass die DNA aus den Zellen austritt. Nach der Zentrifugation wurde der DNA enthaltende Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt und bei -20 °C bis zur Verwendung gelagert.

2.2.5.2 Plasmidisolierung

2.2.5.2.1 Isolierung durch Alkalische Lyse

Das Prinzip der Alkalischen Lyse basiert auf dem unterschiedlichen Vermögen zur Renaturierung von Plasmid- und chromosomaler DNA nach alkalischer Denaturierung. Die Methode wurde ursprünglich von Birnboim und Doly 1979 beschrieben (Birnboim & Doly, 1979).

Für die Isolierung von Plasmiden wurden 3 ml einer ÜNK des plasmidtragenden Stammes für 3 min bei 5.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 100 µl kaltem GTE-Puffer (Glukose-Tris-EDTA) vollständig resuspendiert. Die Zugabe von Glukose und Tris-HCl führt zur Stabilisierung der Osmolarität und des pH-Wertes und verhindert eine frühzeitige Zelllyse und eine dadurch bedingte verringerte Plasmidausbeute. Die Komplexbildung zweiwertiger Kationen, wie Mg^{2+} und Ca^{2+} durch EDTA, bewirkt die Destabilisierung der Bakterienhülle. Zusätzlich enthält der GTE-Puffer das Enzym RNase A, das die bei der Isolierung frei werdende RNA durch hydrolytische Spaltung abbaut. Zu dem Ansatz wurden 200 µl Lysepuffer hinzugegeben und das Reaktionsgefäß sofort invertiert. Durch die Zugabe von SDS und NaOH im Lysepuffer wird die Zellwand lysiert und sowohl Plasmid- als auch chromosomale DNA durch Brechen der Wasserstoffbrückenbindungen denaturiert. Anschließend wurden 150 µl kalter Neutralisationspuffer hinzugegeben, der Ansatz gevortext und für 3 min auf Eis gestellt. Der leicht saure Kaliumacetatpuffer führt zur Neutralisation des pH-Wertes und Renaturierung der DNA. Während die Plasmid-DNA aufgrund ihrer Konformität in der Lage ist vollständig zu renaturieren, fällt die durch Präparationsschritte zerstückelte chromosomale DNA gemeinsam mit Zellwandbestandteilen, Proteinen und Kaliumdodecylsulfat aus. Die Zelltrümmer sowie die chromosomale DNA wurden für 5 min bei 15.000 rpm abzentrifugiert und 400 µl des plasmidenthaltenden Überstands in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Anschließend wurden 800 µl Ethanol abs. hinzugegeben und der Ansatz für 15 min bei 15.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und das Präzipitat mit 1 ml Ethanol 70 % gewaschen. Der Ansatz wurde für 5 min bei

15.000 rpm zentrifugiert und der Waschschrift mit 1 ml Ethanol 70 % sowie die Zentrifugation wiederholt. Der Überstand wurde vollständig abgenommen und das Pellet zur Entfernung des Ethanols bei 37 °C für etwa 20 min im Brutschrank getrocknet. Das Lösen des Pellets erfolgte in 30 µl 1:10 verdünntem EB-Puffer aus dem Hi Yield® Plasmid Mini DNA Isolierungskit. Die Plasmid-DNA wurde bei -20 °C gelagert.

2.2.5.2.2 Isolierung mittels Hi Yield® Plasmid Mini DNA Isolierungskit

Die Methode der Plasmidisolierung über das Hi Yield® Plasmid Mini Kit bedient sich der modifizierten Form der Alkalischen Lyse mit RNase-Behandlung und dem Einsatz von Glasfasermatrix zur Bindung der DNA nach Zugabe chaotroper Salze (Birnboim & Doly, 1979; Vogelstein & Gillespie, 1979). Die RNase A wurde dem PD1-Puffer zugegeben, die chaotropen Salze zur verbesserten Bindung der DNA an die Matrix sind in den Puffern PD3 und W1 enthalten.

Die Durchführung erfolgte nach den Angaben des Herstellers (Südlabor SLG, 2014). 4 ml ÜNK des plasmid-tragenden Stammes wurden für 1 min bei 15.000 x g zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in RNase-haltigem PD1-Puffer resuspendiert. Nach Zugabe von 200 µl PD2-Lysepuffer wurde der Ansatz mehrmals invertiert und für 2 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden 300 µl des Neutralisationspuffers PD3 hinzugegeben, der Ansatz erneut invertiert und für 3 min bei 15.000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde auf eine Säule des Kits gegeben, für 30 s bei 15.000 x g zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Anschließend wurden 400 µl W1-Puffer auf die Säule gegeben, erneut für 30 s bei 15.000 x g zentrifugiert und der Durchfluss ebenfalls verworfen. Die Plasmid-DNA wurde mit 600 µl ethanolhaltigem Wash Buffer gewaschen und der Durchfluss nach der Zentrifugation von 30 s bei 15.000 x g verworfen. Zur Entfernung von Pufferrückständen erfolgte ein Trocknungsschritt für 3 min bei 15.000 x g. Die Säule wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und 15 µl 1:10 verdünnter EB-Puffer mittig auf die Säule gegeben. Nach einer Inkubationszeit von 2 min bei RT wurde für 2 min bei 15.000 x g zentrifugiert. Elutions- und Zentrifugationsschritt wurden mit weiteren 15 µl wiederholt. Die eluierte Plasmid-DNA wurde bei -20 °C gelagert.

2.2.6 Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR - *polymerase chain reaction*) wurde 1983 von Kary Mullis entwickelt und stellt bis heute eine der größten revolutionären Entwicklungen in der Molekularbiologie dar. Mit der Erfindung der PCR war es erstmalig möglich, ausgehend von geringsten Mengen an DNA, DNA-Abschnitte gezielt und in hoher Kopienzahl *in vitro* zu amplifizieren. Mittlerweile wurde die Polymerase-Kettenreaktion methodisch weiterentwickelt (Saiki et al., 1988). Eine deutliche Verbesserung brachte der Austausch der

anfänglich verwendeten DNA-Polymerase I aus *E. coli* gegen die Polymerase aus dem thermophilen Bakterium *Thermus aquaticus*. Während die Polymerase aus *E. coli* bei der Denaturierung zerstört wurde und nach jedem Zyklus neu ergänzt werden musste, ist die Polymerase aus *Thermus aquaticus* hitzestabil und bleibt selbst bei den hohen Temperaturen der Denaturierung intakt. Die aus *Thermus aquaticus* isolierte Polymerase wird als *Taq*-Polymerase bezeichnet und ermöglichte die Automatisierung der Methode. Eine weitere hitzestabile Polymerase stellt die *Pfu*-Polymerase aus dem hyperthermophilen Archaeon *Pyrococcus furiosus* dar. Gegenüber der *Taq*-Polymerase hat die *Pfu*-Polymerase sowie ihre Weiterentwicklung die High Fidelity Phusion® DNA Polymerase, den Vorteil einer Korrekturlesefunktion (*proof reading*), wodurch die Fehlerrate bei der Amplifizierung minimiert wird (Thermo Scientific, 2011, 2013).

Tabelle 2.12: Gegenüberstellung der verwendeten DNA-Polymerasen in dieser Arbeit

	<i>DreamTaq® Polymerase</i>	<i>Phusion® High Fidelity Polymerase</i>
<i>Gewinnung</i>	Isoliert aus <i>Thermus aquaticus</i>	Modifizierte Form der <i>Pfu</i> -Polymerase aus <i>Pyrococcus furiosus</i>
<i>Syntheseleistung</i>	1 min/kb (Thermo Scientific, 2013)	15 - 30 s/kb (Thermo Scientific, 2011)
<i>Korrekturlesefunktion</i>	nein	ja (3' → 5'-Exonuklease-Aktivität)
<i>Fehlerrate</i>	$2,2 \times 10^{-5}$ (Thermo Scientific 2015)	$4,4 \times 10^{-7}$ (Thermo Scientific 2015)
<i>Enden</i>	Adenosylrestüberhang (Thermo Scientific, 2013)	glatte Enden (Thermo Scientific, 2011)

Das Ausgangsmaterial für die PCR bilden ein DNA-Template, zwei spezifisch bindende Oligonukleotide (Primer), Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTPs), eine DNA-abhängige DNA-Polymerase sowie der zur Polymerase gehörige Mg^{2+} -haltige Puffer. Die Amplifizierung des DNA-Fragmentes findet in den drei aufeinander folgenden und in sich wiederholenden Phasen statt: Denaturierung, Annealing und Elongation (Abb. 2.1). In der ersten Phase, der Denaturierung, wird die als Template dienende dsDNA bei mindestens 95 °C denaturiert, sodass die Wasserstoffbrückenbindungen der Doppelhelix aufgebrochen werden und die DNA als komplementäre Einzelstränge vorliegt. Anschließend erfolgt das Annealing der Primer an die einzelsträngige DNA. Hierfür wird die Temperatur in Abhängigkeit der Schmelztemperatur der Primer auf ca. 50 – 72 °C gesenkt, sodass diese an die komplementären Bereiche der Einzelstränge hybridisieren können. Durch die Bindung der Primer werden freie 3'-OH-Enden generiert an die die DNA-Polymerase in der dritten Phase bei 72 °C die dNTPs anbaut und den neu synthetisierten zur Matrize komplementären Strang verlängert. Die drei Phasen werden in der Regel in bis zu 30 Zyklen wiederholt, wobei die im vorausgegangenen Zyklus generierte Menge an PCR-Produkt als Template für den folgenden Zyklus fungiert. Die Kopienzahl liegt aufgrund der annähernden Verdoppelung der PCR-Produktmenge pro Zyklus nach 30 Zyklen bei etwa 1 Milliarde.

In dieser Arbeit fand die Methode der PCR Verwendung bei der Klonierung von Reporterplasmiden, der Selektion von Transformanten und Rekombinanten, der Sequenzierung sowie bei der Bestimmung von Expressionsniveaus in der qRT-PCR.

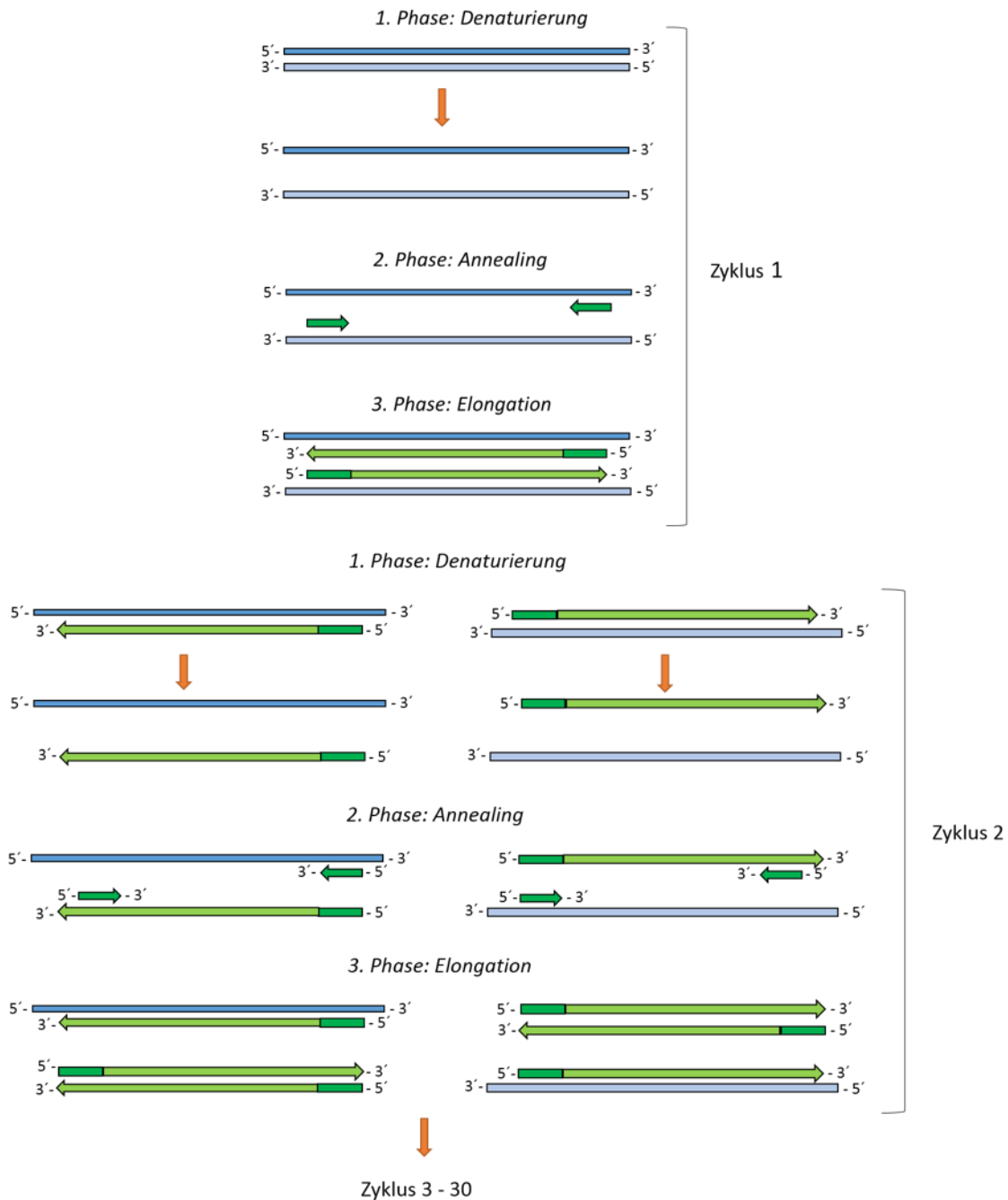


Abbildung 2.1: Prinzip der Polymerase-Kettenreaktion

2.2.6.1 Standard-PCR

2.2.6.1.1 Standard-PCR mit der DreamTaq® DNA Polymerase

Für die Durchführung von PCRs mit der DreamTaq® DNA Polymerase wurde folgendes Standardprotokoll verwendet und dieses entsprechend den Bedingungen des zu amplifizierenden Produktes angepasst. Die Schmelztemperatur der Primer (T_m) wurde mit der Formel 2.2 berechnet. Als Annealingtemperatur wurde die Schmelztemperatur abzüglich 5 °C verwendet.

$$T_m = 4 \times \text{Anzahl der Basen GC} + 2 \times \text{Anzahl der Basen AT}$$

Formel 2.2: Berechnung der Schmelztemperatur (T_m) der Primer

Tabelle 2.13: Verwendetes Standardprotokoll für PCRs mit der DreamTaq® DNA Polymerase

Reaktionsansatz	Volumina		
<i>10 x DreamTaq® Buffer</i>	5 µl		
<i>dNTPs (2 mM)</i>	1,5 µl		
<i>Forward-Primer</i>	1 µl (0,2 µM)		
<i>Reverse-Primer</i>	1 µl (0,2 µM)		
<i>DreamTaq® DNA Polymerase</i>	0,25 µl		
<i>Template-DNA (Koch-DNA unverd. bzw. Plasmid-DNA aus Alkalischer Lyse 1:300 verd.)</i>	2 µl		
<i>Wasser</i>	ad 50 µl		
Reaktionsschritt	Programm		
<i>Initiale Denaturierung</i>	95 °C	3 min	
<i>Denaturierung</i>	95 °C	30 s	} x 30 Zyklen
<i>Annealing</i>	$T_m - 5\text{ °C}$	30 s	
<i>Elongation</i>	72 °C	1 min/kb	
<i>Finale Elongation</i>	72 °C	5 min	
<i>Pause</i>	4 °C		

2.2.6.1.2 Standard-PCR mit der Phusion® High Fidelity DNA Polymerase

In Tabelle 2.14 ist das Standardprotokoll für PCRs, die mit der Phusion® High Fidelity DNA Polymerase durchgeführt wurden, dargestellt. Die PCR-Bedingungen wurden an das jeweils zu amplifizierende PCR-Produkt angepasst. Für die Phusion® High Fidelity DNA Polymerase stehen die zwei Puffer HF- und GC-Puffer zur Verfügung. Der HF-Puffer diene, wie nach Herstellerangaben empfohlen, als Standardpuffer (Thermo Scientific, 2011). Für DNA-Templates mit einem hohem GC-Gehalt oder komplexen sekundären Strukturen wurde der GC-Puffer unter Zusatz von DMSO verwendet. Die Schmelztemperatur der Primer wurde mit der Formel 2.2 berechnet und die Annealingtemperatur nach den Empfehlungen des Herstellers angepasst (Thermo Scientific, 2011).

Tabelle 2.14: Verwendetes Standardprotokoll für PCRs mit der Phusion® High Fidelity DNA Polymerase

Reaktionsansatz	Volumina	
<i>5 x HF Buffer/ 5 x GC Buffer</i>	10 µl	
<i>dNTPs (2 mM)</i>	5 µl	
<i>Forward-Primer</i>	1,5 µl (0,3 µM)	
<i>Reverse-Primer</i>	1,5 µl (0,3 µM)	
<i>DMSO (optional)</i>	1,5 µl (3 %)	
<i>Phusion® High Fidelity DNA Polymerase</i>	0,5 µl	
<i>Template-DNA (Koch-DNA unverd. bzw. Plasmid-DNA aus Alkalischer Lyse 1:300 verd.)</i>	2 µl	
<i>Wasser</i>	ad 50 µl	
Reaktionsschritt	Programm	
<i>Initiale Denaturierung</i>	98 °C	30 s
<i>Denaturierung</i>	98 °C	10 s
<i>Annealing</i>	x ¹ °C (Thermo Scientific, 2011)	30 s
<i>Elongation</i>	72 °C	30 s/kb
<i>Finale Elongation</i>	72 °C	5 min
<i>Pause</i>	4 °C	

x 30 Zyklen

¹abhängig von der Primerlänge

2.2.6.2 Gradienten-PCR

Die Gradienten-PCR diente zur Optimierung von PCR-Bedingungen und wurde zur Ermittlung der optimalen Annealingtemperatur von Primerpaaren verwendet. Hierfür wurde ein PCR-Mastermix nach dem Standardprotokoll für die DreamTaq® Polymerase (Tabelle 2.13) angesetzt und jeweils 10 µl auf einzelne 0,2 ml Reaktionsgefäße verteilt. In einem Thermocycler wurde ein entsprechendes Gradientenprogramm gefahren, sodass die Annealingtemperatur im Gerät von links nach rechts zunahm. Die Proben wurden im Agarosegel aufgetrennt und anhand der Produktausbeute und der -spezifität die optimale Annealingtemperatur gewählt.

2.2.6.3 SOEing-PCR

Die SOEing-PCR (*splicing by overlap extension*) ist eine spezielle Form der PCR, bei der zwei PCR-Produkte durch homologe Bereiche der Primer basengenau zu einem PCR-Produkt fusioniert werden (Horton, 1995). Hierfür wurden die Primer der zu fusionierenden PCR-Produkte so gewählt, dass der Reverse-Primer des vorderen PCR-Produktes und der Forward-Primer des hinteren PCR-Produktes komplementär zueinander sind. Sie bestehen beide jeweils zu 20 bp aus dem vorderen und dem hinteren PCR-Produkt und ermöglichen darüber die Fusion zum SOEing-Produkt. Bei dem Forward-Primer des vorderen PCR-Produktes und dem Reverse-Primer des hinteren PCR-Produktes handelte es sich um zwei Standardprimer, an die Erkennungssequenzen von Restriktionsenzymen für die Plasmidkonstruktion angehängt wurden. Die zu fusionierenden PCR-Produkte wurden nach dem Standardprotokoll für die Phusion® High Fidelity DNA Polymerase (Tabelle 2.14) amplifiziert und die Primer anschließend über eine Reinigung mit dem NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up entfernt. In einem molaren Verhältnis von 1:1 wurden die Einzelfragmente in einer Gesamtmenge von 100 ng als Template für die SOEing-PCR eingesetzt. Mit Ausnahme der Primer wurden alle für die PCR benötigten Reagenzien zum Ansatz gegeben und das SOEing-Programm 1 gefahren (Tabelle 2.15). Hierbei wurde über die Hybridisierung der homologen Primer und der anschließenden Elongation durch die Phusion® DNA-Polymerase das SOEing-Produkt generiert (Abb. 2.2). Nach Beendigung des Programmes wurden die äußeren Primer (Forward-Primer des vorderen PCR-Produktes und Reverse-Primer des hinteren PCR-Produktes) zu dem Ansatz gegeben und das SOEing-Programm 2 (Tabelle 2.15) mit 30 Zyklen gefahren. Das fusionierte PCR-Produkt diente nun als DNA-Template für die Amplifizierung.

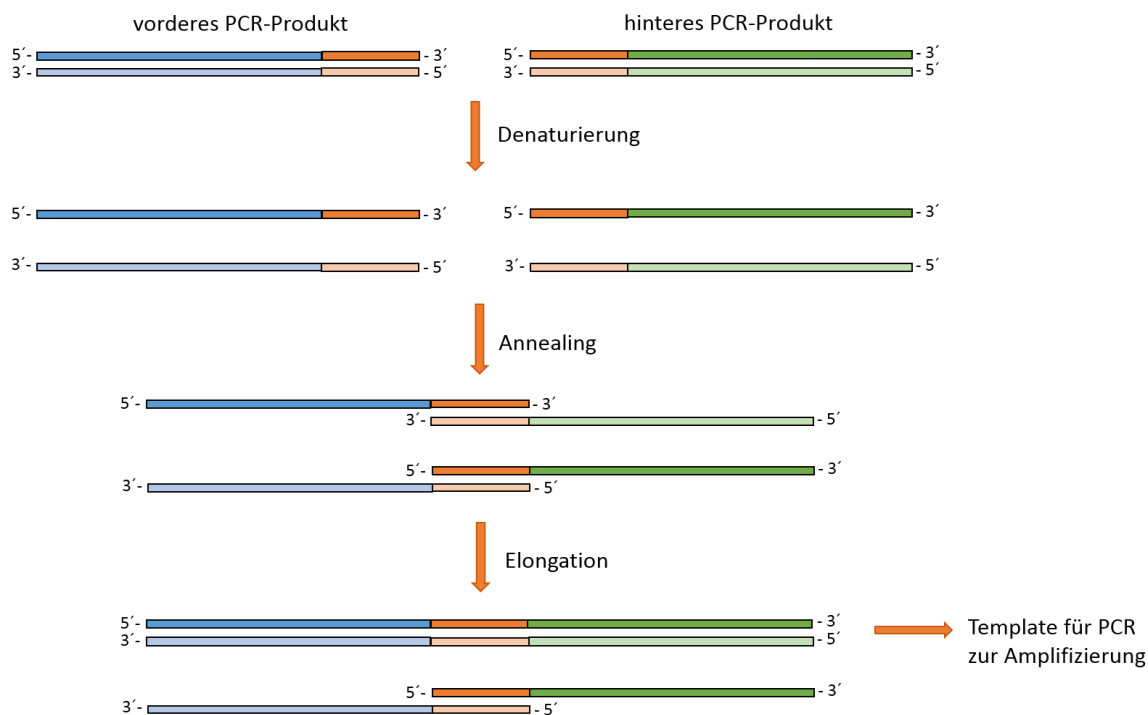


Abbildung 2.2: Generierung des SOEing-Produktes Tabelle 2.15: Verwendete Programme in der SOEing-PCR

SOEing-Programm 1		SOEing-Programm 2	
Reaktionsschritt	Programm	Reaktionsschritt	Programm
Initiale		Initiale	
Denaturierung	98 °C, 2 min	Denaturierung	98 °C, 2 min
Denaturierung	98 °C, 20 s	Denaturierung	98 °C, 20 s
Annealing/ Elongation	72 °C, 30 s/kb	Annealing/ Elongation	x ¹ °C, 30 s/kb
Finale Elongation	72 °C, 5 min	Finale Elongation	72 °C, 5 min
	x 6		x 30

¹ abhängig von der Schmelztemperatur der äußeren Primer

2.2.7 Agarose-Gelelektrophorese

Bei der Agarose-Gelelektrophorese handelt es sich um eine molekularbiologische Methode, welche zur Größenauftrennung von Nukleinsäuren und zur Konzentrationsabschätzung genutzt wird. Das Prinzip der Auftrennung basiert auf der Wanderung der durch die Phosphatgruppen negativ geladenen Nukleinsäure in einer Gelmatrix im elektrischen Feld. Dabei verhält sich die Wanderungsgeschwindigkeit linearer dsDNA umgekehrt proportional zum Logarithmus des Molekulargewichtes (Helling, Goodman, & Boyer, 1974). Zusätzlich wird die Wanderungsgeschwindigkeit von der Stromstärke und der Konformität beeinflusst. Als

Gelmatrix diente Agarose, ein Polysaccharid, welches aus den Bausteinen D-Galaktose und 3,6-Anhydro-L-Galaktose aufgebaut ist und durch Aufkochen in 0,5 x TAE-Puffer nach anschließendem Erkalten eine Gelstruktur ausbildet. Die Konzentration der Agarose in dem Puffer bestimmt die Porengröße der Gelmatrix, wobei hohe Konzentrationen zu kleineren Poren und niedrige Konzentrationen zu größeren Poren führen. Demnach wurden hochprozentige Gele für niedrig molekulare Nukleinsäuren und niedrigprozentuale Gele für Nukleinsäuren mit einer größeren molekularen Masse verwendet. Gängige Gelkonzentrationen lagen im Bereich von 0,5 % - 2 %. Die Detektion der Nukleinsäuren erfolgte über Ethidiumbromid (EtBr), einen in die DNA interkalierenden Fluoreszenzfarbstoff, der unmittelbar vor dem Gießen zu dem Agarosegel gegeben wurde. Die eingesetzte EtBr-Konzentration betrug 1 µL einer 1 %igen EtBr-Lösung pro 100 ml Agarosegel. Die mit EtBr versetzte und in 0,5 x TAE-Puffer gelöste Agarose wurde in eine Elektrophoresekammer transferiert und nach dem Polymerisieren mit 0,5 x TAE-Puffer vollständig bedeckt. Die Probentaschen wurden mithilfe eines Kammes gebildet, welcher in das flüssige Agarosegel getaucht und nach dem Polymerisieren wieder gezogen wurde. Anschließend wurden die Nukleinsäureproben im Verhältnis 5:1 mit 5 x DNA-Ladepuffer versetzt und in die Geltaschen pipettiert. Die in dem DNA-Ladepuffer enthaltene Polysucrose führt aufgrund einer Dichtezunahme zum Absinken der Nukleinsäure in den Taschen. Die zwei ebenfalls in dem DNA-Ladepuffer enthaltenen Farbstoffe Xylencyanol und Bromphenolblau dienten zum Abschätzen des Laufverhaltens während der Elektrophorese. Xylencyanol läuft in einem 1 %igen Agarosegel auf Höhe eines linearen 300 bp großen dsDNA-Moleküls, Bromphenolblau auf Höhe eines linearen 3000 bp großen dsDNA-Moleküls. Nach dem Anlegen einer Spannung und der Auftrennung der Nukleinsäuren wurde das Gel bei 254 nm in dem Geldokumentationssystem BioDoc Analyze fotografiert. Anhand eines Nukleinsäuremarkers, der im Gel mit aufgetrennt wurde, wurden Molekülgröße und Nukleinsäurekonzentration abgeschätzt.

2.2.8 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

2.2.8.1 Bestimmung mittels Agarose-Gelelektrophorese

Die Konzentrationsbestimmung von DNA erfolgte vorwiegend über die Konzentrationsabschätzung anhand eines DNA-Markers in einer Agarose-Gelelektrophorese. Hierfür wurde die Bandenintensität der Probe mit der Intensität der vom DNA-Marker entsprechenden Bande gleicher Fragmentgröße mit definierter DNA-Konzentration verglichen und die Ausgangskonzentration der Probe, bezogen auf das aufgetragene Volumen, zurückgerechnet.

2.2.8.2 Bestimmung mittels Agilent Bioanalyzer 2100

Der Agilent Bioanalyzer 2100 von Agilent Technologies wurde zur Konzentrations- und Qualitätsbestimmung von RNA verwendet. Das Prinzip der Messung basiert auf der traditionellen Agarose-Gelelektrophorese, welche auf einen Chip transferiert wurde. Die Konzentrationsbestimmung der Proben erfolgt über das Verhältnis der Peakflächen eines Größenmarkers zu den Peakflächen der 16S und 23S rRNA der Proben. Ein interner Standard, bestehend aus einem kurzen DNA-Fragment (< 25 nt), dient zur Bestimmung des Startpunktes der Analyse sowie zur Erkennung von Degradierungen der isolierten RNA.

Zur Vorbereitung der Elektrophorese wurde das Gel mit einem Fluoreszenzfarbstoff gemischt und in die Mikrokanäle des Chips mithilfe einer speziellen Vorrichtung (*priming station*) gedrückt. Nach der Polymerisation wurde der interne Standard in jede Kavität pipettiert und anschließend die denaturierten RNA-Proben sowie der entsprechende RNA-Größenmarker ergänzt. Der Chip wurde in den Bioanalyzer eingesetzt und die Elektrophorese gestartet. Das Ergebnis wurde als Elektropherogramm mit Konzentrationsangaben, 23S-/16S-Verhältnis und *RNA Integrity Number* (RIN) erhalten. Die detaillierte Durchführung ist dem Handbuch des Herstellers zu entnehmen (Agilent Technologies, 07/2013).

2.2.8.3 Bestimmung mittels ND-1000 Spektralphotometer

Mit dem UV-Vis-Spektralphotometer ND-1000 wurden die Konzentration und die Reinheit von RNA sowie von Plasmid-DNA nach Säulenisolierung bestimmt. Die Messung der Proben erfolgt über eine Flüssigkeitsbrücke, die sich zwischen einem unteren und oberen Messsockel ausbildet und ermöglicht dadurch die Vermessung kleinster Probenvolumina ohne den Gebrauch von Küvetten. Für die Messung der Nukleinsäureproben wurden 2 µl auf den unteren Messsockel pipettiert und die Absorption gegen den vorher bestimmten Leerwert gemessen. Die Bestimmung der Konzentration erfolgt über eine Absorptionsmessung bei 260 nm und der anschließenden Berechnung über das Lambert-Beer'sche Gesetz (Formel 2.3). Die Messung der Reinheit wird über Quotienten aus den Absorptionen bei 230 nm, 260 nm und 280 nm angegeben. Bei einem Absorptionsverhältnis $A_{260/280}$ von etwa 1,8 für DNA und 2,0 für RNA wird die Nukleinsäure als „rein“ bezeichnet. Bei Werten unterhalb von 1,8 bzw. 2,0 ist eine Kontamination mit Proteinen zu vermuten. Für das Verhältnis von $A_{260/230}$ liegt der erwartete Wert für Nukleinsäuren bei 2,0 – 2,2. Ein niedriges Verhältnis von $A_{260/230}$ weist auf Verunreinigungen mit organischen Bestandteilen oder chaotropen Salzen hin.

$$E_{\lambda} = \varepsilon_{\lambda} * c * d$$

Formel 2.3: Lambert-Beer'sches Gesetz

E_{λ} = wellenlängenspezifische Extinktion

ε_{λ} = wellenlängenspezifischer
Extinktionskoeffizient [m²/mol]

c = Konzentration [mol/L]

d = Schichtdicke [m]

2.2.9 Reinigung und Konzentrierung von Nukleinsäuren

Die Reinigung von DNA-Fragmenten für die Klonierung umfasste die direkte Reinigung, welche zur Entfernung von Oligonukleotiden und Restriktionsenzymen genutzt wurde, sowie die Gelextraktion, die die präzise Isolierung und Reinigung des gewünschten Fragmentes bei Anwesenheit von Nebenprodukten ermöglichte. Die Durchführung erfolgte mit dem Kit NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up der Firma Macherey-Nagel (Macherey-Nagel, 07/2014).

Für die Reinigung eines DNA-Fragmentes aus einem Agarosegel wurde das Fragment mit einem Skalpell präzise aus dem Gel ausgeschnitten, das Zweifache der extrahierten Gelmasse an Binding Buffer NTI hinzugegeben und im Wasserbad für 5 – 10 min bei 50 °C zum Lösen der Agarose erwärmt. Für die direkte Reinigung wurde zu dem PCR-Produkt das Zweifache des Probenvolumens an Binding Buffer NTI pipettiert. Der Binding Buffer besitzt einen pH-Indikator, der den optimalen pH-Wert für die Bindung der DNA an die Silikamembran von pH 5 – 6 anhand einer gelben Färbung anzeigt. Der Ansatz wurde vollständig auf die Säule gegeben, wobei die hohe Konzentration an chaotropen Salzen im Binding Buffer NTI die Bindung der DNA an die Membran vermittelte. Anschließend erfolgte die Zentrifugation bei 11.000 x g für 30 s. Der Durchfluss wurde verworfen, die DNA mit 700 µl ethanolhaltigem Buffer NT3 gewaschen und der Durchfluss nach Zentrifugation bei 11.000 x g für 30 s erneut verworfen. Zur verbesserten Entfernung des chaotropen Salzes und Erhöhung des Reinheitsgrades der DNA wurden der Wasch- und Zentrifugationsschritt mit 250 µl wiederholt. Anschließend wurde die Membran über die Zentrifugation für 5 min bei 11.000 x g getrocknet. Die Säule wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die DNA mit 1:10 verdünntem Buffer NE in zwei Schritten a 15 µl bei 11.000 x g für 1 min eluiert. Zur Erhöhung der Ausbeute wurde der Elutionspuffer bei Fragmenten über 1000 bp zuvor auf 70 °C erwärmt.

2.2.10 Enzymatische Behandlung von Nukleinsäuren

2.2.10.1 Restriktionsverdau

Restriktionsenzyme bzw. Restriktionsendonukleasen sind bakterielle Enzyme, die den DNA-Doppelstrang anhand spezifischer Erkennungssequenzen schneiden. Sie dienen den Bakterien als Abwehrsystem, indem sie Fremd-DNA erkennen und zerstören. Die eigene DNA liegt aufgrund von Modifikationsenzymen methyliert vor und ist somit vor den zelleigenen Endonukleasen geschützt. Restriktionsenzyme werden anhand ihres Energieverbrauchs und der Spezifität der Schnittstelle in drei Typen eingeteilt: Typ-I benötigt für die Spaltung ATP und besitzt sowohl eine Endonuklease- als auch eine Methylaseaktivität. Die Schnittstelle liegt etwa 1000 bp von der Erkennungssequenz entfernt und ist daher unspezifisch. Der Typ-II bildet mit Abstand den größten Teil der in der Molekularbiologie verwendeten Restriktionsenzyme. Da die Erkennungssequenz

gleichzeitig die Schnittstelle darstellt, ist eine präzise Restriktion von DNA-Fragmenten möglich, was insbesondere für Klonierungen oder RFLP-Analysen entscheidend ist. Die Spaltung der Typ-II-Restriktionsenzyme erfolgt ATP-unabhängig. Typ-III-Restriktionsenzyme besitzen, wie Enzyme vom Typ-I, eine ATP-abhängige Endonuklease- und Methylaseaktivität. Ihre Erkennungs- und Schnittstellen liegen 5 – 20 bp voneinander entfernt.

Die Restriktionsenzyme vom Typ-II fanden Verwendung bei der Konstruktion und Überprüfung von Reporterplasmiden. Bei den hierfür verwendeten Restriktionsenzymen handelte es sich um FastDigest-Enzyme, die im Vergleich zu konventionellen Restriktionsenzymen eine verkürzte Inkubationszeit und eine verringerte Staraktivität aufweisen (Thermo Fisher Scientific). Das verwendete Standardprotokoll für den Verdau mit FastDigest-Enzymen ist in Tabelle 2.16 dargestellt. Die Inkubationszeit für den Verdau von Plasmiden betrug 30 min, für den Verdau von PCR-Produkten 45 min. Eine Besonderheit stellt das FastDigest-Enzym *DpnI* dar, welches abweichend zu anderen Restriktionsenzymen, gezielt methylierte DNA schneidet. Diese Eigenschaft wurde für die Konstruktion des Kontrollplasmides pHPKC3-05 genutzt (Kapitel 2.2.12.1). Für den Verdau der methylierten DNA wurde eine Inkubationszeit von 3 h verwendet. Laut Herstellerangaben liegt für das FastDigest-Enzym *DpnI* bis zu einer Inkubationszeit von 16 h keine Staraktivität vor, sodass keine unspezifische Restriktion trotz langer Inkubation zu erwarten war (Thermo Scientific, 2012).

Tabelle 2.16: Standardprotokoll für den Verdau mit FastDigest-Enzymen

Reaktionsansatz	Plasmid-DNA	PCR-Produkt
<i>Wasser (Nuklease-frei)</i>	15 µl	17 µl
<i>10 x FastDigest Buffer</i>	2 µl	2 µl
<i>DNA</i>	2 µl (bis zu 1 µg) ¹	10 µl (~ 0,2 µg) ¹
<i>FastDigest-Enzym</i>	1 µl	1 µl
<i>Gesamtvolumen</i>	20 µl	30 µl
Programm	Plasmid-DNA	PCR-Produkt
<i>Inkubation</i>	30 min, 37 °C	45 min, 37 °C
<i>Inaktivierung</i>	5 – 15 min, 65 – 80 °C ²	5 – 15 min, 65 – 80 °C ²

¹ Abhängigkeit des zugegebenen Volumens von der DNA-Konzentration; ² abhängig vom jeweiligen Restriktionsenzym

2.2.10.2 Dephosphorylierung

Die Dephosphorylierung bezeichnet die katalytische Abspaltung eines Phosphatrestes am 5'-Ende von Nukleinsäuren und diente zur Vermeidung einer Religation von nur mit einem Restriktionsenzym linearisierten Vektoren. Anwendung fand die Dephosphorylierung bei der Vektorvorbereitung für die Konstruktion der

Reporterplasmide. Hierfür wurde direkt zu dem verdauten Vektor das Enzym Antarctic Phosphatase von NEB sowie der zum Enzym entsprechende 10 x Antarctic Phosphatase Reaction Buffer in den vom Hersteller empfohlenen Konzentrationen hinzugegeben (New England Biolabs). Der Ansatz wurde für 2 h bei 37 °C im Thermocycler inkubiert und anschließend das Enzym für 5 min bei 70 °C inaktiviert.

2.2.10.3 Ligation

Die Ligation stellt die enzymatisch katalysierte Verknüpfung eines 5'-Phosphat-Endes mit einem 3'-OH-Ende von Nukleinsäuren dar und wurde im Rahmen der Plasmidkonstruktionen verwendet. Die zu verknüpfenden Enden können sowohl vom selben DNA-Molekül als auch von unterschiedlichen Molekülen stammen. Bei dem verwendeten Enzym handelte es sich um die T4 DNA-Ligase von Thermo Scientific, eine ATP-abhängige Ligase, die sowohl kohäsive Enden (*sticky ends*) als auch glatte Enden (*blunt ends*) miteinander verknüpfen kann.

Die für die Ligation eingesetzten Produkte wurden mit den entsprechenden Restriktionsenzymen verdaut und über das Kit NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up gereinigt. Vektor und Insert wurden im molaren Verhältnis von 1:3 unter Zugabe des Ligase-Puffers und der T4 DNA-Ligase in den vom Hersteller empfohlenen Konzentrationen (Thermo Fisher Scientific) vermischt und im Thermocycler bei 37 °C für 1 h inkubiert. Das Enzym wurde bei 70 °C für 5 min inaktiviert und der Ansatz direkt für die Transformation eingesetzt.

2.2.11 Transfer von DNA

Die Voraussetzung für die Transformation von Bakterien ist die Fähigkeit zur Aufnahme von Fremd-DNA. Diese Fähigkeit wird als Kompetenz bezeichnet. Man unterscheidet zwischen einer natürlichen Kompetenz, die auf bestimmte Spezies reduziert ist und einer erworbenen Kompetenz, welche über chemisch-physikalische Maßnahmen vermittelt wird. Methoden zum Erwerb der Kompetenz stellen die CaCl₂-Methode sowie die Elektroporation dar.

2.2.11.1 CaCl₂-Methode

Bei der CaCl₂-Methode werden die Zellen mit einer CaCl₂-Lösung behandelt, welche durch den Überschuss an Calcium-Ionen eine erhöhte Permeabilität der Zellmembran und eine Erleichterung der DNA-Aufnahme bewirkt.

Ausgehend von einer ÜNK wurden die Zellen 1:100 mit LB-Medium verdünnt und bis zu einer OD_{600nm} von etwa 0,5 bei 37 °C angezogen. Die Zellen wurden für 10 min auf Eis inkubiert, bei 5300 rpm und 4 °C für 15 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Anschließend wurden sie in einem 1/10 des Ausgangsvolumens eiskaltem Puffer TFB1 resuspendiert und erneut 10 min auf Eis inkubiert. Der Zentrifugationsschritt wurde wiederholt, der Überstand verworfen und die Zellen in einem 1/40 des Ausgangsvolumens eiskaltem Puffer TFB2 resuspendiert. Nach einer weiteren 10 minütigen Inkubation auf Eis wurden die Zellen a 200 µl aliquotiert und für die Transformation direkt verwendet oder bis zur Verwendung bei -80 °C gelagert.

Für die Transformation wurden die kompetenten Zellen mit 100 ng Plasmid-DNA versetzt und für mindestens 45 min auf Eis inkubiert. Zur Erhöhung der Transformationseffizienz wurde die Inkubationszeit für die Transformation mit Plasmiden > 7000 bp bis auf 3 h verlängert. Anschließend wurden die Zellen für 90 s bei 42 °C einem Hitzeschock ausgesetzt, 2 min auf Eis inkubiert und dann vollständig in 1 ml SOC-Medium überführt. Die Zellen wurden bei 37 °C und 130 rpm für 45 min inkubiert, auf Selektionsplatten sowie einer LB-Agarplatte zur Wachstumskontrolle ausplattiert und über Nacht bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Zur Untersuchung der Transformationseffizienz der Zellen wurden diese unter Standardbedingungen mit dem Vektor pBR322 transformiert.

2.2.11.2 Elektroporation

Die Elektroporation stellt neben der $CaCl_2$ -Methode eine weitere Methode für den Transfer von DNA dar. Hierbei werden die Zellen einem elektrischen Impuls ausgesetzt, der zu einer kurzzeitigen Erhöhung der Zellmembranpermeabilität führt und die Zellen zur Aufnahme von Fremd-DNA befähigt. Entscheidend für den Erfolg der Elektroporation und zur Vermeidung eines elektrischen Durchschlages ist eine geringe Salzkonzentration der Zellsuspension.

Für die Herstellung elektrokompeter Zellen wurden diese in LB-Medium bei 37 °C und 130 rpm in einem Schüttelinkubator bis zu einer OD_{600nm} von 0,5 angezogen und für 30 min auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden für 15 min bei 4 °C und 3000 x g zentrifugiert, der Überstand verworfen und in einem 1/10 des Ausgangsvolumens eiskaltem, demineralisiertem Wasser resuspendiert. Der Zentrifugationsschritt wurde wiederholt und die Zellen in einem 1/25 des Ausgangsvolumens eiskaltem, demineralisiertem Wasser resuspendiert. Nach einem dritten Zentrifugationsschritt unter gleichen Bedingungen wurden die Zellen in einem 1/100 des Ausgangsvolumens einer 15 %igen Glycerinlösung resuspendiert und a 50 µl aliquotiert. Die Zellen wurden direkt für die Elektroporation verwendet.

Für die Transformation wurde ein Aliquot der elektrokompeter Zellen mit 50 ng Plasmid versetzt und für 10 min auf Eis inkubiert. Der gesamte Ansatz wurde in die vorgekühlte Elektroporationsküvette pipettiert und der elektrische Impuls mit den Bedingungen 2,5 kV, 25 µF und 200 Ω ausgelöst. Nach Überführung

des Ansatzes in 1 ml SOC-Medium wurden die Zellen für 1 h bei 37 °C und 130 rpm in einem Schüttelinkubator inkubiert und anschließend auf Selektionplatten sowie einer LB-Agarplatte zur Wachstumskontrolle ausplattiert. Die Inkubation der Agarplatten erfolgte über Nacht in einem Brutschrank bei 37 °C.

2.2.12 Ortsspezifische Mutagenese

Der Begriff ortsspezifische Mutagenese beschreibt die gezielte Einführung von Mutationen, welche auf Grundlage von einzelnen Basensubstitutionen, Insertionen oder Deletionen basieren kann. Es gibt verschiedene Methoden, die der ortsspezifischen Mutagenese unterliegen. In dieser Arbeit wurde die ortsspezifische Mutagenese bei der Plasmidkonstruktion von pHPKC3-05 (Kapitel 2.2.12.1) sowie bei der Konstruktion der $\Delta toIC$ -Mutante *E. coli* R7 (Kapitel 2.2.12.2) verwendet.

2.2.12.1 Erzeugung einer PCR-vermittelten Deletion in Plasmid-DNA

Die gezielte Deletion von Sequenzabschnitten in Plasmid-DNA mittels PCR stellt eine Methode dar, bei der, ausgehend von einem zirkulären Template, das Zielplasmid unter Aussparung der zu deletierenden Sequenz als ein PCR-Produkt vollständig amplifiziert und anschließend über die stammeigene Ligase im Zielwirt zu einem Plasmid ligiert wird (Hansson et al., 2008). Der Vorteil dieser Methode gegenüber der herkömmlichen Klonierung besteht darin, dass auf die Vorbereitung des Inserts und des Vektors wie Reinigung und Verdau sowie auf die Ligation *in vitro* verzichtet wird. Die Deletion der Zielsequenz wird durch das Design der Primer erzeugt, welche aus einer Sequenz vor und hinter dem zu deletierenden Bereich bestehen und zueinander komplementäre Bereiche besitzen. Über die homologen Bereiche an den Enden des PCR-Produktes wird in *E. coli in vivo* das PCR-Produkt zu dem gewünschten Plasmid ligiert. Die Entfernung der Template-DNA erfolgt über den Verdau mit *DpnI*, einem Restriktionsenzym, welches methylierte DNA (Template-Plasmid) erkennt und verdaut. Das nicht-methylierte PCR-Produkt bleibt vom Verdau unberührt und wird für die Transformation eingesetzt.

Für die Konstruktion des Kontrollplasmides pHPKC3-05 (Kapitel 3.1.2.1) diente das Plasmid pHPKC3-03 als DNA-Template, bei dem der *srp*-Promotor deletiert wurde. Die Amplifizierung des PCR-Produktes erfolgte mit der Phusion® High Fidelity Polymerase nach dem in Tabelle 2.17 aufgeführten Protokoll.

Tabelle 2.17: Reaktionsansatz und Programm für die Amplifizierung des PCR-Produktes zur Konstruktion von pHPKC3-05

Reaktionsansatz	Volumina	
<i>5 x GC Buffer</i>	5 µl	
<i>dNTPs (2 mM)</i>	2,5 µl	
<i>Forward-Primer</i>	0,75 µl (0,3 µM)	
<i>Reverse-Primer</i>	0,75 µl (0,3 µM)	
<i>DMSO</i>	0,75 µl (3 %)	
<i>Phusion® High Fidelity DNA Polymerase</i>	0,25 µl	
<i>pHPKC3-03 (1:200 verd.)</i>	1 µl	
<i>Wasser</i>	ad 25 µl	
Reaktionsschritt	Programm	
<i>Initiale Denaturierung</i>	98 °C	30 s
<i>Denaturierung</i>	98 °C	10 s
<i>Annealing</i>	64 °C	30 s
<i>Elongation</i>	72 °C	2 min
	} x 5 Zyklen	
<i>Denaturierung</i>	98 °C	10 s
<i>Annealing/ Elongation</i>	72 °C	3 min
	} x 25 Zyklen	
<i>Finale Elongation</i>	72 °C	10 min
<i>Pause</i>	4 °C	

Das PCR-Produkt wurde mithilfe des Kits NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up gereinigt und über den Verdau mit *DpnI* das Ausgangsplasmid pHPKC3-03 aus dem Ansatz entfernt. Anschließend wurde *E. coli* JM109 mit 100 ng des PCR-Produktes nach dem Standardprotokoll für die CaCl₂-Methode transformiert und die Transformanten auf Tetracyclin-Agarplatten selektiert.

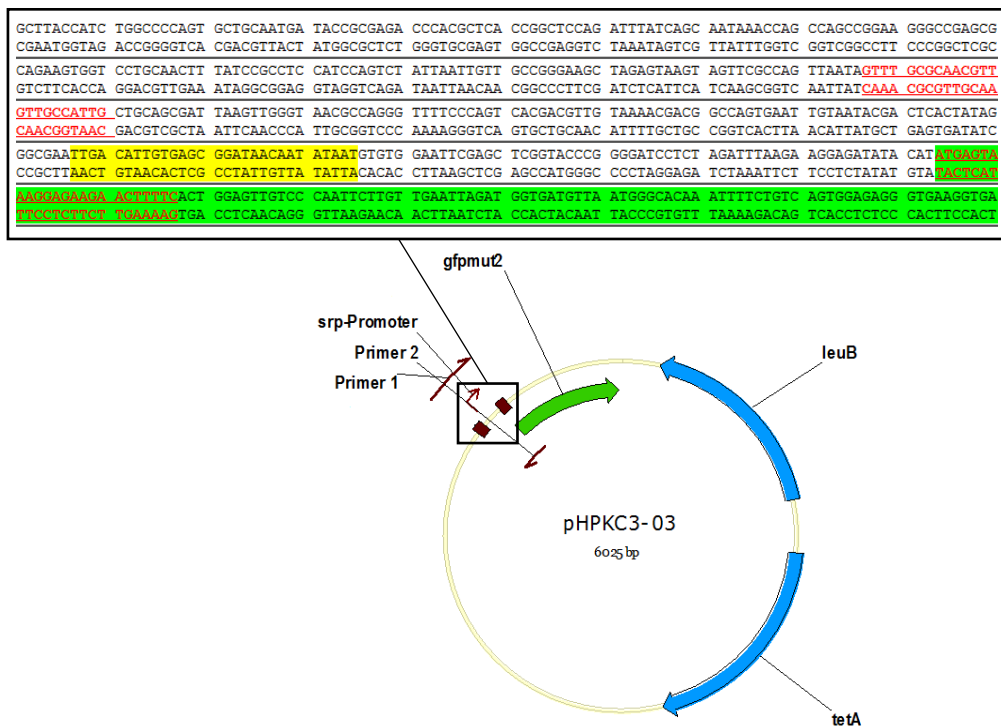


Abbildung 2.3: Erzeugung der PCR-vermittelten Deletion des *srp*-Promotors in pHPK3-03; rote Schrift in der Sequenz/ braune Rechtecke in der Plasmidkarte = vordere und hintere Primersequenz; gelb = *srp*-Promotor; grün = Genanfang von *gfpmut2*; der deletierte Bereich befindet sich zwischen der vorderen und hinteren Sequenz der Primer

2.2.12.2 Gene doctoring

Das Gene doctoring basiert auf einer Zwei-Plasmid-Technologie, die die Einkreuzung eines *in vivo* erzeugten linearen DNA-Fragmentes mittels homologer Rekombination vermittelt und sowohl zur Erzeugung von chromosomalen Deletionen als auch für Epitop-Tagging genutzt wird (Lee et al., 2009). Die Erzeugung einer ortsspezifischen chromosomalen Deletion basiert auf der Konstruktion eines individuellen Donorplasmides, welches die homologen Bereiche für die Rekombination trägt. Als Ausgangsvektor des Donorplasmides dient pDOC-K, ein von pEX100T abgeleiteter Vektor, der das Gen *sacB*, eine Ampicillin- und eine Kanamycin-resistenz trägt. Die Kanamycinresistenz wird von den Erkennungssequenzen der FLP-Rekombinase (FRT-Sequenzen) und der aus *Saccharomyces cerevisiae* stammenden Meganuklease *I-SceI* sowie von *multiple cloning sites* (MCS) flankiert, die für die Insertion homologer Bereiche verwendet werden können. Das Gen *sacB* kodiert für die Levansucrase, ein aus *Bacillus subtilis* stammendes Enzym, welches in *E. coli* in Anwesenheit von Saccharose toxische Levane bildet und nach erfolgter Rekombination und Verdau des Donorplasmides zur Selektion richtiger Rekombinanten herangezogen wird. Die homologe Rekombination wird über das λ -Red-System vermittelt, dessen Gene *gam*, *exo* und *bet* über das zweite Plasmid, das Rekombinationsplasmid pACBSCE, in den Zielwirt eingebracht werden. Das Gam-Protein schützt die lineare DNA vor der zelleigenen Degradierung durch den RecBCD-Komplex, während das Exo-Protein, katalysiert vom Bet-

Protein, die für die Rekombination benötigten Einzelstrangüberhänge generiert. Neben den Genen des λ -Red-Systems befinden sich auf dem Rekombinationsplasmid eine zur Selektion verwendete Chloramphenicolresistenz sowie das Strukturgen und eine Schnittstelle der Meganuklease. Zur gezielten Expression der Meganuklease und der λ -Red-Gene stehen diese unter Kontrolle des *araBAD*-Promotors. Nach Transformation des Zielwirtes mit Donor- und Rekombinationsplasmid wird über Arabinose die Expression der Meganuklease und der λ -Red-Gene induziert. Durch die Expression der Meganuklease wird das Donorplasmid zweimal geschnitten und das lineare DNA-Fragment, bestehend aus der Kanamycinresistenz, den FRT-Sequenzen und den homologen Bereichen, erzeugt. Die *I-SceI*-Schnittstelle im Rekombinationsplasmid führt zur Zerstörung des Rekombinationsplasmides und verhindert somit eine durch zu lange Exposition hervorgerufene unspezifische Rekombination. Durch die homologe Rekombination wird die Kanamycinresistenz, flankiert von den FRT-Sequenzen, in das Chromosom eingekreuzt und das Zielgen deletiert. Die Entfernung der Kanamycinresistenz erfolgt über das FLP/FRT-System.

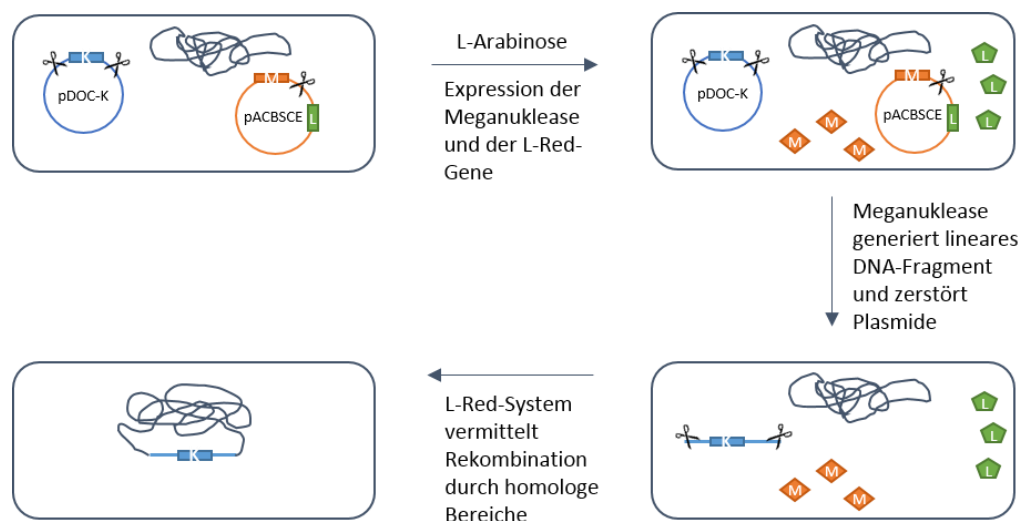


Abbildung 2.4: Prinzip des Gene Doctorings

K = Kanamycinresistenz, M = Meganuklease, L = λ -Red-Gene, Schere = Erkennungssequenz der Meganuklease

2.2.12.2.1 Homologe Rekombination

Für die Konstruktion der $\Delta tolC$ -Mutante *E. coli* R7 wurde der Ausgangsstamm *E. coli* C600 mit dem Rekombinationsplasmid pACBSCE über die $CaCl_2$ -Methode und anschließend mittels Elektroporation mit dem Donorplasmid pHPK12-02b (Kapitel 3.1.1.3.2) transformiert. Die Selektion von Transformanten mit beiden Plasmiden erfolgte über Agarplatten mit den Zusätzen Ampicillin, Chloramphenicol und Kanamycin. Von den erhaltenen Transformanten wurden drei hinsichtlich ihrer Saccharoseempfindlichkeit über eine KBE-

Bestimmung auf Kanamycin-Agarplatten mit 5 % Saccharose untersucht und hiervon ein sensibler Transformant für das weitere Vorgehen verwendet. Eine Kolonie des selektierten Transformanten wurde für 2 h bei 37 °C und 130 rpm in 1 ml LB-Medium unter Zusatz von 0,5 % Glukose inkubiert. Die Glukose diente zur Repression des *araBAD*-Promotors und Vermeidung einer frühzeitigen Expression der λ -Red-Gene und der Meganuklease. Anschließend wurde die Glukose über die dreimalige Zentrifugation für 10 min bei 5000 x g und 4 °C mit anschließender Resuspension in LB-Medium entfernt. Nach Zusatz von L-Arabinose in einer Endkonzentration von 0,5 % wurde die Bakteriensuspension für 4 h bei 37 °C und 180 rpm inkubiert. Verdünnungen der Bakteriensuspension wurden auf Kanamycin-Agarplatten unter Zusatz von 5 % Saccharose ausplattiert und für 24 h bei 30 °C im Brutschrank inkubiert.

2.2.12.2.2 Agardilutionsverfahren zur Selektion von Rekombinanten

Aufgrund der erhöhten Empfindlichkeit von *tolC*-Mutanten gegenüber vom Efflux beeinflusster Antibiotika, wie zum Beispiel Novobiocin, wurde das Agardilutionsverfahren zur Selektion *tolC*-negativer Rekombinanten bei der Konstruktion der $\Delta tolC$ -Mutante von *E. coli* C600 verwendet. Die Methode diente lediglich zur Selektion und nicht zur Bestimmung einer definierten MHK, sodass die Durchführung abweichend von den CLSI-Standards erfolgte (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2012, 2014).

Die zu untersuchenden Rekombinanten wurden von einer Agarplatte mit einem sterilen Glasstab gepickt und in mit 100 μ l LB-Medium gefüllte Kavitäten einer Mikrotiterplatte (A – H: 1 – 6) eingerührt. Zur Selektion wurde Kanamycin in einer Konzentration von 50 μ g/ml zum LB-Medium ergänzt. Die Mikrotiterplatte wurde über Nacht bei 37 °C im Brutschrank inkubiert und anschließend die zweite Hälfte der Mikrotiterplatte (A – H: 7 – 12) mit 100 μ l physiologischer Kochsalzlösung befüllt. Mit einem sterilen Replikator wurde ein Tropfen der Bakteriensuspension in die physiologische Kochsalzlösung übertragen. Der Replikator wurde abgeflammt, in die Kavitäten mit der verdünnten Bakteriensuspension getaucht und diese auf Selektionsplatten gestempelt. Verwendet wurden LB-Agarplatten ohne antibakteriellen Zusatz als Wachstumskontrolle, LB-Agarplatten mit dem Zusatz von Ampicillin bzw. Chloramphenicol zur Kontrolle des Verlustes von Donor- und Rekombinationsplasmid, LB-Agarplatten mit Kanamycin und 5 % Saccharose zur Selektion von Rekombinanten, die das Donorplasmid verloren und gleichzeitig die Kanamycinresistenz eingekreuzt haben, sowie LB-Agarplatten mit unterschiedlichen Konzentrationen an Novobiocin zur Selektion *tolC*-negativer Rekombinanten. Die Konzentrationen der Novobiocin-Agarplatten wurden so gewählt, dass bei intaktem TolC ein Wachstum bei allen Antibiotikakonzentrationen [64 μ g/ml, 32 μ g/ml, 16 μ g/ml] vorlag, während bei Funktionsverlust von TolC für das Wachstum unter den niedrigeren Konzentrationen die MHK bereits überschritten wurde. Die Agarplatten wurden im Brutschrank bei 37 °C über Nacht inkubiert und das Wachstum am nächsten Tag ausgewertet.

2.2.12.2.3 Entfernung der Resistenzkassette mittels FLP/FRT-System

Das FLP/FRT-System stellt neben dem Cre/loxP-System aus dem Bakteriophagen P1 eines der am häufigsten verwendeten Systeme zur Anwendung der seitenspezifischen Rekombination (*site-specific recombination*; SSR) dar. Das System umfasst die FLP-Rekombinase und die FRT-Sequenzen (*FLP recombinase target*), bei denen es sich um 34 bp lange Erkennungssequenzen handelt, die mit Ausnahme eines Nukleotids aus zwei palindromischen Sequenzen von jeweils 13 bp und einer zentralen asymmetrischen Sequenz von 8 bp bestehen. Die asymmetrische Sequenz bestimmt die Orientierung der FRT-Sequenz sowie das Ergebnis nach erfolgter Rekombination. Liegen die FRT-Sequenzen in gleicher Orientierung vor, wird der dazwischen liegende Bereich deletiert. Die entgegengesetzte Orientierung der FRT-Sequenzen führt dagegen zu einer Inversion der Sequenz (Lacroix et al., 2011).

Das FLP/FRT-System wurde zur Entfernung der Kanamycinresistenz in *E. coli* R26 verwendet, woraus der Sensorstamm *E. coli* R7 resultierte. Hierfür wurde *E. coli* R26 mit dem „Helferplasmid“ pCP20 (Amp^R, Clm^R, *flp*) transformiert, das neben dem Gen der FLP-Rekombinase (*flp*) über eine temperatursensitive Replikation verfügt (Cherepanov & Wackernagel, 1995). Über die Temperatur wird somit die Expression der FLP-Rekombinase sowie die Eliminierung des Plasmides aus der Zelle reguliert. Die Transformation von *E. coli* R26 mit pCP20 erfolgte aufgrund der temperatursensitiven Replikation abweichend vom Standardprotokoll der CaCl₂-Methode. Die kompetenten Zellen wurden mit 50 ng Plasmid versetzt und für 2,5 h auf Eis inkubiert. Nach dem Hitzeschritt für 90 s bei 42 °C wurden die Zellen für 2 min auf Eis inkubiert und anschließend vollständig in 1 ml SOC-Medium überführt. Die Inkubation der Bakteriensuspension erfolgte für 1,5 h bei 30 °C und 130 rpm. Der Ansatz wurde auf Ampicillin-Agarplatten ausplattiert und für 43 h bei 30 °C im Brutschrank inkubiert. Zur Entfernung von pCP20 wurden vier der Ampicillin-resistenten Transformanten vereinzelt und auf LB-Agarplatten bei 42 °C über Nacht inkubiert. Mittels Replikaplattierung auf Ampicillin- und Kanamycin-Agarplatten wurden der Verlust von pCP20 und der Kanamycinresistenz überprüft. Die weitere Überprüfung der Deletion erfolgte über PCR und Sequenzierung (Kapitel 3.1.1.3.3 und 3.1.1.3.4.).

2.2.13 Sequenzierung

Für die Sequenzierung von DNA-Fragmenten wurde das GeXP-System sowie das GenomeLab DTCS Quick Start Kit von Beckmann Coulter verwendet. Das Prinzip der Sequenzierung mittels des GeXP-Systems basiert auf der Methode nach Sanger, welche durch die Verwendung fluoreszenzmarkierter Nukleotide, das Cycle Sequencing und der Auftrennung mittels Kapillarelektrophorese weiterentwickelt wurde (Beckman Coulter).

2.2.13.1 Cycle Sequencing

Das Cycle Sequencing stellt eine Variante der Sequenzierung dar, bei der die für die Sequenzierung benötigten PCR-Produkte unterschiedlicher Fragmentgröße linear amplifiziert und anschließend über eine Kapillarelektrophorese aufgetrennt werden. Der Begriff lineare Amplifizierung ist auf die Verwendung von nur einem Primer, dem Sequenzierprimer, zurückzuführen, wodurch die Synthese nur an einem Strang stattfindet. Bei den zugesetzten Nukleotiden handelt es sich sowohl um dNTPs als auch um fluoreszenzmarkierte ddNTPs, welche bei Einbau durch das fehlende 3'-OH-Ende den Abbruch in der DNA-Synthese bewirken. Die dadurch erhaltenen unterschiedlich langen und fluoreszenzmarkierten DNA-Fragmente werden ihrer Größe nach aufgetrennt und das in Abhängigkeit des eingebauten ddNTPs spezifische Fluoreszenzsignal detektiert. Über eine Software wird aus den einzelnen Fragmenten die gesuchte DNA-Sequenz ermittelt.

Die Sequenzierung wurde zur Überprüfung von Plasmidkonstruktionen, der *tolC*-Deletion in *E. coli* R7 sowie zur Untersuchung von chromosomalen Mutationen in *ampR* und dem intergenetischen Bereich von *ampR* und *ampC* in *Citrobacter freundii* GK100 verwendet. Als DNA-Template für die Sequenzierung dienten PCR-Produkte oder über Säulen isolierte Plasmide. Zur Entfernung von Primern und nicht eingebauten Nukleotiden wurden die PCR-Produkte vor dem Cycle Sequencing enzymatisch behandelt. Hierzu wurden 5 µl PCR-Produkt mit 0,5 µl Exonuklease I und 1 µl FastAP™ versetzt und für 15 min bei 37 °C inkubiert. Die Inaktivierung der Enzyme erfolgte bei 85 °C für 15 min. Das Standardprotokoll für das Cycle Sequencing ist in Tabelle 2.18 dargestellt.

Tabelle 2.18: Standardprotokoll für die Generierung der DNA-Fragmente

Reaktionsansatz	PCR-Produkt	Plasmid-DNA
<i>DNA</i>	5 – 100 ng ²	100 – 500 ng ²
<i>Sequenzierprimer</i>	10 pmol	10 – 30 pmol
<i>Puffer</i>	1 – 3 µl ²	1 – 3 µl ²
<i>Quick Start Mastermix</i> ¹	1 – 3 µl ²	1 – 3 µl ²
<i>DMSO</i>	-	1 µl
<i>Wasser</i>	ad 20 µl	ad 20 µl
Programm		
<i>Vorinkubation</i>	-	96 °C, 5 min (ohne Quick Start)
<i>Inkubation</i>	96 °C, 20 s 45 – 60 °C, 20 s 60 °C, 4 min	96 °C, 20 s - 60 °C, 4 min
	} x 30 Zyklen	} x 30 Zyklen
<i>Pause</i>	4 °C	4 °C

¹ enthält: dNTPs, ddNTPs, DNA-Polymerase, MgCl₂ Reaction Buffer, Tris-HCl, Pyrophosphatase

² abhängig von der Fragmentgröße

2.2.13.2 Ethanol-Fällung

Nach dem Cycle Sequencing wurden die DNA-Fragmente mit Ethanol gefällt. Hierzu wurden 5 µl Fällungsreagenz und die 20 µl Sequenzieransatz aus dem Cycle Sequencing mit 60 µl Ethanol abs. vermengt und 12 min bei 14.000 rpm und RT zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und das Pellet zweimal mit jeweils 200 µl Ethanol 70 % gewaschen. Die Zentrifugation der Waschschrte erfolgte für 30 s bei 14.000 rpm. Der Überstand wurde vollständig abgenommen und das Pellet im Dunkeln bei RT für etwa 20 min getrocknet. Das getrocknete Pellet wurde zur Stabilisierung der Einzelstränge für die Sequenzierung in 30 µl Formamid enthaltender SLS (*sample loading solution*) aus dem DTCS Quick Start Kit gelöst und der Ansatz in einer Mikrotiterplatte in das Sequenziergerät gegeben.

2.2.14 Quantitative Real-time PCR

Die Quantitative Real-time PCR ist eine sensitive Methode basierend auf dem Prinzip der herkömmlichen PCR, welche durch Messung von Fluoreszenzsignalen eine Quantifizierung der Ausgangsmenge über eine Echtzeitmessung erlaubt. Die Erzeugung der Fluoreszenzsignale kann durch unterschiedliche Methoden erfolgen, wie zum Beispiel durch interkalierende Substanzen (SYBR® Green I) oder durch fluoreszenzmarkierte sequenzspezifische Sonden (TaqMan®-Sonden, FRET-Sonden, Molecular Beacons). Klassische Anwendungsgebiete der qRT-PCR sind Untersuchungen zur Genexpression sowie die SNP-Genotypisierung (Qiagen, 07/2010).

Die Methode der qRT-PCR wurde als Näherung zur Bestimmung der Promotorwahl für die Reporterplasmide genutzt. Verwendet wurden das ViiA™ 7 Real-time PCR System sowie die entsprechende ViiA™ 7 Software von Applied Biosystems.

2.2.14.1 Anzucht und Zellernte

Für die Anzucht zur Zellernte wurde, ausgehend von einer frischen Agarplatte, eine ÜNK des Sensorstammes in LB-Medium angesetzt und diese in einer Tageskultur 1:100 mit frischem Medium verdünnt. Für Tagesanzuchten, die in M9-Medium mit Glukose als Kohlenstoffquelle erfolgten, wurde der ÜNK zum Erhalt des Komplementationsplasmides Tetracyclin in einer Konzentration von 10 µg/ml hinzugefügt. Das Entfernen des Antibiotikums erfolgte über die Zentrifugation für 10 min bei 3000 x g und anschließender Resuspension in M9-Medium. Die Tageskulturen wurden bei 37 °C und 130 rpm (LB-Medium) bzw. 180 rpm (M9-Medium) bis zur gewünschten optischen Dichte angezogen und Proben a 1 ml entnommen. Anschließend wurde die Bakteriensuspension bei 3000 x g für 5 min abzentrifugiert, das Medium vollständig entnommen und das Pellet bis zur Isolierung bei -20 °C gelagert. Für die Untersuchung der Genexpression unter Einfluss

von Antibiotika wurde zu der Tageskultur in der frühen exponentiellen Phase ($OD_{600nm} = 0,2$) das entsprechende Antibiotikum in Konzentrationen von 1,5 – 4 x MHK hinzugegeben und die Zellernte zu den gewünschten Zeitpunkten (1 h, 2 h, 3 h nach Antibiotikaexposition) durchgeführt.

2.2.14.2 RNA-Isolierung

Die RNA-Isolierung erfolgte über das Kit NucleoSpin® RNA II von Macherey-Nagel nach den Angaben des Herstellers (Macherey-Nagel, 06/2015). Zum Schutz vor abbauenden RNasen wurden während der RNA-Isolierung besondere Vorkehrungen getroffen. Hierzu zählten das Tragen von Handschuhen, die Verwendung von RNase-freien Reaktionsgefäßen, RNase-freiem Wasser und gestopften Pipettenspitzen sowie die Reinigung von Arbeitsmaterialien mit RNase Away.

Die eingefrorenen Zellpellets wurden in 100 µl mit 1 mg/ml Lysozym versetztem TE-Puffer resuspendiert und für 10 min bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Nach dem Aufbrechen der Zellwand durch das Lysozym erfolgte die Zelllyse durch Zugabe von 350 µl Puffer RA1 und 3,5 µl β-Mercaptoethanol. Das im Puffer RA1 enthaltene chaotrope Guanidinthiocyanat sowie das hinzugefügte Mercaptoethanol führen zu einer Denaturierung der RNasen und schützen die RNA vor Degradierung. Zur Reduzierung der Viskosität und Trübung wurde die Lösung durch den violetten NucleoSpin® Filter für 1 min bei 11.000 x g filtriert. Der Durchfluss wurde mit 350 µl Ethanol 70 % versetzt, auf die blaue NucleoSpin® RNA-Säule gegeben und bei 11.000 x g für 1 min zentrifugiert. Aufgrund der Bindung aller Nukleinsäuren an die Silikamembran erfolgte anschließend der enzymatische Abbau der DNA. Zur Vorbereitung eines effektiven DNA-Verdaus wurden 350 µl eines Membran entsalzenden Puffers auf die Säule gegeben und diese für 30 s bei 11.000 x g zentrifugiert. Anschließend wurden 10 µl rDNase mit 90 µl des dazugehörigen Reaktionspuffers vermengt und hiervon 95 µl mittig auf die Silikamembran pipettiert. Nach einer Inkubationszeit von 15 min bei RT erfolgte die Inaktivierung der rDNase durch Zugabe von 200 µl Buffer RAW2 mit anschließender Zentrifugation für 30 s bei 11.000 x g. Zur Entfernung von Pufferrückständen wurde die Silikamembran mit 600 µl Buffer RA3 gewaschen und für 30 s bei 11.000 x g zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen, der Waschschrift mit 250 µl Buffer RA3 wiederholt und die Silikamembran zum Trocknen für 2 min bei 11.000 x g zentrifugiert. Die Säule wurde in ein neues Nuklease-freies Reaktionsgefäß transferiert und die RNA mit 60 µl RNase-freiem Wasser für 1 min bei 11.000 x g eluiert. Die Reinheit und Konzentration der RNA wurden über den Bioanalyser ermittelt. Zur Reduzierung von Einfrier- und Auftauzyklen wurde die isolierte RNA a 10 µl aliquotiert und bei -80 °C bis zur Verwendung gelagert.

2.2.14.3 Reverse Transkription

Der Begriff reverse Transkription beschreibt die Umschreibung von RNA in DNA, welche enzymatisch durch eine reverse Transkriptase katalysiert wird. Reverse Transkriptasen sind RNA-abhängige DNA-Polymerasen, die neben der Polymeraseaktivität zusätzlich durch die RNase H über eine Nukleaseaktivität verfügen. Nach der Bindung eines Primers an die mRNA beginnt die reverse Transkriptase am freien 3'-OH-Ende mit der cDNA-Synthese, einem zur mRNA komplementären Strang (*complementary DNA*). Das Ergebnis der Synthese bildet ein mRNA-cDNA-Hybridstrang. Der mRNA-Anteil wird anschließend von der RNase H durch hydrolytische Spaltung der Phosphodiesterbrücken abgebaut und einzelsträngige cDNA erhalten.

Für die Umschreibung der RNA in cDNA im Rahmen der qRT-PCR wurden die Maxima® Reverse Transcriptase sowie der RiboLock® RNase Inhibitor von Thermo Scientific verwendet. Der RNase Inhibitor führt über eine nicht-kompetitive Hemmung zur Inhibierung von RNasen und schützt die mRNA vor frühzeitiger Degradierung. Die durch die reverse Transkriptase vermittelte RNase H-Aktivität bleibt dabei von der Hemmung durch RiboLock® unberührt. Die Durchführung der cDNA-Synthese erfolgte nach den Angaben des Herstellers (Thermo Scientific, 2012). Hierfür wurden RNA, Primer, dNTPs und Wasser in den in Tabelle 2.19 aufgeführten Konzentrationen vermengt und zur Reduzierung von Sekundärstrukturen für 5 min bei 65 °C im Thermocycler inkubiert.

Tabelle 2.19: Reaktionsansatz der cDNA-Synthese

Reaktionsansatz	Menge/ Volumen
<i>RNA</i>	150 ng
<i>Primer</i>	2 µl (= 20 pmol)
<i>dNTP-Mix (10 mM)</i>	1 µl
<i>Wasser</i>	ad 14,5 µl

Die Proben wurden kurz auf Eis gestellt und anschließend jeweils 4 µl 5 x RT Buffer und 0,5 µl RiboLock® RNase Inhibitor als Mastermix hinzugefügt. Als Letztes wurde 1 µl der reversen Transkriptase ergänzt und der Ansatz für 30 min bei 50 °C inkubiert. Die Termination der Reaktion erfolgte durch Inkubation für 5 min bei 85 °C. Die cDNA wurde bis zur Verwendung bei -80 °C gelagert. Für jede isolierte RNA wurde eine NRT (*no reverse transcriptase control*) angesetzt, bei der anstelle der reversen Transkriptase 1 µl RNase-freies Wasser hinzugegeben wurde. Die NRT dient in der qRT-PCR zum Nachweis von DNA-Kontaminationen, die bei der RNA-Isolierung nicht vollständig entfernt wurden.

2.2.14.4 qRT-PCR

Für die qRT-PCR wurde der Maxima® SYBR Green qPCR Mastermix von Thermo Scientific verwendet, der den interkalierenden Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green I, die Maxima® Hot Start *Taq* Polymerase sowie die dNTPs in einem für die PCR optimierten Puffer enthält. Bei der Hot Start *Taq* Polymerase handelt es sich um eine chemisch modifizierte *Taq*-Polymerase, die aufgrund von hitzelabilen Schutzgruppen an Aminosäureresten erst bei höheren Temperaturen eine Enzymaktivität besitzt und darüber ein Arbeiten bei RT ermöglicht. Als interne passive Referenz zur Normierung des SYBR Green I und zum Ausgleich von Pipettierungenauigkeiten diente der Fluoreszenzfarbstoff ROX. ROX und SYBR Green I besitzen unterschiedliche Emissionsmaxima, sodass eine Überschneidung der Fluoreszenzsignale vermieden wird.

Die qRT-PCR erfolgte nach den vom Hersteller empfohlenen Angaben (Thermo Scientific, 2011). Zur Reduzierung von Pipettierungenauigkeiten und Pipettierschritten wurde ein SYBR-Green-ROX-Mastermix, bestehend aus dem SYBR Green Mastermix, verdünntem ROX und RNase-freiem Wasser, angesetzt. Der Mastermix wurde entsprechend der Anzahl der zu untersuchenden Gene und unter Berücksichtigung der Probenanzahl pro Gen auf einzelne Reaktionsgefäße aufgeteilt.

Tabelle 2.20: Reaktionsansatz des SYBR-Green-ROX-Mastermixes

Reaktionsansatz	Volumen pro Probe
<i>SYBR Green Mastermix</i>	12,5 µl
<i>ROX (mit RNase-freiem Wasser 1:10 verd.)</i>	0,05 µl
<i>RNase-freies Wasser</i>	8,45 µl

Zu jedem Mastermixansatz wurden die für die Gene entsprechenden Primerpaare hinzugefügt, sodass spezifisch für jedes Gen unabhängig von der cDNA ein neuer Mastermix vorlag.

Tabelle 2.21: Reaktionsansatz des SYBR-Green-ROX-Mastermixes zuzüglich der Primer

Reaktionsansatz	Volumen pro Probe
<i>SYBR-Green-ROX-Mastermix</i>	21,0 µl
<i>Forward-Primer</i>	0,75 µl (= 0,3 µM)
<i>Reverse-Primer</i>	0,75 µl (= 0,3 µM)
<i>Gesamtvolumen</i>	22,5 µl

In für die qRT-PCR geeignete Mikrotiterplatten wurden in jede Kavität 22,5 µl des Primer enthaltenen SYBR-Green-ROX-Mastermixes sowie 2,5 µl der zuvor mit RNase-freiem Wasser 1:10 verdünnten cDNA bzw. NRT

pipettiert. Zur Kontrolle der qRT-PCR wurden von jedem Gen eine NTC (*no template control*), bei der anstelle von cDNA 2,5 µl RNase-freies Wasser verwendet wurde, sowie für jede isolierte RNA eine NRT mit dem Referenzgen angesetzt. Die NTC diente zur Detektion von Kontaminationen und Primerdimeren. Die Bestimmung der Proben erfolgte als Triplikat. Die befüllte Mikrotiterplatte wurde abzentrifugiert, mit Folie verschlossen und in das qRT-PCR-Gerät eingesetzt. Aufgrund spezifischer Vorraussetzungen für das Design der qRT-Primer konnte für alle qRT-Versuche ein Standardprogramm verwendet werden (Thermo Scientific, 2011).

Tabelle 2.22: Standardprogramm für die qRT-PCR

Programm

Initiale Denaturierung	95 °C, 10 min	} x 40 Zyklen
Denaturierung	95 °C, 15 s	
Annealing/ Elongation	60 °C, 1 min	
Schmelzkurve		

Nach Beendigung des PCR-Programmes erfolgte zur Kontrolle auf unspezifische Amplifikate, wie zum Beispiel der Bildung von Primerdimeren, die Aufnahme einer Schmelzkurve. Hierbei wurde die Probe unter Messung der Fluoreszenzintensität kontinuierlich erhitzt. Bei Erreichen der für das Produkt charakteristischen Schmelztemperatur denaturiert der Doppelstrang, das SYBR Green I wird frei und eine Abnahme der Fluoreszenzintensität wird detektiert. Das Ergebnis der Schmelzkurve stellt für das spezifische PCR-Produkt einen Peak bei der charakteristischen Schmelztemperatur dar. Das Vorhandensein weiterer Peaks zeigt die Bildung unspezifischer Amplifikate.

2.2.14.5 Auswertung der qRT-PCR

Für die Auswertung der qRT-PCR existieren unterschiedliche Quantifizierungsmethoden, wobei generell zwischen der absoluten und der relativen Quantifizierung differenziert wird. Bei der absoluten Quantifizierung wird mittels eines externen Standards mit bekannter Konzentration eine Kalibrierkurve erstellt, anhand derer die genaue Konzentration oder Kopienzahl des Zielgenes ermittelt wird. Bei der relativen Quantifizierungsmethode stellt das Ergebnis keine absolut quantifizierbare Menge sondern die relative Genexpressionsänderung dar, welche mit einem bei allen Bedingungen konstant exprimierten Gen (Referenzgen) ins Verhältnis gesetzt wird. Als Referenzgen für Untersuchungen mit *E. coli* R7 wurde das Gen *proC* gewählt, welches in einem Vorversuch auf eine konstante Expression über die Zeit und unter Zugabe von Antibiotika untersucht wurde. Für Untersuchungen mit *E. coli* MG1655 diente das für diesen Stamm bereits etablierte

cysG als Referenzgen. Die relative Quantifizierung erfolgt über die Ermittlung von Ct-Werten, den sogenannten *threshold cycles*, die den Zyklus angeben, bei dem sich der Amplifikationsplot (ΔR_n vs. Cycle) mit dem Threshold kreuzt. Der Threshold stellt einen Wert dar, der sich innerhalb der exponentiellen Phase entsprechend einem Intervall zwischen Hintergrundsignal (Baseline) und dem Plateau der Amplifikationskurve befindet und für jedes Gen individuell von der ViiA™ 7 Software angepasst wird.

Die Auswertung der Ergebnisse der qRT-PCR erfolgte über die relative Quantifizierungsmethode nach Pfaffl (Pfaffl, 2001). Die Methode nach Pfaffl stellt eine effizienz-korrigierte Methode dar, welche von der $\Delta\Delta Ct$ -Methode abgeleitet wurde. Die $\Delta\Delta Ct$ -Methode basiert auf der Bildung der Differenzen der Ct-Werte von Ziel- und Referenzgen im uninduzierten sowie im induzierten Zustand (ΔCt -Werte). Hieraus wird der $\Delta\Delta Ct$ -Wert gebildet, der durch die Subtraktion des ΔCt -Wertes der uninduzierten Probe vom ΔCt -Wert der induzierten Probe berechnet wird (Livak & Schmittgen, 2001). Aufgrund der Verdopplung der PCR-Produktmenge pro Zyklus bei optimalen PCR-Bedingungen wird der negative $\Delta\Delta Ct$ -Wert als Potenz zur Basis zwei gesetzt (Formel 2.4).

$$Ratio = 2^{-((Ct_{Zielgen} - Ct_{Referenzgen})_{induziert} - (Ct_{Zielgen} - Ct_{Referenzgen})_{uninduziert})}$$

$$Ratio = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

Formel 2.4: Bestimmung der relativen Expressionsänderung nach der $\Delta\Delta Ct$ -Methode

Die Voraussetzung für die Verwendung der $\Delta\Delta Ct$ -Methode ist die Vergleichbarkeit der PCR-Effizienzen von Ziel- und Referenzgen. PCR-Effizienzen können u.a. durch die Anwesenheit von PCR-Inhibitoren, beispielsweise aus der RNA-Isolierung wie Ethanol oder durch ein nicht optimales Primerdesign beeinflusst werden. Da die Vergleichbarkeit der PCR-Effizienz nicht immer gegeben ist, wurde das effizienz-korrigierte Modell nach Pfaffl entwickelt. Hierbei fließt die für jedes Gen spezifische PCR-Effizienz in die Formel der $\Delta\Delta Ct$ -Methode mit ein (Formel 2.5).

$$Ratio = \frac{E_{Zielgen}^{\Delta Ct_{Zielgen} (uninduziert-induziert)}}{E_{Referenzgen}^{\Delta Ct_{Referenzgen} (uninduziert-induziert)}}$$

Formel 2.5: Bestimmung der relativen Expressionsänderung nach Pfaffl

Die Bestimmung der PCR-Effizienzen erfolgte über Standardkurven oder über die Berechnung mathematischer Algorithmen der Auswertungsprogramme LinReg PCR und PCR Miner (Ruijter et al., 2009; Zhao & Fernald, 2005). Das Programm LinReg PCR basiert auf dem von Ruijter et al. entwickelten Prinzip zur Analyse von Fluoreszenzdaten ausgehend von einzelnen Amplifikationskurven der PCR mit einem interkalierenden Farbstoff, wie zum Beispiel dem SYBR Green I (Ruijter et al., 2009). Das Programm nutzt hierfür die nicht basiskorrigierten auf die passive Kontrolle normierten Fluoreszenzdaten (R_n) und führt für jede einzelne Probe eine Basislinienkorrektur durch. Anschließend wird der Linearitätsbereich der jeweiligen Kurve ermittelt und mittels linearer Regression die Steigung bestimmt. Hiervon ausgehend werden die PCR-Effizienz und der Ct-Wert pro Probe berechnet. Verwendet wurde die Version LinReg PCR 2014.5 (September 2014). Das Programm PCR Miner von Zhao und Fernald bestimmt analog zu Ruijter et al. die PCR-Effizienz und den Ct-Wert anhand der R_n -Daten der einzelnen Amplifikationskurven (Zhao & Fernald, 2005). Der Unterschied zum Programm LinReg PCR liegt in der Art der Ermittlung des Linearitätsbereiches sowie dem Algorithmus zur Bestimmung der PCR-Effizienz. Anstelle einer linearen Regression verwenden Zhao und Fernald das Prinzip der iterativen nicht-linearen Regression, welche neben dem Ausgleich der Hintergrundfluoreszenz eine präzisere Bestimmung des Startpunktes der exponentiellen Phase ermöglicht. Hierfür werden anstelle eines großen Linearitätsbereiches mehrere kürzere Bereiche von mindestens vier Zyklen innerhalb der exponentiellen Phase definiert und für jeden Bereich mittels nicht-linearer Regression die Effizienz und der dazugehörige P-Wert der Regression bestimmt. Anhand der P-Werte erfolgt die Berechnung eines gewichteten Mittelwertes, der die finale PCR-Effizienz darstellt. Verwendet wurde die Version PCR Miner 4.1 (2013).

Die Bestimmung der PCR-Effizienzen über Standardkurven erfolgte durch eine serielle 1:10-Verdünnung der cDNA bestimmt in einer Vier-Punkt-Messung. Die Ct-Werte wurden gegen den Logarithmus der Konzentration aufgetragen und die Steigung der Geraden über die lineare Regression ermittelt. Die PCR-Effizienz wurde anschließend über die Steigung mit der Formel 2.6 berechnet.

$$Effizienz = 10^{\left(\frac{-1}{Steigung}\right)} - 1$$

Formel 2.6: Berechnung der PCR-Effizienz über die Standardkurve

Zur Bestimmung der Vergleichbarkeit der PCR-Effizienzen wurden die Differenzen der Ct-Werte jeder Verdünnung von Referenz- und Untersuchungsgen gebildet und diese ebenfalls gegen den Logarithmus der Konzentration aufgetragen (ΔCt). Bei einer Steigung $< 0,1$ gelten die PCR-Effizienzen als vergleichbar (Qiagen, 07/2010).

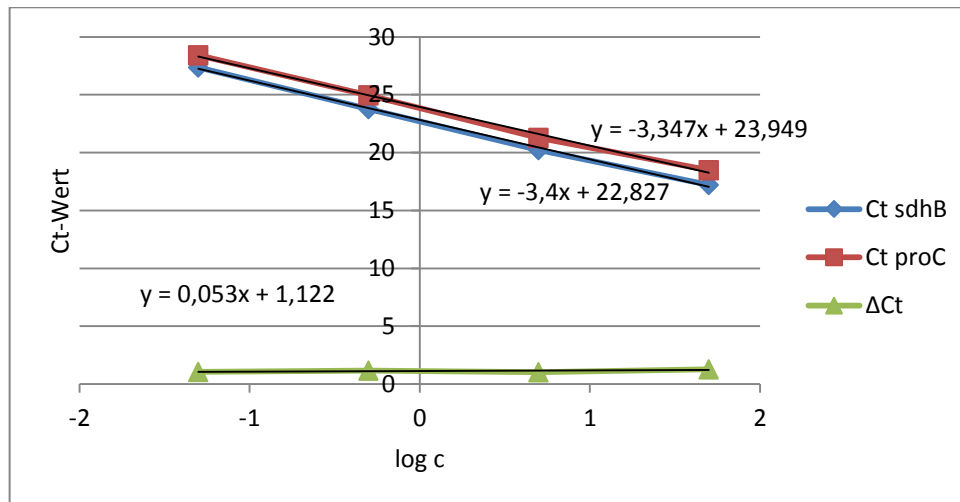


Abbildung 2.5: Bestimmung der Vergleichbarkeit der PCR-Effizienz über die Standardkurve am Beispiel von *sdhB* (Untersuchungsgen) und *proC* (Referenzgen)

2.2.15 Fluoreszenzmessung

Der Begriff Fluoreszenz beschreibt die spontane Emission von Licht, welche durch den Übergang eines Elektrons vom angeregten Zustand in den ursprünglichen weniger energiereichen Zustand erfolgt. Der auslösende Faktor für die Anregung des Elektrons stellt in der Regel die Absorption von Licht spezifischer Wellenlängen dar. Durch die Instabilität des Systems im energiereicheren Zustand fällt das Elektron nach kurzer Zeit wieder auf das energieärmere Ausgangsniveau zurück und emittiert die Energie in Form von Licht (Fluoreszenz). Dabei lassen sich insbesondere Elektronen aus Doppelbindungen bzw. konjugierten Systemen leichter anregen, da diese über mehrere Atome verteilt vorliegen.

Bei den in dieser Arbeit verwendeten Fluoreszenzproteinen handelte es sich um das GFPmut2, das rote Fluoreszenzprotein mCherry sowie das blaue Fluoreszenzprotein mTagBFP2 (Cormack et al., 1996; Shaner et al., 2004; Subach et al., 2011). Das GFPmut2 stellt eine Variante des WT-GFPs dar, welche aufgrund von drei Aminosäuresubstitutionen im Fluorophor eine bathochrome Verschiebung der Anregungswellenlänge sowie eine fast 100-fach erhöhte Fluoreszenzintensität in *E. coli* aufweist. Das Fluoreszenzprotein mCherry wurde von Shaner et al. durch gerichtete Evolution, ausgehend von dem roten Fluoreszenzprotein DsRed aus der Anemone *Discosoma* sp. entwickelt. Die Vorteile dieses Proteins, im Vergleich zu dem natürlichen Fluoreszenzprotein, liegen in der verbesserten Fotostabilität, der monomeren Form und der verringerten Halbwertszeit zur Proteinreifung (Shaner et al., 2004). Das blaue Fluoreszenzprotein mTagBFP2 stellt eine Weiterentwicklung des mTagBFPs dar und wurde von Subach et al. entwickelt. Es besitzt gegenüber seinem Vorgänger eine erhöhte chemische Stabilität sowie, im Vergleich zu anderen blauen Fluoreszenzproteinen,

eine erhöhte Leuchtintensität (Subach et al., 2011). Die Durchführung der Fluoreszenzmessungen erfolgte mit dem Fluorimeter Mithras LB 940 von Berthold Technologies.

2.2.15.1 Anzucht und Messung

Für die Fluoreszenzmessungen wurden die Zellen, ausgehend von einer ÜNK, 1:100 in frischem M9-Medium mit Glukose (bzw. LB-Medium) bis zur frühen exponentiellen Phase von einer OD_{600nm} von 0,2 bei 37 °C und 180 rpm im Schüttelinkubator angezogen, und auf die gewünschte Anzahl an Untersuchungskolben aufgeteilt. Je nach Versuchsziel wurden die Antibiotika in 1 x MHK oder in anderen Konzentrationen hinzugegeben und 1 h, 2 h und 3 h nach Antibiotikaexposition im Fluorimeter vermessen. Hierfür wurden zu den Messzeitpunkten von den Proben und vom Medium die OD_{600nm} bestimmt sowie die Fluoreszenz als Triplikat vermessen. In eine schwarze Mikrotiterplatte wurden jeweils 3 x 100 µl Probe bzw. Medium pipettiert, die Mikrotiterplatte in das Gerät eingelegt und das Programm für das jeweilige Fluoreszenzprotein gestartet. Die Proben wurden in dem Gerät vor der Fluoreszenzmessung zusätzlich durch Schütteln kurz durchmischt. Mit Ausnahme der Vorversuche (Kapitel 3.1.3.1) wurden alle Fluoreszenzversuche in einer Doppelbestimmung und als Triplikat durchgeführt. Die Maxima der Anregungs- und Emissionsspektren sowie die verwendeten Anregungs- und Emissionswellenlängen der jeweiligen Fluoreszenzproteine sind in Tabelle 2.23 dargestellt. Als weitere Parameter für die Fluoreszenzmessungen wurden eine Belichtungszeit von 1 s, eine Messdauer von 0,1 s und eine Lampenenergie von 14.000 für GFPmut2 und mTagBFP2 bzw. von 56.000 für mCherry verwendet. Die Lampenenergie ist von Berthold Technologies als eine dimensionslose Größe angegeben und für den Bereich von 0 – 65.535 einstellbar (Berthold Technologies, 2008). Nach Angaben des Herstellers entspricht das Intervall der Lampenenergie 0 bis 75 Watt (Berthold Technologies, 2008).

Tabelle 2.23: Fluoreszenzproteine und ihre Maxima sowie verwendete Anregungs- und Emissionswellenlängen

Fluoreszenzprotein	Maxima der Anregungs-/ Emissionsspektren	verwendete Anregungs-/ Emissionswellenlängen
<i>GFPmut2</i>	481 nm / 507 nm	485 nm / 535 nm
<i>mCherry</i>	587 nm / 610 nm	550 nm / 610 nm
<i>mTagBFP2</i>	399 nm / 456 nm	405 nm / 460 nm

2.2.15.2 Auswertung der Fluoreszenzdaten

Die erhaltenen Fluoreszenzrohdaten wurden auf die OD_{600nm} zum jeweiligen Messzeitpunkt der Probe normiert, indem der Quotient aus Fluoreszenzintensität und der OD_{600nm} gebildet wurde (Formel 2.7). Die daraus resultierenden Fluoreszenzdaten wurden in der Einheit RFU (*relative fluorescence unit*) angegeben und dienten zum Ausgleich von Differenzen in der Zelldichte. Zur besseren Vergleichbarkeit des Verhältnisses

der Fluoreszenzsignale von induzierter zur uninduzierten Probe von Messungen unterschiedlicher Versuchstage wurden die RFU-Werte als prozentuale Abweichung zur uninduzierten Kontrolle angegeben und hierüber der Mittelwert sowie die Standardabweichung berechnet.

$$\text{Fluoreszenzsignal, normiert [RFU]} = \frac{\text{Fluoreszenzrohsignal}}{OD_{600nm}}$$

Formel 2.7: Berechnung zur Normierung der Fluoreszenzsignale

Die Bestimmungsgrenzen bilden den Schwellenwert, ab dem eine Änderung der Fluoreszenzintensität als relevant betrachtet wurde. Die obere Bestimmungsgrenze wurde über die Leerwertmethode ermittelt, indem die 10-fache Standardabweichung der uninduzierten Kontrolle spezifisch für jede Stamm-Plasmid-Kombination und den jeweiligen Messzeitpunkt berechnet und zum entsprechenden Mittelwert addiert wurde (Formel 2.8).

$$\text{obere Bestimmungsgrenze} = \bar{x} \text{ der RFU}_{\text{uninduzierte Kontrolle}} \text{ als } 100 \% + 10 * s \text{ in } \%$$

Formel 2.8: Berechnung der oberen Bestimmungsgrenze

Die untere Bestimmungsgrenze wurde aufgrund der prozentualen Angaben anhand von Formel 2.9 aus der oberen Bestimmungsgrenze berechnet. Es handelt sich hierbei nicht um eine reale statistische Größe, sondern um eine fiktive Grenze die aufgrund der experimentellen Begebenheiten notwendig war.

$$\text{untere Bestimmungsgrenze} = \frac{100}{\text{obere Bestimmungsgrenze}} * 100 \%$$

Formel 2.9: Berechnung der unteren Bestimmungsgrenze

Zur Verdeutlichung der Berechnung der Fluoreszenzdaten ist eine Beispielrechnung mit fiktiven Messergebnissen angegeben:

Tabelle 2.24: Beispielrechnung zur Auswertung der Fluoreszenzdaten

	<i>uninduzierte Kontrolle als Dreifachbestimmung</i>	<i>induzierte Probe als Dreifachbestimmung</i>
<i>RFU</i>	1000 /1100/ 900	5000/4900/5200
<i>Mittelwert (M)</i>	1000 = 100 %	5033 = 503 % (bezogen auf die uninduzierte Kontrolle)
<i>Standardabweichung (s)</i>	100 RFU	153 RFU
<i>Standardabweichung in 100 %</i>	10 %	3,03 %
<i>10 x Standardabweichung in %</i>	100 %	30,3 %
<i>Obere Bestimmungsgrenze</i>	100 % (M) + 100 % (s) = 200 %	
<i>Untere Bestimmungsgrenze</i>	100 /200 x 100 % = 50 %	

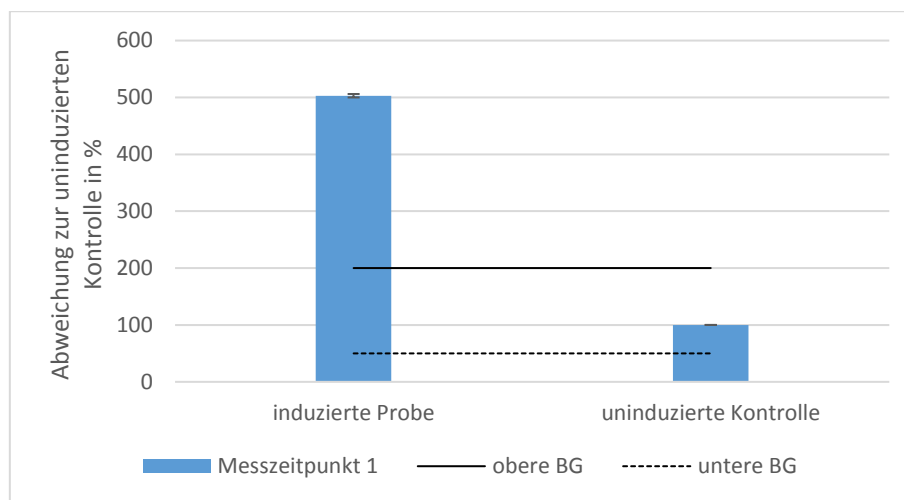


Abbildung 2.6:: Graphische Darstellung zur Beispielrechnung; BG = Bestimmungsgrenze

Die Darstellung zur Beispielgraphik zeigt, dass die induzierte Probe, eine im Vergleich zur uninduzierten Kontrolle, 5-fach höhere relative Fluoreszenzintensität aufweist. Da dieser Wert oberhalb der Bestimmungsgrenze von 200 % liegt, ist die Induktion als signifikant zu bewerten.

3 Ergebnisse

Das Ziel dieser Arbeit bestand in der Entwicklung eines sensitiven biosensorischen Messsystems zum Nachweis subinhibitorischer Konzentrationen antibakterieller Substanzen, wie z.B. in Untersuchungsproben. Ein solches Messsystem sollte die folgenden Eigenschaften aufweisen:

- eine hohe Antibiotikasensitivität,
- ein breites Anwendungsspektrum auf unterschiedliche Wirkstoffe
- sowie eine einfache und unkomplizierte Messmethode darstellen.

Die hohe Sensitivität sollte über die Konstruktion einer für Antibiotika hypersensitiven $\Delta toIC$ -Mutante von *E. coli* C600 erreicht werden, welche als Sensorstamm des Messsystems fungieren sollte. Das Gen *toIC* kodiert für das Protein TolC, ein äußeres Membranprotein und stellt einen Bestandteil verschiedener unspezifischer Effluxpumpen mit breitem Substratspektrum (MDR; „multiple drug resistance“) in *E. coli* dar. Das Protein ist somit an der Eliminierung toxischer Substanzen beteiligt, wie zum Beispiel Antibiotika oder Metabolite aus Stoffwechselwegen. Eine Deletion von *toIC* und der damit reduzierte Efflux, führen zu einer intrazellularen Anreicherung dieser Substanzen und zu einer Zunahme der Sensitivität (Rosner & Martin, 2013). Die $\Delta toIC$ -Mutante sollte dann mit unterschiedlichen Reporterplasmiden, jeweils bestehend aus einem durch Antibiotika induzierbaren Promotor gekoppelt mit dem Strukturgen eines Fluoreszenzproteins, transformiert werden. Der Nachweis von zellulärem Stress über eine durch Antibiotika induzierte Änderung der Fluoreszenzintensität im Vergleich zu einer uninduzierten Kontrolle stellt somit das Grundprinzip des biosensorischen Messsystems dar. Das Anwendungsspektrum umfasste zunächst ausschließlich bakterizide Antibiotika unabhängig von deren molekularen Zielstrukturen. Im Rahmen der Erweiterung des Messsystems sollte das Anwendungsspektrum zusätzlich um Vertreter bakteriostatisch wirkender Antibiotikaklassen ergänzt werden (Kapitel 3.2).

Zum Erreichen dieser Zielsetzung wurden in dieser Arbeit drei Ansätze verfolgt:

1. Die Konstruktion eines Reportersystems basierend auf der von Kohanski et al. aufgestellten Hypothese eines gemeinsamen Wirkmechanismus bakterizider Antibiotika (Kapitel 3.1) (Kohanski et al., 2007).
2. Die Konstruktion von drei voneinander unabhängigen GFP-basierten Reportersystemen, welche auf spezifische, durch unterschiedliche Antibiotikaklassen induzierte Stressesstimuli ansprechen (Kapitel 3.2). Hierfür wurde jeweils ein System entwickelt, welches DNA-Schäden signalisiert, eines, welches Zellhüllstress anzeigt und eines, welches Störungen der Zellwandbiosynthese, beispielsweise durch Nachweis von Abbauprodukten der Zellwand, nachweist.

3. Als Erweiterung, der in Punkt 2 beschriebenen Systeme, wurden diese in einer Kombination in einem Messsystem vereint (Kapitel 3.3). Die Verwendung eines zusätzlichen rot bzw. blau fluoreszierenden Proteins neben GFP sollte schließlich den simultanen differenzierten Nachweis verschiedener Stressestimuli in derselben Probe ermöglichen, um dadurch eine Minimierung des Messaufwands bei gleichzeitiger Erhöhung der maximalen Probenanzahl zu erreichen. Dieses System sollte abschließend in einem verblindeten Versuch mit unbekannten Proben getestet werden (Kapitel 3.3.4).

3.1 Entwicklung eines Messsystems zum Nachweis bakterizider Antibiotika

Im Jahre 2007 stellten Kohanski et al. die Hypothese eines gemeinsamen Wirkmechanismus bakterizider Antibiotika auf, welcher unabhängig von der primären Zielstruktur auf der Bildung Reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) beruht und wodurch die bakterizide Wirkung vermittelt wird (Kohanski et al., 2007). Diese Hypothese bildete die Grundlage für diese Arbeit und sollte in Kombination mit einem hochempfindlichen Sensorstamm zur Entwicklung eines biosensorischen Messsystems für den Nachweis bakterizider Antibiotika führen. Kohanski et al. beschreiben die Bildung von ROS, insbesondere die der hoch schädlichen Hydroxylradikale, als den Endpunkt einer ausschließlich durch bakterizid wirkende Antibiotika induzierten Kaskade. Diese umfasst unter anderem den Citratzyklus, die Erschöpfung von Reduktionsäquivalenten, insbesondere von NADH, die Destabilisierung von Eisen-Schwefel-Clustern sowie die Stimulierung der Fenton-Reaktion. Aufgrund einer Verschiebung des NAD^+/NADH -Verhältnisses und der erhöhten Genexpression von Untereinheiten der NADH-Dehydrogenase I (*nuoCEF*) bei Zugabe bakterizider Antibiotika, stellt die NADH-Dehydrogenase I für Kohanski et al. eines der Schlüsselenzyme des gemeinsamen Wirkmechanismus dar. Eine detaillierte Ausführung zur Hypothese und der ROS generierenden Kaskade ist in Kapitel 1.2.5 beschrieben.

3.1.1 Konstruktion des Sensorstammes

3.1.1.1 Charakterisierung einer *tolC*-Mutante am Beispiel von *E. coli* DE112

Zur Abschätzung einer durch den Verlust von TolC hervorgerufenen Sensitivitätserhöhung wurden von den Stämmen *E. coli* RFM443 und dessen *tolC*-Mutante *E. coli* DE112 (*tolC::miniTn10*) die minimalen Hemmkonzentrationen für verschiedene Antibiotika bestimmt, deren Wirksamkeit durch Efflux beeinflusst wird. Des Weiteren wurde mittels quantitativer Real-time PCR (qRT-PCR) untersucht, ob die basale Expression von *nuoF*, welches für eine der Untereinheiten der NADH-Dehydrogenase I, sowie von *marA*, welches für den globalen Transkriptionsaktivator MarA codiert als Folge der *tolC*-Mutation verändert ist. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3.1 sowie in Abbildung 3.1 dargestellt.

3.1.1.1.1 Bestimmung der Antibiotikaempfindlichkeit als MHK

Wie bereits beschrieben führt der Verlust des Proteins TolC, insbesondere durch den eingeschränkten Export von Antibiotika durch die äußere Membran, zu einer Akkumulation von Antibiotika in der Zelle und in Folge dessen zu einer Erhöhung der Sensitivität und Abnahme der MHK (Rosner & Martin, 2013). Das Maß der Sensitivitätserhöhung ist für jedes Antibiotikum spezifisch und abhängig von der Effizienz, mit der die Substanz aus der Zelle eliminiert wird. In der MHK-Bestimmung wurden die Antibiotika Novobiocin, Nalidixinsäure und Chloramphenicol untersucht, welche bekannte Substrate von AcrAB-TolC darstellen (Elkins & Nikaido, 2002; Nikaido & Takatsuka, 2009). Das Aminoglykosid Gentamicin, welches aufgrund seines hydrophilen Charakters nicht über AcrAB-TolC eliminiert wird, fungierte als Negativkontrolle (Elkins & Nikaido, 2002). Die Durchführung der MHK-Bestimmung erfolgte nach CLSI-Standard (Kapitel 2.2.3). Wie erwartet, zeigte die *tolC*-Mutante *E. coli* DE112 im Vergleich zum Ausgangsstamm für die Substrate der Effluxpumpe eine verringerte MHK. Die größte Abnahme mit sechs Verdünnungsstufen wurde für Novobiocin ermittelt, gefolgt von Nalidixinsäure mit drei Stufen und Chloramphenicol mit zwei Stufen. Gentamicin bewirkte keine relevante Erhöhung der Sensitivität. Eine MHK-Differenz von einer Stufe liegt im Bereich der methodischen Schwankung.

Tabelle 3.1: Ergebnis der MHK-Bestimmung von *E. coli* RFM443 und *E. coli* DE112

Antibiotikum	<i>E. coli</i> RFM443	<i>E. coli</i> DE112	MHK-Stufen
<i>Novobiocin</i>	32 µg/ml	0,5 µg/ml	6
<i>Nalidixinsäure</i>	4 µg/ml	0,5 µg/ml	3
<i>Chloramphenicol</i>	8 µg/ml	2 µg/ml	2
<i>Gentamicin</i>	0,125 µg/ml	0,063 µg/ml	1

3.1.1.1.2 Ermittlung der basalen Expression der Gene *nuoF* und *marA* mittels quantitativer Real-time PCR

Die Verwendung des *nuoF*-Promotors für die Konstruktion des Reportersystems zum Nachweis bakterizider Antibiotika setzte voraus, dass die basale Expression von *nuoF* nicht maßgeblich durch den Verlust von TolC beeinflusst wird. Eine erhöhte *nuoF*-Expression in der *tolC*-Mutante würde die Spezifität und die Empfindlichkeit des Messsystems beeinträchtigen und stellt demnach ein Ausschlusskriterium für die Verwendung des Promotors bei der Reporterplasmidkonstruktion dar. Neben der Expression von *nuoF* wurde zusätzlich die des globalen Transkriptionsaktivators MarA untersucht, welcher als Teil des *marRAB*-Operons die Expression der Effluxpumpe AcrAB-TolC positiv reguliert (Duval & Lister, 2013). Anders als bei der Expression von *nuoF*, war zu erwarten, dass eine erhöhte Expression von *marA* zur teilweisen Kompensierung der durch den Verlust von TolC hervorgerufenen Effekte und der Wiederherstellung der Homöostase führen würde (Rosner & Martin, 2009).

Die Quantifizierung der Genexpression erfolgte über die Effizienz-korrigierte Methode nach Pfaffl. Für diese Messungen wurden im Rahmen eines Vorversuches ausgehend von einer Anzucht in einer Dreifachbestimmung die Expression und die PCR-Effizienz anhand der erhaltenen Amplifikationskurven über das Auswertungsprogramm PCR Miner ermittelt (Zhao & Fernald, 2005). Aufgrund mangelnder Wiederholungsmessungen sind die Daten lediglich als Näherung zu betrachten. Die Berechnung über ein zweites Auswertungsprogramm, LinReg PCR, diente als zusätzliche Überprüfung der PCR-Effizienzen und lieferte vergleichbare Ergebnisse (Ruijter et al., 2009).

Die quantitative Bestimmung der basalen Expression von *nuoF* zeigte für die *tolC*-Mutante *E. coli* DE112 im Vergleich zum Ausgangsstamm *E. coli* RFM443 eine etwa 1,5-fache Erhöhung der Expression. Da Differenzen der Ct-Werte von bis zu eins für die gleiche Probe innerhalb einer Mehrfachbestimmung mit unterschiedlichen Anzuchten auftreten und der daraus gebildete $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Wert als Potenz in der Formel zur Berechnung des Expressionsunterschiedes über die $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode (Kapitel 2.2.14.5) vorliegt, wird die Expressionsänderung von *nuoF* in einer *tolC*-Mutante als nicht relevant bewertet. Im Folgenden wurde daher die *nuoF*-Expression unter Einfluss bakterizider Antibiotika untersucht (Kapitel 3.1.2.2.1.1).

Im Vergleich zum Ausgangsstamm zeigte die *tolC*-Mutante eine etwa fünffach erhöhte Expression von *marA* (Abb. 3.1) und bestätigte die erwartete Expressionserhöhung (Rosner & Martin, 2009).

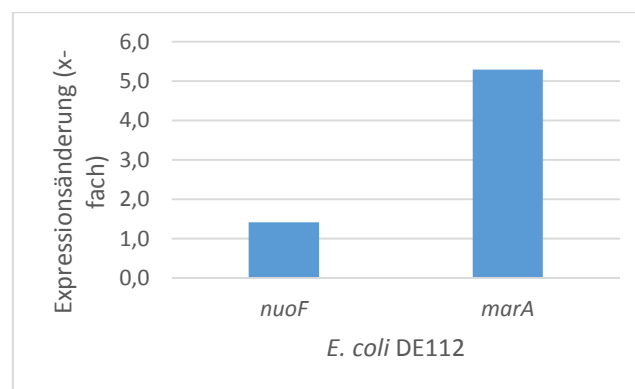


Abbildung 3.1: Änderung der Expression von *marA* und *nuoF* in *E. coli* DE112 im Vergleich zum Ausgangsstamm *E. coli* RFM443

3.1.1.2 Charakterisierung von *E. coli* C600 als Wirtsstamm für Reporterplasmide, die durch verschiedene Antibiotika induziert werden

Die *tolC*-Mutante *E. coli* DE112 zeigte in der MHK-Bestimmung (Kapitel 3.1.1.1.1) im Vergleich zu *E. coli* RFM443 eine erhöhte Empfindlichkeit und entsprach somit dem hypersensitiven Phänotyp. Hinsichtlich weiterer genetischer Eigenschaften sollte ein geeigneter Stamm gewählt werden, der als Ausgangsstamm zur Konstruktion der ΔtolC -Mutante dienen sollte. Die gewünschten genetischen Eigenschaften hierfür wa-

ren (1) die Abwesenheit von Resistenzgenen bzw. resistenzvermittelnder Mutationen gegenüber Antibiotika, wodurch die betreffende Antibiotikaklasse vom Messsystem ausgeschlossen wäre sowie (2) das Vorliegen eines Selektionsmarkers, der den Erhalt des Reporterplasmides während Anzucht und Messung ohne Verwendung von Antibiotika gewährleistet. Eine Alternative zur Selektion durch Antibiotika stellt die Verwendung eines Auxotrophiemarkers dar. Dies setzt trotz erschwelter Wachstumsbedingungen einer ΔtoI -Mutante die Anzucht in Minimalmedium voraus (Dhamdhare & Zgurskaya, 2010). Die verwendete Bezeichnung M9-Medium bezieht sich im Folgenden auf M9-Medium mit Glukose als Kohlenstoffquelle. Unter Berücksichtigung der aufgeführten Kriterien wurde der Stamm *E. coli* C600 (*F*-, *thr-1*, *leuB6*, *thi-1*, *lacY1*, *supE44*, *tonA21*) als Ausgangsstamm für das biosensorische Messsystem gewählt. *E. coli* C600 besitzt drei Nährstoffauxotrophien (*thr-1*, *leuB6*, *thi-1*), wovon die Auxotrophie gegenüber Leucin (*leuB6*) mit einem Defekt der Isopropylmalatdehydrogenase, einem essentiellen Enzym der Leucin-Biosynthese, als Selektionsmarker verwendet wurde. Die Defekte in der Threonin- (*thr-1*) und Thiaminsynthese (*thi-1*) wurden durch Supplementierung des Mediums kompensiert.

3.1.1.2.1 Untersuchung zur Auxotrophie von *E. coli* C600

Für den Nachweis der Leucin-Auxotrophie wurde *E. coli* C600 als Übernachtskultur in dem Minimalmedium M9 mit Glukose mit und ohne L-Leucinzugabe sowie als Kontrolle in dem Komplexmedium LB untersucht. Das M9-Medium wurde, wie in Kapitel 2.1.6 beschrieben, hergestellt und mit der Aminosäure L-Threonin sowie dem B1-Vitamin Thiamin in den Konzentrationen von jeweils 20 µg/ml supplementiert. Nach einer Inkubationszeit von 12 h war sowohl bei der in LB angezogenen Kontrollkultur als auch bei der Anzucht in mit L-Leucin supplementiertem M9-Medium ein Wachstum zu beobachten. Im Gegensatz dazu konnte für die Anzucht in M9-Medium ohne L-Leucinzugabe auch nach stark verlängerter Inkubation von bis zu einer Woche kein Wachstum nachgewiesen werden.

Der Zusatz von L-Leucin ist daher für das Wachstum von *E. coli* C600 in M9-Medium essentiell, sodass über die Komplementation der *leuB6*-Mutation der Erhalt der Reporterplasmide in der Zelle in Leucin-freiem Medium gewährleistet werden konnte.

3.1.1.2.2 Konstruktion des Plasmides pHPKC3-02 zur Komplementation der Leucin-Auxotrophie

Das Plasmid pHPKC3-02 stellte das Ausgangsplasmid für das Messsystem und alle weiteren Reporterplasmidkonstruktionen dar. Für die Konstruktion wurde in das *bla*-Gen der TEM-1 β -Laktamase des Plasmidvektors pBR322 (Amp^R , Tet^R) das Gen *leuB* aus *E. coli* MG1655 inseriert, wodurch die Ampicillinresistenz inaktiviert wurde. Das Gen *tetA* vermittelt die Tetracyclinresistenz in pBR322 und blieb als Selektionsmarker aktiv. Da *leuB* in einem ca. 6,5 kb großen Operon organisiert ist, sollten die in pBR322 vorhandenen Promotoren P1 und P3 der β -Laktamase für die Expression von *leuB* genutzt werden (Brosius, Cate, & Perlmutter,

1982; Somers, Amzallag, & Middleton, 1973). Über eine basengenaue Substitution von *leuB* gegen *bla* am Startcodon wurde der optimale Abstand zwischen dem zu inserierenden Strukturgenen und den Promotoren beibehalten. Dies erfolgte mittels eines SOEing-Produktes (Abb. 3.2 rechts), welches aus einem *leuB*-Fragment (1332 bp) und einem pBR322-Fragment (623 bp) konstruiert (Abb. 3.2 links) und über die Schnittstellen *Pst*I und *Bam*HI in pBR322 inseriert wurde. Die Differenz aus der Summe der Basenpaaranzahl des pBR322-Fragmentes und des *leuB*-Fragmentes im Vergleich zur Basenpaaranzahl des SOEing-Produktes resultiert aus den sich überschneidenden homologen Bereichen der Einzelfragmente. Wie in Abbildung 3.3 dargestellt, lag die Schnittstelle für *Bam*HI in dem Gen *tetA*, sodass bei Spaltung des Vektors *tetA* zwar zerstört, jedoch nach Insertion des SOEing-Produktes wieder vollständig rekonstruiert wurde.

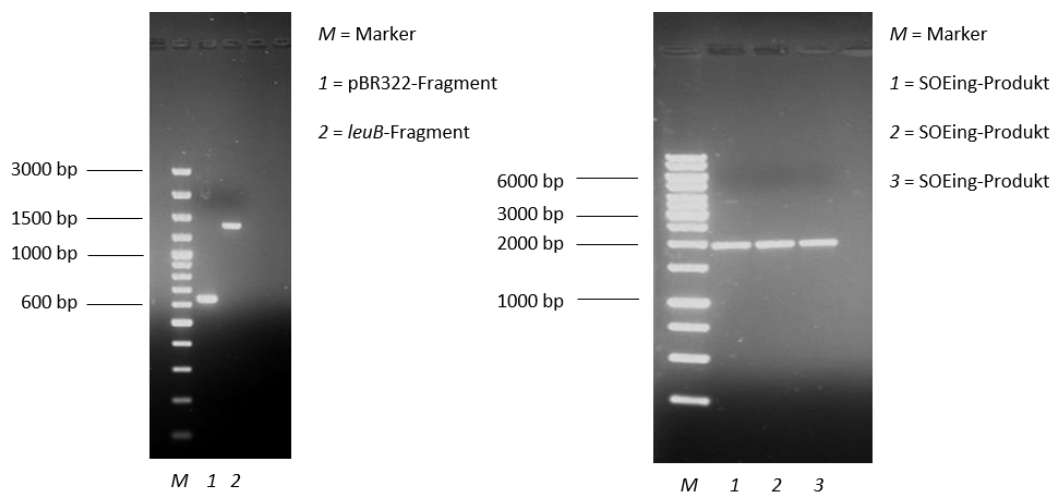


Abbildung 3.2: links: gereinigte Einzelfragmente für die SOEing-PCR; rechts: gereinigtes SOEing-Fragment (aufgrund der hohen Ausbeute des Produktes nach erfolgter SOEing-PCR wurden für die Reinigung drei Ansätze durchgeführt, die für die Ligation vereint wurden)

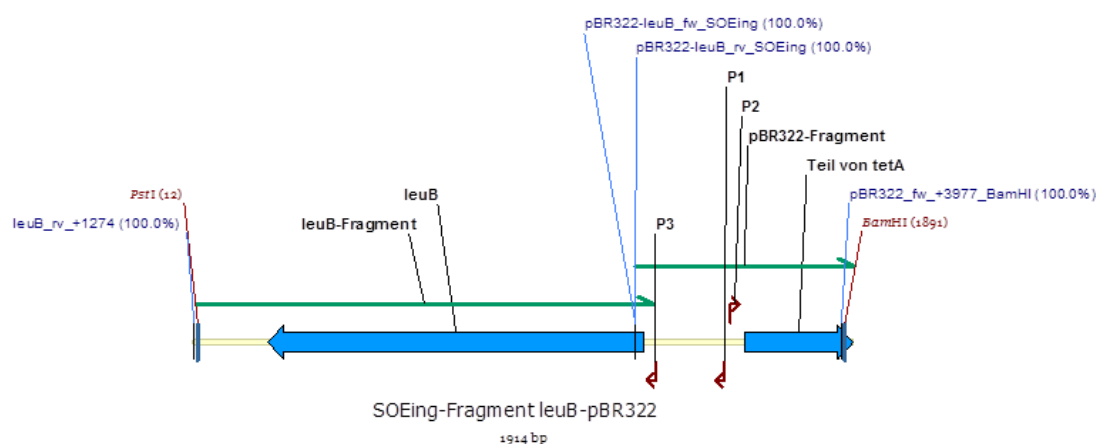


Abbildung 3.3: SOEing-Produkt aus dem *leuB*-Fragment und dem Fragment aus pBR322

Nach Transformation des Konstruktionsstammes *E. coli* JM109 mit dem Ligationsansatz aus gespaltenem SOEing-Produkt und Vektorfragment wurden die Transformanten zunächst auf Tetracyclin-Agarplatten selektiert und anschließend mittels Replikaplattierung auf den Verlust der β -Laktamase über Ampicillin-Agarplatten überprüft. Das gesuchte Plasmid wurde aus den Ampicillin-sensitiven Transformanten isoliert und im Restriktionsverdau mit *Bam*HI und *Nde*I kontrolliert. Der Einzelverdau mit *Bam*HI führte zur Linearisierung des Plasmides und zeigte das gewünschte Fragment von 5115 bp. Der Einzelverdau mit *Nde*I lieferte, aufgrund der durch das Insert erzeugten zusätzlichen Schnittstelle, im Vergleich zum Ausgangsplasmid pBR322, die gewünschten Fragmente von 3174 bp und 1941 bp. Des Weiteren sind noch unverdautes und nur einmal geschnittenes Plasmid als Folge eines unvollständigen Verdau zu erkennen. Der Restriktionsverdau bestätigte somit die Identität von pHPKC3-02.

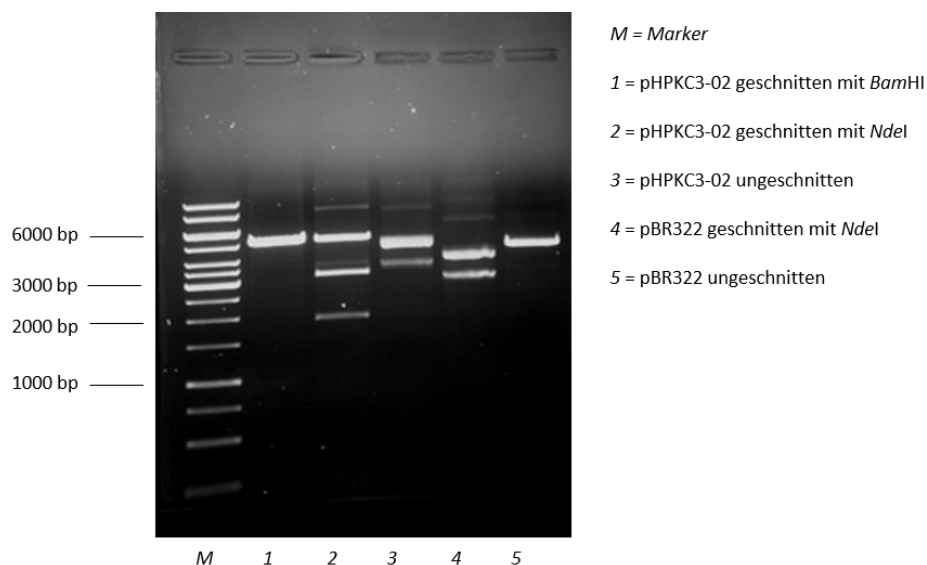


Abbildung 3.4: Restriktionsverdau von pHPKC3-02 mit *Bam*HI und *Nde*I

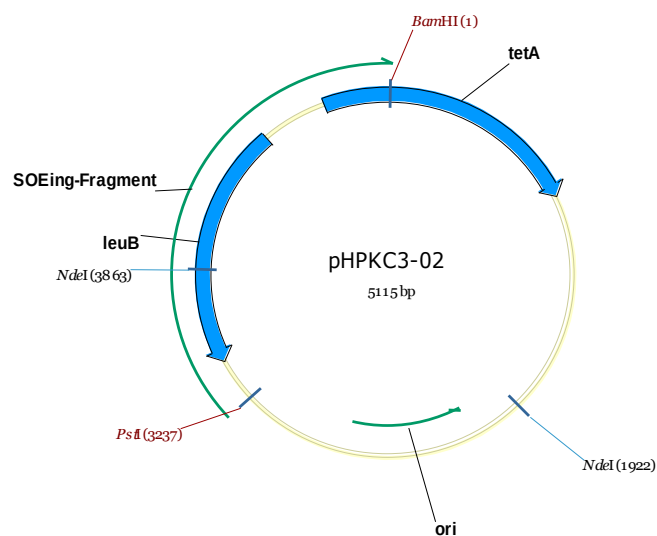


Abbildung 3.5: Plasmidkarte des Komplementationsplasmides pHPKC3-02

3.1.1.2.3 Prüfung der Komplementation der *leuB6*-Mutation durch pHPKC3-02

E. coli C600 wurde mit dem Plasmid pHPKC3-02 transformiert und das Wachstumsverhalten der Transformanten sowie des untransformierten Stammes auf M9-Agarplatten mit und ohne Zusatz von L-Leucin verglichen. Während *E. coli* C600 ausschließlich auf mit L-Leucin supplementierten Platten ein Wachstum zeigte, zeigten die Transformanten auch auf den Agarplatten ohne Zusatz ein Wachstum. Das Plasmid komplementierte den Defekt in der Leucin-Biosynthese, sodass in nachfolgenden Versuchen auf den Zusatz von Tetracyclin zur Selektion plasmidtragender Zellen in Leucin-freiem M9-Medium verzichtet wurde.

3.1.1.3 Konstruktion der $\Delta toIC$ -Mutante von *E. coli* C600 mittels homologer Rekombination

Die Einführung der chromosomalen *toIC*-Deletion in *E. coli* C600 erfolgte mittels Gene doctoring, einer Methode basierend auf dem Prinzip der homologen Rekombination (Lee et al., 2009). Die Methode wurde im Arbeitskreis etabliert und ist in Kapitel 2.2.12.2 detailliert beschrieben.

3.1.1.3.1 Saccharose-Toleranz-Test

Bei dem Saccharose-Toleranz-Test handelt es sich um einen Vorversuch für das Gene doctoring, der zur Bestimmung der Saccharoseempfindlichkeit des Ausgangsstammes für die Rekombinationsexperimente dient. Wie in Kapitel 2.2.12.2 beschrieben, führt die Expression der Levansucrase in Anwesenheit von Saccharose zu toxischen Levanen, die sich letal auf die Zelle auswirken. Das Gen der Levansucrase (*sacB*) befindet sich auf dem Plasmid pDOC-K bzw. auf dem Donorplasmid, welches nach erfolgter Rekombination zerstört wird und eine Selektion von rekombinanten Zellen in Saccharose-haltigem Medium ermöglicht. In einem Vorversuch wurde zuvor eine eventuelle natürliche Empfindlichkeit von *E. coli* C600 gegenüber Saccharose geprüft. Hierfür wurde der Stamm mit dem Plasmid pDOC-K (*sacB*⁺, Amp^R, Kan^R) transformiert und die Transformanten auf Ampicillin-Agarplatten selektiert. Vier Transformanten wurden auf Ampicillin-Agarplatten mit und ohne Zusatz von 5 % Saccharose ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. In einem parallelen Ansatz wurde *E. coli* C600 ohne pDOC-K auf LB-Agarplatten ebenfalls mit und ohne Zusatz von 5 % Saccharose ausplattiert und unter gleichen Bedingungen inkubiert. Der Zusatz von Saccharose hatte keinen Einfluss auf das Wachstum des untransformierten Stammes. Es lag daher keine natürliche Empfindlichkeit von *E. coli* C600 gegenüber Saccharose vor. Entgegen den Erwartungen war auf den Agarplatten mit *E. coli* C600/pDOC-K trotz anzunehmender Expression der Levansucrase, ein Wachstum unter Zusatz von Saccharose erkennbar. Im Vergleich zu den Agarplatten ohne Saccharose waren die Kolonien jedoch kleiner und deren Anzahl um ein Vielfaches geringer. Für die nach erfolgter Rekombination anschließende Selektion musste daher berücksichtigt werden, dass *sacB* keinen zuverlässigen Selektionsmarker darstellt.

3.1.1.3.2 Konstruktion des Donorplasmides pHPKC12-02b

Das Donorplasmid pHPKC12-02b wurde in zwei Schritten konstruiert, in denen jeweils ein homologer Bereich inseriert wurde. Die homologen Bereiche umfassten die Sequenzabschnitte in 5'- und 3'- Richtung von *tolC* und flankierten das in pHPKC12-02b zur späteren Selektion benötigte Kanamycinresistenzgen *aphA*. Abweichend zur Literatur wurde durch die Verlängerung der homologen Bereiche auf 500 bp versucht die Anzahl der Rekombinationsereignisse zu erhöhen (Lee et al., 2009).

Im ersten Schritt wurde das Plasmid pHPKC12-02a konstruiert, welches den homologen Bereich in 5'-Richtung von *tolC* (H1) trägt. Mittels der Kochlysate-Methode wurde aus *E. coli* C600 Plasmid-DNA isoliert und mit den Primern *tolC_E.coli_fw_-468* und *tolC_E.coli_rv_-2* ein 511 bp großes PCR-Produkt amplifiziert, das dann mit den Restriktionsenzymen *Bam*HI und *Eco*RI an jeweils einem Ende gespalten wurde. Anschließend wurde das gesplattene PCR-Produkt in den vorbereiteten Vektor pDOC-K inseriert. Die erhaltenen Transformanten wurden auf Ampicillin-Agarplatten selektiert und die Plasmide mittels Alkalischer Lyse isoliert. Die erfolgreiche Insertion des homologen Bereiches H1 wurde über Restriktionsverdau mit *Eco*RI und *Bam*HI nachgewiesen (Abb.3.6). Die erwarteten Fragmentlängen für pHPKC12-02a lagen bei 7227 bp und 499 bp und entsprachen dem Elektropherogramm. Für das Ausgangsplasmid pDOC-K war nur das Fragment von 7227 bp zu erwarten.

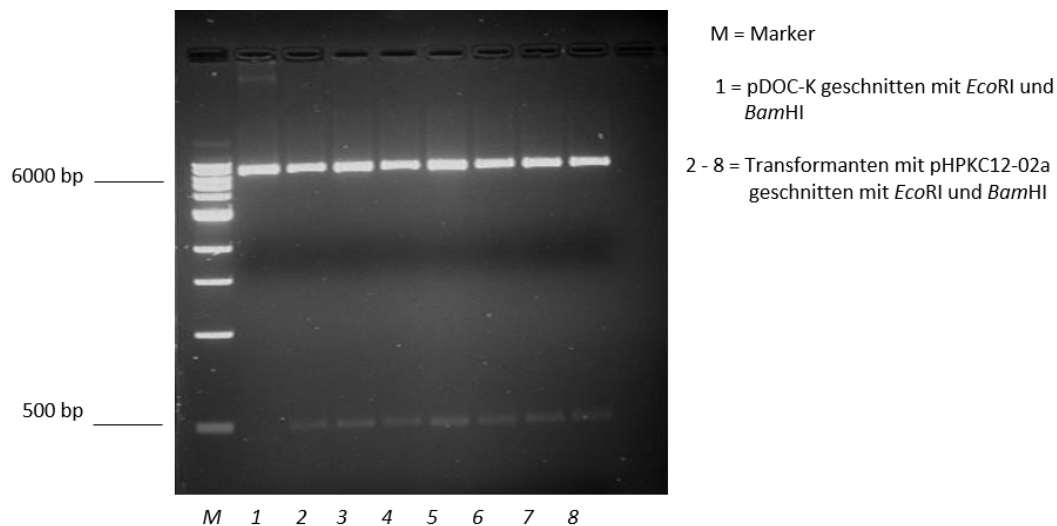


Abbildung 3.6: Doppelverdau von pDOC-K und pHPKC12-02a mit den Restriktionsenzymen *Eco*RI und *Bam*HI

Das Plasmid pHPKC12-02a diente anschließend als Ausgangsplasmid für die Konstruktion von pHPKC12-02b. Hierfür wurde der in 3'-Richtung liegende Bereich von *tolC* von 456 bp (H2) mit den Primern *tolC_E.coli_fw_+1471* und *tolC_E.coli_rv_+1881* ausgehend von Kochlysate-DNA aus *E. coli* C600 amplifiziert und über die Restriktionsschnittstellen *Sal*I und *Xho*I in pHPKC12-02a inseriert. Aus Gründen des Primerde-

signs wurde der Forward-Primer an das 3'-Ende von *tolC* gelegt, sodass nach Rekombination eine Restsequenz des Genes von 12 bp erhalten blieb. Die Transformanten wurden auf Ampicillin-Agarplatten selektiert und deren Plasmide über Alkalische Lyse isoliert. Die Überprüfung von pHPKC12-02b erfolgte über Restriktionsverdau mit *Bam*HI und *Hinc*II, Einzelverdau mit *Eco*RI sowie über die Sequenzierung der homologen Bereiche H1 und H2 im Vergleich zum Ausgangsstamm *E. coli* C600. Die erwarteten Fragmentgrößen für pHPKC12-02b im Doppelverdau lagen bei 2973 bp, 2549 bp, 1370 bp und 822 bp. Im Gegensatz hierzu lagen für das Ausgangsplasmid pHPKC12-02a die erwarteten Fragmentgrößen von 2973 bp, 2549 bp, 1789 bp und 822 bp vor. Das kleinste Fragment von 822 bp sowohl bei pHPKC12-02a als auch bei pHPKC12-02b ist aufgrund der geringen Menge und der kleinen Fragmentgröße in Abbildung 3.7 nur sehr schwach zu erkennen.

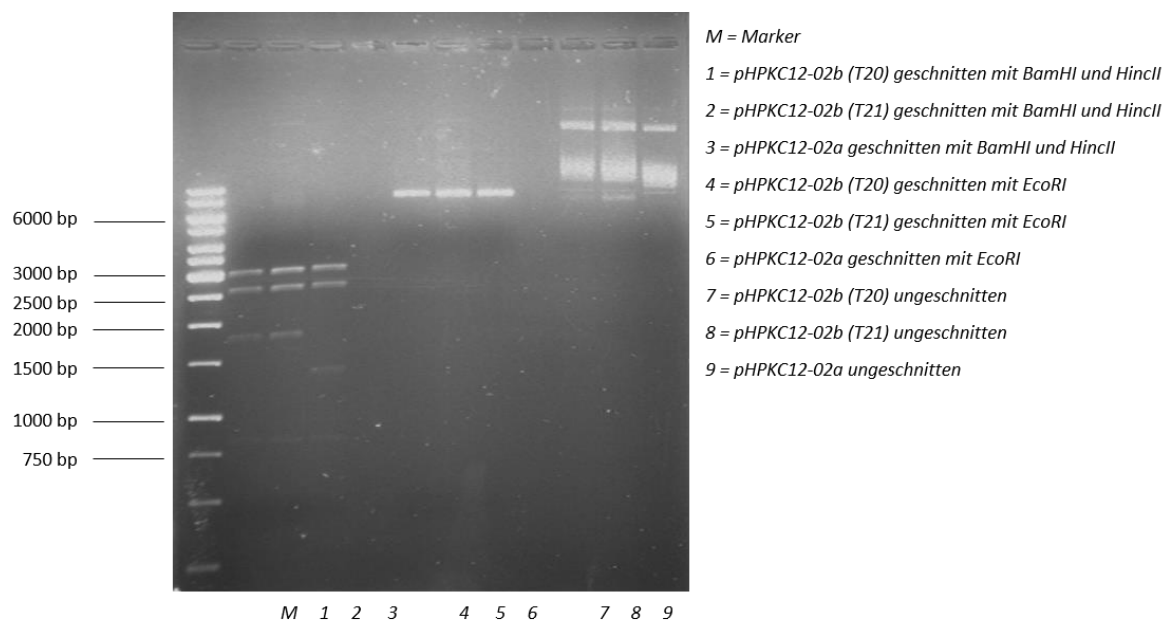


Abbildung 3.7: Einzel- und Doppelverdau von pHPKC12-02b und dem Ausgangsplasmid pHPKC12-02a

Die Sequenzanalyse für den homologen Bereich H1 für pHPKC12-02b erfolgte für DNA-Fragmente, die mit den Primern pDOC-K_rv_+2365 und pDOC-K_fw_+2178 bzw. für *E. coli* C600 mit den Primern tolC_E.coli_fw_-576 und tolC_E.coli_rv_+41 mittels PCR gewonnen wurden. Analog hierzu erfolgte die Sequenzierung des homologen Bereiches H2 für pHPKC12-02b mit den Primern pDOC-K_rv_+88 und pDOC-K_fw_+7584 bzw. für *E. coli* C600 mit tolC_E.coli_rv_+1972 und tolC_E.coli_fw_+1297. Die Ergebnisse der Sequenzanalyse (Abb. 3.8 und 3.9) bestätigten für H1 von Basenpaar 41 bis 493 (entsprechend 82 bp bis 533 bp in Abb. 3.8) bzw. für H2 von Basenpaar 1 bis 386 (entsprechend 147 bp bis 533 bp in Abb. 3.9), dass keine unerwünschten konstruktionsbedingten Mutationen vorlagen. Die Nachsequenzierung der nicht eindeutig bestimmten Bereiche (1 bp – 40 bp für H1 bzw. 387 bp – 432 bp für H2) in der Δ *tolC*-Mutante bestätigte, dass auch dort keine Mutationen durch die Plasmidkonstruktion erzeugt wurden.

					Section 1	
	(1)	1	10	20	37	
GK617_tolC_H1_fw-576_bs	(1)	GGGCAACATCTTCCACACTTTTACCCTCTTCAATCAT				
GK617_tolC_H1_rv+41_bs(c)	(1)	-----TCAATCAT				
pHPKC12-2b_tolC_H1+2365rv_bs(c)	(1)	-----				
pHPKC12-2b_tolC_H1+2178fw_bs2	(1)	-----AT				
Consensus	(1)	TCAATCAT				
					Section 2	
	(38)	38	50	60	74	
GK617_tolC_H1_fw-576_bs	(38)	CCCGGCAACCATCT-CCAGTAGCCAAGGGGTTTCGCT				
GK617_tolC_H1_rv+41_bs(c)	(9)	CCCGGCAACCATCT-CCAGTAGCCAAGGGGTTTCGCT				
pHPKC12-2b_tolC_H1+2365rv_bs(c)	(1)	-----				
pHPKC12-2b_tolC_H1+2178fw_bs2	(3)	GAATGCAACCATGNTCCAGTAGCCAAGGGGTGTCGCT				
Consensus	(38)	CCCGGCAACCATCT CCAGTAGCCAAGGGGTTTCGCT				
					Section 3	
	(75)	75	80	90	100	111
GK617_tolC_H1_fw-576_bs	(74)	GGTGT--CGTACGCGGCAATCCGAATCTGCTCAATCA				
GK617_tolC_H1_rv+41_bs(c)	(45)	GGTGT--CGTACGCGGCAATCCGAATCTGCTCAATCA				
pHPKC12-2b_tolC_H1+2365rv_bs(c)	(1)	-----ATCTGCTCAATCA				
pHPKC12-2b_tolC_H1+2178fw_bs2	(40)	GGTGTGTGCGTACGCGGCAATCCGAATCTGCTCAATCA				
Consensus	(75)	GGTGT CGTACGCGGCAATCCGAATCTGCTCAATCA				
					Section 4	
	(112)	112	120	130	148	
GK617_tolC_H1_fw-576_bs	(109)	GCACAACCTTCATCAGCACTGGGTCAAAGGGTAGCAA				
GK617_tolC_H1_rv+41_bs(c)	(80)	GCACAACCTTCATCAGCACTGGGTCAAAGGGTAGCAA				
pHPKC12-2b_tolC_H1+2365rv_bs(c)	(14)	GCACAACCTTCATCAGCACTGGGTCAAAGGGTAGCAA				
pHPKC12-2b_tolC_H1+2178fw_bs2	(77)	GCACAACCTTCATCAGCACTGGGTCAAAGGGNAGCAA				
Consensus	(112)	GCACAACCTTCATCAGCACTGGGTCAAAGGGTAGCAA				
					Section 5	
	(149)	149	160	170	185	
GK617_tolC_H1_fw-576_bs	(146)	GACTGCGGCGTGACCGCGCTCAAAAATTTCCCGCCGC				
GK617_tolC_H1_rv+41_bs(c)	(117)	GACTGCGGCGTGACCGCGCTCAAAAATTTCCCGCCGC				
pHPKC12-2b_tolC_H1+2365rv_bs(c)	(51)	GACTGCGGCGTGACCGCGCTCAAAAATTTCCCGCCGC				
pHPKC12-2b_tolC_H1+2178fw_bs2	(114)	GACTGCGGCGNGACCGCGCTCAAAAATTTCCCGCCGC				
Consensus	(149)	GACTGCGGCGTGACCGCGCTCAAAAATTTCCCGCCGC				
					Section 6	
	(186)	186	200	210	222	
GK617_tolC_H1_fw-576_bs	(183)	ACCTCATGACTCATTTGCCCCGTTGAATAGACGATGAC				
GK617_tolC_H1_rv+41_bs(c)	(154)	ACCTCATGACTCATTTGCCCCGTTGAATAGACGATGAC				
pHPKC12-2b_tolC_H1+2365rv_bs(c)	(88)	ACCTCATGACTCATTTGCCCCGTTGAATAGACGATGAC				
pHPKC12-2b_tolC_H1+2178fw_bs2	(151)	ACCTCANAGACTCANTTGCCCCGTTGAATAGACGATGAC				
Consensus	(186)	ACCTCATGACTCATTTGCCCCGTTGAATAGACGATGAC				
					Section 7	
	(223)	223	230	240	259	
GK617_tolC_H1_fw-576_bs	(220)	GAAATCTATAAAGATCTAATGAAAAAAGCCGCGATA				
GK617_tolC_H1_rv+41_bs(c)	(191)	GAAATCTATAAAGATCTAATGAAAAAAGCCGCGATA				
pHPKC12-2b_tolC_H1+2365rv_bs(c)	(125)	GAAATCTATAAAGATCTAATGAAAAAAGCCGCGATA				
pHPKC12-2b_tolC_H1+2178fw_bs2	(188)	GAAATCTANAAAGANCTAANGAAAAAAGCCGCGATA				
Consensus	(223)	GAAATCTATAAAGATCTAATGAAAAAAGCCGCGATA				
					Section 8	
	(260)	260	270	280	296	
GK617_tolC_H1_fw-576_bs	(257)	AAGTGTTTCTCGTGCAATAATTTCTACATCGTTTTTG				
GK617_tolC_H1_rv+41_bs(c)	(228)	AAGTGTTTCTCGTGCAATAATTTCTACATCGTTTTTG				
pHPKC12-2b_tolC_H1+2365rv_bs(c)	(162)	AAGTGTTTCTCGTGCAATAATTTCTACATCGTTTTTG				
pHPKC12-2b_tolC_H1+2178fw_bs2	(225)	AAGTGTTTCTCGTGCAATAATTTCTACATNCGTTTTTG				
Consensus	(260)	AAGTGTTTCTCGTGCAATAATTTCTACATCGTTTTTG				

Abbildung 3.8a: Sequenzanalyse für den homologen Bereich H1 in pHPKC12-02b (Abschnitt 1 bis 8)

		Section 9			
	(297)	297	310	320	333
GK617_tolC_H1_fw-576_bS (294)		CCAAATGTAACGGGCAGGTTGTCTGGCTTAAGCATTG			
GK617_tolC_H1_rv+41_bS (c) (265)		CCAAATGTAACGGGCAGGTTGTCTGGCTTAAGCATTG			
pHPKC12-2b_tolC_H1+2365rv_bS (c) (199)		CCAAATGTAACGGGCAGGTTGTCTGGCTTAAGCATTG			
pHPKC12-2b_tolC_H1+2178fw_bS2 (262)		CCAAATGTAACGGGCAGGTTGTCTGGCTTAAGCATTG			
Consensus (297)		CCAAATGTAACGGGCAGGTTGTCTGGCTTAAGCATTG			
		Section 10			
	(334)	334	340	350	370
GK617_tolC_H1_fw-576_bS (331)		TTAATGTCCTGGCACTAATAGTGAATTAAATGTGAAT			
GK617_tolC_H1_rv+41_bS (c) (302)		TTAATGTCCTGGCACTAATAGTGAATTAAATGTGAAT			
pHPKC12-2b_tolC_H1+2365rv_bS (c) (236)		TTAATGTCCTGGCACTAATAGTGAATTAAATGTGAAT			
pHPKC12-2b_tolC_H1+2178fw_bS2 (299)		TTAATGTCCTGGCACTAATAGTGAATTAAATGTGAAT			
Consensus (334)		TTAATGTCCTGGCACTAATAGTGAATTAAATGTGAAT			
		Section 11			
	(371)	371	380	390	407
GK617_tolC_H1_fw-576_bS (368)		TTCAGCGACGTTTGACTGCCGTTTGAGCAGTCATGTG			
GK617_tolC_H1_rv+41_bS (c) (339)		TTCAGCGACGTTTGACTGCCGTTTGAGCAGTCATGTG			
pHPKC12-2b_tolC_H1+2365rv_bS (c) (273)		TTCAGCGACGTTTGACTGCCGTTTGAGCAGTCATGTG			
pHPKC12-2b_tolC_H1+2178fw_bS2 (336)		TTCAGCGACGTTTGACTGCCGTTTGAGCAGTCATGTG			
Consensus (371)		TTCAGCGACGTTTGACTGCCGTTTGAGCAGTCATGTG			
		Section 12			
	(408)	408	420	430	444
GK617_tolC_H1_fw-576_bS (405)		TTAAATTGAGGCACATTAAACGCCCTATGGCACGTAAC			
GK617_tolC_H1_rv+41_bS (c) (376)		TTAAATTGAGGCACATTAAACGCCCTATGGCNCGTANC			
pHPKC12-2b_tolC_H1+2365rv_bS (c) (310)		TTAAATTGAGGCACATTAAACGCCCTATGGCACGTAAC			
pHPKC12-2b_tolC_H1+2178fw_bS2 (373)		TTAAATTGAGGCACATTAAACGCCCTATGGCACGTAAC			
Consensus (408)		TTAAATTGAGGCACATTAAACGCCCTATGGCACGTAAC			
		Section 13			
	(445)	445	450	460	481
GK617_tolC_H1_fw-576_bS (443)		CCAACCTTTTGCGGTAGCGGCTTCTGCTAGAAATCCGC			
GK617_tolC_H1_rv+41_bS (c) (414)		CCAACCTTTTGCGGTAGCGGCTTCTGCTAGANTCCGC			
pHPKC12-2b_tolC_H1+2365rv_bS (c) (348)		CCAACCTTTTGCGGTAGCGGCTTCTGCTAGANTCCGC			
pHPKC12-2b_tolC_H1+2178fw_bS2 (410)		CCAACCTTTTGCGGTAGCGGCTTCTGCTAGAAATCCGC			
Consensus (445)		CCAACCTTTTGCGGTAGCGGCTTCTGCTAGANTCCGC			
		Section 14			
	(482)	482	490	500	518
GK617_tolC_H1_fw-576_bS (480)		AAATAATTTTACAGTTTGATCGCGCTAAATACTGCTTC			
GK617_tolC_H1_rv+41_bS (c) (451)		ANTNATTTTACAGTTTNATCGCGCTAAATACTGCTTC			
pHPKC12-2b_tolC_H1+2365rv_bS (c) (385)		ANTAATTTTACAGTTTGATCGCGCTAAATACTGCTTC			
pHPKC12-2b_tolC_H1+2178fw_bS2 (447)		AAATAATTTTACAGTTTGATCGCGCTAAATACTGCTTC			
Consensus (482)		ANTAATTTTACAGTTTGATCGCGCTAAATACTGCTTC			
		Section 15			
	(519)	519	528		
GK617_tolC_H1_fw-576_bS (517)		ACCNCAAG--			
GK617_tolC_H1_rv+41_bS (c) (488)		ACCACAAGG-			
pHPKC12-2b_tolC_H1+2365rv_bS (c) (422)		ACCACAAGGA			
pHPKC12-2b_tolC_H1+2178fw_bS2 (484)		ACCACAAG--			
Consensus (519)		ACCACAAGG			

Abbildung 3.8b: Sequenzanalyse für den homologen Bereich H1 in pHPKC12-02b (Abschnitt 9 bis 15)

		Section 1			
	(1)	1	10	20	39
GK617_tolC_H2_rv+1972_bS(c)	(1)	-----			
GK617_tolC_H2_fw+1297_bS	(1)	TTTCNCTAATCCGGAAAACGTNGCACCCGCAAACGCCGG			
pHPKC12-2b_tolC_H2+7584w_bS	(1)	-----			
pHPKC12-2b_tolC_H2+88rv_bS(c)	(1)	-----			
Consensus	(1)				
		Section 2			
	(40)	40	50	60	78
GK617_tolC_H2_rv+1972_bS(c)	(1)	-----			
GK617_tolC_H2_fw+1297_bS	(40)	AACAGAATGCTATNTGCTGATGGTTATGCGCCTGATAGC			
pHPKC12-2b_tolC_H2+7584w_bS	(1)	-----AAAGCGCTCTG			
pHPKC12-2b_tolC_H2+88rv_bS(c)	(1)	-----			
Consensus	(40)				
		Section 3			
	(79)	79	90	100	117
GK617_tolC_H2_rv+1972_bS(c)	(1)	-----GTTT-AGCAAAATATCCGCA-CGCANTA			
GK617_tolC_H2_fw+1297_bS	(79)	CCGGCACCAGTTCGTTT-AGCAAAATATCCGCA-CGCACATA			
pHPKC12-2b_tolC_H2+7584w_bS	(12)	AAGTTTCCTATACCTTCTAGAGAAATAGGAACCTTCGGAATA			
pHPKC12-2b_tolC_H2+88rv_bS(c)	(1)	-----ACTTTCTAGAGAAATAGGAACCTTCGGAATA			
Consensus	(79)	G	C	A	ACTTTCTAGCGAATATGCGCTTCGGAATA
		Section 4			
	(118)	118	130	140	156
GK617_tolC_H2_rv+1972_bS(c)	(26)	CCACC--AGTA--ACGGTCATAACCTT--TTCCGTAAC			
GK617_tolC_H2_fw+1297_bS	(116)	CCACC--AGTA--ACGGTCATAACCTT--TTCCGTAAC			
pHPKC12-2b_tolC_H2+7584w_bS	(51)	GGAACTAAGGAGGATATTCATATCTCGAGTTCCGTAAC			
pHPKC12-2b_tolC_H2+88rv_bS(c)	(30)	GGAACTAAGGAGGATATTCATATCTCGAGTTCCGTAAC			
Consensus	(118)	GGACCTAAGTAGGATGTTTCATATCTCTAGTTCCGTAAC			
		Section 5			
	(157)	157	170	180	195
GK617_tolC_H2_rv+1972_bS(c)	(59)	GATGACGACGACGGGGCTTCGGCCCCGTCTGAACGTAAG			
GK617_tolC_H2_fw+1297_bS	(149)	GATGACGACGACGGGGCTTCGGCCCCGTCTGAACGTAAG			
pHPKC12-2b_tolC_H2+7584w_bS	(90)	GATGACGACGACGGGGCTTCGGCCCCGTCTGAACGTAAG			
pHPKC12-2b_tolC_H2+88rv_bS(c)	(69)	GATGACGACGACGGGGCTTCGGCCCCGTCTGAACGTAAG			
Consensus	(157)	GATGACGACGACGGGGCTTCGGCCCCGTCTGAACGTAAG			
		Section 6			
	(196)	196	210	220	234
GK617_tolC_H2_rv+1972_bS(c)	(98)	GCAACGTAAAGATACGGGTATCTGCCGCATTNTTCCCC			
GK617_tolC_H2_fw+1297_bS	(188)	GCAACGTAAAGATACGGGTATCTGCCGCATTCTTCCCC			
pHPKC12-2b_tolC_H2+7584w_bS	(129)	GCAACGTAAAGATACGGGTATCTGCCGCATTCTTCCCC			
pHPKC12-2b_tolC_H2+88rv_bS(c)	(108)	GCAACGTAAAGATACGGGTATCTGCCGCATTCTTCCCC			
Consensus	(196)	GCAACGTAAAGATACGGGTATCTGCCGCATTCTTCCCC			
		Section 7			
	(235)	235	240	250	273
GK617_tolC_H2_rv+1972_bS(c)	(137)	CTTCTCGCTTCAATTTTCGACCAGCCATCCTCTATTCTGA			
GK617_tolC_H2_fw+1297_bS	(227)	CTTCTCGCTTCAATTTTCGACCAGCCATCCTCTATTCTGA			
pHPKC12-2b_tolC_H2+7584w_bS	(168)	CTTCTCGCTTCAATTTTCGACCAGCCATCCTCTATTCTGA			
pHPKC12-2b_tolC_H2+88rv_bS(c)	(147)	CTTCTCGCTTCAATTTTCGACCAGCCATCCTCTATTCTGA			
Consensus	(235)	CTTCTCGCTTCAATTTTCGACCAGCCATCCTCTATTCTGA			
		Section 8			
	(274)	274	280	290	312
GK617_tolC_H2_rv+1972_bS(c)	(176)	TGGGTATTTACCACTGGTCCCGGAAGACAAAAATGAAAC			
GK617_tolC_H2_fw+1297_bS	(266)	TGGGTATTTACCACTGGTCCCGGAAGACAAAAATGAAAC			
pHPKC12-2b_tolC_H2+7584w_bS	(207)	TGGGTATTTACCACTGGTCCCGGAAGACAAAAATGAAAC			
pHPKC12-2b_tolC_H2+88rv_bS(c)	(186)	TGGGTATTTACCACTGGTCCCGGAAGACAAAAATGAAAC			
Consensus	(274)	TGGGTATTTACCACTGGTCCCGGAAGACAAAAATGAAAC			

Abbildung 3.9a: Ergebnis der Sequenzanalyse für den homologen Bereich H2 von pHPKC12-02b (Abschnitt 1 bis 8)

Section 9					
	(313)	313	320	330	340 351
GK617_tolC_H2_rv+1972_bS(c) (215)		GGACAAAATCCATACGCCACGCATCGTTCCGCAAAAAC			
GK617_tolC_H2_fw+1297_bS (305)		GGACAAAATCCATACGCCACGCATCGTTCCGCAAAAAC			
pHPKC12-2b_tolC_H2+7584w_bS (246)		GGACAAAATCCATACGCCACGCATCGTTCCGCAAAAAC			
pHPKC12-2b_tolC_H2+88rv_bS(c) (225)		GGACAAAATCCATACGCCACGCATCGTTCCGCAAAAAC			
Consensus (313)		GGACAAAATCCATACGCCACGCATCGTTCCGCAAAAAC			
Section 10					
	(352)	352	360	370	380 390
GK617_tolC_H2_rv+1972_bS(c) (254)		GGAGCGCAGCCATCTGACACCAGTCGCTCTCGCGGTTG			
GK617_tolC_H2_fw+1297_bS (344)		GGAGCGCAGCCATCTGACACCAGTCGCTCTCGCGGTTG			
pHPKC12-2b_tolC_H2+7584w_bS (285)		GGAGCGCAGCCATCTGACACCAGTCGCTCTCGCGGTTG			
pHPKC12-2b_tolC_H2+88rv_bS(c) (264)		GGAGCGCAGCCATCTGACACCAGTCGCTCTCGCGGTTG			
Consensus (352)		GGAGCGCAGCCATCTGACACCAGTCGCTCTCGCGGTTG			
Section 11					
	(391)	391	400	410	429
GK617_tolC_H2_rv+1972_bS(c) (293)		CCACTGTTTTTATGCTGGCTGGCTGTGAAAAGAGTGATG			
GK617_tolC_H2_fw+1297_bS (383)		CCACTGTTTTTATGCTGGCTGGCTGTGAAAAGAGTGATG			
pHPKC12-2b_tolC_H2+7584w_bS (324)		CCACTGTTTTTATGCTGGCTGGCTGTGAAAAGAGTGATG			
pHPKC12-2b_tolC_H2+88rv_bS(c) (303)		CCACTGTTTTTATGCTGGCTGGCTGTGAAAAGAGTGATG			
Consensus (391)		CCACTGTTTTTATGCTGGCTGGCTGTGAAAAGAGTGATG			
Section 12					
	(430)	430	440	450	468
GK617_tolC_H2_rv+1972_bS(c) (332)		AAACAGTGTCTCTCTATCAAAATGCTGACGACTGTTTCAG			
GK617_tolC_H2_fw+1297_bS (422)		AAACAGTGTCTCTCTATCAAAATGCTGACGACTGTTTCAG			
pHPKC12-2b_tolC_H2+7584w_bS (363)		AAACAGTGTCTCTCTATCAAAATGCTGACGACTGTTTCAG			
pHPKC12-2b_tolC_H2+88rv_bS(c) (342)		AAACAGTGTCTCTCTATCAAAATGCTGACGACTGTTTCAG			
Consensus (430)		AAACAGTGTCTCTCTATCAAAATGCTGACGACTGTTTCAG			
Section 13					
	(469)	469	480	490	507
GK617_tolC_H2_rv+1972_bS(c) (371)		CTGCAAACCCAGGCAAAAGCGCCGAATGTACCACCGCGT			
GK617_tolC_H2_fw+1297_bS (461)		CTGCAAACCCAGGCAAAAGCGCCGAATGTACCACCGCGT			
pHPKC12-2b_tolC_H2+7584w_bS (402)		CTGCAAACCCAGGCAAAAGCGCCGAATGTACCACCGCGT			
pHPKC12-2b_tolC_H2+88rv_bS(c) (381)		CTGCAAACCCAGGCAAAAGCGCCGAATGTACCACCGCGT			
Consensus (469)		CTGCAAACCCAGGCAAAAGCGCCGAATGTACCACCGCGT			
Section 14					
	(508)	508	520	530	546
GK617_tolC_H2_rv+1972_bS(c) (410)		ACAACAATGCGCTGAAAGAAGCCGAACGTACTGCGCCGA			
GK617_tolC_H2_fw+1297_bS (500)		ACAACAATGCGCTGAAAGAAGCCGAACGTACTGCGCCGA			
pHPKC12-2b_tolC_H2+7584w_bS (441)		ACAACAATGCGCTGAAAGAAGCCGAACGTACTGCGCCGA			
pHPKC12-2b_tolC_H2+88rv_bS(c) (420)		ACAACAATGCGCTGAAAGAAGCCGAACGTACTGCGCCGA			
Consensus (508)		ACAACAATGCGCTGAAAGAAGCCGAACGTACTGCGCCGA			
Section 15					
	(547)	547	560	570	585
GK617_tolC_H2_rv+1972_bS(c) (449)		NATNACGCCACCCGTGAAGACTGTGTTGCTGAATTTGGT			
GK617_tolC_H2_fw+1297_bS (510)		-----			
pHPKC12-2b_tolC_H2+7584w_bS (480)		AATA-CNCCNCCCGTGAANACTGTGTTGCTGAAGTCGAC			
pHPKC12-2b_tolC_H2+88rv_bS(c) (459)		AATA-CGCCACCCGTGAAGACTGTGTTGCTGAAGTCGAC			
Consensus (547)		AATA CGCCACCCGTGAAGACTGTGTTGCTGAAGTCGAC			
Section 16					
	(586)	586	600	610	624
GK617_tolC_H2_rv+1972_bS(c) (488)		GAGGTCAGTGCAGCAGGCACCAGCCAGGCTGGCATG			
GK617_tolC_H2_fw+1297_bS (510)		-----			
pHPKC12-2b_tolC_H2+7584w_bS (518)		TAGTAGGGATNACNCGGTAATGAGCTTGGCNCTGGCCGT			
pHPKC12-2b_tolC_H2+88rv_bS(c) (497)		TAGTAGGGATAACAGGGTAATGAGCTTGGCATCTGGCCGT			
Consensus (586)		TAGTAGGGAT ACAGGGTAATGAGCTTGGC CTGGCCGT			
Section 17					
	(625)	625	630	640	650
GK617_tolC_H2_rv+1972_bS(c) (527)		GCACCA-----			
GK617_tolC_H2_fw+1297_bS (510)		-----			
pHPKC12-2b_tolC_H2+7584w_bS (557)		CGTTTT-----			
pHPKC12-2b_tolC_H2+88rv_bS(c) (536)		CGTTTTACAACGTCGTGACNNGGAAA			
Consensus (625)		CGTTTT			

Abbildung 3.9b: Ergebnis der Sequenzanalyse für den homologen Bereich H2 von pHPKC12-02b (Abschnitt 9 bis 17)

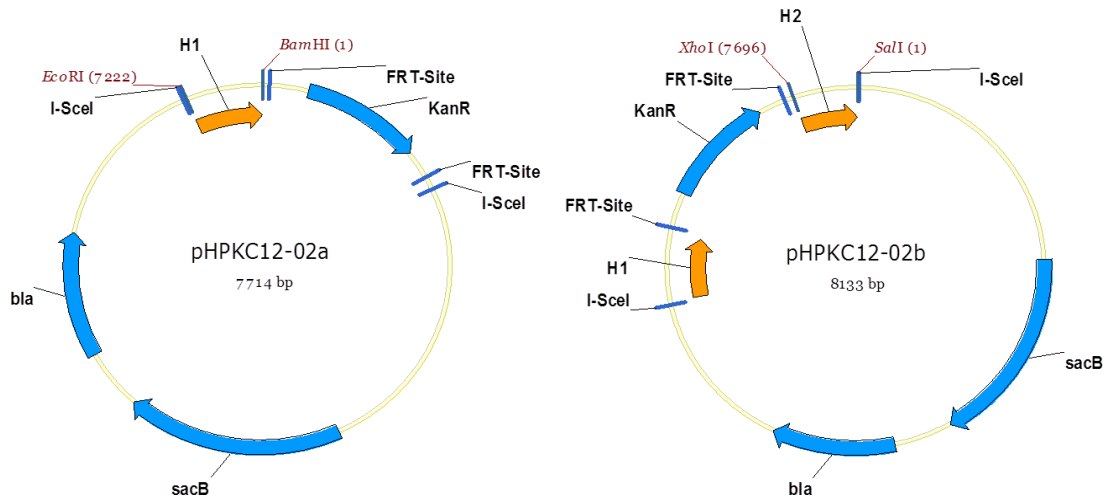


Abbildung 3.10: Plasmidkarten des Donorplasmides pHPKC12-02b und dessen Vorkonstruktion pHPKC12-02a; H1 = homologer Bereich in 5'-Richtung zu *toIC*; H2 = homologer Bereich in 3'-Richtung zu *toIC*; I-SceI = Schnittstelle der Meganuklease; FRT-Site = Erkennungssequenz der FLP-Rekombinase; *sacB* = kodiert für die Levansucrase; Kan^R = Kanamycinresistenz; *bla* = β -Laktamresistenz

3.1.1.3.3 Gezielte Einführung einer chromosomalen *toIC*-Deletion mittels Rekombination

E. coli C600 wurde mit dem Plasmid pACBSCE (Clm^R, *gam*, *exo*, *bet*), welches die Gene des Phagen λ für die Rekombination trägt sowie mit dem Donorplasmid pHPKC12-02b transformiert und die Transformanten auf Ampicillin-Chloramphenicol-Kanamycin-Agarplatten (LB_{ACK}) selektiert. Da die Expression der Levansucrase im Vorversuch zu keiner ausreichenden Selektion geführt hatte (Kapitel 3.1.1.3.1), wurden drei Transformanten hinsichtlich ihrer Saccharoseempfindlichkeit über die Bestimmung der Keimzahl als KBE/ml untersucht. Hierbei wiesen alle drei unter Saccharosezusatz im Vergleich zum Wachstum ohne Saccharose eine um den Faktor 10⁴ verringerte Keimzahl auf. Die Rekombination wurde bei einem Transformanten durch Arabinose induziert und 46 potentielle Rekombinante (R2 – R47) auf LB-Agarplatten unter Zusatz von Kanamycin [50 μ g/ml] und 5 % Saccharose (LB_{K5}) selektiert. Über Replikaplattierung erfolgte die weitere Selektion, wobei der Ausgangsstamm *E. coli* C600 als Kontrolle mitgeführt wurde. Die Rekombinanten sowie *E. coli* C600 wurden auf folgende Agarplatten übertragen: LB als Wachstumskontrolle, LB_{K5} zur Selektion der Rekombinanten mit einer Kanamycinresistenz und Unempfindlichkeit gegenüber Saccharose, Chloramphenicol-Agarplatten (LB_C) zur Überprüfung des Verlustes von Plasmid pACBSCE, Ampicillin-Agarplatten (LB_A) zur Überprüfung des Verlustes von Plasmid pHPKC12-02b und LB-Agarplatten mit Novobiocin-Konzentrationen von 16 μ g/ml (LB_{N16}), 32 μ g/ml (LB_{N32}) und 64 μ g/ml (LB_{N64}) zur Selektion von Mutanten in *toIC*, die aufgrund eines Funktionsverlustes des Proteins (Kapitel 3.1.1.1.1) eine höhere Empfindlichkeit aufweisen sollten. Mittels MHK-Bestimmung war die Empfindlichkeit von *E. coli* C600 für Novobiocin mit 64 μ g/ml ermittelt worden, sodass bei den niedrigeren Novobiocin-Konzentrationen für *toIC*-negative Rekombinanten kein Wachstum zu erwarten war. Nach erfolgter Arabinoseinduktion und Zerstörung der Plasmide

pACBSCE und pHPKC12-02b durch die Meganuklease, war für die gesuchte ΔtoI -Mutante nur ein Wachstum auf LB und LB_{KS} zu erwarten. Das Ergebnis der Replikaplattierung ist in Tabelle 3.2 dargestellt.

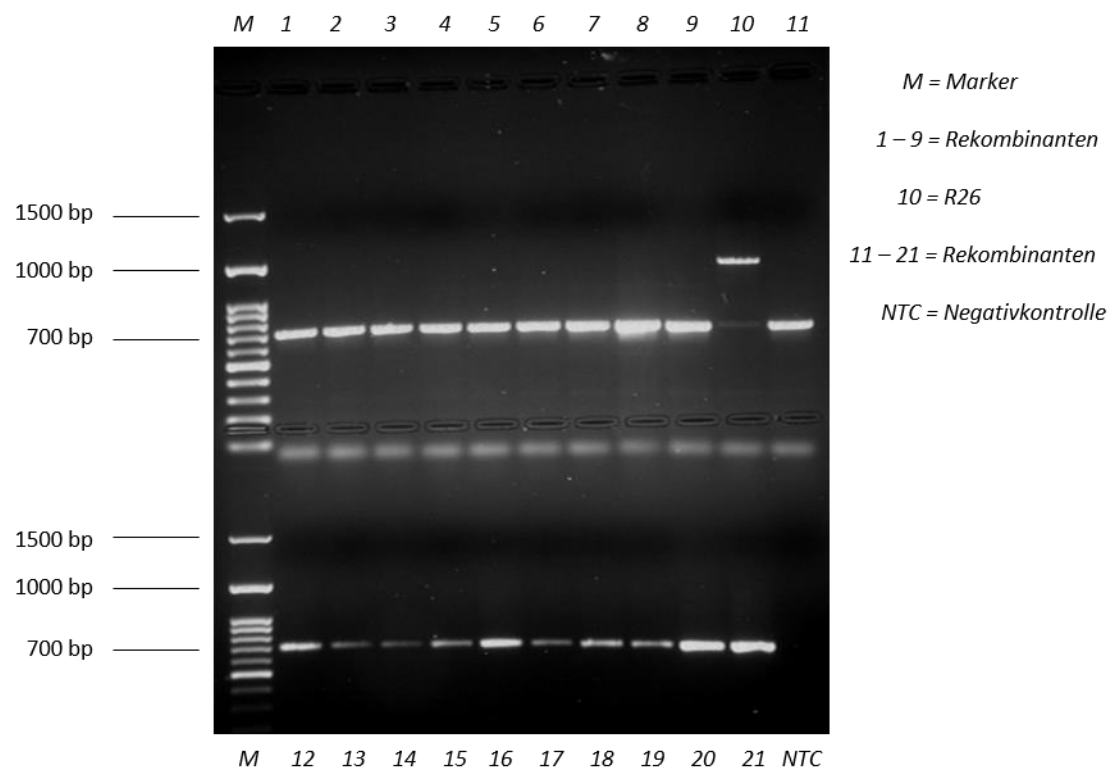
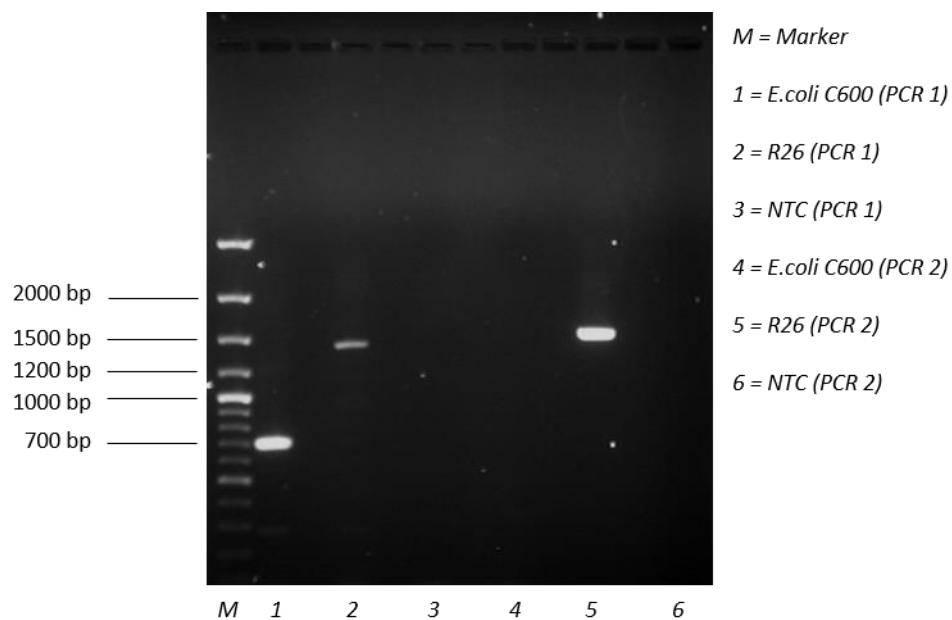
Tabelle 3.2: Ergebnis der Replikaplattierung selektierter Rekombinanten nach Arabinoseinduktion

Rekombinante	LB	LB_{KS}	LB_C	LB_A	LB_{N64}	LB_{N32}	LB_{N16}
<i>E. coli</i> C600	+++	-	-	-	++	+++	+++
R2	+++	+++	-	-	-	(+)	+
R3	+++	+++	-	-	-	(+)	+
R4	+++	+	-	-	-	-	-
R5	+++	+++	-	-	-	(+)	+
R6	+++	+++	-	+++	-	-	-
R7	+++	+++	+++	-	-	(+)	+
R8	+++	+++	-	-	-	(+)	+
R9	+++	+++	-	-	-	(+)	+
R10	+++	+++	-	+++	-	(+)	+
R11	+++	+++	-	+++	-	(+)	+
R12	+++	+++	-	+++	-	(+)	+
R13	+++	+++	-	+++	-	(+)	+
R14	+++	+++	-	-	-	(+)	+
R15	+++	+	-	-	-	-	-
R16	+++	+	-	-	-	-	-
R17	+++	+	-	-	-	-	-
R18	+++	+	-	-	-	-	-
R19	+++	+	-	-	-	-	-
R20	+++	+	-	-	-	-	-
R21	+++	+	-	-	-	-	-
R22	+++	+++	-	-	-	(+)	+
R23	+++	+	-	-	-	-	-
R24	+++	+++	+++	-	-	(+)	+
R25	+++	+++	-	-	-	(+)	+
R26	+++	+++	-	-	-	-	-
R27	+++	+++	-	-	-	(+)	+
R28	+++	+++	-	-	-	(+)	+
R29	+++	+	-	-	-	-	-
R30	+++	+++	-	+++	-	(+)	+
R31	+++	+++	-	+++	-	(+)	+
R32	+++	+++	-	-	-	(+)	+
R33	+++	+++	-	+++	-	(+)	+
R34	+++	+++	+++	-	-	(+)	+
R35	+++	+++	-	+++	-	(+)	+

R36	+++	+	-	-	-	-	-
R37	+++	+++	-	-	-	(+)	+
R38	+++	+++	-	-	-	(+)	+
R39	+++	+++	++	-	-	(+)	+
R40	+++	+++	-	-	-	(+)	+
R41	+++	+++	-	-	-	(+)	+
R42	+++	+++	-	-	-	(+)	+
R43	+++	+++	-	+++	-	(+)	+
R44	+++	+++	-	-	-	(+)	+
R45	+++	+++	-	-	-	(+)	+
R46	+++	+++	-	+++	-	-	-
R47	+++	+	-	-	-	-	-

Legende: +++ starkes Wachstum, ++ mittleres Wachstum, + schwaches Wachstum, (+) sehr schwaches Wachstum, - kein Wachstum; LB = LB-Agarplatten, LB_A = Ampicillin-Agarplatten [100 µg/ml], LB_C = Chloramphenicol-Agarplatten [35 µg/ml], LB_{K5} = Kanamycin-Agarplatten [50 µg/ml] mit 5 % Saccharosezusatz, LB_{N64} = Novobiocin-Agarplatten [64 µg/ml], LB_{N32} = Novobiocin-Agarplatten [32 µg/ml], LB_{N16} = Novobiocin-Agarplatten [16 µg/ml]

Von den untersuchten Rekombinanten entsprach nur die Rekombinante R26 dem erwarteten Wachstumsprofil der *ΔtolC*-Mutante. R26 zeigte ein starkes Wachstum auf LB und LB_{K5} sowie kein Wachstum auf LB_A, LB_C und LB_{N16-64}. Die Kanamycinresistenz lag somit nicht mehr auf dem Plasmid sondern chromosomal vor. Zur Überprüfung der Selektion über Antibiotikaplatten wurde zusätzlich ein Screening mittels PCR durchgeführt. Hierbei wurden die Rekombinante R26 und *E. coli* C600 sowie solche Rekombinanten untersucht, die sowohl beide Plasmide verloren hatten als auch eine erhöhte Empfindlichkeit gegenüber Novobiocin und ein deutliches Wachstum auf LB_{K5} zeigten (R2, R3, R5, R8, R9, R14, R22, R24, R25, R27, R28, R32, R37, R38, R40, R41, R42, R44, R45). Die PCR wurde mit den zwei Forward-Primern *tolC_E.coli_fw_+1297* und *pDK4Kanares_[K2]_5_+162_pKD4* sowie dem Reverse-Primer *tolC_E.coli_rv_+1972* durchgeführt (PCR 1). Der Forward-Primer *tolC_E.coli_fw_+1297* bindet in dem Gen *tolC*, sodass bei Anwesenheit von *tolC* mit dem Reverse-Primer ein PCR-Produkt von 697 bp amplifiziert wird. Bei vorhandener Deletion von *tolC* bindet der Forward-Primer *pDK4Kanares_[K2]_5_+162_pKD4* in der inserierten Kanamycinresistenz und ein größeres Produkt von 1419 bp wird amplifiziert. Das größere Fragment wurde nur mit Kochlysate-DNA der Rekombinante R26 erhalten und bestätigte damit die Ergebnisse der Selektion durch die Antibiotika (Abb. 3.11). Aufgrund einer Verunreinigung in der NTC, welche allerdings nur bei starker Überbelichtung erkennbar ist und der ebenfalls bei R26 erhaltenen Bande für das kleinere Fragment, wurde die PCR 1 für R26 und im Vergleich zu *E. coli* C600 nach Austausch der Reagenzien wiederholt (Abb. 3.12). Zusätzlich wurde mit den Primern *tolC_E.coli_fw_-576* und *pDK4Kanres_[Kt]_3'_+632_pKD4* eine weitere PCR durchgeführt, die aufgrund der Bindungsstelle des Reverse-Primers in dem Kanamycinresistenzgen nur für R26 ein Produkt von 1507 bp ergeben sollte (PCR 2).

Abbildung 3.11: Elektropherogramm von potentiellen Rekombinanten mit $\Delta tolC$ -Mutation (PCR 1)Abbildung 3.12: Elektropherogramm von R26 und *E. coli* C600 von der PCR 1 als Wiederholung und von PCR 2

Um in einem weiteren Schritt das Kanamycinresistenzgen aus R26 zu entfernen, wurde der Stamm mit dem Plasmid pCP20 (Amp^R, Clm^R, *flp*) transformiert und die Transformanten auf LB_A selektiert. Das Plasmid pCP20 trägt neben den Resistenzgenen für Ampicillin und Chloramphenicol das Gen für die FLP-Rekombinase (*flp*), ein Enzym, welches durch sequenzspezifische Rekombination über die FRT-Sequenzen das Entfernen der Kanamycinresistenz vermittelt (Cherepanov & Wackernagel, 1995). Nach erfolgter Induktion der FLP-Rekombinase bei 42 °C wurden 46 erhaltene Rekombinanten (R*) sowie die Rekombinante R26 als Ausgangsstamm zur Kontrolle mittels Replikaplattierung auf LB-Agarplatten, Kanamycin-Agarplatten [50 µg/ml] (LB_K) und auf LB_A übertragen und bei 37 °C über Nacht inkubiert. Das Ergebnis der Replikaplattierung zeigte, dass alle 46 Rekombinanten die Fähigkeit zum Wachstum auf LB_K und LB_A verloren hatten und somit das Entfernen der Kanamycinresistenz sowie der Verlust von pCP20 erfolgreich waren. Von diesen Rekombinanten wurden R*7, R*8 und R*9 zusätzlich mittels PCR auf den Verlust der Kanamycinresistenz überprüft (Abb. 3.13). Hierfür wurden die Primer *tolC_E.coli_fw_-576* und *tolC_E.coli_rv_+1972* verwendet, die 3' und 5' zu den homologen Bereichen im Chromosom binden. Beim Ausgangsstamm *E. coli* C600 bzw. bei R26 wurden Fragmente von 2455 bp (R26) und 2569 bp (*E. coli* C600) amplifiziert, die die Kanamycinresistenz (R26) bzw. das Gen *tolC* (*E. coli* C600) beinhalten. Das bei den Rekombinanten R*7, R*8 und R*9 amplifizierte PCR-Produkt umfasste aufgrund der Deletion von *tolC* und dem erfolgreichen Entfernen der Kanamycinresistenzkassette eine Größe von etwa 1200 bp und entsprach somit den Erwartungen.

Die Rekombinante R*7 wurde für das weitere Arbeiten ausgewählt und wird im Folgenden als $\Delta tolC$ -Mutante *E. coli* R7 bezeichnet.

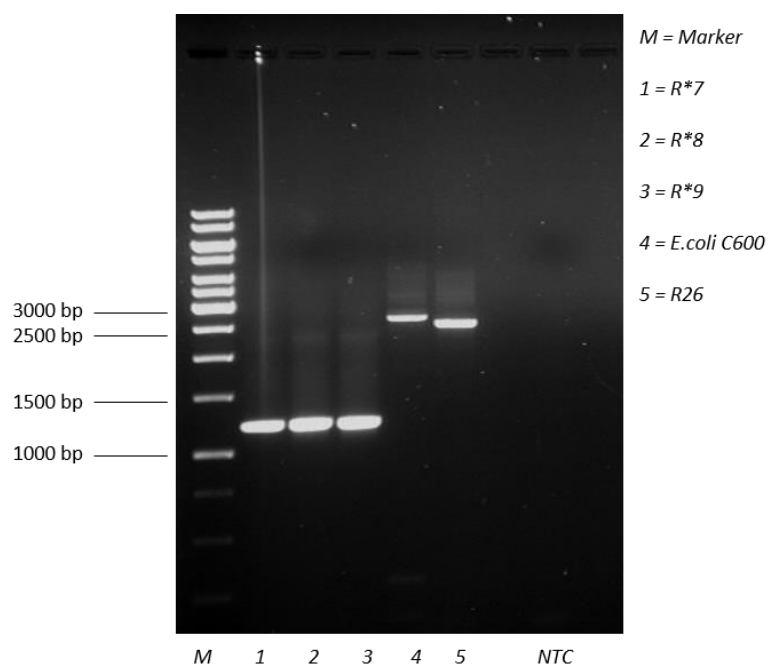


Abbildung 3.13: Überprüfung der *tolC*-negativen Rekombinanten auf den Verlust der Kanamycinresistenz

3.1.1.3.4 Genetische Überprüfung der $\Delta tolC$ -Mutante *E. coli* R7

Zur genetischen Überprüfung von *E. coli* R7 wurden die Übergänge sowie der zwischen H1 und H2 liegende Bereich sequenziert. Hierfür wurden die Primer *tolC_E.coli_fw_-576*, *tolC_E.coli_rv_+1972* und *del_tolC_E.coli_rv_+66H2* verwendet. Die Sequenzierung ergab, dass keine Mutationen durch die Rekombination in den untersuchten Bereichen erzeugt wurden. Der Bereich zwischen den homologen Sequenzen umfasste eine Narbensequenz, welche aus einem aus pHPKC12-02b nicht kodierenden Bereich sowie einer der FRT-Erkennungssequenzen bestand. Mit Ausnahme von 12 bp, die durch den homologen Bereich H2 erhalten blieben, wurde *tolC* vollständig deletiert. Die Elektropherogramme der Originalsequenzen für den intergenetischen Bereich von *nudF* und *ygiB* sind dem Anhang zu entnehmen (Kapitel 8.1).

		Section 1			
	(1)	1	10	20	39
R7 Bereich um <i>tolC</i>	(1)	CTTCGCGACGGGCAACATCTTCCACACTTTCACCCTCTT			
C600 Delta <i>tolC_fw_-576_bS</i>	(1)	-----AACATCTTCCACACTTTCACCCTCTT			
<i>tolC_rv_+66H2_01.08.13_bS2</i> (c)	(1)	-----			
<i>tolC_rv_+66H2_bS</i> (c)	(1)	-----			
C600 Delta <i>tolC_rv_+1972</i> (c)_bS	(1)	-----			
Consensus	(1)				
		Section 2			
	(40)	40	50	60	78
R7 Bereich um <i>tolC</i>	(40)	CAATCATCCCGGCAACCATCTCCAGTAGCCAAGGGGTTT			
C600 Delta <i>tolC_fw_-576_bS</i>	(27)	CAATCATCCCGGCAACCATCTCCAGTAGCCAAGGGGTTT			
<i>tolC_rv_+66H2_01.08.13_bS2</i> (c)	(1)	-----			
<i>tolC_rv_+66H2_bS</i> (c)	(1)	-----			
C600 Delta <i>tolC_rv_+1972</i> (c)_bS	(1)	-----			
Consensus	(40)				
		Section 3			
	(79)	79	90	100	117
R7 Bereich um <i>tolC</i>	(79)	CGCTGGTGTCGTACGCGGCAATCCGAATCTGCTCAATCA			
C600 Delta <i>tolC_fw_-576_bS</i>	(66)	CGCTGGTGTTNNTACGCGGCAATCCGAATCTGCTCAATCA			
<i>tolC_rv_+66H2_01.08.13_bS2</i> (c)	(1)	-----			
<i>tolC_rv_+66H2_bS</i> (c)	(1)	-----			
C600 Delta <i>tolC_rv_+1972</i> (c)_bS	(1)	-----			
Consensus	(79)				
		Section 4			
	(118)	118	130	140	156
R7 Bereich um <i>tolC</i>	(118)	GCACAACTTCATCACGCACTGGGTCAAAGGGTAGCAAGA			
C600 Delta <i>tolC_fw_-576_bS</i>	(105)	GCACAACTTCATCACGCACTGGGTCAAAGGGTAGCAAGA			
<i>tolC_rv_+66H2_01.08.13_bS2</i> (c)	(1)	-----			
<i>tolC_rv_+66H2_bS</i> (c)	(1)	-----			
C600 Delta <i>tolC_rv_+1972</i> (c)_bS	(1)	-----			
Consensus	(118)				

Abbildung 3.14a: Alignment der Sequenzanalyse für *E. coli* R7 im Bereich um die *tolC*-Deletion (Abschnitt 1 bis 4)

		Section 5			
	(157)	157	170	180	195
R7 Bereich um tolC	(157)	CTGCGGCGTGACCGCGCTCAAAAATTTCCCGC			
C600 Delta tolC-fw_-576_bs	(144)	CTGCGGCGTGACCGCGCTCAAAAATTTCCCGC			
tolC_rv_+66H2_01.08.13_bs2 (c)	(1)	-----			
tolC_rv_+66H2_bs (c)	(1)	-----			
C600 Delta tolC-rv_+1972 (c)_bs	(1)	-----			
Consensus	(157)	CGCACCT			
		Section 6			
	(196)	196	210	220	234
R7 Bereich um tolC	(196)	CATGACTCATTGCGCCGTTGAATAGACGATGACGAAATC			
C600 Delta tolC-fw_-576_bs	(183)	CATGACTCATTGCGCCGTTGAATAGACGATGACGAAATC			
tolC_rv_+66H2_01.08.13_bs2 (c)	(8)	CATGACTCATTGCGCCGTTGAATAGACGATGACGAAATC			
tolC_rv_+66H2_bs (c)	(1)	-----			
C600 Delta tolC-rv_+1972 (c)_bs	(1)	-----			
Consensus	(196)	CATGACTCATTGCGCCGTTGAATAGACGATGACGAAATC			
		Section 7			
	(235)	235	240	250	273
R7 Bereich um tolC	(235)	TATAAAGATCTAATGAAAAAAGCCGCGATAAAGTGTTT			
C600 Delta tolC-fw_-576_bs	(222)	TATAAAGATCTAATGAAAAAAGCCGCGATAAAGTGTTT			
tolC_rv_+66H2_01.08.13_bs2 (c)	(47)	TATAAAGATNTAATGAAAAAAGCCGCGATAAAGTGTTT			
tolC_rv_+66H2_bs (c)	(1)	-----			
C600 Delta tolC-rv_+1972 (c)_bs	(1)	-----			
Consensus	(235)	TATAAAGAT TAATGAAAAAAGCCGCGATAAAGTGTTT			
		Section 8			
	(274)	274	280	290	312
R7 Bereich um tolC	(274)	CTCGTGCAATAATTTCTACATCGTTTTTGCCAAATGTAA			
C600 Delta tolC-fw_-576_bs	(261)	CTCGTGCAATAATTTCTACATCGTTTTTGCCAAATGTAA			
tolC_rv_+66H2_01.08.13_bs2 (c)	(86)	CTCGTGCAATAATTTCTACATCGTTTTTGCCAAATGTAA			
tolC_rv_+66H2_bs (c)	(1)	-----			
C600 Delta tolC-rv_+1972 (c)_bs	(1)	-----			
Consensus	(274)	CTCGTGCAATAATTTCTACATCGTTTTTGCCAAATGTAA			
		Section 9			
	(313)	313	320	330	351
R7 Bereich um tolC	(313)	CGGGCAGGTTGTCTGGCTTAAGCATTGTTAATGTCCTGG			
C600 Delta tolC-fw_-576_bs	(300)	CGGGCAGGTTGTCTGGCTTAAGCATTGTTAATGTCCTGG			
tolC_rv_+66H2_01.08.13_bs2 (c)	(125)	CGGGCAGGTTGTCTGGCTTAAGCATTGTTAATGTCCTGG			
tolC_rv_+66H2_bs (c)	(1)	-----			
C600 Delta tolC-rv_+1972 (c)_bs	(1)	-----			
Consensus	(313)	CGGGCAGGTTGTCTGGCTTAAGCATTGTTAATGTCCTGG			
		Section 10			
	(352)	352	360	370	390
R7 Bereich um tolC	(352)	CACTAATAGTGAATTAAATGTGAATTTTCAGCGACGTTTG			
C600 Delta tolC-fw_-576_bs	(339)	CACTAATAGTGAATTAAATGTGAATTTTCAGCGACGTTTG			
tolC_rv_+66H2_01.08.13_bs2 (c)	(164)	CACTAATAGTGAATTAAATGTGAATTTTCAGCGACGTTTG			
tolC_rv_+66H2_bs (c)	(1)	-----			
C600 Delta tolC-rv_+1972 (c)_bs	(1)	-----			
Consensus	(352)	CACTAATAGTGAATTAAATGTGAATTTTCAGCGACGTTTG			
		Section 11			
	(391)	391	400	410	429
R7 Bereich um tolC	(391)	ACTGCCGTTTGGAGCAGTCATGTGTTAAATTGAGGCACAT			
C600 Delta tolC-fw_-576_bs	(378)	ACTGCCGTTTGGAGCAGTCATGTGTTAAATTGAGGCACAT			
tolC_rv_+66H2_01.08.13_bs2 (c)	(203)	ACTGCCGTTTGGAGCAGTCATGTGTTAAATTGAGGCACAT			
tolC_rv_+66H2_bs (c)	(1)	-----			
C600 Delta tolC-rv_+1972 (c)_bs	(1)	-----			
Consensus	(391)	ACTGCCGTTTGGAGCAGTCATGTGTTAAATTGAGGCACAT			

Abbildung 3.14b: Alignment der Sequenzanalyse für *E. coli* R7 im Bereich um die *tolC*-Deletion (Abschnitt 5 bis 11)

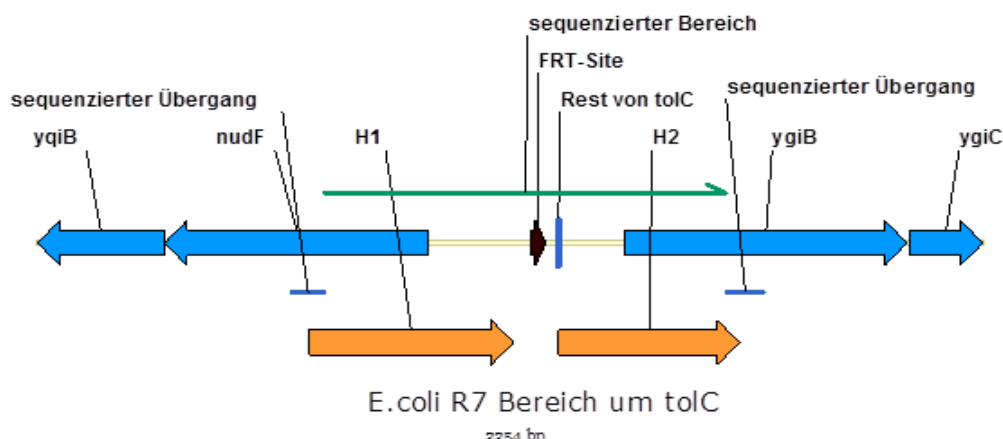
		Section 12			
	(430)	430	440	450	468
R7 Bereich um tolC	(430)	TAACGCCCTATGGCACGTAACGCCAACCTTTTGCGGTAG			
C600 Delta tolC-fw_-576_bs	(417)	TAACGCCCTATGGCACGTAACGCCAACCTTTTGCGGTAG			
tolC_rv_+66H2_01.08.13_bs2 (c)	(242)	TAACGCCCTATGGCACGTAACGCCAACCTTTTGCGGTAG			
tolC_rv_+66H2_bs (c)	(1)	-----			
C600 Delta tolC-rv_+1972 (c)_bs	(1)	-----			
Consensus	(430)	TAACGCCCTATGGCACGTAACGCCAACCTTTTGCGGTAG			
		Section 13			
	(469)	469	480	490	507
R7 Bereich um tolC	(469)	CGGCTTCTGCTAG AATCCGCAATAATTTTACAGTTTGAT			
C600 Delta tolC-fw_-576_bs	(456)	CGGCTTCTGCTANAATCCGCAATAATTTTACAGTTTGAT			
tolC_rv_+66H2_01.08.13_bs2 (c)	(281)	CGGCTTCTGCTAG AATCCGCAATAATTTTACAGTTTGAT			
tolC_rv_+66H2_bs (c)	(1)	-----			
C600 Delta tolC-rv_+1972 (c)_bs	(1)	-----			
Consensus	(469)	CGGCTTCTGCTA AATCCGCAATAATTTTACAGTTTGAT			
		Section 14			
	(508)	508	520	530	546
R7 Bereich um tolC	(508)	CGCGCTA AATACTGCTTCACCACAAGGAATGCGGATCCC			
C600 Delta tolC-fw_-576_bs	(495)	CGCNCTA -----			
tolC_rv_+66H2_01.08.13_bs2 (c)	(320)	CGCGCTA AATACTGCTTCACCACAAGGAATGCGGATCCC			
tolC_rv_+66H2_bs (c)	(1)	-----			
C600 Delta tolC-rv_+1972 (c)_bs	(1)	-----			
Consensus	(508)	CGC CTA			
		Section 15			
	(547)	547	560	570	585
R7 Bereich um tolC	(547)	GGGTACCTAGGACCGGTCAATTGGCTGGAGCTGCTTCGA			
C600 Delta tolC-fw_-576_bs	(502)	-----			
tolC_rv_+66H2_01.08.13_bs2 (c)	(359)	GGGTACCTAGGACCGGTCAATTGGCTGGAGCTGCTTCGA			
tolC_rv_+66H2_bs (c)	(1)	-----			
C600 Delta tolC-rv_+1972 (c)_bs	(1)	-----			
Consensus	(547)				
		Section 16			
	(586)	586	600	610	624
R7 Bereich um tolC	(586)	AG TTCCTATACTTTCTAGAGA TAGGAACT TC GGAATAG			
C600 Delta tolC-fw_-576_bs	(502)	-----			
tolC_rv_+66H2_01.08.13_bs2 (c)	(398)	AG TTCCTATACTTTCTAGAGAN TAGGAACT TC GGAATAG			
tolC_rv_+66H2_bs (c)	(1)	-- TTCCTATACTTTCTAGAGA TAGGAACTN - GGAATAG			
C600 Delta tolC-rv_+1972 (c)_bs	(1)	-----			
Consensus	(586)	TTCCTATACTTTCTAGAGA TAGGAACT GGAATAG			
		Section 17			
	(625)	625	630	640	663
R7 Bereich um tolC	(625)	GAACTAAGGAG GATATTCA - TATCTCGAGTTCGCTAACT			
C600 Delta tolC-fw_-576_bs	(502)	-----			
tolC_rv_+66H2_01.08.13_bs2 (c)	(437)	GAACTAAGGAG NATATTCA TATCTCGAGTTCGCTAACT			
tolC_rv_+66H2_bs (c)	(37)	GAACTAAGGAG GATATTCA - TATCTCGAGTTCGCTAACT			
C600 Delta tolC-rv_+1972 (c)_bs	(1)	----- ACT			
Consensus	(625)	GAACTAAGGAG ATATTCA TATCTCGAGTTCGCTAACT			
		Section 18			
	(664)	664	670	680	702
R7 Bereich um tolC	(663)	GATGACGACGACGGGGCTTCGGCCCCGTC TGAACGTAAG			
C600 Delta tolC-fw_-576_bs	(502)	-----			
tolC_rv_+66H2_01.08.13_bs2 (c)	(476)	GATGACGACGACGGGGCTTCGGCCCCGTC -----			
tolC_rv_+66H2_bs (c)	(75)	GATGACGACGACGGGGCTTCGG -----			
C600 Delta tolC-rv_+1972 (c)_bs	(4)	GATGACGACGACGGGGCTTCGGCCCCGTC TGAACGTAAG			
Consensus	(664)	GATGACGACGACGGGGCTTCGGCCCCGTC			

Abbildung 3.14c: Alignment der Sequenzanalyse für *E. coli* R7 im Bereich um die *tolC*-Deletion (Abschnitt 12 bis 18)

						Section 19
	(703)	703	710	720	730	741
R7 Bereich um tolC	(702)	GCAACGTAAAGATACGGGTTATCTGCCGCATTCTTCCCC				
C600 Delta tolC-fw_-576_bS	(502)	-----				
tolC_rv_+66H2_01.08.13_bS2 (c)	(505)	-----				
tolC_rv_+66H2_bS (c)	(97)	-----				
C600 Delta tolC-rv_+1972 (c)_bS	(43)	GCAACGTAAAGATACGGGTTATCTGCCGCATTCTTCCCC				
Consensus	(703)					
						Section 20
	(742)	742	750	760	770	780
R7 Bereich um tolC	(741)	CTTCTCGCTTCAATTTTCGACCAGCCATCCTCTATTCTGA				
C600 Delta tolC-fw_-576_bS	(502)	-----				
tolC_rv_+66H2_01.08.13_bS2 (c)	(505)	-----				
tolC_rv_+66H2_bS (c)	(97)	-----				
C600 Delta tolC-rv_+1972 (c)_bS	(82)	CTTCTCGCTTCAATTTTCGACCAGCCATCCTCTATTCTGA				
Consensus	(742)					
						Section 21
	(781)	781	790	800		819
R7 Bereich um tolC	(780)	TGGGTATTTACCACTGGTCCCGGAAGACAAAAATGAAAC				
C600 Delta tolC-fw_-576_bS	(502)	-----				
tolC_rv_+66H2_01.08.13_bS2 (c)	(505)	-----				
tolC_rv_+66H2_bS (c)	(97)	-----				
C600 Delta tolC-rv_+1972 (c)_bS	(121)	TGGGTATTTACCACTGGTCCCGGAAGACAAAAATGAAAC				
Consensus	(781)					
						Section 22
	(820)	820	830	840		858
R7 Bereich um tolC	(819)	GGACAAAATCCATACGCCACGCATCGTTCCGCAAAAAC				
C600 Delta tolC-fw_-576_bS	(502)	-----				
tolC_rv_+66H2_01.08.13_bS2 (c)	(505)	-----				
tolC_rv_+66H2_bS (c)	(97)	-----				
C600 Delta tolC-rv_+1972 (c)_bS	(160)	GGACAAAATCCATACGCCACGCATCGTTCCGCAAAAAC				
Consensus	(820)					
						Section 23
	(859)	859	870	880		897
R7 Bereich um tolC	(858)	GGAGCGCACGCCATCTGACACCAGTCGCTCTCGCGGTTG				
C600 Delta tolC-fw_-576_bS	(502)	-----				
tolC_rv_+66H2_01.08.13_bS2 (c)	(505)	-----				
tolC_rv_+66H2_bS (c)	(97)	-----				
C600 Delta tolC-rv_+1972 (c)_bS	(199)	GGAGCGCACGCCATCTGACACCAGTCGCTCTCGCGGTTG				
Consensus	(859)					
						Section 24
	(898)	898	910	920		936
R7 Bereich um tolC	(897)	CCTACTGTTTTTATGCTGGCTGGCTGTGAAAAGAGTGATG				
C600 Delta tolC-fw_-576_bS	(502)	-----				
tolC_rv_+66H2_01.08.13_bS2 (c)	(505)	-----				
tolC_rv_+66H2_bS (c)	(97)	-----				
C600 Delta tolC-rv_+1972 (c)_bS	(238)	CCTACTGTTTTTATGCTGGCTGGCTGTGAAAAGAGTGATG				
Consensus	(898)					
						Section 25
	(937)	937	950	960		975
R7 Bereich um tolC	(936)	AAACAGTGTCTCTCTATCAAAATGCTGACGACTGTTTCAG				
C600 Delta tolC-fw_-576_bS	(502)	-----				
tolC_rv_+66H2_01.08.13_bS2 (c)	(505)	-----				
tolC_rv_+66H2_bS (c)	(97)	-----				
C600 Delta tolC-rv_+1972 (c)_bS	(277)	AAACAGTGTCTCTCTATCAAAATGCTGACGACTGTTTCAG				
Consensus	(937)					

Abbildung 3.14d: Alignment der Sequenzanalyse für *E. coli* R7 im Bereich um die *tolC*-Deletion (Abschnitt 19 bis 25)

Section 26						
	(976)	976	990	1000	1014	
R7 Bereich um tolC	(975)	CTGCAAACCCAGGC AAAAGCGCCGAATGTACCACCGCGT				
C600 Delta tolC-fw_-576_bs	(502)	-----				
tolC_rv_+66H2_01.08.13_bs2 (c)	(505)	-----				
tolC_rv_+66H2_bs (c)	(97)	-----				
C600 Delta tolC-rv_+1972 (c)_bs	(316)	CTGCAAACCCAGGC AAAAGCGCCGAATGTACCACCGCGT				
Consensus	(976)					
Section 27						
	(1015)	1015	1020	1030	1040	1053
R7 Bereich um tolC	(1014)	ACAACAATGCGCTGAAAGAAGCCGAACGTACTGCGCCGA				
C600 Delta tolC-fw_-576_bs	(502)	-----				
tolC_rv_+66H2_01.08.13_bs2 (c)	(505)	-----				
tolC_rv_+66H2_bs (c)	(97)	-----				
C600 Delta tolC-rv_+1972 (c)_bs	(355)	ACAACAATGCGCTGAAAGAAGCCGAACGTACTGCGCCGA				
Consensus	(1015)					
Section 28						
	(1054)	1054	1060	1070	1080	1092
R7 Bereich um tolC	(1053)	AATACGCCACCCGTGAAGACTGTGTTGCTGAATTTGGTG				
C600 Delta tolC-fw_-576_bs	(502)	-----				
tolC_rv_+66H2_01.08.13_bs2 (c)	(505)	-----				
tolC_rv_+66H2_bs (c)	(97)	-----				
C600 Delta tolC-rv_+1972 (c)_bs	(394)	NN-ACGCCACCCGTGAAGACTGTGTTGCTGAATTTGGTG				
Consensus	(1054)					
Section 29						
	(1093)	1093	1100	1110	1120	1131
R7 Bereich um tolC	(1092)	AAGGTCAGTGCCAGCAGGCACCAGCCCAGGCTGGCATGG				
C600 Delta tolC-fw_-576_bs	(502)	-----				
tolC_rv_+66H2_01.08.13_bs2 (c)	(505)	-----				
tolC_rv_+66H2_bs (c)	(97)	-----				
C600 Delta tolC-rv_+1972 (c)_bs	(432)	AAGGTCAGTGCCAGCAGGCACCAGCCCAGGCTGGCATGG				
Consensus	(1093)					
Section 30						
	(1132)	1132	1140	1150	1160	1170
R7 Bereich um tolC	(1131)	CACCAGAAAACCAGGCGCAGGCCAGCAATCCAGCGGGA				
C600 Delta tolC-fw_-576_bs	(502)	-----				
tolC_rv_+66H2_01.08.13_bs2 (c)	(505)	-----				
tolC_rv_+66H2_bs (c)	(97)	-----				
C600 Delta tolC-rv_+1972 (c)_bs	(471)	CACCA-----				
Consensus	(1132)					

Abbildung 3.14e: Alignment der Sequenzanalyse für *E. coli* R7 im Bereich um die *tolC*-Deletion (Abschnitt 26 bis 30)Abbildung 3.15: Sequenzierter Bereich um *tolC* in *E. coli* R7

3.1.1.4 Charakterisierung von *E. coli* R7

Zur weiteren funktionellen Charakterisierung der $\Delta toIC$ -Mutation von *E. coli* R7 wurden die Sensitivität gegenüber Antibiotika anhand einer MHK-Bestimmung sowie das Wachstumsverhalten und die Zell- und Kolonie-Morphologie im Vergleich zum Ausgangsstamm untersucht.

3.1.1.4.1 Bestimmung der Sensitivitätserhöhung im Vergleich zum Ausgangsstamm *E. coli* C600

Die Bestimmung der MHK für *E. coli* R7 nach CLSI-Standard ergab für die Antibiotika Norfloxacin, Chloramphenicol, Linezolid und Novobiocin eine im Vergleich zum Ausgangsstamm *E. coli* C600 erhöhte Sensitivität. Für Novobiocin und Linezolid, die in *E. coli* bei intaktem TolC über den Efflux effizient eliminiert werden, lag mit fünf bzw. sechs Stufen die stärkste Erhöhung der Sensitivität vor (Augustus et al., 2004; Bokma et al., 2006; Schumacher et al., 2007). Für Chloramphenicol konnte eine Steigerung von drei Stufen, für Norfloxacin von zwei Stufen nachgewiesen werden. Die Antibiotika Ampicillin und Kanamycin zeigten im Vergleich zum Ausgangsstamm einen Unterschied in der MHK von einer bzw. keiner Stufe.

Tabelle 3.3: Ergebnis der MHK-Bestimmung von *E. coli* R7 im Vergleich zum Ausgangsstamm *E. coli* C600

Antibiotikum	<i>E. coli</i> C600	<i>E. coli</i> R7	Stufen
<i>Ampicillin</i>	8 µg/ml	4 µg/ml	1
<i>Chloramphenicol</i>	8 µg/ml	1 µg/ml	3
<i>Kanamycin</i>	0,5 µg/ml	0,5 µg/ml	keine
<i>Linezolid</i>	256 µg/ml	8 µg/ml	5
<i>Norfloxacin</i>	0,063 µg/ml	0,016 µg/ml	2
<i>Novobiocin</i>	64 µg/ml	1 µg/ml	6

3.1.1.4.2 Morphologische Betrachtung

Neben einer Erhöhung der Sensitivität führte die Deletion von *toIC* zu einer visuell erkennbaren morphologischen Veränderung von *E. coli* R7-Kolonien auf LB-Agar. Im Gegensatz zu den schleimigen und größeren Kolonien von *E. coli* C600, besaß *E. coli* R7 glatte, scharf abgegrenzte und wesentlich kleinere Kolonien. Die morphologische Veränderung der $\Delta toIC$ -Mutante war so deutlich, dass eine Differenzierung beider Stämme durch die Betrachtung der Agarplatten möglich war.

Bei der mikroskopischen Analyse von Kulturen von *E. coli* C600 und *E. coli* R7 in LB-Medium (Abb. 3.16) bzw. von *E. coli* C600/pHPKC3-02 und *E. coli* R7/pHPKC3-02 in M9-Medium (Abb. 3.17) vor und nach einer Inkubationszeit von 12 h, zeigte die Mutante nach Inkubation in beiden Medien Filamentierung. Während in LB-

Medium die Filamentierung nur bei einzelnen Zellen auftrat, war der Defekt in M9-Medium stärker ausgeprägt. Dies bestätigte die in der Literatur angegebenen Ergebnisse zum Wachstum von *tolC*-Mutanten (Kapitel 1.1.3.2) (Dhamdhare & Zgurskaya, 2010; Vega & Young, 2014). Die Zellen von *E. coli* C600 zeigten nach 12 h Inkubation morphologisch keinen Unterschied zu den Zellen zum Zeitpunkt t_0 . Dies traf sowohl auf die Anzucht in LB-Medium als auch in M9-Medium zu.

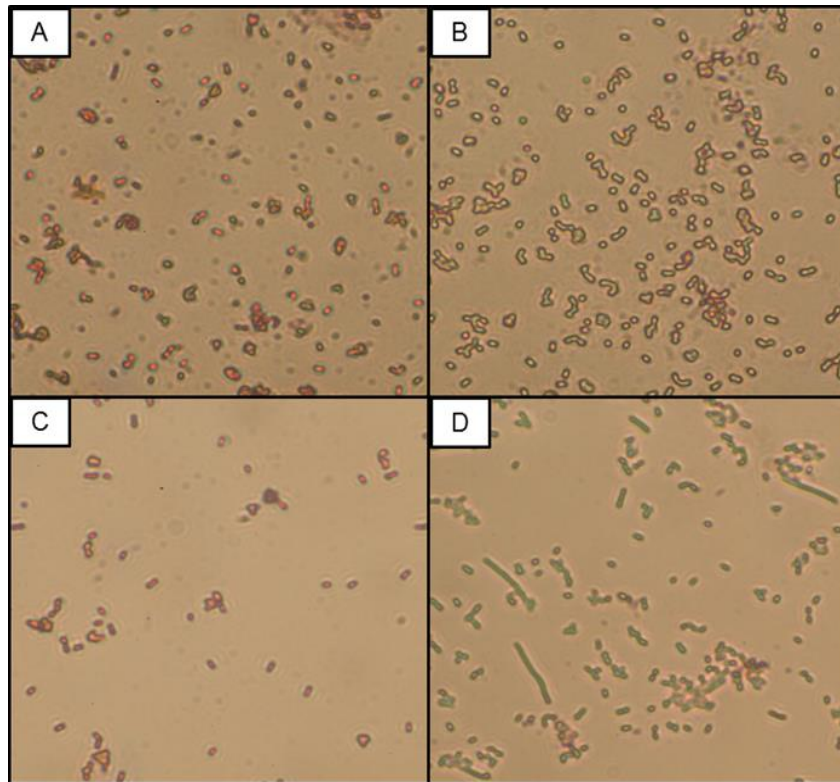


Abbildung 3.16: Mikroskopische Aufnahmen von *E. coli* C600 und *E. coli* R7 in LB-Medium (400-fache Vergrößerung); A: *E. coli* C600 t_0 ; B: *E. coli* C600 t_{12h} ; C: *E. coli* R7 t_0 ; D: *E. coli* R7 t_{12h}

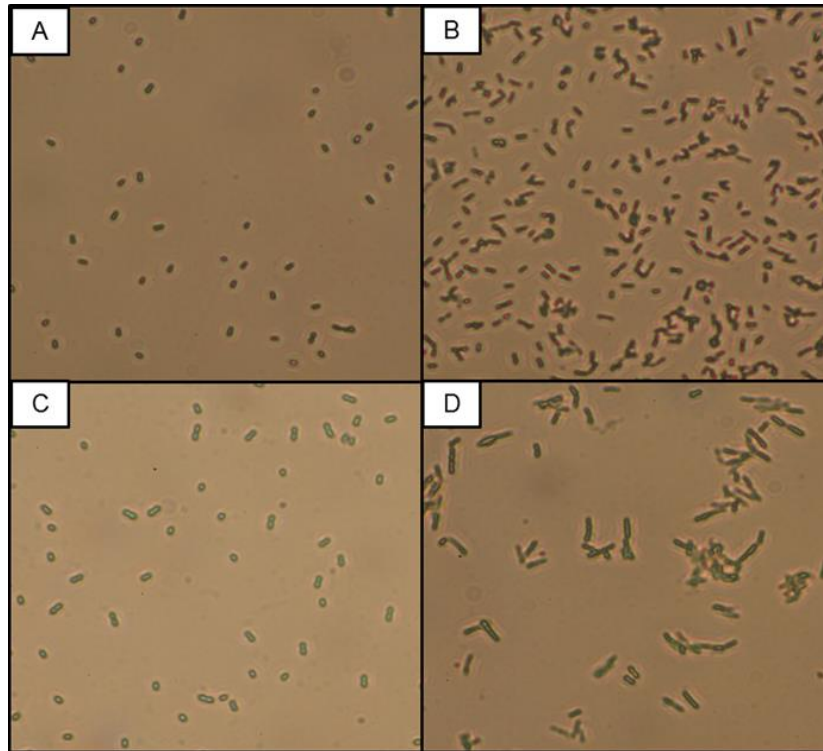


Abbildung 3.17: Mikroskopische Aufnahmen von *E. coli* C600/pHPKC3-02 und *E. coli* R7/pHPKC3-02 in M9-Medium (400-fache Vergrößerung); A: *E. coli* C600/pHPKC3-02 t_0 ; B: *E. coli* C600/pHPKC3-02 t_{12h} ; C: *E. coli* R7/pHPKC3-02 t_0 ; D: *E. coli* R7/pHPKC3-02 t_{12h}

3.1.1.4.3 Untersuchung zum Wachstumsverhalten

Zur Untersuchung des Wachstumsverhaltens wurden von *E. coli* C600/pHPKC3-02 und *E. coli* R7/pHPKC3-02 in M9-Medium Wachstumskurven erstellt. Das M9-Medium wurde mit L-Threonin und Thiamin entsprechend den Empfehlungen von Sambrook und Russel in den Konzentrationen von jeweils 20 µg/ml supplementiert (Sambrook, 2001). Für die Erstellung der Wachstumskurven wurden Übernachtskulturen in M9-Medium angesetzt und nach einer Inkubationszeit von 13 h 1:100 mit Medium verdünnt. Die Kolben wurden bei 37 °C und 180 rpm inkubiert und aufgrund der langen Latenzphase die KBE/ml nach Erreichen einer OD_{600nm} von 0,1 in Abständen von einer Stunde bestimmt.

Nach einer Latenzphase von 5,5 h erreichte *E. coli* C600/pHPKC3-02 die exponentielle Phase mit einer maximalen Keimzahl von $4,4 \times 10^9$ nach 7,75 h. Im Gegensatz zum Ausgangsstamm ist in Abbildung 3.18 für *E. coli* R7/pHPKC3-02 über die Zeit ein stagnierender Kurvenverlauf ohne exponentielle Phase und mit einer starken Abnahme nach 18 h zu erkennen. Die OD_{600nm} von 0,1 wurde nach einer Inkubationszeit von 14 h erreicht und benötigte damit die 2,5-fache Zeit von *E. coli* C600. Aufgrund der Zunahme der OD_{600nm} und der damit korrelierenden Zellmasse bei gleichbleibender KBE/ml ist ein hoher Anteil abgestorbener Zellen zu vermuten. Das Wachstum von *E. coli* R7 in M9-Medium zeigte starke Defizite und bedurfte einer Optimierung der Wachstumsbedingungen.

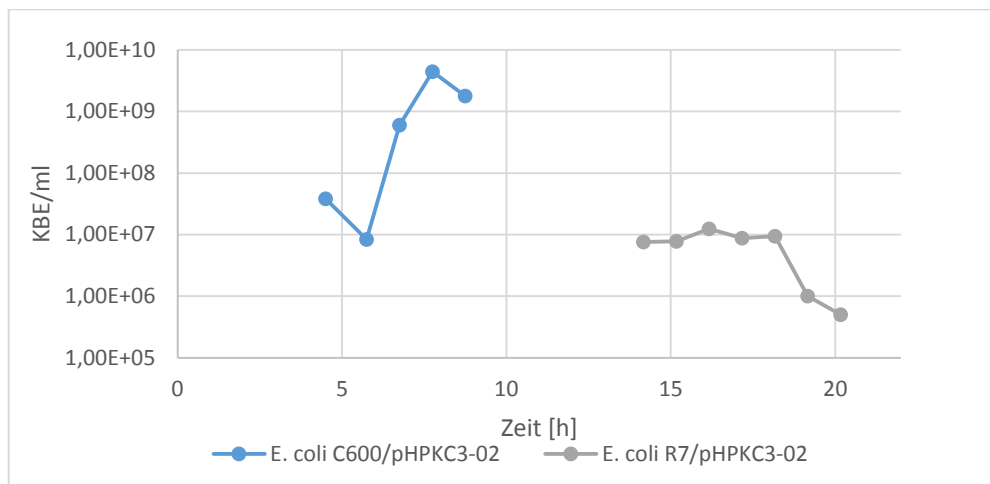


Abbildung 3.18: Wachstumskurven von *E. coli* C600/pHPKC3-02 und *E. coli* R7/pHPKC3-02 in M9-Medium; bestimmt ab einer OD_{600nm} von 0,1

3.1.1.5 Optimierung der Wachstumsbedingungen in M9-Medium

Die Voraussetzung für die Funktionalität des biosensorischen Messsystems ist ein stabiles Wachstumsverhalten des Sensorstammes in dem Untersuchungsmedium. Aufgrund starker Wachstumsdefizite von *E. coli* R7/pHPKC3-02 in M9-Medium (Abb. 3.18), wurde daher eine Optimierung der Wachstumsbedingungen durch Veränderungen der Mediumzusammensetzung vorgenommen. Die Wachstumsdefizite, wie eine verlängerte Latenzphase und eine verlangsamte Wachstumsrate einer $\Delta toI/C$ -Mutante in M9-Medium, wurden bereits von Dhamdhare et al. beschrieben (Dhamdhare & Zgurskaya, 2010). Die Ursachen dieses Defektes sind bis heute ungeklärt. Hypothesen dazu umfassen sowohl Störungen der Zellteilung mit veränderter Morphologie, die Erschöpfung von Reduktionsäquivalenten als auch eine Verbindung zum Aminosäure- und Eisenstoffwechsel (Kapitel 1.1.3.2) (Dhamdhare & Zgurskaya, 2010; Vega & Young, 2014; Wiriyathanawudhiwong et al., 2009). In Optimierungsversuchen wurde der Einfluss der Supplementierung weiterer proteinogener Aminosäuren sowie die Veränderung der Supplementkonzentrationen auf das Wachstumsverhalten von *E. coli* R7/pHPKC3-02 untersucht. Ein Bezug zum Eisenstoffwechsel war zum damaligen Zeitpunkt nicht bekannt und wurde daher nicht in den Optimierungsversuchen berücksichtigt.

3.1.1.5.1 Veränderung der Aminosäuresupplementierung

Um zu gewährleisten, dass sich die für die Tageskulturen verwendeten Zellen der Übernachtskulturen (ÜNKs) nicht bereits in der Absterbephase befanden, wurde in einem Vorversuch die maximale Inkubationszeit der ÜNK vor dem Absterben in M9-Medium ermittelt. Nach einer Inkubationszeit von etwa 15 h ging der Stamm in die Absterbephase über. Die Inkubationszeit der ÜNKs in den Optimierungsversuchen wurde mit einem zeitlichen Puffer von 2 h auf 13 h festgelegt.

Dhamdhare et al. beschrieben in ihrer Publikation die Aufhebung des Wachstumsdefizites einer ΔtoC -Mutante in M9-Medium durch die Supplementierung von L-Serin (Dhamdhare & Zgurskaya, 2010). Die Erstellung von Wachstumskurven von *E. coli* R7/pHPKC3-02 mit und ohne L-Serinzugabe in der von Dhamdhare et al. eingesetzten Konzentration von 100 $\mu\text{g/ml}$ zeigte, dass die Wachstumsrate durch die Zugabe von L-Serin unverändert blieb, jedoch die exponentielle Phase weiter verkürzt war. Dies führte zu einer geringeren Maximalkeimzahl unter Serinzugabe. Die von Dhamdhare et al. aufgestellte Behauptung der Serinauxotrophie einer ΔtoC -Mutante in M9-Medium konnte für *E. coli* R7/pHPKC3-02 unter den durchgeführten Bedingungen nicht bestätigt werden.

Im Folgenden wurde der Einfluss weiterer proteinogener Aminosäuren untersucht. Eine ÜNK von *E. coli* R7/pHPKC3-02 wurde in M9-Medium unter Zusatz von L-Threonin und Thiamin in den Konzentrationen von jeweils 20 $\mu\text{g/ml}$ angesetzt und diese in einer Tageskultur 1:100 in M9-Medium verdünnt. Die verdünnte Bakteriensuspension wurde auf 20 Röhrchen à 3 ml aufgeteilt und zu jedem Röhrchen jeweils eine Aminosäure sowie die essentiellen Supplemente L-Threonin und Thiamin hinzugefügt. Der Einfluss der untersuchten proteinogenen Aminosäuren wurde einzeln (Röhrchen 1 – 17) sowie in Kombination (Röhrchen 18) untersucht. Als Kontrollen dienten ein Röhrchen mit der alleinigen Supplementierung von L-Threonin und Thiamin (Positivkontrolle) sowie ein Röhrchen mit Medium ohne Bakteriensuspension zur Überprüfung auf Verunreinigung (Negativkontrolle). Der Versuchsansatz wurde in den Konzentrationen 20 $\mu\text{g/ml}$ und 50 $\mu\text{g/ml}$ durchgeführt, sodass eine Gesamtanzahl von 40 Röhrchen resultierte. Nach Zugabe der Supplemente wurden die Röhrchen für 12 h bei 37 °C und 180 rpm inkubiert und anschließend visuell über den Trübungsgrad ausgewertet. Das Ergebnis des Wachstumsversuches zur Supplementierung proteinogener Aminosäuren ist in Tabelle 3.4 dargestellt.

Tabelle 3.4: Auswertung des Trübungsgrades von *E. coli* R7/pHPKC3-02 in M9-Medium unter Zugabe verschiedener Aminosäuren in den Konzentrationen 20 $\mu\text{g/ml}$ und 50 $\mu\text{g/ml}$

Röhrchen	Aminosäure	Wachstum bei 20 $\mu\text{g/ml}$	Wachstum bei 50 $\mu\text{g/ml}$
1	L-Alanin	+	+++
2	L-Arginin	+	+++
3	L-Asparagin	+	+++
4	L-Asparaginsäure	+	+++
5	L-Cystein	(+)	+++
6	L-Glutamin	++	+++
7	L-Glutaminsäure	++	+++
8	L-Glycin	+	+++
9	L-Histidin	++	+++
10	L-Lysin	(+)	+++
11	L-Methionin	++	+++

12	L-Phenylalanin	+	+++
13	L-Prolin	(+)	+++
14	L-Serin	(+)	+++
15	L-Tryptophan	-	+++
16	L-Tyrosin	+	+++
17	L-Valin	-	-
18	Alle	-	-
Positivkontrolle	-	+	+++
Negativkontrolle	-	-	-

Legende: +++ starkes Wachstum, ++ mittleres Wachstum, + schwaches Wachstum, (+) sehr schwaches Wachstum, - kein Wachstum

Die Erhöhung der Supplementkonzentration von 20 µg/ml auf 50 µg/ml führte bei allen Röhrchen zu einer visuell erkennbaren Erhöhung des Trübungsgrades. Ausnahmen hierbei bildeten die Supplementierungen mit L-Valin sowie die aller untersuchten Aminosäuren gemeinsam, bei denen das Wachstum in beiden Konzentrationen vollständig inhibiert wurde. Aufgrund des gleichmäßig starken Wachstums aller Röhrchen in der Konzentration von 50 µg/ml ist zu vermuten, dass der Wachstumsvorteil vorwiegend auf die erhöhten Konzentrationen an Threonin und / oder Thiamin zurückzuführen ist. Zur genaueren Erfassung von Wachstumsunterschieden wurde von den Röhrchen, die in der Konzentration von 20 µg/ml im Vergleich zur Positivkontrolle eine stärkere Trübung aufwiesen, eine KBE-Bestimmung durchgeführt. Dies umfasste die Röhrchen mit den Supplementierungen L-Glutamin, L-Glutaminsäure, L-Histidin und L-Methionin. Das Ergebnis der KBE-Bestimmung ist in Abbildung 3.19 dargestellt und spiegelt das Ergebnis der visuellen Auswertung des Trübungsgrades wider. Die KBE/ml des mit Methionin supplementierten Röhrchens in der Konzentration 50 µg/ml war nicht auswertbar und wurde vom Ergebnis ausgeschlossen. Die mit L-Glutamin, L-Glutaminsäure und L-Histidin supplementierten Röhrchen wiesen im Vergleich zur niedrigeren Konzentration eine etwa 3,5 – 6-fache Steigerung der KBE/ml auf. Bei der Positivkontrolle führte die Erhöhung der Supplementkonzentration zu einer über 30-fachen Steigerung. Der entscheidende Faktor für das verstärkte Wachstum stellt dennoch die Erhöhung der Thiamin- und Threoninkonzentration dar.

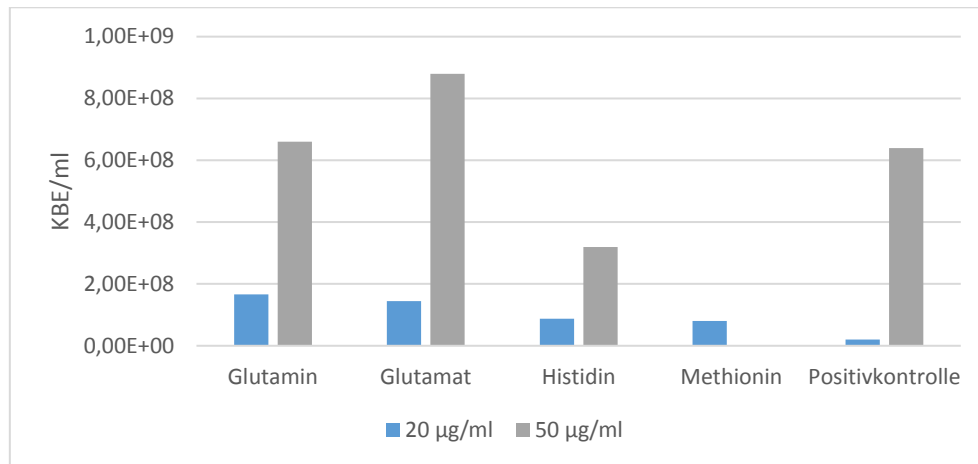


Abbildung 3.19: Bestimmung der KBE/ml von *E. coli* R7/pHPKC3-02 in M9-Medium unter Zusatz verschiedener Aminosäuren sowie den essentiellen Supplementen L-Threonin und Thiamin in den Konzentrationen 20 µg/ml und 50 µg/ml

3.1.1.5.2 Optimierung der Supplementkonzentrationen

Die Erhöhung der Konzentration an L-Threonin und Thiamin auf 50 µg/ml führte in der ÜNK von *E. coli* R7/pHPKC3-02 in M9-Medium zu einer Erhöhung der Keimzahl von $2,0 \times 10^7$ auf $6,4 \times 10^8$ KBE/ml (Abb. 3.19, Positivkontrolle). Um eine weitere Steigerung zu erzielen, wurden die Konzentrationen bis auf 200 µg/ml erhöht und das Wachstum in einer KBE-Bestimmung verglichen. Zur Vereinfachung der Versuchsbedingungen wurde die Inkubationszeit bis zur Bestimmung der KBE/ml auf 9 h reduziert. Der Einfluss höherer Supplementkonzentrationen auf das Wachstumsverhalten von *E. coli* C600/pHPKC3-02 wurde zum Vergleich ebenfalls untersucht.

Bei *E. coli* R7/pHPKC3-02 konnte eine direkte Korrelation zwischen der Supplementkonzentration und der KBE/ml beobachtet werden. Die Zunahme der Konzentration der essentiellen Supplemente L-Threonin und Thiamin führte zu einer kontinuierlichen Steigerung der KBE/ml, welche bei einer Konzentration von jeweils 200 µg/ml fast bis an das Keimzahlniveau des Ausgangsstammes heranreichte.

Im Gegensatz zu *E. coli* R7/pHPKC3-02 lag bei *E. coli* C600/pHPKC3-02 keine Korrelation zwischen der Supplementkonzentration und der KBE/ml vor. Die Erhöhung der Konzentration führte zu keiner Steigerung der Keimzahl, welche im Konzentrationsbereich von 50 µg/ml bis 200 µg/ml konstant bei einem Wert etwa 1×10^9 KBE/ml blieb.

Das Ergebnis des Wachstumsversuches zeigte, dass der erhöhte Bedarf an L-Threonin und Thiamin ein spezifisches Charakteristikum der $\Delta toIC$ -Mutante *E. coli* R7 in M9-Medium darstellt.

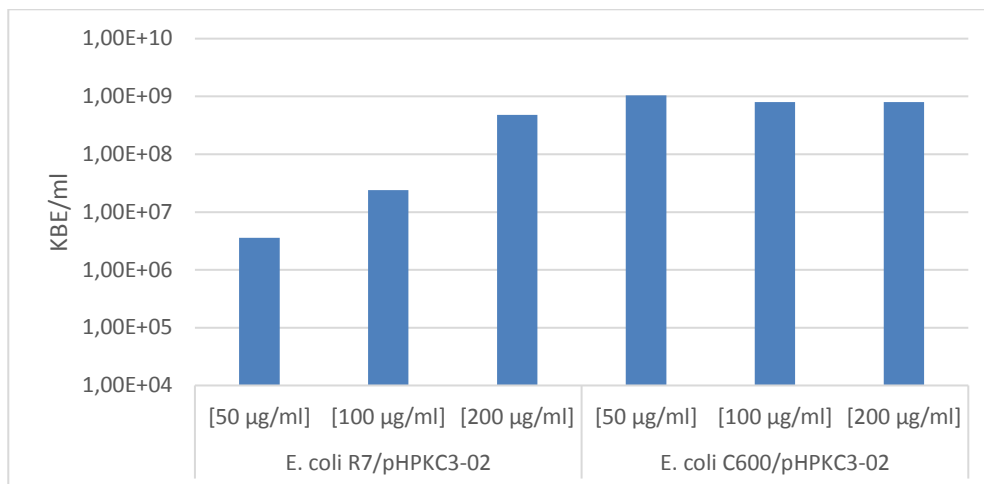


Abbildung 3.20: KBE/ml von *E. coli* R7/pHPKC3-02 und *E. coli* C600/pHPKC3-02 in M9-Medium nach Zugabe unterschiedlicher Konzentrationen an L-Threonin und Thiamin

Zur Überprüfung der bisher optimierten Bedingungen wurde das Wachstumsverhalten vom Rührchenkulturmaßstab (ca. 3 ml) auf das Wachstum im Kolben (ca. 50 ml) übertragen. Das M9-Medium wurde mit L-Threonin und Thiamin in einer Konzentration von jeweils 200 µg/ml supplementiert und Wachstumskurven von *E. coli* C600/pHPKC3-02 und *E. coli* R7/pHPKC3-02 erstellt. Im Vergleich zur ersten Wachstumskurve (Abb. 3.18) wurde durch die Steigerung der Supplementkonzentration eine Erhöhung der Maximalkeimzahl sowie ein Wachstum mit exponentieller Phase erzielt. *E. coli* R7/pHPKC3-02 erreichte jedoch trotz Optimierung nicht das Keimzahlniveau des Ausgangsstammes. Die $\Delta toI/C$ -Mutante zeigte einen charakteristischen Wachstumsverlauf mit einer verlängerten Latenzphase von etwa 9 h, gefolgt von einer exponentiellen Phase von etwa 2 h und einem abruptem Absterben.

E. coli C600/pHPKC3-02 besaß in M9-Medium gegenüber der $\Delta toI/C$ -Mutante einen Wachstumsvorteil bezogen auf die maximale Keimzahl sowie auf die Dauer der Latenzphase. Im Vergleich zu *E. coli* R7/pHPKC3-02 war die exponentielle Phase deutlich verlängert, woraus eine erhöhte Keimzahl resultierte. Die Latenzphase war im Vergleich zur Mutante um etwa 50 % reduziert. Bei Betrachtung der Wachstumskurven ist zu beachten, dass das Inokulum der Tageskultur von *E. coli* C600/pHPKC3-02 aufgrund des bereits besseren Wachstums in der ÜNK, eine höhere Ausgangskeimzahl besaß. Dies ist zu berücksichtigen, da das Inokulum Einfluss auf die Dauer der Latenzphase hat (Barton, 2005; Madar et al., 2013).

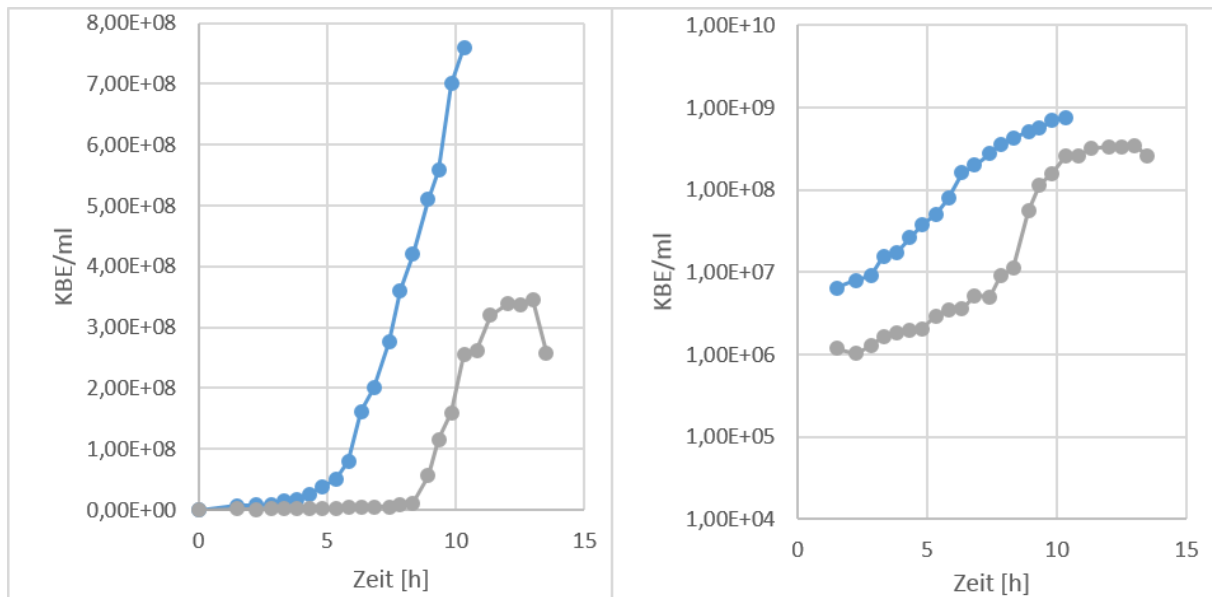


Abbildung 3.21: Wachstumskurven von *E. coli* C600/pHPKC3-02 (blau) und *E. coli* R7/pHPKC3-02 (grau) in M9-Medium unter optimierten Bedingungen

In einem folgenden Ansatz wurde anhand verschiedener Konzentrationen von L-Threonin und Thiamin im Bereich von 1 µg/ml bis 300 µg/ml die Bedeutung der einzelnen Supplemente für die Wachstumssteigerung im Röhrchenmaßstab untersucht. Dabei wurde die Konzentration eines Supplementes verändert, während die Konzentration des zweiten Supplementes bei 200 µg/ml konstant gehalten wurde. Hierfür wurde eine ÜNK von *E. coli* R7/pHPKC3-02 1:100 in M9-Medium verdünnt, die Kultur auf zehn Röhrchen mit unterschiedlichen Konzentrationen an L-Threonin und Thiamin aufgeteilt und bei 37 °C und 180 rpm für 10 h inkubiert. Im Vergleich zu vorherigen Wachstumsversuchen wurde trotz ausreichender Inkubationszeit nur eine generell geringe Keimzahl erreicht. Da alle Röhrchen von derselben ÜNK ausgingen, war ein relativer Vergleich innerhalb des Versuches vertretbar und der Versuch auswertbar.

Die Zunahme der L-Threoninkonzentration führte zu einem kontinuierlichen Anstieg der KBE/ml und zeigte eine direkte Korrelation zwischen der Konzentration und der Keimzahl. Eine Korrelation zwischen der Thiaminkonzentration und der KBE/ml konnte nicht beobachtet werden. Die KBE/ml blieb bei Reduzierung der Thiaminkonzentration konstant in einem Bereich von $5 - 6 \times 10^7$ KBE/ml. Die höchste KBE/ml wurde mit einer Konzentration von L-Threonin und Thiamin von jeweils 300 µg/ml erhalten. Der limitierende Faktor für das Wachstum von *E. coli* R7/pHPKC3-02 in M9-Medium stellte die Konzentration an L-Threonin dar.

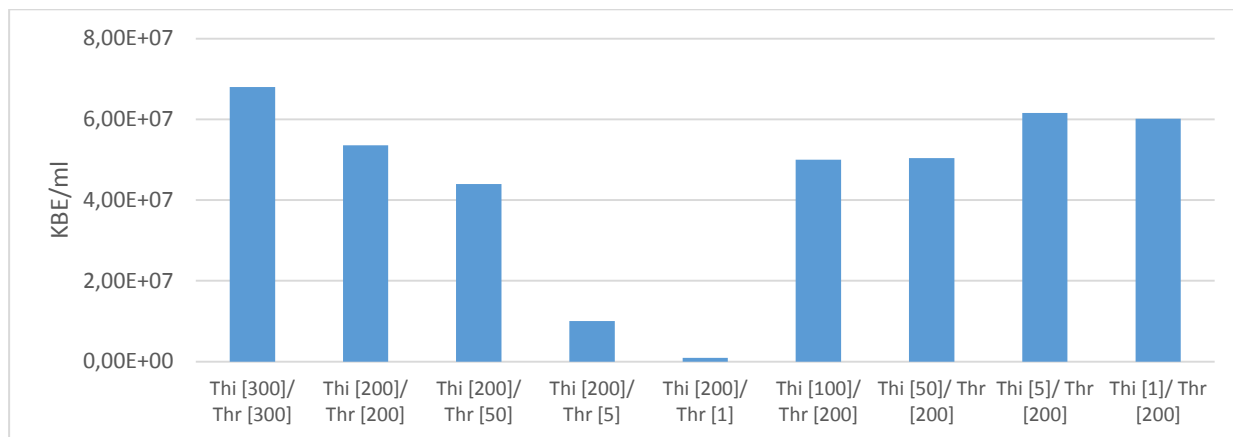


Abbildung 3.22: Ergebnis der KBE-Bestimmung von *E. coli* R7/pHPKC3-02 in M9-Medium unter Verwendung unterschiedlicher Konzentrationen von L-Threonin (Thr) und Thiamin (Thi); die Konzentrationen der eingesetzten Supplemente sind in eckigen Klammern in der Einheit µg/ml angegeben

Ausgehend von bisherigen Ergebnissen wurde *E. coli* R7/pHPKC3-02 in den Supplementkonzentrationen von jeweils 200 µg/ml und 300 µg/ml in Wachstumskurven untersucht. Da die Verwendung einer hohen Thiaminkonzentration keinen entscheidenden Wachstumsvorteil erbracht hatte (Abb. 3.22), wurden zusätzlich zwei Kolben mit einer reduzierten Thiaminkonzentration von 5 µg/ml mitgeführt. Während die Erhöhung der L-Threoninkonzentration von 200 µg/ml auf 300 µg/ml zu einer Steigerung der Wachstumsrate führte, bewirkte die reduzierte Konzentration an Thiamin eine Verzögerung der exponentiellen Phase von etwa 1 h (Abb. 3.23).

Für die folgenden Versuche wurde die Supplementkonzentration für Thiamin und L-Threonin auf eine Konzentration von jeweils 300 µg/ml festgelegt.

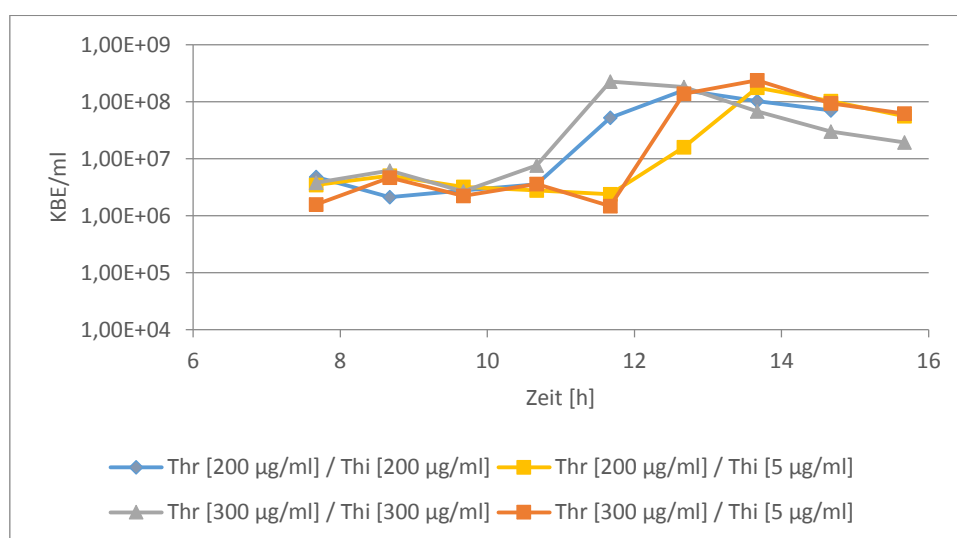


Abbildung 3.23: Wachstumskurven von *E. coli* R7/pHPKC3-02 in M9-Medium unter Verwendung unterschiedlicher Konzentrationen an L-Threonin (Thr) und Thiamin (Thi)

3.1.1.5.3 Erhöhung des Inokulums

Zur Verkürzung der Latenzphase und Vereinfachung der Versuchsdurchführung wurde für die Anzucht der ÜNK das M9-Medium gegen LB-Medium unter Zusatz von Tetracyclin [10 µg/ml] gewechselt. Für das Ansetzen der Tageskultur wurden die Zellen abzentrifugiert und in M9-Medium resuspendiert. Die Anzucht der ÜNK in LB-Medium führte zu einer Erhöhung des Inokulums der Tageskultur und verkürzte die Latenzphase auf etwa 4 h. Der charakteristische Wachstumsverlauf einer kurzen exponentiellen Phase mit einem abrupten Absterben in M9-Medium blieb unverändert.

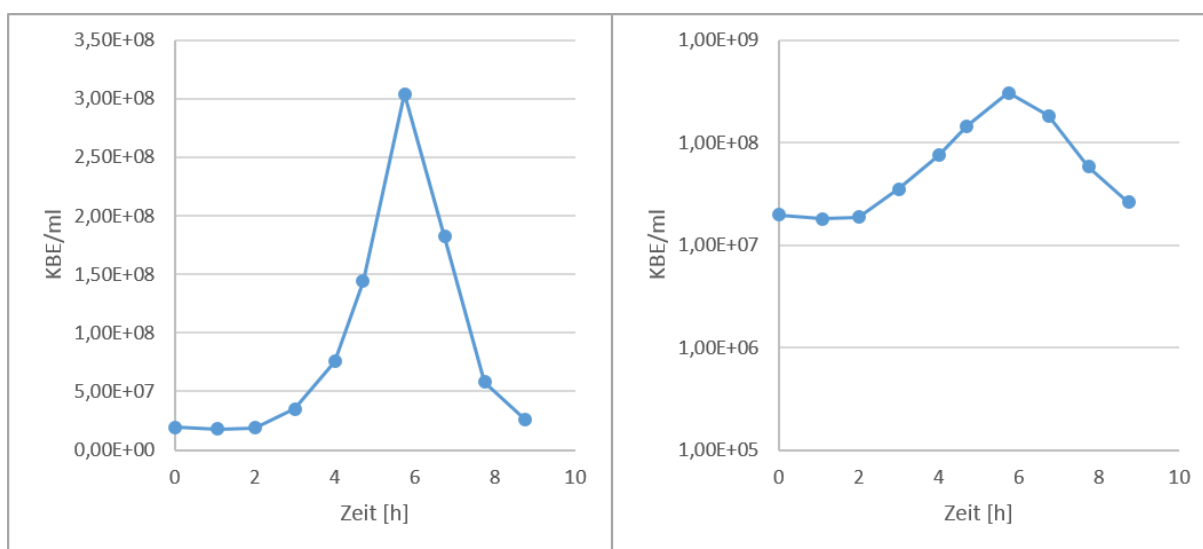


Abbildung 3.24: Charakteristischer Wachstumsverlauf von *E. coli* R7/pHPKC3-02 in M9-Medium nach Verkürzung der Latenzphase

3.1.1.5.4 Umstellung von M9-Medium auf LB-Medium

Obwohl das Wachstumsverhalten von *E. coli* R7/pHPKC3-02 in M9-Medium durch die Optimierung verbessert wurde, wurde zur Vereinfachung der Versuchsbedingungen und der Verlängerung des exponentiellen Messfensters die Umstellung des Untersuchungsmediums von M9- auf LB-Medium in Betracht gezogen. Ausgehend von einer ÜNK wurden zwei Tageskulturen in LB-Medium angesetzt und zu einer der Kulturen, zum Erhalt von pHPKC3-02, Tetracyclin [10 µg/ml] ergänzt. Bei der zweiten Kultur wurde zum Vergleich der antibiotischen Wirksamkeit auf die Zugabe von Tetracyclin verzichtet. Die Kulturen wurden bis zur frühen exponentiellen Phase angezogen und jede Kultur auf vier Kolben aufgeteilt. In jeweils einen Kolben wurden Ampicillin [8 µg/ml], Kanamycin [1 µg/ml] und Norfloxacin [0,063 µg/ml] in einer Konzentration von 2 x MHK hinzugegeben. Der vierte Kolben diente als uninduzierte Kontrolle und enthielt nur LB-Medium bzw. LB-Medium mit Tetracyclinzusatz. Während die beiden uninduzierten Kontrollkulturen einen vergleichbaren Wachstumsverlauf zeigten, war bei den mit Ampicillin, Norfloxacin und Kanamycin versetzten Kolben eine Reduzierung der antibakteriellen Wirksamkeit unter Anwesenheit von Tetracyclin zu beobachten. Die

Verwendung von LB-Medium unter Zusatz von Tetracyclin war daher nicht möglich. Die Überlegung einer Umstellung des Mediums von M9 auf LB wurde daher verworfen.

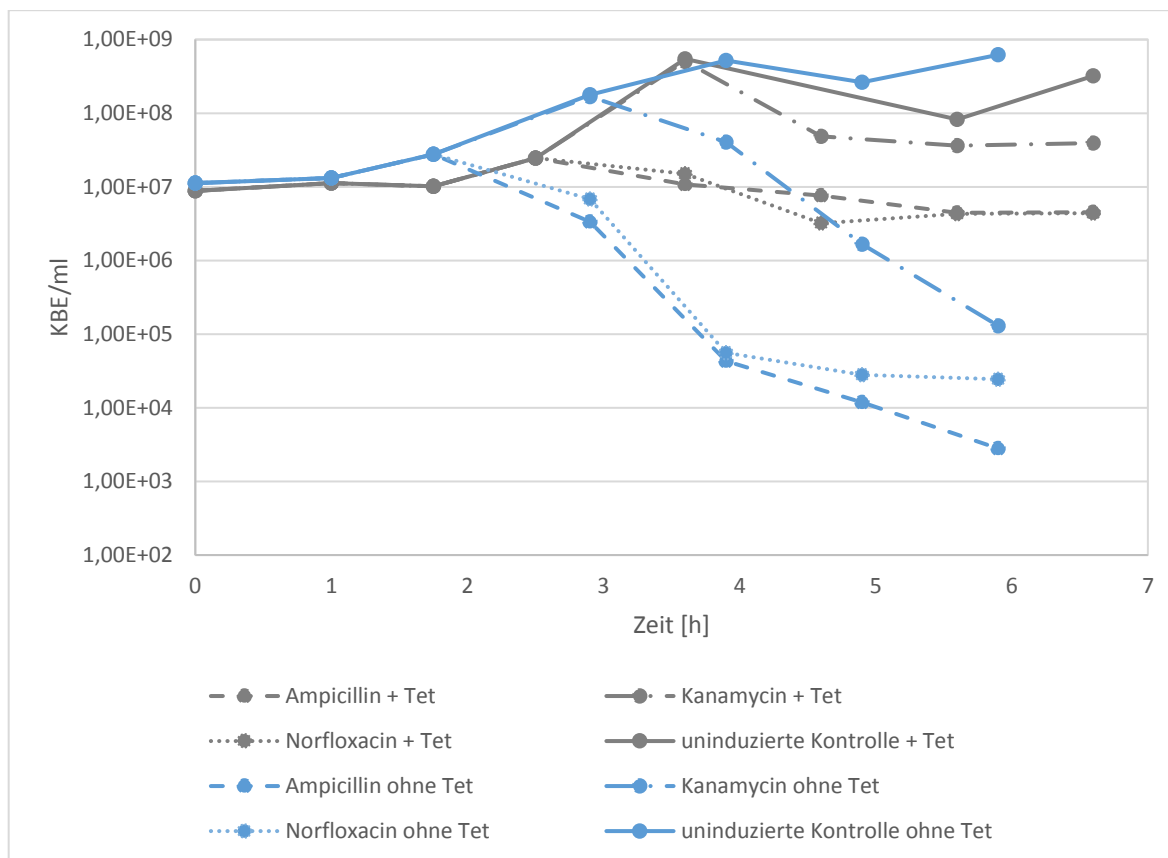


Abbildung 3.25: Einfluss von Tetracyclin (Tet) auf die Wirkung bakterizider Antibiotika in LB-Medium

Versuche zum Plasmidverlust mit *E. coli* R7/pHPKC3-02 in LB-Medium ohne Selektionsdruck, parallel auf LB-Agarplatten und LB-Agarplatten mit Tetracyclinzusatz [10 µg/ml] zeigten, dass in der exponentiellen Phase nur noch etwa 60 % der Zellen eine Tetracyclinresistenz aufzeigten. Im Vergleich dazu lagen die Werte für Tetracyclinresistente Zellen für den gleichen Versuch in M9-Medium bei 80 - 90 % (Abb. 3.26).

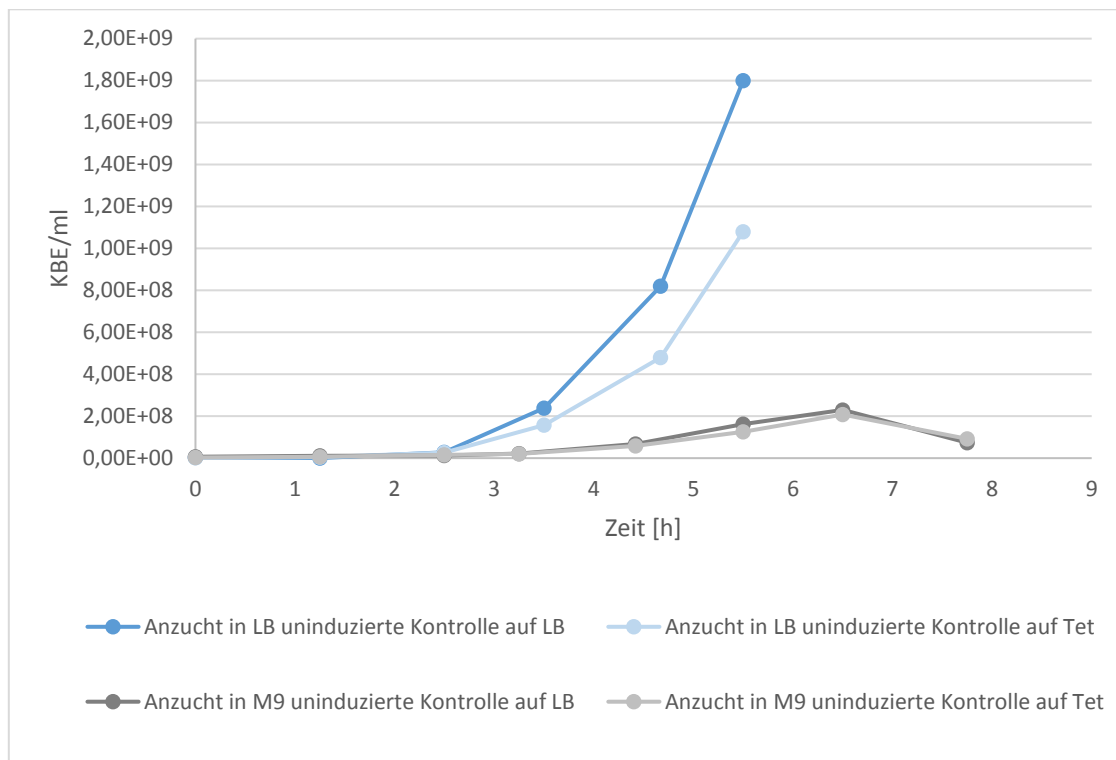


Abbildung 3.26: Untersuchung des Plasmidverlustes von *E. coli* R7/pHPKC3-02 in Abhängigkeit des Mediums

3.1.1.5.5 Zusammengefasste Ergebnisse der Versuche zur Optimierung der Wachstumsbedingungen

Durch die Anpassung der Supplementkonzentrationen in M9-Medium konnte die maximale Keimzahl von *E. coli* R7/pHPKC3-02 von 1×10^7 auf 3×10^8 gesteigert und eine exponentielle Phase im Wachstumsverlauf erzielt werden. Zusätzlich führte die Verwendung von LB-Medium unter Zusatz von Tetracyclin für die ÜNK zu einer Erhöhung des Inokulums und einer Verringerung der Latenzphase um etwa 50 %. Dies bewirkte eine deutliche Verkürzung der Versuchsdauer und Vereinfachung der Versuchsdurchführung. Ein normaler Wachstumsverlauf konnte jedoch trotz Optimierung nicht erreicht werden (Abb. 3.24). Nach einer exponentiellen Phase von etwa 2 h kam es weiterhin zum plötzlichen Absterben der Kultur ohne Übergang in eine stationäre Phase. Aufgrund des charakteristischen Wachstumsverhaltens in M9-Medium wurde eine Umstellung des Messsystems auf LB-Medium unter Zugabe von Tetracyclin in Betracht gezogen. Durch die Reduzierung der antibakteriellen Wirksamkeit in Anwesenheit von Tetracyclin musste dieser Ansatz verworfen und die Anzucht weiterhin in M9-Medium durchgeführt werden. Trotz des weiterhin suboptimalen Wachstums führte die Optimierung zu einer Vereinfachung der Versuchsbedingungen und einer signifikanten Verbesserung des Wachstumsverhaltens, sodass die Verwendung von *E. coli* R7/pHPKC3-02 in M9-Medium als Basis für das biosensorische Messsystem ermöglicht wurde.

3.1.1.6 MHK-Bestimmung von *E. coli* R7/pHPKC3-02

Unter den optimierten Wachstumsbedingungen wurde die MHK für *E. coli* R7/pHPKC3-02 in M9-Medium für Vertreter unterschiedlicher Antibiotikaklassen bestimmt. Untersucht wurden die bakteriziden Antibiotika Ampicillin (β -Laktame), Kanamycin (Aminoglykoside), Norfloxacin (Fluorchinolone), Novobiocin (Aminocumarine), Rifampicin (Ansamycine) und Polymyxin (Polymyxine) sowie die bakteriostatischen Antibiotika Chloramphenicol und Erythromycin (Makrolide). Aufgrund der verringerten Wachstumsgeschwindigkeit in M9-Medium wurde die Inkubationszeit auf 24 h verlängert. Das Ergebnis der MHK-Bestimmung ist in Tabelle 3.5 dargestellt.

Tabelle 3.5: Ergebnis der MHK-Bestimmung für *E. coli* R7/pHPKC3-02 in M9-Medium

Antibiotikum	MHK
<i>Ampicillin</i>	2 $\mu\text{g/ml}$
<i>Kanamycin</i>	0,125 $\mu\text{g/ml}$
<i>Norfloxacin</i>	0,032 $\mu\text{g/ml}$
<i>Polymyxin</i>	0,5 $\mu\text{g/ml}$
<i>Rifampicin</i>	8 $\mu\text{g/ml}$
<i>Novobiocin</i>	1 $\mu\text{g/ml}$
<i>Chloramphenicol</i>	0,5 $\mu\text{g/ml}$
<i>Erythromycin</i>	1 $\mu\text{g/ml}$

3.1.2 Konstruktion der Reporterplasmide des Messsystems

Nach erfolgreicher Konstruktion der ΔtolC -Mutante *E. coli* R7 und der Optimierung der Wachstumsbedingungen in M9-Medium erfolgte die Konstruktion der Reporterplasmide des biosensorischen Messsystems. Hierbei handelte es sich um:

1. pHPKC3-04, welches basierend auf einem Reportersystem aus einem durch Antibiotika induzierbaren Promotor und dem Gen des Fluoreszenzproteins GFPmut2 die Anwesenheit von Antibiotika in Stammumgebung anzeigt,
2. pHPKC3-03, ein Kontrollplasmid, das eine starke Expression des Fluoreszenzproteins vermittelt und zur Untersuchung der Fluoreszenzproteinbildung unter Zusatz von Proteinbiosynthesehemmern sowie der Fähigkeit zur Toleranz größerer Mengen an GFPmut2 in der ΔtolC -Mutante dient und
3. pHPKC3-05, ein weiteres Kontrollplasmid, welches das Gen des Fluoreszenzproteins ohne Promotor trägt und für die Detektion der Antibiotika vermittelten Eigenfluoreszenz herangezogen werden sollte.

Anschließend sollte *E. coli* R7 mit den Plasmiden transformiert und die Änderung der Fluoreszenzintensität im Vergleich zu uninduzierten Proben gemessen werden.

3.1.2.1 Konstruktion der Kontrollplasmide pHPKC3-03 und pHPKC3-05

Für die Konstruktion des Kontrollplasmides pHPKC3-03 wurde die Expression von *gfpmut2* unter Kontrolle des artifiziell hergestellten *srp*-Promotors gestellt. Da es sich hierbei um einen sehr starken Promotor handelt und dieser bereits im Ausgangsplasmid pKENgfpmut2 mit dem Gen des gewünschten Fluoreszenzproteins als funktionsfähiges Fusionsprodukt vorlag, wurde der Promotor für die Konstruktion des Kontrollplasmides gewählt. Der *srp*-Promotor stellt einen veränderten *tac*-Promotor dar, der zwischen der -35 und der -10-Region einen verkürzten *lac*-Operator O1 besitzt und darüber sterisch die Bindung der RNA-Polymerase an den Promotor inhibiert (Ezaz-Nikpay et al., 1994). Die gekürzte Form des Operators hat keinen Einfluss auf die Bindungsaffinität der RNA-Polymerase und hatte ausschließlich konstruktionsbedingte Gründe. Ein bekanntes Problem, der auf dem *lac*-Operon basierenden Überexpressionssystemen, stellt eine geringe konstitutive Expression im uninduzierten Zustand dar („leaky expression“) (Ezaz-Nikpay et al., 1994). Diese kann, insbesondere bei der Expression von für die Zelle toxischen Proteinen, zu Wachstumsdefiziten, Plasmidinstabilitäten bis hin zum Zelltod führen (Ezaz-Nikpay et al., 1994). Durch die verbesserte Reprimierbarkeit des *srp*-Promotors wird dies effektiver unterbunden, sodass die kontrollierte Expression toxischer Proteine in größeren Mengen ermöglicht wird (Ezaz-Nikpay et al., 1994).

Mit den Primern GFP_fw_-178_PstI und GFP_rv_+757_PstI wurde von pKENgfpmut2 ein 979 bp großes PCR-Produkt, welches das Gen *gfpmut2* sowie den *srp*-Promotor beinhaltet, amplifiziert und über die PstI-Schnittstelle in pHPKC3-02 inseriert. Obwohl es sich bei dem *srp*-Promotor um einen induzierbaren Promotor handelt und die Expression im uninduzierten Zustand stark reduziert sein sollte, lag bei den Transformanten bereits ohne Induktion durch IPTG eine bei Tageslicht deutlich visuell erkennbare Fluoreszenz vor. Die Transformanten wurden mittels Alkalischer Lyse isoliert und anschließend im Restriktionsverdau mit *EcoRI* hinsichtlich Identität und Orientierung des Inserts untersucht. Das Ergebnis des Restriktionsverdaus bestätigte die erfolgreiche Insertion des PCR-Produktes bei allen isolierten Plasmiden. Da es sich bei der Konstruktion um eine ungerichtete Insertion handelte, wurden beide Orientierungen des Inserts erhalten. Die erwarteten Fragmentgrößen für die Orientierung entgegen *leuB* betrugen 2286 bp und 3739 bp (Abb. 3.27: Nr.1, 2, 4, 5, 6), während die Fragmentgrößen für die entgegengesetzte Orientierung bei 1636 bp und 4389 bp (Abb. 3.27: Nr. 3, 7, 8) lagen. Für das weitere Vorgehen wurde das aus Nr. 2 isolierte Plasmid verwendet, welches im Folgenden als pHPKC3-03 bezeichnet wird. Zum Ausschluss konstruktionsbedingter Mutationen wurden von pHPKC3-03 der *srp*-Promotorbereich inklusive des Übergangs zu *gfpmut2* sequenziert. Die Sequenzierung ergab, dass keine Mutationen im untersuchten Bereich vorlagen. Aufgrund der

hohen Fluoreszenzintensität im uninduzierten Zustand war eine weitere Induktion mit IPTG für die gewünschten Untersuchungen nicht notwendig, sodass das Kontrollplasmid ohne Induktion verwendet wurde.

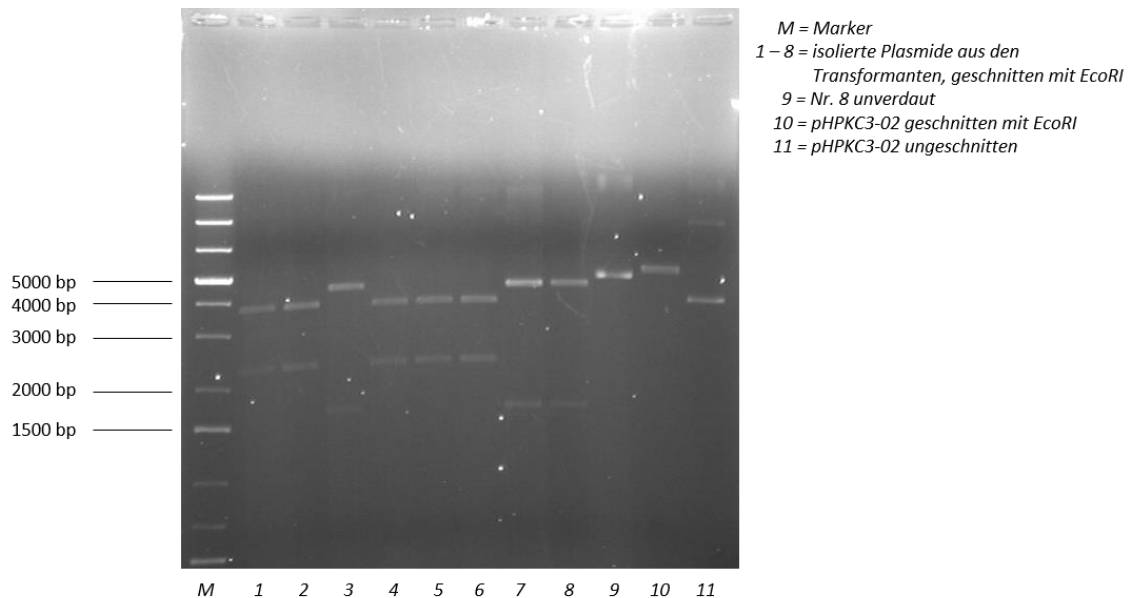


Abbildung 3.27: Restriktionsverdau isolierter Plasmide aus den grün fluoreszierenden Transformanten mit *EcoRI*

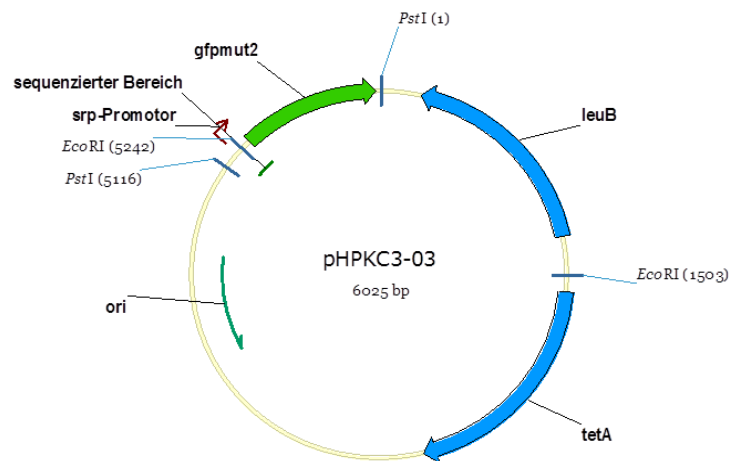


Abbildung 3.28: Plasmidkarte des Kontrollplasmides pHPKC3-03

Nachdem die korrekte Konstruktion des Plasmids pHPKC3-03 bestätigt war, wurde das Plasmid als Template-DNA für die Konstruktion von pHPKC3-05 verwendet. Hierfür wurde über eine PCR mit den Primern Rollingcircle_fw_E.coli_Neg und Rollingcircle_rv_E.coli_Neg die *srp*-Promotorsequenz von pHPKC3-03 entfernt, sodass das Strukturgen von GFPmut2 promotorlos auf dem Plasmid vorlag. Die Methode zur Erzeugung einer PCR-vermittelten Deletion ist in Kapitel 2.2.12.1 detailliert beschrieben. Entfernt wurde ein 183

bp größer, direkt vor dem Genstart von *gfpmut2*, liegender Bereich. Durch den Verlust der *gfpmut2*-Expression verloren die Transformanten (T1, T3 und T4) die charakteristische grün-gelbliche Fluoreszenz von pHPKC3-03. Mittels Restriktionsverdau und Sequenzierung des Übergangs sowie des Bereiches in 5'-Richtung von *gfpmut2* wurde der Verlust des *srf*-Promotors und die Identität von pHPKC3-05 bestätigt. Zum Vergleich wurden für das Elektropherogramm das geschnittene sowie das ungeschnittene Ausgangsplasmid pHPKC3-03 ebenfalls aufgetragen. Im Gegensatz zu pHPKC3-05 besitzt pHPKC3-03 eine zweite Schnittstelle für *EcoRI*, sodass die erwarteten Fragmentgrößen für pHPKC3-03 bei 2286 bp und 3739 bp bzw. für pHPKC3-05 bei 5842 bp lagen.

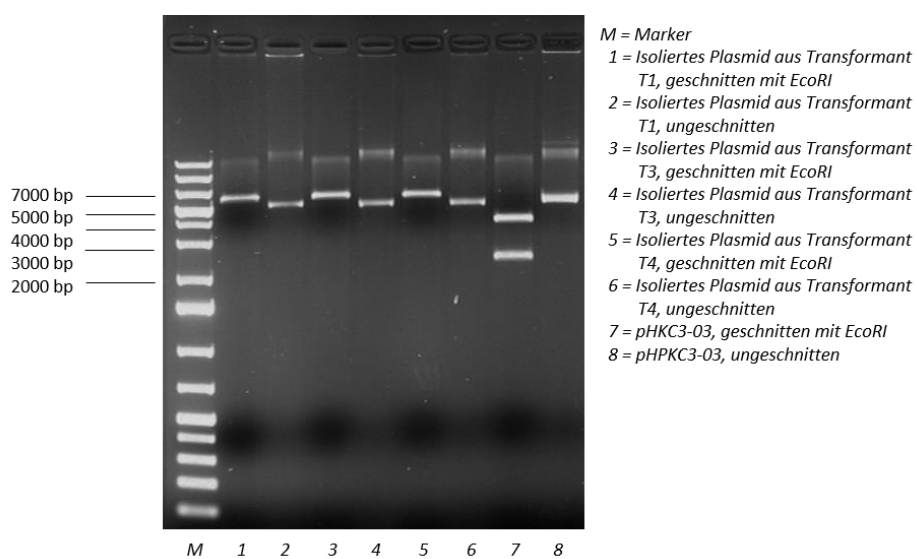


Abbildung 3.29: Restriktionsverdau von pHPKC3-05 und des Ausgangsplasmides pHPKC3-03 mit *EcoRI*

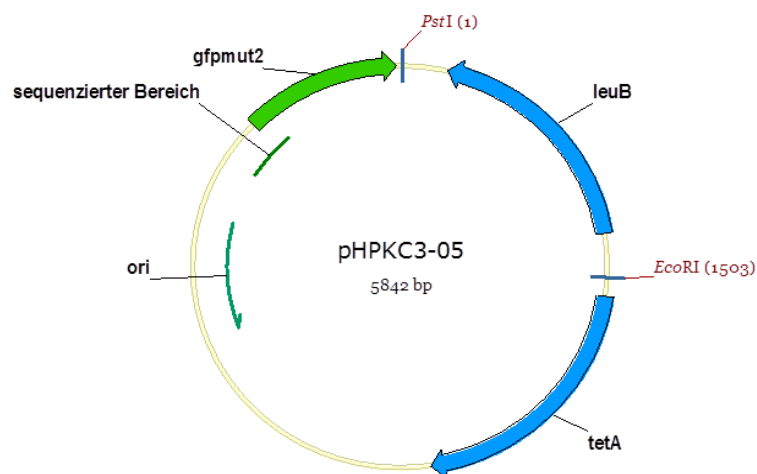


Abbildung 3.30: Plasmidkarte des Kontrollplasmides pHPKC3-05

3.1.2.2 Konstruktion des Plasmides pHPKC3-04

Das Plasmid pHPKC3-04 stellte das eigentliche Reporterplasmid des Nachweissystemes dar und sollte anhand eines spezifischen Reporterkonstrukts die Anwesenheit antibakterieller Substanzen in der Umgebung der $\Delta to/C$ -Mutante aufzeigen. Hierfür sollte ein durch Antibiotika induzierbarer Promotor mit dem Strukturgenen der GFP-Variante GFPmut2 fusioniert werden. Die 2007 von Kohanski et al. aufgestellte Hypothese eines gemeinsamen Wirkmechanismus bakterizider Antibiotika bildete die Grundlage für die Wahl des Promotors (Kohanski et al., 2007). Die Hypothese beschreibt eine im Gegensatz zu bakteriostatischen Antibiotika ausschließlich nur durch bakterizide Antibiotika hervorgerufene und von deren primärer Zielstruktur unabhängige Kaskade. Diese führt über die Aktivierung des Citratzyklus und der Atmungskette zu einem verstärkten Verbrauch des Reduktionsäquivalentes NADH, einer hierdurch erhöhten Bildung von O_2^- , der Zerstörung von Eisen-Schwefel-Clustern und letztendlich über die Stimulierung der Fenton-Reaktion zu einer erhöhten intrazellulären ROS-Bildung (Kapitel 1.2.5). Die erhöhte intrazelluläre Konzentration an ROS resultiert in einer verstärkten Schädigung von Biomolekülen und stellt nach Ansicht von Kohanski et al. die eigentliche Ursache der letalen Wirkung bakterizider Antibiotika dar.

3.1.2.2.1 Ermittlung des Promotors für die Reportergenkonstruktion

3.1.2.2.1.1 Überprüfung der Genexpression von *nuoF* in *E. coli* MG1655 unter Einfluss bakterizider Antibiotika

In einem Vorversuch wurde analog der Publikation von Kohanski et al. der Stamm *E. coli* MG1655 hinsichtlich einer veränderten Genexpression von *nuoF* unter Zugabe bakterizider Antibiotika untersucht (Kohanski et al., 2007). Das Gen *nuoF* codiert für eine Untereinheit der NADH-Dehydrogenase I aus der Atmungskette und zeigte neben den Genen *nuoE* und dem fusionierten Gen *nuoC/D* in Genexpressionsuntersuchungen von Kohanski et al. von mit bakteriziden Antibiotika behandelten Proben im Vergleich zu einer mit einem bakteriostatischen Antibiotikum behandelten Probe eine erhöhte Genexpression. Dementsprechend stellte die NADH-Dehydrogenase I ein Schlüsselenzym dieser Kaskade dar. Abweichend zur Publikation wurde die Genexpression auf die uninduzierte Kontrolle bezogen, da diese den späteren Bezugspunkt des Messsystems darstellen sollte [2]. *E. coli* MG1655 wurde in LB-Medium bis zur frühen exponentiellen Phase ($OD_{600}=0,2$) angezogen und auf drei Kolben aufgeteilt. Jeweils ein Ansatz wurde mit den Antibiotika Ampicillin [5 $\mu\text{g/ml}$] und Kanamycin [5 $\mu\text{g/ml}$] in den von Kohanski et al. eingesetzten bakteriziden Konzentrationen versetzt, der dritte Ansatz ohne Antibiotikum diente als uninduzierte Kontrolle. Eine Stunde nach Antibiotikaexposition wurden die Zellen geerntet und die RNA isoliert. Mittels qRT-PCR wurde in einer Einfachbestimmung als Triplikat die Höhe der Expression über die Methode nach Pfaffl in einer Näherung bestimmt. Die Berechnung der PCR-Effizienzen erfolgte über das Auswertungsprogramm PCR Miner.

Für die mit Antibiotika behandelten Proben bezogen auf die uninduzierte Kontrolle wurde eine Genexpressionserhöhung unter Ampicillin von 1,26 bzw. unter Kanamycin von 1,12 ermittelt. Vergleichende präzise Daten zur Expressionserhöhung von *nuoF* von Kohanski et al. liegen nicht vor (Kohanski et al., 2007). Da Kohanski et al. sich in ihrer Messung jedoch auf Kulturen, die das bakteriostatisch wirksame Spectinomycin enthielten bezogen, stellt das Ergebnis der qRT-PCR keinen direkten Widerspruch zur Hypothese des gemeinsamen Wirkmechanismus dar.

Dennoch zeigte die Expressionsmessung, dass der Promotor von *nuoF* aufgrund der nur geringen und nicht relevanten Expressionsänderung trotz hoher eingesetzter Antibiotikakonzentrationen für die Konstruktion eines auf Reportergen basierenden hoch sensitiven Nachweissystems, eine ungeeignete Wahl darstellt.

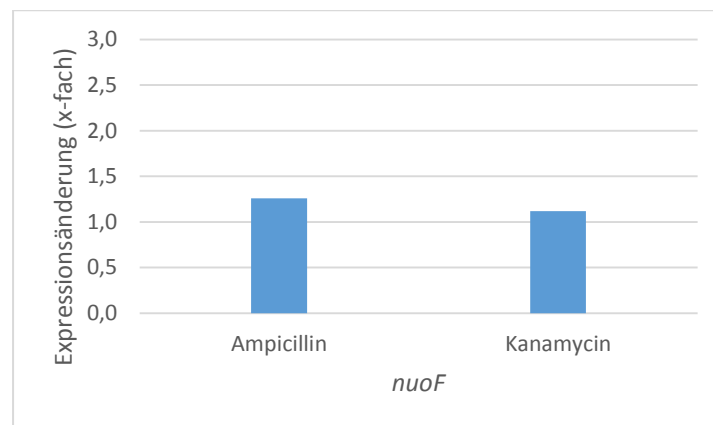


Abbildung 3.31: Expressionsänderung von *nuoF* nach Zugabe von Ampicillin und Kanamycin bezogen auf eine uninduzierte Kontrolle gemessen in *E. coli* MG1655

3.1.2.2.1.2 Promotorwahl für die Reportergenkonstruktion

Nachdem der Promotor von *nuoF* für die Konstruktion des Reportersystems als ungeeignet bewertet wurde, wurde eine neue Auswahl an Genen mittels umfangreicher Literaturrecherche getroffen, für die eine Änderung der Expression unter Einfluss bakterizider Antibiotika angenommen wurde. Auch diese wurden mittels qRT-PCR in einer ersten Näherung untersucht. Bei der Genauswahl wurde an der Grundidee des gemeinsamen Wirkmechanismus festgehalten, sodass insbesondere Gene aus zentralen Stoffwechselwegen und der von Kohanski et al. beschriebenen Kaskade (Kapitel 1.2.5) gewählt wurden. Die Ergebnisse der Literaturrecherche zur Begründung der Auswahl an Kandidatengenen sind in einer Kurzfassung sowie in Tabelle 3.6 als Übersicht zuzüglich einer Zuordnung der jeweiligen Stoffwechselwege bzw. -funktionen und den zugehörigen Referenzen zusammengefasst. Einzelheiten zu den Veröffentlichungen wie Anzuchtbedingungen, Antibiotikakonzentrationen und Versuchsdurchführungen sind den jeweiligen Referenzen zu entnehmen.

Gene des Citratzyklus (*acnA*, *acnB*, *sucA*, *sdhB*)

Der Citratzyklus (TCA) nimmt aufgrund der Generierung und Bereitstellung von NADH-Reduktionsäquivalenten für die Atmungskette eine Schlüsselrolle in der Hypothese des gemeinsamen Wirkmechanismus bakterizider Antibiotika unter aeroben Wachstumsbedingungen ein. Während die Induktion mit bakteriostatischen Antibiotika keinen Einfluss auf das Verhältnis von NAD⁺/NADH hat, führt die Induktion mit bakteriziden Antibiotika zu einem sprunghaften Verbrauch an NADH und damit zu einer Verschiebung des Verhältnisses zugunsten von NAD⁺ (Kohanski et al., 2007). Der verstärkte Verbrauch an NADH bewirkt einen Anstieg von Hyperoxid und eine Verringerung der Überlebensrate (Kohanski et al., 2007). Kohanski et al. zeigten auch, dass bei Deletionsmutanten in Genen für Enzyme des TCA ($\Delta icdA$, $\Delta acnA$, $\Delta acnB$, $\Delta sucB$, Δmdh) aufgrund des Enzymdefekts und des dadurch verringerten Angebots an NADH für die Atmungskette, die Mutanten eine höhere Überlebensrate nach Exposition mit Norfloxacin aufwiesen als der Wildtyp. Die Überlebensrate korrelierte dabei mit der Menge an gebildetem NADH, sodass bei einem Ausfall eines TCA-Enzyms vor Bildung des ersten NADH-Äquivalents die Überlebensrate höher war als bei einem Ausfall nach der ersten Reaktion, die zur Bildung von Reduktionsäquivalenten führt.

Die Entwicklung eines theoretischen Modells von Brynildsen et al. zur Ermittlung neuer Zielstrukturen antibakterieller Substanzen erweiterte im Rahmen dieser Arbeit die Auswahl an zu untersuchenden Genen für die qRT-PCR und lieferte weitere Hinweise im Zusammenhang von metabolischen Stoffwechselwegen und der Bildung von ROS (Brynildsen et al., 2013). Das Modell umfasst neben dem Citratzyklus zahlreiche Stoffwechselwege wie die Glykolyse, den Pentose-Phosphatweg, den Entner-Doudoroff-Weg, den Glyoxylatweg, die aerobe Atmung sowie den Acetat- und Glutamat-Metabolismus. Die experimentelle Überprüfung des theoretischen Modells erfolgte mittels gezielter Knockout-Mutanten und Fluoreszenz-basierter Reportersysteme. Das Modell stellte unter anderem für Gene der Succinat-Dehydrogenase (*sdhCDAB*), der α -Ketoglutarat-Dehydrogenase (*sucABCD*), der Cytochrom-*bo*₃-Oxidoreduktase (*cyoABCD*) und der Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase (*zwf*) einen Bezug zur ROS-Bildung her.

Einen weiteren Hinweis auf eine Beteiligung des TCA an der Generierung von ROS lieferten Lu et al., die mittels *gfp*-basierter Reportersysteme eine erhöhte Expression von *acnA* sowie aus dem SoxRS-Regulon stammenden Genen (*sodA*, *zwf*, *soxS*) nach Induktion mit Hyperoxid nachwiesen (Lu et al., 2005).

Ein Zusammenhang zwischen dem TCA und ROS konnte auch bei anderen Bakterienspezies beobachtet werden. Thomas et al. zeigten einen Fitnessvorteil einer Δ TCA-Mutante ($\Delta acnA$, $\Delta gltA$, $\Delta icdA$) von *Staphylococcus epidermidis* gegenüber dem Wildtyp unter Einfluss von Oxacillin sowie eine erhöhte Resistenz gegenüber H₂O₂ (Thomas et al., 2013). Auch Van Acker et al. beschrieben eine Korrelation zwischen dem TCA und der Bildung von ROS (Van Acker et al., 2013). So wurde bei einer Population resistenter Persisterzellen des *Burkholderia cepacia* Komplexes (Bcc-Komplex) nach einer gesteigerten Bildung von ROS durch die Behandlung mit Tobramycin eine verringerte Expression einer Vielzahl von Enzymen des TCA und der Atmungskette nachgewiesen. Die Eisen-Schwefel-Untereinheit der Succinat-Dehydrogenase (*sdhB*) zeigte

hierbei die stärkste Abnahme der Expression. Zusätzlich erfolgte eine Aktivierung des Glyoxylatweges, eines alternativen Stoffwechselweges mit Induktion der Isocitratlyase (*aceA*). Van Acker et al. interpretierten die Abnahme der Expression von Genen des TCA und der Atmungskette als protektiven Mechanismus zur Reduzierung von ROS.

Gene aus DNA-Reparatur- und Schutzsystemen (*dinB*, *sodA*, *soxS*)

Die Untersuchung von Genen aus DNA-Reparatur- und Schutzsystemen stellte einen weiteren Ansatz zur Ermittlung eines geeigneten Promotors für die Reporterkonstruktion dar. Die Mn-Superoxiddismutase (*sodA*) spielt als Hauptdetoxifizierungsenzym von Hyperoxid eine Schlüsselrolle beim Abbau von ROS. Bei Annahme einer gesteigerten ROS-Bildung durch bakterizide Antibiotika sollte daher die Expression von *sodA* sowie weiterer unter Kontrolle des SoxRS-Regulons stehender Gene (*acnA*, *soxS*, *zwf*) untersucht werden (Baez & Shiloach, 2013; Lu et al., 2005). Baez et al. beschrieben bei Erhöhung der Sauerstoffsättigung einer Kultur die verstärkte Bildung von ROS und eine Aktivierung des SoxRS-Regulons mit einer gesteigerten Expression von *soxS* und *sodA* (Baez & Shiloach, 2013).

Die bereits von Lu et al. erwähnte Publikation zeigte ebenfalls eine verstärkte Expression von *sodA*, *zwf*, *acnA* und *soxS* nach Induktion mit Hyperoxid generierendem Paraquat (Lu et al., 2005).

Bezogen auf bakterizide Antibiotika konnten Goswami et al. einen Bezug zwischen der Wirksamkeit von Ciprofloxacin und der Expression der Superoxiddismutasen in *E. coli* herstellen (Goswami, Mangoli, & Jawali, 2006). Bei Transformation von *E. coli* MG1655 mit Plasmiden, die eine Überexpression der Superoxiddismutasen *sodA*, *sodB* bzw. *sodC* bewirkten, wurde bei einer Konzentration von 10 ng/ml für Ciprofloxacin im Vergleich zur untransformierten Kontrolle ein verbessertes Überleben nachgewiesen. Ein positiver Effekt bei Konzentrationen über 10 ng/ml wurde jedoch nicht gezeigt.

Ein weiterer Hinweis auf einen Zusammenhang zwischen der Superoxiddismutase und bakteriziden Antibiotika lieferte die Publikation von Kaldalu et al.. Bei der Analyse von Transkriptionsprofilen eines *E. coli*-Stammes nach Zugabe bakterizider Konzentrationen von Ampicillin und Ofloxacin in der exponentiellen Phase, wiesen sie für die Induktion mit Ofloxacin eine verstärkte Expression von *sodA* und *sodB* nach (Kaldalu, Mei, & Lewis, 2004).

Eine erhöhte Expression von *sodA* nach Behandlung mit Norfloxacin in einer Konzentration von 250 ng/ml in *E. coli* wurde von Kohanski et al. mittels eines Microarrays ebenfalls gezeigt (Dwyer et al., 2007).

Eine Erweiterung zur Hypothese der letalen Wirkung bakterizider Antibiotika durch vermehrte ROS-Bildung wurde von Foti et al. erbracht (Foti et al., 2012). Anstelle der Oxidation von Lipiden, Proteinen und DNA durch Hydroxylradikale, beschrieben Foti et al. als zentrales Ereignis oxidativer Prozesse Veränderungen im Nukleotid-Pool, insbesondere die Oxidation von Guanin zu 8-Oxo-Guanin. Dabei führte nicht die erhöhte Konzentration an Hydroxylradikalen, sondern der vermehrte Einbau von eng benachbart liegenden 8-Oxo-

Guanin-Bausteinen durch die Transläsionspolymerase DinB sowie die unvollständige Korrektur dieser inkorrekten und fehlpaarenden Nukleotide zum Zelltod.

Gene aus Signaltransduktionswegen (*cpxP*, *arcA*)

Bei dem CpxRA-Zwei-Komponenten-System (CpxRA-TCS) handelt es sich um ein Stresssystem, welches bei Veränderungen in der Zellumgebung, wie Änderung von pH-Wert oder Salzkonzentration sowie durch Zellhüllstress aktiviert wird (Hunke, Keller, & Müller, 2012). Es besteht aus der membranständigen Sensor-kinase CpxA, dem cytoplasmatischen Regulatorprotein CpxR und dem periplasmatischen Protein CpxP, welches sowohl als Negativregulator von CpxA als auch als essentielles Adaptorprotein bei der Proteolyse fehlgefalteter Proteine durch die Protease DegP fungiert (Buelow & Raivio, 2005; Hunke et al., 2012; Isaac et al., 2005; Raivio, Popkin, & Silhavy, 1999; Ruiz & Silhavy, 2005; Thede et al., 2011). Einzelheiten zum Mechanismus, Induktoren und Mitgliedern des Cpx-Regulons sind in Kapitel 3.2.2.1 beschrieben. In dem Cpx-Regulon stellt *cpxP* eines der am stärksten induzierbaren Gene dar (DiGiuseppe & Silhavy, 2003). Die Induktion des CpxRA-TCS durch Aminoglykoside wurde bereits mehrfach bestätigt (Kohanski et al., 2008; Mahoney & Silhavy, 2013). Kohanski et al. beschrieben im Vergleich zu bakteriostatischen Antibiotika auch bei Induktion mit Ampicillin und Norfloxacin eine erhöhte Expression von *cpxP* (Kohanski et al., 2007). Zusätzlich stellten sie eine Verbindung zwischen dem CpxRA-TCS und dem Arc-Zwei-Komponenten-System (Arc-TCS) her und verwiesen auf die Beteiligung dieser Systeme an einem gemeinsamen bakteriziden Wirkmechanismus unter Bezugnahme auf ihre Hypothese (Kohanski et al., 2008).

Gene aus Stoffwechsel- und Synthesewegen (*aceA*, *iscS*, *sdhB*, *cyoD*, *gdhA*, *zwf*)

Die Isocitratlyase (*aceA*) stellt das erste Enzym des Glyoxylatzyklus dar, einem alternativen Weg zum Citratzyklus, welcher unter Umgehung der beiden Decarboxylierungsschritte zur Gewinnung von C4-Bausteinen für Biosynthesewege dient (Kornberg, 1966). In der bereits erwähnten Veröffentlichung von Van Acker et al. wurde über einen Microarray eine erhöhte Expression der Isocitratlyase sowie eine verringerte Expression von Enzymen des TCA bei resistenten Persisterzellen nachgewiesen (Van Acker et al., 2013). Aufgrund der mehrfach erwähnten Korrelation zwischen dem TCA und der Bildung von ROS sowie dem metabolischen Zusammenhang des TCA und des Glyoxylatzyklus wurde das Gen der Isocitratlyase in die Genauswahl zur Untersuchung einer veränderten Expression aufgenommen.

Das Gen *iscS* kodiert für die Cystein-Desulfurase, einem Enzym aus der Eisen-Schwefel-Cluster-Synthese (FeS-Cluster-Synthese) und besitzt somit eine zentrale Bedeutung in der Hypothese des gemeinsamen Wirkmechanismus. Kohanski et al. zeigten, dass durch die Zugabe eines Eisenchelators die Überlebensrate bei Zellanzuchten in Anwesenheit von Ampicillin, Norfloxacin und Kanamycin in bakteriziden Konzentrationen

anstieg. Zusätzlich wiesen sie bei einer *ΔiscS*-Mutante einen protektiven Effekt gegenüber bakteriziden Antibiotika und eine verringerte Bildung von ROS nach (Kohanski et al., 2007). Weiterhin zeigten sie bezüglich der Induktion von oxidativem Stress durch Gyraseinhibitoren mittels einer Transkriptomanalyse unter Einfluss von Norfloxacin eine erhöhte Expression des *iscRSUA*-Operons (Dwyer et al., 2007).

Als zentraler Ort der aeroben Atmung stellt die Elektronentransportkette einen bedeutenden Bildungsort von ROS dar (Imlay & Fridovich, 1991). Wichtige Enzyme der Elektronentransportkette unter aeroben Bedingungen in *E. coli* bilden die zwei NADH-Dehydrogenasen I (*nuoA-N*) und II (*ndh*), die Succinat-Dehydrogenase (*sdhCDAB*) sowie die drei Oxidoreduktasen Cytochrom *bo₃* (*cyoABCD*), Cytochrom *bd-I* (*cydABX*) und Cytochrom *bd-II* (*appBC*) (Kapitel 1.2.1.1) (Borisov et al., 2011; Fuchs, 2014). Während Kohanski et al. die NADH-Dehydrogenase I als zentrales Enzym der ROS-Bildung beschrieben, konnten Brynildsen et al. mittels auf oxidativen Stress reagierender Reportersysteme ebenso eine erhöhte Expression bei Deletionsmutanten aus dem *sdh*-Operon und dem *cyo*-Operon nachweisen. Bei Untersuchungen zur Überlebensrate von *ΔsdhC*-, *ΔcyoA*- und *ΔnuoG*-Mutanten nach Zugabe bakterizider Antibiotika zeigten diese im Vergleich zum Wildtyp eine erhöhte Sensitivität, welche Brynildsen et al. auf die erhöhte basale ROS-Bildung zurückführten (Brynildsen et al., 2013).

Im Gegensatz zu Kohanski et al. und Brynildsen et al. wiesen Van Acker et al. eine verringerte Expression von Enzymen der Atmungskette unter Antibiotikaeinfluss nach. Dies traf unter anderem auf Untereinheiten der Succinat-Dehydrogenase, der NADH-Dehydrogenase I und der Oxidoreduktase Cytochrom *bo₃* zu (Van Acker et al., 2013). Auch Kaldalu et al. zeigten eine Abnahme der Expression von *cyoD* (Cytochrom *bo₃*) und *nuoGJMN* (NADH-Dehydrogenase I) unter Einfluss von Ampicillin und Ofloxacin. Hierzu wurden Zellen von *E. coli* in der exponentiellen Phase mit bakteriziden Konzentrationen von Ampicillin und Ofloxacin induziert und eine Transkriptomanalyse durchgeführt (Kaldalu et al., 2004).

Als Enzym der Glutamat-Biosynthese katalysiert die Glutamat-Dehydrogenase (*gdhA*) die NADPH-abhängige Aminierung von α -Ketoglutarat zu L-Glutamat. Eine Beteiligung an ROS-bildenden Prozessen wurde in der bereits erwähnten Veröffentlichung von Van Acker et al. beschrieben (Van Acker et al., 2013).

Das Gen *zwf* kodiert für die Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase, ein Enzym aus dem Pentose-Phosphat-Weg. Das Gen unterliegt der Kontrolle des SoxRS-Regulons und ist somit direkt an der oxidativen Stressantwort beteiligt (Lu et al., 2005; Semchyshyn, Bagnyukova, & Lushchak, 2005). Mittels einer Reportergenkonstruktion aus dem Promotor von *zwf* und dem Gen *gfp* zeigten Lu et al. nach Zugabe von Paraquat eine erhöhte Genexpression (Lu et al., 2005). Eine geringe Zunahme der *zwf*-Expression nach Erhöhung der Sauerstoffkonzentration in einer Kultur wurde auch von Baez et al. bewiesen (Baez & Shiloach, 2013). Ebenfalls ein direkter Zusammenhang zwischen der Expression und Aktivität der Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase und oxidativem Stress wurde von Sandoval et al. erbracht. Die Zugabe von ROS induzierendem Tellurit zu einer Kultur von *E. coli* führte zu einer Überexpression von *zwf* sowie einer erhöhten Bildung von

NADPH. Sandoval et al. beschrieben die Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase als ein Schutzenzym vor oxidativem Stress (Sandoval, Arenas, & Vásquez, 2011).

Tabelle 3.6: Genauswahl zur Untersuchung des Einflusses bakterizider Antibiotika auf die Expression

Gen	Protein	Stoffwechselweg / Funktion	Referenz
<i>aceA</i>	Isocitratlyase	Glyoxylatweg	(Van Acker et al., 2013)
<i>acnA</i>	Aconitase A	TCA	(Brynildsen et al., 2013; Kohanski et al., 2007; Lu et al., 2005; Thomas et al., 2013)
<i>acnB</i>	Aconitase B	TCA	(Kohanski et al., 2007)
<i>arcA</i>	ArcA	Regulatorprotein des Arc-Zwei-Komponenten-Systems	(Kohanski et al., 2008)
<i>cpxP</i>	CpxP	Negativregulatorprotein des CpxRA-Zwei-Komponenten-Systems	(Kohanski et al., 2007; Kohanski et al., 2008; Mahoney & Silhavy, 2013)
<i>cyoD</i>	CyoD	Untereinheit der Oxidoreduktase Cytochrom <i>bo</i> ₃	(Brynildsen et al., 2013; Kaldalu et al., 2004; Van Acker et al., 2013)
<i>dinB</i>	DNA-Polymerase IV	Translasiionspolymerase	(Foti et al., 2012)
<i>gdhA</i>	Glutamat-Dehydrogenase	Glutamatsynthese	(Van Acker et al., 2013)
<i>iscS</i>	Cystein-Desulfurase	FeS-Clustersynthese	(Dwyer et al., 2007; Kohanski et al., 2007)
<i>sdhB</i>	SdhB	Eisen-Schwefel-Untereinheit der Succinat-Dehydrogenase aus TCA und Atmungskette	(Brynildsen et al., 2013; Van Acker et al., 2013)
<i>sodA</i>	Mn-Superoxiddismutase	Abbau von ROS; SoxRS-Regulon	(Baez & Shiloach, 2013; Dwyer et al., 2007; Goswami et al., 2006; Kaldalu et al., 2004; Lu et al., 2005)
<i>soxS</i>	SoxS	Transkriptionsaktivator des SoxRS-Regulons	(Baez & Shiloach, 2013; Dwyer et al., 2007; Lu et al., 2005)
<i>sucA</i>	α -Ketoglutarat-Dehydrogenase	TCA	(Brynildsen et al., 2013; Van Acker et al., 2013)
<i>zwf</i>	Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase	Pentosephosphatweg; SoxRS-Regulon	(Baez & Shiloach, 2013; Brynildsen et al., 2013; Lu et al., 2005; Sandoval et al., 2011)

3.1.2.2.1.3 Quantitative Ermittlung der Expression der Genauswahl unter Einfluss bakterizider Antibiotika

Von der in Kapitel 3.1.2.2.1.2 ermittelten Genauswahl wurde mittels qRT-PCR die Genexpression unter Einfluss der bakteriziden Antibiotika Ampicillin und Norfloxacin im Vergleich zu einer uninduzierten Kontrolle in einer Näherung untersucht. Für die Auswertung der Expressionswerte wurde die Methode nach Pfaffl herangezogen. Die PCR-Effizienzen wurden über das Auswertungsprogramm PCR Miner berechnet. Die Bestimmung der Expressionswerte erfolgte zunächst ausgehend von einer Präparation als Dreifachbestimmung.

E. coli R7/pHPKC3-02 wurde in M9-Medium bis zu einer OD_{600nm} von 0,2 angezogen und die Expression der ermittelten Genauswahl nach Zugabe unterschiedlicher Antibiotika (Ampicillin [5 µg/ml], Kanamycin [0,25 µg/ml, Norfloxacin [0,063 µg/ml] und Polymyxin [0,75 µg/ml], Chloramphenicol [1 µg/ml]) im Vergleich zu einer uninduzierten Kontrolle 1 h nach Antibiotikaexposition untersucht. Zur Reduzierung des Versuchsaufwandes wurden zunächst nur die Anzuchten mit Ampicillin und Norfloxacin in Bezug zur uninduzierten Kontrolle für die qRT-PCR eingesetzt.

Wie in Abb. 3.32 dargestellt führte die Zugabe von Ampicillin in *E. coli* R7/pHPKC3-02 zu einer mindestens zweifach erhöhten Expressionsänderung der Gene *cyoD*, *gdhA*, *dinB* und *sdhB*. Die höchste Expressionsänderung wurde für *sdhB* mit einem Faktor von etwa fünf erzielt. Die anderen untersuchten Gene zeigten Änderungen in der Genexpression von einem Faktor kleiner zwei. Für die Anzucht mit Norfloxacin war nur für die Gene *dinB* und *sdhB* eine Steigerung der Expression von größer zwei nachweisbar. Diese lag für *dinB* bei einem Faktor von etwa 2,5 und für *sdhB*, wie auch bei der Anzucht mit Ampicillin, bei einem Faktor von etwa fünf. Die Expressionswerte für *soxS* waren aufgrund von Ct-Werten im Bereich der NTCs nicht auswertbar und sind daher nicht dargestellt.

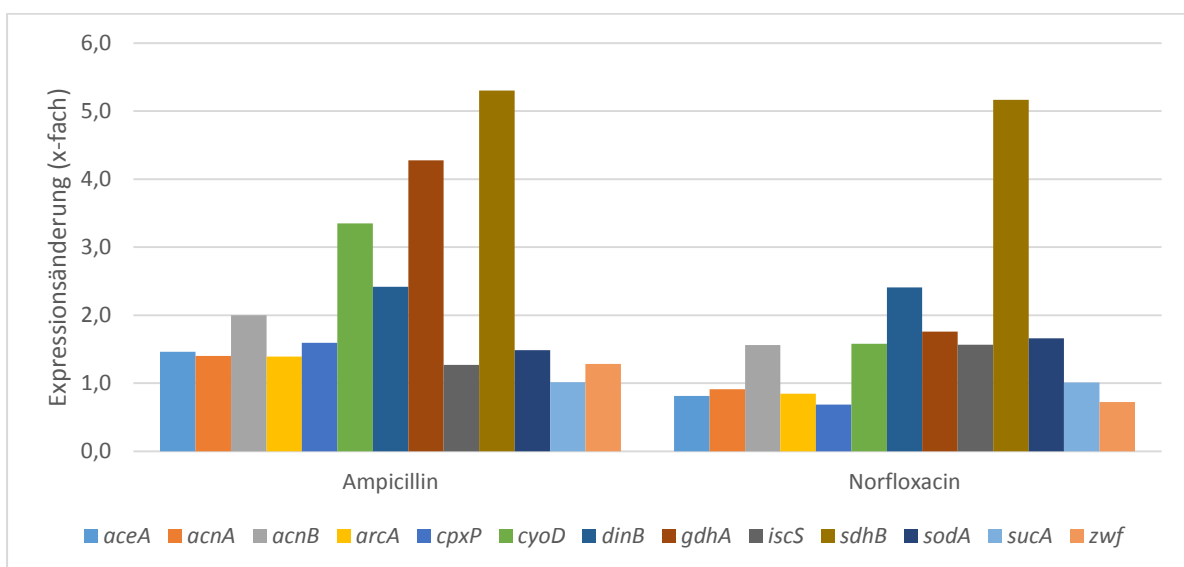


Abbildung 3.32: Expressionsänderung von *E. coli* R7/pHPKC3-02 nach Zugabe von Ampicillin und Norfloxacin; gemessen 1 h nach Antibiotikaexposition

Zur Bestätigung der beobachteten erhöhten Expression in Anwesenheit der bakteriziden Antibiotika Ampicillin und Norfloxacin wurde die qRT-PCR-Analyse für *sdhB* wiederholt und um die aus derselben Anzucht stammenden Proben mit Polymyxin und Kanamycin sowie mit dem als Negativkontrolle dienenden bakteriostatischen Chloramphenicol erweitert. Während für Chloramphenicol eine Expressionsänderung mit einem Faktor von etwa 1,5 nachweisbar war, zeigte sich bei Anzucht mit den bakteriziden Antibiotika eine Erhöhung der *sdhB*-Genexpression um den Faktor 3 – 5,5 (Abb. 3.33).

Ergänzend zur Bestimmung der PCR-Effizienzen über das Auswertungsprogramm PCR Miner wurde über eine Standardkurve die Vergleichbarkeit der PCR-Effizienzen von Referenz- und Untersuchungsgen bestätigt.

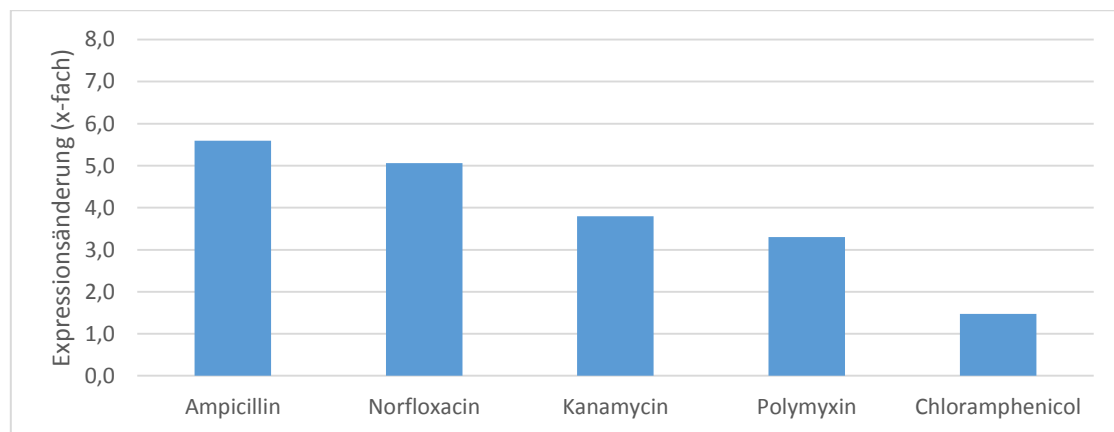


Abbildung 3.33: Expressionsänderung von *sdhB* unter Einfluss verschiedener Antibiotika; gemessen 1 h nach Antibiotikaexposition

Im Gegensatz zu den ersten Genexpressionsuntersuchungen (Abb. 3.32 und Abb. 3.33) konnten bei Wiederholungen mit neuen Anzuchten unter denselben Bedingungen die Werte erhöhter Genexpression für *sdhB* bzw. *dinB* nicht bestätigt werden. Das Ergebnis der Messung aus zwei bzw. drei unabhängig angezogenen Kulturen ist in Abbildung 3.34 dargestellt. Während bei der zweiten Wiederholung die Werte im Vergleich zur uninduzierten Kontrolle für *sdhB* sowohl unter Zugabe von Norfloxacin als auch von Ampicillin um etwa 2- bis 3-fach erhöht waren, zeigten die Werte der ersten Wiederholung keine relevante Änderung. Der Messwert für die Anzucht mit Norfloxacin zum Zeitpunkt 1 h der ersten Wiederholung war nicht auswertbar und wurde von den Ergebnissen ausgeschlossen. Auch die Werte der Genexpression für *dinB* waren in der Wiederholung im Vergleich zur ersten Messung geringer.

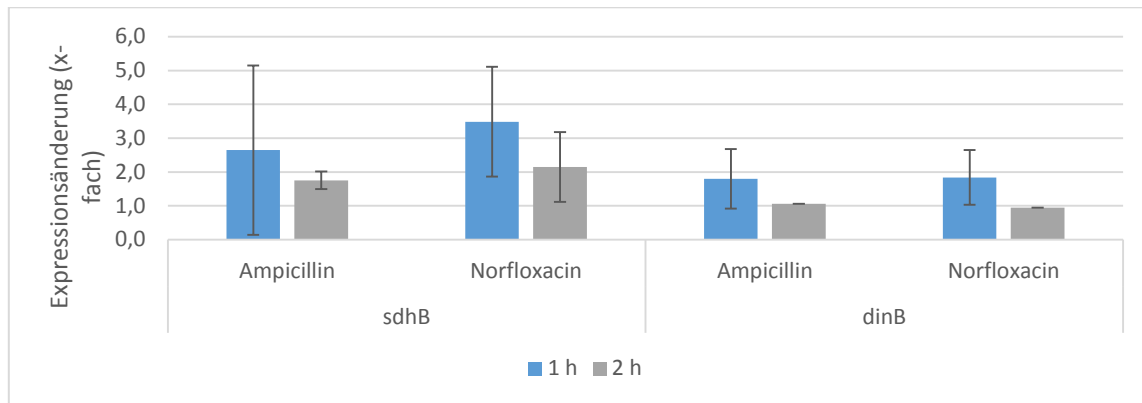


Abbildung 3.34: Ergebnis der Expressionsmessung für die Gene *sdhB* und *dinB* unter Zugabe von Ampicillin und Norfloxacin; gemessen 1 h und 2 h nach Antibiotikaexposition als Doppel- (*dinB*) bzw. Dreifachbestimmung (*sdhB*) in Triplikaten

Die eingesetzten Antibiotikakonzentrationen bei der Anzucht sowie die Versuchsdurchführung wurden bei allen Messungen gleich gehalten. Die OD der Zellen zum Zeitpunkt der Antibiotikazugabe war ebenfalls zwischen den Messungen vergleichbar. Bei Betrachtung der entsprechenden Keimzahlen konnte jedoch eine Abweichung zwischen der ersten Messung und den Wiederholungsmessungen festgestellt werden. Während die Keimzahl bei der ersten Messung zum Zeitpunkt der Antibiotikazugabe bei $1,6 \times 10^7$ KBE/ml lag, wiesen die Keimzahlbestimmungen der Wiederholungsmessungen Werte von $5,0 \times 10^7$ KBE/ml (1. Wiederholung) und von $5,4 \times 10^7$ KBE/ml (2. Wiederholung) auf (Abb. 3.35). Bei Betrachtung von Abbildung 3.35 ist des Weiteren zu erkennen, dass im Gegensatz zu den Anzuchten der Wiederholungsmessungen, bei denen die Antibiotikazugabe zu Beginn der exponentiellen Phase erfolgte, bei der Erstmessung diese noch in der Lag-Phase stattfand. Wiederum vergleichbar waren die maximal erreichbare Keimzahl sowie die durch die Antibiotika vermittelte Keimzahlreduzierung.

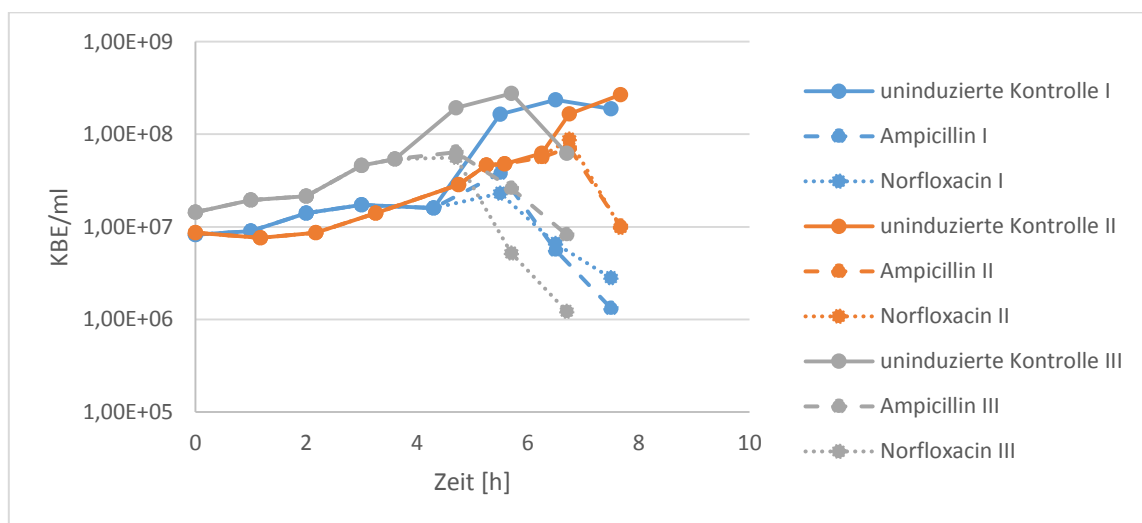


Abbildung 3.35: Vergleich des Wachstumsverhaltens der Anzuchten zur Isolierung der RNA; I = Anzucht der ersten Messung, II = Anzucht der 1. Wiederholung, III = Anzucht der 2. Wiederholung

Die voneinander abweichenden Ergebnisse für *sdhB* in Versuchen der qRT-PCR ermöglichten keine konkrete Aussage zur Expressionsänderung unter Zusatz bakterizider Antibiotika. Spekulativ ist die Tendenz einer Erhöhung nach Antibiotikaexposition erkennbar. Zur weiteren Untersuchung der *sdh*-Expression auf translationaler Ebene wurde der Promotor des *sdh*-Operons inklusive regulatorischer Einheiten für die Konstruktion des Reportersystems verwendet. Dies sollte weitere Aussagen zu einer veränderten Expression unter Einfluss bakterizider Antibiotika liefern.

3.1.2.2.2 Konstruktion des Reporterplasmides pHPKC3-04

Ausgehend von den Ergebnissen der qRT-PCR und der Literaturrecherche wurde das Reporterplasmid pHPKC3-04 konstruiert. Dieses trägt ein Fusionsprodukt aus dem Promotor inklusive weiterer regulatorischer Einheiten des *sdh*-Operons und dem Strukturgen von GFPmut2. Das Protein GFPmut2 stellt eine Variante des Wildtyp-GFPs dar, bei dem durch Aminosäureaustausch im Fluorophor eine erhöhte Fluoreszenzintensität erreicht wurde (Cormack et al., 1996).

Das Gen *sdhB* ist Teil des komplex regulierten *sdh*-Operons, welches über einen Promotor, die Transkriptionsfaktoren ArcA, CRP, Fur und Fnr sowie posttranskriptional über die sRNAs RybB, RyhB und Spot42 reguliert wird (Desnoyers & Masse, 2012; Massé & Gottesman, 2002; Park, Tseng, & Gunsalus, 1995). Die Transkription erfolgt über polycistronische mRNA. Die Anwesenheit eines zweiten Promotors, welcher sich in dem Gen *sdhC* befindet und die Transkription einer zweiten verkürzten polycistronischen mRNA initiiert, wird ebenfalls diskutiert (Wilde & Guest, 1986). Die regulatorischen Einheiten des Operons reichen ausgehend von *sdhC* von - 437 bp bis + 381 bp und umfassen damit einen Bereich von insgesamt 818 bp. Das Fusionsprodukt wurde über eine SOEing-PCR konstruiert. Für die Konstruktion der Einzelfragmente wurde ein 1072 bp großes PCR-Produkt mit den Primern *sdhB_fw_-1047bp_PstI* und *SOE_sdhB_gfp_rv* von Kochlysatz-DNA aus *E. coli* C600 (*sdh*-Fragment) sowie ein 815 bp großes PCR-Produkt mit den Primern *SOE_gfp_sdhB_fw* und *GFP_rv_+757_PstI* ausgehend von dem Vektor pKENGfpmut2 mit dem Gen für das Fluoreszenzprotein (*gfpmut2*-Fragment) amplifiziert (Cormack et al., 1996). Das erhaltene SOEing-Produkt besaß eine Größe von 1837 bp (Abb. 3.36) und wurde über die Restriktionsschnittstelle *PstI* in das Komplementationsplasmid pHPKC3-02 inseriert. Die natürlich vorkommende *PstI*-Schnittstelle direkt hinter *gfpmut2* wurde aufgrund einer längeren AT-reichen Region und der palindromischen Sequenz der *HindIII*-Schnittstelle, welche die Wahrscheinlichkeit zur Bildung von Primerdimeren erhöhen, nicht für das Primerdesign verwendet (Abb. 3.37). Der zwischen den *PstI*-Schnittstellen liegende Bereich von 45 bp wurde daher mittels Restriktionsverdau entfernt. Aufgrund der geringen Fragmentgröße und der begrenzten Auflösung im Agarosegel kann keine Aussage über die erfolgreiche Entfernung des kleinen Fragmentes nach Verdau bzw. eine genaue Fragmentgröße des SOEing-Produktes getroffen werden. Für die Funktionalität des Reporterplasmides besitzt die zusätzliche *PstI*-Schnittstelle jedoch keine Relevanz.

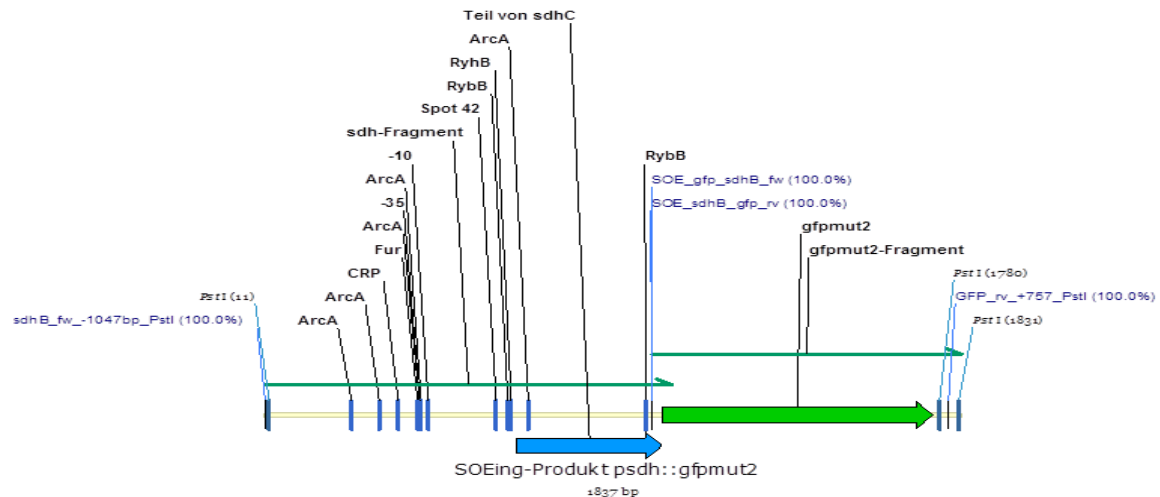


Abbildung 3.36: SOEing-Produkt aus den regulatorischen Einheiten des *sdh*-Operons und dem Strukturgen *gfpmut2*; Transkriptions- und Translationsregulatoren: Transkriptionsinhibitoren = ArcA und FNR; Transkriptionsaktivatoren = CRP, Fur und IHF; Translationsinhibierende regulatorische sRNAs = RyhB, Spot 42 und RybB

```

1601 ATACTCCAAT TGGCGATGGC CCTGTCTTT TACCAGACAA CCATTACCTG TCCACACAAT CTGCCCTTTC GAAAGATCCC AACGAAAAGA GAGACCCAT
    TATGAGGTTA ACCGCTACCG GGACAGGAAA ATGGTCTGTT GGTAATGGAC AGGTGTGTTA GACGGGAAAAG CTTCTAGGG TTGCTTTTCT CTCTGGTGTA

1701 GGTCTTCTTT GAGTTTGTAA CAGCTGCTGG GATTACACAT GGCATGGATG AACTATACAA ATAAATGTCC AGACCTGCAG GCATGCAAGC TTCTGTTTTG
    CCAGGAAGAA CTCAAACATT GTCGACGACC CTAATGTGTA CCGTACCTAC TTGATATGTT TATTACAGG TCTGGACGTC CGTACGTTTC AAGACAAAAC

1801 GCGGATGAGA GAAGATTTC AGCCTCTGCA GCTTGCA
    CGCCTACTCT CTCTCTAAAAG TCGGAGACGT CGAACGT
  
```

Abbildung 3.37: Sequenzausschnitt der C-terminalen Region von GFPmut2; grün = codierende Teilsequenz von *gfpmut2*; rot umrandet = AT-reiche Region

Nach Transformation des Ligationsansatzes wurden die Transformanten auf Tetracyclin-Agarplatten (LB_{Tet}) selektiert. Da sowohl der Ausgangsvektor pHPK3-02 als auch pHPK3-04 über eine intakte Tetracyclinresistenz verfügen, erfolgte die weitere Identifizierung möglicher rekombinanter Plasmide mittels PCR. Hierfür wurden sieben Pools aus jeweils fünf Transformanten zur Gewinnung von Kochlysat-DNA gebildet und die erhaltenen Plasmid-DNA-Mischungen mit den Primern SOE_gfp_sdhB_fw und GFP_rv_+757_PstI auf die Anwesenheit von *gfpmut2* untersucht. Nach Auftrennung der DNA-Fragmente in einem Agarosegel zeigten zwei Pools das gewünschte PCR-Produkt. Von den Transformanten aus diesen beiden Pools wurden die Plasmide mittels alkalischer Lyse jeweils einzeln isoliert und mittels Restriktionsanalyse weiter untersucht. Die abzentrifugierten Zellpellets von Übernachtskulturen der Transformanten T54 und T117 wiesen bereits eine deutliche grün-gelbliche Fluoreszenz auf, was auf eine Proteinexpression von GFPmut2 hinwies. Die Orientierung des jeweiligen Inserts sowie die Identität von pHPK3-04 konnten anschließend im Einzelverdau mit den Restriktionsenzymen *EcoRI* und *BamHI* bestätigt werden. Die erwarteten Fragmentgrößen für die gesuchten Plasmide lagen für den Einzelverdau mit *EcoRI* bei 6884 bp bzw. für den Einzelverdau mit

*Bam*HI je nach Orientierung des Inserts bei 3549 bp und 3335 bp bzw. 4898 bp und 1986 bp. Die unbestimmten Reihen aus Abbildung 3.38 stammen aus einem parallel mit aufgetragenen Restriktionsverdau des Plasmides pHPKC3-03 und sind hier zu vernachlässigen. Zusätzlich wurden durch Sequenzierung des *sdh*-Fragmentes sowie des Übergangsbereichs zu *gfpmut2* konstruktionsbedingte Mutationen im regulatorischen Bereich ausgeschlossen.

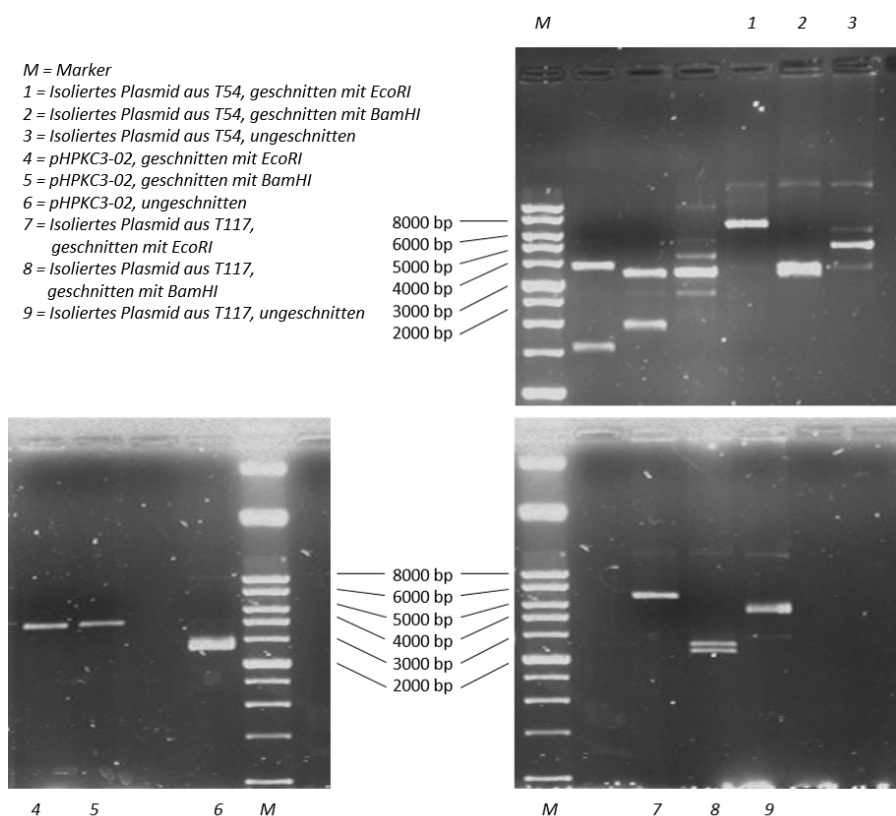


Abbildung 3.38: Restriktionsverdau von pHPKC3-04 und des Ausgangsplasmides pHPKC3-02 mit *Eco*RI und *Bam*HI

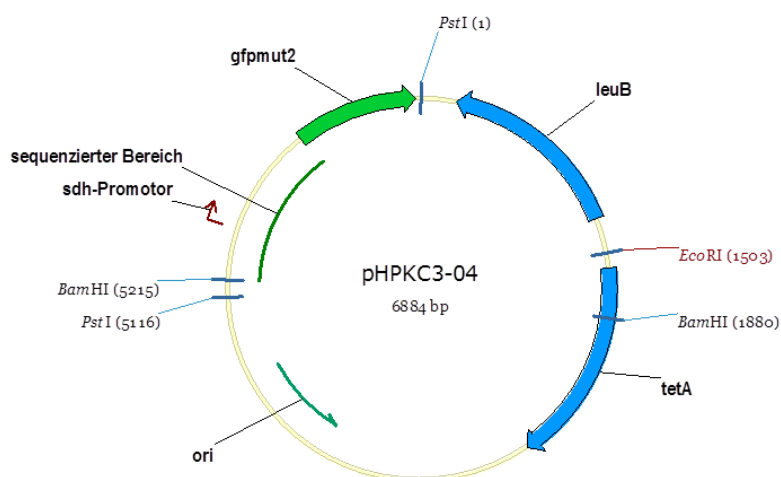


Abbildung 3.39: Plasmidkarte von pHPKC3-04

3.1.3 Messungen der Fluoreszenz von *E. coli* R7-Zellen mit pHPKC3-03, pHPKC3-05 und pHPKC3-04

Für die Messung der Fluoreszenzintensität wurde *E. coli* R7 mit den Reporterplasmiden pHPKC3-03, pHPKC3-04 und pHPKC3-05 transformiert und in dem Fluorimeter Mithras LB940 (Berthold Technologies) vermessen. Die Wellenlängen für Anregung und Emission betrugen 485 nm bzw. 535 nm. Mit Ausnahme der Vorversuche wurden die Fluoreszenzmessungen in Doppelbestimmung jeweils als Triplikate durchgeführt. Die Messwerte der Fluoreszenzbestimmungen wurden auf die OD_{600nm} normiert (RFU) und anschließend zur besseren Vergleichbarkeit von Doppelbestimmungen als prozentuale Abweichung zur uninduzierten Kontrolle angegeben (Kapitel 2.2.15). Trotz eines qualitativen Nachweissystems wurde die Bestimmungsgrenze für den Nachweis einer durch Antibiotika vermittelten Fluoreszenzänderung herangezogen. Diese wurde mithilfe der Leerwertmethode ermittelt und entspricht der 10-fachen Standardabweichung der uninduzierten Kontrolle. Die Begründung zur Wahl für die Bestimmungsgrenze und gegen die Nachweisgrenze wird in Kapitel 4.2.2.1 diskutiert.

Für die Versuche zur Induktion des Fluoreszenzproteins unter Antibiotikazugabe wurde mit Ausnahme der Bestimmung zur Sensitivität eine Konzentration von 1 x MHK gewählt. Diese lag unterhalb der von Kohanski et al. verwendeten Konzentrationen (Kohanski et al., 2007). Die Konzentration von 1 x MHK führte jedoch, wie anhand von KBE-Bestimmungen überprüft, bereits zu einer ausreichenden Reduzierung der Keimzahl und einer hierdurch anzunehmenden Induktion von Stressantworten. Anschließend sollten die bei einer Konzentration von 1 x MHK über das Reporterplasmid ermittelten Antibiotika in Untersuchungen zur Sensitivität in subinhibitorischen Konzentrationen untersucht werden. Der Zeitpunkt der Antibiotikazugabe wurde so gewählt, dass sich die Zellen in der frühen exponentiellen Phase befanden. Die kurze exponentielle Phase bestimmte des Weiteren die Zeitpunkte der Fluoreszenzmessung, welche auf 1 h und 2 h nach Antibiotikaexposition festgelegt wurden.

3.1.3.1 Vorversuche zur Fluoreszenzmessung

Zur Einschätzung der Fluoreszenzintensität und der Linearität des Messsignals wurde *E. coli* R7 mit den Plasmiden pHPKC3-03, pHPKC3-04 und mit pHPKC3-02 transformiert und als Tageskulturen nach einer Inkubationszeit von 8 h im Fluorimeter vermessen. Da sich zu diesem Zeitpunkt das Plasmid pHPKC3-05, welches das promotorlose Strukturgen *gfpmut2* tragen sollte, noch in der Konstruktion befand, wurde zunächst auf das Komplementationsplasmid pHPKC3-02, von dem ebenfalls keine *gfpmut2*-Expression ausging, als vorläufige Negativkontrolle zurückgegriffen. Beim Vergleich der Fluoreszenzintensitäten zeigte die Anzucht mit pHPKC3-03 durch den *srp*-Promotor eine starke *gfpmut2*-Expression. Die niedrigste Intensität wurde bei *E. coli* R7/pHPKC3-02 erreicht, was basierend auf Medium und Eigenfluoreszenz der Zellen, die Hintergrundfluoreszenz der Messung darstellte. Bei Messung der Zellen aus der Anzucht mit pHPKC3-04 überstieg das Fluoreszenzsignal um einen Faktor von 60 das Signal der Hintergrundfluoreszenz. Die bereits hohe Expression von *gfpmut2* im uninduzierten Zustand und die Auswirkungen auf das Messsystem sind kritisch zu

betrachten, da Antibiotika induzierte Signale durch die bereits hohe basale Expression von *gfpmut2* verdeckt und der Nachweis bakterizider Antibiotika über dieses Reportersystem gestört oder verhindert werden könnte.

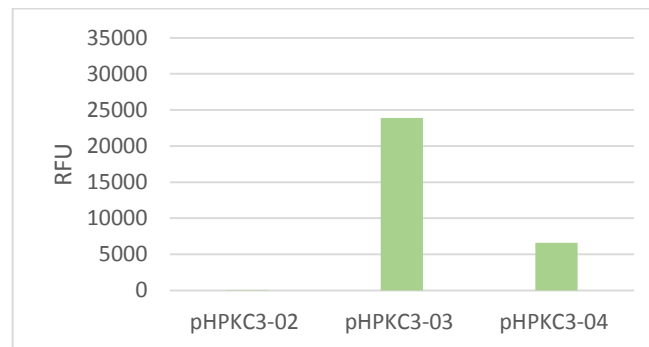


Abbildung 3.40: Vergleich der Fluoreszenzintensitäten von *E. coli* R7 transformiert mit den Plasmiden pHPKC3-02, pHPKC3-03 bzw. pHPKC3-04; Lampenenergie = 5000

Für die Messung zur Linearität von OD_{600nm} und Fluoreszenzintensität wurde von einer ÜNK von *E. coli* R7/pHPKC3-03 eine Verdünnungsreihe angesetzt und diese bei verschiedenen Lichtintensitäten gegen die Zelldichte, gemessen als OD_{600nm} aufgetragen. Die Lampenenergie stellt hierbei einen dimensionslosen Parameter in der Geräteeinstellung dar. Bei allen getesteten Lampenenergien konnte eine vergleichbare lineare Korrelation über die gesamte Messbandbreite nachgewiesen werden. Bei der Lampenenergie von 21.000 wurde die höchste Intensität erzeugt, die bei Betrachtung der Einzelwerte innerhalb der Triplikate jedoch die stärkste Abweichung zeigte. Aufgrund geringerer interner Abweichungen bei hoher Fluoreszenzintensität wurde für die folgenden Fluoreszenzmessungen die Einstellung der Lampenenergie auf 14.000 festgelegt.

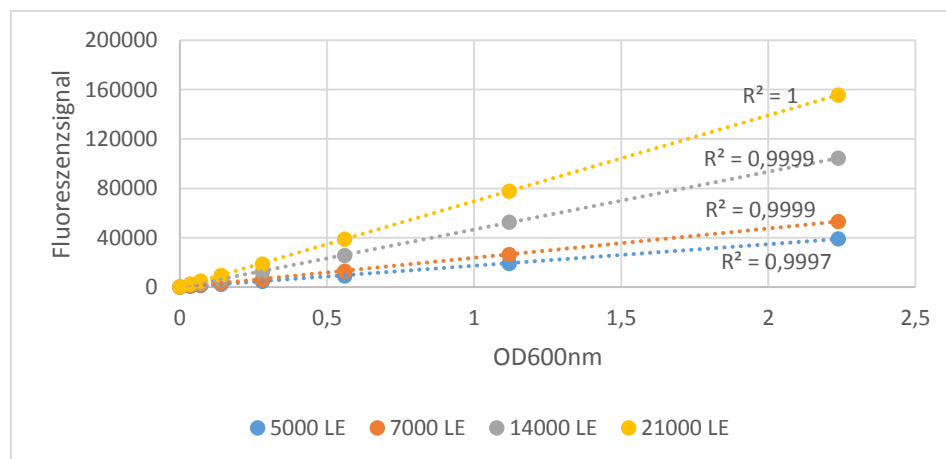


Abbildung 3.41: Messung der Linearität zwischen OD_{600nm} und Fluoreszenzsignal bei unterschiedlichen Lichtintensitäten; das Fluoreszenzsignal ist als Rohsignal angegeben; LE = Lampenenergie

3.1.3.2 Ermittlung der Eigenfluoreszenz verwendeter Antibiotika

In Abhängigkeit ihrer chemischen Struktur können Antibiotika, wie zum Beispiel Chinolone, bei geeigneter Anregungswellenlänge eine Eigenfluoreszenz besitzen und zu einer Störung der Fluoreszenzmessung beitragen (Jian Wang, 2014; Shen, 1989). Zur Ermittlung dieser Eigenfluoreszenz wurde *E. coli* R7 mit dem Kontrollplasmid pHPKC3-05 unter Zusatz von Antibiotika vermessen. Die in dieser Arbeit höchste eingesetzte Antibiotika-konzentration von 1 x MHK wurde in der frühen exponentiellen Phase hinzugegeben und die Fluoreszenzintensität 1 h und 2 h nach Antibiotikaexposition gemessen. Keines der zugegebenen Antibiotika bewirkte eine relevante Erhöhung des Fluoreszenzsignals in Bezug zur uninduzierten Kontrolle.

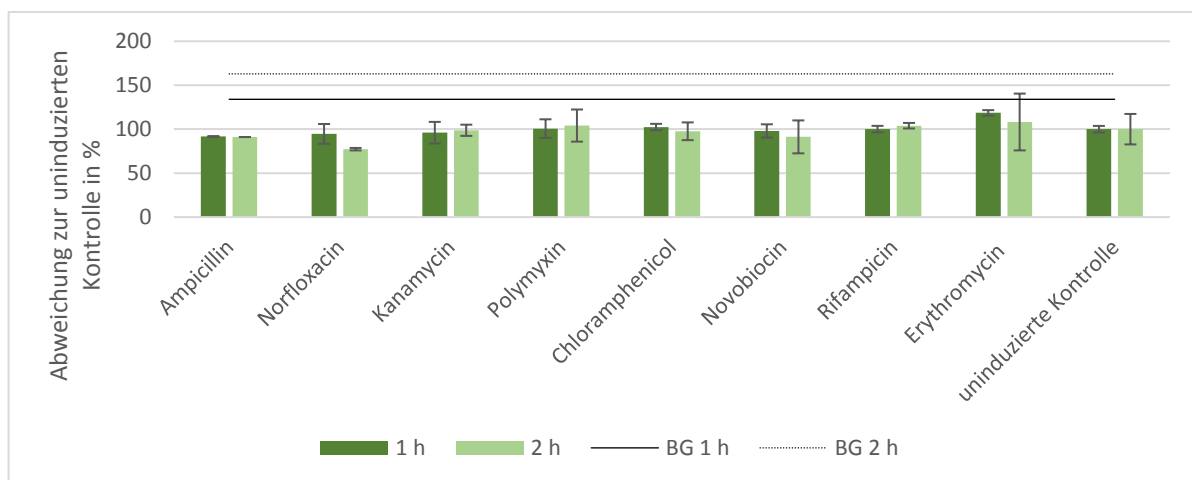


Abbildung 3.42: Untersuchung der Eigenfluoreszenz der verwendeten Antibiotika in einer Konzentration von 1 x MHK mit *E. coli* R7/pHPKC3-05; gemessen 1 h und 2 h nach Antibiotikaexposition; BG 1 h = obere Bestimmungsgrenze für Werte nach 1 h; BG 2 h = obere Bestimmungsgrenze für Werte nach 2 h

3.1.3.3 Untersuchung zur Spezifität zum Nachweis bakterizider Antibiotika mit pHPKC3-04

Nachdem die Identität des Plasmides pHPKC3-04 bestätigt war (Kapitel 3.1.2.2.2), wurde der Einfluss verschiedener Antibiotika in einer Konzentration von 1 x MHK auf die Expression des *sdh*-Operons in *E. coli* R7/pHPKC3-04 untersucht. Die Fluoreszenzmessung ergab für Zellen unter Anzucht mit einem der Antibiotika Ampicillin, Kanamycin, Polymyxin bzw. Rifampicin unter Berücksichtigung der Standardabweichungen eine geringe Zunahme der Fluoreszenzintensität oberhalb der jeweiligen Bestimmungsgrenzen. Die maximale Zunahme der Fluoreszenz gegenüber der uninduzierten Kontrolle lag bei der Anzucht mit Polymyxin mit einem Anstieg von 125 % vor. Eine Abnahme der Fluoreszenzintensität wurde bei den Anzuchten mit Chloramphenicol, Novobiocin und Erythromycin sowie bei Ampicillin zum Messzeitpunkt 2 h nach Antibiotikaexposition beobachtet. Die größte Abnahme mit einem Wert von ca. 60 % bezogen auf die uninduzierte Kontrolle wurde unter Zugabe von Novobiocin erreicht. Trotz hoher Antibiotikakonzentration von 1 x MHK wich die Fluoreszenzintensität der induzierten Proben nur geringfügig ab, sodass eine Übertragung des

Messsystems auf subinhibitorische Konzentrationen nicht möglich war. Des Weiteren lieferte das Messsystem keinen spezifischen Nachweis für Antibiotika mit bakterizidem Wirkungstyp.

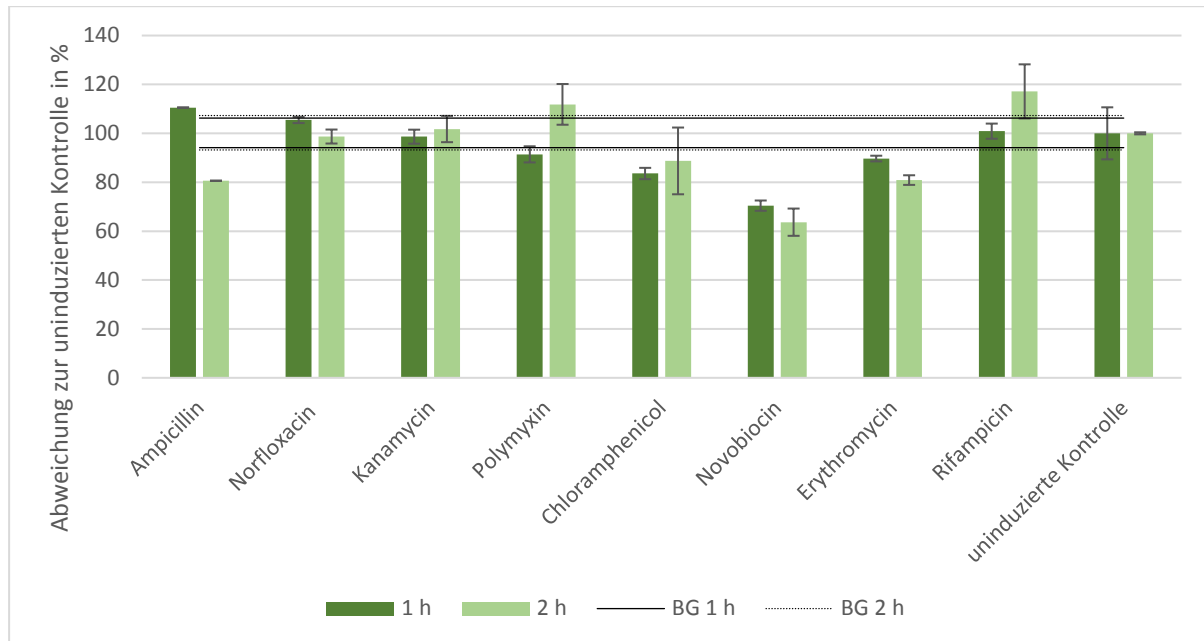


Abbildung 3.43: Fluoreszenzmessung von *E. coli* R7/pHPKC3-04 nach Zugabe verschiedener Antibiotika in einer Konzentration von 1 x MHK; gemessen 1 h und 2 h Antibiotikaexposition; BG 1 h = obere und untere Bestimmungsgrenze für Werte nach 1 h; BG 2 h = obere und untere Bestimmungsgrenze für Werte nach 2 h

3.1.4 Zusammenfassung der Ergebnisse zum Messsystem für den Nachweis bakterizider Antibiotika

Das Messsystem zum Nachweis bakterizider Antibiotika besteht aus einem hypersensitiven Sensorstamm von *E. coli*, bezeichnet als die $\Delta toIC$ -Mutante *E. coli* R7, welche mit Fluoreszenz-basierten Reportersystemen transformiert und in Anwesenheit von Antibiotika vermessen wurde. Der Nachweis antibiotischer Substanzen in der Umgebung des Sensorstammes beruht hierbei auf der Induktion des mit dem Gen des Fluoreszenzproteins GFPmut2 fusionierten Promotors, welcher in Anwesenheit von Antibiotika im Vergleich zu einer uninduzierten Kontrolle zu einer veränderten Expression von *gfpmut2* führen sollte.

In Vorversuchen zur Etablierung des Messsystems konnte eine direkte Korrelation zwischen der OD_{600nm} und dem Fluoreszenzsignal sowie die Toleranz zur Bildung größerer Mengen von GFPmut2 in *E. coli* R7 nachgewiesen werden (Kapitel 3.1.3.1). Des Weiteren zeigten Versuche mit dem Kontrollplasmid pHPKC3-05, dass die Eigenfluoreszenz der verwendeten Antibiotika vernachlässigbar ist (Kapitel 3.1.3.2).

Von der nach Literaturrecherche getroffenen Auswahl von Genen aus Stoffwechselwegen, Reparatur- und Schutzsystemen sowie aus Signaltranskriptions- und Synthesewegen versprach das Gen *sdhB* aus dem *sdh*-Operon den größten Erfolg auf eine veränderte Expression durch bakterizide Antibiotika. Aufgrund nicht

reproduzierbarer Ergebnisse in der qRT-PCR wurde die *sdh*-Expression mittels eines Reportersystems auf translationaler Ebene untersucht. Hierfür wurde der Promotor inklusive regulatorischer Einheiten mit *gfpmut2* als SOEing-Produkt in pHPKC3-02 inseriert und das Reporterplasmid pHPKC3-04 erhalten.

In Fluoreszenzmessungen sowohl unter Einfluss von bakteriziden als auch bakteriostatischen Antibiotika konnte jedoch keine starke Erhöhung der *sdh*-Expression nachgewiesen werden. Die Abweichungen zur uninduzierten Kontrolle lagen trotz Induktion mit hohen Antibiotikakonzentrationen im Bereich von 60 – 125 % und zeigten keinen Zusammenhang zwischen der Expression des *sdh*-Operons und dem bakteriziden Wirkungstyp. Das Reporterplasmid pHPKC3-04 wurde demnach für den spezifischen und sensitiven Nachweis bakterizider Antibiotika als ungeeignet bewertet.

3.2 Erweiterung um drei individuelle Messsysteme zum spezifischen Nachweis von DNA-Schäden, Zellhüllstress und Störungen der Zellwandsynthese

Das entwickelte biosensorische Messsystem auf Basis der *sdh*-Expression erzielte in Fluoreszenzversuchen weder die benötigte Sensitivität zum Nachweis subinhibitorischer Konzentrationen noch die gewünschte Spezifität gegenüber dem bakteriziden Wirkungstyp (Abb. 3.43). Die zum damaligen Zeitpunkt neu erschienenen Veröffentlichungen, die die von Kohanski et al. aufgestellte Hypothese in Frage stellten und bis heute zu einer kontroversen Diskussion bezüglich des gemeinsamen Wirkmechanismus durch ROS beitragen, unterstützten zusätzlich die Überlegung den bisher verfolgten Ansatz zur Etablierung eines biosensorischen Messsystems zum Nachweis bakterizider Antibiotika um ein Messsystem zu erweitern, welches auf spezifische Stressstimuli einzelner Antibiotikaklassen basiert (Ezraty et al., 2013; Keren et al., 2013; Liu & Imlay, 2013). Dazu wurden drei voneinander unabhängige Reportersysteme konstruiert und diese im Stammhintergrund *E. coli* R7 vermessen. Bei den induzierenden Stimuli der Reportersysteme handelte es sich um Schäden an der DNA, gekennzeichnet durch Strangbrüche (Kapitel 3.2.1), Zellhüllstress (Kapitel 3.2.2) sowie Störungen der Zellwandsynthese (Kapitel 3.2.3). Die Erweiterung des Messsystems ermöglichte die Ausdehnung des Anwendungsspektrums auf Vertreter bakteriostatischer Antibiotikaklassen, wie beispielsweise Hemmer der Proteinbiosynthese.

3.2.1 Messsystem zum Nachweis von DNA-Schäden

Die Ursachen für DNA-Schäden sind vielseitig und umfassen neben UV-Strahlung, Hydroxylradikalen und Chemikalien auch antibakterielle Substanzen wie die Gruppe der Chinolone. Die Behandlung mit Chinolonen führt zu Strangbrüchen in der DNA und zur Aktivierung der SOS-Antwort, einem Schutzsystem der Zelle, welches Maßnahmen zum temporären Zellarrest und zur Reparatur einleitet (Kohiyama, Contremoulins, & Baudin, 2013; Laponogov et al., 2009; Schroder, Goerke, & Wolz, 2013). Das Protein RecA übernimmt in der

Aktivierung der SOS-Antwort eine zentrale Rolle. Die Aktivierung von RecA führt zur autokatalytischen Spaltung von LexA, einem Protein, das durch Bindung an Promotorbereiche, den sogenannten LexA-Boxen, die Transkription diverser Gene reprimiert. Die Verwendung des *recA*-Promotors stellt daher den zentralen Bezugspunkt des Messsystems zum Nachweis von DNA-Schäden dar. Neben den Chinolonen als klassische Induktoren der SOS-Antwort führt auch die Behandlung mit β -Laktamantibiotika zu einer Aktivierung des Systems. Diese erfolgt indirekt über das DipBA-Zwei-Komponenten-System (DipBA-TCS) (Miller et al., 2004).

3.2.1.1 Konstruktion des Reporterplasmides pHPKC3-06

Für die Konstruktion des Reporterplasmides pHPKC3-06 wurde der Promotor von *recA*, welcher zwischen der -10- und der -35-Region eine Bindestelle des LexA-Repressors (LexA-Box) besitzt, mit dem Gen *gfpmut2* über ein SOEing-Produkt fusioniert und in das Komplementationsplasmid pHPKC3-02 inseriert. Das SOEing-Produkt war im Rahmen eines Arbeitskreis-internen Projektes generiert und aus dem Vektor pHPJufo3 über Restriktionsverdau mit *PstI* isoliert worden. Nach Transformation des Ligationsansatzes wurden die Transformanten auf Tetracyclin-Agarplatten selektiert. Die Plasmidisolierung mittels alkalischer Lyse und der anschließende Restriktionsverdau mit *EcoRI* und *NsiI* zeigten das für pHPKC3-06 erwartete Bandenmuster in der Agarosegelelektrophorese von 6138 bp im Einzelverdau mit *EcoRI* und im Doppelverdau mit *EcoRI* und *NsiI* von 2352 bp und 3786 bp. Die Sequenzierung des Promotorbereiches und des *gfpmut2*-Übergangs bestätigten, dass keine konstruktionsbedingten Mutationen in regulatorischen Bereichen vorlagen.

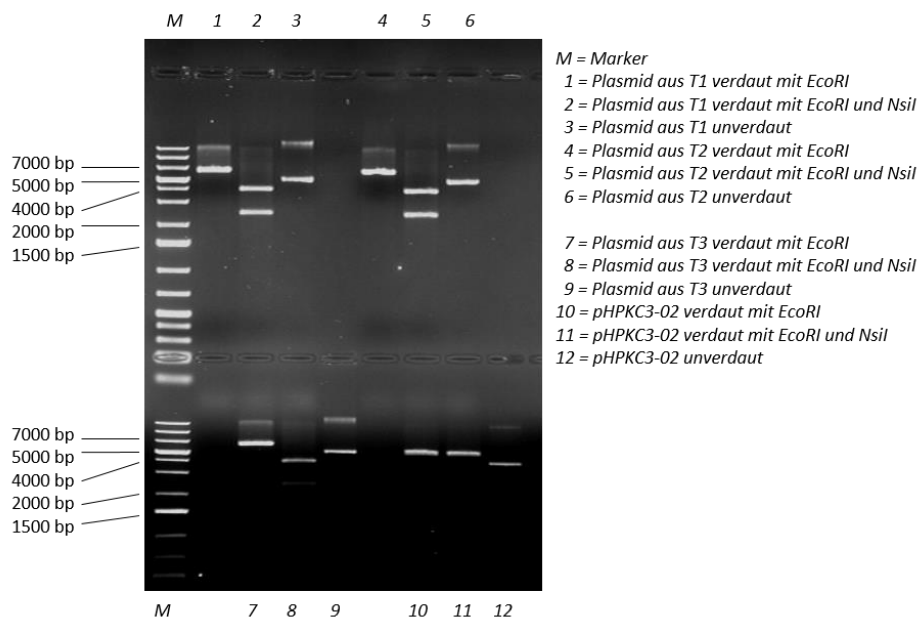


Abbildung 3.44: Restriktionsverdau von pHPKC3-06 und des Ausgangsplasmides pHPKC3-02 im Einzelverdau mit *EcoRI* sowie im Doppelverdau mit *EcoRI* und *NsiI*

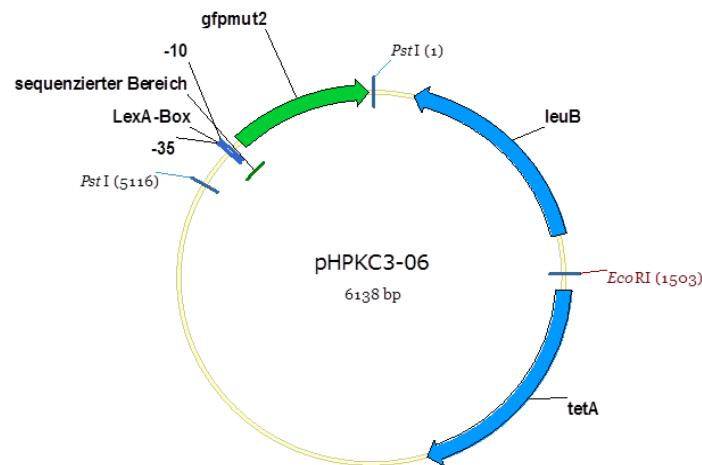


Abbildung 3.45: Plasmidkarte von pHPKC3-06 mit dem Reportergenkonstrukt *precA-gfpmut2*

3.2.1.2 Fluoreszenzmessungen mit pHPKC3-06

E. coli R7 wurde mit dem Plasmid pHPKC3-06 transformiert und analog zu den vorherigen Versuchen in M9-Medium angezogen. Die Messung der Fluoreszenzintensität erfolgte 1 h und 2 h nach Antibiotikaexposition. Die Rohdaten der Fluoreszenzmessungen wurden auf die OD_{600nm} normiert (RFU) und als prozentuale Angabe zur uninduzierten Kontrolle angegeben.

3.2.1.2.1 Untersuchung zur Spezifität

Von den zugegebenen Antibiotika führten nur die Antibiotika Norfloxacin und Rifampicin zu einer Steigerung der *recA*-Expression. Während eine Induktion der SOS-Antwort für Fluorchinolone bereits mehrfach nachgewiesen wurde, stellt dies für Rifampicin eine neuere Beobachtung dar, die nur von Kohanski et al. in den Ergänzungen zur Veröffentlichung des gemeinsamen Wirkmechanismus beschrieben wurde (Baharoglu & Mazel, 2014; Dwyer et al., 2007; Kohanski et al., 2007; Phillips et al., 1987). Die Fluoreszenzintensität unter Zugabe von Norfloxacin erreichte im Vergleich zur uninduzierten Kontrolle nach 1 h eine Steigerung von fast 600 % bzw. nach 2 h von etwa 1100 %. Die Induktion unter Rifampicin war schwächer als unter Norfloxacin und lag nach 1 h bei einer Steigerung von etwa 200 % und nach 2 h bei etwa 450 %. Eine Induktion unter Zugabe von Ampicillin konnte nicht nachgewiesen werden. Auch die Zugabe von Novobiocin dessen Zielstruktur die B-Untereinheit der Gyrase darstellt, führte wie erwartet aufgrund eines von den Fluorchinolonen abweichenden Wirkmechanismus, zu keiner Steigerung der Fluoreszenzintensität (Schroder et al., 2013). Unter Zugabe der anderen Antibiotika war ebenfalls keine Steigerung zu beobachten. Die, als Kontrolle für die Wirksamkeit der eingesetzten Antibiotika, durchgeführte Bestimmung der KBE, zeigte für die mit Kanamycin versetzte Probe eine im Vergleich zur uninduzierten Kontrolle unveränderte KBE/ml. Das Ergebnis der Fluoreszenzmessung wurde daher für Kanamycin ausgeschlossen. Das Messsystem zum Nachweis auf DNA-Schäden zeigte somit sowohl eine hohe Sensitivität als auch Spezifität.

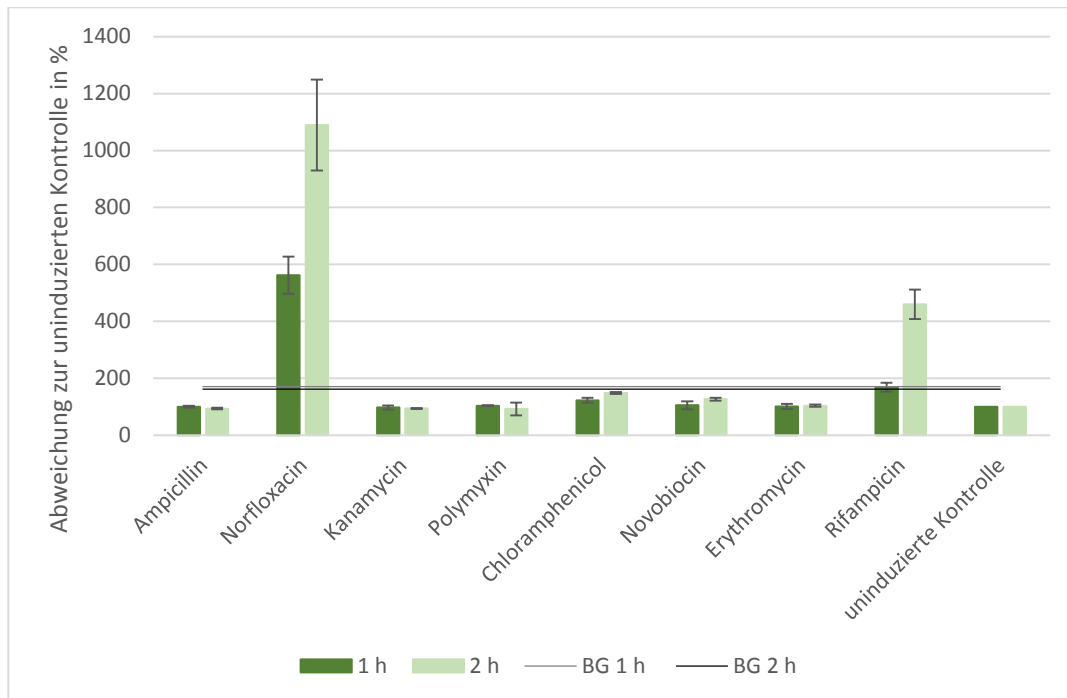


Abbildung 3.46: Untersuchung der Spezifität von *E. coli* R7/pHPKC3-06; gemessen 1 h und 2 h nach Antibiotikaexposition; BG 1 h = obere Bestimmungsgrenze für Werte nach 1 h; BG 2 h = obere Bestimmungsgrenze für Werte nach 2 h

3.2.1.2.2 Untersuchung zur Sensitivität

Die Untersuchung zur Spezifität ergab eine Erhöhung der *recA*-Expression unter Einfluss der Antibiotika Norfloxacin und Rifampicin. Zur Untersuchung der Sensitivität wurde *E. coli* R7/pHPKC3-06 bis zur frühen exponentiellen Phase angezogen, die Kultur aufgeteilt und Norfloxacin bzw. Rifampicin jeweils in den Konzentrationen 1 x MHK, 0,2 x MHK und 0,04 x MHK hinzugegeben. Zusätzlich wurde in der Wiederholungsmessung für Rifampicin ein Kolben mit 0,5 x MHK vermessen.

Das Ergebnis der Fluoreszenzmessung zeigte sowohl für Norfloxacin als auch für Rifampicin bei Erhöhung der Antibiotikakonzentration eine Zunahme der Fluoreszenzintensität bzw. der *recA*-Expression. Die Bestimmungsgrenze für Norfloxacin lag mit 2 % Abweichung minimal oberhalb des 2 h-Messwertes für die Konzentration 0,2 x MHK. Ein Nachweis für Norfloxacin ist demnach bei Konzentrationen größer 0,2 x MHK entsprechend 0,0064 µg/ml erfassbar.

Bezogen auf Rifampicin lieferte die 0,5 x MHK entsprechend einer Konzentration von 4 µg/ml die geringste nachweisbare Konzentration.

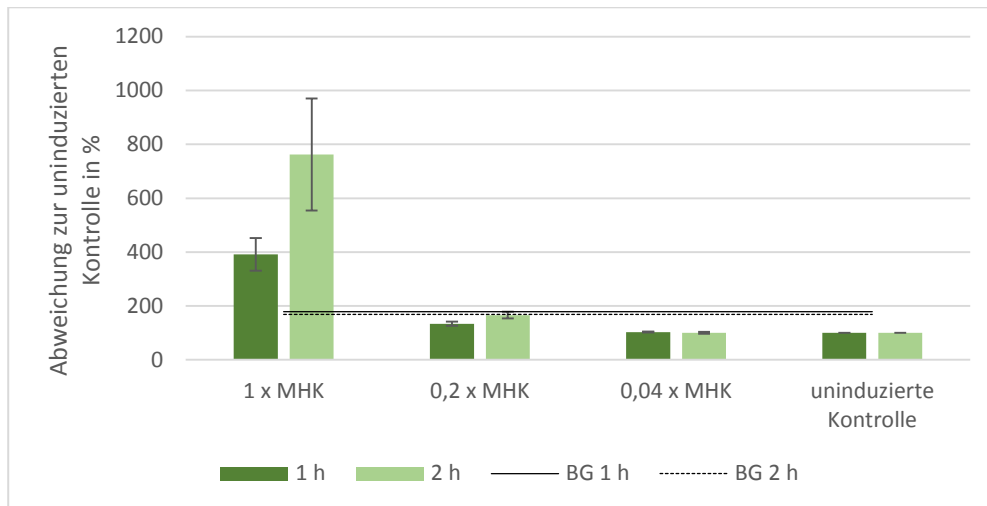


Abbildung 3.47: Untersuchung der Sensitivität von *E. coli* R7/pHPKC3-06 für Norfloxacin; gemessen 1 h und 2 h nach Antibiotikaexposition; BG 1 h = obere Bestimmungsgrenze für Werte nach 1 h; BG 2 h = obere Bestimmungsgrenze für Werte nach 2 h

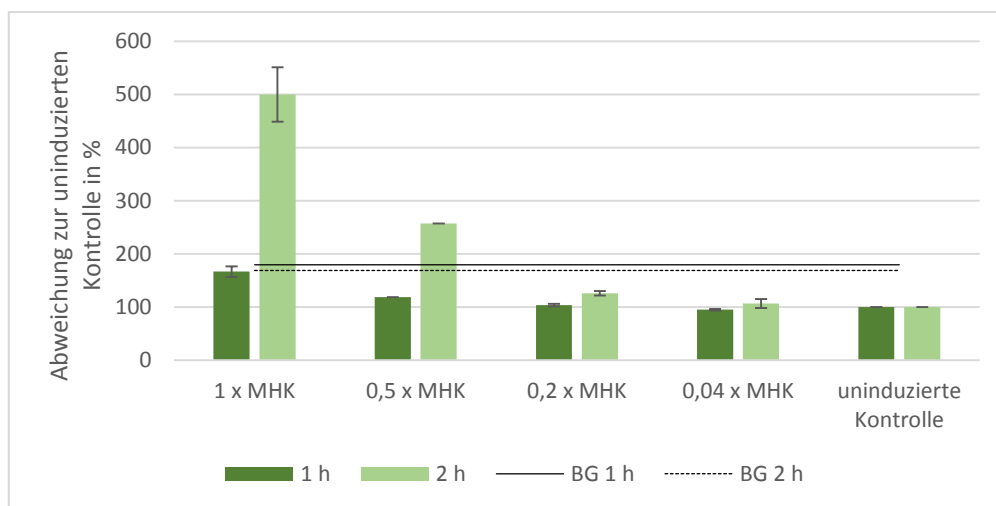


Abbildung 3.48: Untersuchung der Sensitivität von *E. coli* R7/pHPKC3-06 für Rifampicin; gemessen 1 h und 2 h nach Antibiotikaexposition; BG 1 h = obere Bestimmungsgrenze für Werte nach 1 h; BG 2 h = obere Bestimmungsgrenze für Werte nach 2 h

3.2.2 Messsystem zum Nachweis von Zellhüllstress

Die Zellhülle schützt das Bakterium vor äußeren Einflüssen und reguliert den selektiven Ein- und Ausstrom von Nährstoffen und Xenobiotika [61]. Stressstimuli in der Zellhülle sind vielseitig und umfassen unter anderem die Veränderung von Umweltbedingungen sowie die Anwesenheit fehlgefalteter Proteine. Ein klassischer Induktor von Zellhüllstress stellt daher die Gruppe der Aminoglykoside dar, die zu Fehlablesungen der mRNA und dadurch zu fehlerhaften und fehlgefalteten Proteinen führt. Die Aktivierung von Schutzsystemen zur Erhaltung der Integrität der Zellhülle und der dadurch induzierten veränderten Genexpression

als Antwort auf Zellhüllstress, sollte die Basis dieses Messsystems darstellen. Hierfür wurde über Literaturrecherche eine Genauswahl ermittelt, für die ein Zusammenhang mit Zellhüllstress bzw. eine veränderte Expression nach Exposition mit Aminoglykosiden beschrieben war und anschließend in einer Näherung über die qRT-PCR untersucht wurde.

3.2.2.1 Literaturrecherche zur Promotorwahl des Reporterplasmides

Die durch Literaturrecherche ermittelte Genauswahl umfasst vorwiegend Gene aus der Hitzeschockantwort und ist in Tabelle 3.7 einschließlich Funktion und Referenzen angegeben. Der folgende Abschnitt umfasst eine kurze Zusammenfassung zur Begründung der Genauswahl. Details zu Versuchsdurchführungen und -bedingungen sind den jeweiligen Referenzen zu entnehmen.

ClpB

Bei dem Protein ClpB handelt es sich um eine ATP-abhängige Protease, welche in Kooperation mit dem DnaK-System an der Auflösung von Proteinaggregaten beteiligt ist (Ling et al., 2012). Shaw et al. zeigten nach Zugabe von Kanamycin zu einer exponentiell wachsenden Kultur von *E. coli* eine konzentrationsabhängige Steigerung der *clpB*-Expression im Bereich von 0,5 x bis 4 x MHK (Shaw et al., 2003). Bei Proteinaggregaten in *E. coli*, verursacht durch das Aminoglykosid Streptomycin, wiesen Ling et al. eine Anreicherung von ClpB, IbpA und IbpB in den Aggregaten sowie eine Beteiligung an der Auflösung dieser nach (Ling et al., 2012). Eine erhöhte Expression nach Zugabe von Gentamicin und Kanamycin wurde bezogen auf eine mit Spectinomycin behandelte Probe von Kohanski et al. ermittelt (Kohanski et al., 2007; Kohanski et al., 2008).

CpxP

CpxP ist ein Mitglied des Cpx-Zwei-Komponentensystems (Cpx-TCS) mit negativ regulierender Funktion des TCS und Beteiligung an der Degradierung fehlgefalteter Proteine durch die Protease DegP. Stimuli für die Aktivierung des Cpx-TCS stellen unter anderem Veränderungen des pH-Wertes, der Osmolarität, der Zusammensetzung der Membranphospholipide, Überexpression von fehlgefalteten Piluseinheiten sowie die Substanzen Kupfer, EDTA, Ethanol und Indol dar (Bury-Mone et al., 2009; Danese & Silhavy, 1998; Jones et al., 1997; Price & Raivio, 2009; Prigent-Combaret et al., 2001; Snyder et al., 1995; Yamamoto & Ishihama, 2006).

Das Cpx-TCS agiert als klassisches Zwei-Komponenten-Signaltransduktionssystem und besteht aus dem cytoplasmatischen Regulatorprotein CpxR und der membranständigen Sensorkinase CpxA. An der cytoplasmatischen Domäne von CpxA erfolgen unter ATP-Verbrauch die Autophosphorylierung eines konservierten Histidinrestes und der anschließende Transfer des Phosphates auf einen Aspartatrest in der aminoterminalen Domäne von CpxR. Das resultierende CpxR~P kontrolliert die Expression der Gene des Cpx-Regulons

sowohl in einer negativ als auch positiv regulierenden Funktion. Das Protein CpxP, das über CpxR~P positiv reguliert wird, besitzt eine entscheidende regulierende Funktion innerhalb des Cpx-TCS. Es interagiert direkt mit der Sensorkinase CpxA und fungiert sowohl als Negativregulator für CpxA als auch als Adaptermolekül bei der Proteolyse fehlgefalteter Proteine durch DegP (Isaac et al., 2005; Tschauner et al., 2014). Im stressfreien Zustand verhindert CpxP die Autophosphorylierung von CpxA und inhibiert die Cpx-Stressantwort (Fleischer et al., 2007). Der genaue Mechanismus der Inhibierung von CpxA durch CpxP ist noch nicht vollständig geklärt, wird allerdings auf Basis elektrostatischer Wechselwirkungen vermutet. Aufgrund der schalenförmigen Struktur von CpxP mit einer vorwiegend positiv geladenen konkaven und einer negativ geladenen konvexen Oberfläche wird eine Interaktion zwischen der konkaven Seite von CpxP und den negativ geladenen Aminosäureresten der periplasmatischen Domäne von CpxA angenommen (Thede et al., 2011; Zhou et al., 2011). Die Stimulierung der *cpxP*-Expression erfolgt durch Aktivierung der Cpx-Stressantwort, wobei *cpxP* eines der am stärksten induzierbaren Gene des Regulons darstellt (DiGiuseppe & Silhavy, 2003). Eine signifikante Erhöhung der *cpxP*-Expression durch Gentamicin wiesen Kohanski et al. in *E. coli* MG1655 mittels qRT-PCR nach (Kohanski et al., 2008). Ebenso zeigten sie eine erhöhte Expression nach Zugabe von Kanamycin im Vergleich zum bakteriostatischen Antibiotikum Spectinomycin (Kohanski et al., 2007).

Ein Zusammenhang zwischen Mutationen im Cpx-Locus und der Entstehung von Aminoglykosidresistenz wurde bereits mehrfach beschrieben (Debnath et al., 2013; Kohanski et al., 2008; Mahoney & Silhavy, 2013; Rainwater & Silverman, 1990; Thorbjarnardottir, Magnusdottir, & Eggertsson, 1978). Dabei führen sowohl Mutationen in der Sensorkinase CpxA, die einen Verlust der Proteinfunktionalität bewirken als auch Mutationen, die eine konstitutive Expression von CpxA vermitteln zu einer Aktivierung der Cpx-Antwort und einer verringerten Empfindlichkeit gegenüber Aminoglykosiden (Kohanski et al., 2008; Mahoney & Silhavy, 2013). Die Aktivierung des Cpx-TCS trotz fehlendem CpxA wird über den Verlust der Phosphataseaktivität von CpxA gegenüber dem phosphoryliertem Regulatorprotein CpxR~P begründet, aufgrund derer CpxR vorwiegend durch andere Kinasen phosphoryliert vorliegt und die Transkription der Cpx-regulierten Gene initiiert (Mahoney & Silhavy, 2013).

DnaK

Das Protein DnaK stellt das zentrale Chaperon der Hitzeschockantwort dar, welches in Kooperation mit DnaJ und GrpE sowohl an der Faltung neu entstandener Polypeptidketten als auch an der Reparatur fehlgefalteter Proteine als Folge von Stressreaktionen beteiligt ist (Schröder et al., 1993; Teter et al., 1999). Die bereits erwähnte Veröffentlichung von Shaw et al. zeigte in einem Microarray eine erhöhte Expression von *dnaK* nach Zugabe von Kanamycin in den Konzentrationen von 0,5 x MHK bis 4 x MHK. Die Zunahme der Expression korrelierte hierbei mit der zugesetzten Antibiotikakonzentration und umfasste einen Bereich von 3,5- bis 37-facher Änderung (Shaw et al., 2003). Auch Kohanski et al. wiesen eine erhöhte Expression von *dnaK*

nach Zugabe von Kanamycin und Gentamicin im Vergleich zu Spectinomycin in *E. coli* nach (Kohanski et al., 2007; Kohanski et al., 2008). Der Beweis einer Aktivierung der Hitzeschockantwort nach Zugabe von Kanamycin wurde von VanBogelen und Neidhardt mittels 2D-Gelelektrophorese erbracht (VanBogelen & Neidhardt, 1990).

GroEL

Das Protein GroEL ist Teil der GroE-Chaperon-Maschine, eines der wichtigsten Chaperonsysteme in *E. coli* (Knippers, 2006; Taguchi, 2005). GroEL ist an der Faltung neu synthetisierter Proteine beteiligt, die Hauptaufgabe besteht jedoch in der Aufhebung von Fehlfaltungen aufgrund von Stressreaktionen, ausgelöst beispielsweise durch hohe Temperaturen (Knippers, 2006). Die plasmidvermittelte kombinierte Überexpression von GroEL und GroES führte nach Zugabe von Gentamicin in *E. coli* zu einer Erhöhung der Überlebensrate (Goltermann, Good, & Bentin, 2013). Die erhöhte Expression von GroEL nach Behandlung mit Kanamycin und Gentamicin im Vergleich zu Spectinomycin wurde von Kohanski et al. nachgewiesen (Kohanski et al., 2007; Kohanski et al., 2008).

HslV

HslV ist die Peptidase-Komponente der ATP-abhängigen Protease HslVU und ist beteiligt an der Degradierung von Proteinen im Rahmen der Hitzeschockantwort (Rohrwild et al., 1997). In den bereits erwähnten Veröffentlichungen von Shaw et al. und Kohanski et al. lag auch für *hslV* nach Behandlung mit Kanamycin bzw. Gentamicin eine Erhöhung der Expression vor (Kohanski et al., 2007; Kohanski et al., 2008; Shaw et al., 2003). Eine Erhöhung der MHK für Kanamycin und Streptomycin nach Überexpression von *hslV* wurde von Ling et al. beschrieben (Ling et al., 2012).

HtpG

Bei dem Protein HtpG handelt es sich um ein Chaperon mit ATPase-Aktivität, welches dem eukaryotischen Hsp90 entspricht (Panaretou et al., 1998). Shaw et al. beschreiben eine 4,5- bis 30-fache Expressionsänderung von *htpG* nach Zugabe unterschiedlicher Konzentrationen von Kanamycin (Shaw et al., 2003). Ebenso wiesen Kohanski et al. nach Behandlung mit Gentamicin und Kanamycin eine erhöhte Expression im Vergleich zu einer mit Spectinomycin behandelten Probe nach (Kohanski et al., 2007; Kohanski et al., 2008).

IbpB

Ebenfalls zur Gruppe der Chaperone gehört das kleine Hitzeschockprotein IbpB, welches fehlgefaltete Proteine stabilisiert und unter Vermeidung einer irreversiblen Aggregation diese an weitere Chaperonsysteme

für eine ATP-abhängige Faltung vermittelt (Kuczyńska-Wisnik et al., 2002; Veinger et al., 1998). Eine Überexpression von *ibpB* wurde von Shaw et al. in einem Microarray unter Zugabe von Kanamycin in einer Konzentration von 1 x MHK und 4 x MHK nachgewiesen. Die Expressionssteigerung erstreckte sich in einem Bereich von 3- bis 300-facher Änderung (Shaw et al., 2003). Der Nachweis von Streptomycin über einen *ibpB-lacZ*-Reporter in *E. coli* zeigte ebenfalls einen Zusammenhang zwischen *ibpB* und Aminoglykosiden (Bianchi & Baneyx, 1999). Auch Kohanski et al. wiesen eine im Vergleich zu Spectinomycin erhöhte Expression von *ibpB* nach Behandlung mit Gentamicin und Kanamycin nach (Kohanski et al., 2007; Kohanski et al., 2008).

Tabelle 3.7: Übersicht ausgewählter Gene für die Promotorwahl des Messsystems zum Nachweis von Zellhüllstress

Gen	Protein	Funktion	Referenz
<i>clpB</i>	ClpB	Protease	(Kohanski et al., 2007; Kohanski et al., 2008; Ling et al., 2012; Shaw et al., 2003)
<i>cpxP</i>	CpxP	Negativregulatorprotein des Cpx-TCS	(Debnath et al., 2013; DiGiuseppe & Silhavy, 2003; Kohanski et al., 2007; Kohanski et al., 2008; Mahoney & Silhavy, 2013; Price & Raivio, 2009;
<i>dnaK</i>	DnaK	Chaperon	(Kohanski et al., 2007; Kohanski et al., 2008; Shaw et al., 2003; VanBogelen & Neidhardt, 1990)
<i>groEL</i>	GroEL	Chaperonin	(Goltermann et al., 2013; Kohanski et al., 2007; Kohanski et al., 2008; Taguchi, 2005)
<i>hslV</i>	HslV	Peptidase-Komponente der HslVU-Protease	(Kohanski et al., 2007; Kohanski et al., 2008; Ling et al., 2012; Shaw et al., 2003)
<i>htpG</i>	HtpG	Chaperon	(Kohanski et al., 2007; Kohanski et al., 2008; Shaw et al., 2003)
<i>ibpB</i>	IbpB	Chaperon	(Bianchi & Baneyx, 1999; Kohanski et al., 2007; Kohanski et al., 2008; Shaw et al., 2003)

3.2.2.2 Quantitative Ermittlung der Expression unter Einfluss von Kanamycin

Von der durch Literaturrecherche ermittelten Genauswahl (*clpB*, *cpxP*, *dnaK*, *groEL*, *hslV*, *htpG*, *ibpB*) wurde mittels qRT-PCR die Expression nach Induktion von Zellhüllstress untersucht. Die Messung der Genexpression erfolgte in einer Einzelbestimmung als Triplikat und ist daher als Näherung zu betrachten. Für die Anzucht zur RNA-Isolierung wurde *E. coli* R7/pHPKC3-02 in M9-Medium bis zur frühen exponentiellen Phase angezogen und zur Provokation einer möglichst starken Stressreaktion, mit Kanamycin in einer Konzentra-

tion von 2,5 x MHK versetzt. Aufgrund des späten Wirkungseintritts des Antibiotikums, welcher in der Bestimmung der KBE/ml erst 2 h nach Antibiotikaexposition zu beobachten war, wurden die Zellen unter Berücksichtigung des Übergangs in die Absterbephase, zum Messzeitpunkt 2 h und 3 h geerntet. Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte über die effizienzkorrigierte Methode nach Pfaffl, die Bestimmung der PCR-Effizienzen mithilfe des Auswertungsprogrammes PCR Miner. Als zusätzliche Kontrolle wurde die Vergleichbarkeit der PCR-Effizienzen von *cpxP* und dem Referenzgen über eine Standardkurve bestätigt.

Das Ergebnis der qRT-PCR zeigte nur für die Gene *cpxP* und *ibpB* eine geringfügige Erhöhung der Expression unter Einfluss von Kanamycin. Während für *ibpB* der Wert der Expressionsänderung nach 3 h auf eine etwa 1,5-fache Expressionsänderung abnahm, blieb das Niveau für *cpxP* trotz beginnender Absterbephase mit einem Faktor von etwa zwei konstant.

Die Wahl des Promotors für das Reporterplasmid pHPKC3-08 wurde auf Grundlage der Literaturrecherche, wobei hierbei für das Cpx-TCS bzw. *cpxP* im Zusammenhang mit Aminoglykosiden die umfangreichsten Daten vorlagen, sowie aufgrund der Ergebnisse zur Näherung der qRT-PCR getroffen.

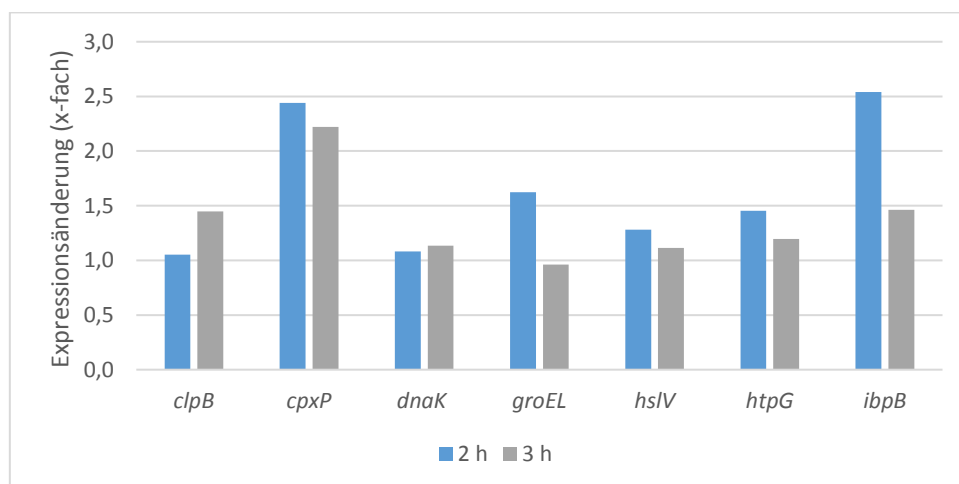


Abbildung 3.49: Expressionsänderung der Genauswahl in *E. coli* R7/pHPKC3-02 unter Zusatz von Kanamycin; gemessen 2 h und 3 h nach Antibiotikaexposition

3.2.2.3 Plasmidkonstruktion von pHPKC3-08

Für die Konstruktion des Reporterplasmides pHPKC3-08 wurde der Promotor von *cpxP* inklusive regulatorischer Einheiten in einer SOEing-PCR mit dem Gen *gfpmut2* fusioniert und in das Komplementationsplasmid pHPKC3-02 inseriert.

Die Regulation von *cpxP* erfolgt über einen Promotor und mindestens zwei Bindungsstellen für CpxR, dem Regulatorprotein des Cpx-TCS (De Wulf, Kwon, & Lin, 1999; Yamamoto & Ishihama, 2006). Das Cpx-TCS ist in Kapitel 3.2.2.1 detailliert beschrieben. Die Einzelfragmente für die SOEing-PCR wurden mit den Primern *cpxP*_EcoK12_5_-451 und *cpxP*-*gfpmut2*_3_+25 von Kochlysat-DNA aus *E. coli* R7 sowie mit den Primern

cpxP-gfpmut2_5_-25 und GFP_rv_+757 vom Vektor pKEngfpmut2 amplifiziert. Das erhaltene SOEing-Produkt besaß eine Größe von 1253 bp und wurde nach Restriktionsverdau in die *Pst*I-Schnittstelle von pHPKC3-02 inseriert.

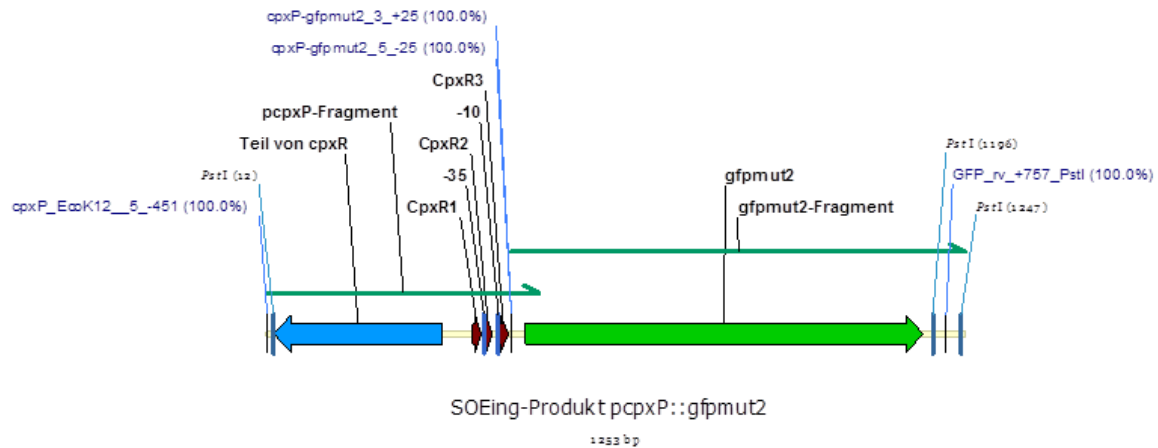
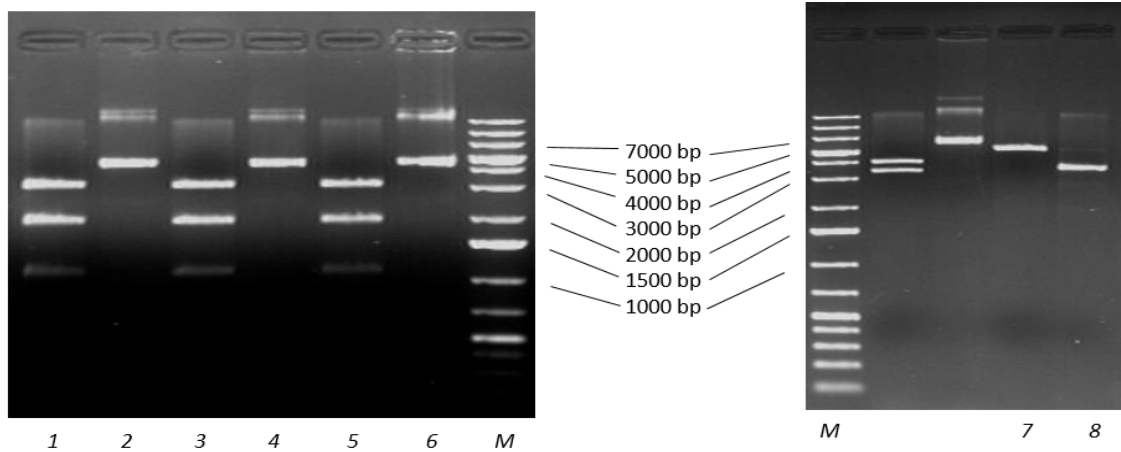


Abbildung 3.50: SOEing-Produkt aus dem Promotorbereich von *cpxP* und dem Strukturgen von *gfpmut2*

Nach einer mittels PCR durchgeführten Vorselektion der erhaltenen Transformanten wurde die Identität von pHPKC3-08 nach Plasmidisolierung im Restriktionsverdau mit *NdeI* überprüft. Die erwarteten Fragmentgrößen von 1128 bp, 1997 bp und 3174 bp lagen bei den vorselektierten Plasmiden vor, womit die Identität von pHPKC3-08 bestätigt wurde. Die nicht beschriebenen Reihen stammen aus parallel aufgetragenen Restriktionsverdauansätzen und sind für das Ergebnis irrelevant. Analog der Transformanten mit pHPKC3-04 zeigten auch die positiv-selektierten Transformanten mit pHPKC3-08 eine grün-gelbliche Fluoreszenz ohne Induktion. Über Sequenzierung des *cpxP*-Promotorbereiches und des Übergangs zu *gfpmut2* wurden konstruktionsbedingte Mutationen im regulatorischen Bereich ausgeschlossen.



M = Marker

1 = Isoliertes Plasmid aus T44, geschnitten mit NdeI

2 = Isoliertes Plasmid aus T44, ungeschnitten

3 = Isoliertes Plasmid aus T46, geschnitten mit NdeI

4 = Isoliertes Plasmid aus T46, ungeschnitten

5 = Isoliertes Plasmid aus T30, geschnitten mit NdeI

6 = Isoliertes Plasmid aus T30, ungeschnitten

7 = pHPKC3-02, geschnitten mit NdeI

8 = pHPKC3-02, ungeschnitten

Abbildung 3.51: Restriktionsverdau von pHPKC3-08 und des Ausgangsplasmides pHPKC3-02 mit NdeI

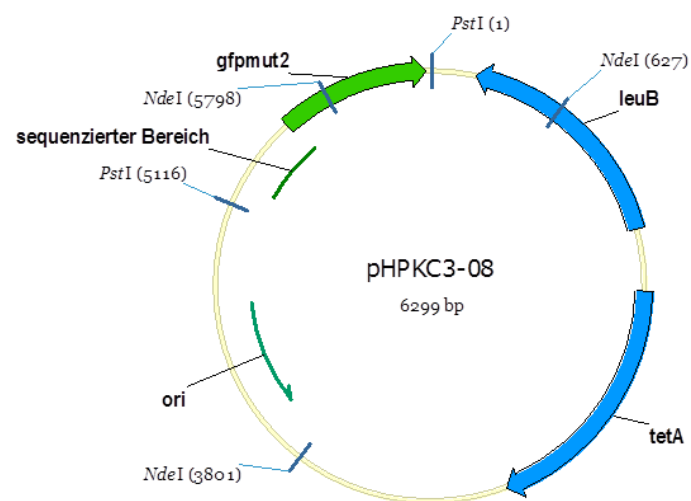


Abbildung 3.52: Plasmidkarte von pHPKC3-08

3.2.2.4 Fluoreszenzmessungen mit pHPKC3-08

E. coli R7 wurde mit dem Reporterplasmid pHPKC3-08 transformiert und hinsichtlich Sensitivität, Induzierbarkeit und Spezifität untersucht.

3.2.2.4.1 Untersuchung zur Sensitivität

Für die Untersuchung der Sensitivität wurde *E. coli* R7/pHPKC3-08 nach Erreichen der frühen exponentiellen Phase mit Kanamycin in den Konzentrationen von 1 x MHK, 0,5 x MHK und 0,2 x MHK versetzt und die Fluoreszenzintensität 1 h und 2 h nach Antibiotikaexposition gemessen.

Aufgrund der Aktivierung des Cpx-TCS durch die Anwesenheit fehlgefalteter Proteine und die dadurch erzeugte Induktion der *cpxP*-Expression wurde für die Messung mit pHPKC3-08 unter Zusatz von Kanamycin eine Zunahme der Fluoreszenzintensität angenommen. Entgegen den Erwartungen lag keine erhöhte relative Fluoreszenzintensität vor. Die Fluoreszenzintensität unter Zusatz von Kanamycin lag unabhängig von der Konzentration im Bereich der uninduzierten Kontrolle.

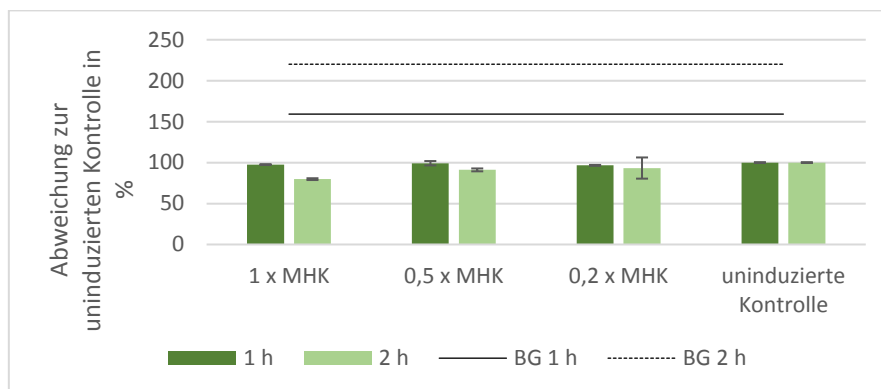


Abbildung 3.53: Untersuchung der Sensitivität von *E. coli* R7/pHPKC3-08 am Beispiel von Kanamycin; gemessen 1 h und 2 h nach Antibiotikaexposition; BG 1 h = obere Bestimmungsgrenze für Werte nach 1 h; BG 2 h = obere Bestimmungsgrenze für Werte nach 2 h

3.2.2.4.2 Untersuchung zur Spezifität

Nachdem für die Anzucht mit Kanamycin keine Erhöhung der Fluoreszenzintensität nachgewiesen wurde (Abb. 3.53), wurde die Reporterkonstruktion unter Zugabe weiterer Antibiotika aus unterschiedlichen Klassen getestet. Hierbei zeigten die mit den Proteinbiosynthesehemmern Erythromycin, Linezolid und Chloramphenicol bzw. dem Transkriptioninhibitor Rifampicin versetzten Kolben eine Abnahme der relativen Fluoreszenzintensität. Die Abnahme lag zum Messzeitpunkt 2 h bei etwa 50 % und ist aufgrund der Unterschreitung der Bestimmungsgrenze als signifikant zu betrachten. Eine gestörte Bildung des Fluoreszenzproteins aufgrund des Wirkmechanismus dieser Antibiotika wurde daher in einem folgenden Versuch mit dem

Kontrollplasmid pHPKC3-03 überprüft (Kapitel 3.2.2.4.3). Die Zugabe der weiteren untersuchten Antibiotika bewirkte keine relevante Änderung der Fluoreszenzintensität.

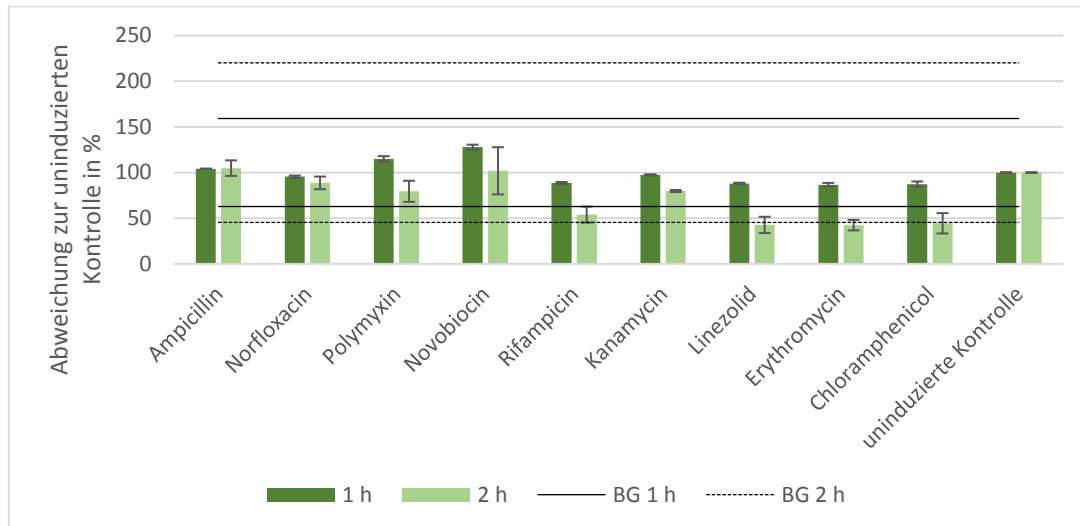


Abbildung 3.54: Untersuchung der Spezifität von *E. coli* R7/pHPKC3-08; gemessen 1 h und 2 h nach Antibiotikaexposition; BG 1 h = obere und untere Bestimmungsgrenze für Werte nach 1 h; BG 2 h = obere und untere Bestimmungsgrenze für Werte nach 2 h

3.2.2.4.3 Überprüfung der Fluoreszenzproteinbildung unter Zugabe von Inhibitoren der Proteinbiosynthese und der Transkription

Aufgrund der verringerten relativen Fluoreszenzintensität unter Zugabe von Inhibitoren der Proteinbiosynthese und der RNA-Polymerase, gemessen mit pHPKC3-08, wurde die Fähigkeit zur Bildung des Fluoreszenzproteins unter Zugabe von Erythromycin, Chloramphenicol, Linezolid, Kanamycin und Rifampicin überprüft. Hierfür wurde *E. coli* R7/pHPKC3-03 1 h und 2 h nach Antibiotikaexposition in einer Konzentration von 1 x MHK vermessen. Die Fluoreszenzmessung unter Rifampicin erfolgte als Einmalbestimmung. Bei einer vom Wirkmechanismus abhängigen Störung der Fluoreszenzproteinbildung wäre bei Untersuchungen mit pHPKC3-03 aufgrund der durch den *srf*-Promotor vermittelten starken *gfpmut2*-Expression ebenfalls eine Abnahme der Fluoreszenzintensität zu erwarten.

Wie in Abbildung 3.55 zu erkennen ist, führte keines der zugefügten Antibiotika zu einer mit pHPKC3-08 vergleichbaren Abnahme der Fluoreszenzintensität. Die niedrigste relative Fluoreszenzintensität war beim 1 h-Messwert für Rifampicin mit 90 % zu beobachten. Die Mittelwerte der 2 h-Messwerte mit Ausnahme von Rifampicin lagen alle bei Werten über 100%. Die Abnahme der Fluoreszenzintensität mit pHPKC3-08 ist demnach vermutlich nicht auf eine gestörte Fluoreszenzproteinbildung zurückzuführen.

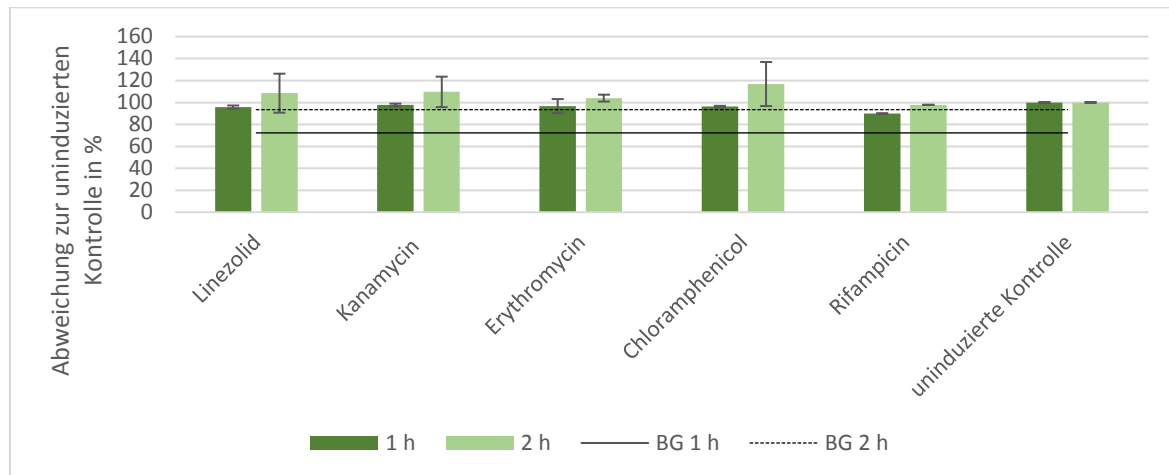


Abbildung 3.55: Untersuchung zur Störung der Fluoreszenzproteinbildung mit *E. coli* R7/pHPKC3-03 unter Zusatz von Proteinbiosynthesehemmern und Rifampicin; gemessen 1 h und 2 h nach Antibiotikaexposition; BG 1 h = untere Bestimmungsgrenze für Werte nach 1 h; BG 2 h = untere Bestimmungsgrenze für Werte nach 2 h

3.2.2.4.4 Überprüfung der Induzierbarkeit der Reporterkonstruktion

Zur Überprüfung der generellen Induzierbarkeit der Reporterkonstruktion und zum Ausschluss eines Konstruktionsfehlers wurde zu einer Anzucht von *E. coli* R7/pHPKC3-08 in der frühen exponentiellen Phase NaOH hinzugegeben und der pH-Wert auf 8 eingestellt. Die Alkalisierung des Mediums stellt einen Induktor von CpxP dar und sollte bei korrekter Konstruktion zu einer Erhöhung der Fluoreszenzintensität führen (Danese & Silhavy, 1998). Die Fluoreszenzintensität für den Messpunkt 1 h nach Induktion lag oberhalb der Bestimmungsgrenze und bestätigte die durch NaOH erwartete Fluoreszenzerhöhung aufgrund induzierter *cpxP*-Expression. Die weitere Steigerung der Fluoreszenzintensität zum Messzeitpunkt 2 h nach Induktion war nur gering und lag mit einer im Vergleich zum 1 h-Messwert um 8 % erhöhten Zunahme unterhalb der Bestimmungsgrenze. Eine Induzierbarkeit der *cpxP*-Expression konnte grundsätzlich gezeigt werden.

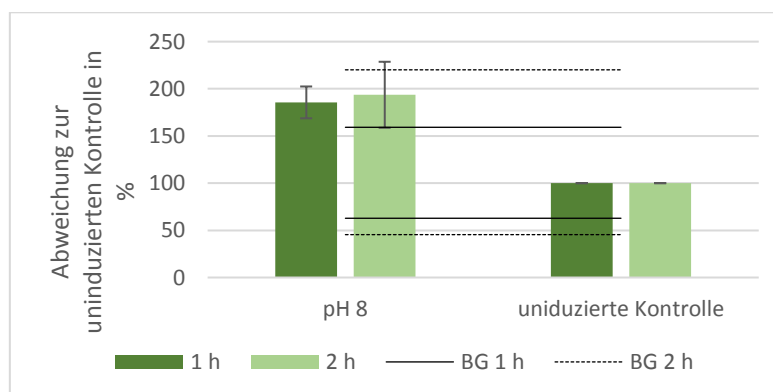


Abbildung 3.56: Untersuchung der Induzierbarkeit von *cpxP* unter Zusatz von NaOH; BG 1 h = obere und untere Bestimmungsgrenze für Werte nach 1 h; BG 2 h = obere und untere Bestimmungsgrenze für Werte nach 2 h

Die Reporterkonstruktion mit dem Promotor von *cpxP* führte entgegen der Erwartung zu keiner Antibiotika induzierten Steigerung der relativen Fluoreszenzintensität bei Zellhüllstress, sondern zu einer Abnahme nach Zugabe von Inhibitoren der Proteinbiosynthese sowie des RNA-Polymerase-Inhibitors Rifampicin. Für das bakterizid wirkende Kanamycin wurde keine relevante Abnahme der Fluoreszenzintensität nachgewiesen. Das ursprüngliche Anwendungsspektrum von Antibiotika, die Stress in der Zellhülle induzieren, musste aufgrund des Ergebnisses für Kanamycin eingeschränkt werden. Die Anwendbarkeit als Nachweissystem ist begrenzt auf die bakteriostatischen Proteinbiosynthesehemmer und Rifampicin.

3.2.3 Messsystem zum Nachweis von Störungen der Zellwandsynthese

β -Laktamasen sind bakterielle Enzyme, die aufgrund der Spaltung des für β -Laktamantibiotika charakteristischen Laktamrings eine Inaktivierung des Antibiotikums und eine Resistenz gegenüber dieser Wirkstoffklasse vermitteln. Die Induktion des Enzyms basiert auf der Anwesenheit von Zellwandbestandteilen, sogenannten Anhydromuropeptiden, welche verstärkt als Folge einer β -Laktambehandlung oder aufgrund des natürlichen Recyclingprozesses der Zellwand auftreten (Johnson et al., 2013).

Die Induktion der β -Laktamase AmpC wurde für das Reportersystem zum Nachweis von Störungen in der Zellwand bzw. als direkter Nachweis für β -Laktamantibiotika herangezogen. Da die in *E. coli* natürlich vorkommende AmpC- β -Laktamase aufgrund der Abwesenheit des Regulatorproteins AmpR nicht induzierbar ist, wurde *ampR* sowie der intergenetische Bereich von *ampR* und *ampC* aus einem Stamm der Spezies *Citrobacter freundii* für die Reporterkonstruktion verwendet (De Meester et al., 1986). AmpR reguliert die Expression von *ampC* sowohl in Anwesenheit als auch in Abwesenheit eines Induktors und ermöglicht somit eine Induzierbarkeit der β -Laktamase in *E. coli* (Kapitel 1.4.2.1). Weitere Proteine, die die Induktion von AmpC beeinflussen sind die Amidase AmpD, die transmembrane Permease AmpG sowie die β -Glucosaminidase NagZ (Johnson et al., 2013). Mutationen in diesen Genen können zu einer veränderten Induzierbarkeit von AmpC führen und den Nachweis von Antibiotika über das biosensorische Messsystem beeinflussen. Zum Ausschluss einer mutationsbedingten veränderten Induzierbarkeit wurde der aus *Citrobacter freundii* GK100 für die Konstruktion des Reporterplasmides pHPKC3-13 amplifizierte Bereich sequenziert. Mutationen in *ampD*, *ampG* und *nagZ* waren aufgrund des bekannten Stammbhintergrunds von *E. coli* C600 nicht zu erwarten, sodass auf die Sequenzierung dieser Gene verzichtet wurde.

3.2.3.1 Sequenzierung von *ampR* und des intergenetischen Bereiches von *ampR* und *ampC* in *Citrobacter freundii* GK100

Die Sequenzierung von *ampR* sowie des zwischen *ampR* und *ampC* liegenden Bereiches mit den Promotoren *pampC* und *pampR* erfolgte mit den Primern *ampR*_Cf_fw_+910 und *ampC*_Cf_rv_+36. Aufgrund stammspezifischer Variationen in *Citrobacter freundii* wurden die erhaltenen Sequenzen von GK100 mit

den Sequenzen von *Citrobacter freundii* aus der Datenbank *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) sowie mit der Sequenz von *Citrobacter freundii* OS60 aus der von Linquist und Normark beschriebenen Veröffentlichungen verglichen (Lindquist, Lindberg, & Normark, 1989; National Center of Biotechnology Information, o.D.).

Die Sequenzierung des intergenetischen Bereiches ergab keine Mutationen für die regulatorischen Bereiche von *ampC* und *ampR*. Die Sequenzierung von *ampR* wies vier Nukleotidsubstitutionen im letzten Drittel des Genes auf, wobei drei der Substitutionen in stillen Mutationen ohne Änderung der Aminosäureabfolge resultierten (P276P, S248S, H213H). Die vierte Substitution führte aufgrund des Austausches von Cytosin gegen Adenin an Position 695 zu einem Austausch der Aminosäure 232 von Isoleucin (ATC) gegen Serin (AGC) (Abb. 3.57 – 3.59). Der Sequenzausschnitt in Abb. 3.57 ist komplementär in der in Abb. 3.58 entsprechenden Leserichtung dargestellt. Veröffentlichungen zu Mutanten mit dieser Aminosäuresubstitution wurden nicht gefunden. Aufgrund des Wachstums von *Citrobacter freundii* GK100 auf Ampicillin-Agarplatten [100 µg/ml] war von einer grundsätzlichen Expression von AmpC auszugehen. Eine veränderte Induzierbarkeit der β -Laktamase konnte jedoch nicht ausgeschlossen werden und wurde anhand von Fluoreszenzmessungen mit dem Reporterplasmid untersucht. Die bereits in der Literatur beschriebenen Mutationen G102E, D135Y, S35F und Y264N, die zu einer nachgewiesenen veränderten Induzierbarkeit von AmpC führten, lagen bei *Citrobacter freundii* GK100 nicht vor (Bartowsky & Normark, 1991, 1993).

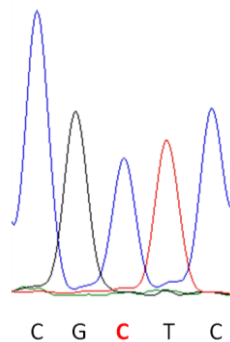


Abbildung 3.57: Sequenzausschnitt aus *Citrobacter freundii* GK100 im Bereich des Aminosäureaustausches; die Nukleotidsubstitution ist rot markiert

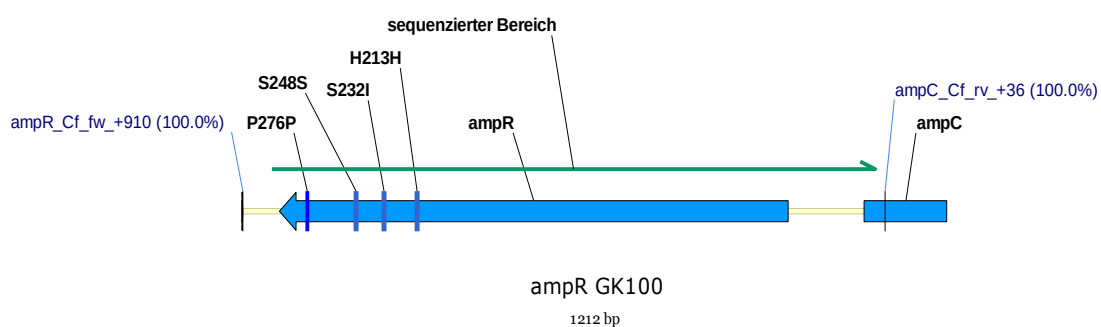


Abbildung 3.58: Sequenzierter Bereich von *Citrobacter freundii* GK100

--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

Abbildung 3.59: Aminosäuresequenz von *ampR* in verschiedenen Stämmen von *Citrobacter freundii*

3.2.3.2 Konstruktion des Plasmides pHPKC3-13

Die Konstruktion des Reporterplasmides pHPKC3-13 erfolgte über ein SOEing-Produkt, welches aus dem Gen *ampR*, dem intergenetischen Bereich von *ampR* und *ampC* sowie dem Gen *gfpmut2* konstruiert und anschließend in pHPKC3-02 inseriert wurde.

Für die Einzelfragmente des SOEing-Produktes wurde von Kochlysat-DNA von *Citrobacter freundii* GK100 ein 1094 bp großes PCR-Produkt mit den Primern *ampR*_Cf_fw_+910 und *ampR*-*gfpmut2*_-109_rv (*ampRC*-Fragment) sowie vom Vektor pKENG*gfpmut2* ein 814 bp großes PCR-Produkt mit den Primern *gfpmut2*-*ampR*_-23_fw und *GFP*_rv_+757_PstI (*gfpmut2*-Fragment) amplifiziert. Das SOEing-Produkt wurde über die *Pst*I-Schnittstelle in das Komplementationsplasmid pHPKC3-02 inseriert. Aufgrund der hohen Anzahl an Transformanten erfolgte eine Vorselektion mittels PCR auf die Anwesenheit des *ampRC*-Fragmentes. Von den untersuchten 150 Transformanten zeigten die drei Transformanten T26, T103 und T130 einen positiven Nachweis auf das *ampRC*-Fragment. Nach Isolierung der Plasmide aus den positiv-selektierten Transformanten über alkalische Lyse, ergab der anschließende Restriktionsverdau mit *Nde*I für alle drei Plasmide das erwartete Bandenmuster mit den Fragmentgrößen 1921 bp, 1811 bp und 3174 bp für pHPKC3-13 (Abb. 3.61). Aufgrund unspezifischer Banden im Verdau der aus T103 und T130 isolierten Plasmide wurde das Plasmid aus T26 für das weitere Vorgehen verwendet. Der Ausschluss konstruktionsbedingter Mutationen in regulatorischen Bereichen erfolgte über die Sequenzierung des intergenetischen Bereiches von *ampR* und *ampC* sowie des Übergang zu *gfpmut2*.

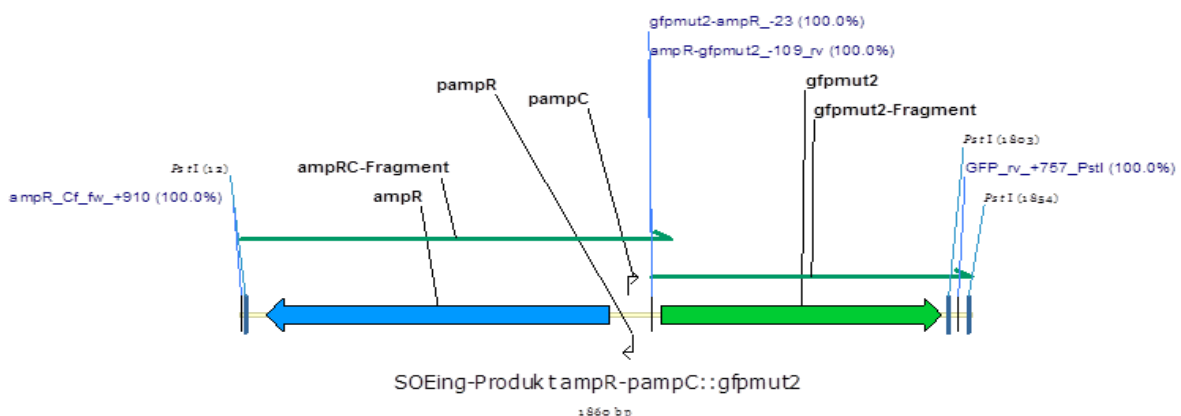


Abbildung 3.60: SOEing-Produkt aus *ampR* und dem Promotorbereich von *ampR* und *ampC* (*ampRC*-Fragment) und dem Gen *gfpmut2* (*gfpmut2*-Fragment)

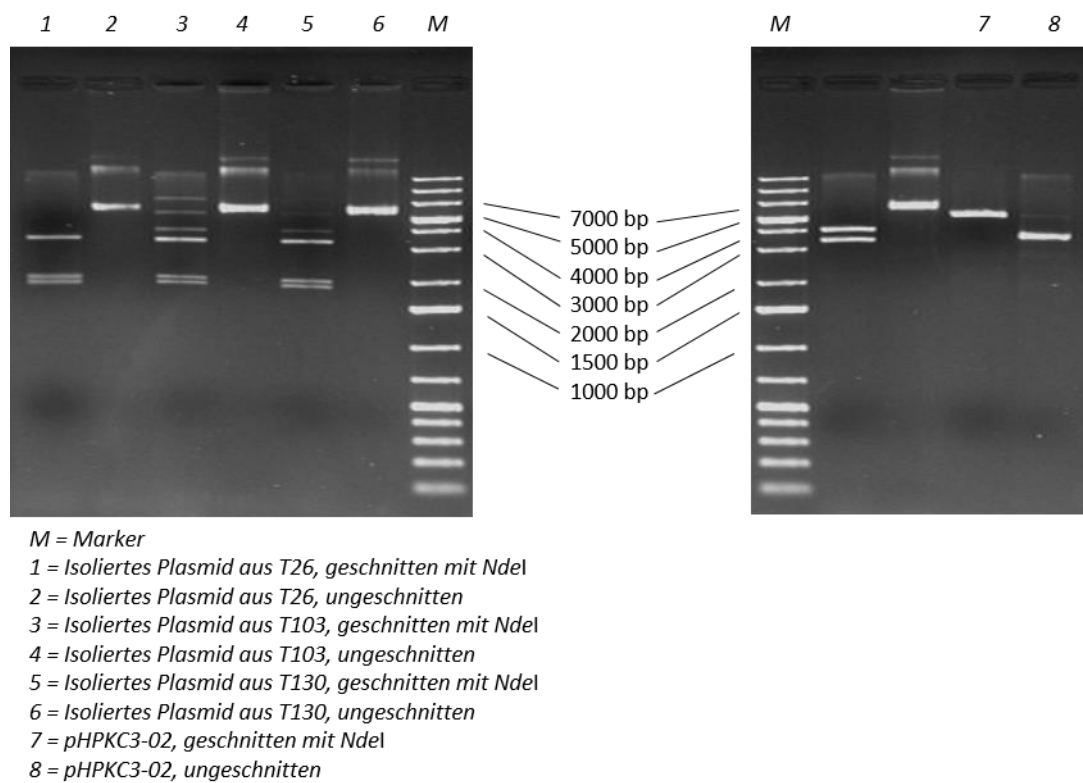


Abbildung 3.61: Restriktionsverdau von pHPKC3-13 sowie des Ausgangsplasmides pHPKC3-02 mit NdeI

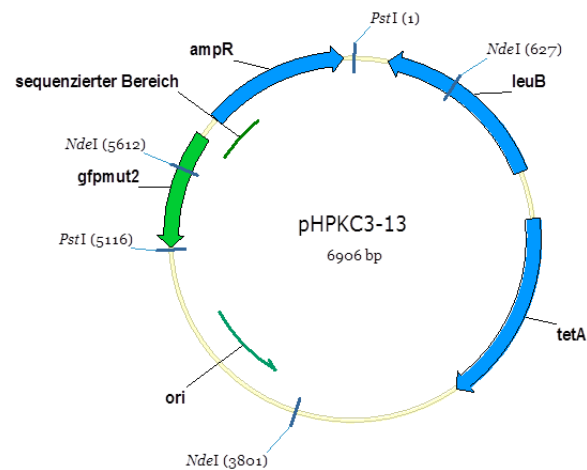


Abbildung 3.62: Plasmidkarte von pHPKC3-13

3.2.3.3 Fluoreszenzmessungen mit pHPKC3-13

E. coli R7 wurde mit dem Reporterplasmid pHPKC3-13 transformiert und hinsichtlich der Sensitivität und Spezifität gegenüber β -Laktamantibiotika untersucht.

3.2.3.3.1 Untersuchungen zur Sensitivität

Für die Untersuchung zur Sensitivität wurde *E. coli* R7/pHPKC3-13 bis zur frühen exponentiellen Phase angezogen, der Ansatz aufgeteilt und Ampicillin jeweils in den Konzentrationen 1 x MHK, 0,5 x MHK und 0,2 x MHK hinzugegeben.

Die Zugabe von Ampicillin führte unabhängig von der zugegebenen Antibiotikakonzentration zu keiner Steigerung der Fluoreszenzintensität. Die Fluoreszenzwerte lagen alle im Bereich der uninduzierten Kontrolle. Als eine mögliche Ursache hierfür wurde die Amidase AmpD in Betracht gezogen, welche negativ regulierend auf die β -Laktamase-Expression wirkt (Jacobs et al., 1995; Johnson et al., 2013). Die durch β -Laktamantibiotika hervorgerufene Störung der Zellwandsynthese führt zur verstärkten Generierung von Anhydromuropeptiden, welche sowohl Vorläufermoleküle der Zellwand als auch die Effektormoleküle des Repressors AmpR darstellen. Binden die Anhydromuropeptide an den Repressor, ändert dieser seine Konformation und bindet nicht mehr an seiner Bindungsstelle, wodurch die Expression von *ampC* induziert wird. Die Funktion von AmpD besteht in der Hydrolyse dieser Anhydromuropeptide, sodass AmpD maßgeblich an der Induzierbarkeit von AmpC beteiligt ist. In Folge dessen wurde das Reporterplasmid pHPKC3-13 in einem *ampD*-negativen Stammhintergrund unter β -Laktamzugabe untersucht.

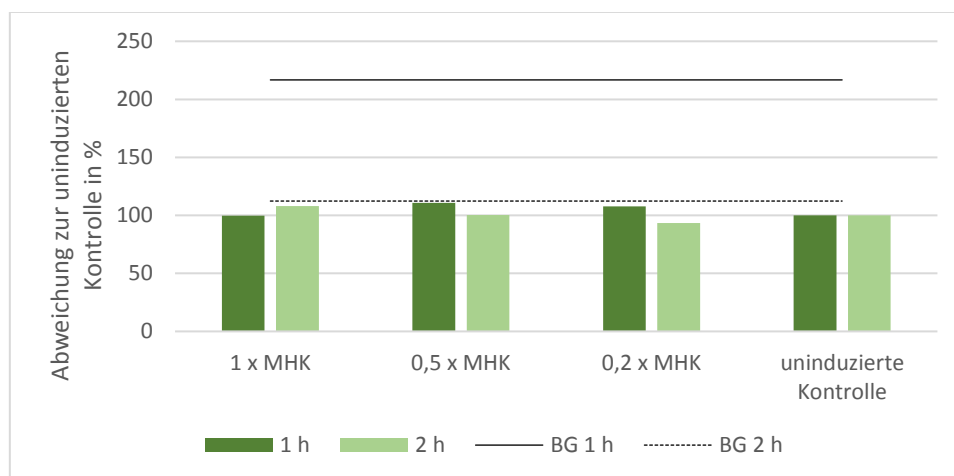


Abbildung 3.63: Untersuchung der Sensitivität von *E. coli* R7/pHPKC3-13 unter Zusatz von Ampicillin; gemessen 1 h und 2 h nach Antibiotikaexposition; BG 1 h = obere Bestimmungsgrenze für Werte nach 1 h; BG 2 h = obere Bestimmungsgrenze für Werte nach 2 h

Der Stamm *E. coli* SN0302 trägt die Mutation *ampD2*, eine Insertion des IS1-Elementes in *ampD*, welche zu einer Inaktivierung von AmpD und einer semikonstitutiven Überexpression der β -Laktamase führt (Lindberg, Lindquist, & Normark, 1987). Der von Lindberg et al. eingeführte Begriff der „semikonstitutiven Überexpression“ beschreibt die bei *ampD*-Mutanten im Vergleich zum Wildtyp erhöhte konstitutive β -Laktamaseexpression, welche zusätzlich eine restliche Induzierbarkeit aufweist. Trotz einer verringerten

relativen Induzierbarkeit der *ampD*-Mutante wurde aufgrund der generell erhöhten β -Laktamaseexpression nach Zugabe eines β -Laktams eine messbare Induktion der *gfpmut2*-Expression für pHPKC3-13 erwartet (Lindberg et al., 1987). Hierfür wurden *E. coli* SN0302 sowie der Ausgangsstamm *E. coli* SN03 mit pHPKC3-13 transformiert und die Fluoreszenzintensität nach Zugabe von Cefoxitin untersucht. Bei Cefoxitin handelt es sich um ein Cephalosporin der 2. Generation, das ebenfalls ein starker Induktor von AmpC mit zusätzlicher Hydrolysestabilität ist. Die für die definierte Zugabe der Antibiotikakonzentration benötigte Bestimmung der MHK für Cefoxitin ergab für beide Stämme eine Konzentration von 2 $\mu\text{g/ml}$.

Nach Transformation von *E. coli* SN03 und *E. coli* SN0302 mit dem Reporterplasmid pHPKC3-13 wurde die Fluoreszenzintensität nach Zugabe von Cefoxitin in einer Konzentration von 1 x MHK vermessen. Zur Vermeidung einer Umkonstruktion von pHPKC3-13 mit einem für *E. coli* SN03 bzw. *E. coli* SN0302 geeigneten Auxotrophiemarker zur Selektion in M9-Medium und zur Schaffung optimaler Wachstumsbedingungen, erfolgte die Anzucht zunächst in LB-Medium ohne Selektionsdruck. Um den möglichen Verlust des Reporterplasmides bei der Anzucht zu überprüfen, wurde die Keimzahl zu den jeweiligen Messpunkten sowohl auf LB- als auch auf Tetracyclin-Agarplatten bestimmt. Beim Vergleich der erhaltenen Keimzahlen der LB- und Tetracyclin-Agarplatten, lag kein relevanter Unterschied vor, sodass ein Effekt des Fluoreszenzsignals durch den Verlust des Reporterplasmides zu vernachlässigen war. Die Messzeitpunkte wurden aufgrund einer im Vergleich zu *E. coli* R7 längeren exponentiellen Phase auf 1 h, 2 h und 3 h nach Antibiotikaexposition festgelegt. Die Fluoreszenzmessung wurde in einer Doppelbestimmung durchgeführt, wobei die Messzeitpunkte sich bei Erstmessung (40 min, 1,5 h, 3 h) und Wiederholungsmessung (1 h, 2 h, 3 h) unterschieden. Aufgrund der geringen Abweichungen der Bestimmungsgrenzen für die Werte nach 1 h, 2 h und 3 h ist aus Gründen der Übersichtlichkeit nur die Bestimmungsgrenze für die Werte 3 h nach Antibiotikaexposition im Diagramm dargestellt.

Der Vergleich der Fluoreszenzintensitäten von *E. coli* SN03 und *E. coli* SN0302 unter Zusatz von Cefoxitin zeigte für die *ampD*-Mutante eine deutliche Steigerung der Fluoreszenzintensität und Erhöhung der Empfindlichkeit. Bei *E. coli* SN03 lag für die Werte 2 h und 3 h nach Cefoxitinzugabe eine von der uninduzierten Kontrolle abweichende Erhöhung der Fluoreszenzintensität von 165 % bzw. 285 % vor. Bei der *ampD*-Mutante war dagegen bereits nach 1,5 h eine relevante Erhöhung der Fluoreszenzintensität mit einer Steigerung von 293 % nachzuweisen. Die Werte für die Messzeitpunkte 2 h und 3 h lagen bei 532 % und 1522 %.

Das Reporterplasmid pHPKC3-13 ist demnach unter Voraussetzung eines *ampD*-negativen Stammhintergrunds für den sensitiven Nachweis von β -Laktamantibiotika bzw. von Störungen der Zellwandsynthese geeignet.

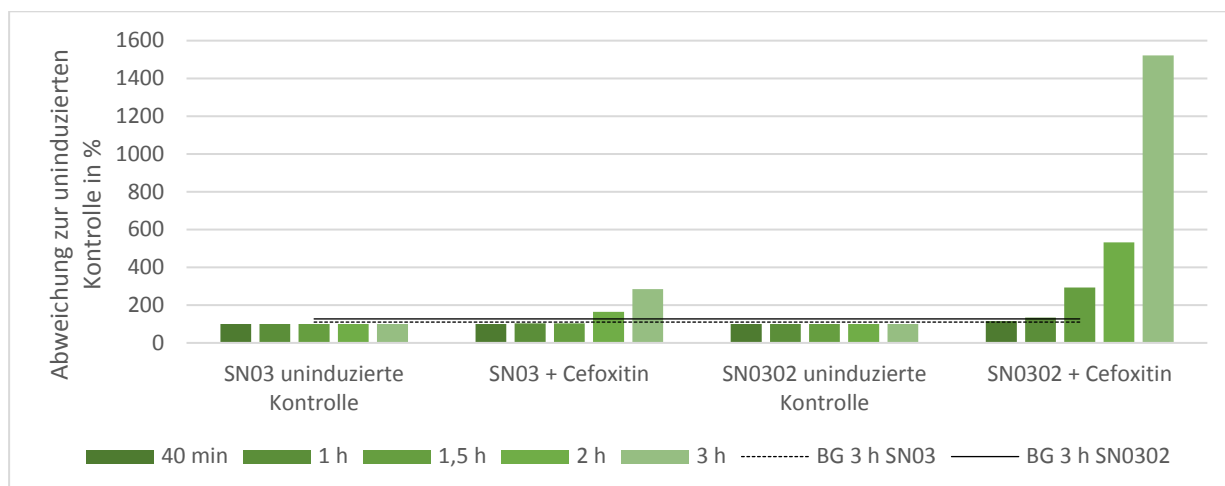


Abbildung 3.64: Untersuchung des Effektes von AmpD auf die *ampC*-Expression in *E. coli* SN03 und *E. coli* SN0302; BG 3 h = obere Bestimmungsgrenze für Werte nach 3 h

3.2.3.3.2 Untersuchung zur Spezifität

Die Bestimmung der MHK für *E. coli* SN0302/pHPKC3-13 diente zur Ermittlung der definierten Antibiotikazugabe und wurde nach CLSI-Standard durchgeführt. Das Ergebnis der MHK-Bestimmung ist in Tabelle 3.8 dargestellt.

Tabelle 3.8: Ergebnis der MHK-Bestimmung für *E. coli* SN0302/pHPKC3-13

Antibiotikum	MHK
<i>Ampicillin</i>	4 µg/ml
<i>Cefoxitin</i>	2 µg/ml
<i>Chloramphenicol</i>	2 µg/ml
<i>Erythromycin</i>	64 µg/ml
<i>Kanamycin</i>	2 µg/ml
<i>Linezolid</i>	64 µg/ml
<i>Norfloxacin</i>	0,016 µg/ml
<i>Novobiocin</i>	64 µg/ml
<i>Polymyxin</i>	0,25 µg/ml
<i>Rifampicin</i>	4 µg/ml

Für die Untersuchung zur Spezifität wurde *E. coli* SN0302/pHPKC3-13 bis zu einer OD_{600nm} von 0,25 in LB-Medium angezogen, die Kultur aufgeteilt und jeweils eines der Antibiotika in einer Konzentration von 1 x MHK hinzugegeben. Nach 2 h bzw. 3 h zeigte von den untersuchten Antibiotika Cefoxitin als einzige Substanz eine starke Erhöhung der relativen Fluoreszenzintensität. Die relative Fluoreszenzintensität für Ampicillin, welches ebenfalls ein Substrat für die Induktion der β -Laktamase darstellt, war nach 3 h nur gering

erhöht. Trotz der nur geringen Änderung der relativen Fluoreszenzintensität war bei Betrachtung der Rohdaten eine deutliche Zunahme zu erkennen. Diese lag 3 h nach Antibiotikaexposition bezogen auf die uninduzierte Kontrolle bei 231 %. Vergleichend dazu lagen die prozentualen Abweichungen der anderen Antibiotika zwischen 84 % und 102 % bzw. für Cefoxitin bei 300 %. Eine Zunahme der Rohdaten konnte im Gegensatz dazu bei der vorherigen Fluoreszenzmessung mit *E. coli* R7 als Stammhintergrund nicht beobachtet werden. Die Ursache für den nicht erbrachten Nachweis von Ampicillin durch *E. coli* R7/pHPKC3-13 (Kapitel 3.2.3.3.1) war demnach vermutlich nicht in einer zu geringen Induzierbarkeit durch das Antibiotikum, sondern auf den *ampD*-positiven Stammhintergrund zurückzuführen. Für die Antibiotika Chloramphenicol, Erythromycin und Linezolid lagen die Mittelwerte der Fluoreszenzintensitäten unter Berücksichtigung der Standardabweichung zum Teil oberhalb der entsprechenden Bestimmungsgrenzen. Die Abweichungen lagen im Bereich von 14 % – 30 % bezogen auf die uninduzierte Kontrolle und werden aufgrund des spezifischen Nachweises über die Induktion von AmpC als falsch positive Ergebnisse gewertet.

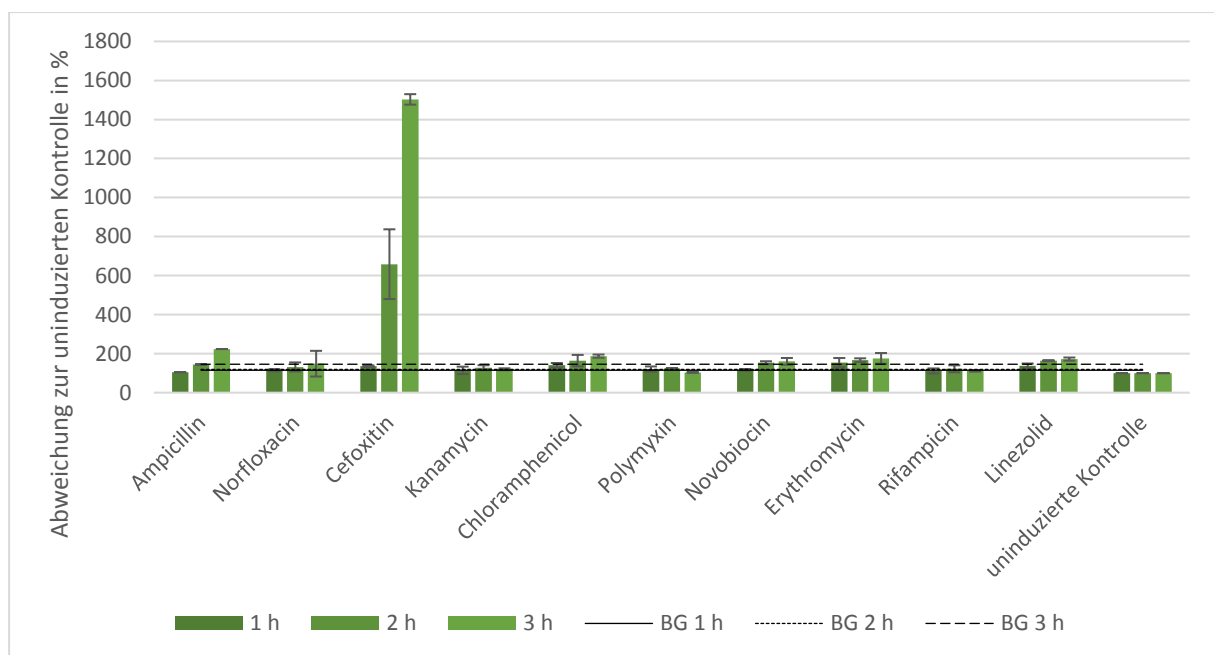


Abbildung 3.65: Untersuchung der Spezifität von *E. coli* SN0302/pHPKC3-13; BG 1 h = obere Bestimmungsgrenze für Werte nach 1 h; BG 2 h = obere Bestimmungsgrenze für Werte nach 2 h; BG 3 h = obere Bestimmungsgrenze für Werte nach 3 h

3.2.4 Zusammenfassung der Resultate von Versuchen zur Erweiterung des Messsystems um individuelle Reportersysteme

Die Umstellung eines einzelnen Reportersystems zum Nachweis bakterizider Antibiotika auf drei voneinander unabhängige Reportersysteme für spezifische Stressantworten führte zur Konstruktion der Reporterplasmide pHPKC3-06 (*precA::gfpmut2*), pHPKC3-08 (*pcpxP::gfpmut2*) und pHPKC3-13 (*ampR-pampC::gfpmut2*). Das Plasmid pHPKC3-06, welches DNA-Schäden signalisiert, zeigte mit hoher Spezifität und Sensitivität einen positiven Nachweis für Gyrasehemmung durch Fluorchinolone, wie Norfloxacin, sowie der daraus resultierenden Hemmung der DNA-Replikation. Ein ebenfalls positiver Nachweis, mit einer im Vergleich zu Norfloxacin geringeren Empfindlichkeit, wurde für den RNA-Polymeraseinhibitor Rifampicin erbracht.

Die Detektion von Zellhüllstress mit dem Schwerpunkt des Nachweises von Aminoglykosiden, sollte über das Plasmid pHPKC3-08 erfolgen. In den Fluoreszenzanalysen konnte jedoch keine Erhöhung der Fluoreszenzintensität bei Zugabe von Kanamycin nachgewiesen werden. Entgegen den Erwartungen führte die Zugabe von Proteinbiosynthesehemmern sowie von Rifampicin zu einer Abnahme der relativen Fluoreszenzintensität. Eine gestörte Bildung des Fluoreszenzproteins aufgrund der Hemmung der Proteinbiosynthese bzw. der Transkription wurde durch Untersuchungen mit dem Kontrollplasmid pHPKC3-03 überprüft. Das Reporterplasmid diente daher im Folgenden zum Nachweis von Proteinbiosyntheseinhibitoren.

Der Nachweis von Stress auf die Zellwand bzw. einer gestörten Zellwandsynthese wurde über das Reporterplasmid pHPKC3-13 gezeigt. Aufgrund der funktionsfähigen Amidase *ampD* in *E. coli* R7 konnte über das Messsystem mit dem Sensorstamm keine ausreichende Sensitivität erzielt werden. Diese wurde durch die Substitution von *E. coli* R7 mit der *ampD*-Mutante *E. coli* SN0302 erheblich gesteigert, sodass für Messungen mit pHPKC3-13 *E. coli* SN0302 als neuer Sensorstamm festgelegt wurde.

3.3 Etablierung eines kombinierten Messsystems auf Basis der individuellen Reportersysteme

Über die drei individuellen Messsysteme konnten Antibiotika aus der Klasse der Fluorchinolone, Rifampicin, Hemmer der Proteinbiosynthese sowie β -Laktame getrennt voneinander nachgewiesen werden. Der Nachweis dieser Substanzen nebeneinander war aufgrund der Verwendung des gleichen Fluoreszenzproteins (GFPmut2) ohne die mehrmalige Vermessung derselben Probe mit jeweils einem Reportersystem nicht möglich. Zur Vereinfachung des Nachweissystems wurden die individuellen Messsysteme daher auf dem Plasmid pHPKC3-14 vereint (Kapitel 3.3.3.1) und somit der Versuchsaufwand erheblich reduziert. Hierfür war eine Erweiterung der Messsysteme unter Verwendung von zwei weiteren Fluoreszenzproteinen notwendig. Zur Erhöhung der Substratspezifität und Verringerung der Überschneidung von Anregungs- und Emissionsspektren wurden das rote Fluoreszenzprotein (RFP) mCherry sowie das blaue Fluoreszenzprotein

(BFP) mTagBFP2 neben dem bereits vorhandenen GFPmut2 für das kombinierte Messsystem verwendet. Das RFP wurde für die Konstruktion des Reportersystems zum Nachweis von Proteinbiosynthesehemmern, das BFP für das Reportersystem zum Nachweis von β -Laktamantibiotika eingesetzt. Vor der Konstruktion von pHPKC3-14 wurden beide Fluoreszenzproteine hinsichtlich der Empfindlichkeit, der Überlagerung der Fluoreszenzsignale und der Eigenfluoreszenz der Antibiotika bei den spezifischen Emissionswellenlängen untersucht.

Abschließend sollte das kombinierte Messsystem in einem verblindeten Versuch auf unbekannte Proben angewendet werden (Kapitel 3.3.4).

3.3.1 Vorversuche zu Messungen mit dem roten Fluoreszenzprotein mCherry und dem blauen Fluoreszenzprotein mTagBFP2

Analog den Untersuchungen mit GFPmut2 wurden mit den Fluoreszenzproteinen mCherry und mTagBFP2 Kontrollplasmide konstruiert, die abgesehen vom Fluoreszenzprotein in Aufbau und Funktion den Kontrollplasmiden pHPKC3-03 und pHPKC3-05 gleichen.

Die Kontrollplasmide pHPKC3-10 und pHPKC3-15 tragen den *srp*-Promotor aus dem Vektor pKEN-gfpmut2 fusioniert mit *mCherry* (pHPKC3-10) bzw. *mTagBFP2* (pHPKC3-15) und vermitteln eine starke Expression des Fluoreszenzproteins. Mit den Plasmiden wurden die Fähigkeit zur erhöhten Bildung von mCherry bzw. mTagBFP2, mögliche Störungen der Fluoreszenzproteinbildung durch Proteinbiosynthesehemmer sowie das Absorptions- und Emissionsverhalten im roten, grünen und blauen Wellenlängenbereich (Kapitel 3.3.1.2.3) untersucht.

Die Plasmide pHPKC3-11 und pHPKC3-16 tragen das promotorlose Gen *mCherry* (pHPKC3-11) bzw. *mTagBFP2* (pHPKC3-16) und dienen zur Ermittlung der Eigenfluoreszenz der untersuchten Antibiotika im roten und blauen Wellenlängenbereich. Die Fluoreszenzmessungen erfolgten bei einer Anregungswellenlänge von 550 nm und einer Emissionswellenlänge von 610 nm für mCherry bzw. bei 405 nm und 460 nm für mTagBFP2.

3.3.1.1 Konstruktion der Kontrollplasmide

3.3.1.1.1 Konstruktion der Kontrollplasmide pHPKC3-10 und pHPKC3-11

Für die Konstruktion von pHPKC3-10 wurden mit den Primern GFP_fw_-178_PstI und *srp*-mCherry_3_+25 sowie mit *srp*-mCherry_5_-25 und mCherry_EcoK12_3_+948 die Einzelfragmente für die SOEing-PCR hergestellt. Das 5'-terminale Einzelfragment (*srp*-Fragment) umfasste 214 bp und wurde vom Vektor pKEN-gfpmut2 amplifiziert. Für das 3'-terminale 1006 bp große Fragment (mCherry-Fragment), diente der Vektor

pET-mCherry LIC als Template-DNA. Das SOEing-Produkt wurde über die *Pst*I-Schnittstelle in pHPKC3-02 inseriert.

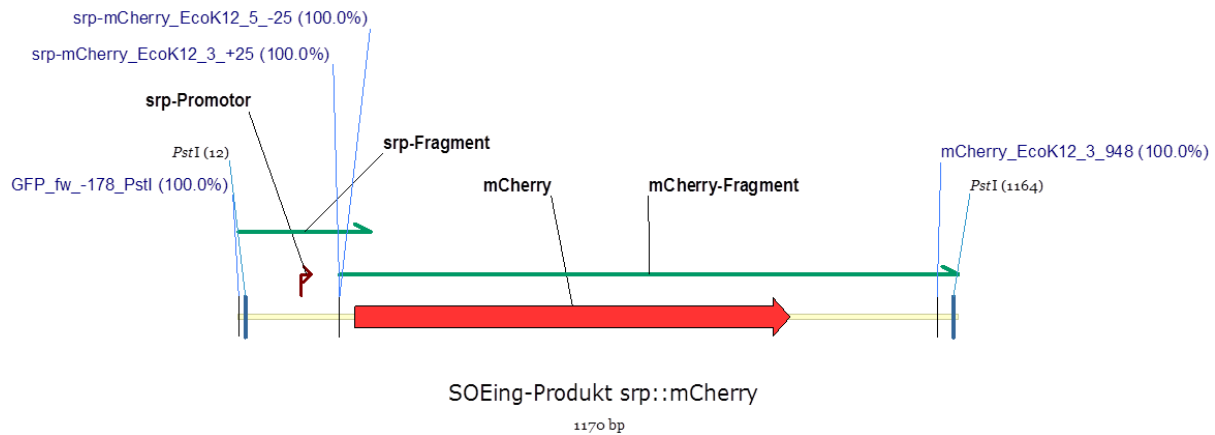


Abbildung 3.66: SOEing-Produkt aus dem *srp*-Promotor und *mCherry*

Die Konstruktion von pHPKC3-11 erfolgte über die Amplifizierung eines 993 bp großen PCR-Produktes mit den Primern *mCherry_fw_+1_PstI* und *mCherry_EcoK12_3_+948* ausgehend vom Vektor pET-mCherry LIC. Die Bindungsstelle des Primers *mCherry_fw_+1_PstI* lag basengenau am Startcodon von *mCherry*, sodass nur das Strukturgen ohne Promotor amplifiziert wurde. Das PCR-Produkt wurde ebenfalls über die *Pst*I-Schnittstelle in pHPKC3-02 inseriert.

Transformanten, die jeweils eines der beiden Plasmide erhalten hatten, wurden auf Tetracyclin-Agarplatten selektiert und anschließend mittels PCR und Restriktionsverdau untersucht. Die Transformanten T6 und T13 mit dem konstruierten Plasmid pHPKC3-10 zeigten eine bei Tageslicht rötliche Färbung, welche auf die Expression des RFPs zurückzuführen war. Die Größe des PCR-Fragmentes sowie zusätzlich die Größe der Fragmente des Restriktionsverdaus mit *Bam*HI von 3383 bp, 2129 bp und 755 bp bestätigten die Anwesenheit des *srp*-Promotors und die Identität von pHPKC3-10. Die Bande mit der Fragmentgröße von 755 bp ist nur bei sehr starker Überbelichtung zu erkennen und wurde daher in Abbildung 3.67 C separat gekennzeichnet. Zum Ausschluss von Mutationen und zur Überprüfung des SOEing-Produktes wurden das *srp*-Fragment sowie der Übergang zu *mCherry* sequenziert. Die Sequenzierung ergab, dass keine konstruktionsbedingten Mutationen in dem untersuchten Bereich vorlagen.

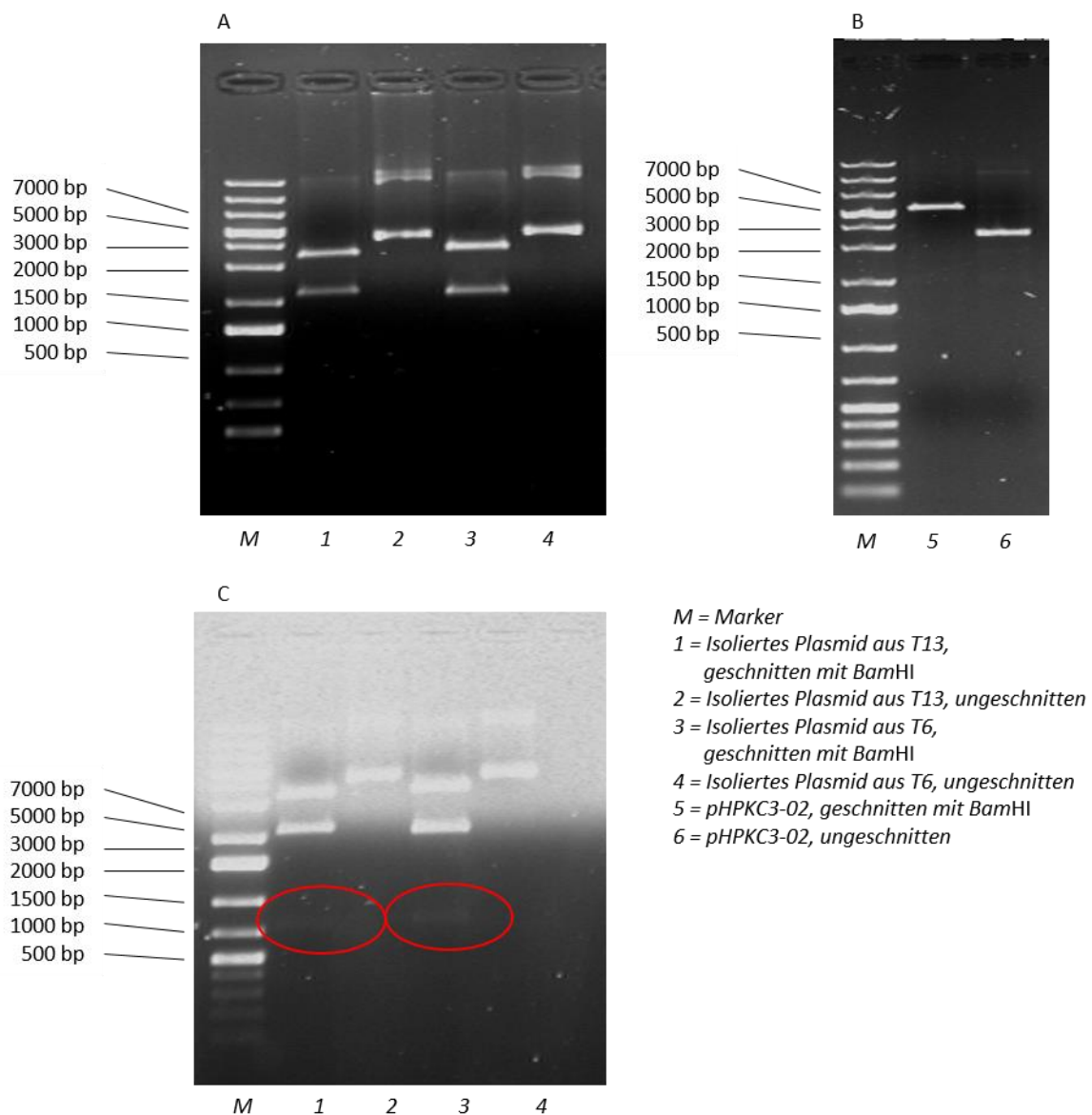


Abbildung 3.67: Restriktionsverdau von pHPKC3-10 (A und C) sowie des Ausgangsplasmides pHPKC3-02 (B) mit *Bam*HI

Die Transformanten mit pHPKC3-11 ohne *srp*-Promotor-Fragment zeigten, wie erwartet, keine Fluoreszenz und wurden ebenfalls über einen Restriktionsverdau mit *Bam*HI kontrolliert. Hierbei zeigten nur die aus den Transformanten T10 und T11 isolierten Plasmide die erwarteten Fragmentgrößen von 2129 bp und 3961 bp. Zum Vergleich wurde das Plasmid pHPKC3-10 ebenfalls nach Restriktionsverdau aufgetragen, welches durch die zusätzliche Schnittstelle für *Bam*HI in der *srp*-Promotorsequenz eine dritte Bande im Elektropherogramm aufweist.

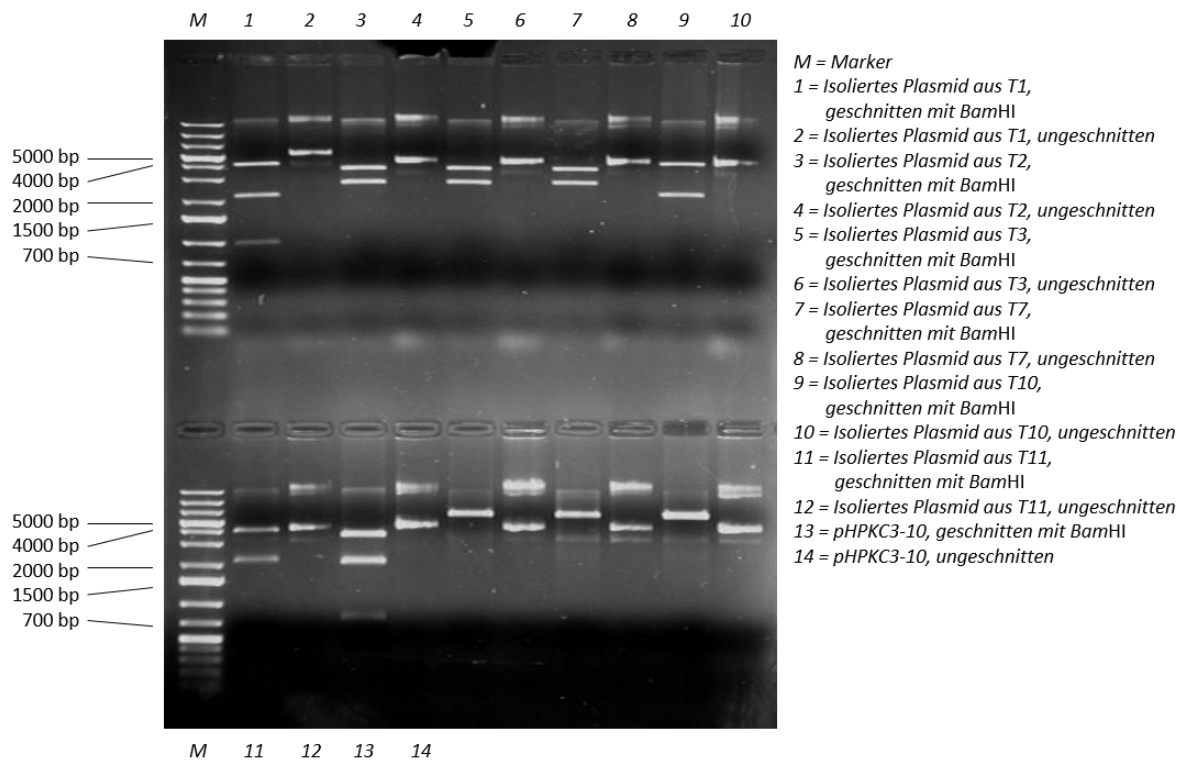
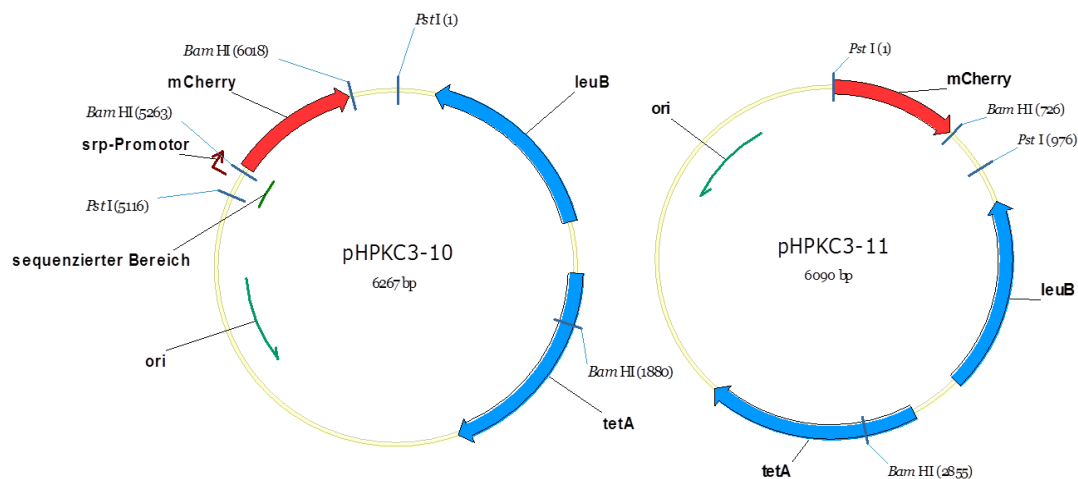
Abbildung 3.68: Restriktionsverdau von pHPKC3-11 und pHPKC3-10 mit *Bam*HI

Abbildung 3.69: Plasmidkarten der Kontrollplasmide pHPKC3-10 und pHPKC3-11

3.3.1.1.2 Konstruktion der Kontrollplasmide pHPKC3-15 und pHPKC3-16

Die Einzelfragmente für das SOEing-Produkt zur Konstruktion von Plasmid pHPKC3-15 wurden mit den Primern GFP_fw_-178_PstI und mTagBFP2+srp-pKEN_+25_rv mit pKENGfpmut2 als Template-DNA (*srp*-Fragment) sowie mit den Primern srp-pKEN+mTagBFP2_-25_fw und mTagBFP2_+1001_rv mit pBAD-mTagBFP2

als Template-DNA (mTagBFP2-Fragment) amplifiziert. Das SOEing-Produkt besaß eine Größe von 1219 bp und wurde über die *Pst*I-Schnittstelle in pHPKC3-02 inseriert.

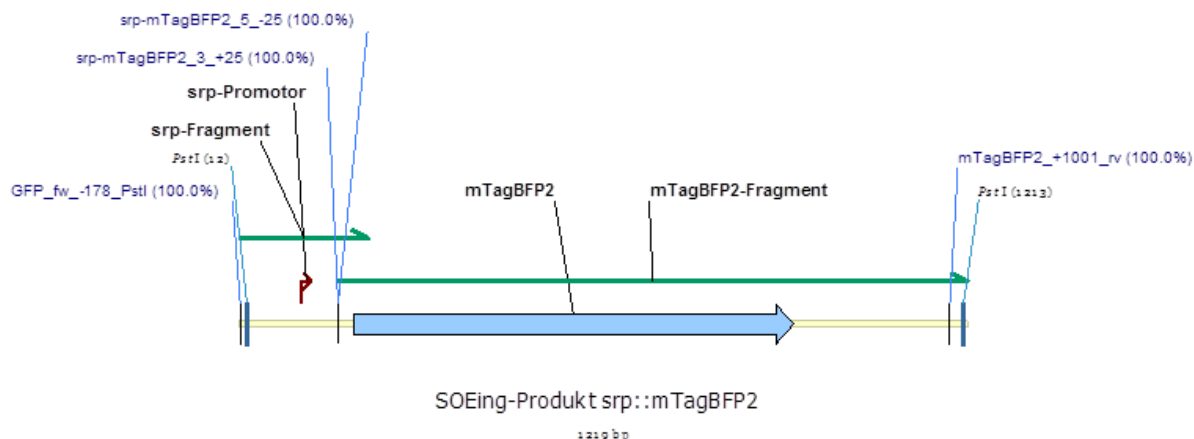


Abbildung 3.70: SOEing-Produkt aus *srp*-Promotor und dem Gen des blauen Fluoreszenzproteins mTagBFP2

Für die Konstruktion von pHPKC3-16 wurde das Insert direkt vom Vektor pBAD-mTagBFP2 mit den Primern *mTagBFP2_fw_+1_PstI* und *mTagBFP2_+1018_rv* amplifiziert und über die *Pst*I-Schnittstelle in pHPKC3-02 inseriert.

Die erhaltenen Transformanten mit pHPKC3-15 zeigten im Gegensatz zu den Transformanten mit pHPKC3-03 (*srp::gfpmut2*) und pHPKC3-10 (*srp::mCherry*) keine bei Tageslicht erkennbare Färbung, sodass die Identifizierung von Pools, die rekombinanten Klone mit dem *mTagBFP2*-Gen enthielten, mittels PCR erfolgen musste. Von den auf *mTagBFP2* positiv getesteten Pools wurden aus den jeweils einzelnen Transformanten Plasmide isoliert und im Restriktionsverdau mit *Ava*I kontrolliert. Die erwarteten Fragmentgrößen von 3988 bp und 2328 bp lagen nur bei den aus T16 und T28 isolierten Plasmiden vor. Mit dem aus T16 isolierten Plasmid wurde weitergearbeitet und der Promotorbereich sowie der Übergang zu *mTagBFP2* sequenziert. Das Ergebnis der Sequenzierung zeigte, dass keine konstruktionsbedingten Mutationen vorlagen.

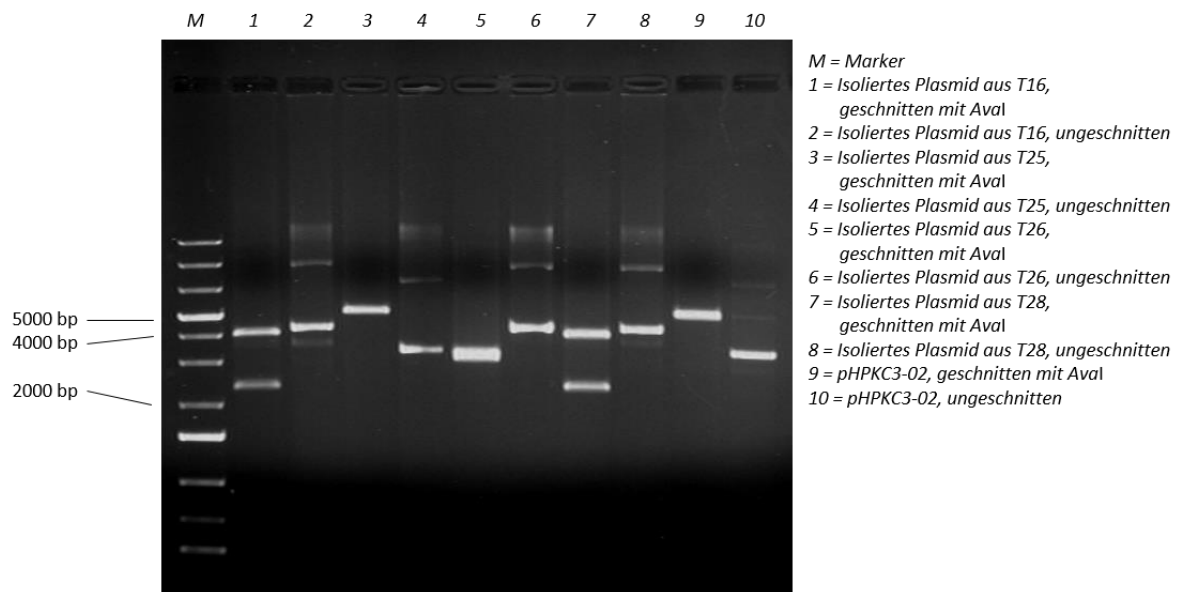


Abbildung 3.71: Restriktionsverdau von pHPKC3-15 sowie des Ausgangsplasmides pHPKC3-02 mit Aval

Die Überprüfung der Plasmidkonstruktion von pHPKC3-16 erfolgte über einen Restriktionsverdau mit *EcoRI*. Die erwarteten Fragmentgrößen von 1786 bp und 4353 bp lagen nur bei dem aus T1 isoliertem Plasmid vor.

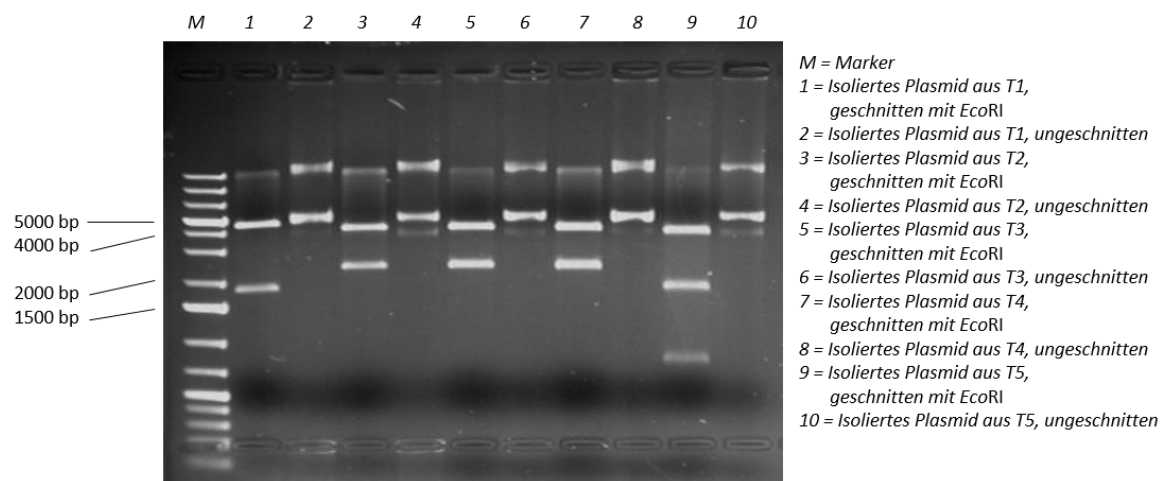


Abbildung 3.72: Restriktionsverdau von pHPKC3-16 mit *EcoRI*

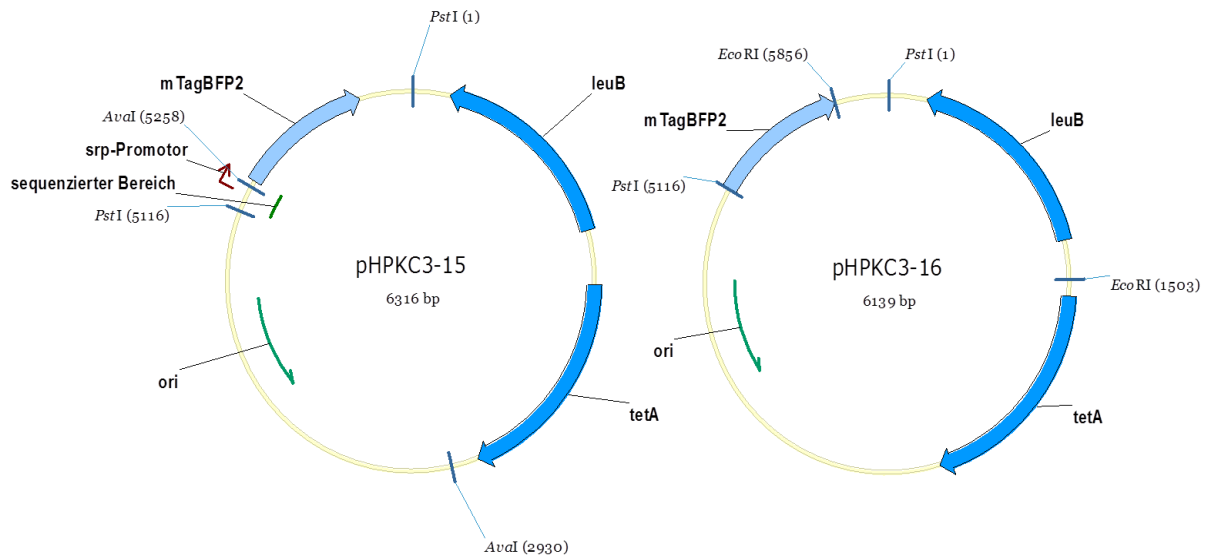


Abbildung 3.73: Plasmidkarten der Kontrollplasmide pHPKC3-15 und pHPKC3-16

3.3.1.2 Fluoreszenzmessungen mit den Kontrollplasmiden

3.3.1.2.1 Fluoreszenzmessungen mit pHPKC3-10 und pHPKC3-11

Aufgrund der Abnahme der Fluoreszenzintensität bei Zugabe der bakteriostatischen Proteinbiosynthesehemmer zu Zellen von *E. coli* R7/pHPKC3-08 (Kapitel 3.2.2.4.2) wurde der Einfluss der Antibiotika auf die Bildung des RFPs untersucht. Abweichend zu den mit GFPmut2 ermittelten Ergebnissen bewirkte die Zugabe der Antibiotika trotz starker Genexpression über den *srp*-Promotor ebenfalls eine zeitabhängige Abnahme der relativen Fluoreszenzintensität. Diese war im Vergleich zur Messung mit pHPKC3-03, insbesondere zum Messzeitpunkt 3 h (in Kapitel 3.2.2.4.3 Abb. 3.55 nicht dargestellt), um etwa 30 % bis 50 % stärker reduziert. Die prozentuale Abweichung zur uninduzierten Kontrolle lag bei Messungen mit pHPKC3-03 zum Messpunkt 3 h zwischen 85 % und 112 %, im Vergleich dazu betrug diese bei Messungen mit pHPKC3-10 zwischen 53 % und 56 %. Zu berücksichtigen ist, dass sich *E. coli* R7 zum Messzeitpunkt $t=3$ h bereits in der Absterbephase befindet und die Fluoreszenzwerte daher allgemein kritisch zu betrachten sind. Auf die Abnahme der Fluoreszenzintensität zum Messzeitpunkt 3 h wird in Kapitel 4.4.3.1 näher eingegangen. Für die Messzeitpunkte 1 h und 2 h wurde keine relevante Abnahme der Fluoreszenzintensität für pHPKC3-10 nachgewiesen. Die Messwerte lagen oberhalb der jeweiligen Bestimmungsgrenzen. Die Abnahme der Fluoreszenzintensität aufgrund einer gestörten Fluoreszenzproteinbildung unter Einfluss von Proteinbiosynthesehemmern ist für das RFP mCherry daher nicht auszuschließen.

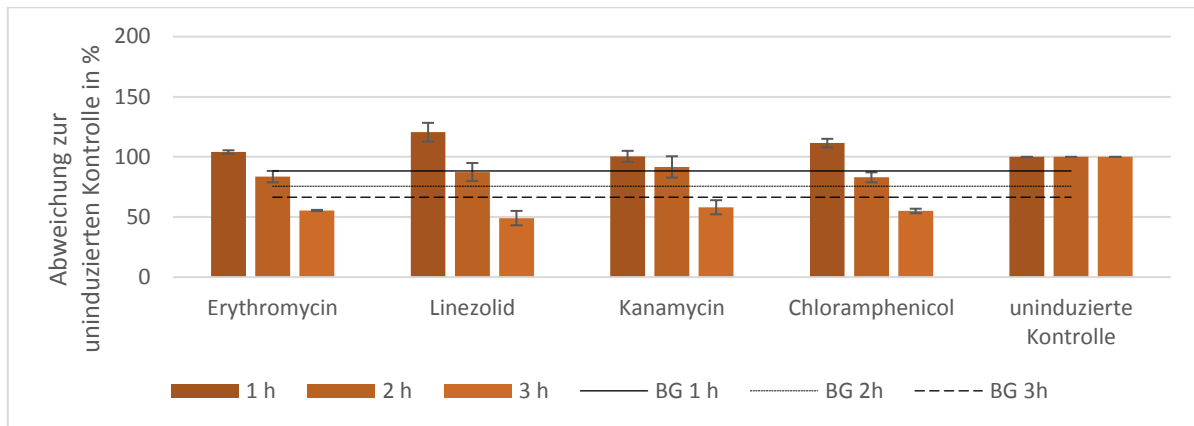


Abbildung 3.74: Untersuchung der Fluoreszenzproteinbildung von mCherry unter Einfluss von Proteinbiosynthesehemmern; gemessen 1 h und 2 h nach Antibiotikaexposition; BG 1 h = untere Bestimmungsgrenze für Werte nach 1 h; BG 2 h = untere Bestimmungsgrenze für Werte nach 2 h; BG 3 h = untere Bestimmungsgrenze für Werte nach 3 h

Die Eigenfluoreszenz der Antibiotika im Emissionsbereich des RFPs wurde mithilfe des promotorlosen Kontrollplasmides pHPKC3-11 ermittelt. Hierfür wurden die Antibiotika in der frühen exponentiellen Phase in einer Konzentration von $1 \times \text{MHK}$ zu *E. coli* R7/pHPKC3-11 hinzugegeben und die Zellen 1 h und 2 h nach Antibiotikaexposition vermessen. Für die Anzucht mit Polymyxin konnte nur eine Einfachbestimmung für die Auswertung verwendet werden.

Die Zugabe der Antibiotika bewirkte bezogen auf die uninduzierte Kontrolle keine relevante Zu- oder Abnahme der Fluoreszenzintensität. Die breiten Bestimmungsgrenzen für die Werte nach 2 h resultierten aus der hohen Standardabweichung der uninduzierten Kontrolle. Aufgrund der niedrigen RFU-Werte im Emissionsbereich des RFPs mit relativen Fluoreszenzintensitäten von 100 bis 200 RFU führten bereits geringe absolute Messschwankungen zu einer im Verhältnis großen Standardabweichung.

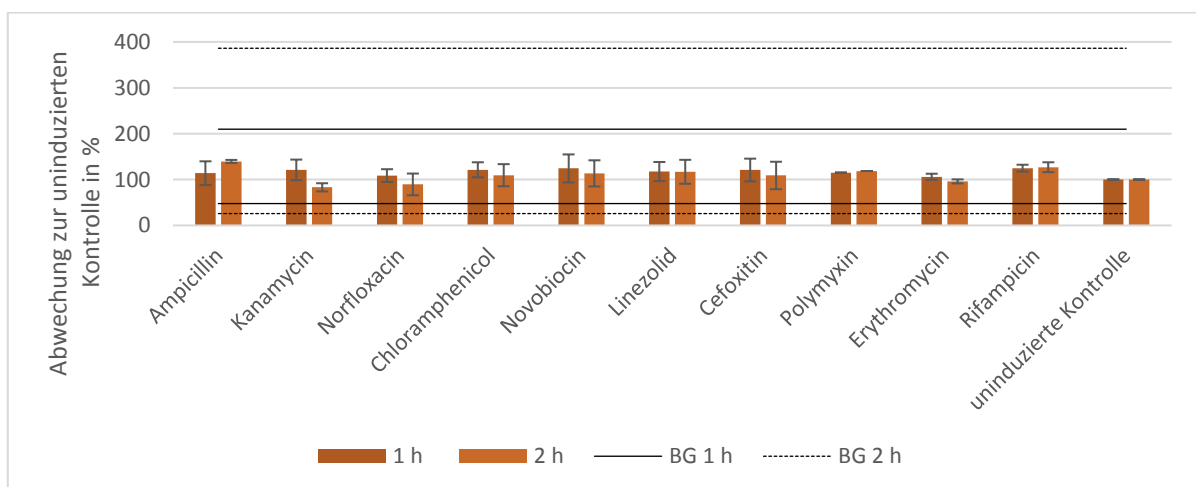


Abbildung 3.75: Ermittlung der Eigenfluoreszenz der Antibiotika; gemessen 1 h und 2 h nach Antibiotikaexposition; BG 1 h = untere und obere Bestimmungsgrenze für Werte nach 1 h; BG 2 h = untere und obere Bestimmungsgrenze für Werte nach 2 h

3.3.1.2.2 Fluoreszenzmessungen mit pHPKC3-15 und pHPKC3-16

Die Eigenfluoreszenz der verwendeten Antibiotika für die Emissionswellenlänge von mTagBFP2 wurde mit *E. coli* R7/pHPKC3-16 in M9-Medium untersucht. Die Messung zum Zeitpunkt 2 h erfolgte nur als Einzelbestimmung in Triplikaten. Die weiten Bestimmungsgrenzen für die Werte 1 h nach Antibiotikaexposition ergeben sich aufgrund von Abweichungen der RFU-Werte der uninduzierten Kontrolle von Erst- und Wiederholungsmessung und der daraus resultierenden hohen Standardabweichung. Die prozentualen Abweichungen zur uninduzierten Kontrolle zeigten, wie an der Standardabweichung zu erkennen ist, nur geringe Abweichungen zwischen den Messungen.

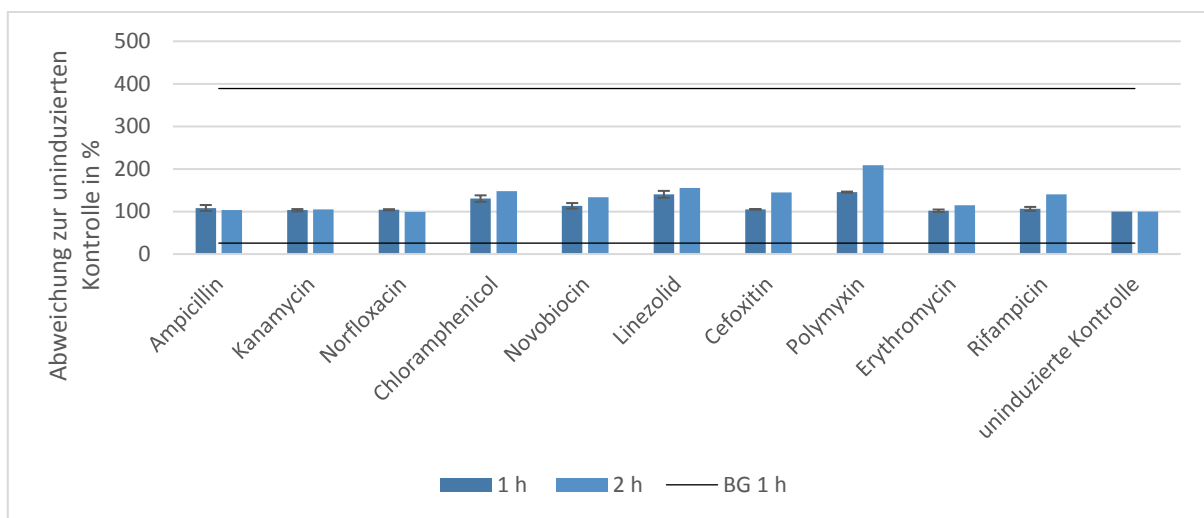


Abbildung 3.76: Untersuchung der Eigenfluoreszenz der Antibiotika mit *E. coli* R7/pHPKC3-16; gemessen 1 h und 2 h nach Antibiotikaexposition; BG 1 h = obere und untere Bestimmungsgrenze für Werte nach 1 h

3.3.1.2.3 Untersuchung zur Überlagerung des Fluoreszenzsignals von GFPmut2, mCherry und mTagBFP2

Zur Untersuchung der Überlagerung von Fluoreszenzsignalen aufgrund von sich überschneidenden Anregungs- und Emissionsspektren der Fluoreszenzproteine wurden Übernachtskulturen von *E. coli* R7 mit den jeweiligen Kontrollplasmiden pHPKC3-03, pHPKC3-10 und pHPKC3-15 bei den für GFPmut2, mCherry und mTagBFP2 verwendeten Anregungs- und Emissionswellenlängen vermessen. Zum Vergleich wurden die entsprechenden promotorlosen Kontrollplasmide ebenfalls untersucht. Die Bestimmung der Fluoreszenzintensitäten erfolgte als Triplikat in einer Einfachbestimmung.

Wie in Abbildung 3.77 zu erkennen ist, emittieren die Fluoreszenzproteine spezifisch nur bei den für sie verwendeten Emissionswellenlängen. Eine Überlagerung der Fluoreszenzsignale bei Messungen mit pHPKC3-14 war daher zu vernachlässigen.

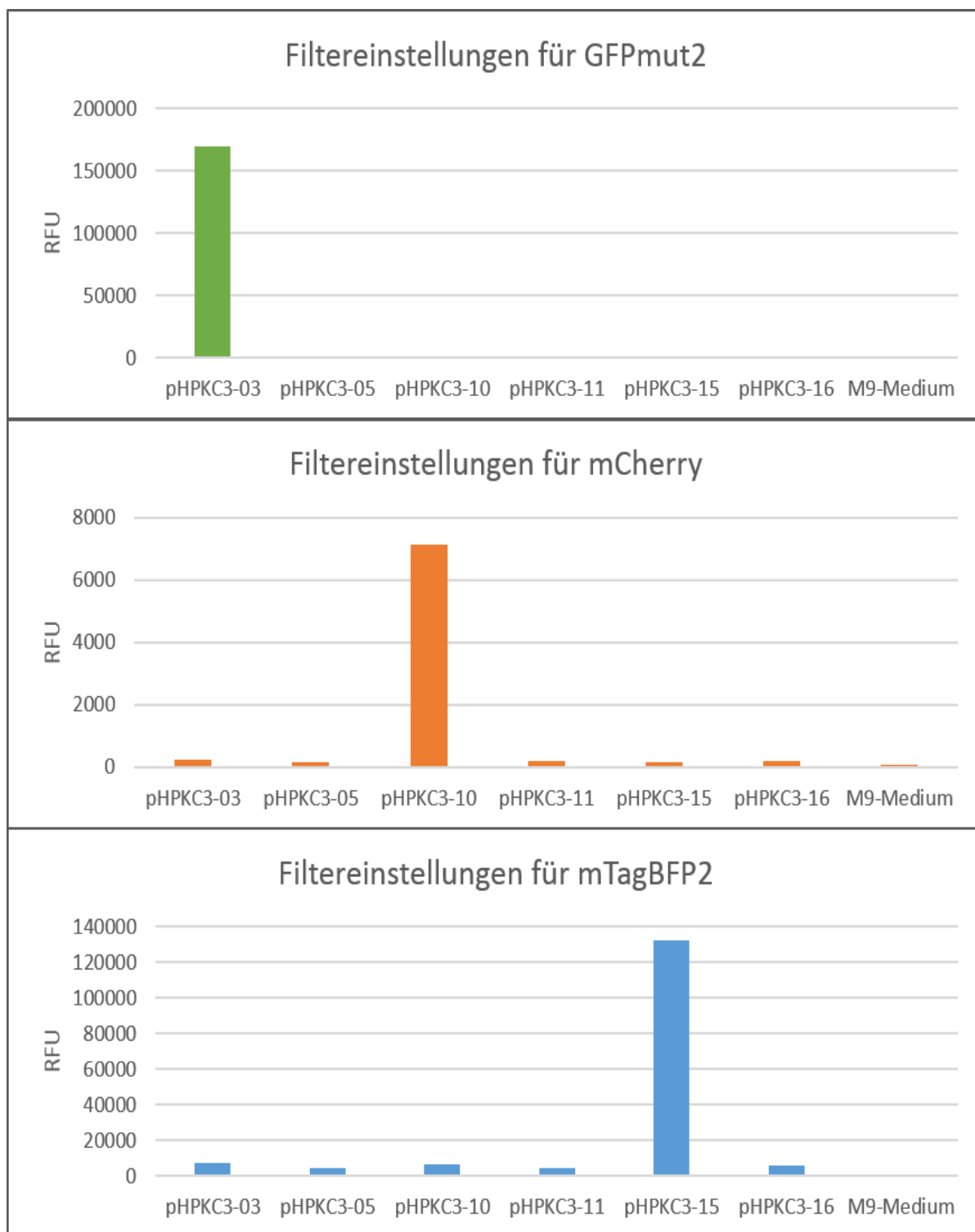


Abbildung 3.77: Untersuchung der Überlagerung der Fluoreszenzsignale der verwendeten Fluoreszenzproteine GFPmut2, mCherry und mTagBFP2; pHPKC3-03 = *srp::gfpmut2*, pHPKC3-05 = *gfpmut2* ohne Promotor, pHPKC3-10 = *srp::mCherry*, pHPKC3-11 = *mCherry* ohne Promotor, pHPKC3-15 = *srp::mTagBFP2*, pHPKC3-16 = *mTagBFP2* ohne Promotor

3.3.2 Erweiterung der individuellen Messsysteme um die Plasmide pHPKC3-07 und pHPKC3-12

Die Messsysteme zum Nachweis von Störungen der Zellwandsynthese und zum Nachweis von Proteinbiosynthesehemmern wurden um die Reporterplasmide pHPKC3-07 und pHPKC3-12 erweitert. Das Plasmid pHPKC3-07 besteht aus dem regulatorischen Bereich von *cpxP* fusioniert mit dem Gen *mCherry* und diente zum Nachweis der Proteinbiosynthesehemmer. Für den Nachweis von Störungen der Zellwandsynthese wurde das Plasmid pHPKC3-12 konstruiert, welches das *ampR-pampC*-Fragment trägt, fusioniert mit *mTag-BFP2*.

3.3.2.1 Konstruktion von pHPKC3-07 und pHPKC3-12

Die Konstruktion des Reporterplasmides pHPKC3-07 erfolgte über eine SOEing-PCR. Die Einzelfragmente wurden von Kochlysat-DNA aus *E. coli* C600 mit den Primern *cpxP*_EcoK12_5_-451 und *cpxP*-*mCherry*_3_+25 sowie vom Vektor pET-*mCherry* LIC mit den Primern *cpxP*-*mCherry*_5_-25 und *mCherry*_EcoK12_3_+948 amplifiziert. Das erhaltene SOEing-Produkt wurde über die *Pst*I-Schnittstelle in pHPKC3-02 inseriert.

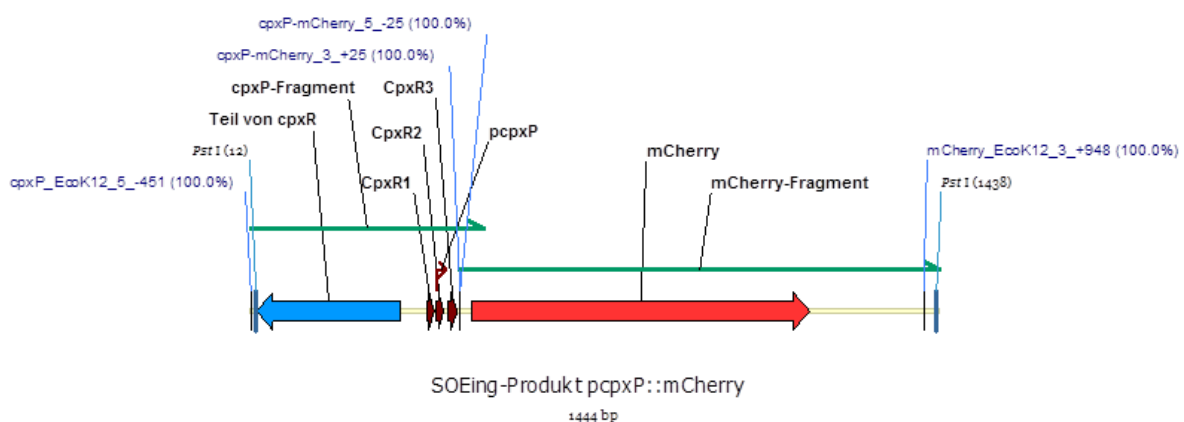


Abbildung 3.78: SOEing-Produkt aus dem Promotorbereich von *cpxP* und dem Gen *mCherry*

Die Transformanten mit pHPKC3-07 zeigten eine durch die Expression von *mCherry* verursachte rötliche Färbung, welche im Vergleich zu Transformanten mit pHPKC3-10 schwächer ausgeprägt war. Die Bildung des Fluoreszenzproteins im uninduzierten Zustand wurde bereits bei mit dem GFPmut2-Analogon pHPKC3-08 transformierten Zellen beobachtet. Die Plasmide wurden über alkalische Lyse isoliert und über Restriktionsverdau mit *Bam*HI das spezifische Bandenmuster für pHPKC3-07 bestätigt. Die erwarteten Fragmentgrößen von 4412 bp und 2129 bp lagen nur bei dem aus T5 isolierten Plasmid vor. Über Sequenzierung des *cpxP*-Promotorbereiches und des Übergangs zu *mCherry* wurden konstruktionsbedingte Mutationen ausgeschlossen.

Bei dem Plasmid aus T9 wurde das SOEing-Produkt vermutlich zweifach inseriert. Der Transformant zeigte eine im Vergleich zu den aus T5 und T7 isolierten Plasmiden deutlich intensivere Rotfärbung.

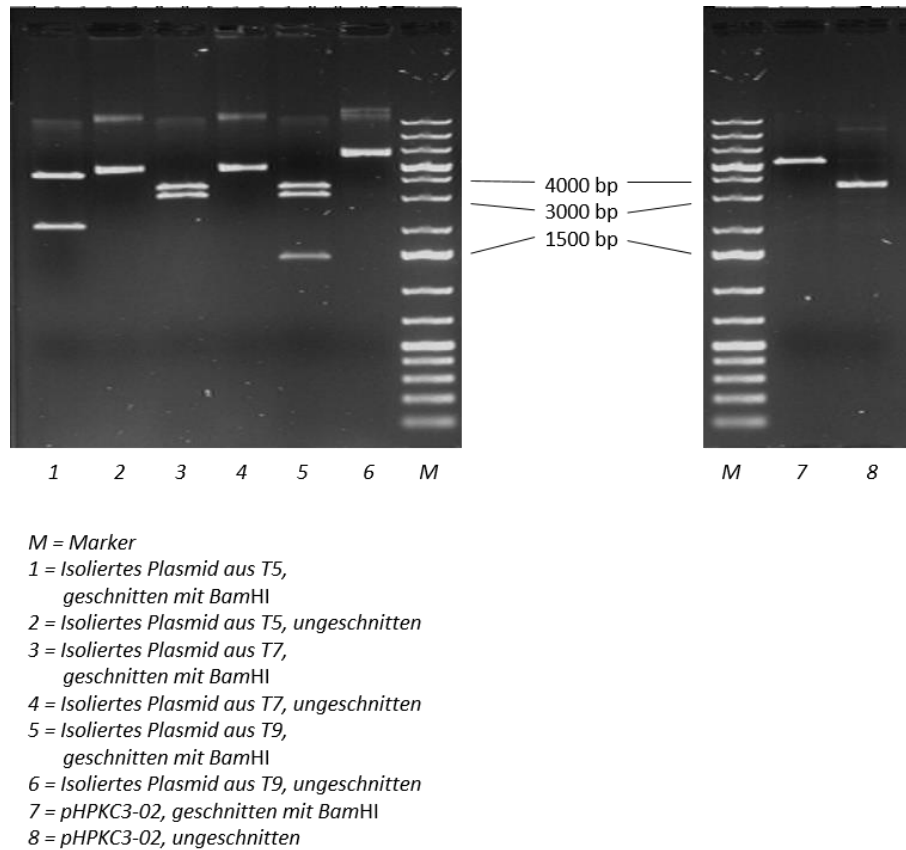


Abbildung 3.79: Restriktionsverdau von pHPKC3-07 und des Ausgangsplasmides pHPKC3-02 mit *Bam*HI

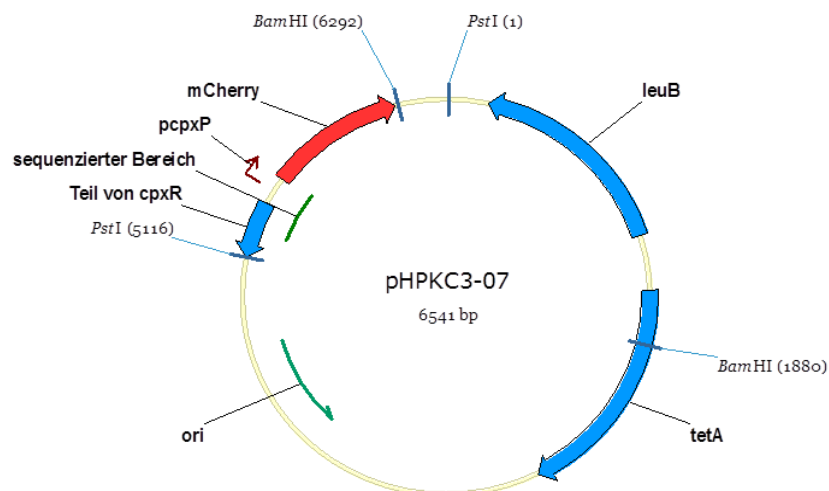


Abbildung 3.80: Plasmidkarte von pHPKC3-07

Die Einzelfragmente für die SOEing-PCR zur Konstruktion des Reporterplasmides pHPKC3-12 wurden mit den Primern *ampR_Cf_fw_+910* und *ampR-mTagBFP2_-109_rv* (*ampR-pampC*-Fragment) von Kochlysat-DNA aus *Citrobacter freundii* GK 100 sowie mit *mTagBFP2-ampR_fw_-23* und *mTagBFP2_+1018_rv* (*mTagBFP2*-Fragment) vom Plasmid pBAD-mTagBFP2 amplifiziert. Das SOEing-Produkt wurde über die *Pst*I-Schnittstelle in pHPKC3-02 inseriert.

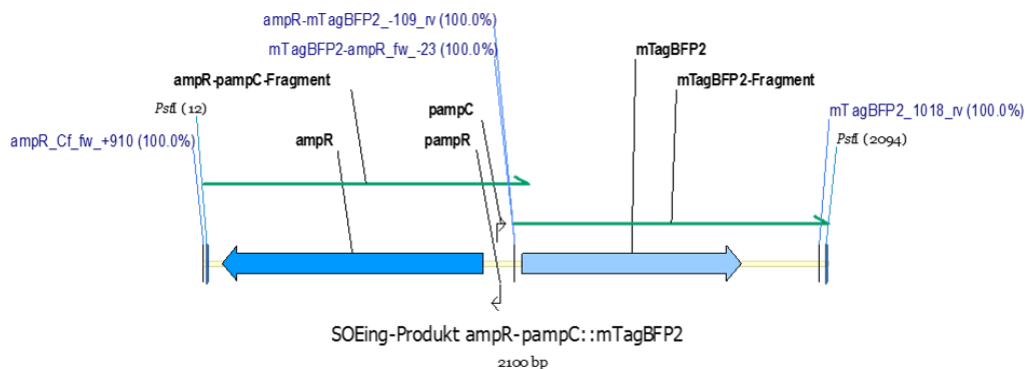


Abbildung 3.81: SOEing-Produkt aus *ampR* und dem Promotorbereich von *ampR* und *ampC* (*ampR-pampC*-Fragment) und dem Gen *mTagBFP2* (*mTagBFP2*-Fragment)

Die Kochlysat-DNA der erhaltenen Transformanten wurde mittels PCR auf die Anwesenheit des *ampR-pampC*-Fragmentes untersucht, wobei der Transformant T61 mit positivem Nachweis ermittelt wurde. Nach Isolierung des Plasmides und anschließendem Restriktionsverdau mit *Eco*RI konnte die Identität von pHPKC3-12 aufgrund der erwarteten Fragmentgrößen von 3308 bp und 3889 bp bestätigt werden. Über Sequenzierung wurden konstruktionsbedingte Mutationen im intergenetischen Bereich von *ampR* und *ampC* sowie im Übergang zu *mTagBFP2* ausgeschlossen.

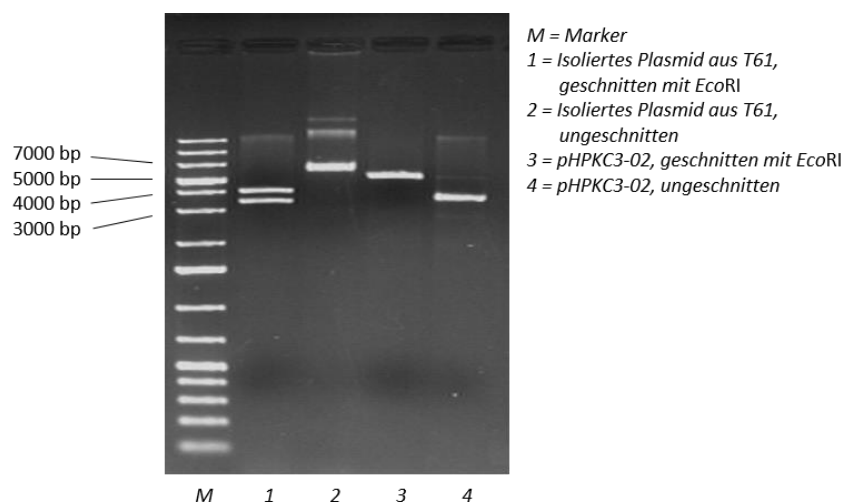


Abbildung 3.82: Restriktionsverdau von pHPKC3-12 und des Ausgangsplasmides pHPKC3-02 mit *Eco*RI

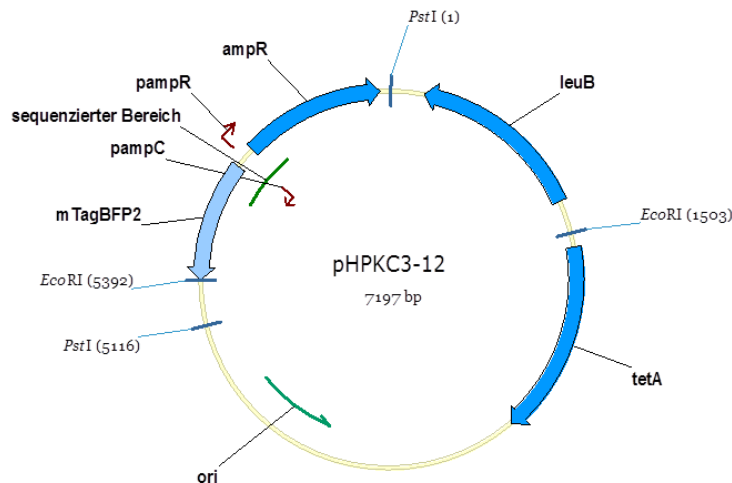


Abbildung 3.83: Plasmidkarte von pHPKC3-12

3.3.2.2 Fluoreszenzmessungen mit pHPKC3-07 und pHPKC3-12

3.3.2.2.1 Untersuchung zur Sensitivität von *E. coli* R7/pHPKC3-07 am Beispiel von Erythromycin

Die Untersuchung zur Sensitivität von pHPKC3-07 wurde am Beispiel von Erythromycin in einer Konzentration von 1 x MHK durchgeführt. Der Versuch erfolgte als Dreifachbestimmung in Triplikaten. Zum besseren Vergleich der mit pHPKC3-10 ermittelten Ergebnisse zur Bildung von Fluoreszenzprotein nach Zugabe von Proteinbiosynthesehemmern (Kapitel 3.3.1.2.1) wurde trotz des Übergangs in die Absterbephase die Fluoreszenzintensität nach 3 h in Abb. 3.84 dargestellt.

Das Ergebnis der Fluoreszenzmessung zeigte über die Zeit eine Abnahme der relativen Fluoreszenzintensität bezogen auf die uninduzierte Kontrolle. Im Vergleich zu vorherigen Fluoreszenzmessungen mit pHPKC3-08 nach Zugabe von Erythromycin war die Sensitivität von pHPKC3-07 jedoch deutlich verringert. Während für pHPKC3-08 zum Messpunkt 1 h eine Abnahme um 13 % bzw. zum Messpunkt 2 h um 58 % zu beobachten war (Kapitel 3.2.2.4.2), lag bei Messungen mit pHPKC3-07 nach 1 h keine Abnahme und zum Messpunkt 2 h nur eine Abnahme von 7 % vor. Auch der direkte Vergleich der Ergebnisse von pHPKC3-07 und pHPKC3-10 zeigte eine stärkere Abnahme der Fluoreszenzintensität unter Verwendung des Kontrollplasmides. Die Widersprüchlichkeit dieser Ergebnisse unter anderem in Bezug zu den mit den GFPmut2-Analoga ermittelten Ergebnissen wird in Kapitel 4.4.3 diskutiert. Unabhängig von der Ursache der Fluoreszenzabnahme ist aufgrund der Dreifachbestimmung und der geringen Standardabweichung die Abnahme für pHPKC3-07 unter Zugabe von Erythromycin reproduzierbar.

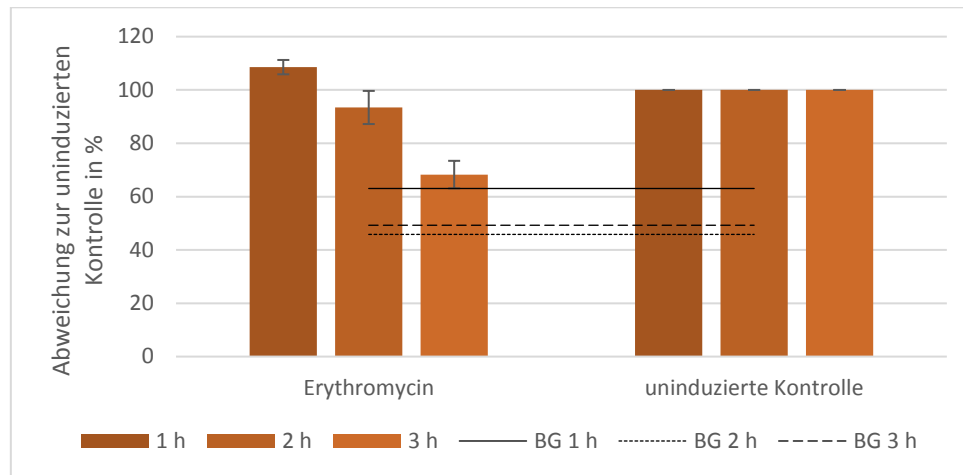


Abbildung 3.84: Untersuchung zur Sensitivität von *E. coli* R7/pHPKC3-07 am Beispiel von Erythromycin; gemessen 1 h, 2 h und 3 h nach Antibiotikaexposition; BG 1 h = untere Bestimmungsgrenze für Werte nach 1 h; BG 2 h = untere Bestimmungsgrenze für Werte nach 2 h; BG 3 h = untere Bestimmungsgrenze für Werte nach 3 h

3.3.2.2.2 Untersuchung zur Sensitivität von *E. coli* SN0302/pHPKC3-12 am Beispiel von Cefoxitin

Die *ampD*-Mutante *E. coli* SN0302 wurde mit dem Reporterplasmid pHPKC3-12 transformiert und die Fluoreszenzintensität 1 h, 2 h und 3 h nach Zugabe von Cefoxitin gemessen. Die eingesetzte Antibiotikakonzentration betrug 1 x MHK. Aufgrund der hohen, durch das LB-Medium vermittelten, Hintergrundfluoreszenz im Emissionsbereich von mTagBFP2 wurde die Messung parallel in M9-Medium durchgeführt. Hierfür wurde das Medium mit 1 µg/ml Thiamin und 50 µg/ml Uracil supplementiert. Die Abnahme der Bestimmungsgrenze über die Zeit beruht auf der korrelierenden Abnahme der relativen Fluoreszenzintensität von *E. coli* SN0302. Der Stamm zeigte eine im Vergleich zu *E. coli* R7 kürzere Generationszeit, sodass nach Erreichen einer OD von größer 1 eine Abnahme der relativen Fluoreszenzintensitäten erfolgte. Die dadurch resultierenden höheren relativen Fluoreszenzintensitäten zu früheren Messzeitpunkten besitzen größere Abweichungen als die geringeren Fluoreszenzintensitäten zu späteren Zeitpunkten mit der Folge einer größeren Standardabweichung und breiteren Bestimmungsgrenzen.

Die Messung von *E. coli* SN0302/pHPKC3-12 zeigte in beiden Medien, unter Berücksichtigung des möglichen Verlustes des Reporterplasmides und unterschiedlich stark ausgeprägter Eigenfluoreszenzen der Medien, zu allen gemessenen Zeitpunkten eine vergleichbare relative Fluoreszenzintensität (Abb. 3.85 und Abb. 3.86). Die Normierung der Fluoreszenzrohsignale auf die OD_{600nm} (RFU) führte in LB-Medium für die uninduzierte Kontrolle zum Messzeitpunkt 2 h und 3 h nach Antibiotikaexposition aufgrund der hohen Eigenfluoreszenz des Mediums zu RFU-Werten unterhalb der Hintergrundfluoreszenz. Der Nachweis von Cefoxitin erfolgte anhand des 3 h-Messwertes, welcher als einziger oberhalb der Bestimmungsgrenze lag.

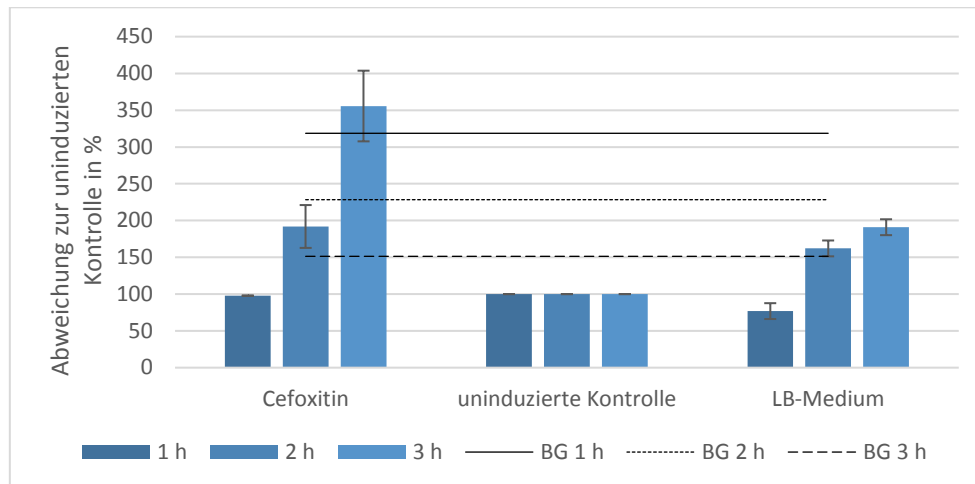


Abbildung 3.85: Untersuchung der Sensitivität von *E. coli* SN0302/pHPKC3-12 in LB-Medium am Beispiel von Cefoxitin; BG 1 h = obere Bestimmungsgrenze für Werte nach 1 h; BG 2 h = obere Bestimmungsgrenze für Werte nach 2 h; BG 3 h = obere Bestimmungsgrenze für Werte nach 3 h

In M9-Medium lag ebenfalls nur der Wert für 3 h nach Antibiotikaexposition oberhalb der Bestimmungsgrenze, sodass dieser zum Nachweis von Cefoxitin herangezogen wurde. Aufgrund der um den Faktor von 4- bis 7-fach niedrigeren prozentualen Hintergrundfluoreszenz durch das Medium bezogen auf die uninduzierte Kontrolle, wurde für weitere Versuche mit dem blauen Fluoreszenzprotein M9-Medium als Anzuchtmedium gewählt.

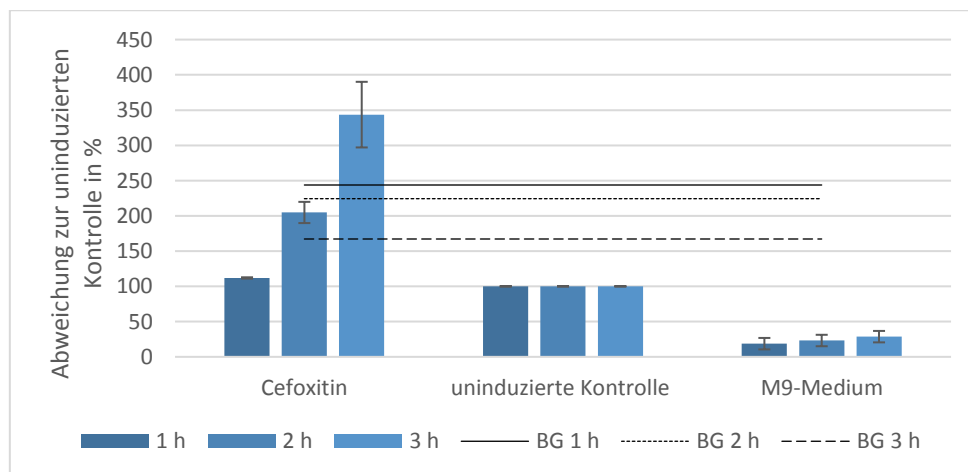


Abbildung 3.86: Untersuchung der Sensitivität von *E. coli* SN0302/pHPKC3-12 in M9-Medium am Beispiel von Cefoxitin; BG 1 h = obere Bestimmungsgrenze für Werte nach 1 h; BG 2 h = obere Bestimmungsgrenze für Werte nach 2 h; BG 3 h = obere Bestimmungsgrenze für Werte nach 3 h

Nach Untersuchungen zur Sensitivität in unterschiedlichen Medien wurde die Empfindlichkeit des Messsystems unter Verwendung verschiedener Konzentrationen an Cefoxitin bestimmt. Hierfür wurde *E. coli* SN0302/pHPKC3-12 in M9-Medium angezogen und die Fluoreszenzintensität nach Zugabe von Cefoxitin in

den Konzentrationen von 0,2 x MHK, 0,5 x MHK und 1 x MHK gemessen. Die Untersuchung der Sensitivität zeigte eine konzentrations- und zeitabhängige Zunahme der Fluoreszenzintensität mit steigender Cefoxitin-konzentration. Die niedrigste untersuchte nachweisbare Konzentration lag nach 3 h bei 0,2 x MHK, entsprechend einer Konzentration von 0,4 µg/ml.

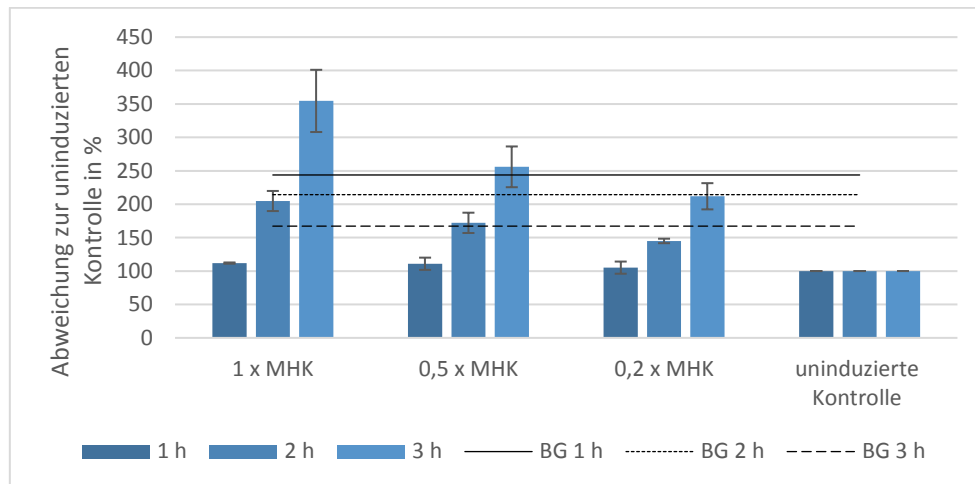


Abbildung 3.87: Untersuchung der Sensitivität von *E. coli* SN0302/pHPKC3-12 in M9-Medium unter Zusatz unterschiedlicher Konzentrationen an Cefoxitin; BG 1 h = obere Bestimmungsgrenze für Werte nach 1 h; BG 2 h = obere Bestimmungsgrenze für Werte nach 2 h; BG 3 h = obere Bestimmungsgrenze für Werte nach 3 h

3.3.3 Konstruktion des kombinierten Messsystems

3.3.3.1 Konstruktion des Reporterplasmides pHPKC3-14

Für die Konstruktion des kombinierten Messsystems wurden die Reportersysteme *ampR-pampC::mTag-BFP2* und *pcpXP::mCherry* in das Plasmid pHPKC3-06 (*precA::gfpmut2*) inseriert. Untersuchungen zur Sensitivität von pHPKC3-12 (Kapitel 3.3.2.2.2) zeigten, dass das Reportersystem einen sensitiven Nachweis für Cefoxitin lieferte. Dem entgegen lag für das Reportersystem *pcpXP::mCherry* nur eine geringe, aber reproduzierbare Abnahme der Fluoreszenzintensität nach 3 h unter Zugabe von Erythromycin vor (Kapitel 3.3.2.2.1) vor. Auch wenn mit dem *pcpXP::mCherry*-Konstrukt kein sensibler Nachweis über eine veränderte Expression von *cpxP* erbracht werden konnte, wurde das Reportersystem für die Konstruktion von pHPKC3-14 verwendet um zumindest die reproduzierbare Fluoreszenzabnahme zum Nachweis von Proteinbiosynthesehemmern zu nutzen.

Die Konstruktion von pHPKC3-14 erfolgte in zwei Schritten. Aufgrund von Restriktionsschnittstellen in Promotorbereichen, in Genen der Fluoreszenzproteine oder anderen benötigten Strukturgenen wurde zuerst das Reportersystem *ampR-pampC::mTagBFP2* und anschließend *pcpXP::mCherry* inseriert. Der erste Schritt umfasste die Konstruktion von pHPKC3-09, einem Zwischenkonstrukt, welches die Reportersysteme *precA::gfpmut2* und *ampR-pampC::mTagBFP2* auf einem Plasmid vereinte. Über die Primer

ampR_Cf_fw_+910_AvaI und *mTagBFP2_rv_+1018_AvaI* wurde vom Reporterplasmid pHPKC3-12 das *ampR-pampC::mTagBFP2*-Fragment amplifiziert und über die *AvaI*-Schnittstelle in pHPKC3-06 inseriert. Die Transformanten wurde im Restriktionsverdau mit *EcoRI* kontrolliert. Die Identität von pHPKC3-09 wurde für das aus T5 isolierte Plasmid durch den Nachweis der erwarteten Fragmentgrößen von 4991 bp und 3229 bp bestätigt.

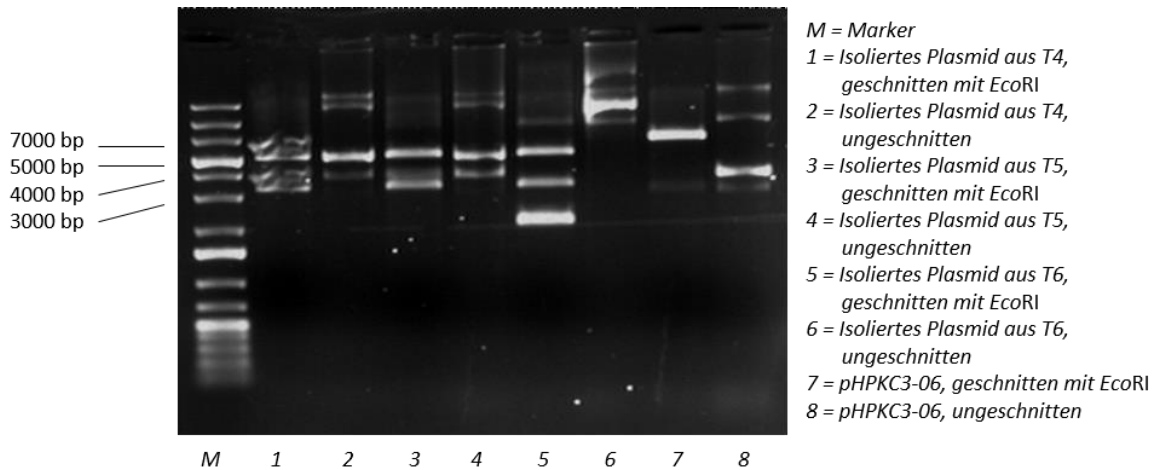


Abbildung 3.88: Restriktionsverdau von pHPKC3-09 und des Ausgangsplasmides pHPKC3-06 mit *EcoRI*

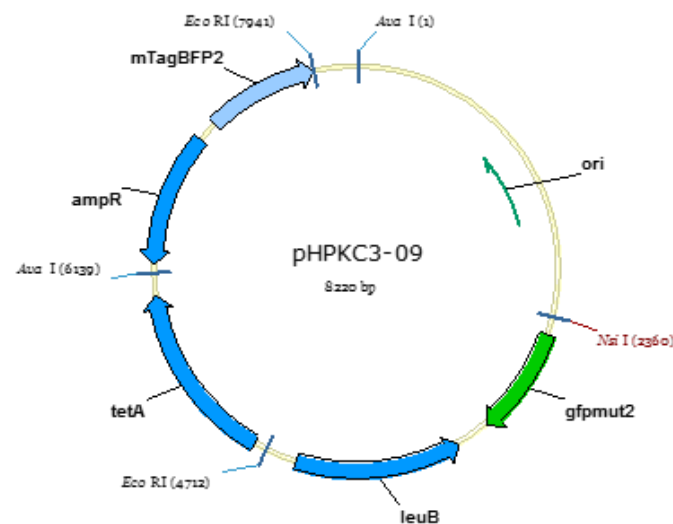


Abbildung 3.89: Plasmidkarte des Zwischenproduktes pHPKC3-09

Ausgehend von pHPKC3-07 wurde das Reportersystem *pcpXP::mCherry* mit den Primern *cpXP_E.coli_fw_-451_NsiI* und *mCherry_Eco_rv_948_NsiI* amplifiziert und über die *NsiI*-Schnittstelle in pHPKC3-09 inseriert. Die Schnittstelle *NsiI* befindet sich 34 bp vor der -35-Region des *recA*-Promotors und führte somit zu keiner Störung der *gfpmut2*-Expression. Das Plasmid wurde über Restriktionsverdau mit *EcoRI* kontrolliert und die

erwarteten Fragmentgrößen von 6417 bp und 3229 bp erhalten. Die Transformanten zeigten analog zu Transformanten mit pHPKC3-07 eine leichte rötliche Färbung. Mittels Sequenzierung des intergenetischen Bereichs von *ampR* und *ampC* inklusive des Übergangs zu *mTagBFP2* sowie des Promotorbereichs von *cpxP* und des Übergangs zu *mCherry* wurden konstruktionsbedingte Mutationen ausgeschlossen.

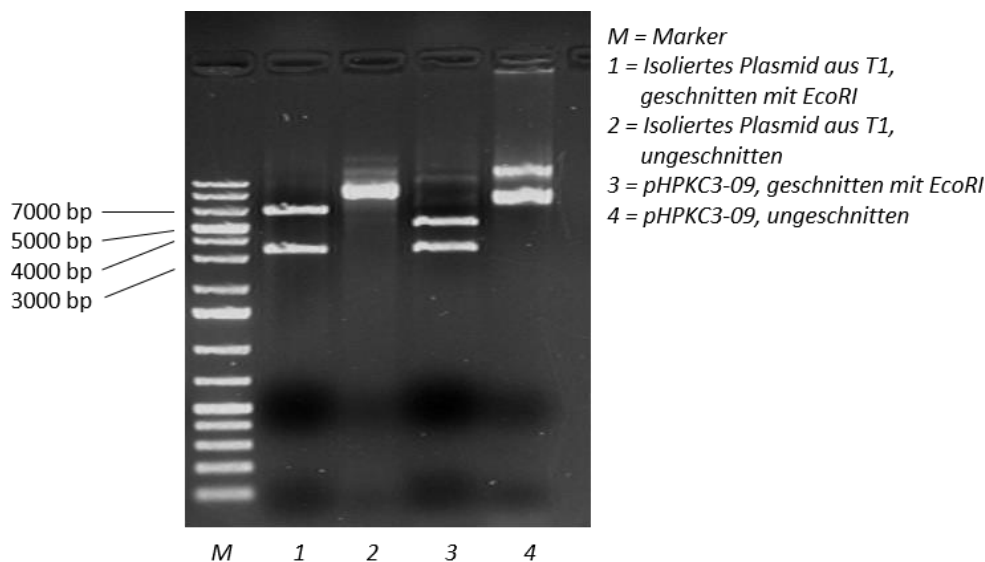


Abbildung 3.90: Restriktionsverdau von pHPKC3-14 und des Ausgangsplasmides pHPKC3-09 mit *EcoRI*

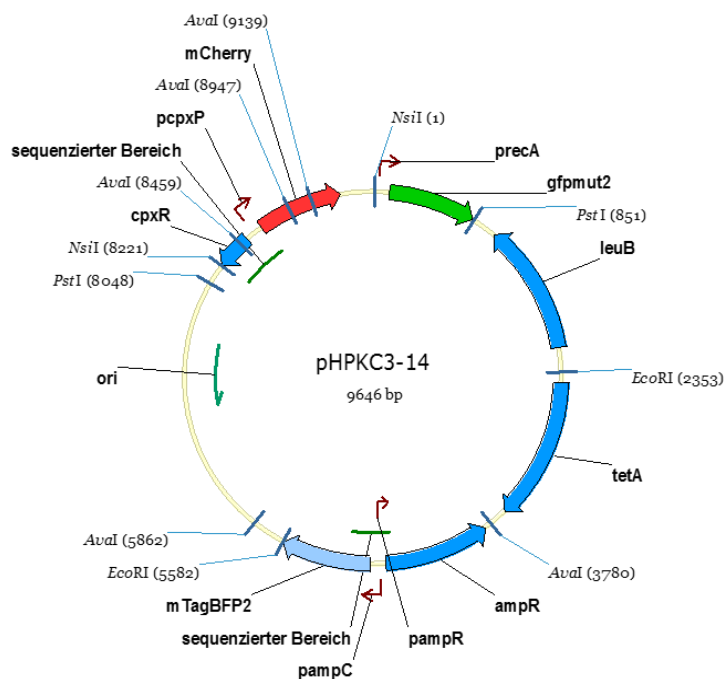


Abbildung 3.91: Plasmidkarte von pHPKC3-14

3.3.3.2 Vergleich der Sensitivität von kombiniertem und individuellen Messsystemen

Für die Messsysteme zum Nachweis von DNA-Schäden und Proteinbiosynthesehemmern wurde die Sensitivität hinsichtlich der Messung als individuelles bzw. als kombiniertes Messsystem verglichen (Abb. 3.92). Die zugesetzte Antibiotikakonzentration betrug 1 x MHK. Aufgrund nicht ausreichender Ergebnisse von *E. coli* SN0302/pHPKC3-14 lag für das Messsystem zum Nachweis von β -Laktamantibiotika kein Vergleich der Sensitivität vor.

Die Messung mit pHPKC3-14 nach Zugabe von Erythromycin zeigte für den Messwert 3 h nach Antibiotikaexposition eine größere Abnahme der relativen Fluoreszenzintensität als bei der Messung mit pHPKC3-07. Bezogen auf die uninduzierte Kontrolle lag bei der Messung mit pHPKC3-07 die Fluoreszenzintensität bei 68,28 % des Ausgangswertes. Im Vergleich dazu war die Fluoreszenzintensität gemessen mit pHPKC3-14 auf 28,63 % reduziert und lag unterhalb der Bestimmungsgrenze. Die Beteiligung weiterer Effekte, welche mit dem Absterben des Stammes assoziiert sind, können für den Messzeitpunkt nach 3 h nicht ausgeschlossen werden. Für das Messsystem zum Nachweis von DNA-Schäden war die Empfindlichkeit gemessen mit pHPKC3-14 gegenüber pHPKC3-06 sowohl nach 1 h als auch nach 2 h um über die Hälfte reduziert. Die Fluoreszenzintensität nach 1 h für die Messung mit pHPKC3-14 lag unterhalb der Bestimmungsgrenze, so dass der 2 h-Wert für den Nachweis von Norfloxacin verwendet wurde. Die Umstellung auf das kombinierte Messsystem führte für den Nachweis von DNA-Schäden zu einem deutlichen Verlust der Sensitivität, während für das Messsystem zum Nachweis von Proteinbiosyntheseinhibitoren die Sensitivität des kombinierten Messsystems erhöht war.

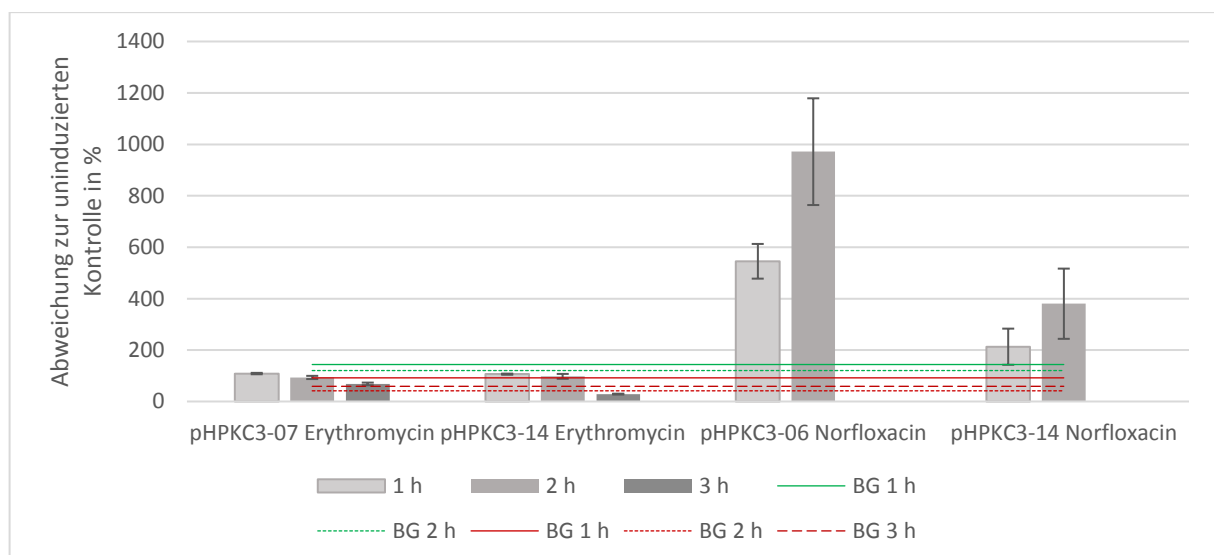


Abbildung 3.92: Vergleich der Sensitivität von *E. coli* R7/pHPKC3-06 (= *precA::gfpmut2*) und *E. coli* R7/pHPKC3-07 (*pcpxP::mCherry*) mit *E. coli* R7/pHPKC3-14 (*precA::gfpmut2* + *pcpxP::mCherry* + *ampR-pampC::mTagBFP2*); gemessen 1 h, 2 h und 3 h nach Antibiotikaexposition; BG 1 h = Bestimmungsgrenze für Werte nach 1 h; BG 2 h = Bestimmungsgrenze für Werte nach 2 h; BG 3 h = Bestimmungsgrenze für Werte nach 3 h; grün = BG für Werte mit der Filtereinstellung für GFPmut2; rot = BG für Werte mit der Filtereinstellung für mCherry; die dargestellten BGs beziehen sich auf *E. coli* R7/pHPKC3-14

3.3.4 Anwendung des kombinierten Messsystems auf unbekannte Proben

Das kombinierte Messsystem wurde zum Abschluss dieser Arbeit in einem verblindeten Versuch getestet und auf dessen Eignung zum Nachweis antibakterieller Substanzen geprüft. Hierzu wurden die Stämme *E. coli* R7/pHPKC3-14 und *E. coli* SN0302/pHPKC3-14 bis zur frühen exponentiellen Phase in M9-Medium angezogen und jeweils auf fünf Kolben aufgeteilt. Ein Kolben von jedem Stamm blieb von der Antibiotikazugabe unberührt und diente als uninduzierte Kontrolle (Kolben 1 für *E. coli* R7/pHPKC3-14 und Kolben 6 für *E. coli* SN0302/pHPKC3-14). In die anderen Kolben wurde verblindet von einer Mitarbeiterin des Arbeitskreises eine Auswahl an Antibiotika im Bereich von 0,2 x bis 1 x MHK hinzugegeben (Tab. 3.9). Da zum Nachweis einer Wirkung von β -Laktamantibiotika nur der Stamm *E. coli* SN0302/pHPKC3-14 geeignet war, wurde jedem mit Antibiotika supplementierten Kolben von *E. coli* R7/pHPKC3-14 ein Kolben mit *E. coli* SN0302/pHPKC3-14 mit dem gleichen Antibiotikum in der gleichen stammspezifischen MHK zugeordnet (Tabelle 3.10). Aufgrund der in MH-Medium bestimmten MHK-Werte für *E. coli* SN0302/pHPKC3-14 waren geringe Abweichungen in der Vergleichbarkeit der MHKs nicht auszugeschließen. Neben der Antibiotikauswahl wurde Teebaumöl als weitere antibakteriell wirksame Substanz ergänzt. Die in der Literatur angegebene MHK für *E. coli* für Teebaumöl lag im Bereich von 0,08 – 2 % und wurde aufgrund des gewünschten MHK-Intervalls von 0,2 - 1 x MHK auf eine Konzentration von 0,016 % – 2 % festgelegt (Carson, Hammer, & Riley, 2006). Die unbekannten Proben wurden 1 h 15 min, 2 h und 3 h nach Antibiotikazugabe mit den drei Filtereinstellungen für GFPmut2, mCherry und mTagBFP2 vermessen.

Tabelle 3.9: Antibiotikaauswahl mit entsprechendem MHK-Intervall (0,2 x – 1 x MHK)

Antibiotikum	<i>E. coli</i> R7 [µg/ml]	<i>E. coli</i> SN0302 [µg/ml]
<i>Ampicillin</i>	0,8 - 4	0,8 - 4
<i>Cefoxitin</i>	0,4 - 2	0,4 - 2
<i>Chloramphenicol</i>	0,1 – 0,5	0,4 - 2
<i>Erythromycin</i>	0,2 - 1	12,8 - 64
<i>Kanamycin</i>	0,025 – 0,125	0,4 - 2
<i>Linezolid</i>	1,6 - 8	12,8 - 64
<i>Norfloxacin</i>	0,0064 - 0,032	0,0032 - 0,016
<i>Novobiocin</i>	0,2 - 1	12,8 - 64
<i>Polymyxin</i>	0,1 - 0,5	0,05 - 0,25
<i>Rifampicin</i>	1,6 - 8	0,8 - 4
<i>Teebaumöl</i>	0,016 % - 2 % (Carson et al., 2006)	0,016 % - 2 % (Carson et al., 2006)

Tabelle 3.10: Zuordnung der Kolben von *E. coli* R7/pHPKC3-14 und *E. coli* SN0302/pHPKC3-14

<i>E. coli</i> R7/pHPKC3-14	<i>E. coli</i> SN0302/pHPKC3-14
Kolben 1 (uninduzierte Kontrolle)	Kolben 6 (uninduzierte Kontrolle)
Kolben 2	Kolben 7
Kolben 3	Kolben 8
Kolben 4	Kolben 9
Kolben 5	Kolben 10

Die Auswertung der relativen Fluoreszenzintensität (Abb. 3.93) ergab für Kolben 7 (*E. coli* SN0302/pHPKC3-14) zum Messzeitpunkt 3 h nach Antibiotikazugabe, gemessen mit den Filtereinstellungen für mTagBFP2, eine Zunahme der Fluoreszenzintensität von 233%. Diese lag für Kolben 2 bzw. bei Vermessung mit den Filtereinstellungen für mCherry und GFPmut2 nicht vor. Das Fluoreszenzprofil von Kolben 7 wies daher auf die Anwesenheit eines β -Laktamantibiotikums hin.

Für den Kolben 3 lag bei Vermessung mit allen drei Emissionswellenlängen eine Reduktion des Fluoreszenzsignals vor. Die Abnahme zeigte eine zeitabhängige Korrelation und reichte bei Verwendung der Filtereinstellungen des grünen und blauen Fluoreszenzproteins nach 3 h von 50 % bzw. der des RFPs bis unter 35 %. Aufgrund der nicht gesteigerten Expression von *gfpmut2*, handelt es sich vermutlich bei der Zugabe um einen Proteinbiosynthesehemmer und nicht um Rifampicin, welches bei Messungen mit pHPKC3-08 (Abb. 3.54) ebenfalls zu einer Abnahme der Fluoreszenzintensität geführt hatte. Trotz einer Antibiotikazugabe in der entsprechenden MHK konnte eine Abnahme für den Kolben 8 mit *E. coli* SN0302/pHPKC3-14 bei keiner Filtereinstellung beobachtet werden.

Den Kolben 4 bzw. 9 waren keine der nachweisbaren Stressreaktionen zuzuordnen. Weder bei *E. coli* R7/pHPKC3-14 noch bei *E. coli* SN0302/pHPKC3-14 lag bei Vermessung einer der verwendeten Filtereinstellungen eine relevante Änderung der Fluoreszenzintensität vor.

Die erhöhte *gfpmut2*-Expression in Kolben 5 deutete auf eine Aktivierung des SOS-Systems hin, welche wie in vorherigen Versuchen zur Spezifität von pHPKC3-06 gezeigt (Kapitel 3.2.1.2.1), sowohl auf die Zugabe von Norfloxacin als auch von Rifampicin zurückzuführen sein könnte. Zu vermuten war, dass es sich aufgrund der nur geringen Abnahme der Fluoreszenzintensität von mCherry bei Kolben 5 um den Zusatz von Norfloxacin handelte. In den Versuchen mit pHPKC3-08 zeigte Rifampicin eine mit den Proteinbiosynthesehemmern vergleichbare Abnahme der *gfpmut2*-Expression. Eine erhöhte Fluoreszenzintensität für Kolben 10 lag nicht vor.

Die Auflösung der Zuordnung der zugesetzten Antibiotika und deren Konzentrationen ergab für die Kolben 2 und 7 die Zugabe von Ampicillin in einer Konzentration von 0,375 x MHK, für die Kolben 3 und 8 die Zugabe von Linezolid in einer Konzentration von 0,5 x MHK, für Kolben 4 und 9 die Zugabe von Teebaumöl in einer

Konzentration von 0,02 % und für die Kolben 5 und 10 die Zugabe von Norfloxacin in einer Konzentration von 0,469 x MHK für *E. coli* R7/pHPKC3-14 bzw. von 0,938 x MHK für *E. coli* SN0302/pHPKC3-14. Die unterschiedlichen zugebenen Konzentrationen für Norfloxacin sind auf einen Fehler bei der Antibiotikazugabe zurückzuführen.

Zusammenfassend konnten alle Annahmen bezüglich der zugesetzten Antibiotika bestätigt und die Wirkungsweise der Antibiotika über das entwickelte Messsystem mit pHPKC3-14 als Reporterplasmid erfolgreich nachgewiesen werden.

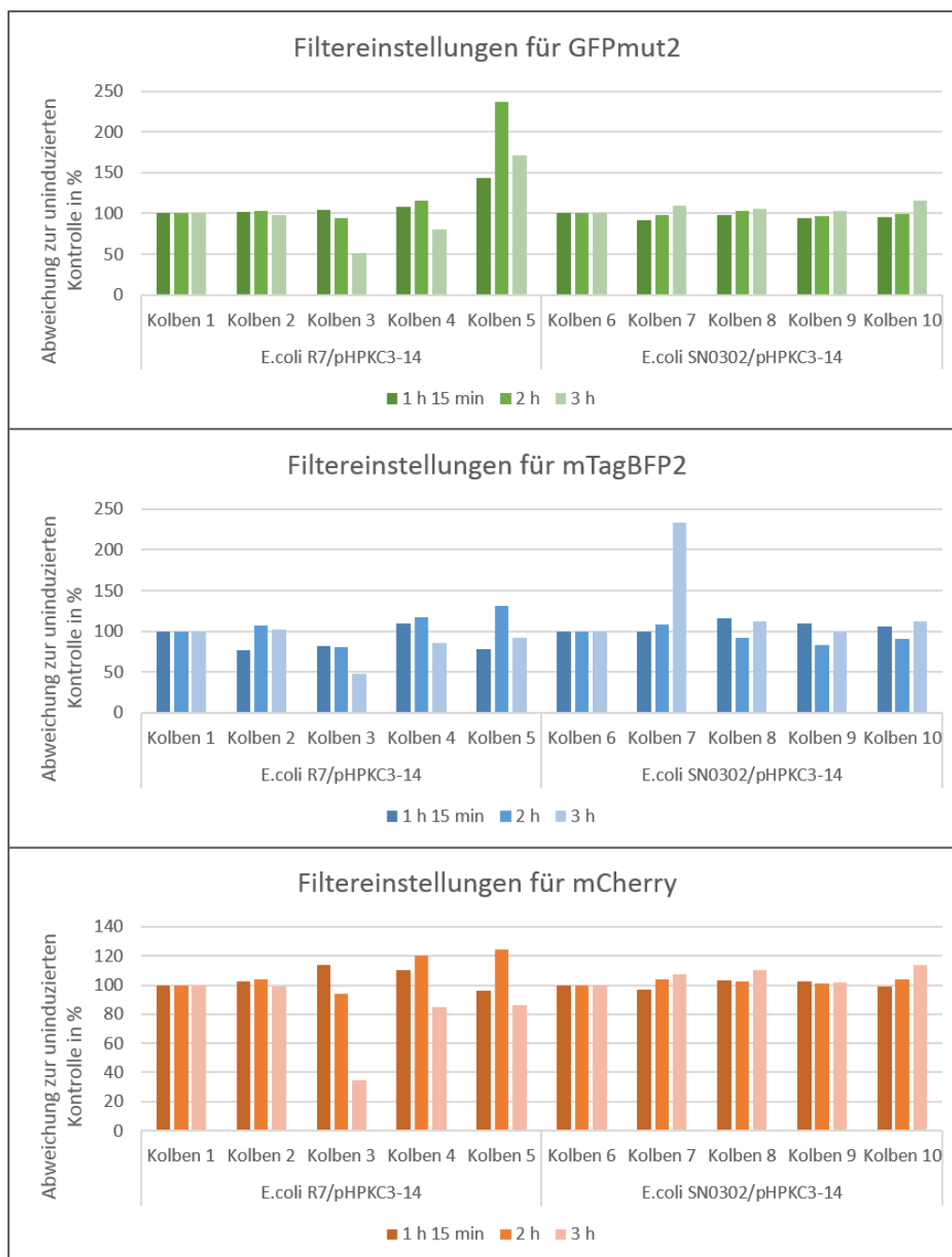


Abbildung 3.93: Untersuchung unbekannter Proben im verblindeten Versuch mit dem Reporterplasmid pHPKC3-14

4 Diskussion

Das Ziel dieser Arbeit bestand in der Etablierung eines auf Reportergentechnologie basierenden Messsystems, welches geringste Mengen an antibiotisch wirksamen Stoffen detektieren sollte. Mithilfe des Messsystems sollten sowohl vor dem Hintergrund des vermehrten Antibiotikaeinsatzes Kontaminationen von Antibiotika in Untersuchungsproben zum Beispiel in Erd- oder Wasserproben nachgewiesen, als auch ein Beitrag zur Detektion antibakterieller Aktivitäten auch von neuen antimikrobiell wirksamen Substanzen geleistet werden. Als Ausgangstamm für die Entwicklung eines hochempfindlichen Sensororganismus für die Erfassung von antimikrobiellen Aktivitäten wurde *E. coli* K-12 gewählt, der aufgrund seiner Eigenschaften, wie z.B. einer kurzen Generationszeit, dem Fehlen von Pathogenität und seiner einfachen Kultivierung unter Laborbedingungen einen klassischen Labor- und Untersuchungskeim in der molekularen Biologie darstellt. Zur Optimierung der Sensitivität wurde von dem Sensorstamm eine $\Delta toIC$ -Mutante konstruiert, die aufgrund eines verringerten Efflux und der dadurch erhöhten intrazellulären Akkumulation der Antibiotika, die gewünschte erhöhte Sensitivität aufwies. Auf Grundlage der Hypothese des gemeinsamen Wirkmechanismus bakterizider Antibiotika nach Kohanski et al. wurde mittels Literaturrecherche eine Auswahl von Genen aus dem Citratzyklus, der Atmungskette, dem Glyoxylatweg, der Glutamatsynthese, dem Pentocephosphatweg, der Eisen-Schwefel-Cluster-Synthese sowie aus Reparatur- und Stresssystemen getroffen, deren regulatorischen Elemente für die Reporterplasmidkonstruktion in Betracht gezogen wurden und die mittels Näherung durch qRT-PCR weiter untersucht wurden (Kohanski et al., 2007). Das hieraus hervorgegangene Reporterplasmid pHPKC3-04, mit den regulatorischen Elementen der Succinat-Dehydrogenase, lieferte jedoch in den Fluoreszenzmessungen nur unzureichende Ergebnisse. Die zunehmende Kritik an der Hypothese des gemeinsamen Wirkmechanismus sowie die Ergebnisse der Fluoreszenzmessungen mit pHPKC3-04 führten daher zur Entwicklung weiterer Reporterplasmidkonstruktionen, die über spezifische bakterielle Stressantworten (DNA-Schäden, Zellhüllstress und Störungen der Zellwandsynthese) die Anwesenheit bestimmter Antibiotika aufzeigen und eine Erweiterung um bakteriostatische Antibiotika ermöglichen.

4.1 Der Sensorstamm

4.1.1 Auswahl des Sensorstammes

Ein entscheidendes Kriterium für die Auswahl des Sensorstammes stellte ein Genotyp mit einer Nährstoffauxotrophie dar, welcher den Erhalt des Reporterplasmides ohne antibiotische Selektionsmarker in M9-Medium ermöglichte. Dadurch konnte der Ausschluss bestimmter Antibiotikaklassen für die Messung sowie etwaige Interaktionen zwischen einem antibiotischen Selektionsmarker und dem nachzuweisenden Antibiotikum vermieden werden. Eine weitere Voraussetzung war die Abwesenheit von Antibiotikaresistenzgenen bzw. von Mutationen, die zu einer erhöhten Resistenz führen können. So wurde beispielweise auf einen

Stammhintergrund mit Mutationen in dem Gen *rpsL* verzichtet, das für das ribosomale Protein S12 der 30S-Untereinheit kodiert und eine natürliche Resistenz gegenüber Streptomycin vermittelt. Unter Berücksichtigung der dargestellten Kriterien wurde als Sensorstamm *E. coli* C600 gewählt. Abgesehen von den natürlichen Resistenzen von *E. coli*, wie zum Beispiel gegenüber Makroliden, Lincosamiden oder Novobiocin, besitzt *E. coli* C600 keine zusätzlichen Antibiotikaresistenzeigenschaften. Von den drei Nährstoffauxotrophien über die *E. coli* C600 verfügt, wurde für die Stabilisierung des Untersuchungsplasmides die Auxotrophie gegenüber Leucin gewählt. Des Weiteren besitzt der Stamm Defekte in der Threoninbiosynthese (*thr-1*) sowie in der Thiaminsynthese (*thi-1*). Diese sollten durch entsprechende Mediumsupplementationen aufgehoben werden.

Zur Überprüfung der Komplementation der Leucin-Auxotrophie wurde das Plasmid pHPKC3-02 konstruiert (Kapitel 3.1.1.2.2). Anschließend wurde *E. coli* 600 hiermit transformiert und sowohl mit als auch ohne pHPKC3-02 in M9-Medium sowie mit und ohne Leucinsupplementation angezogen (Kapitel 3.1.1.2.3). Der Nachweis, dass nur der mit pHPKC3-02 transformierte Stamm ohne die Leucinsupplementation in M9-Medium wachsen konnte, zeigte, dass zum einen das Komplementationsplasmid funktionsfähig war und den Defekt aufhob, zum anderen konnte über die Auxotrophie ein Selektionsdruck in M9-Medium erzeugt werden, der den Erhalt des Plasmides gewährleistet. Die Stamm-Plasmid-Kombination war dementsprechend für das weitere Vorgehen geeignet.

4.1.2 Konstruktion der $\Delta toIC$ -Mutante von *E. coli* C600

Das äußere Membranprotein TolC stellt einen essentiellen Bestandteil zahlreicher Effluxpumpkomplexe in *E. coli* dar und ist im Rahmen der multiplen Antibiotikaresistenz (MDR) maßgeblich an der Eliminierung von Antibiotika aus der Zelle beteiligt. Vorversuche mit der *tolC*-Mutante *E. coli* DE112 im Vergleich zu ihrem Ausgangsstamm *E. coli* RFM443 zeigten, anhand von Bestimmungen der minimalen Hemmkonzentration, eine erhöhte Sensitivität für die Mutante gegenüber unterschiedlichen Antibiotikaklassen (Kapitel 3.1.1.1.1). Wie erwartet wiesen hierbei Antibiotika, deren intrazelluläre Konzentration bei intaktem TolC normalerweise stark über den Efflux reduziert wird, eine größere Zunahme ihrer Aktivität auf. Dies traf unter anderem für Novobiocin zu, dessen MHK bei der Mutante um sechs Stufen verringert war, wodurch die natürliche Resistenz von *E. coli* gegen das Antibiotikum aufgehoben wurde. Die Deletion von *tolC* führte in Abhängigkeit des jeweiligen Antibiotikums zu einer zum Teil erheblichen Steigerung der Sensitivität der Zellen und damit zu einer deutlich niedrigeren Nachweisgrenze des Messsystems.

Die Konstruktion der $\Delta toIC$ -Mutante erfolgte über die Methode des Gene doctorings, einer auf dem Prinzip der homologen Rekombination basierenden Methode, beschrieben von Lee et al. (Lee et al., 2009). Hierfür wurde das Donorplasmid pHPKC12-02b konstruiert, welches eine von zwei FRT-Sequenzen und den homologen Bereichen flankierte Kanamycinresistenzkassette trägt (Kapitel 3.1.1.3.2). Die homologen Bereiche

umfassten Sequenzabschnitte in 5'- und 3'- Richtung von *tolC* und wurden abweichend zum Protokoll von Lee et al. von 50 bp auf etwa 500 bp verlängert. Obwohl die Verlängerung der homologen Bereiche die Wahrscheinlichkeit für Ereignisse der Rekombination erhöht, war damit zusätzlich eine erhöhte Wahrscheinlichkeit für Fehlrekombinationen, wie die Einkreuzung von Teilsequenzen gegeben. Dies stellte jedoch aufgrund der multiplen Selektionsverfahren der Rekombinanten wie Saccharosetoleranztest, Selektion auf Kanamycin-, Ampicillin- und Chloramphenicol-Agarplatten sowie der Selektion über den TolC-Funktionstest mittels unterschiedlicher Novobiocinkonzentrationen eine akzeptable Konsequenz dar. Die erste Selektion der Rekombinanten nach Induktion durch Arabinose erfolgte auf LB-Agarplatten mit den Zusätzen Kanamycin [50 µg/ml] und Saccharose (5 %) (LB_{KS}). Hierbei wurden alle Rekombinanten aussortiert, bei denen die Kanamycinresistenzkassette nicht miteingekreuzt wurde sowie diejenigen, die das Donorplasmid nicht verloren haben und nicht auf Saccharose-haltigem Nährmedium überleben konnten. In Vorversuchen zum Saccharosetoleranztest zeigte sich jedoch, dass die Selektion nicht vollständig zuverlässig war. *E. coli* zeigte zwar in Anwesenheit von *sacB* ein signifikant reduziertes Wachstum mit kleineren Kolonien, aber nicht wie erwartet, ein 100%iges Absterben der Kultur (Kapitel 3.1.1.3.1). Die anschließende Selektion auf Ampicillin- und Chloramphenicol-Agarplatten diente der Überprüfung des Verlustes von Donor- und Rekombinationsplasmid. Die Plasmide sollten bei erfolgter Rekombination durch die Meganuklease zerstört worden sein und die Rekombinanten kein Wachstum auf diesen Platten zeigen. Hierbei zeigte sich, dass von den 46 untersuchten Rekombinanten elf eine Resistenz gegenüber Ampicillin und nur vier gegenüber Chloramphenicol aufwiesen. Dementsprechend wurde das Rekombinationsplasmid vermutlich effizienter zerstört als das Donorplasmid. Erstaunlicherweise wiesen alle Ampicillin-resistenten Rekombinanten ein starkes Wachstum auf LB_{KS} auf, was trotz direkter Kolo-kalisation von *sacB* und *bla* auf dem Donorplasmid gegen die Anwesenheit eines intakten *sacB*-Gens spricht. 12 Rekombinanten zeigten ein charakteristisches Wachstumsprofil, welches ein lediglich schwaches Wachstum auf LB_{KS} beinhaltete. Die Rekombinanten hatten dementsprechend beide Plasmide verloren und besaßen zusätzlich Defekte in der TolC-Funktion. Das schwache Wachstum auf LB_{KS} ließ allerdings vermuten, dass es sich hierbei nicht um die gewünschten Rekombinanten handelte. Die Rekombinante R26 erfüllte als Einzige vollständig die Kriterien für die erfolgreiche Rekombination und Deletion von *tolC*. R26 sowie die restlichen Rekombinanten, die sowohl beide Plasmide verloren hatten, ein starkes Wachstum auf LB_{KS} und eine im Vergleich zum Ausgangsstamm *E. coli* C600 erhöhte Sensitivität gegenüber Novobiocin aufzeigten, wurden mittels einer Screening-PCR auf die Anwesenheit von *tolC* und der Kanamycinkassette untersucht. Hierbei wurden zwei Forward-Primer eingesetzt, wobei der eine in *tolC* und der andere in der eingekreuzten Kanamycinkassette bindet. Der dritte Primer bildete einen Reverse-Primer, der hinter *tolC* in einem von der Rekombination unberührtem Bereich bindet. Von der Länge des amplifizierten PCR-Produktes konnte somit eindeutig abgeleitet werden, ob eine erfolgreiche Rekombination stattgefunden hat. Das Ergebnis der PCR bestätigte die Vorselektion über Antibiotikaplatten und verifizierte R26 als die gesuchte Rekombinante. Über das „Helferplasmid“ pCP20 wurde die Kanamycinkassette entfernt und anschließend die Deletion mittels PCR überprüft. Die Rekombinante

wurde in dem Bereich um das deletierte Gen *tolC* inklusive der Übergänge der homologen Bereiche sequenziert und die Rekombinante als $\Delta tolC$ -Mutante von *E. coli* C600 verifiziert. Die Sequenzierung ergab, dass *tolC* mit Ausnahme von 12 bp vollständig entfernt wurde. Des Weiteren blieben eine Narbensequenz aus einem nicht kodierenden Bereich des Donorplasmides sowie eine der FRT-Sequenzen zurück. Die $\Delta tolC$ -Mutante wurde als *E. coli* R7 bezeichnet und für das weitere Arbeiten verwendet.

4.1.3 Charakterisierung von *E. coli* R7

Im Vergleich zu *E. coli* C600 wies die $\Delta tolC$ -Mutante R7 einen zum Teil stark vom Ausgangsstamm abweichenden Phänotyp auf. Dieser umfasste zum einen morphologische Veränderungen auf LB-Medium, wie einen kleineren Koloniedurchmesser und den Verlust der bei *E. coli* C600 vorhandenen schleimigen Oberfläche als auch insbesondere Veränderungen bezüglich des Wachstumsverhaltens in M9-Medium. Hierbei zeigte die Mutante im Vergleich zum Ausgangsstamm eine generell geringere maximale Keimzahl, eine verlängerte Lag-Phase, eine kürzere exponentielle Phase von 2 h ohne anschließende stationäre Phase sowie ein charakteristisches plötzliches Absterben der Kultur.

Mikroskopische Untersuchungen zeigten nach einer Inkubation von 12 h in LB- und M9-Medium bei der Mutante eine zum Teil starke Filamentierung der Zellen. Während in LB-Medium dies nur auf einzelne Zellen beschränkt war, war der Anteil filamentierter Zellen in M9-Medium wesentlich ausgeprägter (Kapitel 3.1.1.4.2). Die veränderte Morphologie von $\Delta tolC$ -Mutanten in M9-Medium wurde in der Literatur bereits von Vega et al. und Dhamdhare et al. beschrieben und bestätigt die Ergebnisse der mikroskopischen Untersuchung für *E. coli* C600 und *E. coli* R7 (Dhamdhare & Zgurskaya, 2010; Vega & Young, 2014). Die Ursache hierfür ist bis heute nicht vollständig geklärt. Untersuchungen von Vega et al. führen jedoch einen Zusammenhang auf zwischen der Morphologie und dem Eisenstoffwechsel bzw. der Anwesenheit von im Periplasma akkumuliertem Enterobactin, einem Siderophor, welches über TolC sezerniert wird (Vega & Young, 2014). Vega et al. stellten die Hypothese auf, dass die erhöhte Konzentration an periplasmatischem unbeladenem Enterobactin anderen essentiellen Zellvorgängen Eisen entzieht und komplexiert. Die Supplementierung geringer Mengen an Eisen zum M9-Medium lieferte bei der $\Delta tolC$ -Mutante die Wildtyp-Morphologie und führte zusätzlich, bestimmt als KBE/ml, zu einem verbesserten Wachstumsverhalten. Interessanterweise zeigten Deletionsmutanten von *acrA*, *acrB* und *acrR* sowie kombinierte Deletionsmutanten der drei Gene nicht den auffälligen Phänotyp, sodass nicht der Verlust der MDR-Effluxpumpe AcrAB-TolC, sondern der Funktionsverlust von TolC als ursächlich hierfür zu betrachten ist (Dhamdhare & Zgurskaya, 2010; Vega & Young, 2014). Da zum entscheidenden Zeitpunkt für die Ermittlung der Mediumzusammensetzung die Veröffentlichung noch nicht erschienen war, wurden in dieser Arbeit keine Optimierungsversuche von *E. coli* R7 in M9-Medium unter Supplementierung mit Eisen durchgeführt. Dies wäre jedoch in Anbetracht einer Weiterentwicklung des Messsystems eine interessante und entscheidende Option zur Verbesserung der Wachstumsbedingungen und Optimierung des Messsystems.

Die ersten Versuche zum Wachstum von *E. coli* R7/pHPKC3-02 im Vergleich zum Ausgangsstamm *E. coli* C600/pHPKC3-02 in M9-Medium führten gravierende Wachstumsdefizite der $\Delta toI/C$ -Mutante auf (Kapitel 3.1.1.4.3, Abb. 3.18). Die Zusammensetzung des Mediums wurde entsprechend nach den Angaben von Sambrook und Russel gewählt und zusätzlich aufgrund der vorliegenden Auxotrophien mit L-Threonin und Thiamin in einer Konzentration von jeweils 20 $\mu\text{g/ml}$ supplementiert (Sambrook, 2001). Die Leucin-Auxotrophie wurde mithilfe des Plasmides pHPKC3-02 komplementiert. Nach 13 h erreichte die Mutante eine OD von etwa 0,1 und eine Keimzahl von $7,6 \times 10^6$ KBE/ml. Diese stagnierte in den weiteren fünf Stunden und sank anschließend nach einer Gesamtinkubationszeit von 21 h auf $2,4 \times 10^6$ KBE/ml ab. Es lag demnach kein normales Wachstum der Mutante unter den bisherigen Mediumvoraussetzungen vor. Im Gegensatz hierzu erreichte *E. coli* C600 in M9-Medium nach etwa 5,5 h die exponentielle Phase und eine maximale Keimzahl von $4,4 \times 10^9$ KBE/ml nach 7,75 h. Das Wachstumsverhalten des Ausgangstammes zeigte, dass die Grundzusammensetzung des M9-Mediums und die Komplementation durch pHPKC3-02 ausreichende Voraussetzungen für ein normales Wachstum boten. Es war daher zu vermuten, dass die Mutante spezielle Anforderungen an das M9-Medium stellte bzw. wie von Dhamdhere et al. beschrieben, dem Wachstumsdefizit eine metabolische Ursache zugrunde lag (Dhamdhere & Zgurskaya, 2010). Dhamdhere et al. wiesen bei $\Delta toI/C$ -Mutanten in M9-Medium ebenfalls ein gestörtes Wachstum nach, welches sich anhand einer verlängerten Lag-Phase, eines verlangsamten Wachstums in der exponentiellen Phase sowie Zellteilungsdefekten widerspiegelte. Die Ursache hierfür sahen Dhamdhere et al. in einer Erschöpfung des oxidierten Metaboliten NAD^+ und dem daraus resultierenden hohen Verhältnis an NADH/NAD^+ . Dieses führt zur Reduzierung der Protonenmotorischen Kraft sowie zur Inhibierung von TCA-Enzymen und resultiert letztendlich in einem metabolischem „Abschalten“ der Zelle (Dhamdhere & Zgurskaya, 2010).

Da im weiteren Vorgehen mit der Mutante in M9-Medium der Einfluss antibakterieller Substanzen untersucht werden sollte, stellte das mangelnde Wachstum der uninduzierten Kontrolle einen nicht akzeptablen Ausgangszustand dar und bedurfte einer Optimierung der Wachstumsbedingungen.

4.1.3.1 Optimierung der M9-Mediumzusammensetzung

Für die Optimierung der Mediumzusammensetzung wurde zunächst durch die Zugabe weiterer Aminosäuren das Wachstumsverhalten von *E. coli* R7/pHPKC3-02 untersucht. Hierzu wurde die Zugabe von L-Serin getestet, welches nach Angaben von Dhamdhere et al. zu einer Wiederherstellung des Wildtyp-Phänotyps der $\Delta toI/C$ -Mutante in M9-Medium führen soll. Dieses konnte jedoch im Wachstumsversuch mit *E. coli* R7/pHPKC3-02 nicht bestätigt werden. Im Gegensatz zur Veröffentlichung von Dhamdhere et al. führte die Zugabe von Serin zu einer weiteren Abnahme der maximalen Gesamtkeimzahl. Analog der Ergebnisse mit *E. coli* R7/pHPKC3-02 konnten auch Vega et al. keine Wachstumsverbesserung durch die Zugabe von L-Serin nachweisen und beschrieben sogar stärker ausgeprägte morphologische Veränderungen unter Zugabe von L-Serin (Vega & Young, 2014).

In einem folgenden Versuch wurde die Zugabe weiterer proteinogener Aminosäuren in den Konzentrationen von 20 µg/ml und 50 µg/ml im Röhrchenmaßstab untersucht und das Wachstum anhand des Trübungsgrades visuell ausgewertet (Kapitel 3.1.1.5.1). Das Ergebnis zeigte bei allen Röhrchen mit der Supplementkonzentration von 50 µg/ml ein im Vergleich zur niedrigeren Konzentration deutlich verstärktes Wachstum. Ausnahmen hiervon bildeten die Röhrchen, die mit L-Valin bzw. mit allen untersuchten Aminosäuren parallel supplementiert wurden. Bei diesen Röhrchen wurde kein Wachstum nachgewiesen. Die Wachstums- hemmung unter Zugabe von L-Valin bei *E. coli* K12-Stämmen ist bereits seit Mitte der 50er Jahre bekannt und auf eine Feedback-Inhibierung der Acetolactatsynthase (ALS), einem Enzym der Biosynthese verzweigter Aminosäuren, zurückzuführen (De Felice et al., 1977; Leavitt & Umbarger, 1962). Die Tatsache, dass das Wachstum bei sonst allen Röhrchen mit höherer Supplementkonzentration verbessert war, ließ vermuten, dass die Ursache anstelle der Supplementierung mit weiteren Aminosäuren primär in der erhöhten Konzentration an Threonin und Thiamin lag. Da für die Röhrchen mit 50 µg/ml visuell kein Unterschied im Trübungsgrad nachzuweisen war, wurde zur Überprüfung des Effektes der untersuchten Aminosäuren die KBE/ml der Röhrchen bestimmt, die in der niedrigen Supplementkonzentration einen im Vergleich zur Positivkontrolle höheren Trübungsgrad aufzeigten. Die KBE/ml zeigte hierbei, dass der durch die zusätzlich ergänzten Aminosäuren hervorgerufene Effekt bei der Supplementkonzentration von 20 µg/ml, bezogen auf die höhere Konzentration von 50 µg/ml, vernachlässigbar ist und der Wachstumsvorteil, wie bereits vermutet, auf die Erhöhung der Threonin- und Thiaminkonzentration zurückzuführen ist.

In Folge dessen wurden in anschließenden Versuchen die L-Threonin- und Thiaminkonzentrationen bis auf 200 µg/ml weiter erhöht und im Vergleich zum Ausgangsstamm *E. coli* C600/pHPKC3-02 betrachtet (Kapitel 3.1.1.5.2, Abb. 3.20). Hierbei konnte eine direkte Korrelation zwischen der Erhöhung der Supplementkonzentrationen und der Erhöhung der KBE/ml bei *E. coli* R7/pHPKC3-02 nachgewiesen werden. Im Gegensatz hierzu zeigte der Ausgangsstamm unabhängig von der Supplementkonzentration konstante Keimzahlen. Da der Versuch keinen zeitlichen Wachstumsverlauf aufzeigt und nur eine Endpunktbestimmung darstellt, kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass die erhöhte Zugabe an Threonin- und Thiamin auch bei dem Ausgangsstamm einen positiven Effekt auf das Wachstum, wie eine Erhöhung der Wachstumsrate, hervorruft. Des Weiteren kann nicht ausgeschlossen werden, dass das Ergebnis der KBE/ml bei *E. coli* R7/pHPKC3-02 nach einer Verlängerung der Inkubationszeit ein dem Ausgangsstamm ähnliches Ergebnis liefert. Der Versuch ist daher lediglich als eine Art Stichprobe zu werten und bestätigt nur, dass unter Erhöhung der Supplementkonzentrationen die Wachstumsrate bei *E. coli* R7/pHPKC3-02 erhöht ist.

Die Untersuchung des Wachstumsverhaltens über die Zeit von *E. coli* C600/pHPKC3-02 und *E. coli* R7/pHPKC3-02 unter Erhöhung der Supplementkonzentrationen zeigte, dass die Mutante im Vergleich zum Ausgangsstamm eine verlängerte Latenzphase sowie eine verkürzte exponentielle Phase mit verringerter maximaler Keimzahl besaß (Abb. 3.21). Bei Betrachtung der Wachstumskurven ist jedoch zu beachten, dass bei gleicher OD unterschiedliche Keimzahlen der Stämme vorlagen. So lag bei einer OD von 0,02 bei *E. coli* C600/pHPKC3-02 eine viermal höhere Keimzahl als bei der Mutante vor. Dies ist zu berücksichtigen, da die

Anfangskeimzahl einen Einfluss auf die Dauer der Latenzphase ausübt (Barton, 2005; Madar et al., 2013). Trotzdem konnte im Wachstumsversuch über die Zeit eine deutliche Verbesserung des Wachstumsverhaltens von *E. coli* R7/pHPKC3-02 im Vergleich zur ersten Anzucht (Abb. 3.18) erzielt werden.

Im weiteren Verlauf der Optimierung wurde die Bedeutung der einzelnen Supplementkonzentrationen untersucht. Hierzu wurde *E. coli* R7/pHPKC3-02 im Röhrchenmaßstab angezogen, wobei eine der Supplementkonzentrationen konstant bei 200 µg/ml gehalten wurde, während die andere in unterschiedlichen Konzentrationen zwischen 1 – 200 µg/ml variiert wurde. Zusätzlich wurde ein Röhrchen mit jeweils 300 µg/ml L-Threonin und Thiamin angesetzt. Das Ergebnis des Versuches zeigte deutlich, dass die L-Threoninkonzentration die entscheidende Komponente für ein verbessertes Wachstum darstellte (Abb. 3.22). Da der Versuch analog zum vorherigen Wachstumsversuch im Röhrchenmaßstab als eine Stichprobe zu einem einzelnen Zeitpunkt zu werten ist, kann keine Aussage über die maximale Keimzahl als Endpunkt getroffen werden. Der Versuch zeigte jedoch, dass die Wachstumsrate bei niedrigen L-Threoninkonzentrationen signifikant reduziert war und zum Messzeitpunkt eine geringere Keimzahl als bei Röhrchen mit höheren Threoninkonzentrationen vorlag. Untersuchungen als Wachstumskurve zeigten, dass bezogen auf die maximale Keimzahl, kein Vorteil bei der Erhöhung der L-Threoninkonzentration von 200 µg/ml auf 300 µg/ml bestand (Abb. 3.23). Allerdings wurde die maximale Keimzahl bei der höheren Konzentration in kürzerer Zeit erreicht. Des Weiteren zeigte sich, dass die niedrige Konzentration von Thiamin von 5 µg/ml sowohl in Kombination mit 200 µg/ml als auch 300 µg/ml eine Verlängerung der Latenzphase von etwa 1 h bewirkte. Als Voraussetzung für die Anzuchtbedingungen anschließender Versuche wurde daher das M9-Medium mit jeweils 300 µg/ml an Threonin und Thiamin supplementiert.

Nachteilig für die Durchführung der Wachstumsversuche, auch in Hinblick auf spätere Messungen unter Antibiotikazugabe, war die lange Latenzphase von *E. coli* R7/pHPKC3-02. Diese führte inklusive der Anzucht der Übernachtskultur zu Versuchszeiten von bis zu 24 h und einer unflexiblen Versuchsplanung. Um die Durchführung zu vereinfachen, wurde daher die Latenzphase, durch Anzucht der Übernachtskultur in LB-Medium und der damit einhergehenden Erhöhung der Keimzahl, versucht zu verkürzen. Wie bereits in der Literatur beschrieben, bezieht sich das Wachstumsdefizit von $\Delta toI C$ -Mutanten nicht auf das Wachstum in LB-Medium, sodass die Anzucht der Übernachtskultur von *E. coli* R7/pHPKC3-02 in LB-Medium zu einer signifikanten Erhöhung der Keimzahl führte. Um den Erhalt des Komplementationsplasmides bzw. des späteren Reporterplasmides zu gewährleisten, wurde für die Anzucht in LB-Medium Tetracyclin in einer Konzentration von 10 µg/ml zugegeben. Dieses wurde nach Erreichen der angestrebten Zelldichte durch Zentrifugation der Zellen, Waschen und Resuspendierung in M9-Medium entfernt. Durch die erhöhte Keimzahl der Übernachtskultur konnte die OD für die Tageskultur auf ca. 0,06 eingestellt und die Latenzphase auf etwa 4 h reduziert werden. Die Umstellung der Anzuchtbedingungen für die Übernachtskultur führte demnach zu einer signifikanten und akzeptablen Verkürzung der Versuchsdauer.

Im Vergleich zum ersten Wachstumsversuch von *E. coli* R7/pHPKC3-02 in M9-Medium (Abb. 3.18) bewirkte die Optimierung der Wachstumsbedingungen eine deutliche Verbesserung hinsichtlich der maximalen Keimzahl und des Wachstumsverlaufs. Die maximale Keimzahl konnte von 1×10^7 auf über 3×10^8 , entsprechend einem Faktor von 30 bzw. 3000 %, gesteigert werden. Bezüglich des Wachstumsverlaufs wurde eine Verkürzung der Latenzphase auf etwa 4 h durch die Anzucht der Übernachtskultur erzielt sowie eine exponentielle Phase von etwa 2 h erreicht. Ein dem Ausgangsstamm vergleichendes Wachstum konnte jedoch nicht beobachtet werden. Dennoch ermöglichte das Zeitfenster der exponentiellen Phase die Messung antibiotischer Effekte im Sensorstamm und bildete somit eine Grundvoraussetzung für die Funktionalität des biosensorischen Messsystems. Charakteristisch für das Wachstumsverhalten von *E. coli* R7/pHPKC3-02 in M9-Medium war außerdem, dass der Stamm nach Erreichen der maximalen Keimzahl keine anhaltende stationäre Phase, sondern ein abruptes Absterben mit einer fast exponentiellen Keimzahlreduktion aufwies. Dies konnte trotz Optimierung nicht verhindert werden.

4.2 Prinzip und Aufbau des biosensorischen Messsystems zum Nachweis bakterizider Antibiotika

Die Basis des biosensorischen Messsystems bildeten der hypersensitive Sensorstamm *E. coli* R7, welcher mit Reportergensystem tragenden Plasmiden transformiert wurde und dessen Fluoreszenzintensität in Anwesenheit bakterizid wirkender Antibiotika im Vergleich zu einer uninduzierten Kontrolle vermessen wurde. Der Sensorstamm mit seinen genetischen Charakteristika und seinem Wachstumsverhalten in unterschiedlichen Medien ist bereits ausführlich diskutiert worden (Kapitel 4.1.1 - 4.1.3). Für die Etablierung des biosensorischen Nachweissystems wurden drei Plasmide konstruiert: das Reporterplasmid pHPKC3-04 (Kapitel 3.1.2.2), das den Nachweis antibakterieller Substanzen in der Umgebung des Sensorstammes aufzeigen sollte sowie zwei Kontrollplasmide, die das Hintergrundsignal und die Eigenfluoreszenz zugefügter Antibiotika darstellen (pHPKC3-05) bzw. zur Kalibrierung des Messsignals, der Untersuchung der Funktionalität des Fluoreszenzproteins und des Fluoreszenzsignals in Anwesenheit von Proteinbiosynthesehemmern (pHPKC3-03) dienen sollten (Kapitel 3.1.2.1). Als Ausgangsplasmid für die Konstruktion der Plasmide wurde pHPKC3-02 verwendet, welches über die Komplementation der Leucin-Auxotrophie den Erhalt des jeweiligen Plasmides in M9-Medium gewährleistet. Für die Konstruktion von pHPKC3-04 wurde ein durch Literaturrecherche und mittels qRT-PCR ermittelter Promotor, welcher bei Anwesenheit antibakterieller Substanzen eine signifikante Induktion aufweisen sollte, mit einem Reporterprotein fusioniert und in pHPKC3-02 inseriert. Im Gegensatz hierzu wurde bei den Kontrollplasmiden auf einen Promotor vor dem Reporterprotein verzichtet (pHPKC3-05) bzw. ein starker Promotor für eine hohe Proteinexpression (pHPKC3-03) verwendet.

Die Wahl eines GFP-basierten Reportersystems beruhte zum einen auf dem generell hohen Erfahrungsstand mit diesem System, zum anderen auf der unkomplizierten Handhabung des Proteins als Reporter. Im Gegensatz zur ebenfalls gängigen Methode des Luciferase-Assays benötigen Fluoreszenz-basierte Reportersysteme keine Zugabe weiterer Substanzen für die Lichtemission. Ein weiterer Vorteil ist, dass die Zellen sofort vermessen werden können und keine Inkubationszeiten notwendig sind. Nachteilig allerdings sind die geringere Sensitivität des Systems sowie die Störanfälligkeit durch die Eigenfluoreszenz der Zellen bzw. durch zugefügte Substanzen, wie zum Beispiel Antibiotika. Über eine Variante des Wildtyp-GFPs, das sogenannte GFPmut2, welches aufgrund dreier Aminosäuresubstitutionen im Fluorophor eine etwa 20-fach höhere relative Fluoreszenzintensität als der Wildtyp aufweist, wurde daher versucht die Sensitivität des Messsystems zu steigern (Cormack et al., 1996). Die Problematik der Eigenfluoreszenz wurde durch Messungen mit dem promotorlosen Kontrollplasmid pHPKC3-05 behoben.

4.2.1 Konstruktion des Reporterplasmides pHPKC3-04

Die Voraussetzung für die Konstruktion von pHPKC3-04 bildete die Wahl eines geeigneten Promotors, welcher sowohl selektiv als auch sensitiv durch bakterizid wirkende Antibiotika induziert werden sollte. Die von Kohanski et al. bereits erwähnte Hypothese eines gemeinsamen Wirkmechanismus bakterizider Antibiotika stellte einen optimalen Ansatzpunkt für die Suche nach einem geeigneten Promotor dar (Kapitel 1.2.5) (Kohanski et al., 2007). Hierbei von besonderem Interesse war das Enzym NADH-Dehydrogenase I aus der Atmungskette, dessen Untereinheiten NuoC/DEF nach Inkubation mit bakteriziden Antibiotika im Vergleich zur Inkubation mit einem bakteriostatischen Antibiotikum in einer Microarray-Analyse eine erhöhte Expression aufwies. Infolgedessen wurde in einem qRT-Versuch die Expression von *nucF* in dem von Kohanski et al. verwendeten Stamm *E. coli* MG1655 nach Behandlung mit Kanamycin und Ampicillin in einer Näherung untersucht (Kapitel 3.1.2.2.1.1). Da sich das Messsystem später auf eine uninduzierte Kontrolle beziehen sollte, wurde abweichend zur Publikation, die Expressionsänderung nicht gegen eine mit bakteriostatischen Antibiotika behandelte Probe sondern gegen eine uninduzierte Kontrolle vermessen. Das Ergebnis der qRT-Messung zeigte, dass keine Expressionserhöhung von *nucF* nach Zugabe der bakteriziden Antibiotika Kanamycin und Ampicillin im Vergleich zu einer uninduzierten Kontrolle vorlag (Abb. 3.31). In Ergänzungen der Veröffentlichung zum Microarray konnten Kohanski et al. allerdings für mit Kanamycin und Ampicillin behandelte Proben, bezogen auf uninduzierte Kontrollen, ebenfalls keine erhöhte Aktivität von Stoffwechselwegen mit Beteiligung der NADH-Dehydrogenase I aufzeigen. Detaillierte Daten zur Genexpression von *nucF* gegen uninduzierte Kontrollen sind jedoch nicht veröffentlicht.

Obwohl der Promotor von *nucF* nicht als geeignet anzusehen war, wurde die Hypothese des gemeinsamen Wirkmechanismus bakterizider Antibiotika zunächst weiter als Grundlage für die Reporterkonstruktion beibehalten und mittels umfangreicher Literaturrecherche ein Kollektiv an möglichen Genen für die Auswahl eines geeigneten Promotors getroffen (Kapitel 3.1.2.2.1.2). Die Gene stammten hierbei vorwiegend aus

zentralen Stoffwechselwegen, wie der Atmungskette, dem TCA oder dem Glyoxylatzyklus sowie aus Stressantwort- und Reparatursystemen, beispielsweise der SOS-Antwort oder Systemen zur Detoxifizierung von ROS. Eine Beschreibung der Genauswahl, inklusive Begründung durch entsprechende Literaturverweise, ist im Ergebnisteil ausführlich aufgeführt. Zu berücksichtigen ist, dass sich die Angaben veränderter Genexpression unter Einfluss antibakterieller Substanzen in den Literaturangaben weder auf *tolC*-Mutanten noch auf Anzuchten in M9-Medium beziehen. Aufgrund der in *E. coli* vielseitigen Funktionen von TolC und dem erhöhten Stresslevel von *tolC*-Mutanten, zum Beispiel charakterisiert an der erhöhten Expression von *pspA*, *soxS* und *marRAB*, waren die in der Literatur erhaltenen Ergebnisse zur Genexpression nicht direkt auf *E. coli* R7/pHPKC3-02 in M9-Medium übertragbar (Rosner & Martin, 2009). Die Genauswahl stellte somit zunächst lediglich einen ersten Ansatzpunkt bzw. eine Tendenz für die Suche nach einer Expressionsänderung eines Gens und der daraus resultierenden Verwendung des Promotors für die Reporterkonstruktion dar. Die ausgewählten Gene wurden mittels qRT-PCR unter Einfluss von Ampicillin und Kanamycin nach einer Inkubationszeit von 1 h in einer Näherung untersucht (Kapitel 3.1.2.2.1.3). Der Zeitpunkt der Probenentnahme für die Zellernte zur RNA-Isolierung wurde hierbei so gewählt, dass sich der Stamm in der exponentiellen Phase befand. Somit lag der Stamm in einer Phase der maximalen Proteinexpression vor und eine störende veränderte Expression von Stressantworten durch Nährstoffmangel und Vorbereitungen für den Eintritt in die stationäre Phase wurden minimiert. Die Aktivierung weiterer durch die *tolC*-Deletion und der Anzucht in M9-Medium hervorgerufener Stressantworten konnte dennoch nicht ausgeschlossen werden und zur Verdeckung Antibiotika induzierter Effekte führen. Hierzu zählt unter anderem auch der bei $\Delta tolC$ -Mutanten hervorgerufene Mangel an Eisen, der in Zusammenhang mit dem Wachstumsdefizit in M9-Medium diskutiert wird (Vega & Young, 2014). Durch den Verlust des Proteins TolC und damit der Fähigkeit zur Sekretierung von Enterobactin ins Medium, fehlt der Mutante eine essentielle Eisenquelle, welche zu Wachstumsdefiziten und einer veränderten Morphologie führt (Vega & Young, 2014). Die Wiederherstellung des Phänotyps durch Supplementation mit Fe^{2+} stellt daher einen Optimierungsansatz des Messsystems dar.

Von den untersuchten Genen der Expressionsmessung von *E. coli* R7/pHPKC3-02 wiesen lediglich *sdhB* (FeS-Cluster-Untereinheit der Succinat-Dehydrogenase), *cyoD* (Untereinheit der Oxidoreduktase Cytochrom *bo*₃), *dinB* (DNA-Polymerase IV) und *gdhA* (Glutamat-Dehydrogenase) eine relevante Expressionserhöhung auf. Hiervon wiederum zeigten nur die Gene *sdhB* und *dinB* sowohl nach Behandlung mit Ampicillin als auch mit Kanamycin eine erhöhte Expression. Der Wert für *sdhB* lag im Vergleich zur uninduzierten Kontrolle bei einem Faktor von etwa fünf, während *dinB* einen Faktor von etwa zwei aufwies (Abb. 3.32). Ausgehend von derselben Anzucht wurde die qRT-Messung für *sdhB* für die Präparationen nach Zugabe von Polymyxin, Norfloxacin und Chloramphenicol sowie als Wiederholung von Ampicillin und Kanamycin in einer Einfachbestimmung als Triplikat durchgeführt. Hierbei konnte die vorherige Expressionserhöhung für die Präparation nach Behandlung von Ampicillin und Kanamycin bestätigt sowie für die Präparationen nach Behandlung mit den ebenfalls bakteriziden Antibiotika Polymyxin und Norfloxacin nachgewiesen werden. Für das Antibiotikum Chloramphenicol, das als „bakteriostatische Negativkontrolle“ nach der Hypothese von Kohanski

zu betrachten ist, lag keine relevante Expressionserhöhung vor (Abb. 3.33). Zur Verifizierung der qRT-Ergebnisse wurden im Folgenden zwei weitere voneinander unabhängige Anzuchten durchgeführt. Jede Anzucht bestand aus einer uninduzierten Kontrolle und jeweils einer Präparation 1 h nach Inkubation mit Ampicillin und Norfloxacin. Bei den untersuchten Genen handelte es sich um *sdhB* und *dinB*. Bei den Wiederholungsmessungen stellte sich heraus, dass die zuvor erhaltenen Werte für die Expressionserhöhung von *sdhB* von fünffach bzw. für *dinB* von zweifach nicht reproduzierbar waren. Die Schwankungen, insbesondere für *sdhB* zwischen der Erstmessung und den Wiederholungsmessungen mit anderen Anzuchten lagen trotz Einhaltung gleicher Versuchsbedingungen und Antibiotikakonzentrationen in einem Bereich von bis zu 10-facher absoluter Abweichung bzw. ausgedrückt als Standardabweichung vom Mittelwert der Anzuchten bei bis zu $\pm 250\%$ (Abb. 3.34). Die Ursachen für diese enorme Abweichung sind rein spekulativ. Auffallend war, dass die Werte der zwei Wiederholungsmessungen deutlich näher beieinander lagen als die Werte von Erst- und Wiederholungsmessungen. Da die Wiederholung der Erstmessung ausgehend von derselben Anzucht mit weiteren Antibiotika jedoch trotz Durchführung an unterschiedlichen Versuchstagen für *sdhB* nach Zugabe von Ampicillin und Kanamycin vergleichbare Ergebnisse lieferte, ist ein Fehler in der Durchführung der Messungen unwahrscheinlich. Vielmehr ist anzunehmen, dass entweder die isolierte RNA aus der ersten Anzucht der mit Antibiotika behandelten Proben im Vergleich zur uninduzierten Kontrolle eine tatsächliche höhere Konzentration an entsprechender mRNA für *sdhB* enthielt oder die Konzentrationsbestimmung der isolierten RNA fehlerhaft war. Dies würde am ehesten auf die isolierte RNA der uninduzierten Kontrolle zutreffen, da alle mit bakteriziden Antibiotika behandelten Präparationen der RNA vergleichbare Werte für die Expressionserhöhung lieferten (Abb. 3.33). Des Weiteren kann nicht ausgeschlossen werden, dass trotz gleichem Versuchsprotokoll geringste und unvermeidbare Abweichungen in der Handhabung, zum Beispiel durch verlängerte Durchführungsschritte aufgrund eines veränderten Probenumfanges, in einem so sensiblen Stamm wie *E. coli* R7/pHPKC3-02 größere Auswirkungen haben. Beispielsweise könnte es sich bei der Expressionserhöhung der ersten Anzucht um ein kurzes Zeitfenster handeln, welches bei den Folgemessungen verfehlt wurde. Unabhängig jedoch von der Ursache der Abweichung in den Expressionsdaten sind die erhaltenen Werte nicht aussagekräftig. Es wurde daher durch die Konstruktion eines Reportersystems, basierend auf einem Fusionsprodukt aus dem Promotor von *sdhB* und dem Strukturgen *gfpmut2*, die Expressionsmessung auf Proteinebene untersucht. Zur Erhaltung einer physiologischen Regulation des *sdh*-Operons wurden bei der Konstruktion des Fusionsproduktes neben dem Promotor alle regulatorischen Elemente wie Bindestellen für Transkriptionsfaktoren und sRNAs beibehalten. Da es sich bei der mRNA von *sdhB* um eine polycistronische mRNA handelt, beinhaltete dies zwangsläufig auch die fast vollständige Sequenz von *sdhC*, die zahlreiche regulatorische Bindungsstellen sowie einen spekulativen zweiten Promotor aufweist (Park et al., 1995). Untersuchungen mit *sdh-lacZ*-Fusionen zeigten, dass für die maximale Expression von LacZ sowohl der regulatorische Bereich vor *sdhC* als auch zumindest eine Teilsequenz von *sdhC* vorhanden sein muss (Park et al., 1995). Die Regulation des *sdh*-Ope-

rns über sRNAs sowie die am Ende von *sdhC* lokalisierte Bindungsstelle von RybB war den damaligen Autoren noch nicht bekannt, sodass diese bei den *sdh-lacZ*-Fusionen bei Park et al. zwar keine Bedeutung fand allerdings in der Reporterkonstruktion *sdh-gfpmut2* zusätzlich berücksichtigt wurde (Desnoyers & Massé, 2012). Wie bereits erwähnt, wurde nicht die vollständige Sequenz von *sdhC* für die Fusion verwendet, sondern nur eine Teilsequenz, welche die letzten sieben Basen aussparte. Dies hatte den Hintergrund, dass *sdhC* und das darauf folgende Gen *sdhD* einen überlappenden Bereich besitzen, welcher das Stopcodon von *sdhC* und das Startcodon von *sdhD* beinhaltet. Durch die basengenaue Substitution am ATG von *gfpmut2* gegen *sdhD* fällt das ursprüngliche Stopcodon von *sdhC* weg, wird jedoch durch die Sequenzabfolge des *gfpmut2* durch ein anderes Stopcodon um ein Basentriplett zuvor ersetzt. Hierdurch lagen innerhalb der polycistronischen mRNA sowohl für *sdhC* als auch *gfpmut2* jeweils ein offener Leserahmen vor, was eine normale Translation von GFPmut2 ermöglicht.

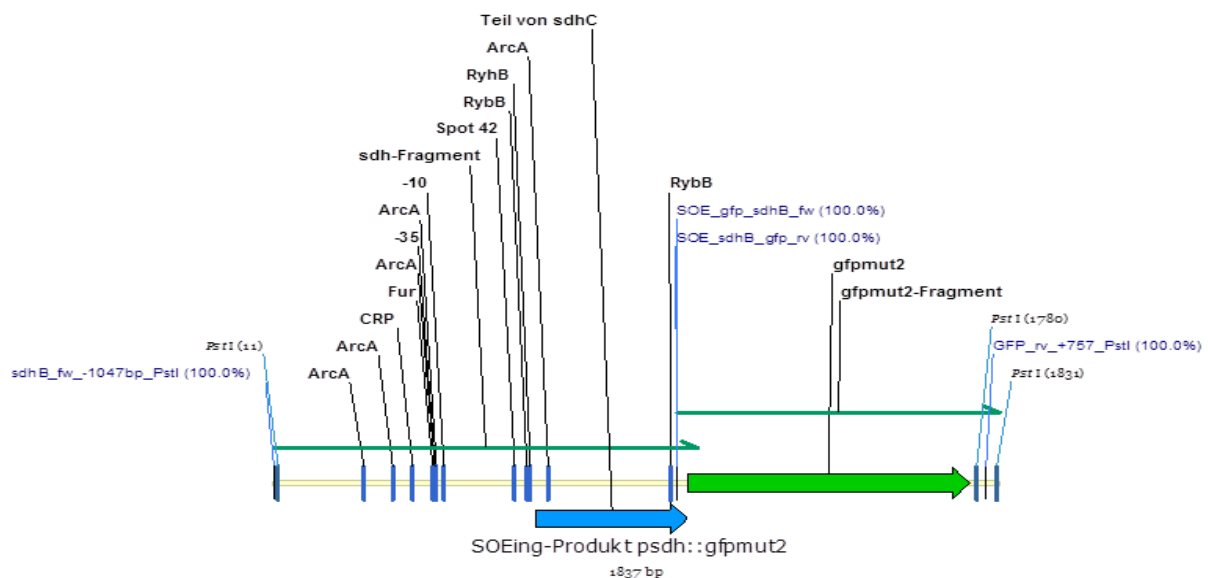


Abbildung 4.1: SOEing-Produkt aus den regulatorischen Einheiten des *sdh*-Operons und dem Strukturgen *gfpmut2* (entspricht Abb. 3.36)

Das Fusionsprodukt wurde über Restriktionsschnittstellen in das Komplementationsplasmid pHPKC3-02 inseriert und das neu konstruierte Plasmid pHPKC3-04 mittels Restriktionsverdau und Sequenzierung des *sdh*-Fragmentes (Abb. 4.1) und des Fusionsübergangs kontrolliert. Die mit pHPKC3-04 transformierten Zellen wiesen eine mit bloßem Auge erkennbare grünliche Fluoreszenz auf, was sowohl auf eine Funktionalität der GFPmut2-Proteinbildung als auch auf eine basale Expression im uninduzierten Zustand hinwies. Die Expression der Succinat-Dehydrogenase ist stark abhängig vom Sauerstoffangebot unter den jeweiligen Wachstumsbedingungen. Während unter aeroben Bedingungen die Succinat-Dehydrogenase verstärkt exprimiert wird, erfolgt unter anaeroben Bedingungen die Repression der Expression des Enzyms. Obwohl daher eine

basale Expression des *sdh*-Operons im uninduzierten Zustand zu erwarten war, war das Ausmaß der Fluoreszenzintensität unerwartet stark. Beim direkten Vergleich der Anzuchten von *E. coli* R7/pHPKC3-04 und *E. coli* R7/pHPKC3-02 wurde eine etwa 60-fache Erhöhung der Fluoreszenzintensität bei Anwesenheit des Reporterplasmides nachgewiesen (Kapitel 3.1.3.1). Nachteilige Auswirkungen auf die Sensitivität des Messsystems waren daher nicht auszuschließen.

4.2.2 Fluoreszenzmessungen mit dem biosensorischen Messsystem

4.2.2.1 Versuchsgestaltung und –auswertung

Die Versuchsgestaltung der Fluoreszenzmessungen erfolgte, mit Ausnahme der Vorversuche, grundsätzlich als Doppelbestimmung mit zwei voneinander unabhängigen Anzuchten. Innerhalb jeder Anzucht wurde eine Dreifachmessung derselben Probe im Fluorimeter durchgeführt. Die detaillierten Parameter der Fluoreszenzmessungen sind dem Material- und Methodenteil zu entnehmen (Kapitel 2.2.15).

Für die Etablierung der Fluoreszenzmessungen wurde zunächst die Linearität zwischen der OD und der Fluoreszenzintensität untersucht. Dies stellte eine wichtige Voraussetzung der späteren Bezugsgröße für die Auswertung der Fluoreszenzsignale dar. Des Weiteren diente der Versuch zur Ermittlung des Geräteparameters Lampenenergie. Hierzu wurde eine ÜNK von *E. coli* R7/pHPKC3-03 angesetzt, wodurch eine hohe Expression und somit eine hohe Konzentration an GFPmut2 mit hoher Fluoreszenzintensität erzielt wurde. Von der ÜNK wurde mit M9-Medium eine serielle Verdünnungsreihe (1:1) angesetzt und die Fluoreszenzintensität bei verschiedenen Lampenenergien gegen die OD aufgetragen (Kapitel 3.1.3.1, Abb. 3.41). Über den gesamten Messbereich konnte eine direkte Korrelation zwischen OD und der Fluoreszenzintensität bei allen eingestellten Lampenenergien mit Korrelationskoeffizienten von 0,9997 – 1 nachgewiesen werden. Zu berücksichtigen ist, dass es sich bei diesem Vorversuch nicht um physiologische Wachstumsbedingungen handelte, sondern nur um die Verdünnungen einer angezogenen Kultur. Entsprechend fließen wachstumsbedingte Faktoren, die Einfluss auf die OD haben, wie zum Beispiel die Zellgröße oder die Filamentierung nicht mit in das Ergebnis ein. Wie im Folgenden beschrieben, wurde versucht, diese allerdings im Rahmen der Möglichkeiten bei der Auswertung durch die Wahl entsprechender Bezugsgrößen zu berücksichtigen.

Nach Überprüfung der korrekten Konstruktion und Funktionsweise der Plasmide pHPKC3-03, pHPKC3-04 und pHPKC3-05 bzw. ihrer Produkte, wurde *E. coli* R7 mit den Plasmiden transformiert und die Fluoreszenz unter Antibiotikazugabe untersucht. Um ein möglichst breites Spektrum an Antibiotika-assoziierten Stressreaktionen in der Zelle zu erzeugen, wurden Antibiotika aus unterschiedlichen Klassen sowie Antibiotika vom bakteriziden als auch bakteriostatischen Wirkungstyp gewählt. Eine Übersicht zum Wirkungstyp und der Klassifizierung der jeweiligen Antibiotika ist in Tabelle 4.1 dargestellt. Ausführlichere Beschreibungen zum Wirkmechanismus, der primären Zielstruktur und zur molekularen Struktur sind Kapitel 1.3.2 zu entnehmen.

Tabelle 4.1: Übersicht zur Klassifizierung und Wirkungstyp verwendeter Antibiotika

Antibiotikum	Antibiotikaklasse	Wirkungstyp
<i>Ampicillin, Cefoxitin</i>	β-Laktamantibiotika	bakterizid
<i>Norfloxacin</i>	Fluorchinolone	bakterizid
<i>Kanamycin</i>	Aminoglykoside	bakterizid
<i>Rifampicin</i>	Ansamycine	bakterizid
<i>Novobiocin</i>	Aminocumarine	in geringen Konzentrationen bakteriostatisch, in höheren Konzentrationen bakterizid
<i>Polymyxin B</i>	Polypeptid-Antibiotika	bakterizid
<i>Erythromycin</i>	Makrolide	bakteriostatisch
<i>Linezolid</i>	Oxazolidinone	bakteriostatisch
<i>Chloramphenicol</i>	-	bakteriostatisch

Für die Entnahme der Proben zur Messung der Fluoreszenz und OD wurden die Messzeitpunkte 1 h und 2 h nach Antibiotikaexposition gewählt. Hierdurch wurde gewährleistet, dass der Sensorstamm sich in der exponentiellen Phase befand und eine Wirkung durch die Antibiotika vermittelt wurde. Letzteres wurde anhand von KBE-Bestimmungen im Vergleich zur uninduzierten Kontrolle überprüft.

Für die Auswertung wurde von den Rohdaten der Dreifachmessung der Fluoreszenz der Mittelwert für jede Präparation gebildet und dieser durch Bildung eines Quotienten auf die jeweilige OD normiert (Kapitel 2.2.15.2). Die daraus hervorgegangenen Werte tragen die Einheit RFU (*Relative Fluorescence Units*). Zur Reduzierung der Schwankungen zwischen Erst- und Wiederholungsmessung von Anzuchten unterschiedlicher Versuchstage wurde zunächst jede Einzelbestimmung für sich betrachtet. Hierzu wurden die RFU-Werte, der mit Antibiotika versetzten Kolben, als prozentuale Abweichung in Bezug zu den RFU-Werten der uninduzierten Kontrolle angegeben. Die uninduzierte Kontrolle wurde auf einen Wert von 100 % gesetzt. Die prozentualen Abweichungen von Erst- und Wiederholungsmessung konnten nun miteinander verglichen werden und Mittelwert und Standardabweichung ausgehend als Doppelbestimmung berechnet werden. Der Grund für die Umrechnung in prozentuale Abweichungen und nicht die Verwendung der direkten RFU-Werte lag darin, dass aufgrund der Abweichungen der absoluten entsprechenden Einzelwerte von Erst- und Wiederholungsmessung, bei jedoch vergleichbaren prozentualen Abweichung zur uninduzierten Kontrolle, die eigentlichen Antibiotika induzierten Abweichungen verschleiert werden würden.

Der umfangreiche zeitliche Versuchsaufwand von Anzucht und Messungen von Fluoreszenz und OD begrenzte die Anzahl der Wiederholungen auf eine Doppelbestimmung, durchgeführt jeweils in Triplikaten. Aufgrund des zu geringen Probenumfanges für generelle Statistikberechnungen zur Signifikanz und für Ausreißerkontrollen, wurde die Bestimmungsgrenze als Kriterium für signifikante Abweichungen zur uninduzierten Kontrolle verwendet (Kapitel 2.2.15.2, Formel 2.8 und 2.9). Obwohl die Bestimmungsgrenze ein Maß für quantitative Messungen darstellt, wurde auf die Verwendung der Nachweisgrenze als Maß qualitativer

Messungen verzichtet. Im Vergleich zur Bestimmungsgrenze mit Werten entsprechend der 10-fachen Standardabweichung bezogen auf den Mittelwert (nach DIN 32645 (2008)), wird die Nachweisgrenze als 3-fache Standardabweichung angegeben. Dies führt zu deutlich niedrigeren Grenzwerten als durch die Bestimmungsgrenze und lieferte zum Teil falsch positive und falsch negative Messergebnisse. Trotz der hierdurch bewirkten Reduzierung der Sensitivität des Messsystems, stellte die Bestimmungsgrenze hinsichtlich der Signifikanz der Ergebnisse jedoch die geeignetere Variante dar.

4.2.2.2 Fluoreszenzmessungen von *E. coli* R7/pHPKC3-04 und *E. coli* R7/pHPKC3-05 unter Antibiotikazugabe

Die Auswertung der Fluoreszenzdaten zur Untersuchung mit *E. coli* R7/pHPKC3-05 zeigte, dass keines der zugefügten Antibiotika weder nach 1 h noch nach 2 h eine im Vergleich zur uninduzierten Kontrolle relevante Eigenfluoreszenz aufwies (Kapitel 3.1.3.2, Abb. 3.42). Die Fehlerbalken der einzelnen mit Antibiotika versetzten Proben lagen alle unterhalb der entsprechenden Bestimmungsgrenze. Des Weiteren lag bei Betrachtung der direkten RFU-Werte der mit pHPKC3-05 und pHPKC3-04 gemessenen uninduzierten Proben eine etwa 30 - 50-fach reduzierte Fluoreszenzintensität beim Kontrollplasmid vor. Effekte durch die Eigenfluoreszenz waren somit vernachlässigbar.

Der Einfluss unterschiedlicher Antibiotika auf die Expression des *sdh*-Operons wurde mit dem Reporterplasmid pHPKC3-04 untersucht (Kapitel 3.1.3.3, Abb. 3.43). Hierbei konnte keine direkte Korrelation zwischen dem bakteriziden Wirkungstyp und einer veränderten *sdh*-Expression nachgewiesen werden. Bezogen auf die Werte 1 h nach Antibiotikaexposition lag lediglich unter Zugabe von Ampicillin eine gering erhöhte relative Fluoreszenzintensität von 110 % vor, welche zum Messzeitpunkt 2 h auf einen Wert von 80 % absank. Bei den 2 h-Messwerten war eine geringe Erhöhung der relativen Fluoreszenzintensität bei Zugabe von Polymyxin mit 112 % und Rifampicin mit 117 % zu erkennen. Eine Abnahme der relativen Fluoreszenzintensität wurde bei Polymyxin mit 91 % 1 h nach Antibiotikaexposition (AE) sowie bei Chloramphenicol (84 % und 89 %), Novobiocin (70 % und 64 %) und Erythromycin (90 % und 81 %) 1 h und 2 h nach Antibiotikaexposition nachgewiesen. Mit Ausnahme der von Novobiocin versetzten Probe, welche die größte Abweichung zur uninduzierten Kontrolle zeigte, konnten trotz zugefügter Antibiotikakonzentrationen von 1 x MHK nur geringe Abweichungen der relativen Fluoreszenzintensität beobachtet werden. Trotz geringer Sensitivität zeigte das Messsystem eine hohe Reproduzierbarkeit bezüglich der RFU-Werte von Erst- und Wiederholungsmessung. Mit Ausnahme von Rifampicin lagen die Standardabweichungen im Bereich von 1 – 3 %, was zu einem schmalen Intervall zwischen oberer und unterer Bestimmungsgrenze führte und bereits geringe Abweichung von über 106 % und geringer 94 % (1 h nach AE) bzw. 107 % und 93 % (2 h nach AE) als signifikant darstellt. Ein Nachweis geringer bzw. subinhibitorischer Konzentration antibakterieller Substanzen war daher mit diesem System nicht realisierbar.

Da das Messsystem mit pHPKC3-04 als zentrales Reporterplasmid weder spezifisch bakterizide Antibiotika nachweisen konnte noch eine hohe Sensitivität aufzeigte, wurde pHPKC3-04 für das Ziel der Etablierung eines biosensorischen Messsystems zum Nachweis bakterizider Antibiotika als für ungeeignet bewertet.

4.2.2.3 Fazit der Fluoreszenzergebnisse und weiteres Vorgehen

Wie in Kapitel 4.2.2.2 erläutert, wurde für das *sdh*-Operon keine spezifische Expressionsänderung unter Zugabe bakterizider Antibiotika nachgewiesen. Eine Überlegung zum weiteren Vorgehen stellten Wiederholungsmessungen der bereits in der qRT-PCR untersuchten Genauswahl (Kapitel 3.1.2.2.1.3) dar. Aufgrund der durch die weitere Verfolgung des Ansatzes von *sdhB* über Fluoreszenzmessungen erstmal nur als Einmalbestimmung durchgeführte Expressionsmessung zur Genauswahl, stellt die Wiederholung mit neuen Anzuchtkulturen eine notwendige Verifizierung der qRT-Ergebnisse für die anderen Gene dar. Die in der aktuellen Literatur vermehrt aufkommenden Diskussionen und Kritik bezüglich der Hypothese von Kohanski et al. führten jedoch zu Überlegungen einer alternativen Umsetzung der Promotionsfragestellung. Insbesondere die Publikationen von Keren et al. sowie von Liu und Imlay warfen Zweifel in Bezug auf eine vermehrte ROS-Bildung unter Behandlung von bakteriziden Antibiotika auf (Keren et al., 2013; Liu & Imlay, 2013). Liu und Imlay führten hierzu ebenfalls Untersuchungen mit *E. coli* MG1655 und den Antibiotika Ampicillin, Norfloxacin und Kanamycin in den von Kohanski et al. eingesetzten Konzentrationen durch (Liu & Imlay, 2013). Sie zeigten hierbei, dass für Ampicillin und Norfloxacin unter sauerstoffreichen Bedingungen keine höhere Letalität als unter anoxischen Bedingungen vorlag. Dies widerspricht der Theorie der vermehrten ROS-Bildung, da diese nur unter oxischen Bedingungen und vorwiegend als Nebenprodukte metabolischer Prozesse, wie der Atmungskette oder bei oxidativem Stress durch die Autoxidation von Flavoproteinen gebildet werden (Kapitel 1.2.1). Auch Mutanten ohne Katalase- und Peroxidase-Aktivität zeigten im Vergleich zum Wildtyp keine erhöhte Sensitivität bei Zugabe bakterizider Antibiotika. Des Weiteren wurde die Expression von Mitgliedern des OxyR-Regulons nach Behandlung mit Ampicillin und Norfloxacin in einer qRT-PCR untersucht. Auch hierbei konnte keine erhöhte Expression nachgewiesen werden.

Analog zu Liu und Imlay konnten auch Keren et al. keine Korrelation zwischen der ROS-Bildung und der Überlebensrate unter Zugabe von bakteriziden Antibiotika nachweisen (Keren et al., 2013). Hierbei untersuchten sie Zellen von *E. coli* nach Behandlung mit bakterizid wirkenden Antibiotika hinsichtlich ihrer Überlebensrate unter oxischen und anoxischen Bedingungen sowie nach Zugabe von Thioharnstoff, einem Hydroxylradikalfänger, welcher nach Angaben von Kohanski et al. einen protektiven Effekt auf die Zellen ausübt (Keren et al., 2013; Kohanski et al., 2007). Den protektiven Effekt von Thioharnstoff konnten Keren et al. für Konzentrationen kleiner 0,25 µg/ml für Norfloxacin bzw. für die Konzentration 6,25 µg/ml für Ampicillin bestätigen. Bei höheren Antibiotikakonzentrationen sowie bei Zugabe von Kanamycin sowohl in hohen (60 µg/ml) als auch niedrigen (10 µg/ml) Konzentrationen lag jedoch kein protektiver Effekt durch Thioharnstoff

vor. Der Vergleich der Überlebensrate unter oxischen und anoxischen Bedingungen zeigte, dass unter Zugabe von Ofloxacin, einem Fluorchinolon, dass sowohl bei der Behandlung von aeroben als auch anaeroben Keimen Anwendung findet, die Letalität unter anoxischen Bedingungen sogar erhöht war. Auch für die Zugabe von Norfloxacin in Konzentrationen größer $0,25\mu\text{g/ml}$ sowie für die Zugabe von Ampicillin in den Konzentrationen von $6,25 - 50\mu\text{g/ml}$ traf dieses zu. Im Gegensatz hierzu zeigte Kanamycin unter oxischen Bedingungen eine erhöhte Letalität. Dieses kann jedoch auch auf die für den Transport von Aminoglykosiden ins Cytoplasma benötigte Protonenpumpe zurückzuführen sein.

Der vorherige Ansatz einer gemeinsamen Kaskade bakterizider Antibiotika wurde daher nicht weiterverfolgt und an Stelle dessen individuelle Messsysteme für einzelne Antibiotika induzierende Stressantworten entwickelt. Bei den Stress induzierenden Stimuli handelte es sich um Schäden an der DNA (Kapitel 3.2.1), Stress an der Zellhülle (Kapitel 3.2.2) sowie Störungen innerhalb der Zellwandsynthese bzw. des Zellwandrecyclings (Kapitel 3.2.3). Die Reporterplasmide wurden außer an bakteriziden Antibiotikaklassen zusätzlich an bakteriostatischen Antibiotika getestet und ein umfangreiches Messsystem auf Grundlage einzelner Stressreaktionen etabliert.

4.3 Etablierung eines biosensorischen Messsystems auf Grundlage individueller Antibiotika induzierter Stressreaktionen

4.3.1 Messsystem zum Nachweis von DNA-Schäden

Die Funktion von RecA als zentraler Aktivator der SOS-Antwort sowie die Induktion dieses Stresssystems durch DNA-Schäden ist bereits lange bekannt. Aufgrund der Bildung des ternären Komplexes und der hieraus resultierenden DNA-Strangbrüche, stellt die Gruppe der Fluorchinolone einen potenten Induktor des Stresssystems bzw. das SOS-Responsesystem und die *recA*-Induktion ein geeigneten Ansatzpunkt für den Nachweis von DNA-Schäden dar (Drlica et al., 2009; Dwyer et al., 2007; Jeong et al., 2006; Schroder et al., 2013). Für die Konstruktion des Plasmides pHPKC3-06 wurde das, im Rahmen eines Arbeitskreis-internen Projektes, generierte SOEing-Produkt aus dem *recA*-Promotor und dem Strukturgen *gfpmut2* in das Komplementationsplasmid pHPKC3-02 inseriert (Kapitel 3.2.1.1). Der Promotor von *recA* trägt zwischen der -10-Region und der -35-Region eine LexA-Bindungsstelle, welche ein entscheidendes Element für die Regulation der *recA*-Transkription darstellt. Das SOEing-Produkt wurde über die Restriktionsschnittstelle *PstI* in das Komplementationsplasmid pHPKC3-02 inseriert und das Reporterplasmid pHPKC3-06 erhalten. Der Sensorstamm *E. coli* R7 wurde mit pHPKC3-06 transformiert und die Expression von *recA* nach Zugabe unterschiedlicher Antibiotika untersucht.

Für die Untersuchung der Spezifität der *recA*-Induktion wurden, mit Ausnahme von Cefoxitin, die in Tabelle 4.1 aufgeführten Antibiotika in einer Konzentration von 1 x MHK zur wachsenden Kultur zugegeben und das Fluoreszenzsignal 1 h und 2 h nach Antibiotikaexposition vermessen (Kapitel 3.2.1.2.1). Das Ergebnis der Fluoreszenzmessung ergab eine signifikante *recA*-Induktion im Vergleich zur uninduzierten Kontrolle nach Zugabe von Norfloxacin von 600 % nach 1 h bzw. 1100 % nach 2 h sowie eine schwächere Induktion von 200 % nach 1 h und 450 % nach 2 h durch Rifampicin. Im Gegensatz zur erwarteten Induktion von *recA* durch Norfloxacin, stellte die Induktion durch Rifampicin ein überraschendes Ergebnis innerhalb der Spezifitätsuntersuchung dar. Die erste Annahme einer Störung der Fluoreszenzmessung durch die intensiv rote Färbung der Rifampicin-Stammlösung konnte durch die Bestimmung der Eigenfluoreszenz mit dem Kontrollplasmid pHPKC3-05 (Kapitel 3.1.3.2) widerlegt werden. Eine Störung der UV-Messung aufgrund derer die RFU-Werte über die OD normiert wurden, lag ebenfalls nicht vor. Die Verwendung eines eigenen Rifampicin-Blanks (M9-Medium plus Rifampicin), welcher die gleiche Antibiotikakonzentration wie in den Kolben aufwies, lieferte vergleichbare OD-Werte wie der Blank ohne Rifampicin. Des Weiteren wäre bei Störung der Messungen aufgrund der Färbung keine Steigerung der Fluoreszenzintensität über die Zeit zu erwarten gewesen. Die Reproduzierbarkeit, Kontrollversuche und die im Vergleich zur uninduzierten Kontrolle hohen Werte der Fluoreszenzintensität bestätigen demnach die spezifische *recA*-Induktion durch Rifampicin. Quellen in der Literatur zur Induktion der SOS-Antwort durch Rifampicin wurden mit Ausnahme von Kohanski et al. nicht gefunden (Kohanski et al., 2007). Hierbei wiesen Kohanski et al. mittels eines *lexA-gfp*-Reporterkonstrukts ebenfalls eine Aktivierung der SOS-Antwort nach und bestätigen damit die erhaltenen Ergebnisse zur Untersuchung mit pHPKC3-06. Die Ursachen für die Induktion durch Rifampicin sind spekulativ. Da die Zielstruktur von Rifampicin die RNA-Polymerase und somit die Hemmung der Transkription darstellt (Kapitel 1.3.2.1.3), könnte jedoch die Bildung von Einzelstrangenden bei der Inhibierung der Elongation der mRNA im offenen Komplex eine mögliche Erklärung für die Aktivierung darstellen.

Kein positiver Nachweis konnte für die Antibiotika Novobiocin und Ampicillin mit dem Reporterplasmid pHPKC3-06 erbracht werden. Für Novobiocin war dies zu erwarten, denn obwohl das Aminocumarin wie die Fluorchinolone ebenfalls die Topoisomerasen II als Zielstruktur aufweist, handelt es sich durch die Bindung an die B-Untereinheit um einen anderen Wirkmechanismus (Kapitel 1.3.2.1.2). Während durch die Fluorchinolone der Komplex aus Enzym und gespaltener DNA stabilisiert wird, arretiert Novobiocin den Komplex vor der ATP-abhängigen Spaltung des Doppelstranges. Hierdurch werden keine Einzelstrangbereiche generiert, sodass auch keine Aktivierung der SOS-Antwort durch RecA erfolgt. Entgegen bisheriger Veröffentlichungen konnte auch nach Zugabe von Ampicillin mit dem Reporterplasmid pHPKC3-06 keine erhöhte *recA*-Induktion nachgewiesen werden. Nach Angaben von Miller et al. erfolgt eine Aktivierung der SOS-Antwort durch β -Laktamantibiotika über das DpiAB-TCS, einem Zwei-Komponenten-System, welches aus der Sensorkinase DpiB und dem Effektor- bzw. Regulatorprotein DpiA besteht (Miller et al., 2004). Über ein *dpiB-lacZ*-Reporterkonstrukt sowie mittels qRT-PCR wiesen sie unter Zugabe verschiedener β -Laktamantibiotika eine etwa vierfach erhöhte Expression des *dpiAB*-Operons nach (Miller et al., 2004). Mithilfe eines

dpiA-Überexpressionplasmides zeigten sie des Weiteren eine erhöhte *sfiA*-Expression, ein durch die SOS-Antwort reguliertes Gen und wiesen darüber eine Aktivierung des Stresssystems nach (Miller et al., 2004). Diese erfolgt unter Beteiligung von RecA, sodass mit dem Reporterplasmid pHPKC3-06 ebenfalls eine erhöhte Fluoreszenzintensität unter Ampicillinzugabe zu erwarten war. Bei Betrachtung der Ergänzungen zur Veröffentlichung wurde jedoch bei der Überexpression von *dpiA* nur eine weniger als zweifach erhöhte *recA*-Induktion mittels Western Blot ermittelt. Eine Überprüfung der *recA*-Induktion unter Zugabe von Ampicillin mit einer sensitiveren Methode, wie beispielsweise die qRT-PCR, wäre daher für eine konkrete Aussage zur Induktion von *recA* hilfreich. Zusammenfassend stellt das Reporterplasmid pHPKC3-06 jedoch kein geeignetes Nachweisverfahren für β -Laktamantibiotika dar.

Die Untersuchung der Sensitivität ergab für Norfloxacin eine im Vergleich zu Rifampicin deutlich höhere Empfindlichkeit. Während unter Zugabe von Norfloxacin mit dem Messsystem Konzentrationen ab 0,2 x MHK, entsprechend einer Konzentration von 0,0064 $\mu\text{g/ml}$ nachgewiesen werden konnten, lag die Grenze eines signifikanten Nachweises von Rifampicin bei Werten von 0,5 x MHK, entsprechend einer Konzentration von 4 $\mu\text{g/ml}$. Durch die Betrachtung der MHK als Bezugspunkt ist der Nachweis für Norfloxacin um den Faktor 2,5-fach sensitiver als für Rifampicin.

4.3.2 Messsystem zum Nachweis von Zellhüllstress

Eine weitere Zielstruktur antibakterieller Substanzen stellt neben der DNA die Zellhülle der Bakterien dar. Diese umfasst beim gramnegativen *E. coli* die innere und äußere Membran sowie den periplasmatischen Raum mit dem Peptidoglykan. Stressauslöser für die Zellhülle können vielseitig sein und umfassen neben Veränderungen von Umweltbedingungen auch die Anwesenheit fehlgefalteter Proteine. Letzteres führt zur Induktion von Chaperonen und Proteasen, Proteine, die die fehlerhaften Proteine in die richtige Konformation überführen oder bei irreparablen Schäden hydrolytisch abbauen. Aufgrund der Bildung fehlerhafter Proteine und einer Störung der Zellpermeabilität, stellte die Gruppe der Aminoglykoside daher einen potenten antibakteriell wirkenden Induktor für Zellhüllstress dar. In Folge dessen wurde über Literaturrecherche eine Auswahl an Genen ermittelt, die in Zusammenhang mit einer veränderten Genexpression bei Anwesenheit von Aminoglykosiden beschrieben wurden. Die Proteinfunktion sowie die Begründung zur Auswahl sowie die entsprechenden Literaturverweise sind Kapitel 3.2.2.1 zu entnehmen. Zu berücksichtigen ist, dass sich die Veröffentlichungen nicht auf eine ΔtoC -Mutante in M9-Medium beziehen und ein Einfluss der *toC*-Deletion bezüglich einer abweichenden Genexpression aufgrund zum Beispiel metabolischer Prozesse nicht auszuschließen ist. Die Genauswahl wurde in einer Näherung unter Zugabe von Kanamycin in 1 x MHK mittels qRT-PCR untersucht. Aufgrund des zeitverzögerten Wirkungseintritts von Kanamycin bei der Anzucht für die Zellernte zur RNA-Isolierung wurden die Messzeitpunkte 2 h und 3 h nach Antibiotikaexposition gewählt. Bei der nachträglichen Überarbeitung der qRT-Ergebnisse wurde allerdings bei der Herstellung der cDNA für die Werte 3 h nach Antibiotikaexposition ein Fehler bezüglich der eingesetzten Menge

an RNA für die uninduzierte Probe festgestellt. Die Ergebnisse zum Zeitpunkt 3 h sind daher zu vernachlässigen. Sie trugen allerdings zum damaligen Zeitpunkt neben den Ergebnissen der Literaturrecherche zur Entscheidung, den *cpxP*-Promotor für die Reporterkonstruktion zu verwenden, mit bei. Ausschlaggebend für die Wahl des *cpxP*-Promotors bildeten trotz besonderer Bedingungen durch die *tolC*-Deletion jedoch die umfangreichen Angaben in der Literatur, welche einen direkten Bezug zwischen Aminoglykosidresistenzen, fehlgefalteten Proteinen und dem Cpx-TCS aufführen.

Die Konstruktion des Reporterplasmides pHPKC3-08, basierend auf den regulatorischen Elementen von CpxP und dem Fluoreszenzprotein GFPmut2, und die anschließende Vermessung im Fluorimeter sollten weitere Erkenntnisse bezüglich einer veränderten Expression innerhalb des Cpx-TCS unter Zugabe unterschiedlicher Antibiotikaklassen erbringen sowie die Eignung des Reporterplasmides zum Nachweis Zellhüllstress auslösender Antibiotika aufführen.

4.3.2.1 Konstruktion von pHPKC3-08

Für die Konstruktion von pHPKC3-08 wurde ein 1253 bp großes SOEing-Produkt aus dem Promotor von *cpxP* inklusive regulatorischer Bindungsstellen für CpxR und dem Strukturgen *gfpmut2* hergestellt und analog der Konstruktion vorheriger Plasmide in das Komplementationsplasmid pHPKC3-02 über die *Pst*I-Schnittstelle inseriert. Aufgrund einer ungünstigen Sequenzabfolge für das Primerdesign wurde ein Sequenzabschnitt des divergent vorgelagerten Gens *cpxR*, kodierend für das Regulatorprotein des Cpx-TCS, mit in das SOEing-Produkt übernommen. Da es sich hierbei nur um eine Teilsequenz des Gens handelte, wurde durch das Reporterplasmid keine veränderte Proteinexpression von CpxR bewirkt und die physiologische Regulation des chromosomalen Cpx-TCS nicht negativ beeinflusst. Auffallend war, dass die erhaltenen Transformanten analog den mit pHPKC3-04 transformierten Zellen, eine leichte grün-gelbliche Fluoreszenz im uninduzierten Zustand aufzeigten. Dies ließ auf die basale *cpxP*-Expression schließen, welche aufgrund der *tolC*-Deletion und einer hierdurch erhöhten *spy*-Expression mit verstärkter Aktivierung des Cpx-TCS zu vermuten war (Rosner & Martin, 2013). Eine mutationsbedingte Überexpression von *cpxP* konnte durch Überprüfung der Plasmidkonstruktion mittels Restriktionsverdau und Sequenzierung der Übergänge der Genfusion sowie relevanter regulatorischer Elemente ausgeschlossen werden.

4.3.2.2 Fluoreszenzmessungen mit pHPKC3-08

Als Antibiotikaklasse mit Verbindung zu Zellhüllstress und dem Cpx-TCS wurde zunächst in einer Fluoreszenzmessung *E. coli* R7/pHPKC3-08 unter dem Einfluss von Kanamycin untersucht (Kapitel 3.2.2.4.1). Hierbei wurden unterschiedliche Konzentrationen an Kanamycin im Bereich von 0,2 – 1 x MHK eingesetzt und die Fluoreszenzintensität nach 1 h und 2 h vermessen. Im Vergleich zur uninduzierten Kontrolle konnte, trotz Keimzahlreduktion bei Konzentrationen über 0,5 x MHK, keine Zunahme der *cpxP*-Expression bzw. der

Fluoreszenzintensität nachgewiesen werden. Ursache hierfür könnte eine durch die *tolC*-Deletion verursachte Überexpression von *cpxP* und eine nicht weiter zu erhöhende Induzierbarkeit darstellen. Des Weiteren könnte auch die Induzierbarkeit von *cpxP* durch Aminoglykoside unabhängig von der *tolC*-Deletion und dem erhöhten Stress der Mutante in M9-Medium zu gering und die Methode zu unempfindlich sein.

Im Gegensatz zur Probe mit Kanamycin war unter Zugabe weiterer Proteinbiosyntheseinhibitoren bzw. unter dem Transkriptionsinhibitor Rifampicin eine Abnahme der relativen Fluoreszenzintensität zu beobachten. Anhand von Fluoreszenzmessungen mit dem Kontrollplasmid pHPKC3-03 wurde daher im Folgenden die Vermutung einer gestörten Fluoreszenzproteinbildung aufgrund des Wirkmechanismus dieser Antibiotika untersucht. Die hohe und von antibiotischen Einflüssen unabhängige *gfpmut2*-Expression von pHPKC3-03 würde bei Störungen der Proteinbildung ebenfalls zu einer verringerten Fluoreszenzintensität im Vergleich zur uninduzierten Kontrolle führen. Zu den hierbei verwendeten Antibiotika zählten das Oxazolidinon Linezolid, das Makrolid Erythromycin, Chloramphenicol, das Aminoglykosid Kanamycin sowie der Transkriptionsinhibitor Rifampicin, die jeweils in einer Konzentration von 1 x MHK hinzugegeben wurden. Analog der Fluoreszenzmessung mit Kanamycin führte die Zugabe keines der Antibiotika zu einer Reduzierung der Fluoreszenzintensität (Kapitel 3.2.2.4.3). Von einer Störung der Fluoreszenzproteinbildung aufgrund der Hemmung der Proteinbiosynthese oder der Transkription war demnach nicht auszugehen.

Die Überprüfung einer weiter zu steigernden Induzierbarkeit erfolgte durch die Zugabe von NaOH. NaOH bzw. die Alkalisierung des Mediums stellt einen starken Induktor für die *cpxP*-Expression dar und wurde analog der Antibiotikazugabe zu einer wachsenden Kultur in der frühen exponentiellen Phase hinzugegeben (Kapitel 3.2.2.4.4) (Danese & Silhavy, 1998; DiGiuseppe & Silhavy, 2003). Der pH-Wert des Mediums wurde auf 8 eingestellt und die Fluoreszenzintensität von *E. coli* R7/pHPKC3-08 1 h und 2 h nach Zugabe gemessen. Die Alkalisierung des Mediums führte lediglich zu einer gering erhöhten Fluoreszenzintensität nach 1 h. Der direkte Vergleich der pH-abhängigen Steigerung der Fluoreszenzintensität von *E. coli* R7/pHPKC3-08 mit Angaben aus der Literatur zeigte eine deutlich reduzierte Induzierbarkeit der *cpxP*-Expression. Während in der Literatur mittels β -Galaktosidase-Assays eine *cpxP*-Expression im Bereich von 15 – 50-facher Erhöhung nachgewiesen wurde, lag diese bei *E. coli* R7/pHPKC3-08 bei einem Faktor kleiner zwei (Danese & Silhavy, 1998; DiGiuseppe & Silhavy, 2003). Es ist daher nicht auszuschließen, dass der Stammhintergrund von *E. coli* R7 oder die Kombination aus $\Delta toIC$ -Mutante und M9-Medium zu einer Aktivierung des Cpx-TCS und einer gesteigerten *cpxP*-Expression führen.

Für das Messsystem zum Nachweis von Zellhüllstress bedeutete dies einen deutlichen Verlust der Sensitivität und stellte darüber hinaus die Eignung des Reportersystems für das Nachweisverfahren in Frage.

Aufgrund der Ergebnisse vorangegangener Fluoreszenzmessungen wie die Untersuchung nach Zugabe von Kanamycin, waren die Ergebnisse von *E. coli* R7/pHPKC3-08 zur Untersuchung der Spezifität unter Zugabe weiterer Antibiotika zunächst unerwartet (Kapitel 3.2.2.4.2). Für die Antibiotika Linezolid, Chloramphenicol und Erythromycin, deren Wirkmechanismus ebenfalls der Proteinbiosynthesehemmung unterliegt bzw. in

geringerem Ausmaß auch für Rifampicin als Transkriptionsinhibitor, lag eine reduzierte relative Fluoreszenzintensität nach 2 h von etwa 50 % vor. Dieses unterschreitet die untere Bestimmungsgrenze, sodass die Ergebnisse als signifikant zu betrachten sind. Aufgrund der bereits erfolgten Fluoreszenzmessung mit dem Kontrollplasmid pHPKC3-03 nach Zugabe von unterschiedlichen Proteinbiosynthesehemmern kann eine gestörte Proteinbildung als Ursache der reduzierten relativen Fluoreszenzintensität ausgeschlossen werden. Zu berücksichtigen ist, dass es sich bei der Abnahme nur um eine Reduzierung der relativen Fluoreszenzintensität (RFU) handelt, während die absoluten Fluoreszenzwerte über die Zeit weiter anstiegen. Da es sich bei GFPmut2 um stabiles Fluoreszenzprotein handelt, das sich über die Zeit in der Zelle anreichert, war dies zu erwarten. Aufgrund der Berechnung der RFU-Werte kann die Abnahme der relativen Fluoreszenzintensität nur auf zwei Variablen zurückgeführt werden: die absoluten Fluoreszenzintensitäten und die OD. Bei Betrachtung der OD (Tabelle 4.2) zeigen die mit bakteriostatischen Antibiotika behandelten Proben eine etwas niedrigere OD im Vergleich zu den mit bakteriziden Antibiotika behandelten Proben. Die OD-Werte der uninduzierten Kontrolle lieferten dagegen, wie vorauszusetzen, vergleichbare Werte. Da bei allen Proben direkt vor Antibiotikazugabe die gleiche Keimzahl vorlag, sind die Unterschiede in der OD aufgrund veränderter Zellmorphologie, Zellyse oder unterschiedlichem zeitlichen Wirkungseintritt der Antibiotika zu vermuten.

Bei der Gegenüberstellung der absoluten Fluoreszenzintensitäten (Tabelle 4.3) ist zu erkennen, dass die mit bakteriostatischen Antibiotika behandelten Proben im direkten Vergleich zur uninduzierten Kontrolle größere Differenzen aufzeigen als die Proben, die mit bakteriziden Antibiotika behandelt wurden. Zu berücksichtigen ist jedoch, dass für die Aussagekraft einer signifikanten Änderung der Fluoreszenzintensität durch Antibiotika die Rohdaten nur eingeschränkt zu betrachten sind und immer der Bezug zur OD bzw. die Angabe als relative Fluoreszenzintensität vorzuliegen hat. Die Gegenüberstellung von OD und Rohdaten zeigt allerdings, dass die Abnahme der relativen Fluoreszenzintensität, hervorgerufen durch bakteriostatische Antibiotika, durch eine stark reduzierte absolute Fluoreszenzintensität sowie durch die reduzierte OD bestimmt wird.

Tabelle 4.2: Gegenüberstellung der OD von Proben nach Zugabe bakterizider und bakteriostatischer Antibiotika im Vergleich zur uninduzierten Kontrolle; die Intervalle der OD beschreiben den Bereich aus dem niedrigsten Wert und dem höchsten Wert hervorgerufen durch die genannten Antibiotika zum jeweiligen Zeitpunkt

Bakterizide Antibiotika: Ampicillin, Norfloxacin, Novobiocin

	Antibiotika (1. Messung)	uninduzierte Kontrolle (1. Messung)	Antibiotika (2. Messung)	uninduzierte Kontrolle (2. Messung)
<i>OD-Intervall nach 1 h</i>	0,4603 – 0,4790	0,4716	0,4529 – 0,4878	0,4786
<i>OD-Intervall nach 2 h</i>	0,5460 – 0,6376	0,6512	0,5512 – 0,7040	0,6818

Bakteriostatische Antibiotika: Linezolid, Erythromycin, Chloramphenicol

	Antibiotika (1. Messung)	uninduzierte Kontrolle (1. Messung)	Antibiotika (2. Messung)	uninduzierte Kontrolle (2. Messung)
<i>OD-Intervall nach 1 h</i>	0,3443 – 0,4431	0,4760	0,3096 – 0,3905	0,4353
<i>OD-Intervall nach 2 h</i>	0,4410 – 0,5938	0,6872	0,4018 – 0,5602	0,6884

Tabelle 4.3: Gegenüberstellung der absoluten Fluoreszenzintensitäten von Proben nach Zugabe bakterizider und bakteriostatischer Antibiotika im Vergleich zur uninduzierten Kontrolle; die Intervalle der Fluoreszenzintensität beschreiben den Bereich aus dem niedrigsten Wert und dem höchsten Wert hervorgerufen durch die genannten Antibiotika zum jeweiligen Zeitpunkt

Bakterizide Antibiotika: Ampicillin, Norfloxacin, Novobiocin

	Antibiotika (1. Messung)	uninduzierte Kontrolle (1. Messung)	Antibiotika (2. Messung)	uninduzierte Kontrolle (2. Messung)
<i>Intervall der Fluoreszenzintensität nach 1 h</i>	18449 - 23558	18786	19699 - 26316	20588
<i>Intervall der Fluoreszenzintensität nach 2 h</i>	34615 - 38856	39993	41077 - 49900	53682

Bakteriostatische Antibiotika: Linezolid, Erythromycin, Chloramphenicol

	Antibiotika (1. Messung)	uninduzierte Kontrolle (1. Messung)	Antibiotika (2. Messung)	uninduzierte Kontrolle (2. Messung)
<i>Intervall der Fluoreszenzintensität nach 1 h</i>	9639 - 12086	15291	10236 - 12854	16190
<i>Intervall der Fluoreszenzintensität nach 2 h</i>	10358 - 13697	36217	11122 - 15780	47650

4.3.3 Messsystem zum Nachweis von Störungen der Zellwandsynthese

Das Messsystem zum Nachweis von Störungen der Zellwandsynthese beruht auf der Induktion der AmpC- β -Laktamase, welche durch die Anreicherung bestimmter Zellwandbestandteile als Folge antibakterieller Behandlung induziert wird und die Anwesenheit von β -Laktamantibiotika aufzeigt. Wie bereits in Kapitel

1.4.2.1 beschrieben stellt die wirtseigene AmpC- β -Laktamase von *E. coli* aufgrund mangelnder Regulation und fehlender Induzierbarkeit keine Alternative für die Reporterkonstruktion des Nachweissystems dar. Aus diesem Grund wurde auf die induzierbare β -Laktamase von *Citrobacter freundii* zurückgegriffen und der *ampC*-Promotor, inklusive Strukturgen und regulatorischer Elemente des in *E. coli* fehlenden Regulatorproteins AmpR, für die Konstruktion verwendet. Die Expression der wirtseigenen AmpC- β -Laktamase von *E. coli* bleibt von der Mutagenese unberührt (Lindberg et al., 1987; Lindberg & Normark, 1986).

4.3.3.1 Konstruktion von pHPKC3-13

Bei dem verwendeten Stamm von *C. freundii* GK100 handelte es sich um einen Vertreter aus der laboreigenen Stammsammlung mit zum Teil unbekanntem Stammhintergrund. Aufgrund dessen erfolgte zunächst zum Ausschluss einer veränderten Induzierbarkeit der β -Laktamase mittels Sequenzierung die Überprüfung auf Mutationen in den für die Plasmidkonstruktion verwendeten Bereichen (Kapitel 3.2.3.1). Hierbei wurden in *ampR* vier Nukleotidsubstitutionen im letzten Drittel des Genes nachgewiesen, wobei es sich bei drei der Substitutionen um stille, nicht die Aminosäuresequenz verändernde Mutationen handelte. Die vierte Substitution resultierte in einem Aminosäureaustausch an Position 232 von Isoleucin gegen Serin. Dies führte zu einem Austausch einer Aminosäure mit unpolarer Seitenkette gegen eine Aminosäure mit polarer Seitenkette, sodass eine Beeinflussung der tertiären Proteinstruktur und damit der Proteinfunktionalität nicht ausgeschlossen werden konnte. Bereits in der Literatur vorhandene Veröffentlichungen zu dieser Mutationen wurden nicht gefunden. Eine Ableitung bezüglich des Ausmaßes einer veränderten AmpC-Induzierbarkeit lag demnach nicht vor und wurde durch Fluoreszenzmessungen mit der Reportergenkonstruktion untersucht. Aufgrund des Wachstums auf mit Ampicillin versetzten LB-Platten konnte eine generelle Expression sowie die Funktionalität der β -Laktamase von *C. freundii* GK 100 bestätigt werden. Die Sequenzierung, der für die Induzierbarkeit ebenfalls benötigten Gene, *nazG*, *ampG* und insbesondere *ampD*, konnte aufgrund des bekannten genotypischen Hintergrunds des Ausgangsstammes *E. coli* C600 vernachlässigt werden. Eine detaillierte Erläuterung bezüglich der Regulation der AmpC-Induktion ist in Kapitel 1.4.2.1 beschrieben.

Für die Konstruktion des Reporterplasmides pHPKC3-13 wurde ein SOEing-Produkt konstruiert, welches aus dem Strukturgen von *ampR*, dem intergenetischen Bereich von *ampR* und *ampC* sowie dem Strukturgen von *gfpmut2* bestand. Das SOEing-Produkt wurde in das Komplementationsplasmid pHPKC3-02 inseriert und das Plasmid mittels Restriktionsverdau und Sequenzierung auf seine korrekte Konstruktion hin überprüft (Kapitel 3.2.3.2). Im Gegensatz zu bisherigen Reporterplasmidkonstruktionen zeigten die Transformanten mit pHPKC3-13 keine grünliche Fluoreszenz im uninduzierten Zustand. Eine hohe konstitutive Expression von AmpC lag demnach nicht vor, sodass eine Induzierbarkeit der β -Laktamase zunächst anzunehmen war.

4.3.3.2 Fluoreszenzmessungen mit pHPKC3-13

Nach Transformation von *E. coli* R7 mit dem Reporterplasmid pHPKC3-13 wurde die Fluoreszenzintensität zunächst in Abhängigkeit unterschiedlicher Ampicillinkonzentrationen untersucht (Kapitel 3.2.3.3.1). Hierbei wurden Konzentrationen im Bereich von 0,2 x bis 1 x MHK verwendet. Entgegen den Erwartungen konnte jedoch keine AmpC-Induktion in *E. coli* R7 nachgewiesen werden. Die Fluoreszenzintensitäten waren unabhängig von der zugefügten Antibiotikakonzentration vergleichbar mit Werten der uninduzierten Kontrolle. Aufgrund der vorherigen Überprüfung der Plasmidkonstruktion und in der Literatur bereits beschriebenen erfolgreichen Induzierbarkeit der AmpC- β -Laktamase in *E. coli* durch Transformation mit *ampR*-tragenden Plasmiden aus *E. cloacae* und *C. freundii*, wurden konstruktionsbedingte Fehler als Ursache zunächst ausgeschlossen (Lindberg et al., 1987; Lindberg & Normark, 1987). Die erhöhte AmpC-Expression in *ampD*-Mutanten sowie die Funktion von AmpD als Negativregulator der AmpC-Induktion führten zur Untersuchung von pHPKC3-13 in einem *ampD*-negativen Stammhintergrund (Kapitel 3.2.3.3.1) (Lindberg et al., 1987). Hierfür verwendet wurden der Stamm *E. coli* SN0302, der durch die Insertion des IS1-Elementes eine Inaktivierung von AmpD aufweist sowie zum direkten Vergleich sein *ampD*-positiver Ausgangsstamm *E. coli* SN03. Aufgrund der hohen Substrataffinität und Enzymaktivität von AmpC gegenüber Cefoxitin, einem Cephalosporin zweiter Generation, wurde dieses als induzierendes β -Laktam in einer Konzentration von 1 x MHK für die Untersuchung gewählt (Jacoby, 2009). Zur Vermeidung einer Neukonstruktion des Reporterplasmides pHPKC3-13 und zur Gewährleistung einer Anzucht unter optimalen Wachstumsbedingungen wurde zunächst auf das M9-Medium verzichtet und der Versuch in LB-Medium ohne Selektionsdruck durchgeführt. Die Überprüfung eines Plasmidverlustes aufgrund des fehlenden Selektionsdruckes wurde über Ausplattierung auf LB- und Tetracyclinagarplatten kontrolliert und war vernachlässigbar. Im Gegensatz zum Ausgangsstamm *E. coli* SN03 zeigte die Fluoreszenzmessung bei der *ampD*-negativen Mutante *E. coli* SN0302 eine deutliche Induktion der AmpC- β -Laktamase unter Zugabe von Cefoxitin. Diese war zeitabhängig und erreichte 3 h nach Antibiotikaexposition prozentuale Abweichungen zur uninduzierten Kontrolle von etwa 1500 %. Kritisch zu betrachten und negativ auswirkend auf die Sensitivität war die störende Eigenabsorption des LB-Mediums, welche vergleichbare Fluoreszenzwerte wie die uninduzierte Kontrolle aufwies. Dennoch waren aufgrund der sehr hohen Zunahme der relativen Fluoreszenzintensität unter Cefoxitin der Nachweis der AmpC-Induktion sowie die Notwendigkeit eines *ampD*-negativen Stammhintergrunds eindeutig. Als Konsequenz dieser Ergebnisse wäre für die Verwendung von pHPKC3-13 als Nachweissystem in *E. coli* R7 die zwangsläufige Inaktivierung von AmpD erforderlich gewesen. Unter Berücksichtigung des experimentellen und zeitlichen Aufwands und den nicht absehbaren metabolischen Konsequenzen der $\Delta tolC$ -Mutante bei weiteren metabolischen Eingriffen, wie dem Zellwandrecycling als Folge des AmpD-Knockouts, wurde auf weitere Sensorstamm verändernde Maßnahmen verzichtet und *E. coli* SN0302 als zusätzlicher Sensorstamm des Messsystems neben *E. coli* R7 etabliert.

Die Untersuchung der Spezifität für *E. coli* SN0302/pHPKC3-13 mit unterschiedlichen Antibiotikaklassen lieferte trotz reproduzierbarer Fluoreszenzwerte unter Zugabe von Cefoxitin zum Teil widersprüchliche Ergebnisse (Kapitel 3.2.3.3.2). Hierzu zählten die vergleichsweise nur geringe Erhöhung der relativen Fluoreszenzintensität unter Ampicillin, welches ebenfalls einen Induktor von AmpC darstellt, wie auch die oberhalb der Bestimmungsgrenze liegende erhöhte Fluoreszenzintensität unter Chloramphenicol, Erythromycin und Linezolid. Da es sich bei Letzteren um Proteinbiosynthesehemmer und nicht um bekannte Induktoren von AmpC handelt, ist davon auszugehen, dass keine verifizierte Zunahme der relativen Fluoreszenzintensität vorlag, sondern es sich vermutlich aufgrund der sehr niedrigen Bestimmungsgrenzen um einen falsch positiven Nachweis handelte. Dies spiegelt die Bedeutung eines möglichst hohen Probenumfangs der uninduzierter Kontrollen zur Bestimmung der Bestimmungsgrenzen wider. Rückblickend betrachtet wäre daher zur Ermittlung präziserer Bestimmungsgrenzen ein größerer Probenumfang von beispielsweise fünf bis zehn Anzuchten für jede Stamm-Plasmid-Kombination zu empfehlen.

Die große Differenz zwischen der relativen Fluoreszenzzunahme nach Zugabe von Ampicillin und Cefoxitin ist auf mehrere Faktoren zurückzuführen. Ein entscheidender Faktor stellt die OD dar, die unter Cefoxitin-zugabe deutlich geringer ausfiel und über die Zeit eine Abnahme aufzeigte, während die OD unter Ampicillin zu den entsprechenden Zeitpunkten drei bis fünfmal höhere Werte aufwies als bei der Cefoxitinprobe und über die Zeit weiter zunahm. Da bei beiden Antibiotika eine Konzentration von 1 x MHK verwendet wurde, könnte eine mögliche Erklärung hierfür in der 21-fach höheren Enzymaktivität (k_{cat}) der AmpC von *C. freundii* gegenüber Cefoxitin im Vergleich zu Ampicillin liegen (Jacoby, 2009). Diese führt zu einer schnellen Umsetzung des Substrates und damit zu einem schnelleren Wirkungseintritt mit früherer Zelllyse. Dieses würde eine Abnahme der OD bewirken und basierend auf Formel 4.1 zu hohen relativen Fluoreszenzintensitäten führen. Die Verwendung der OD als Bezugsgröße für die Normierung der Fluoreszenzrohdaten ist daher insbesondere bei lysierenden Antibiotika kritisch zu betrachten.

$$\text{Fluoreszenzsignal, normiert [RFU]} = \frac{\text{Fluoreszenzrohsignal}}{OD_{600nm}}$$

Formel 4.1: Berechnung der relativen Fluoreszenzintensität (Kapitel 2.2.15.2)

Die Bedeutung der OD wird des Weiteren in der Betrachtung der Fluoreszenzrohdaten der Spezifitätsuntersuchung widerspiegelt (Abb.4.2). Hierbei ist ebenfalls im Gegensatz zur Darstellung der relativen Fluoreszenzdaten (Kapitel 3.2.3.3.2, Abb. 3.65) eine erhöhte Fluoreszenzintensität unter Zugabe von Ampicillin erkennbar.

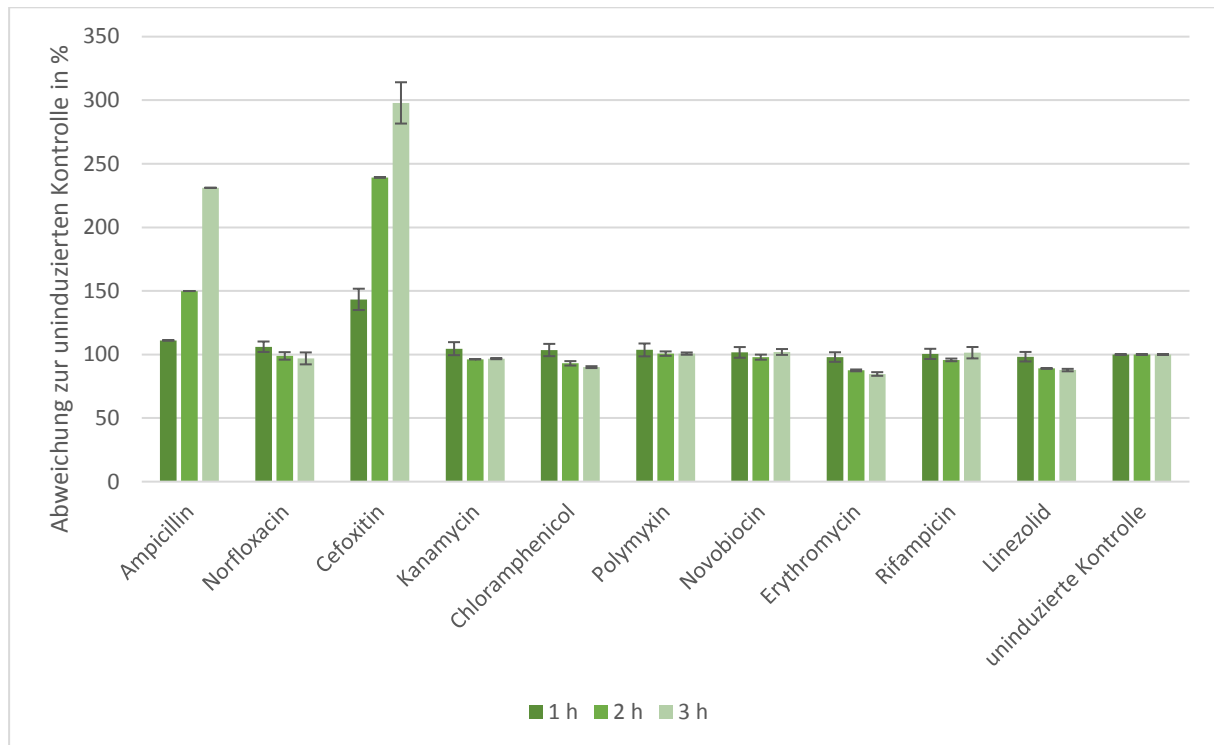


Abbildung 4.2: Fluoreszenzrohdaten der Spezifitätsuntersuchung von *E. coli* SN0302/pHPKC3-13 unter Verwendung von Antibiotikakonzentrationen in 1 x MHK

4.3.4 Zusammenfassung zur Erweiterung des Messsystems um individuelle Reportersysteme

Die Umstellung eines universellen Reportersystems zum Nachweis bakterizider Antibiotika auf drei voneinander unabhängige Reportersysteme für spezifische Stressantworten führte zur Konstruktion der Reporterplasmide pHPKC3-06 (*precA::gfpmut2*), pHPKC3-08 (*pcpxP::gfpmut2*) und pHPKC3-13 (*ampR-pampC::gfpmut2*). Das Plasmid pHPKC3-06, welches DNA-Schäden signalisiert, lieferte mit hoher Spezifität und Sensitivität einen positiven Nachweis für das Fluorchinolon Norfloxacin. Ein ebenfalls positiver Nachweis mit einer im Vergleich zu Norfloxacin geringeren Empfindlichkeit wurde für den RNA-Polymeraseinhibitor Rifampicin erbracht.

Die Detektion von Zellhüllstress mit dem Schwerpunkt des Nachweises von Aminoglykosiden, sollte über das Plasmid pHPKC3-08 erfolgen. In den Fluoreszenzuntersuchungen konnte jedoch keine Erhöhung der Fluoreszenzintensität bei Zugabe von Kanamycin nachgewiesen werden. Die Zugabe von Proteinbiosynthesehemmern sowie von Rifampicin führte ebenfalls zu einer Abnahme der relativen Fluoreszenzintensität. Eine gestörte Bildung des Fluoreszenzproteins aufgrund der Hemmung der Proteinbiosynthese bzw. der Transkription wurde durch Untersuchungen mit dem Kontrollplasmid pHPKC3-03 überprüft. Trotz der ermittelten Abnahme der Fluoreszenzintensität, konnte über pHPKC3-08 die Identifizierung von Proteinbiosynthesehemmern erfolgreich gezeigt werden.

Der Nachweis von Stress in der Zellwand bzw. einer gestörten Zellwandsynthese wurde über das Reporterplasmid pHPKC3-13 gezeigt. Aufgrund des *ampD*-positiven Stammhintergrunds von *E. coli* R7 konnte über das Messsystem mit dem Sensorstamm keine ausreichende Sensitivität erzielt werden. Diese wurde durch die Substitution von *E. coli* R7 gegen die *ampD2*-Mutante *E. coli* SN0302 erheblich gesteigert, sodass für Messungen mit pHPKC3-13 *E. coli* SN0302 als neuer Sensorstamm gewählt wurde. Trotz der hohen Sensitivität gegenüber Cefoxitin weist das Messsystem bezogen auf Ampicillin nur eine geringe Empfindlichkeit auf. Zur verbesserten Aussagekraft bezüglich der Sensitivität sind daher anschließende Untersuchungen mit weiteren β -Laktamantibiotika sowie mit unterschiedlichen Antibiotikakonzentrationen durchzuführen.

4.4 Erweiterung der individuellen Messsysteme zu einem kombinierten Messsystem auf Basis der Antibiotika induzierten Stressantworten

Mit den drei Reportersystemen zum Nachweis von DNA-Schäden, Störungen in der Zellhülle sowie der Zellwandsynthese konnte die Anwesenheit von Antibiotika aus den Klassen der Fluorchinolone, β -Laktame, Ansamycine, Oxazolidinone, Makrolide sowie das Antibiotikum Chloramphenicol mit dem Sensorstamm *E. coli* R7 bzw. *E. coli* SN0302 detektiert werden. Durch die Verwendung von GFPmut2 als einziges Fluoreszenzprotein ist jedoch der Nachweis unterschiedlicher Antibiotikaklassen nebeneinander nicht möglich. Aufgrund Letzterem sowie durch die Notwendigkeit eines zweiten Sensorstammes, ist der experimentelle Aufwand für ein Screening auf mehrere Antibiotikaklassen sehr umfangreich. Zur Vereinfachung der Versuchsbedingungen und Erhöhung des Probenumsatzes wurden die Reportersysteme daher zu einem kombinierten System vereint, sodass die Induktion aller drei Stressantworten über ein einzelnes Plasmid (pHPKC3-14) parallel nachgewiesen werden können. Zur Differenzierung der jeweiligen Stressantworten wurden neben GFPmut2 zwei weitere Fluoreszenzproteine, das rote Fluoreszenzprotein mCherry (*RFP - Red Fluorescent Protein*) und das blaue Fluoreszenzprotein mTagBFP2 (*BFP - Blue Fluorescent Protein*) verwendet. Während das GFPmut2 für den Nachweis von DNA-Schäden beibehalten wurden, diente mCherry für den Nachweis der Proteinbiosynthesehemmer und mTagBFP2 zum Nachweis der AmpC-Induktion. Der selektive Nachweis der drei Stressantworten in einer einzelnen Messung setzte voraus, dass keine gegenseitige Beeinflussung der Fluoreszenzsignale durch die drei Fluoreszenzproteine in der Messung vorlag. Dies wurde durch die Wahl der Fluoreszenzproteine auf Grundlage ihrer Absorptions- und Emissionsspektren gewährleistet bzw. anhand von Fluoreszenzmessungen bestätigt. Die Reportersysteme wurden daher, bevor sie zu einem kombinierten System auf pHPKC3-14 vereint wurden, zunächst einzeln unter Substitution von GFPmut2 gegen mCherry bzw. mTagBFP2 untersucht. Anhand von mCherry- und mTagBFP2-basierten Kontrollplasmiden wurden das Emissionsverhalten der verwendeten Antibiotika bei den entsprechenden Wellenlängen sowie Überschneidungen der Fluoreszenzsignale ermittelt.

4.4.1 Konstruktion der auf mCherry und mTagBFP2 basierten Reporterplasmide

Analog dem GFPmut2-basiertem Reportersystem zum Nachweis von DNA-Schäden, wurden für die auf mCherry- und mTagBFP2-basierten Systeme ebenfalls jeweils ein Kontrollplasmid mit hoher Antibiotika-unabhängiger Fluoreszenzproteinexpression (pHPKC3-10 und pHPKC3-15), ein Kontrollplasmid ohne Fluoreszenzproteinexpression (pHPKC3-11 und pHPKC3-16) sowie ein Untersuchungsplasmid mit induzierbarem Promotor zum Nachweis der Stressreaktion konstruiert (pHPKC3-07 und pHPKC3-12) (Kapitel 3.3.1.1 und 3.3.2.1). Die Reporterplasmide pHPKC3-07 und pHPKC3-12 dienten hierbei als eine Vorstufe zur Untersuchung der Eignung der jeweiligen Fluoreszenzproteine bevor diese zu einem kombinierten System vereint wurden sowie als Konstruktions- und Lagerzwischenschritten für die kombinierte Plasmidkonstruktion pHPKC3-14.

Wie bereits bei pHPKC3-03 (*srp::gfpmut2*) nachgewiesen, zeigten auch die Transformanten mit pHPKC3-10 (*srp::mCherry*) eine bei Tageslicht erkennbare Färbung durch das Fluoreszenzprotein. Eine Färbung der Kolonien von Transformanten mit pHPKC3-15 lag nicht vor. Dies könnte unter anderem auf einen zu geringen Anteil, der für die Anregung der Fluoreszenz benötigten kurzwelligen Strahlung, im Tageslicht zurückzuführen sein. Der Nachweis der erfolgreichen Proteinexpression von mTagBFP2 über pHPKC3-15 wurde anhand von Fluoreszenzmessungen bestätigt. Auch die mit pHPKC3-07 (*pcpXP::mCherry*) transformierten Zellen zeigten eine leichte Rotfärbung im uninduzierten Zustand. Im Vergleich zu Transformanten mit dem Kontrollplasmid pHPKC3-10 fiel diese jedoch schwächer aus. Die rötliche Färbung der Transformanten bestätigt die bereits in Kapitel 4.3.2.1 beschriebene Expression von *cpxP* und bildete daher zwangsläufig das Hintergrundsignal für Transformanten des kombinierten Systems mit pHPKC3-14. Eine Störung durch die rötliche Hintergrundfluoreszenz, bezogen auf GFPmut2 und mTagBFP2, wurde anhand von Fluoreszenzmessungen mit den entsprechenden Kontrollplasmiden (Kapitel 3.3.1.2.3 und 4.4.2) überprüft und ausgeschlossen.

4.4.2 Fluoreszenzmessungen mit den auf mCherry und mTagBFP2 basierten Kontrollplasmiden

Mit den auf mCherry und mTagBFP2 basierten Kontrollplasmiden wurde, analog dem GFPmut2-basiertem Messsystem, die Eigenfluoreszenz der eingesetzten Antibiotika im blauen und roten Wellenlängenbereich sowie eine mögliche Störung der Fluoreszenzproteinbildung in Anwesenheit von Proteinbiosynthesehemmern bzw. dem Transkriptioninhibitor Rifampicin untersucht. Darüber hinaus wurde die Überlagerung von Fluoreszenzsignalen aufgrund ihrer spezifischen Absorptions- und Emissionswellenlängen überprüft.

Zum Ausschluss der Überlagerung von Fluoreszenzsignalen, insbesondere im Hinblick auf die rötliche Hintergrundfluoreszenz der später mit pHPKC3-14 transformierten Zellen, wurden Fluoreszenzmessungen mit allen Kontrollplasmiden (pHPKC3-03, pHPKC3-05, pHPKC3-10, pHPKC3-11, pHPKC3-15, pHPKC3-16) unter Verwendung der für GFPmut2, mCherry und mTagBFP2 benötigten Absorptions- und Emissionswellenlängen durchgeführt (Kapitel 3.3.1.2.3). Da kein Bezug zu einer uninduzierten Kontrolle gezogen werden

konnte und der Vergleich der Kontrollplasmide untereinander erfolgte, wurden die Fluoreszenzintensitäten in der Einheit RFU angegeben. Das Ergebnis der Messung zeigte sehr deutlich, dass die Fluoreszenzproteine nur bei ihren entsprechenden Wellenlängen spezifisch emittieren und keine störende Überlagerung der Fluoreszenzsignale vorlag. Des Weiteren stellte die rötliche Hintergrundfluoreszenz für Messungen im blauen und grünen Wellenlängenbereich keine Beeinträchtigung für das jeweilige Messergebnis dar und konnte somit vernachlässigt werden.

Zur Ermittlung der Eigenfluoreszenz der eingesetzten Antibiotika wurde *E. coli* R7 mit den Kontrollplasmiden pHPKC3-11 und pHPKC3-16 transformiert und die Fluoreszenzintensitäten vermessen. Weder bei Messungen im roten noch im blauen Wellenlängenbereich wurden signifikante Fluoreszenzerhöhungen durch die Eigenfluoreszenz der Antibiotika hervorgerufen. Zu berücksichtigen ist die hohe Bestimmungsgrenze der Messung mit pHPKC3-16, welche als Folge hoher absoluter Abweichungen der Fluoreszenzintensität der uninduzierten Kontrolle von Erst- und Wiederholungsmessung resultiert. Weitere Wiederholungen der uninduzierten Kontrolle zur Präzisierung der Bestimmungsgrenze wären daher zu empfehlen. Bei Betrachtung der prozentualen Abweichung, der mit Antibiotika behandelten Proben im Vergleich zur uninduzierten Kontrolle, sind die Abweichungen zwischen den Versuchen, wie an den niedrigen Standardabweichungen zu erkennen, jedoch nicht als hoch zu bewerten. Des Weiteren befinden sich die relativen Fluoreszenzintensitäten beider Messungen im Bereich von etwa 2.700 – 5.700 RFU (nicht dargestellt), wo hingegen der mit dem Kontrollplasmid pHPKC3-15 erreichte Wert im Bereich von über 130.000 RFU liegt. Die Eigenfluoreszenz der Antibiotika ist demnach auch unabhängig von der Bestimmungsgrenze als nicht relevant zu betrachten.

Aufgrund der bereits mit pHPKC3-08 nachgewiesenen Abnahme der Fluoreszenzintensität unter Einfluss von Proteinbiosynthesehemmern bzw. dem Transkriptioninhibitor Rifampicin (Kapitel 3.2.2.4.2), wurde diese zunächst auch für die analogen Messungen mit dem Reporterplasmid pHPKC3-07 angenommen. Der Ausschluss einer durch den Wirkmechanismus der Antibiotika induzierten Störung der Fluoreszenzproteinbildung von mCherry war daher erforderlich und wurde mithilfe des unter Kontrolle des *srf*-Promotors stehenden Kontrollplasmides pHPKC3-10 untersucht. Hierzu wurden die Versuchsbedingungen analog der Untersuchung mit pHPKC3-03 (Kapitel 3.2.2.4.3) durchgeführt. Wie auch bei den Untersuchungen mit pHPKC3-03 konnte für die Messzeitpunkte 1 h und 2 h nach Antibiotikaexposition keine signifikante Abnahme der Fluoreszenzintensität nachgewiesen werden. Die Proteinbiosynthesehemmer bzw. Rifampicin haben demnach für diese Messzeitpunkte keinen signifikanten Einfluss auf das Ergebnis der Fluoreszenzintensität.

Zusammenfassend bestätigen die Ergebnisse die entsprechenden Annahmen und unterstützen das weitere Vorgehen bezüglich der Etablierung des kombinierten Messsystems.

4.4.3 Fluoreszenzmessungen mit den auf mCherry und mTagBFP2 basierten Plasmiden pHPKC3-07 und pHPKC3-12

Nach Überprüfung einer korrekten Plasmidkonstruktion wurden die Reporterplasmide pHPKC3-07 (*pcpxP::mCherry*) und pHPKC3-12 (*ampR-pampC::mTagBFP2*) hinsichtlich ihrer Sensitivität gegenüber den induzierenden Antibiotika Erythromycin bzw. Cefoxitin untersucht.

4.4.3.1 Untersuchungen mit pHPKC3-07

Die Verwendung von mCherry als Reporterprotein für das Messsystem zum Nachweis von Zellhüllstress bzw. Proteinbiosynthesehemmern lieferte insbesondere im Hinblick auf die mit pHPKC3-08 und pHPKC3-03 erzielten Fluoreszenzdaten unerwartete Ergebnisse. In Abbildung 4.3 ist zur Übersicht eine Gegenüberstellung der relativen Fluoreszenzintensitäten, gemessen mit pHPKC3-08 und pHPKC3-07 sowie den entsprechenden Kontrollplasmiden pHPKC3-03 und pHPKC3-10 nach Zugabe von Erythromycin dargestellt. Zu berücksichtigen ist, dass sich zum Messzeitpunkt 3 h der Stamm bereits in der Absterbephase befand und daher nicht vorhersehbare und von dem Antibiotikum unbeeinflusste metabolische Effekte die relative Fluoreszenzintensität beeinflussen können. Aus diesem Grund wurden die 3 h-Werte in den vorherigen Versuchen nicht berücksichtigt und die Messung lediglich auf die exponentielle Phase mit 1 h und 2 h nach Antibiotikazugabe beschränkt.

Wie bereits in Kapitel 3.2.2.4.2 beschrieben, zeigten die Messungen mit pHPKC3-08 nach Zugabe von Proteinbiosynthesehemmern bzw. dem Transkriptionsinhibitor Rifampicin bereits nach 2 h eine signifikante Abnahme der relativen Fluoreszenzintensität. Für das Kontrollplasmid pHPKC3-03 konnte dies nicht nachgewiesen werden, sodass die Differenz in der Fluoreszenzintensität zunächst auf eine veränderte Expression von *cpxP* zurückgeführt wurde. Für die Messung mit pHPKC3-07 konnte entgegen den mit pHPKC3-08 erzielten Ergebnissen keine signifikante Abnahme nach 2 h nachgewiesen werden. Lediglich die Verlängerung des Messintervalls auf 3 h führte, unter Berücksichtigung der bereits eintretenden Absterbephase, zu einer Abnahme der relativen Fluoreszenzintensität. Diese war allerdings in vergleichbarem Ausmaß auch mit dem Kontrollplasmid pHPKC3-10 nachweisbar. Aufgrund der bei pHPKC3-10 vorliegenden, von Antibiotika unabhängigen, Expression von mCherry war die Abnahme ausschließlich aufgrund einer gestörten Fluoreszenzproteinbildung durch die Hemmung der Proteinbiosynthese bzw. der Transkription zu vermuten. Die Ergebnisse von pHPKC3-07 und pHPKC3-10 lassen daher auf eine von der *cpxP*-Expression unabhängige Fluoreszenzabnahme schließen. Anzumerken ist, dass die Erklärungen bezüglich der Ursache zur Widersprüchlichkeit dieser Ergebnisse rein spekulativ sind. Beim Vergleich der relativen Fluoreszenzwerte der uninduzierten Kontrollen bei den Messungen mit allen vier Plasmiden war auffällig, dass bei pHPKC3-03 im Gegensatz zu den Messungen mit den anderen Plasmiden, insbesondere im direkten Vergleich mit pHPKC3-

08, nur eine geringe Steigerung der relativen Fluoreszenzintensität über die Zeit zu beobachten war. Interessanterweise war das Wachstum von *E. coli* R7/pHPKC3-03 sowie die gemessene OD im Vergleich zu den Messungen mit den anderen Plasmiden nicht auffällig. Dies würde darauf hindeuten, dass innerhalb der Lag-Phase bzw. vielleicht auch innerhalb der ersten Stunde nach Antibiotikazugabe, das Fluoreszenzprotein GFPmut2 in *E. coli* R7/pHPKC3-03 eine Art intrazellulären Schwellenwert erreicht haben könnte. Eine durch Proteinbiosynthesehemmer oder Transkriptionsinhibitoren hervorgerufene Abnahme der Fluoreszenzintensität würde demnach nicht eintreten, da keine bzw. nur eine geringfügige GFPmut2-Expression zum Zeitpunkt der Proteinbiosynthesehemmung vorliegen würde. Für die Interpretation zur Abnahme bei pHPKC3-08 würde das allerdings bedeuten, dass diese neu überdacht werden müsste, da hierdurch eine durch die Proteinbiosynthesehemmer induzierte Fluoreszenzproteinbildungsstörung nicht mehr auszuschließen ist. Die im Hinblick auf mit mCherry erzeugten Ergebnisse würden die Hypothese einer *cpxP*-unabhängigen Fluoreszenzabnahme weiter unterstützen. Eine Voraussetzung für die Richtigkeit der Hypothese bilden unterschiedliche Maturationszeiten der Fluoreszenzproteine. Die Maturationszeit ist definiert als der Zeitabschnitt, den die translatierte nicht fluoreszierende Polypeptidkette benötigt um sich korrekt zu falten, das Chromophor auszubilden und das funktionsfähige fluoreszierende Protein zu bilden (abcam). Die Angabe der Maturationszeit erfolgt in der Regel als Halbwertszeit, entsprechend der Zeit, die benötigt wird um 50 % der vollen Fluoreszenzaktivität auszubilden. Nach Zugabe von Proteinbiosynthesehemmern wäre, wie bereits erwähnt, nach einem bestimmten Zeitintervall und bei ausreichend hoher Antibiotikakonzentration ebenfalls von einer Hemmung der Fluoreszenzproteinbildung auszugehen. Unter Annahme einer vollständigen Hemmung der Proteinbiosynthese basiert die anschließend gemessene Fluoreszenzintensität auf dem Anteil an bis dahin translatiertem, aber noch nicht maturiertem Fluoreszenzprotein. Das Verhältnis der Fluoreszenzintensität über die Zeit ist demnach abhängig davon wie hoch die Maturationszeit des jeweiligen Proteins ist sowie von der Menge an noch nicht maturiertem Fluoreszenzprotein. Die Angaben der Maturationszeiten von GFPmut2 und von mCherry sind jedoch innerhalb der Literaturangaben zum Teil sehr variabel. Während für GFPmut2 Werte zwischen 5 min und 25 min beschrieben sind, liegen die Werte für mCherry zwischen 15 min und 114 min (Cormack et al., 1996; Hebisch et al., 2013; Iizuka, Yamagishi-Shirasaki, & Funatsu, 2011; Shaner et al., 2004). Bezogen auf die Fluoreszenzintensität über die Zeit resultiert aus einer kurzen Maturationszeit nach Eintritt der Proteinbiosynthesehemmung ein kurzfristig weiter konstant steigender Kurvenverlauf mit plötzlich eintretender Stagnierung. Für ein Fluoreszenzprotein mit längerer Maturationszeit dagegen, wäre nach Antibiotikazugabe ein weniger steiler und dafür längerer Kurvenverlauf bis zur Stagnierung zu vermuten. Dies wird durch die Ergebnisse von Hebisch et al. bestätigt, die die Maturationszeiten von GFPmut3 und mCherry miteinander in *E. coli* verglichen haben (Hebisch et al., 2013). Bei Annahme einer kürzeren Maturationszeit für GFPmut2 wäre dies eine Erklärung, weshalb bei Vermessung mit pHPKC3-08 im Gegensatz zur Vermessung mit pHPKC3-07 früher ein Nachweis der Proteinbiosynthesehemmer detektiert werden kann. Die früher eintretende Stagnierung der Fluoreszenzproteinbildung bei gleichzeitig weiter ansteigender OD würde zu der Abnahme der relativen Fluoreszenzintensität

führen. Dies würde bedeuten, dass bei Messungen mit mCherry aufgrund der Proteinbiosynthesehemmung eine spätere Abnahme der relativen Fluoreszenzintensität eintreten würde als bei Messungen mit GFPmut2. Die Tatsache, dass unter Zugabe von Kanamycin als ebenfalls potenter Proteinbiosynthesehemmer nach 2 h bei Messungen mit pHPKC3-08 keine Abnahme vorlag, könnte auf den verzögerten Wirkungseintritt der Aminoglykoside zurückzuführen sein. Die nachträgliche Betrachtung der 3 h-Werte lieferte daher auch hier eine signifikante Abnahme bei einer Konzentration von 1 x MHK.

Für das Messsystem zum Nachweis von Störungen in der Zellhülle bedeutet dies, dass der Nachweis über eine veränderte *cpxP*-Expression als kritisch zu betrachten ist. Dennoch konnte unabhängig von der Ursache anhand der nachgewiesenen zeitabhängigen Fluoreszenzabnahme ein spezifischer Nachweis von Rifampicin bzw. Proteinbiosynthesehemmern erbracht werden. Eine Ausnahme hiervon bildet allerdings das Aminoglykosid Kanamycin. Das Reportersystem aus pHPKC3-07 wurde daher trotzdem für die Plasmidkonstruktion pHPKC3-14 herangezogen.

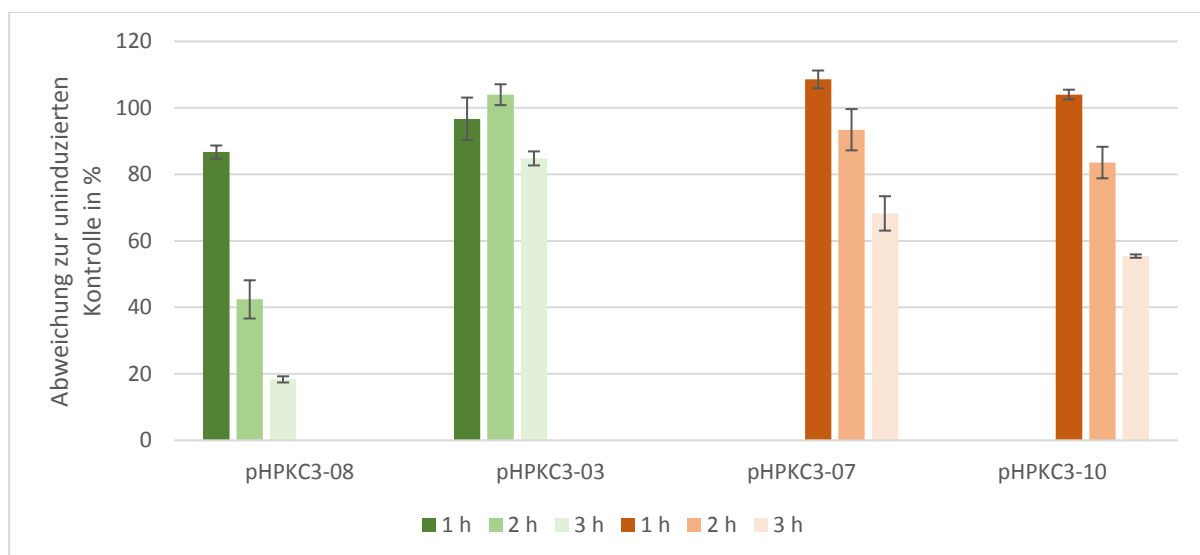


Abbildung 4.3: Gegenüberstellung der relativen Fluoreszenzintensitäten von *E. coli* R7 mit den Reporterplasmiden pHPKC3-08 (*pcpxP::gfpmut2*), pHPKC3-03 (*srp::gfpmut2*), pHPKC3-07 (*pcpxP::mCherry*) und pHPKC3-10 (*srp::mCherry*) nach Behandlung mit Erythromycin

4.4.3.2 Untersuchungen mit pHPKC3-12

Für die Ermittlung der Sensitivität wurde *E. coli* SN0302 mit pHPKC3-12 transformiert und sowohl hinsichtlich unterschiedlicher Konzentrationen an Cefoxitin als auch der Einfluss des Mediums auf das Hintergrundsignal untersucht (Kapitel 3.3.2.2.2). Der Vergleich des Hintergrundsignals in Bezug auf die Wahl des Mediums zeigte bei Verwendung des LB-Mediums eine im Vergleich zum M9-Medium signifikant erhöhte Hintergrundfluoreszenz für Messungen im blauen Wellenlängenbereich. Diese lag im Mittelwert für das LB-

Medium bei absoluten Fluoreszenzwerten von etwa 128.000, während für das M9-Medium Werte von unter 1.000 ermittelt wurden. Die hohe Eigenfluoreszenz des LB-Mediums führte dazu, dass in den Rohdaten nach Zugabe von Cefoxitin keine Steigerung des Fluoreszenzsignals über die Zeit zu beobachten war. Die Zunahme der relativen Fluoreszenzintensität beruhte hierbei ausschließlich auf der Abnahme der OD durch das Antibiotikum. Im Gegensatz hierzu waren die relativen Fluoreszenzintensitäten in M9-Medium unter Zugabe von Cefoxitin sowohl auf eine Zunahme der Rohdaten als auch auf die Abnahme der OD zurückzuführen. Als Untersuchungsmedium wurde daher für den Sensorstamm *E. coli* SN0302 M9-Medium gewählt. Dies machte die Supplementation mit Uracil erforderlich, was jedoch keine Auswirkungen auf die Fluoreszenzintensität ausübte.

Die Untersuchung der geringsten signifikant nachweisbaren Konzentration für Cefoxitin von *E. coli* SN0302/pHPKC3-12 lag bei 0,2 x MHK, entsprechend 0,4 µg/ml. Die höchste Sensitivität wurde zum Messzeitpunkt 3 h erzielt, wobei die Werte im Gegensatz zu den mit dem Sensorstamm *E. coli* R7 ermittelten Ergebnisse aufgrund des besseren Wachstums und der verlängerten exponentiellen Phase uneingeschränkt in die Auswertung einfließen konnten. Durch das verbesserte Wachstum resultierte im Gegensatz zu den Untersuchungen mit *E. coli* R7 eine Abnahme der Bestimmungsgrenzen von 1 h nach 3 h. Dies ist auf die OD-Werte größer 1 zurückzuführen, die zu einer Abnahme der relativen Fluoreszenzintensität und in Folge dessen zu einer Abnahme der Bestimmungsgrenzen über die Zeit führen. Da die relativen Fluoreszenzintensitäten der induzierten Proben auf die uninduzierte Kontrolle bezogen werden, ist für die prozentualen Angaben eine Zunahme zu beobachten.

4.4.4 Konstruktion des kombinierten Reporterplasmides pHPKC3-14

Während die Untersuchungsplasmide pHPKC3-07 und pHPKC3-12 nur als Vorstufen und Konstruktionszwischenstufen zu betrachten sind, bildete das Reporterplasmid pHPKC3-14 die eigentliche Basis des kombinierten Messsystems. Bei der Konstruktion von pHPKC3-14 musste aufgrund der vorliegenden Restriktionschnittstellen im Plasmidhintergrund und in den zu inserierenden Reportersystemen für die Konstruktionschritte eine festgelegte Reihenfolge eingehalten werden. Hierzu wurde zunächst die Zwischenstufe pHPKC3-09 konstruiert, die nach der Insertion des *ampR-pampC::mTagBFP2*-Fragmentes in pHPKC3-06 erhalten wurde. Obwohl für Untersuchungen von Störungen der Zellwandsynthese mit *E. coli* SN0302 nur das *ampR-pampC::mTagBFP2*-Reportersystem erforderlich ist und somit die Transformation mit pHPKC3-12 zum Nachweis ausreichend wäre, wurde unter Vorbehalt möglicher nachträglicher Veränderungen im Stammhintergrund von *E. coli* R7, zum Ausschluss eventueller gegenseitiger störender Faktoren der drei Reportersysteme sowie zur generellen Überprüfung der Funktionalität des kombinierten Messsystems das *ampR-pampC::mTagBFP2*-Reportersystem, wie zuvor geplant, für die Konstruktion von pHPKC3-14 verwendet. In einem zweiten Schritt wurde anschließend in pHPKC3-09 das *pcpxP::mCherry*-Fragment inseriert.

Die erhaltenen Transformanten zeigten, wie erwartet, eine leicht rötliche Färbung, die wie jedoch in Vorversuchen (Kapitel 3.3.1.2.3) gezeigt, zu keiner störenden Überlagerung der Fluoreszenzsignale führte. Die Bewertung und Grenzen des *pcpxP::mCherry*-Reportersystems wurden in Kapitel 4.4.3.1 ausführlich diskutiert. Aufgrund der reproduzierbaren Nachweisfähigkeit von Proteinbiosynthesehemmern wurde das *pcpxP::mCherry*-Reportersystem ebenfalls für die Konstruktion von pHPKC3-14 verwendet.

4.4.5 Anwendung des kombinierten Messsystems mit pHPKC3-14 im verblindeten Versuch

Nach Überprüfung einer erfolgreichen Plasmidkonstruktion wurden die Untersuchungstämmen *E. coli* SN0302 und *E. coli* R7 mit dem Reporterplasmid pHPKC3-14 transformiert und die Eignung des Messsystems in einem verblindeten Versuch in M9-Medium überprüft. Das Probenspektrum umfasste insgesamt 10 Kolben, wobei die Kolben 1 und 6 die uninduzierten Kontrollen von *E. coli* R7/pHPKC3-14 und *E. coli* SN0302/pHPKC3-14 darstellten. Der genaue Versuchsaufbau, die verwendeten Intervalle der Antibiotikakonzentrationen sowie die Kolbenzuordnung sind Kapitel 3.3.4 zu entnehmen.

Bei der Auswertung der Ergebnisse ist zu berücksichtigen, dass aufgrund der Zugabe möglicher Proteinbiosynthesehemmer jeweils auch für *E. coli* R7/pHPKC3-14 die 3 h-Werte angegeben sind. Diese sind nach wie vor kritisch zu betrachten und dienen in diesem Fall ausschließlich zum Nachweis der entsprechenden Proteinbiosyntheseinhibitoren bzw. zum Nachweis von Rifampicin über mCherry.

Die Untersuchung mit dem kombinierten Reporterplasmid pHPKC3-14 lieferte im Blindversuch einen spezifischen Nachweis eines β -Laktams (Ampicillin) über das *ampR-pampC::mTagBFP2*-Reportersystem in Kombination mit dem Sensorstamm *E. coli* SN0302, eines Fluorchinolons (Norfloxacin) über das *precA::gfpmut2*-Reportersystem in *E. coli* R7 sowie eines Proteinbiosynthesehemmers (Linezolid) über das *pcpxP::mCherry*-Reportersystem ebenfalls in *E. coli* R7. Der erfolgreiche Nachweis der unterschiedlichen Stressreaktionen über die entsprechenden Reportersysteme bestätigt demnach die Funktionalität und Spezifität des kombinierten Messsystems.

Der Nachweis einer von Teebaumöl induzierten Stressreaktion konnte nicht erbracht werden. Dies kann zum einen auf die sehr niedrige, am unteren Grenzbereich des Konzentrationsintervalls liegende Konzentration zurückzuführen sein, sodass mögliche Reaktionen eventuell zu schwach ausfielen. Wahrscheinlicher ist jedoch, dass der für Teebaumöl angenommene Wirkmechanismus, basierend auf einer Störung der Zellmembranintegrität mit einschließender Zelllyse sowie einer Störung der Zellatmung, nicht durch die hier nachgewiesenen Stressreaktionen angesprochen wird (Carson et al., 2006; Carson, Mee, & Riley, 2002). Entsprechend konnte über die verwendeten Reportersysteme auch kein Nachweis für Polymyxin erbracht werden, welches ebenfalls über eine Störung der Zellpermeabilität seine antibakterielle Wirkung vermittelt. Untersuchungen mit Teebaumöl in höheren Konzentrationen würden daher weitere Erkenntnisse liefern.

Unerwartet war die Diskrepanz der Ergebnisse beim Vergleich der relativen Fluoreszenzintensitäten von *E. coli* R7/pHPKC3-14 und *E. coli* SN0302/pHPKC3-14 für die Kolben 3 bzw. 8. Während für Kolben 3 (*E. coli* R7/pHPKC3-14) zum Messzeitpunkt 3 h eine Abnahme auf 35 – 50% bei allen drei Fluoreszenzproteinen nachzuweisen war, konnte für Kolben 8 (*E. coli* SN0302/pHPKC3-14) trotz vergleichbarer MHK keine Abnahme der relativen Fluoreszenzintensität beobachtet werden. Da der Stammhintergrund von *E. coli* SN0302 keine Mutationen aufweist, die zu einer veränderten *cpxP*-Expression führen, wäre zu vermuten, dass durch die in der $\Delta toI/C$ -Mutante generell erhöhte *cpxP*-Expression eine größere Differenz in der intrazellulären Konzentration des Fluoreszenzproteins zwischen der uninduzierten Kontrolle und der mit Antibiotika behandelten Probe nach Proteinbiosynthesehemmung oder zumindest zum Teil, eine doch von *cpxP* beeinflusste Fluoreszenzabnahme vorliegt. Dies ist jedoch eine spekulative Annahme.

Analog den Ergebnissen für Kolben 8 wurde auch für Kolben 10 (*E. coli* SN0302) trotz Zugabe von Norfloxacin, in einer Konzentration von annähernd 1 x MHK, keine Zunahme der Fluoreszenzintensität nachgewiesen. Dies muss auf die *recA*-Mutation im Stammhintergrund von *E. coli* SN0302 zurückzuführen sein. Obwohl der *recA*-Promotor unter Kontrolle von LexA steht, wird für die Aktivierung der SOS-Antwort bzw. der Autolyse von LexA das aktivierte Protein RecA benötigt. Dieses liegt in *E. coli* SN0302 nicht vor, sodass keine Autolyse von LexA und damit keine Transkription erfolgen kann. Die Ergebnisse eines Galaktosidase-Reporter-Assays mit einem *recA*-negativen und einem *recA*-positiven *E. coli*-Stamm unter Zugabe von unterschiedlichen Fluorchinolonen unterstützen diese Annahme (Phillips et al., 1987).

Zusammenfassend konnten in dem verblindeten Versuch alle Stressantworten über das kombinierte Messsystem *E. coli* R7/pHPKC3-14 bzw. *E. coli* SN0302 pHPKC3-14 erfolgreich nachgewiesen werden.

4.5 Fazit und Ausblick

Das Ziel dieser Promotionsarbeit, die Etablierung eines Messsystems, basierend auf Reportergentechnologie zum Nachweis antibakterieller Substanzen, ist, unter Berücksichtigung gewisser Einschränkungen, als erfüllt zu betrachten. Wie die Ergebnisse des verblindeten Versuchs gezeigt haben, waren alle Stressantworten mithilfe der Reportersysteme detektierbar und darüber eine Zuordnung der entsprechend zugefügten Antibiotika möglich. Der qualitative Nachweis wurde demnach erbracht. Kritisch zu betrachten ist die Empfindlichkeit des Messsystems, welche sich in Konzentrationen von 0,2 x MHK, entsprechend einem Bereich von etwa 6,4 µg/L für Norfloxacin bzw. 400 µg/L für Cefoxitin erstrecken. Obwohl die Verwendung einer $\Delta toI/C$ -Mutante zu einer signifikanten Erhöhung der Sensitivität führte, waren die mit dem biosensorischen Messsystem erzielten minimal nachweisbaren Antibiotikakonzentrationen für einen sensitiven Nachweis von Antibiotika in zum Beispiel Wasserproben jedoch deutlich zu hoch. Laut Angaben des Umweltbundesamtes von 2013 lagen die nachgewiesenen Antibiotikakonzentrationen für Amoxicillin als Vertreter der

β -Laktame in Oberflächengewässern bei 0,245 $\mu\text{g/L}$ bzw. im Grundwasser bei 0,1 $\mu\text{g/L}$ (Küster Anette, 2013). Die entsprechenden Angaben für Oberflächengewässer bezogen auf die Fluorchinolone Enrofloxacin und Ciprofloxacin lagen bei etwa 0,1 $\mu\text{g/L}$ (Küster Anette, 2013). Für einen signifikanten Antibiotikachweis, wäre daher eine vorherige Konzentrierung der im Wasser enthaltenen Substanzen notwendig. Des Weiteren wäre in einer Weiterführung der Arbeit die Etablierung einer Methode zum Nachweis von Antibiotika in Bodenproben sinnvoll, da diese ebenfalls gängige Untersuchungsproben darstellen.

Zur Reduzierung der Wachstumsschwierigkeiten wäre die Verwendung eines AcrAB-Knockouts als Sensorstamm in Betracht zu ziehen. Dieser weist ebenfalls eine erhöhte Empfindlichkeit durch den Funktionsverlust der Effluxpumpe AcrAB-TolC gegenüber Antibiotika auf, jedoch ohne den *tolC*-Phänotyp zu vermitteln (Ruiz & Levy, 2014). Allerdings wäre hierbei aufgrund der Beteiligung von TolC an diversen Effluxpumpkomplexen mit einer Reduzierung der Empfindlichkeit des Messsystems zu rechnen. Des Weiteren sind, aufgrund der *spy*-vermittelten Aktivierung des Cpx-TCS, Untersuchungen zur Anwendung des Reportersystems zum Nachweis von Proteinbiosyntheseinhibitoren in einem *tolC*-positiven Stammhintergrund interessant.

Eine deutliche Vereinfachung der Messbedingungen und Reduzierung des Arbeitsaufwandes mit dem kombinierten Messsystem wäre die Einführung einer zusätzlichen *ampD*-Deletion in *E. coli* R7. Diese würde die Notwendigkeit von *E. coli* SN0302 als parallelen Sensorstamm aufheben und zu einer Reduzierung des Probenumfangs führen. Aufgrund der bereits nicht optimalen Wachstumsbedingungen von *E. coli* R7 in M9-Medium und dem bei Deletion von *ampD* weiteren Eingriff in die Zellwandsynthese wären zunächst Untersuchungen bezüglich eines veränderten Wachstumsverhaltens und der Sensitivität gegenüber Antibiotika durchzuführen.

Untersuchungen zum Wachstumsverhalten der ΔtolC -Mutante in mit Fe^{2+} supplementiertem M9-Medium stellen einen weiteren Ansatz zur Optimierung des Messsystems dar. Hierzu beschreiben Vega et al. die Wiederherstellung des Wildtyps einer ΔtolC -Mutante bezüglich des Wachstumsverhaltens und der Morphologie nach Eisensupplementation (Vega & Young, 2014). Dies würde aufgrund des verlängerten Zeitfensters der exponentiellen Phase und der hieraus resultierenden längeren Inkubationszeit unter Antibiotikaeinfluss zu einer Erhöhung der Sensitivität und Spezifität beitragen.

Die Wahl der Fluoreszenzproteine war, wie die Vorversuche und der verblindete Versuch zeigten, für das kombinierte Messsystem geeignet. Es lagen keine relevanten Überlagerungen von Fluoreszenzsignalen vor, sodass der parallele Nachweis unterschiedlicher Stressreaktionen über das Reporterplasmid pHPKC3-14 erfolgreich war. Für das Reportersystem zum Nachweis von Zellhüllstress wäre die Wahl eines besser geeigneten Promotors zu empfehlen. Wie bereits in Kapitel 4.4.3.1 ausführlich diskutiert, ist die Spezifität des Reportersystems trotz des erfolgreichen Nachweises von Proteinbiosynthesehemmern in Frage zu stellen und bedarf weiterer Untersuchungen.

Das kombinierte biosensorische Messsystem stellt trotz der empfohlenen Optimierungsansätze ein erfolgreiches Nachweissystem für Antibiotika dar, deren Wirkmechanismus auf DNA-Schäden, der Hemmung der Proteinbiosynthese und der Induktion der AmpC- β -Laktamase beruht.

5 Zusammenfassung

Antibiotika stellen heutzutage eine der am meisten eingesetzten Arzneimittelgruppen sowohl in der Human- als auch Veterinärmedizin dar und nehmen einen unverzichtbaren Stellenwert im Kampf gegen Infektionskrankheiten ein. Obwohl seit ihrer Entdeckung zahlreiche Menschenleben gerettet werden konnten, führt ihr mittlerweile vermehrter unnötiger und unsachgemäßer Verbrauch zur verstärkten Resistenzbildung, insbesondere im Hinblick auf multiresistente Keime. Die Weiterentwicklung bereits bestehender Antibiotika sowie die Entdeckung neuer antibakterieller Substanzen sind demnach von zentraler Bedeutung und bedürfen weiterer Aufmerksamkeit.

Das Ziel dieser Arbeit bestand in der Etablierung eines biosensorischen Nachweissystems für antibakterielle Substanzen basierend auf gezielter Mutagenese und Fluoreszenz-basierter Reportergentechnologie. Das Messsystem sollte zum einen als Detektionsmedium antibakterieller Kontaminationen in Umweltproben dienen als auch zur Entdeckung noch unbekannter Substanzen oder Naturstoffe mit antibakterieller Wirkung beitragen.

Die Basis des Messsystems bildete ein hypersensitiver Sensorstamm von *E. coli*, welcher mit Reporterplasmiden transformiert wurde und über die Änderungen der Fluoreszenzintensität einer uninduzierten Probe in Bezug zu mit Antibiotika behandelten Proben die Anwesenheit antibakteriell wirkender Substanzen nachweisen sollte. Als Sensorstamm für das Messsystem wurde *E. coli* C600 gewählt, ein *E. coli*-Stamm der genotypisch keine Antibiotikaresistenzen aufwies und somit das Untersuchungsspektrum nicht einschränkte. Des Weiteren besitzt *E. coli* C600 für das Messsystem essentielle Nährstoffauxotrophien, über die der Erhalt des Reporterplasmides in dem Untersuchungsmedium M9 während Anzucht und Fluoreszenzmessung gewährleistet wurde. Die erhöhte Sensitivität des Sensorstammes wurde durch die Deletion von TolC, einem zentralen äußeren Membranprotein in *E. coli*, erzielt. Hierdurch resultierten ein verminderter Efflux toxischer Substanzen unter anderem auch von Antibiotika und deren verstärkte intrazelluläre Akkumulation. Aufgrund von Wachstumsdefiziten der $\Delta tolC$ -Mutante *E. coli* R7 in M9-Medium erfolgte mittels Aminosäuresubstitutionen und Verwendung unterschiedlicher Supplementkonzentrationen eine Optimierung der Mediumzusammensetzung. Diese führte zu einem verbesserten Wachstum der Mutante, welches jedoch nicht die ursprüngliche Wachstumsgeschwindigkeit und die maximale Keimzahl des Ausgangsstammes *E. coli* C600 erreichte.

Das Reportersystem bestand aus einem Fusionsprodukt eines durch Antibiotika induzierbaren Promotors und dem Strukturgen von GFPmut2, einer GFP-Variante mit verstärkter Fluoreszenzintensität. Der Ausgangspunkt für die Wahl des Promotors der Reporterkonstruktion basierte auf der von Kohanski et al. 2007 veröffentlichten Publikation, in der erstmalig die Hypothese eines gemeinsamen, von der primären Zielstruktur unabhängigen Wirkmechanismus bakterizider Antibiotika aufgestellt wurde (Kohanski et al., 2007). Die Ursache der letalen Wirkung beschrieben Kohanski et al. in einer metabolischen Kaskade, welche als Endpunkt die vermehrte Bildung von Reaktiven Sauerstoffspezies, insbesondere Hydroxylradikalen, aufweist. Mittels qRT-PCR wurde der Sensorstamm *E. coli* R7 auf eine veränderte Genexpression von Proteinen innerhalb dieser Kaskade sowie aus relevanten Schutz- und Reparatursystemen nach Behandlung mit bakterizid wirkenden Antibiotika untersucht und der Promotor der Succinat-Dehydrogenase aus Atmungskette und Citratzyklus als potentieller Promotor für die Reporterkonstruktion verwendet. Fluoreszenzmessungen mit dem Reportersystem zeigten jedoch keine spezifische Zunahme der Fluoreszenzintensität unter Zugabe von bakteriziden Antibiotika. Die vermehrte Kritik und die aufkommenden Diskussionen bezüglich der von Kohanski et al. verfassten Hypothese sowie die Ergebnisse der Fluoreszenzmessungen führten dazu, dass der zuvor verfolgte Ansatz der Hypothese des gemeinsamen Wirkmechanismus verworfen und eine neue Vorgehensweise zur Beantwortung der Dissertationsfrage gewählt wurde. Anstelle eines einzelnen Reportersystems zum Nachweis ausschließlich bakterizider Antibiotika, wurden daher drei Reportersysteme bzw. –plasmide konstruiert, die auf Antibiotika induzierte Stressreaktion in der Zelle ansprechen:

1. das Reporterplasmid pHPKC3-06, basierend auf dem Fusionsprodukt des *recA*-Promotors und *gfpmut2* zum Nachweis von DNA-Schäden über die Aktivierung der SOS-Antwort,
2. das Reporterplasmid pHPKC3-08, basierend auf dem Fusionsprodukt des *cpxP*-Promotors und *gfpmut2* zum Nachweis von Zellhüllstress über das Cpx-Zwei-Kompartiment-System und
3. das Reporterplasmid pHPKC3-13, basierend auf dem Fusionsprodukt aus dem Strukturgen *ampR* und dem Promotor von *ampC* aus *C.freundii* fusioniert mit *gfpmut2* zum Nachweis von AmpC-induzierenden Störungen der Zellwandsynthese.

Der Sensorstamm *E. coli* R7 wurde mit den Reporterplasmiden pHPKC3-06, pHPKC3-08 und pHPKC3-13 transformiert und nach Behandlung mit Antibiotika die Fluoreszenzintensität gemessen. Während die Fluoreszenzmessungen mit pHPKC3-06 einen spezifischen und sensitiven Nachweis für die entsprechenden Antibiotikaklassen lieferten, zeigten die Ergebnisse der Fluoreszenzmessung für das Messsystem zum Nachweis von Störungen der Zellwandsynthese die Notwendigkeit eines *ampD*-negativen Stammhintergrunds. Dem entsprechend wurde für dieses Reportersystem der Sensorstamm *E. coli* R7 gegen den *ampD*-negativen Stamm *E. coli* SN0302 substituiert. Das Reporterplasmid pHPKC3-08 lieferte entgegen den Erwartungen keinen selektiven Nachweis von Zellhüllstress. Das Reportersystem konnte jedoch aufgrund hoher Reproduzierbarkeit der Fluoreszenzdaten zum Nachweis Proteinbiosynthesehemmer sowie dem Transkription-inhibitor Rifampicin herangezogen werden.

In einer Erweiterung der Arbeit und zur Reduzierung des Arbeits- und Versuchsaufwandes wurden die drei Messsysteme zu einem gemeinsamen kombinierten Messsystem auf dem Plasmid pHPKC3-14 vereint. Zur selektiven Differenzierung der einzelnen Stressantworten nebeneinander wurde bei dem Reportersystem zum Nachweis von Zellhüllstress das Fluoreszenzprotein GFPmut2 gegen das rote Fluoreszenzprotein mCherry sowie beim Reportersystem zum Nachweis von Störungen der Zellwandsynthese gegen das blaue Fluoreszenzprotein mTagBFP2 substituiert. Für das Messsystem zum Nachweis von DNA-Schäden wurde GFPmut2 als Fluoreszenzprotein beibehalten.

In einem abschließenden verblindeten Versuch wurde mit dem kombinierten Messsystem erfolgreich der Nachweis eines β -Laktamantibiotikums, eines Proteinbiosynthesehemmers sowie eines Fluorchinolons in unbekannten Proben nachgewiesen.

Die Etablierung des biosensorischen Messsystems zum Nachweis antibakterieller Substanzen ist demnach, unter Vorbehalt weiterer Optimierungen, als erfolgreich zu betrachten.

6 Summary

Nowadays antibiotics are one of the most used drugs in the human and veterinary medicine and represent an essential value in the battle against infectious diseases. Since the discovery of antibiotics they have saved numerousness of human lives but the increasingly unnecessary and inappropriate usage has led to an enhancement in bacterial resistance, particularly of multiresistant pathogens. Therefore, the further development of present antibiotics and the discovery of new antibiotic substances have become more important.

The aim of this approach was the establishment of a biosensoric detection system for antibiotic traces based on fluorescence reporter gene technology and selective mutagenesis. The purpose of the measurement system was to detect antibiotic contaminations within environmental samples as well as to contribute to the development of new substances with an antibiotic effect.

The basis of the detection system was constituted by a hypersensitive sensor strain of *E. coli* which was transformed with different reporter plasmids. The principle of detection depended on changes within the fluorescence intensity of induced samples compared to non-induced samples. The chosen strain was *E. coli* C600, an *E. coli* strain without an antibiotic resistance marker in its genotypic background entailing that any restrictions within the spectrum of investigations had thereby been prevented from the beginning. In addition, *E. coli* C600 exhibits nutrient auxotrophies to sustain the reporter plasmid in the cell while culturing and measuring the strain in the M9 medium. The hypersensitivity of the strain was achieved by the deletion of TolC, a central outer membrane protein in *E. coli*, while reducing the bacterial efflux of toxic substances and increasing their concentrations by intracellular accumulation. Due to the $\Delta tolC$ mutant *E. coli* R7 growing deficiency in the M9 medium an improvement of the medium supplementation based on different amino acid substitutions and concentrations was accomplished. Despite the growing enhancement of *E. coli* R7 there still remained deficits compared to the growing of the parent strain, particularly related to the growth rate and the maximal germ number.

The reporter system depended on a fusion product of an antibiotic inducible promoter and the structure gene of GFPmut2, a GFP variant with enhanced fluorescence intensity. The initial point for the selection of the promoter in the reporter construction was the publication of Kohanski et al. in 2007, which for the first time proposed the hypothesis of a common mode of action of bactericidal antibiotics irrespective of their primary target (Kohanski et al., 2007). According to Kohanski et al. the real cause of the lethal impact is attributed to a metabolic cascade which leads to an endpoint with an increased formation of reactive oxygen species, particularly of hydroxyl radicals. Via qRT-PCR the altered gene expression of proteins being a part of the cascade and of relevant protection and reparation systems was examined following to antibiotic treatment.

Hence, the promoter of the succinate dehydrogenase, an enzyme of the electron transport chain and the citrate cycle, was determined as a potential promoter for the reporter construction. However, the construction of the reporter plasmid did not present any specific increment of fluorescence after having been treated with bactericidal antibiotics. Augmented discussions with regard to Kohanski's hypothesis as well as the results of the fluorescence measurements led to a change during the procedure of the graduation work. Instead of one single reporter system exclusively detecting bactericidal antibiotics, three independently targeted reporter plasmids were constructed in order to detect different antibiotic induced stress responses:

1. the reporter plasmid pHPKC3-06, based on the fusion product of the *recA* promoter and the structural gene of GFPmut2 for the detection of DNA damages via the SOS response,
2. the reporter plasmid pHPKC3-08, based on the fusion product of the *cpxP* promoter and the structural gene of GFPmut2 for the detection of envelope stress via the Cpx two-component system and
3. the reporter plasmid pHPKC3-13, based on the fusion product of the *ampR* gene and the *ampC* promoter and the structural gene of GFPmut2 for the detection of AmpC induced perturbations of the cell wall synthesis.

The sensor strain *E. coli* R7 was transformed with the reporter plasmids pHPKC3-06, pHPKC3-08 and pHPKC3-13 and after antibiotic treatment the fluorescence intensity was determined, compared to a non-induced sample. While the fluorescence measurements with pHPKC3-06 provided the successful detection of the corresponding antibiotic classes, the functionality of the reporter system to detect perturbations in the cell wall synthesis was dependent on an *ampD*-negative strain background. Therefore, the sensor strain *E. coli* R7 for this reporter system was replaced with the *ampD*-negative *E. coli* SN0302. Against expectations the reporter plasmid pHPKC3-08 didn't provide evidence of a selective detection of envelope stress. But due to the high reproducibility of fluorescence results the reporter system was used for detection of protein biosynthetic inhibitors and the transcription inhibitor rifampicin.

In an expansion of the graduation work and in order to reduce the required work and experimental procedure the three reporter systems were unified into a single measurement system, represented as the plasmid pHPKC3-14. With regards to the selective differentiation of the respective stress responses into a single measurement, the green fluorescent protein GFPmut2 of the reporter system for the detection of envelope stress was replaced with the red fluorescent protein mCherry. Respectively, GFPmut2 of the reporter system for detection of perturbations in the cell wall synthesis was replaced with the blue fluorescent protein mTagBFP2 in the same way. Lastly, the third reporter system GFPmut2 for detecting DNA damages was maintained.

In a concluding and blind examination the unified measurement system demonstrated the successful detection of a β -lactam, a protein synthesis inhibitor and a fluoroquinolone in unknown samples.

According to the results of the blind examination and under reserve of further improvement the establishment of a qualitative biosensoric system detecting antibiotic substances is assessed to be successful.

7 Danksagung

Für die Unterstützung bei der Anfertigung dieser Dissertation möchte ich mich ganz herzlich bei meiner Familie, meinen Freunden, dem gesamten Arbeitskreis und Boris Schoppe bedanken.

Insbesondere möchte ich mich bei Herrn Prof. Heisig bedanken, der mir die Möglichkeit bot diese Arbeit in seinem Arbeitskreis anfertigen zu können und mir immer mit fachlicher und konstruktiver Unterstützung zur Seite stand.

Des Weiteren möchte ich Herrn Prof. Dr. B. Bisping für die Übernahme des Zweitgutachtens sowie neben Herrn Prof. Heisig meinen Prüfern der Disputation Frau Prof. Dr. Z. Ignatova und Frau Dr. A. Paschke-Kratzin vielmals danken.

Bei Frau Dr. Heisig möchte ich mich für ihre engagierte Unterstützung und Hilfestellung in fachlichen Fragen bedanken. Ihre Meinung war für mich stets von großem Wert. Des Weiteren danke ich ihr herzlich für die Bereitstellung des *recA-gfpmut2-SOE*ing-Fragmentes sowie für ihre Hilfe bei der Sequenzierung.

Ferner möchte ich mich bei Antje Schnasse, Gudrun Melles und Tatjana Claussen für deren Unterstützung bei methodischen Durchführungen und Hilfe bei der Praktikumsbetreuung bedanken.

Sabine Badziong danke ich für die Übernahme verwaltungstechnischer und organisatorischer Angelegenheiten.

Meinen Freundinnen Susanne König und Dr. Annekathrin Hilken möchte ich herzlichst für die Übernahme des Lektorats dieser Arbeit danken.

Generell bedanke ich mich beim gesamten Arbeitskreis für die freundliche und kollegiale Zusammenarbeit sowie für die konstruktiven Diskussionen, die zum Erfolg dieser Arbeit beigetragen haben.

Ganz besonders möchte ich mich bei meinen Eltern und meiner Großmutter bedanken, die mich jederzeit unterstützt und auch in schwierigen Zeiten der Promotionsarbeit motiviert haben.

Den größten Dank möchte ich Boris Schoppe aussprechen. Es gibt keinen Menschen, der mich so gut kennt und der so viel für mich getan hat. Er hat mich jederzeit unterstützt und mich auch in Zeiten, in denen ich selbst keinen Ausweg mehr sah, immer wieder aufgefangen. Ohne sein Zutun wäre ich heute nicht an dem Punkt an dem ich jetzt bin.

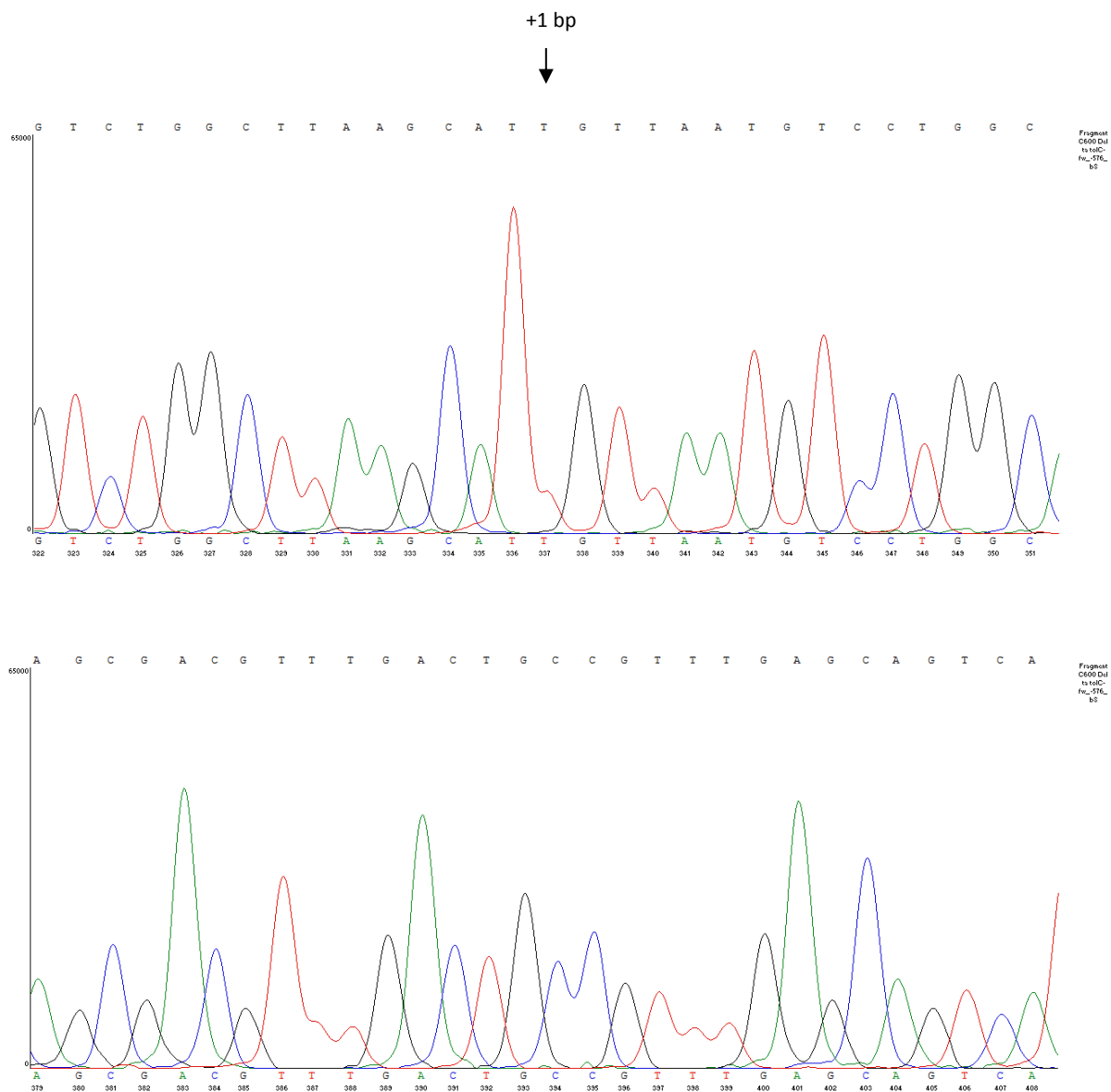
8 Anhang

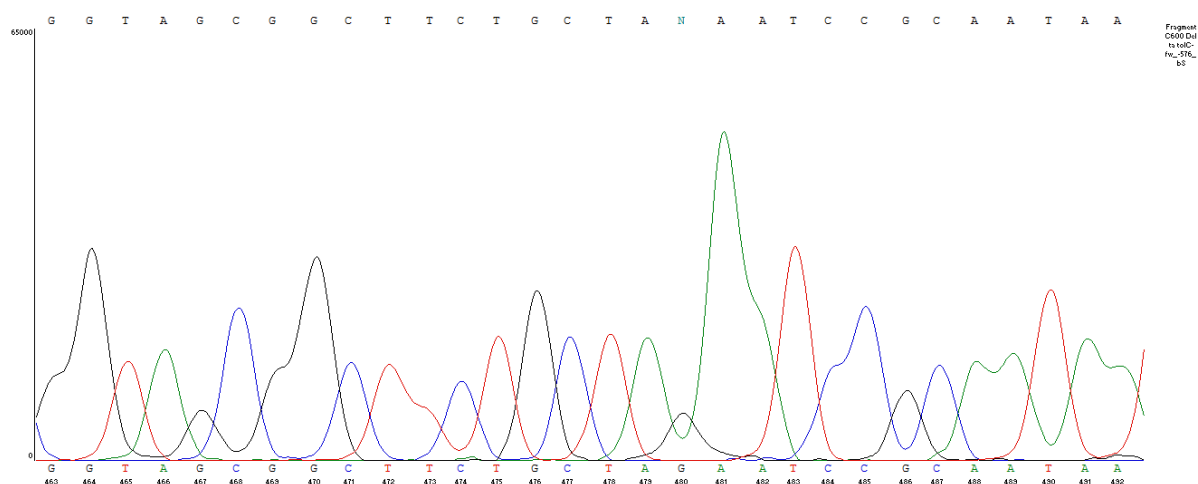
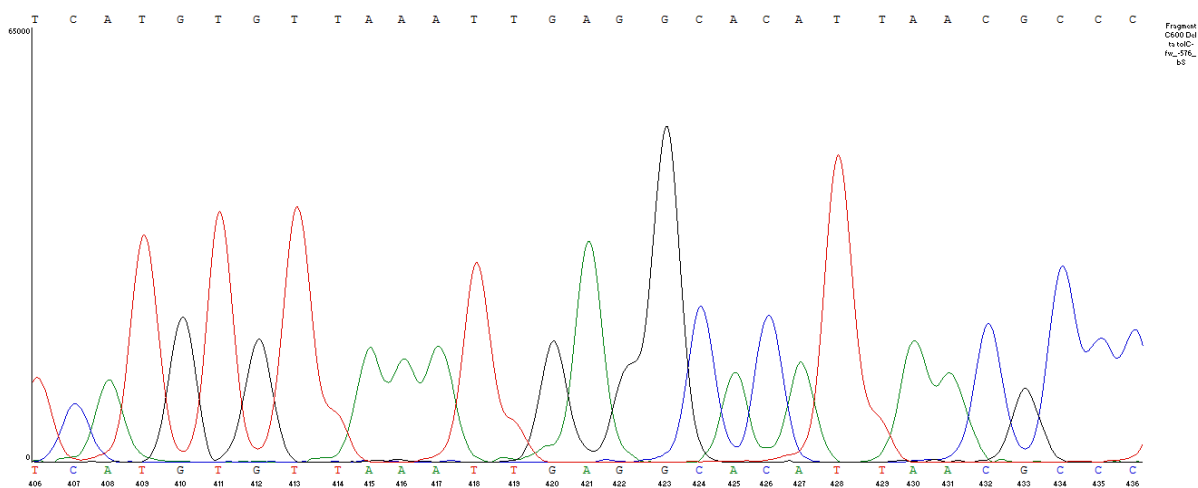
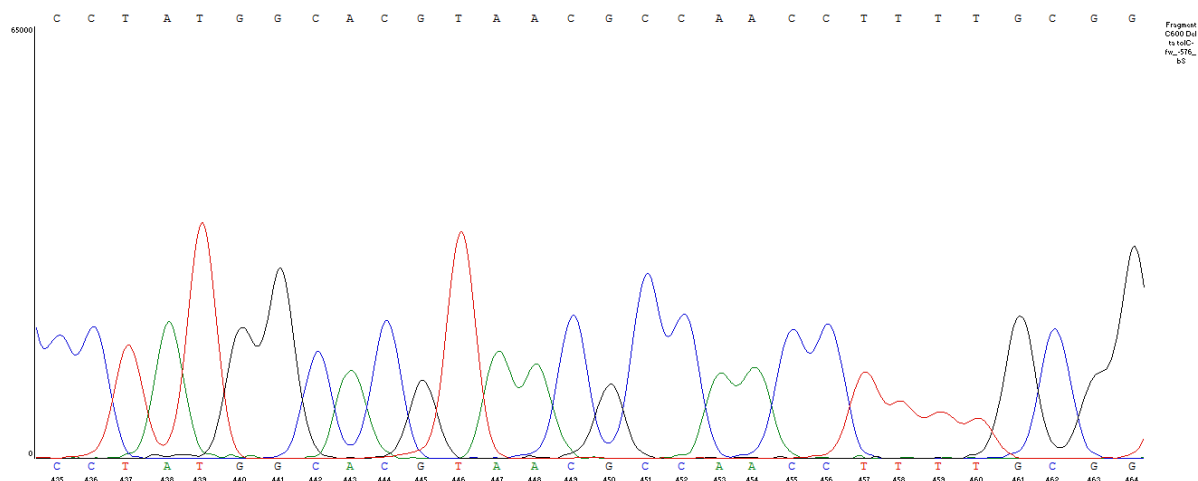
8.1 Elektropherogramme der Originalsequenzen zum Nachweis der *tolC*-Deletion in *E. coli* R7

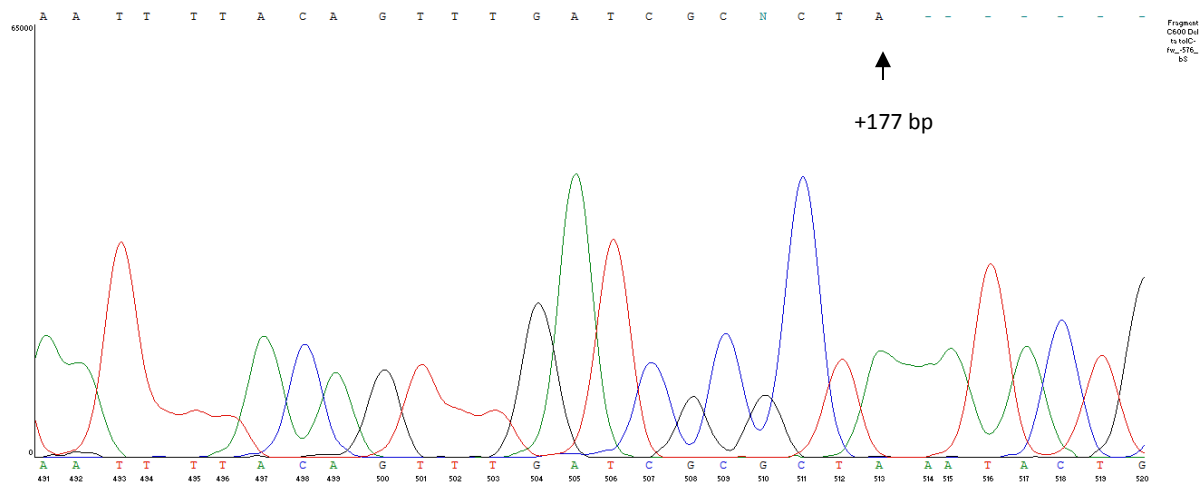
8.1.1 Sequenzierung des intergenetischen Bereichs von *nudF* und *ygiB* in *E. coli* R7

Bezeichnung im Alignment: C600 Delta *tolC*-fw_-567_bs

Sequenzabschnitt des intergenetischen Bereiches von *nudF* und *ygiB*: +1 bp bis +177 bp

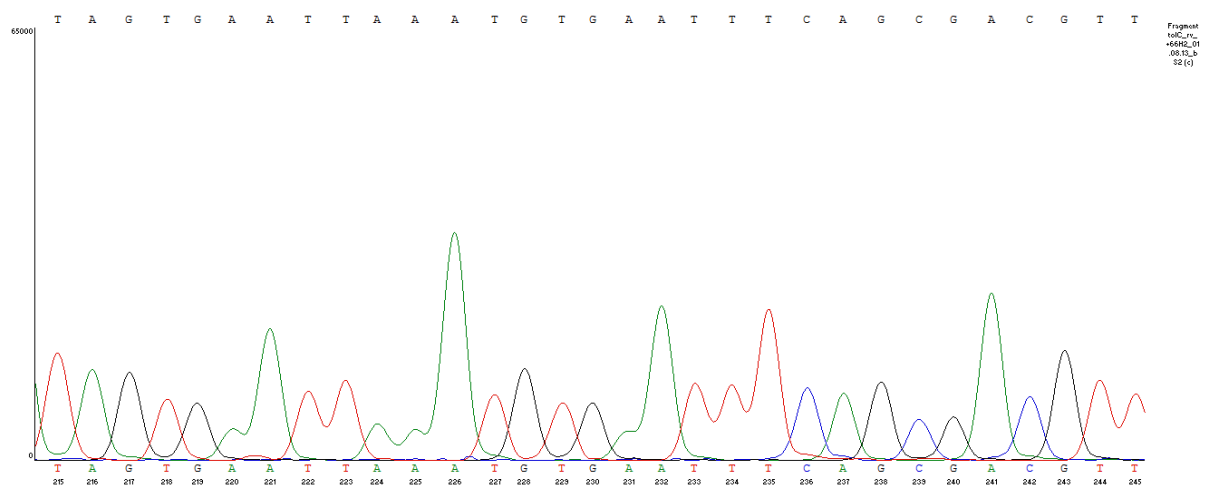
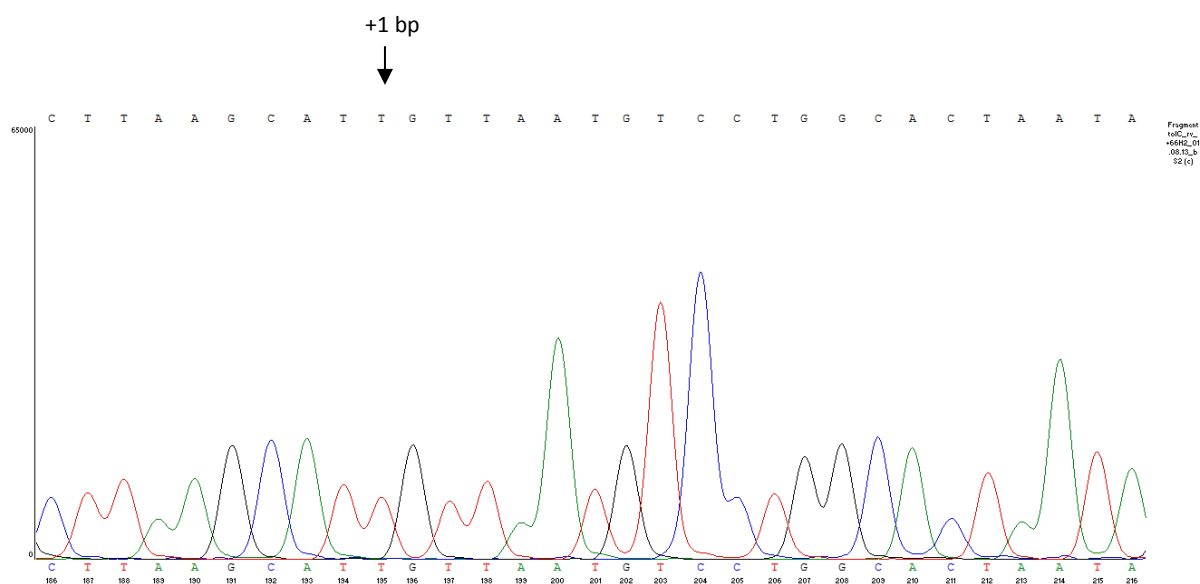


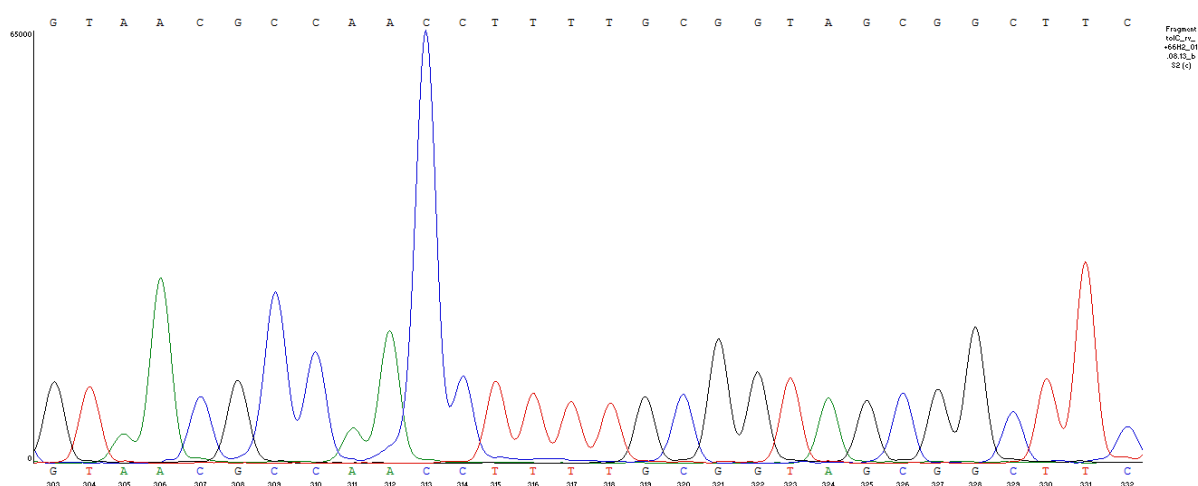
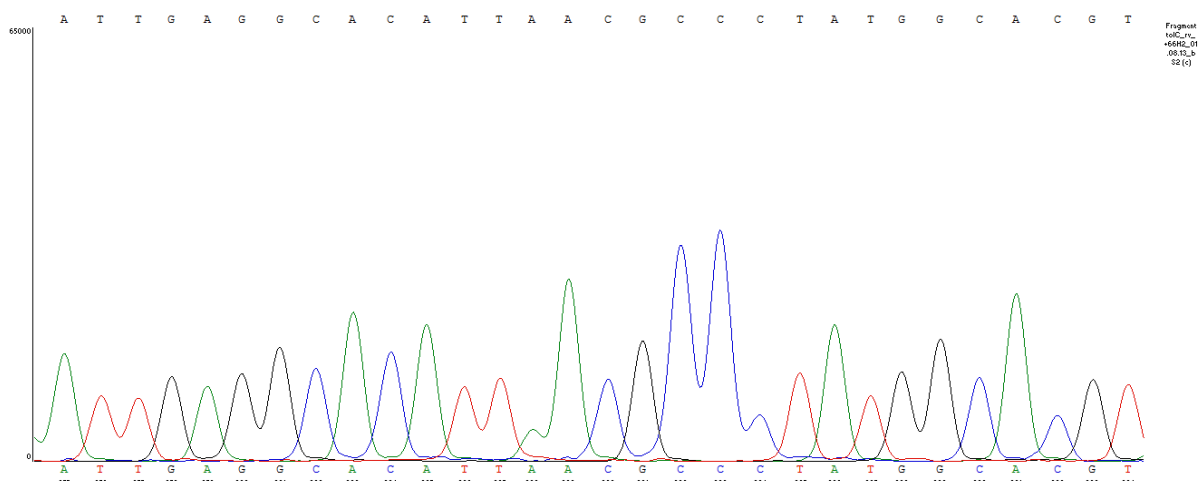
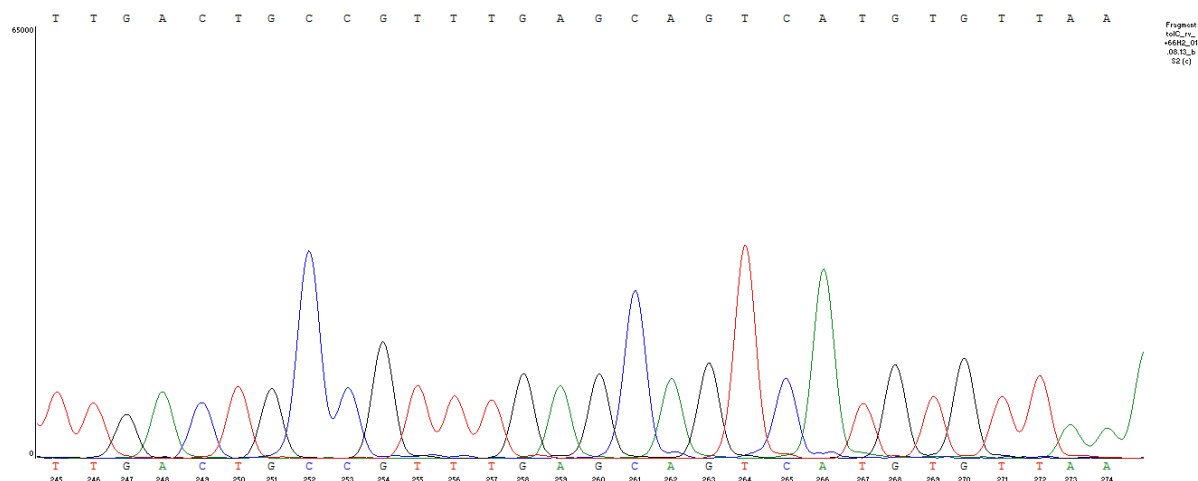


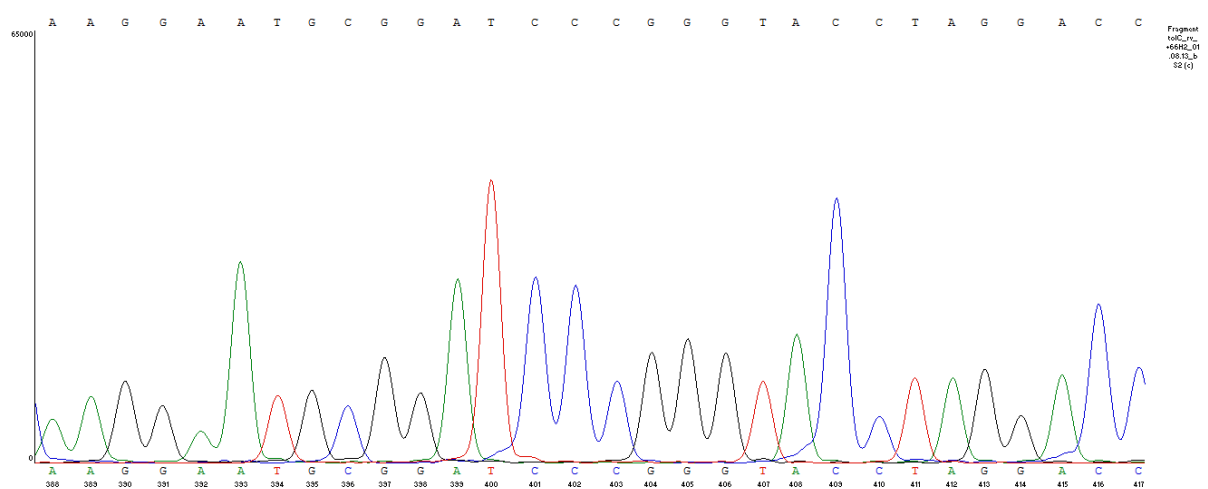
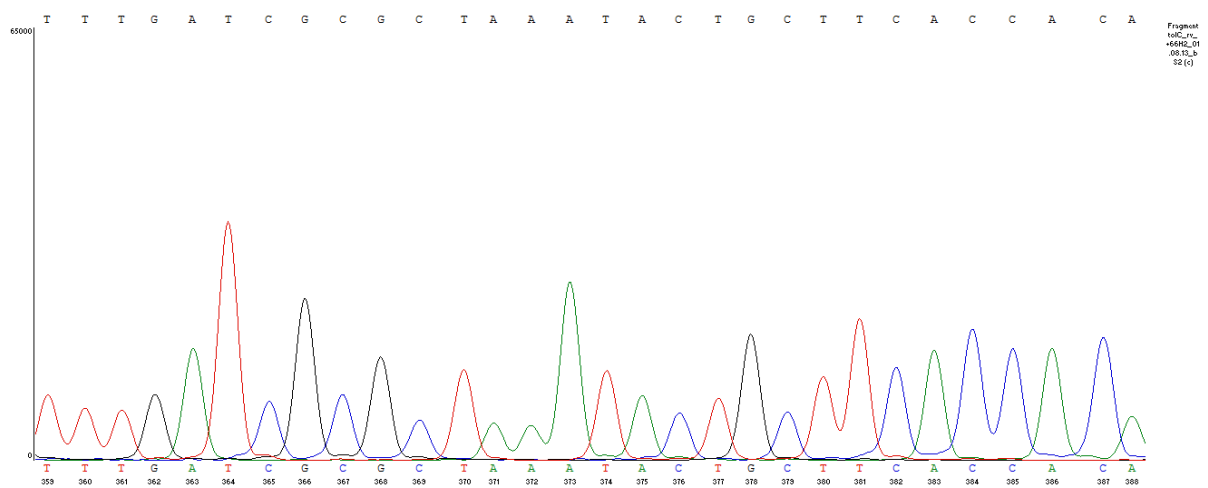
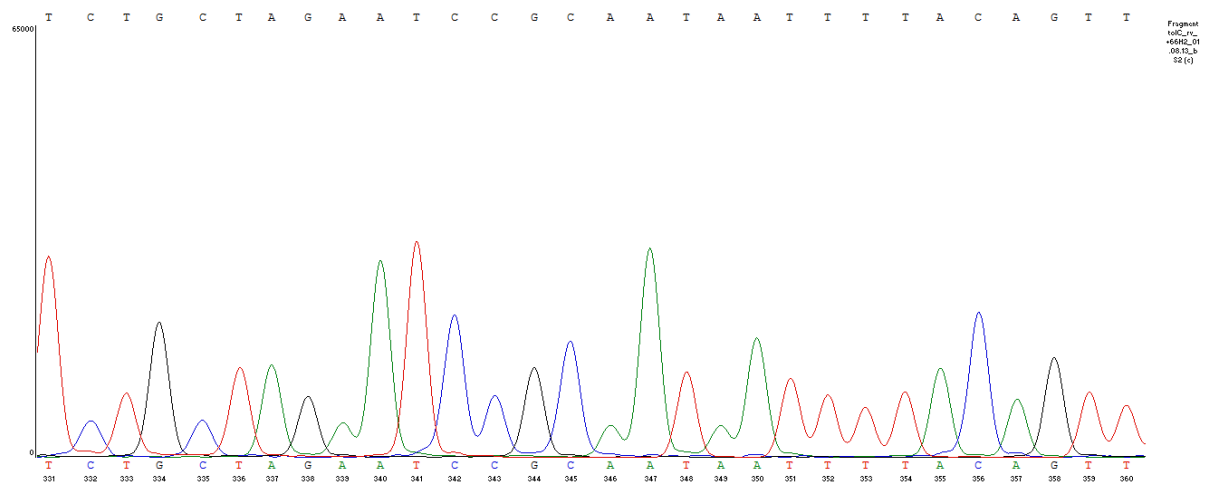


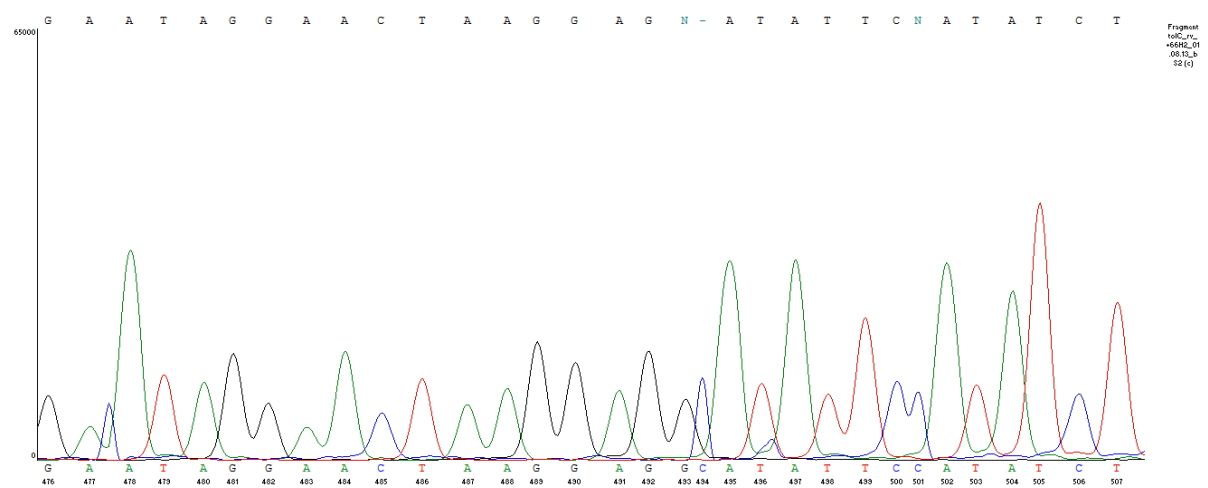
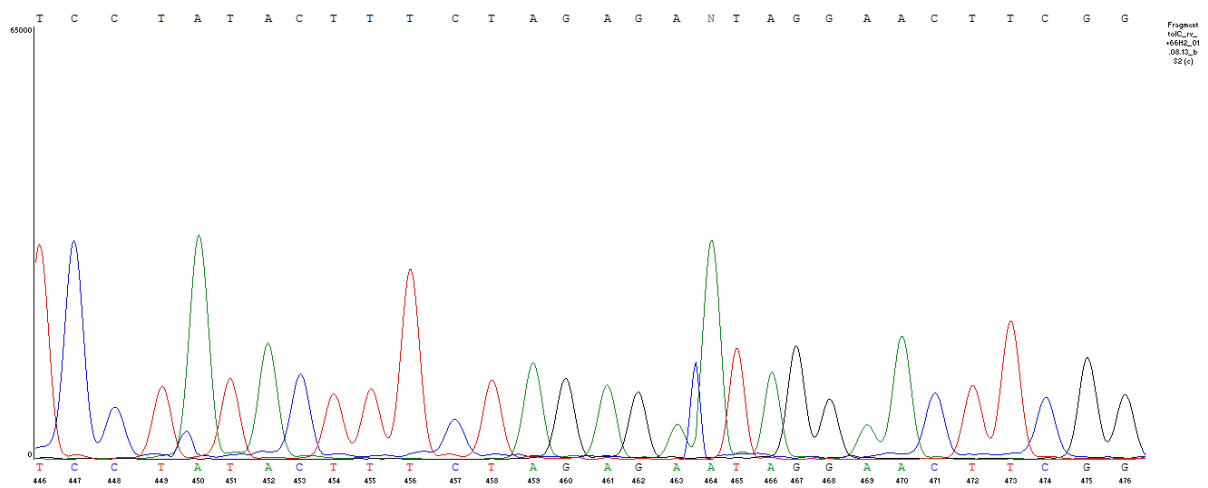
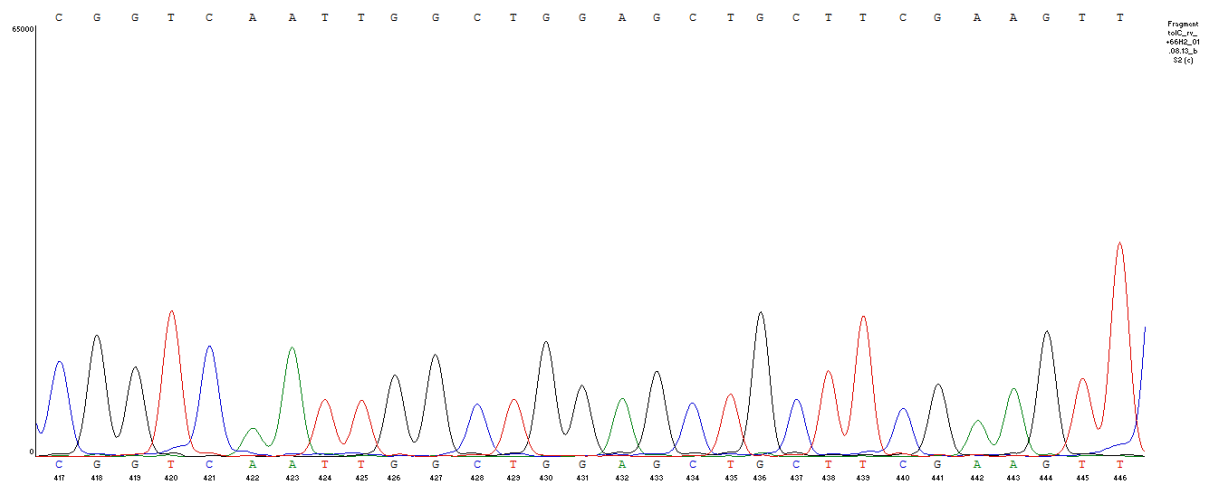
Bezeichnung im Alignment: tolC_rv_+66H2_01.08.13_bS2 (c)

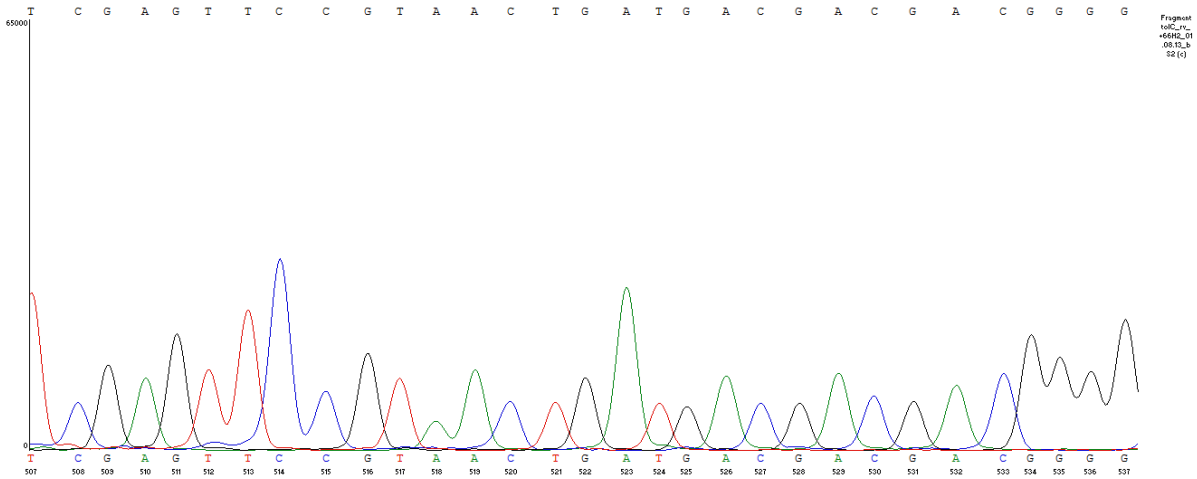
Sequenzabschnitt des intergenetischen Bereiches von *nudF* und *ygiB*: +1 bp bis +354 bp



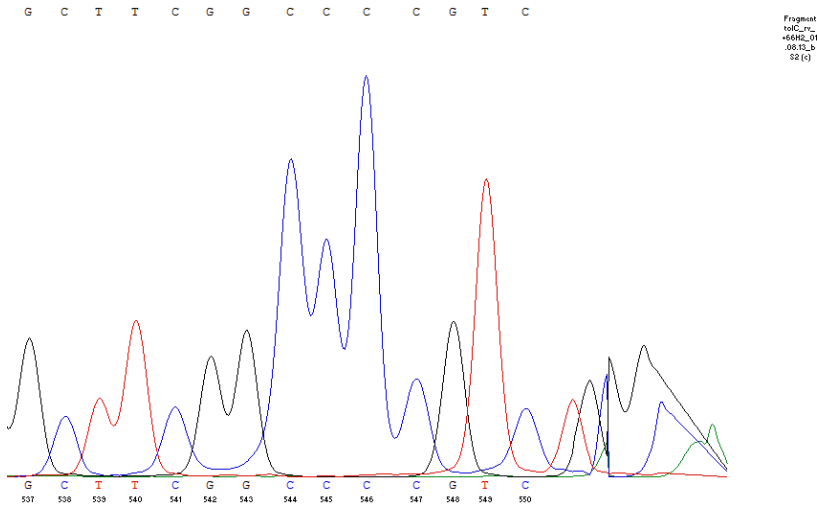






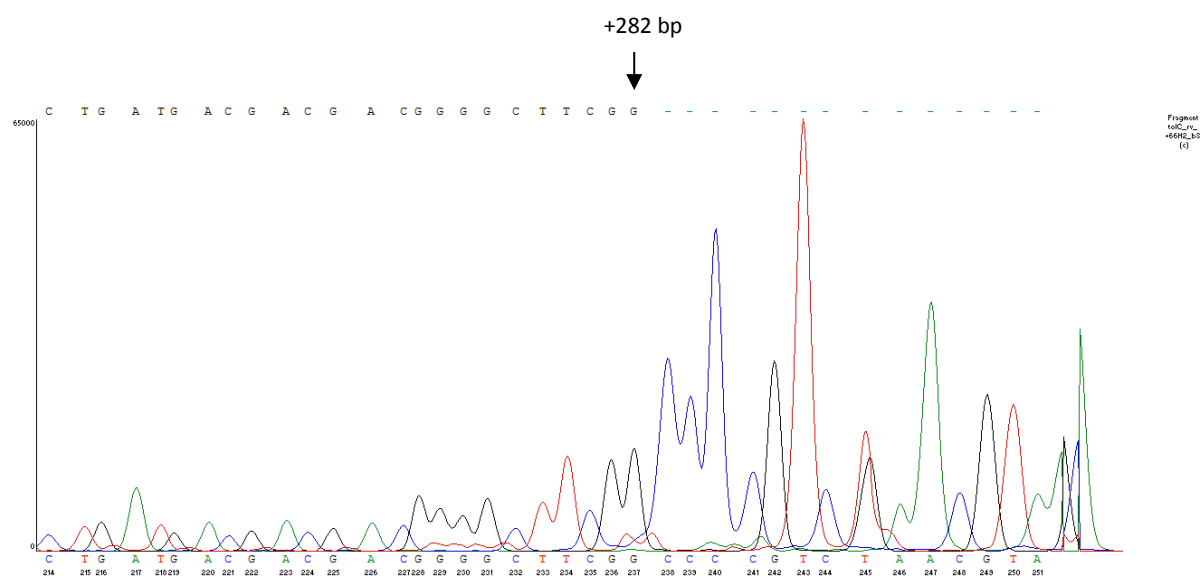
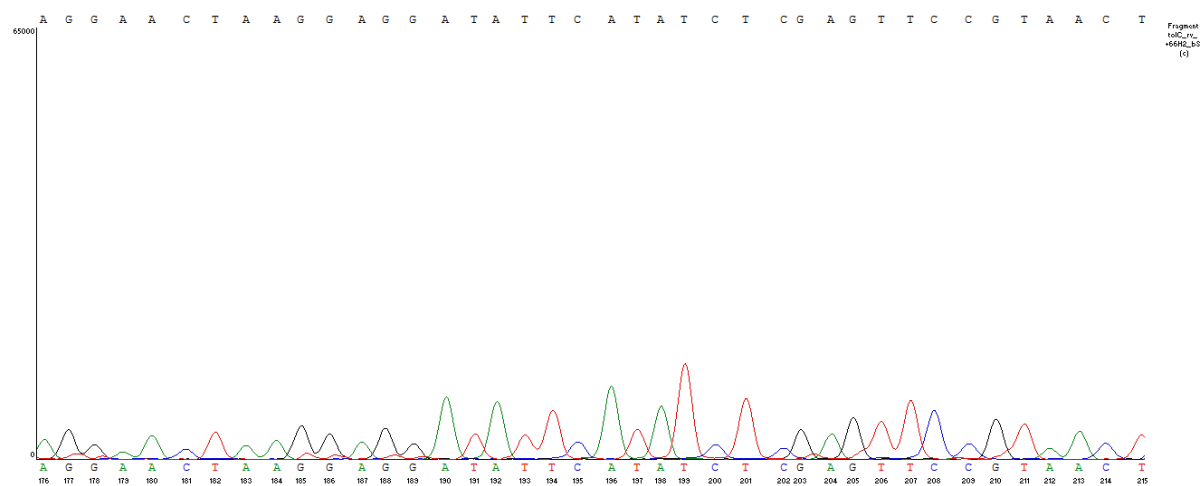
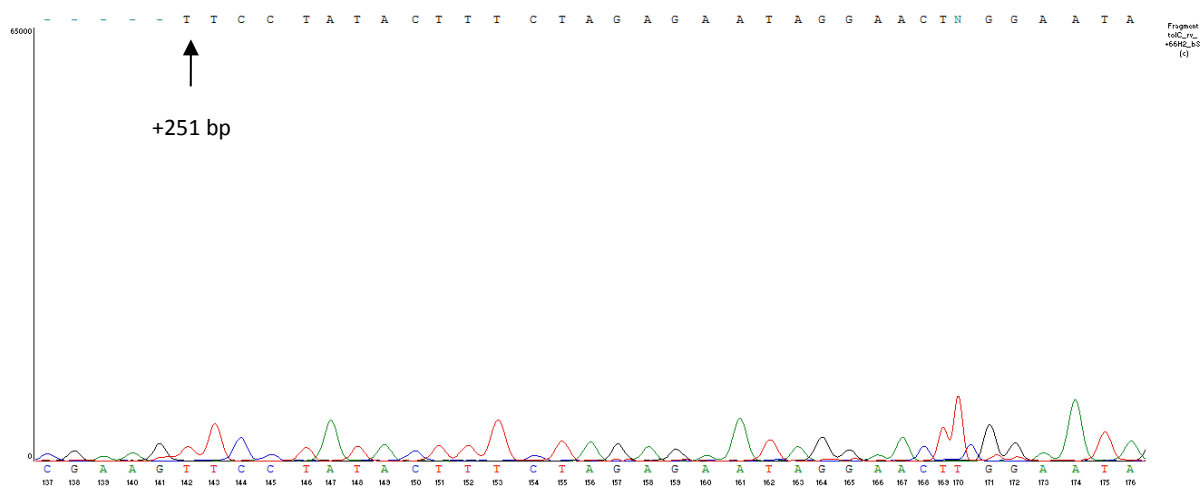


+354 bp



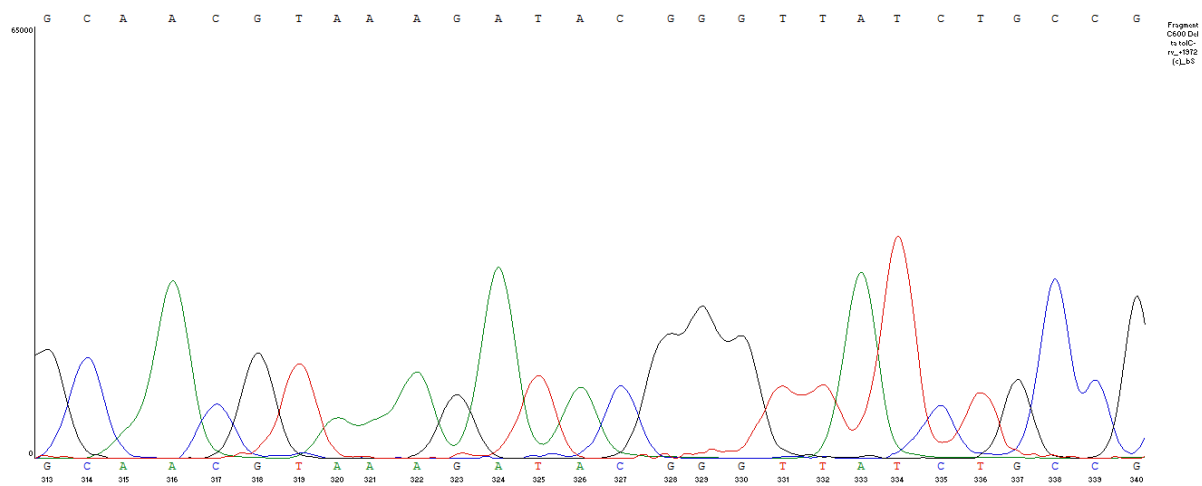
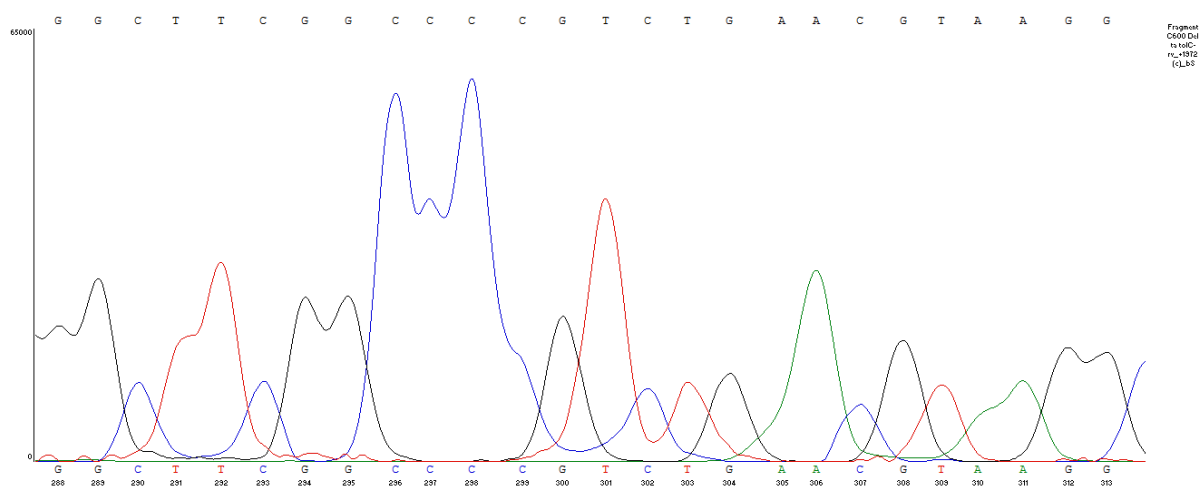
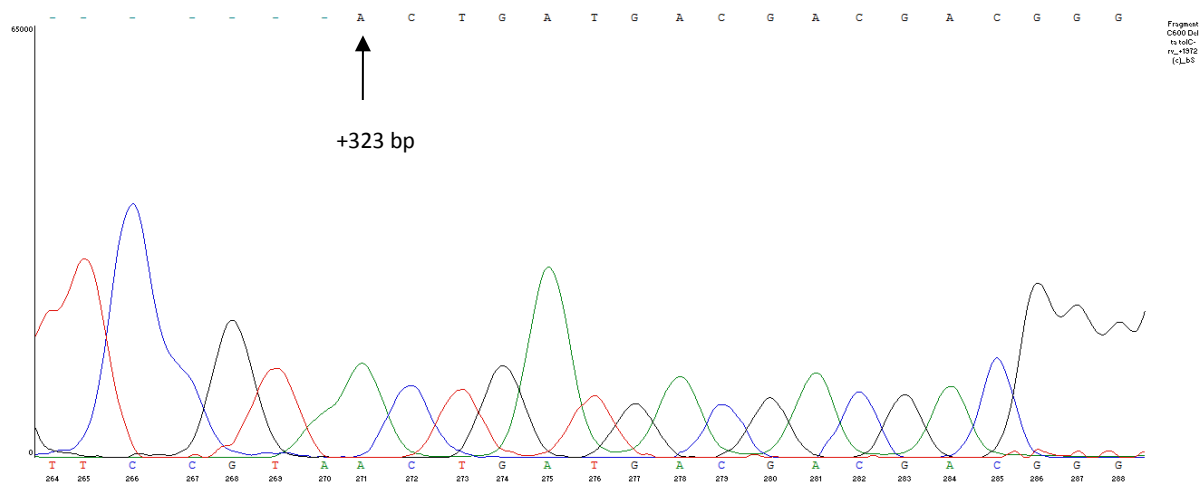
Bezeichnung im Alignment: tolC-rv_+66H2_bS (c)

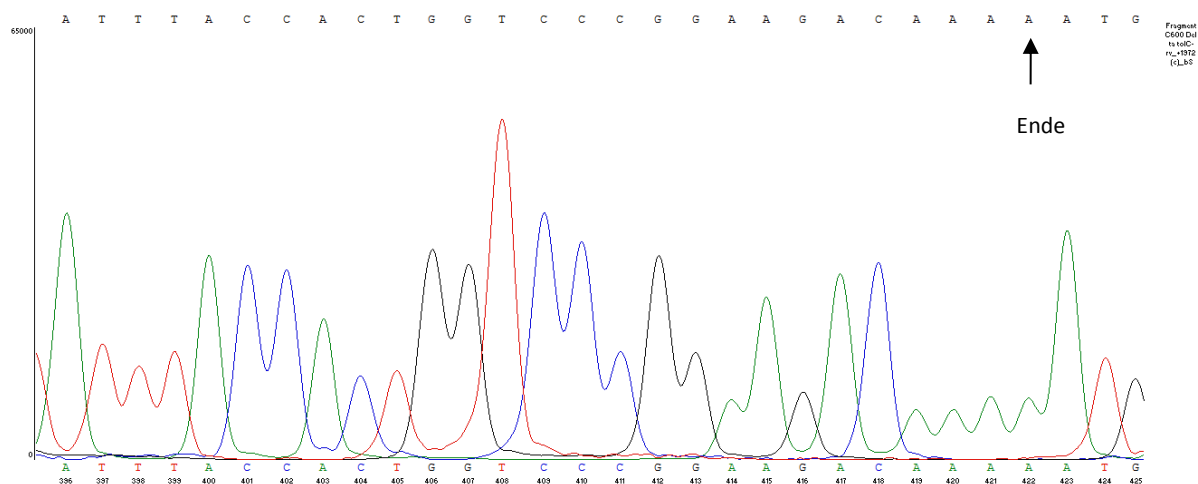
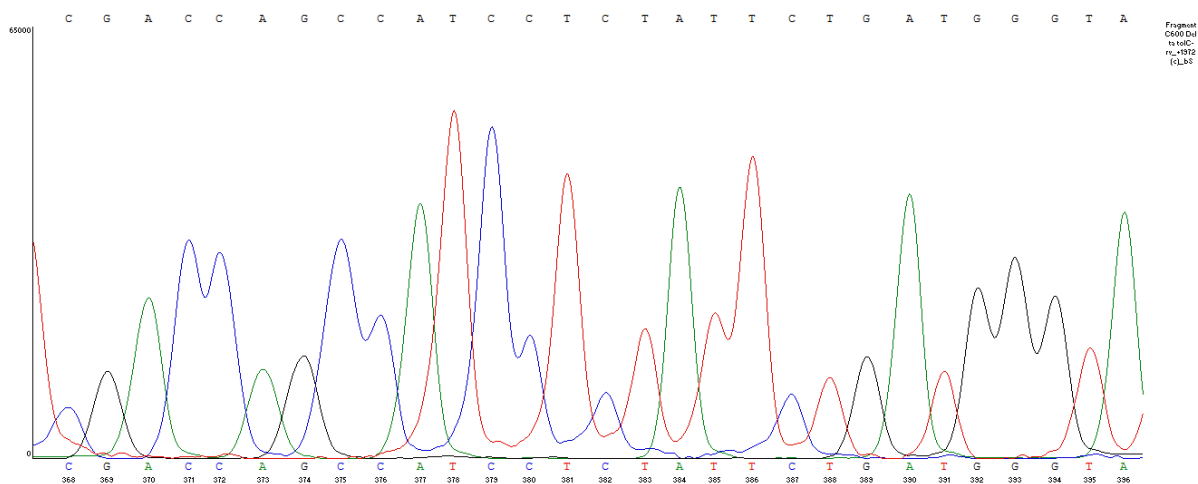
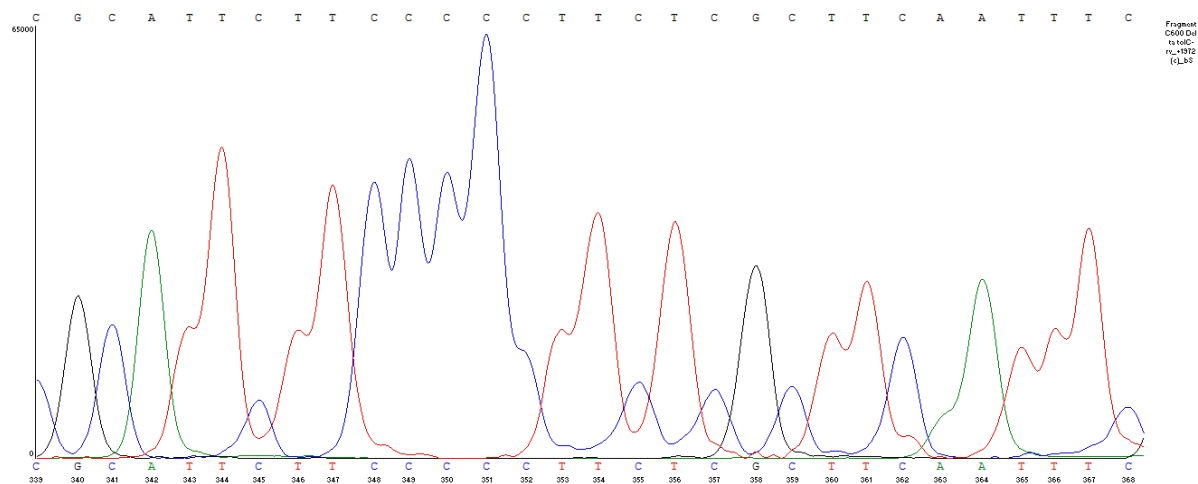
Sequenzabschnitt des intergenetisches Bereiches von *nudF* und *ygiB*: +251 bp bis +282 bp



Bezeichnung im Alignment: C600 Delta tolC-rv_+1972 (c)_bS

Sequenzabschnitt des intergenetischen Bereiches von *nudF* und *ygiB*: +323 bp bis Ende (+474 bp)

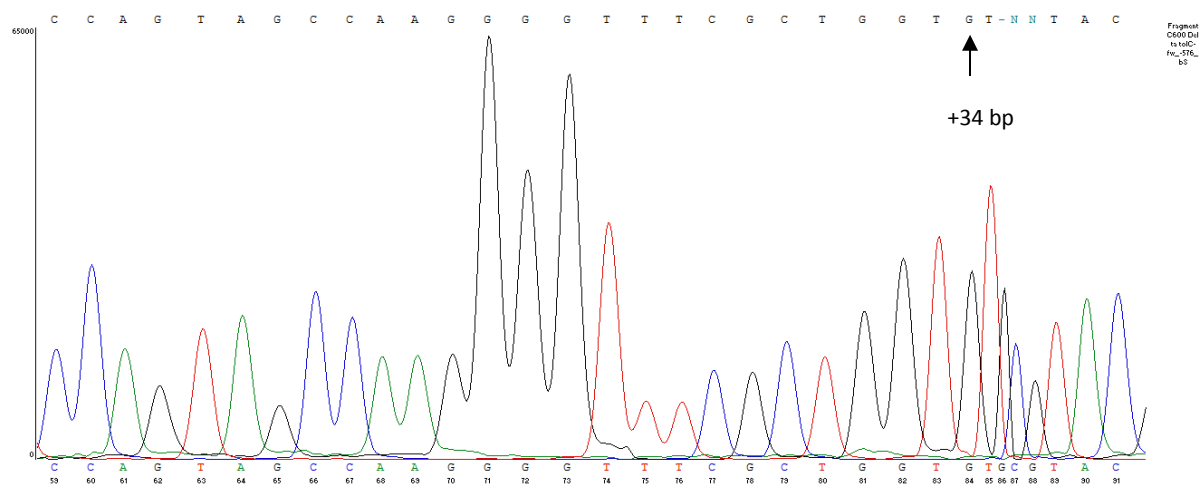
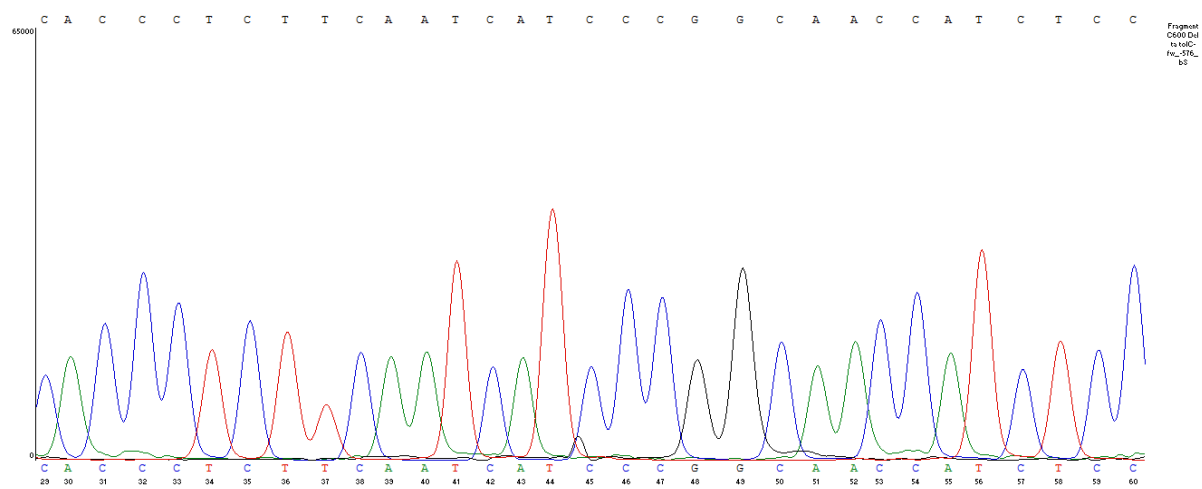
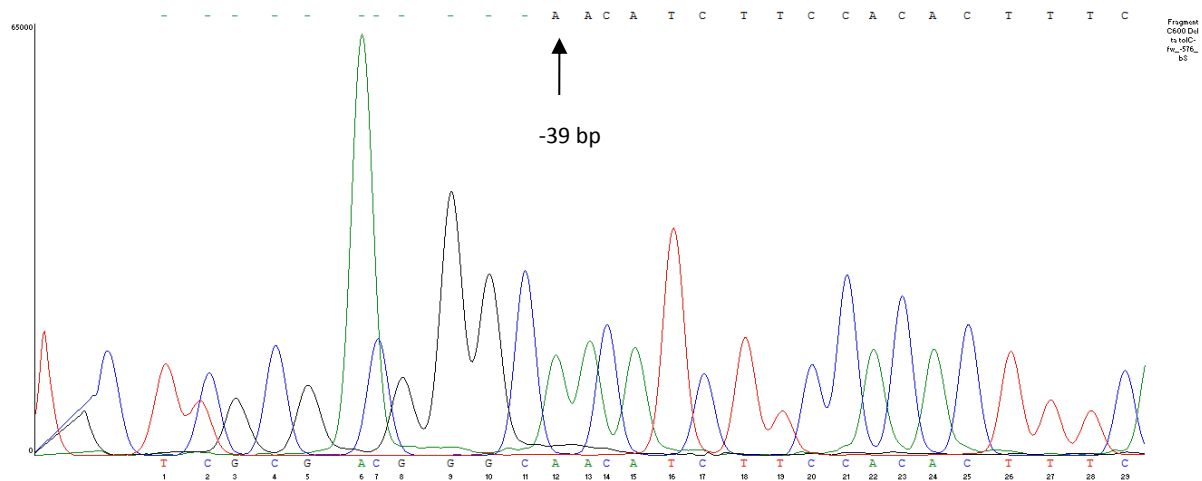




8.1.2 Sequenzierung der Übergänge

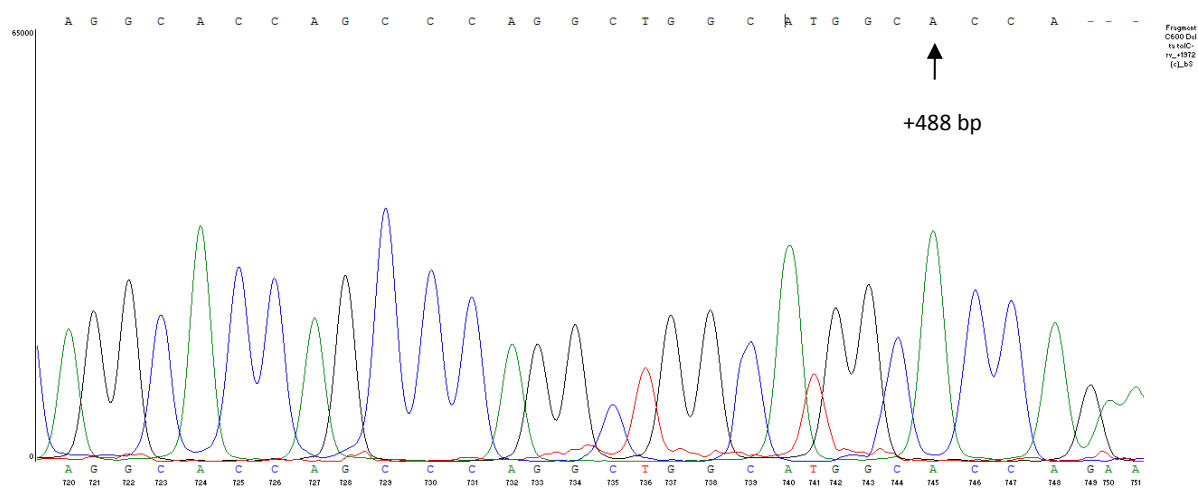
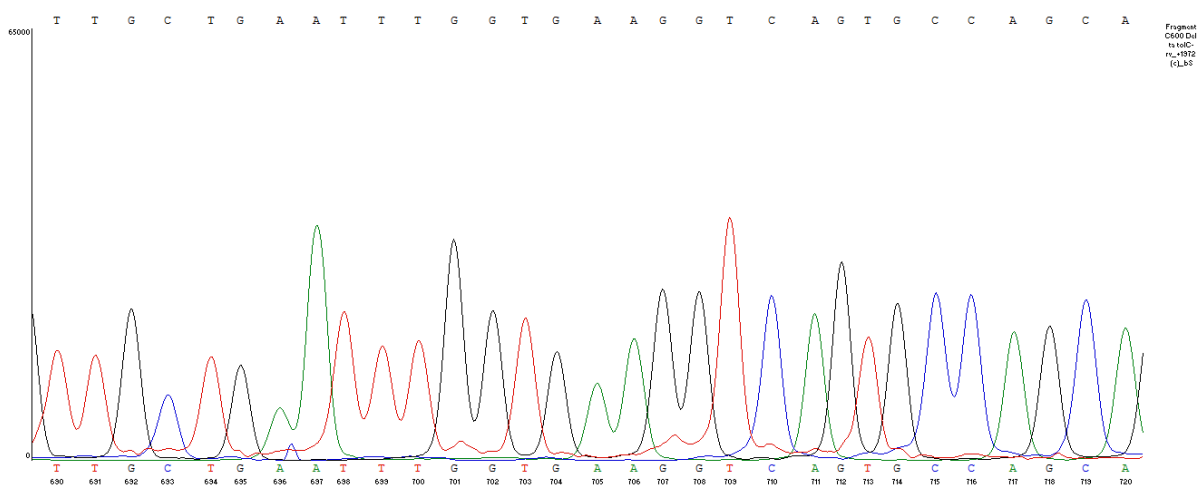
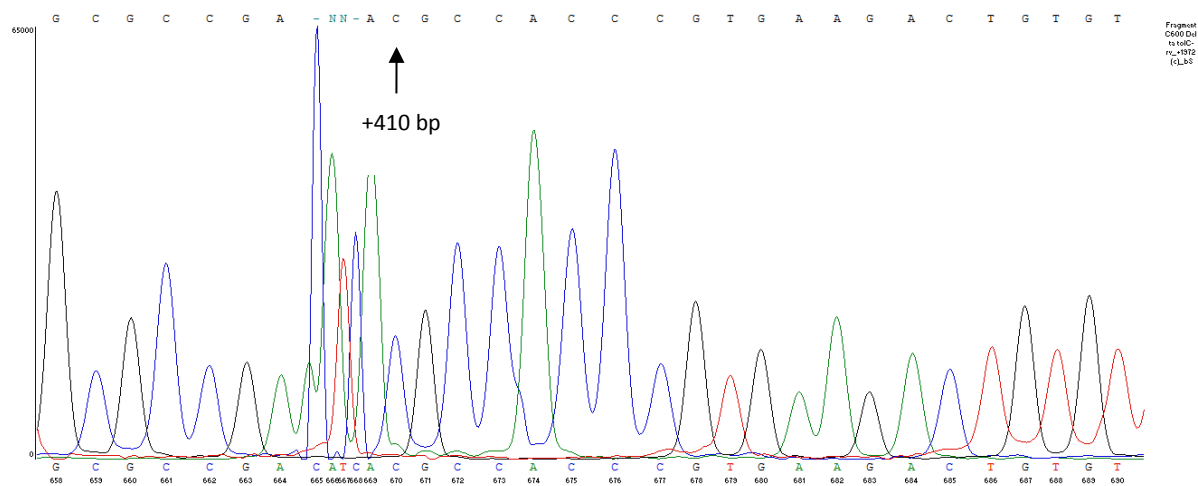
Bezeichnung im Alignment: C600 Delta tolC-fw_-567_bS

Sequenzabschnitt des Übergangs in Bezug zum homologen Bereich H1: -39 bp bis +34 bp



Bezeichnung im Alignment: C600 Delta tolC-rv_+1972 (c)_bS

Sequenzabschnitt des Übergangs in Bezug zum homologen Bereich H2: +410 bp bis +488 bp



8.2 Abkürzungsverzeichnis

Tabelle 8.1: Allgemein verwendete Abkürzungen

<i>Abkürzung</i>	<i>Bedeutung</i>
©	Copyright
®	<i>Registered</i> (eingetragene Warenmarke)
°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	mikromolar
Abb.	Abbildung
ABC	<i>ATP Binding Cassette</i>
AE	Antibiotikaexposition
Amp ^R	Ampicillinresistenz
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
<i>B. subtilis</i>	<i>Bacillus subtilis</i>
BFP	<i>Blue Fluorescent Protein</i>
BG	Bestimmungsgrenze
bp	Basenpaare/ <i>base pairs</i>
bzw.	beziehungsweise
c	Konzentration
<i>C. freundii</i>	<i>Citrobacter freundii</i>
cDNA	<i>complementary DNA</i>
dH ₂ O	Reinstwasser
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>Desoxyribonucleic acid</i>
dNTP	2',3'-Didesoxynukleosidtriphosphat
dsDNA	<i>double stranded DNA</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EB	<i>Elution Buffer</i>
ECDC	<i>European Centre for Disease Prevention and Control</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ESBL	<i>Extendend Spectrum β-Lactamase</i>
<i>et al.</i>	und andere (<i>lat. et alii</i>)
EtBr	Ethidiumbromid
F	Farad
FRT	<i>Flippase Recognition Target</i>
fw	<i>forward</i>
GFP	<i>Green Fluorescent Protein</i>
ggf.	gegebenenfalls
GHS	<i>Global Harmonized System of Classification, Labeling and Packaging of Chemicals</i>
GK-Nr.	Glycerinkulturnummer
GTE-Puffer	Glukose-Tris-EDTA-Puffer
h	Stunde
H ₂ O	Wasser
HMMS	hochmolekulare Substanzen
inkl.	inklusive
IUPAC	<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>
Kan ^R	Kanamycinresistenz
kb	Kilobasenpaare
KBE	koloniebildende Einheiten

KMR	kanzerogen, mutagen, reproduktionstoxisch
<i>K. pneumoniae</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
L	Liter
LB	Luria-Bertani
LE	Lampenenergie
LMMS	niedermolekulare Substanzen
M	Molar (mol/L)
<i>mar</i>	<i>multiple antibiotic resistance</i>
MATE	<i>Multidrug And Toxic Efflux</i>
<i>max.</i>	maximal
MDR	<i>Multiple Drug Resistance</i>
MFS	<i>Major Facilitator Superfamily</i>
MHB	Müller-Hinton Bouillon
MHK	minimale Hemmkonzentration
ml	Milliliter
min	Minute
MOPS	3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure
mRNA	<i>messenger RNA</i>
MRNG	multiresistente gramnegative Stäbchen
MRSA	Methicillin-resistente <i>Staphylococcus aureus</i>
NaAc	Natriumacetat
NAC	<i>no amplification control</i>
NEB	New England BioLabs Inc.
nm	Nanometer
Nov	Novobiocin
Nr.	Nummer
NTC	<i>no template control</i>
OD	Optische Dichte
OMP	<i>Outer Membran Protein</i>
ORF	<i>Open Reading Frame</i>
<i>ori</i>	<i>Origin of Replication</i>
p	Promotor in Zusammenhang mit entsprechender Genbezeichnung
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
QRDR	<i>Quinolone Resistance Determining Region</i>
R ²	Korrelationskoeffizient
RFP	<i>Red Fluorescent Protein</i>
RFU	<i>Relative Fluorescence Unit</i>
RKI	Robert Koch-Institut
RNA	<i>Ribonucleic acid</i>
RND	<i>Resistance Nodulation Cell Division</i>
rpm	<i>rounds/revelation/rotations per minute</i>
RT	Raumtemperatur
rv	<i>reverse</i>
s	Sekunde
SDS	<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i>
SLS	<i>Sample Loading Solution</i>
SMR	<i>Small Multidrug Resistance</i>
SOC	<i>super optimal broth with catabolite repression</i>
SOEing	<i>Splicing by Overlap Extension</i>
sRNA	<i>small RNA</i>
srp	<i>sterically repressed promoter</i>

<i>ssp.</i>	<i>subspecies</i>
<i>Tab.</i>	Tabelle
<i>TAE-Puffer</i>	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
<i>TBE-Puffer</i>	Tris-Borat-EDTA-Puffer
<i>TCA</i>	<i>Tricarboxylic Acid Cycle</i> (Citratzyklus)
<i>TCS</i>	<i>Two Compartment System</i>
<i>Tet</i>	Tetracyclin
<i>Tet^R</i>	Tetracyclinresistenz
<i>TFB</i>	<i>Transformation Buffer</i>
<i>T_M</i>	Schmelztemperatur
<i>ÜNK</i>	Übernachtkultur
<i>ÜTK</i>	Übertagkultur
<i>UV</i>	Ultraviolett
<i>V</i>	Volt
<i>Vis</i>	visible (Lichtspektrum)
<i>WHO</i>	<i>World Health Organisation</i>
<i>z.B.</i>	zum Beispiel
Δ	Deletion/Differenz

Tabelle 8.2: Abkürzungen der DNA-Basen

<i>Abkürzung</i>	<i>Bedeutung</i>
<i>A</i>	Adenin
<i>T</i>	Thymin
<i>C</i>	Cytosin
<i>G</i>	Guanin
<i>U</i>	Uracil

Tabelle 8.3: Abkürzungen der Genbezeichnungen

<i>Gen</i>	<i>Protein</i>	<i>Funktion</i>
<i>aceA</i>	Isocitratlyase	Enzym aus dem Glyoxylatweg
<i>acnA</i>	Aconitase A	Enzym aus dem TCA
<i>acnB</i>	Aconitase B	Enzym aus dem TCA
<i>ampC</i>	AmpC	β-Laktamase
<i>ampR</i>	AmpR	Regulatorprotein der <i>ampC</i> -Expression
<i>arcA</i>	ArcA	Regulatorprotein des Arc-Zwei-Komponenten-Systems
<i>clpB</i>	ClpB	Protease
<i>cpxA</i>	CpxA	Sensorkinase des Cpx-Zwei-Komponenten-Systems
<i>cpxP</i>	CpxP	Negativregulatorprotein des CpxRA-Zwei-Komponenten-Systems
<i>cpxR</i>	CpxR	Regulatorprotein des Cpx-Zwei-Komponenten-Systems
<i>cyoD</i>	CyoD	Untereinheit der Oxidoreduktase Cytochrom <i>bo₃</i>
<i>cysG</i>	Sirohäm-Synthase	Enzym aus der Sirohäm-Biosynthese
<i>dinB</i>	DNA-Polymerase IV	Translasiationspolymerase
<i>dnaK</i>	DnaK	Chaperon
<i>gdhA</i>	Glutamat-Dehydrogenase	Enzym aus der Glutamatsynthese

<i>gfpmut2</i>	GFPmut2	Variante des Wildtyp-GFPs mit erhöhter Fluoreszenzintensität
<i>groE</i>	GroE	Chaperon
<i>groL</i>	GroL	Chaperon
<i>hslV</i>	HslV	Peptidase-Komponent der HslVU-Protease
<i>htpG</i>	HtpG	Chaperon
<i>ibpB</i>	IbpB	Chaperon
<i>icdA</i>	Isocitrat-Dehydrogenase	Enzym aus dem TCA
<i>iscS</i>	Cystein-Desulfurase	Enzym aus der FeS-Clustersynthese
<i>leuB</i>	Isopropylmalat-Dehydrogenase	Enzym des Leucin-Biosyntheseweges
<i>marA</i>	MarA	Globaler Transkriptionsfaktor
<i>mdh</i>	Malat-Dehydrogenase	Enzym aus dem TCA
<i>micF</i>	MicF	Regulatorische antisense-RNA
<i>nuoC/D</i>	NuoCD	Untereinheit der NADH-Dehydrogenase I (Fusionsprotein)
<i>nuoE</i>	NuoE	Untereinheit der NADH-Dehydrogenase I
<i>nuoF</i>	NuoF	Untereinheit der NADH-Dehydrogenase I
<i>proC</i>	Pyrrolin-5-carboxylat-Reduktase	Enzym aus der L-Prolin-Biosynthese
<i>recA</i>	RecA	Beteiligt an der Aktivierung der SOS-Antwort und der der Homologen Rekombination
<i>rob</i>	Rob	Transkriptionsfaktor
<i>sdhB</i>	SdhB	Eisen-Schwefel-Untereinheit der Succinat-Dehydrogenase aus dem TCA und der Atmungskette
<i>sodA</i>	Mn-Superoxiddismutase	Abbau von ROS; SoxRS-Regulon
<i>soxS</i>	SoxS	Transkriptionsaktivator des SoxRS-Regulons
<i>sucA</i>	SucA	Untereinheit der α -Ketoglutarat-Dehydrogenase aus dem TCA
<i>sucB</i>	SucB	Untereinheit der α -Ketoglutarat-Dehydrogenase aus dem TCA
<i>tolC</i>	TolC	Äußeres Membranprotein
<i>zwf</i>	Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase	Enzym aus dem Pentosephosphatweg; SoxRS-Regulon

8.3 Gefahrstoffverzeichnis

8.3.1 Auflistung der verwendeten KMR-Substanzen

Die in der Tabelle 8.4 aufgeführte Zuordnung der Kategorie entstammt der KMR-Liste der IFA (Stand 07/2016) und ist entsprechend den Einstufungen nach CLP-Verordnung bzw. GHS-Verordnung 1272/2008 angegeben (IFA - Institut für Arbeitsschutz der Deutschen Gesetzlichen Unfallversicherung, 2016).

Tabelle 8.4: Auflistung verwendeter KMR-Substanzen

<i>CAS-Nr.</i>	<i>IUPAC-Bezeichnung</i>	<i>Verfahren und maximal eingesetzte Menge</i>	<i>Kategorie</i>
1239-45-8	3,8-Diamino-5-ethyl-6-phenylphenanthridinium-bromid (Ethidiumbromid)	Anfärben von DNA in Agarosegelelen; 4 µl einer 1%igen Lösung	M2
75-12-7	Formamid	Sequenzierung (SLS-Puffer); 30 µl	1B

Legende zur Kategorie der KMR-Substanzen: M = Keimzellmutagen, K = Karzinogen, RD = Entwicklungs-/Fruchtschädigend; 1B = Stoffe, die wahrscheinlich beim Menschen karzinogen sind; die Einstufung erfolgt überwiegend aufgrund von Nachweisen bei Tieren

8.3.2 Auflistung der verwendeten Gefahrstoffe

Tabelle 8.5: Auflistung verwendeter Gefahrstoffe inklusive Angaben nach GHS

<i>Substanz</i>	<i>GHS-Piktogramme</i>	<i>H-Sätze</i>	<i>P-Sätze</i>
<i>Ammoniumchlorid</i>	 	H302 H319 H411	P273 P305 + P351 + P338
<i>2-Mercaptoethanol</i>	   	H301 + H331 H310 H315 H317 H318 H373 H410	P261 P280 P301 + P310 + P330 P302 + P352 + P310 P305 + P351 + P338 + P310 P403 + P233
<i>Ampicillin-Natrium</i>		H317 H334	P261 P280 P342 + P311
<i>Calciumchlorid-Dihydrat</i>		H319	P305 + P351 + P338

Cefoxitin-Natrium

H334

P261

H335

P302+P352

H315

P304+P340

H319

P305+P351+P338
P312

H317

Chloramphenicol

H350

P201

P308 + P313

Essigsäure konz.

H226

P210

H314

P260

P280

P303 + P361 +
P353-P305 + P351
+ P338-P370 +
P378*Ethanol*

H225

P210

H319

P305 + P351 +
P338

P370 + P378

P403 + P235

Ethidiumbromid

H302

P260

H330

P281

H341

P284

P310

*Ethylendiamintetraacetat
(EDTA)*

H319

P305 + P351 +
P338*Gentamicinsulfat*

H317

P261

H334

P280

P342 + P311

Kanamycinsulfat

H360

P201

P308 + P313

Linezolid

H372

P314

Nalidixinsäure

H302

P301 + P312 +
P330*Natriumdodecylsulfat*

H228

P210

H302 + H332

P261

H315

P273

H318

P280

H335

P305 + P351 +
P338

H412

Natriumhydroxid

H290

P260

H314

P280

P303 + P361 +
P353P304 + P340 +
P310-P305 + P351
+ P338*Novobiocin-Natrium*

H317

P280-P305 + P351
+ P338

H319

Polymyxin B Sulfat

H302

P301 + P312 +
P330*Rifampicin*

H302

P301 + P312 +
P330

RNase Away

H315+H319

P280

P332 + P313

P305 + P351 +
P338

P362

P264

P337 + P313

Tetracyclin-HCl

H315

P261

H319

P305 + P351 +
P338

H335

Tris-Base

H315

P280

H319

P302+P352

H335

P305+P351+P338
P312*Xylencyanol*

H319

P280

P305+P351+P338

MOPS

H315

P261

H319

P280

H335

P302+P352
P305+P351+P338*Formamid*

H351

P201-P260-P280-
P308 + P313

H360D

H373

8.4 Lebenslauf

Persönliche Daten

<i>Name</i>	Katja Carstens
<i>Geburtstag/-ort</i>	04.02.1985 in Hamburg

Berufliche Ausbildung

<i>04 / 2005 – 10 / 2009</i>	Studium an der Universität Hamburg Studienfach: Pharmazie
<i>01.12.2009 – 31.05.2010</i>	Durchführung der ersten Hälfte des Praktischen Jahres in der Einhorn-Apotheke in Altona (Apothekenleiterin: Frau Dr. H. Dierking)
<i>01.06.2010 – 30.11.2010</i>	Durchführung der zweiten Hälfte des Praktischen Jahres am Univer- sitätsklinikum Eppendorf im Bereich Strahlentherapie und Radioon- kologie unter Leitung von Juniorprofessorin D. Dartsch
<i>04.02.2011</i>	Erteilung der Approbation als Apothekerin
<i>03/2011-04/2014</i>	Anstellung als wissenschaftliche Mitarbeiterin an der Universität Hamburg und Beginn des Promotionsvorhabens unter der Leitung von Herrn Prof. Heisig im Fachbereich Pharmazeutischen Biologie mit dem Titel: „Entwicklung eines rekombinanten Antibioti- kasensorstammes von <i>E. coli</i> mittels gezielter Mutagenese und Re- porter-gentechnologie“
<i>03/2013</i>	Zur Promotion ergänzende Anstellung als geringfügig Beschäftigte in der Vitalhus-Apotheke (Apothekenleiter: Herr C. Steinhart)
<i>04/2014</i>	Anstellung als Teilzeit-Apothekerin in der Vitalhus-Apotheke (Apo- thekenleiter: Herr C. Steinhart)

8.5 Publikationen

Biosensoric detection of antibiotic traces in the environment by a GFP-based reporter gene plasmid in a hypersusceptible E. coli mutant to identify novel antibiotic resistance determinants

Carstens K., Barbara Körber-Irrgang, Heisig A., Heisig P.; Joint meeting of the Southern Danish Universities and University of Hamburg, Sandbjerg, 31.10.-1.11.2011 (Poster)

Biosensoric detection of antibiotic traces in the environment by a GFP-based reporter system

Carstens K., Heisig A., Heisig P.; 4th Joint Congress of the DGHM and VAAM Dresden, Deutschland, 5. – 8. Oktober 2014 (Poster)

Biosensoric detection of antibiotic traces in the environment by a GFP-based reporter system

Carstens K., Heisig A., Heisig P.; Application note für BERTHOLD TECHNOLOGIES GmbH & CoKG (Deutschland) für das Fluorimeter Mithras LB940; 03/2015

8.6 Eidesstattliche Versicherung

Hiermit versichere ich an Eides statt, die vorliegende Dissertation selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel benutzt zu haben. Ich versichere, dass diese Dissertation nicht in einem früheren Promotionsverfahren eingereicht wurde.

Hamburg, den 20.10.17

.....

Katja Carstens

8.7 Erklärung über frühere Promotionsvorhaben

Ich versichere, dass von mir, Katja Carstens, keine früheren Promotionsvorhaben mit dieser oder einer anderen Dissertation erfolgt sind. Die Arbeit wurde weder im Aus- noch im Inland in gleicher oder ähnlicher Form einer Prüfungskommission vorgelegt.

Hamburg, den 20.10.17

.....

Katja Carstens

9 Literaturverzeichnis

- abcam. Retrieved from <http://www.abcam.com/content/choosing-a-fluorescent-protein>
- Agilent Technologies. (07/2013). Agilent RNA 6000 Nano Kit Guide. Retrieved from www.agilent.com
- Aktories, K., Förstermann, U., Hofmann, F. B., Starke, K. (2005). Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie 9. Auflage.
- Alonso, N., Miro, E., Pascual, V., et al. (2016). Molecular characterisation of acquired and overproduced chromosomal blaAmpC in *Escherichia coli* clinical isolates. *Int J Antimicrob Agents*, 47(1), 62-68. doi:10.1016/j.ijantimicag.2015.10.007
- Ambler, R. P. (1980). The structure of beta-lactamases. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 289(1036), 321-331.
- Andersen, C., Hughes, C., & Koronakis, V. (2000). Chunnel vision. Export and efflux through bacterial channel-tunnels. *EMBO Rep*, 1(4), 313-318. doi:10.1093/embo-reports/kvd075
- Anderson, E. S. (1975). Viability of, and transfer of a plasmid from, *E. coli* K12 in human intestine. *Nature*, 255(5508), 502-504.
- Anes, J., McCusker, M. P., Fanning, S., et al. (2015). The ins and outs of RND efflux pumps in *Escherichia coli*. *Front Microbiol*, 6, 587. doi:10.3389/fmicb.2015.00587
- Anjem, A., & Imlay, J. A. (2012). Mononuclear iron enzymes are primary targets of hydrogen peroxide stress. *J Biol Chem*, 287(19), 15544-15556. doi:10.1074/jbc.M111.330365
- Appleyard, R. K. (1954). Segregation of New Lysogenic Types during Growth of a Doubly Lysogenic Strain Derived from *Escherichia Coli* K12. *Genetics*, 39(4), 440-452.
- Aslund, F., Zheng, M., Beckwith, J., et al. (1999). Regulation of the OxyR transcription factor by hydrogen peroxide and the cellular thiol-disulfide status. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96(11), 6161-6165.
- Atlung, T., & Brondsted, L. (1994). Role of the transcriptional activator AppY in regulation of the *cyx appA* operon of *Escherichia coli* by anaerobiosis, phosphate starvation, and growth phase. *J Bacteriol*, 176(17), 5414-5422.
- Augustus, A. M., Celaya, T., Husain, F., et al. (2004). Antibiotic-Sensitive TolC Mutants and Their Suppressors. *J Bacteriol*, 186(6), 1851-1860. doi:10.1128/JB.186.6.1851-1860.2004
- Bachmann, B. J. (1996). Derivations and genotypes of some mutant derivatives of *Escherichia coli* K-12. In *Escherichia coli and Salmonella typhimurium: Cellular and Molecular Biology*; F.C. Neidhart (ASM Press, Washington, DC), Vol. 2, pp 1190 - 1219.
- Baenkler, G., Hahn, Hinterseer, Knez, Lafrenz, Möhling, Pfeiffer, H. Schmidt, M. Schmidt, Spranger, Voll, Witzens-Harig, Zidek. (2015). Kurzlehrbuch Innere Medizin. Georg Thieme Verlag, 3. Auflage.
- Baez, A., & Shiloach, J. (2013). *Escherichia coli* avoids high dissolved oxygen stress by activation of SoxRS and manganese-superoxide dismutase. *Microb Cell Fact*, 12, 23. doi:10.1186/1475-2859-12-23
- Baharoglu, Z., & Mazel, D. (2014). SOS, the formidable strategy of bacteria against aggressions. *FEMS Microbiol Rev*, 38(6), 1126-1145. doi:10.1111/1574-6976.12077
- Barton, L. (2005). Structural and Functional Relationships in Prokaryotes. Springer.
- Bartowsky, E., & Normark, S. (1991). Purification and mutant analysis of *Citrobacter freundii* AmpR, the regulator for chromosomal AmpC beta-lactamase. *Mol Microbiol*, 5(7), 1715-1725.
- Bartowsky, E., & Normark, S. (1993). Interactions of wild-type and mutant AmpR of *Citrobacter freundii* with target DNA. *Mol Microbiol*, 10(3), 555-565.
- Beckman Coulter. Retrieved from www.beckmancoulter.de
- Berthold Technologies. (2008). Operating Manual LB940 Multimode Reader Mithras.
- Bianchi, A. A., & Baneyx, F. (1999). Stress responses as a tool To detect and characterize the mode of action of antibacterial agents. *Appl Environ Microbiol*, 65(11), 5023-5027.

- Bielski, B. H., Arudi, R. L., & Sutherland, M. W. (1983). A study of the reactivity of HO₂/O₂⁻ with unsaturated fatty acids. *J Biol Chem*, 258(8), 4759-4761.
- Birnboim, H. C., & Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Research*, 7(6), 1513-1523.
- Blattner, F. R., Plunkett, G., 3rd, Bloch, C. A., et al. (1997). The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science*, 277(5331), 1453-1462.
- Bleuel, C., Grosse, C., Taudte, N., et al. (2005). TolC is involved in enterobactin efflux across the outer membrane of *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 187(19), 6701-6707. doi:10.1128/JB.187.19.6701-6707.2005
- Bokma, E., Koronakis, E., Lobedanz, S., et al. (2006). Directed evolution of a bacterial efflux pump: Adaptation of the *E. coli* TolC exit duct to the *Pseudomonas* MexAB translocase. *FEBS Letters*, 580(22), 5339-5343. doi:10.1016/j.febslet.2006.09.005
- Bolivar, F., Rodriguez, R. L., Greene, P. J., et al. (1977). Construction and characterization of new cloning vehicle. II. A multipurpose cloning system. *Gene*, 2(2), 95-113. doi:10.1016/0378-1119(77)90000-2
- Borisov, V. B., Murali, R., Verkhovskaya, M. L., et al. (2011). Aerobic respiratory chain of *Escherichia coli* is not allowed to work in fully uncoupled mode. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108(42), 17320-17324. doi:10.1073/pnas.1108217108
- Borisov, V. B., Murali, R., Verkhovskaya, M. L., et al. (2011). Aerobic respiratory chain of *Escherichia coli* is not allowed to work in fully uncoupled mode. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108(42), 17320-17324. doi:10.1073/pnas.1108217108
- Brondsted, L., & Atlung, T. (1996). Effect of growth conditions on expression of the acid phosphatase (*cyx-appA*) operon and the *appY* gene, which encodes a transcriptional activator of *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 178(6), 1556-1564.
- Brosius, J., Cate, R. L., & Perlmutter, A. P. (1982). Precise location of two promoters for the beta-lactamase gene of pBR322. S1 mapping of ribonucleic acid isolated from *Escherichia coli* or synthesized in vitro. *J Biol Chem*, 257(15), 9205-9210.
- Brynildsen, M. P., Winkler, J. A., Spina, C. S., et al. (2013). Potentiating antibacterial activity by predictably enhancing endogenous microbial ROS production. *Nat Biotechnol*, 31(2), 160-165. doi:10.1038/nbt.2458
- Brynildsen, M. P., Winkler, J. A., Spina, C. S., et al. (2013). Potentiating antibacterial activity by predictably enhancing endogenous microbial ROS production. *Nature biotechnology*, 31(2), 160-165. doi:10.1038/nbt.2458
- Buelow, D. R., & Raivio, T. L. (2005). Cpx Signal Transduction Is Influenced by a Conserved N-Terminal Domain in the Novel Inhibitor CpxP and the Periplasmic Protease DegP. *J Bacteriol*, 187(19), 6622-6630. doi:10.1128/JB.187.19.6622-6630.2005
- Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit, P.-E.-G. f. C. e. V., Infektiologie Freiburg. (2012). GERMAP 2015 - Bericht über den Antibiotikaverbrauch und die Verbreitung von Antibiotikaresistenzen in der Human- und Veterinärmedizin in Deutschland. Antiinfectives Intelligence Gesellschaft für klinisch-mikrobiologische Forschung und Kommunikation mbH.
- Bury-Mone, S., Nomane, Y., Reymond, N., et al. (2009). Global analysis of extracytoplasmic stress signaling in *Escherichia coli*. *PLoS Genet*, 5(9), e1000651. doi:10.1371/journal.pgen.1000651
- Bush, K., & Jacoby, G. A. (2010). Updated functional classification of beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother*, 54(3), 969-976. doi:10.1128/AAC.01009-09
- Campbell, E. A., Korzhova, N., Mustaev, A., et al. (2001). Structural Mechanism for Rifampicin Inhibition of Bacterial RNA Polymerase. *Cell*, 104(6), 901-912. doi:10.1016/S0092-8674(01)00286-0
- Carson, C. F., Hammer, K. A., & Riley, T. V. (2006). Melaleuca alternifolia (Tea Tree) Oil: a Review of Antimicrobial and Other Medicinal Properties. *Clin Microbiol Rev*, 19(1), 50-62. doi:10.1128/CMR.19.1.50-62.2006
- Carson, C. F., Mee, B. J., & Riley, T. V. (2002). Mechanism of Action of Melaleuca alternifolia (Tea Tree) Oil on *Staphylococcus aureus* Determined by Time-Kill, Lysis, Leakage, and Salt Tolerance Assays and Electron

- Microscopy. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 46(6), 1914-1920. doi:10.1128/AAC.46.6.1914-1920.2002
- Cheng, Q., & Park, J. T. (2002). Substrate specificity of the AmpG permease required for recycling of cell wall anhydro-muropeptides. *J Bacteriol*, 184(23), 6434-6436.
- Cherepanov, P. P., & Wackernagel, W. (1995). Gene disruption in *Escherichia coli*: TcR and KmR cassettes with the option of Flp-catalyzed excision of the antibiotic-resistance determinant. *Gene*, 158(1), 9-14. doi:10.1016/0378-1119(95)00193-A
- Chubiz, L. M., & Rao, C. V. (2011). Role of the *mar-sox-rob* regulon in regulating outer membrane porin expression. *J Bacteriol*, 193(9), 2252-2260. doi:10.1128/JB.01382-10
- Clinical and Laboratory Standards Institute. (2012). M07-A9. Vol. 32 No. 2.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. (2014). M100-S24. Vol. 34 No. 1.
- Cormack, B. P., Valdivia, R. H., & Falkow, S. (1996). FACS-optimized mutants of the green fluorescent protein (GFP). *Gene*, 173(1), 33-38. doi:10.1016/0378-1119(95)00685-0
- Craig, S. (2004). *Modern Pharmacology with Clinical Applications*. Lippincott Williams & Wilkins, 6 th Edition, 539.
- Danese, P. N., & Silhavy, T. J. (1998). CpxP, a stress-combative member of the Cpx regulon. *J Bacteriol*, 180(4), 831-839.
- Darai, H., Sonntag, Zöller. (2012). *Lexikon der Infektionskrankheiten des Menschen*. Springer Verlag, 4. Auflage.
- De Felice, M., Squires, C., Levinthal, M., et al. (1977). Growth inhibition of *Escherichia coli* K-12 by L-valine: a consequence of a regulatory pattern. *Mol Gen Genet*, 156(1), 1-7.
- De Meester, F., Frere, J. M., Waley, S. G., et al. (1986). 6-beta-Iodopenicillanate as a probe for the classification of beta-lactamases. *Biochem J*, 239(3), 575-580.
- De Wulf, P., Kwon, O., & Lin, E. C. C. (1999). The CpxRA Signal Transduction System of *Escherichia coli*: Growth-Related Autoactivation and Control of Unanticipated Target Operons. *J Bacteriol*, 181(21), 6772-6778.
- Debnath, I., Norton, J. P., Barber, A. E., et al. (2013). The Cpx stress response system potentiates the fitness and virulence of uropathogenic *Escherichia coli*. *Infect Immun*, 81(5), 1450-1459. doi:10.1128/IAI.01213-12
- Deininger, K. N., Horikawa, A., Kitko, R. D., et al. (2011). A requirement of TolC and MDR efflux pumps for acid adaptation and GadAB induction in *Escherichia coli*. *PLoS One*, 6(4), e18960. doi:10.1371/journal.pone.0018960
- Delgado, M. A., Vincent, P. A., Farias, R. N., et al. (2005). YojI of *Escherichia coli* functions as a microcin J25 efflux pump. *J Bacteriol*, 187(10), 3465-3470. doi:10.1128/JB.187.10.3465-3470.2005
- Desnoyers, G., & Masse, E. (2012). Noncanonical repression of translation initiation through small RNA recruitment of the RNA chaperone Hfq. *Genes Dev*, 26(7), 726-739. doi:10.1101/gad.182493.111
- Desnoyers, G., & Massé, E. (2012). Noncanonical repression of translation initiation through small RNA recruitment of the RNA chaperone Hfq. *Genes Dev*, 26(7), 726-739. doi:10.1101/gad.182493.111
- Dhamdhare, G., & Zgurskaya, H. I. (2010). Metabolic shutdown in *Escherichia coli* cells lacking the outer membrane channel TolC. *Mol Microbiol*, 77(3), 743-754. doi:10.1111/j.1365-2958.2010.07245.x
- DiGiuseppe, P. A., & Silhavy, T. J. (2003). Signal Detection and Target Gene Induction by the CpxRA Two-Component System. *J Bacteriol*, 185(8), 2432-2440. doi:10.1128/JB.185.8.2432-2440.2003
- Drlica, K., Hiasa, H., Kerns, R., et al. (2009). Quinolones: Action and Resistance Updated. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 9(11), 981-998. doi:10.2174/156802609789630947
- Drolet, M., Phoenix, P., Menzel, R., et al. (1995). Overexpression of RNase H partially complements the growth defect of an *Escherichia coli* delta topA mutant: R-loop formation is a major problem in the absence of DNA topoisomerase I. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92(8), 3526-3530.
- Du, D., Wang, Z., James, N. R., et al. (2014). Structure of the AcrAB-TolC multidrug efflux pump. *Nature*, 509(7501), 512-515. doi:10.1038/nature13205

- Du, D., Wang, Z., James, N. R., et al. (2014). Structure of the AcrAB-TolC multidrug efflux pump. *Nature*, 509(7501), 512-515. doi:10.1038/nature13205
- Duval, V., & Lister, I. M. (2013). MarA, SoxS and Rob of *Escherichia coli* – Global regulators of multidrug resistance, virulence and stress response. *International journal of biotechnology for wellness industries*, 2(3), 101-124. doi:10.6000/1927-3037.2013.02.03.2
- Dwyer, D. J., Kohanski, M. A., Hayete, B., et al. (2007). Gyrase inhibitors induce an oxidative damage cellular death pathway in *Escherichia coli*. *Mol Syst Biol*, 3, 91. doi:10.1038/msb4100135
- ECDC/EMEA. (2009). ECDC/EMEA Joint Technical Report - The bacterial challenge: time to react.
- Eguchi, Y., Oshima, T., Mori, H., et al. (2003). Transcriptional regulation of drug efflux genes by EvgAS, a two-component system in *Escherichia coli*. *Microbiology*, 149(Pt 10), 2819-2828. doi:10.1099/mic.0.26460-0
- Elkins, C. A., & Nikaido, H. (2002). Substrate Specificity of the RND-Type Multidrug Efflux Pumps AcrB and AcrD of *Escherichia coli* Is Determined Predominately by Two Large Periplasmic Loops. *J Bacteriol*, 184(23), 6490-6498. doi:10.1128/JB.184.23.6490-6498.2002
- Ezaz-Nikpay, K., Uchino, K., Lerner, R. E., et al. (1994). Construction of an overproduction vector containing the novel srp (sterically repressed) promoter. *Protein Sci*, 3(1), 132-138. doi:10.1002/pro.5560030117
- Ezraty, B., Vergnes, A., Banzhaf, M., et al. (2013). Fe-S cluster biosynthesis controls uptake of aminoglycosides in a ROS-less death pathway. *Science*, 340(6140), 1583-1587. doi:10.1126/science.1238328
- Fleischer, R., Heermann, R., Jung, K., et al. (2007). Purification, reconstitution, and characterization of the CpxRAP envelope stress system of *Escherichia coli*. *J Biol Chem*, 282(12), 8583-8593. doi:10.1074/jbc.M605785200
- Flint, D. H., Tuminello, J. F., & Emptage, M. H. (1993). The inactivation of Fe-S cluster containing hydro-lyases by superoxide. *J Biol Chem*, 268.
- Foster, J. W. (2004). *Escherichia coli* acid resistance: tales of an amateur acidophile. *Nat Rev Micro*, 2(11), 898-907.
- Foti, J. J., Devadoss, B., Winkler, J. A., et al. (2012). Oxidation of the guanine nucleotide pool underlies cell death by bactericidal antibiotics. *Science*, 336(6079), 315-319. doi:10.1126/science.1219192
- Friedrich, T., Dekovic, D. K., & Burschel, S. (2016). Assembly of the *Escherichia coli* NADH:ubiquinone oxidoreductase (respiratory complex I). *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1857(3), 214-223. doi:10.1016/j.bbabo.2015.12.004
- Friedrich, T., & Pohl, T. (2007). NADH as Donor. *EcoSal Plus*, 2(2). doi:10.1128/ecosalplus.3.2.4
- Fuchs, G., Schlegel, H.G. (2014). *Allgemeine Mikrobiologie*. Thieme Verlag, 9. Auflage.
- Fujimoto-Nakamura, M., Ito, H., Oyamada, Y., et al. (2005). Accumulation of Mutations in both *gyrB* and *parE* Genes Is Associated with High-Level Resistance to Novobiocin in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49(9), 3810-3815. doi:10.1128/AAC.49.9.3810-3815.2005
- Gellert, M., Mizuuchi, K., O'Dea, M. H., et al. (1977). Nalidixic acid resistance: a second genetic character involved in DNA gyrase activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 74(11), 4772-4776.
- Gilson, L., Mahanty, H. K., & Kolter, R. (1990). Genetic analysis of an MDR-like export system: the secretion of colicin V. *EMBO J*, 9(12), 3875-3884.
- Goltermann, L., Good, L., & Bentin, T. (2013). Chaperonins fight aminoglycoside-induced protein misfolding and promote short-term tolerance in *Escherichia coli*. *J Biol Chem*, 288(15), 10483-10489. doi:10.1074/jbc.M112.420380
- Goswami, M., Mangoli, S. H., & Jawali, N. (2006). Involvement of reactive oxygen species in the action of ciprofloxacin against *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother*, 50(3), 949-954. doi:10.1128/AAC.50.3.949-954.2006
- Green, J., & Guest, J. R. (1994). Regulation of transcription at the *ndh* promoter of *Escherichia coli* by FNR and novel factors. *Mol Microbiol*, 12(3), 433-444.

- Griffith, K. L., Shah, I. M., & Wolf, R. E., Jr. (2004). Proteolytic degradation of *Escherichia coli* transcription activators SoxS and MarA as the mechanism for reversing the induction of the superoxide (SoxRS) and multiple antibiotic resistance (Mar) regulons. *Mol Microbiol*, 51(6), 1801-1816.
- Gu, M., & Imlay, J. A. (2011). The SoxRS response of *Escherichia coli* is directly activated by redox-cycling drugs rather than by superoxide. *Mol Microbiol*, 79(5), 1136-1150. doi:10.1111/j.1365-2958.2010.07520.x
- Gu, M., & Imlay, J. A. (2011). The SoxRS response of *Escherichia coli* is directly activated by redox-cycling drugs rather than by superoxide. *Mol Microbiol*, 79. doi:10.1111/j.1365-2958.2010.07520.x
- Guenebaut, V., Schlitt, A., Weiss, H., et al. (1998). Consistent structure between bacterial and mitochondrial NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I). *J Mol Biol*, 276(1), 105-112. doi:10.1006/jmbi.1997.1518
- Guillon, H., Tande, D., & Mammeri, H. (2011). Emergence of ertapenem resistance in an *Escherichia coli* clinical isolate producing extended-spectrum beta-lactamase AmpC. *Antimicrob Agents Chemother*, 55(9), 4443-4446. doi:10.1128/AAC.01513-10
- Hancock, R. E., Farmer, S. W., Li, Z. S., et al. (1991). Interaction of aminoglycosides with the outer membranes and purified lipopolysaccharide and OmpF porin of *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother*, 35(7), 1309-1314.
- Hansson, M. D., Rzeznicka, K., Rosenbäck, M., et al. (2008). PCR-mediated deletion of plasmid DNA. *Analytical Biochemistry*, 375(2), 373-375. doi:10.1016/j.ab.2007.12.005
- Hebisch, E., Knebel, J., Landsberg, J., et al. (2013). High variation of fluorescence protein maturation times in closely related *Escherichia coli* strains. *PLoS One*, 8(10), e75991. doi:10.1371/journal.pone.0075991
- Helling, R. B., Goodman, H. M., & Boyer, H. W. (1974). Analysis of endonuclease R-EcoRI fragments of DNA from lambdoid bacteriophages and other viruses by agarose-gel electrophoresis. *J Virol*, 14(5), 1235-1244.
- Henkel, S. G., Ter Beek, A., Steinsiek, S., et al. (2014). Basic regulatory principles of *Escherichia coli*'s electron transport chain for varying oxygen conditions. *PLoS One*, 9(9), e107640. doi:10.1371/journal.pone.0107640
- Higgins, N. P. (2007). Under DNA stress, gyrase makes the sign of the cross. *Nat Struct Mol Biol*, 14(4), 256-258. doi:10.1038/nsmb0407-256
- Hobbs, E. C., Yin, X., Paul, B. J., et al. (2012). Conserved small protein associates with the multidrug efflux pump AcrB and differentially affects antibiotic resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109(41), 16696-16701. doi:10.1073/pnas.1210093109
- Horton, R. M. (1995). PCR-mediated recombination and mutagenesis. SOEing together tailor-made genes. *Mol Biotechnol*, 3(2), 93-99. doi:10.1007/BF02789105
- Hunke, S., Keller, R., & Müller, V. S. (2012). Signal integration by the Cpx-envelope stress system. *FEMS Microbiol Lett*, 326(1), 12-22.
- IFA - Institut für Arbeitsschutz der Deutschen Gesetzlichen Unfallversicherung. (2016). Liste der krebserzeugenden, keimzellmutagenen und reproduktionstoxischen Stoffe. Retrieved from <http://www.dguv.de/ifa%3B/fachinfos/kmr-liste/index.jsp>
- Iizuka, R., Yamagishi-Shirasaki, M., & Funatsu, T. (2011). Kinetic study of de novo chromophore maturation of fluorescent proteins. *Analytical Biochemistry*, 414(2), 173-178. doi:10.1016/j.ab.2011.03.036
- Imlay, J. A. (1995). A metabolic enzyme that rapidly produces superoxide, fumarate reductase of *Escherichia coli*. *J Biol Chem*, 270(34), 19767-19777.
- Imlay, J. A. (2003). Pathways of oxidative damage. *Annu Rev Microbiol*, 57, 395-418. doi:10.1146/annurev.micro.57.030502.090938
- Imlay, J. A. (2008). Cellular defenses against superoxide and hydrogen peroxide. *Annu Rev Biochem*, 77, 755-776. doi:10.1146/annurev.biochem.77.061606.161055
- Imlay, J. A. (2013). The molecular mechanisms and physiological consequences of oxidative stress: lessons from a model bacterium. *Nat Rev Micro*, 11(7), 443-454. doi:10.1038/nrmicro3032

- Imlay, J. A., & Fridovich, I. (1991). Assay of metabolic superoxide production in *Escherichia coli*. *J Biol Chem*, 266(11), 6957-6965.
- Isaac, D. D., Pinkner, J. S., Hultgren, S. J., et al. (2005). The extracytoplasmic adaptor protein CpxP is degraded with substrate by DegP. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102(49), 17775-17779. doi:10.1073/pnas.0508936102
- Jacobs, C., Joris, B., Jamin, M., et al. (1995). AmpD, essential for both beta-lactamase regulation and cell wall recycling, is a novel cytosolic N-acetylmuramyl-L-alanine amidase. *Mol Microbiol*, 15(3), 553-559.
- Jacoby, G. A. (2009). AmpC β -Lactamases. *Clin Microbiol Rev*, 22(1), 161-182. doi:10.1128/CMR.00036-08
- Jensen, L. J., Kuhn, M., Stark, M., et al. (2009). STRING 8—a global view on proteins and their functional interactions in 630 organisms. *Nucleic Acids Research*, 37(Database issue), D412-D416. doi:10.1093/nar/gkn760
- Jeong, H., Kim, J.-S., Song, S., et al. (2016). Pseudoatomic Structure of the Tripartite Multidrug Efflux Pump AcrAB-TolC Reveals the Intermeshing Cogwheel-like Interaction between AcrA and TolC. *Structure*, 24(2), 272-276. doi:10.1016/j.str.2015.12.007
- Jeong, K. S., Xie, Y., Hiasa, H., et al. (2006). Analysis of pleiotropic transcriptional profiles: a case study of DNA gyrase inhibition. *PLoS Genet*, 2(9), e152. doi:10.1371/journal.pgen.0020152
- Jian Wang, L. K., Wei Shen, Xiaoli Hu, Yizhong Shena and Shaopu Liu. (2014). Synergistic fluorescence quenching of quinolone antibiotics by palladium(II) and sodium dodecyl benzene sulfonate and the analytical application. *Anal. Methods*, 2014,6, 4343-4352.
- Johnson, J. M., & Church, G. M. (1999). Alignment and structure prediction of divergent protein families: periplasmic and outer membrane proteins of bacterial efflux pumps. *J Mol Biol*, 287(3), 695-715. doi:10.1006/jmbi.1999.2630
- Johnson, J. W., Fisher, J. F., & Mobashery, S. (2013). Bacterial cell-wall recycling. *Ann N Y Acad Sci*, 1277, 54-75. doi:10.1111/j.1749-6632.2012.06813.x
- Jones, C. H., Danese, P. N., Pinkner, J. S., et al. (1997). The chaperone-assisted membrane release and folding pathway is sensed by two signal transduction systems. *EMBO J*, 16(21), 6394-6406. doi:10.1093/emboj/16.21.6394
- Joshi, S. G., Cooper, M., Yost, A., et al. (2011). Nonthermal dielectric-barrier discharge plasma-induced inactivation involves oxidative DNA damage and membrane lipid peroxidation in *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother*, 55(3), 1053-1062. doi:10.1128/AAC.01002-10
- Juan, C., Macia, M. D., Gutierrez, O., et al. (2005). Molecular mechanisms of beta-lactam resistance mediated by AmpC hyperproduction in *Pseudomonas aeruginosa* clinical strains. *Antimicrob Agents Chemother*, 49(11), 4733-4738. doi:10.1128/AAC.49.11.4733-4738.2005
- Kaldalu, N., Mei, R., & Lewis, K. (2004). Killing by Ampicillin and Ofloxacin Induces Overlapping Changes in *Escherichia coli* Transcription Profile. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48(3), 890-896. doi:10.1128/AAC.48.3.890-896.2004
- Kaneko, K., Okamoto, R., Nakano, R., et al. (2005). Gene mutations responsible for overexpression of AmpC beta-lactamase in some clinical isolates of *Enterobacter cloacae*. *J Clin Microbiol*, 43(6), 2955-2958. doi:10.1128/Jcm.43.6.2955-2958.2005
- Kaper, J. B., Nataro, J. P., & Mobley, H. L. (2004). Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat Rev Microbiol*, 2(2), 123-140. doi:10.1038/nrmicro818
- Keren, I., Wu, Y., Inocencio, J., et al. (2013). Killing by bactericidal antibiotics does not depend on reactive oxygen species. *Science*, 339(6124), 1213-1216. doi:10.1126/science.1232688
- Kim, J.-S., Jeong, H., Song, S., et al. (2015). Structure of the Tripartite Multidrug Efflux Pump AcrAB-TolC Suggests an Alternative Assembly Mode. *Molecules and Cells*, 38(2), 180-186. doi:10.14348/molcells.2015.2277
- Knippers, R. (2006). *Molekulare Genetik*. Thieme Verlag, 9. Auflage.
- Kohanski, M. A., Dwyer, D. J., Hayete, B., et al. (2007). A common mechanism of cellular death induced by bactericidal antibiotics. *Cell*, 130(5), 797-810. doi:10.1016/j.cell.2007.06.049

- Kohanski, M. A., Dwyer, D. J., Wierzbowski, J., et al. (2008). Mistranslation of membrane proteins and two-component system activation trigger antibiotic-mediated cell death. *Cell*, 135(4), 679-690. doi:10.1016/j.cell.2008.09.038
- Kohiyama, M., Contremoulins, V., & Baudin, X. (2013). Trashing of Single-Stranded DNA Generated during Processing of Arrested Replication Fork in *E. coli*. *J Mol Biol*, 425(23), 4837-4844. doi:10.1016/j.jmb.2013.06.027
- Konaklieva, M. I. (2014). Molecular Targets of beta-Lactam-Based Antimicrobials: Beyond the Usual Suspects. *Antibiotics (Basel)*, 3(2), 128-142. doi:10.3390/antibiotics3020128
- Koo, M. S., Lee, J. H., Rah, S. Y., et al. (2003). A reducing system of the superoxide sensor SoxR in *Escherichia coli*. *EMBO J*, 22(11), 2614-2622. doi:10.1093/emboj/cdg252
- Kornberg, H. L. (1966). The role and control of the glyoxylate cycle in *Escherichia coli*. *Biochem J*, 99(1), 1-11.
- Koronakis, V., Eswaran, J., & Hughes, C. (2004). Structure and function of TolC: the bacterial exit duct for proteins and drugs. *Annu Rev Biochem*, 73, 467-489. doi:10.1146/annurev.biochem.73.011303.074104
- Koronakis, V., Sharff, A., Koronakis, E., et al. (2000). Crystal structure of the bacterial membrane protein TolC central to multidrug efflux and protein export. *Nature*, 405(6789), 914-919. doi:10.1038/35016007
- Korshunov, S., & Imlay, J. A. (2006). Detection and quantification of superoxide formed within the periplasm of *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 188(17), 6326-6334. doi:10.1128/JB.00554-06
- Korshunov, S., & Imlay, J. A. (2010). Two sources of endogenous hydrogen peroxide in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol*, 75(6), 1389-1401. doi:10.1111/j.1365-2958.2010.07059.x
- Kuczynska-Wisnik, D., Kedzierska, S., Matuszewska, E., et al. (2002). The *Escherichia coli* small heat-shock proteins IbpA and IbpB prevent the aggregation of endogenous proteins denatured in vivo during extreme heat shock. *Microbiology*, 148(Pt 6), 1757-1765. doi:10.1099/00221287-148-6-1757
- Kuhnert, P., Nicolet, J., & Frey, J. (1995). Rapid and accurate identification of *Escherichia coli* K-12 strains. *Appl Environ Microbiol*, 61(11), 4135-4139.
- Küster Anette, L. S., Hein Arne, Schönfeld Jens. (2013). Antibiotika in der Umwelt - Wirkung und Nebenwirkung.
- Lacroix, C., Giovannini, D., Combe, A., et al. (2011). FLP/FRT-mediated conditional mutagenesis in pre-erythrocytic stages of *Plasmodium berghei*. *Nat. Protocols*, 6(9), 1412-1428.
- Laponogov, I., Sohi, M. K., Veselkov, D. A., et al. (2009). Structural insight into the quinolone-DNA cleavage complex of type IIA topoisomerases. *Nat Struct Mol Biol*, 16(6), 667-669. doi:10.1038/nsmb.1604
- Leavitt, R. I., & Umbarger, H. E. (1962). Isoleucine and valine metabolism in *Escherichia coli*. XI. Valine inhibition of the growth of *Escherichia coli* strain K-12. *J Bacteriol*, 83, 624-630.
- Lee, D. J., Bingle, L. E., Heurlier, K., et al. (2009). Gene doctoring: a method for recombineering in laboratory and pathogenic *Escherichia coli* strains. *BMC Microbiol*, 9, 252. doi:10.1186/1471-2180-9-252
- Lee, D. J., Bingle, L. E. H., Heurlier, K., et al. (2009). Gene doctoring: a method for recombineering in laboratory and pathogenic *Escherichia coli* strains. *BMC Microbiology*, 9, 252-252. doi:10.1186/1471-2180-9-252
- Lehn, N., Stower-Hoffmann, J., Kott, T., et al. (1996). Characterization of clinical isolates of *Escherichia coli* showing high levels of fluoroquinolone resistance. *J Clin Microbiol*, 34(3), 597-602.
- Levy, S. B., Marshall, B., Rowse-Eagle, D., et al. (1980). Survival of *Escherichia coli* host-vector systems in the mammalian intestine. *Science*, 209(4454), 391-394.
- Lewis, R. J., Singh, O. M., Smith, C. V., et al. (1996). The nature of inhibition of DNA gyrase by the coumarins and the cyclothialidines revealed by X-ray crystallography. *EMBO J*, 15(6), 1412-1420.
- Lindberg, F., Lindquist, S., & Normark, S. (1987). Inactivation of the *ampD* gene causes semiconstitutive overproduction of the inducible *Citrobacter freundii* beta-lactamase. *J Bacteriol*, 169(5), 1923-1928.
- Lindberg, F., & Normark, S. (1986). Sequence of the *Citrobacter freundii* OS60 chromosomal *ampC* beta-lactamase gene. *Eur J Biochem*, 156(3), 441-445.

- Lindberg, F., & Normark, S. (1987). Common mechanism of *ampC* beta-lactamase induction in enterobacteria: regulation of the cloned *Enterobacter cloacae* P99 beta-lactamase gene. *J Bacteriol*, 169(2), 758-763.
- Lindquist, S., Lindberg, F., & Normark, S. (1989). Binding of the *Citrobacter freundii* AmpR regulator to a single DNA site provides both autoregulation and activation of the inducible *ampC* beta-lactamase gene. *J Bacteriol*, 171(7), 3746-3753.
- Ling, J., Cho, C., Guo, L. T., et al. (2012). Protein aggregation caused by aminoglycoside action is prevented by a hydrogen peroxide scavenger. *Mol Cell*, 48(5), 713-722. doi:10.1016/j.molcel.2012.10.001
- Liochev, S. I., & Fridovich, I. (1992). Fumarase C, the stable fumarase of *Escherichia coli*, is controlled by the *soxRS* regulon. *Proc Natl Acad Sci*, 89. doi:10.1073/pnas.89.13.5892
- Liu, Y., & Imlay, J. A. (2013). Cell death from antibiotics without the involvement of reactive oxygen species. *Science (New York, N.Y.)*, 339(6124), 1210-1213. doi:10.1126/science.1232751
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT Method. *Methods*, 25(4), 402-408. doi:10.1006/meth.2001.1262
- Livermore, D. M. (2003). Linezolid in vitro: mechanism and antibacterial spectrum. *J Antimicrob Chemother*, 51 Suppl 2, ii9-16. doi:10.1093/jac/dkg249
- Lu, C., Albano, C. R., Bentley, W. E., et al. (2005). Quantitative and kinetic study of oxidative stress regulons using green fluorescent protein. *Biotechnol Bioeng*, 89(5), 574-587. doi:10.1002/bit.20389
- M. Bühlte, M. G. (2014). *Escherichia coli*: Eigenschaften, Vorkommen und Präventionsmaßnahmen. Behr's Verlag.
- Macherey-Nagel. (06/2015). NucleoSpin RNA User manual. Rev. 7.
- Macherey-Nagel. (07/2014). NucleoSpin Gel and PCR Clean-up. Rev. 3.
- Madar, D., Dekel, E., Bren, A., et al. (2013). Promoter activity dynamics in the lag phase of *Escherichia coli*. *BMC Syst Biol*, 7, 136. doi:10.1186/1752-0509-7-136
- Mahoney, T. F., & Silhavy, T. J. (2013). The Cpx Stress Response Confers Resistance to Some, but Not All, Bactericidal Antibiotics. *J Bacteriol*, 195(9), 1869-1874. doi:10.1128/JB.02197-12
- Massé, E., & Gottesman, S. (2002). A small RNA regulates the expression of genes involved in iron metabolism in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99(7), 4620-4625. doi:10.1073/pnas.032066599
- Maxwell, A., & Lawson, D. M. (2003). The ATP-binding site of type II topoisomerases as a target for antibacterial drugs. *Curr Top Med Chem*, 3(3), 283-303.
- Mc Farland, J. (1907). The nephelometer: an instrument for estimating the number of bacteria in suspensions used for calculating the opsonic index and for vaccines. *Journal of the American Medical Association*, XLIX(14), 1176-1178. doi:10.1001/jama.1907.25320140022001f
- Messner, K. R., & Imlay, J. A. (1999). The identification of primary sites of superoxide and hydrogen peroxide formation in the aerobic respiratory chain and sulfite reductase complex of *Escherichia coli*. *J Biol Chem*, 274(15), 10119-10128.
- Messner, K. R., & Imlay, J. A. (2002). Mechanism of superoxide and hydrogen peroxide formation by fumarate reductase, succinate dehydrogenase, and aspartate oxidase. *J Biol Chem*, 277(45), 42563-42571. doi:10.1074/jbc.M204958200
- Miller, C., Thomsen, L. E., Gaggero, C., et al. (2004). SOS response induction by beta-lactams and bacterial defense against antibiotic lethality. *Science*, 305(5690), 1629-1631. doi:10.1126/science.1101630
- Mingeot-Leclercq, M. P., Glupczynski, Y., & Tulkens, P. M. (1999). Aminoglycosides: activity and resistance. *Antimicrob Agents Chemother*, 43(4), 727-737.
- Misra, R., & Reeves, P. R. (1987). Role of *micF* in the *tolC*-mediated regulation of OmpF, a major outer membrane protein of *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol*, 169(10), 4722-4730.
- Muhldorfer, I., & Hacker, J. (1994). Genetic aspects of *Escherichia coli* virulence. *Microb Pathog*, 16(3), 171-181. doi:10.1006/mpat.1994.1018

- Murakami, S., Nakashima, R., Yamashita, E., et al. (2006). Crystal structures of a multidrug transporter reveal a functionally rotating mechanism. *Nature*, 443(7108), 173-179. doi:10.1038/nature05076
- Murakami, S., Nakashima, R., Yamashita, E., et al. (2002). Crystal structure of bacterial multidrug efflux transporter AcrB. *Nature*, 419(6907), 587-593. doi:10.1038/nature01050
- Nagakubo, S., Nishino, K., Hirata, T., et al. (2002). The Putative Response Regulator BaeR Stimulates Multidrug Resistance of *Escherichia coli* via a Novel Multidrug Exporter System, MdtABC. *J Bacteriol*, 184(15), 4161-4167. doi:10.1128/JB.184.15.4161-4167.2002
- Nair, S. R., & Cherubin, C. E. (1978). Use of cefoxitin, new cephalosporin-like antibiotic, in the treatment of aerobic and anaerobic infections. *Antimicrob Agents Chemother*, 14(6), 866-875.
- Nakae, R., & Nakae, T. (1982). Diffusion of aminoglycoside antibiotics across the outer membrane of *Escherichia coli*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 22(4), 554-559.
- National Center of Biotechnology Information. (o.D.). Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov>
- Neeley, W. L., & Essigmann, J. M. (2006). Mechanisms of formation, genotoxicity, and mutation of guanine oxidation products. *Chem Res Toxicol*, 19(4), 491-505. doi:10.1021/tx0600043
- New England Biolabs. Retrieved from www.neb.com
- Nichols, D. S., & McMeekin, T. A. (2002). Biomarker techniques to screen for bacteria that produce polyunsaturated fatty acids. *J Microbiol Methods*, 48(2-3), 161-170.
- Nikaido, H., & Takatsuka, Y. (2009). Mechanisms of RND multidrug efflux pumps. *Biochim Biophys Acta*, 1794(5), 769-781. doi:10.1016/j.bbapap.2008.10.004
- Nollmann, M., Stone, M. D., Bryant, Z., et al. (2007). Multiple modes of *Escherichia coli* DNA gyrase activity revealed by force and torque. *Nat Struct Mol Biol*, 14(4), 264-271. doi:10.1038/nsmb1213
- Normark, S., & Burman, L. G. (1977). Resistance of *Escherichia coli* to penicillins: fine-structure mapping and dominance of chromosomal beta-lactamase mutations. *J Bacteriol*, 132(1), 1-7.
- O'Dea, M. H., Tamura, J. K., & Gellert, M. (1996). Mutations in the B subunit of *Escherichia coli* DNA gyrase that affect ATP-dependent reactions. *J Biol Chem*, 271(16), 9723-9729.
- Panaretou, B., Prodromou, C., Roe, S. M., et al. (1998). ATP binding and hydrolysis are essential to the function of the Hsp90 molecular chaperone in vivo. *EMBO J*, 17(16), 4829-4836. doi:10.1093/emboj/17.16.4829
- Park, S. J., Tseng, C. P., & Gunsalus, R. P. (1995). Regulation of succinate dehydrogenase (*sdhCDAB*) operon expression in *Escherichia coli* in response to carbon supply and anaerobiosis: role of ArcA and Fnr. *Mol Microbiol*, 15(3), 473-482.
- Paulsen, I. T., Park, J. H., Choi, P. S., et al. (1997). A family of gram-negative bacterial outer membrane factors that function in the export of proteins, carbohydrates, drugs and heavy metals from gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol Lett*, 156(1), 1-8.
- Peng, H., & Marians, K. J. (1993). *Escherichia coli* topoisomerase IV. Purification, characterization, subunit structure, and subunit interactions. *J Biol Chem*, 268(32), 24481-24490.
- Pfaffl, M. W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res*, 29(9), e45.
- Pfaffl, M. W. (2017). Gene Quantification Info - The Reference in qPCR & dPCR - Academic & Industrial Information Platform.
- Phillips, I., Culebras, E., Moreno, F., et al. (1987). Induction of the SOS response by new 4-quinolones. *J Antimicrob Chemother*, 20(5), 631-638.
- Piddock, L. J. V. (2006). Clinically Relevant Chromosomally Encoded Multidrug Resistance Efflux Pumps in Bacteria. *Clin Microbiol Rev*, 19(2), 382-402. doi:10.1128/CMR.19.2.382-402.2006
- Pradenas, G. A., Paillavil, B. A., Reyes-Cerpa, S., et al. (2012). Reduction of the monounsaturated fatty acid content of *Escherichia coli* results in increased resistance to oxidative damage. *Microbiology*, 158(Pt 5), 1279-1283. doi:10.1099/mic.0.056903-0

- Price, N. L., & Raivio, T. L. (2009). Characterization of the Cpx Regulon in *Escherichia coli* Strain MC4100. *J Bacteriol*, 191(6), 1798-1815. doi:10.1128/JB.00798-08
- Prigent-Combaret, C., Brombacher, E., Vidal, O., et al. (2001). Complex regulatory network controls initial adhesion and biofilm formation in *Escherichia coli* via regulation of the *csgD* gene. *J Bacteriol*, 183(24), 7213-7223. doi:10.1128/Jb.183.24.7213-7223.2001
- Pruss, B. M., Nelms, J. M., Park, C., et al. (1994). Mutations in NADH:ubiquinone oxidoreductase of *Escherichia coli* affect growth on mixed amino acids. *J Bacteriol*, 176(8), 2143-2150.
- Qiagen. (07/2010). Critical Factors for Successful Real-time PCR. Retrieved from www.qiagen.com
- Rainwater, S., & Silverman, P. M. (1990). The Cpx proteins of *Escherichia coli* K-12: evidence that *cpxA*, *ecfB*, *ssd*, and *eup* mutations all identify the same gene. *J Bacteriol*, 172(5), 2456-2461.
- Raivio, T. L., Popkin, D. L., & Silhavy, T. J. (1999). The Cpx envelope stress response is controlled by amplification and feedback inhibition. *J Bacteriol*, 181(17), 5263-5272.
- Reece, R. J., & Maxwell, A. (1991). DNA gyrase: structure and function. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 26(3-4), 335-375. doi:10.3109/10409239109114072
- Rohrwild, M., Pfeifer, G., Santarius, U., et al. (1997). The ATP-dependent HslVU protease from *Escherichia coli* is a four-ring structure resembling the proteasome. *Nat Struct Biol*, 4(2), 133-139.
- Rosner, J. L., & Martin, R. G. (2009). An Excretory Function for the *Escherichia coli* Outer Membrane Pore TolC: Upregulation of *marA* and *soxS* Transcription and Rob Activity Due to Metabolites Accumulated in *tolC* Mutants. *J Bacteriol*, 191(16), 5283-5292. doi:10.1128/JB.00507-09
- Rosner, J. L., & Martin, R. G. (2013). Reduction of cellular stress by TolC-dependent efflux pumps in *Escherichia coli* indicated by BaeSR and CpxARP activation of *spy* in efflux mutants. *J Bacteriol*, 195(5), 1042-1050. doi:10.1128/JB.01996-12
- Ruijter, J. M., Ramakers, C., Hoogaars, W. M. H., et al. (2009). Amplification efficiency: linking baseline and bias in the analysis of quantitative PCR data. *Nucleic Acids Research*, 37(6), e45-e45. doi:10.1093/nar/gkp045
- Ruiz, C., & Levy, S. B. (2014). Regulation of *acrAB* expression by cellular metabolites in *Escherichia coli*. *J Antimicrob Chemother*, 69(2), 390-399. doi:10.1093/jac/dkt352
- Ruiz, N., & Silhavy, T. J. (2005). Sensing external stress: watchdogs of the *Escherichia coli* cell envelope. *Curr Opin Microbiol*, 8(2), 122-126. doi:10.1016/j.mib.2005.02.013
- Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., et al. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, 239(4839), 487-491.
- Sambrook, J. F., Russel, D. W. (2001). *Molecular Cloning Volume 3. A Laboratory Manual*, Third Edition, A2.2.
- Sandoval, J. M., Arenas, F. A., & Vásquez, C. C. (2011). Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase Protects *Escherichia coli* from Tellurite-Mediated Oxidative Stress. *PLoS One*, 6(9), e25573. doi:10.1371/journal.pone.0025573
- Schröder, H., Langer, T., Hartl, F. U., et al. (1993). DnaK, DnaJ and GrpE form a cellular chaperone machinery capable of repairing heat-induced protein damage. *The EMBO Journal*, 12(11), 4137-4144.
- Schroder, W., Goerke, C., & Wolz, C. (2013). Opposing effects of aminocoumarins and fluoroquinolones on the SOS response and adaptability in *Staphylococcus aureus*. *J Antimicrob Chemother*, 68(3), 529-538. doi:10.1093/jac/dks456
- Schumacher, A., Trittler, R., Bohnert, J. A., et al. (2007). Intracellular accumulation of linezolid in *Escherichia coli*, *Citrobacter freundii* and *Enterobacter aerogenes*: role of enhanced efflux pump activity and inactivation. *J Antimicrob Chemother*, 59(6), 1261-1264. doi:10.1093/jac/dkl380
- Seaver, L. C., & Imlay, J. A. (2001). Alkyl Hydroperoxide Reductase Is the Primary Scavenger of Endogenous Hydrogen Peroxide in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 183(24), 7173-7181. doi:10.1128/JB.183.24.7173-7181.2001
- Seaver, L. C., & Imlay, J. A. (2004). Are respiratory enzymes the primary sources of intracellular hydrogen peroxide? *J Biol Chem*, 279(47), 48742-48750. doi:10.1074/jbc.M408754200

- Semchyshyn, H., Bagnyukova, T., & Lushchak, V. (2005). Involvement of *soxRS* regulon in response of *Escherichia coli* to oxidative stress induced by hydrogen peroxide. *Biochemistry (Mosc)*, 70(11), 1238-1244.
- Shaner, N. C., Campbell, R. E., Steinbach, P. A., et al. (2004). Improved monomeric red, orange and yellow fluorescent proteins derived from *Discosoma* sp. red fluorescent protein. *Nat Biotechnol*, 22(12), 1567-1572. doi:10.1038/nbt1037
- Shaw, K. J., Miller, N., Liu, X., et al. (2003). Comparison of the Changes in Global Gene Expression of *Escherichia coli* Induced by Four Bactericidal Agents. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 5(2), 105-122. doi:10.1159/000069981
- Shen, L. L. (1989). A reply: "Do quinolones bind to DNA?" - Yes.
- Sissi, C., & Palumbo, M. (2010). In front of and behind the replication fork: bacterial type IIA topoisomerases. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 67(12), 2001-2024. doi:10.1007/s00018-010-0299-5
- Smith, H. W. (1975). Survival of orally administered *E. coli* K 12 in alimentary tract of man. *Nature*, 255(5508), 500-502.
- Snyder, W. B., Davis, L. J., Danese, P. N., et al. (1995). Overproduction of NlpE, a new outer membrane lipoprotein, suppresses the toxicity of periplasmic LacZ by activation of the Cpx signal transduction pathway. *J Bacteriol*, 177(15), 4216-4223.
- Sobota, J. M., & Imlay, J. A. (2011). Iron enzyme ribulose-5-phosphate 3-epimerase in *Escherichia coli* is rapidly damaged by hydrogen peroxide but can be protected by manganese. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108(13), 5402-5407. doi:10.1073/pnas.1100410108
- Somers, J. M., Amzallag, A., & Middleton, R. B. (1973). Genetic Fine Structure of the Leucine Operon of *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol*, 113(3), 1268-1272.
- Spiro, S., Roberts, R. E., & Guest, J. R. (1989). FNR-dependent repression of the *ndh* gene of *Escherichia coli* and metal ion requirement for FNR-regulated gene expression. *Mol Microbiol*, 3(5), 601-608.
- Subach, O. M., Cranfill, P. J., Davidson, M. W., et al. (2011). An Enhanced Monomeric Blue Fluorescent Protein with the High Chemical Stability of the Chromophore. *PLoS One*, 6(12), e28674. doi:10.1371/journal.pone.0028674
- Südlabor SLG. (2014). User Manual HYPD100.
- Sulavik, M. C., Houseweart, C., Cramer, C., et al. (2001). Antibiotic Susceptibility Profiles of *Escherichia coli* Strains Lacking Multidrug Efflux Pump Genes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 45(4), 1126-1136. doi:10.1128/AAC.45.4.1126-1136.2001
- Taguchi, H. (2005). Chaperonin GroEL meets the substrate protein as a "load" of the rings. *J Biochem*, 137(5), 543-549. doi:10.1093/jb/mvi069
- Tamura, N., Murakami, S., Oyama, Y., et al. (2005). Direct interaction of multidrug efflux transporter AcrB and outer membrane channel TolC detected via site-directed disulfide cross-linking. *Biochemistry*, 44(33), 11115-11121. doi:10.1021/bi050452u
- Tatsumi, R., & Wachi, M. (2008). TolC-dependent exclusion of porphyrins in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 190(18), 6228-6233. doi:10.1128/JB.00595-08
- Teter, S. A., Houry, W. A., Ang, D., et al. (1999). Polypeptide Flux through Bacterial Hsp70: DnaK Cooperates with Trigger Factor in Chaperoning Nascent Chains. *Cell*, 97(6), 755-765. doi:10.1016/S0092-8674(00)80787-4
- Thede, G. L., Arthur, D. C., Edwards, R. A., et al. (2011). Structure of the Periplasmic Stress Response Protein CpxP. *J Bacteriol*, 193(9), 2149-2157. doi:10.1128/JB.01296-10
- Thermo Fisher Scientific. Retrieved from www.thermofisher.com
- Thermo Scientific. (2011). Manual Phusion High Fidelity DNA Polymerase. Retrieved from www.thermoscientific.com/fermentas
- Thermo Scientific. (2011). Product Information Maxima SYBR Green/ROX qPCR Mastermix. Retrieved from www.thermoscientific.com/fermentas

- Thermo Scientific. (2012). Product Information Thermo Scientific FastDigest DpnI. Retrieved from www.thermoscientific.com/onebio
- Thermo Scientific. (2012). Product Information Thermo Scientific Maxima Reverse Transcriptase. Retrieved from www.thermoscientific.com/onebio
- Thermo Scientific. (2013). Manual DreamTaq DNA Polymerase. Retrieved from www.thermoscientific.com/fermentas
- Thermo Scientific (2015). PCR Fidelity Calculator. Retrieved from <https://www.thermofisher.com>
- Thomas, V. C., Kinkad, L. C., Janssen, A., et al. (2013). A dysfunctional tricarboxylic acid cycle enhances fitness of *Staphylococcus epidermidis* during beta-lactam stress. *MBio*, 4(4). doi:10.1128/mBio.00437-13
- Thorbjarnardottir, S. H., Magnúsdóttir, R. A., & Eggertsson, G. (1978). Mutations determining generalized resistance to aminoglycoside antibiotics in *Escherichia coli*. *Mol Gen Genet*, 161(1), 89-98.
- Tikhonova, E. B., Yamada, Y., & Zgurskaya, H. I. (2011). Sequential mechanism of assembly of multidrug efflux pump AcrAB-TolC. *Chem Biol*, 18(4), 454-463. doi:10.1016/j.chembiol.2011.02.011
- Tomasiak, T., Cecchini, G., & Iverson, T. (2007). Succinate as Donor; Fumarate as Acceptor. *EcoSal Plus*. doi:10.1128/ecosal.3.2.6
- Tschauner, K., Hornschemeyer, P., Müller, V. S., et al. (2014). Dynamic interaction between the CpxA sensor kinase and the periplasmic accessory protein CpxP mediates signal recognition in *E. coli*. *PLoS One*, 9(9), e107383. doi:10.1371/journal.pone.0107383
- Unden, G., & Bongaerts, J. (1997). Alternative respiratory pathways of *Escherichia coli*: energetics and transcriptional regulation in response to electron acceptors. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1320(3), 217-234. doi:10.1016/S0005-2728(97)00034-0
- Unden, G., Steinmetz, P. A., & Degreif-Dunnwald, P. (2014). The Aerobic and Anaerobic Respiratory Chain of *Escherichia coli* and *Salmonella enterica*: Enzymes and Energetics. *EcoSal Plus*, 6(1). doi:10.1128/ecosalplus.ESP-0005-2013
- Vaara, M. (1992). Agents that increase the permeability of the outer membrane. *Microbiol Rev*, 56(3), 395-411.
- Vaccaro, L., Scott, K. A., & Sansom, M. S. P. (2008). Gating at Both Ends and Breathing in the Middle: Conformational Dynamics of TolC. *Biophys J*, 95(12), 5681-5691. doi:10.1529/biophysj.108.136028
- Van Acker, H., Sass, A., Bazzini, S., et al. (2013). Biofilm-grown *Burkholderia cepacia* complex cells survive antibiotic treatment by avoiding production of reactive oxygen species. *PLoS One*, 8(3), e58943. doi:10.1371/journal.pone.0058943
- Van Bambeke, F., Balzi, E., & Tulkens, P. M. (2000). Antibiotic efflux pumps. *Biochem Pharmacol*, 60(4), 457-470.
- Van Dyk, T. K., Majarian, W. R., Konstantinov, K. B., et al. (1994). Rapid and sensitive pollutant detection by induction of heat shock gene-bioluminescence gene fusions. *Appl Environ Microbiol*, 60(5), 1414-1420.
- VanBogelen, R. A., & Neidhardt, F. C. (1990). Ribosomes as sensors of heat and cold shock in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 87(15), 5589-5593.
- Varghese, S., Tang, Y., & Imlay, J. A. (2003). Contrasting sensitivities of *Escherichia coli* aconitases A and B to oxidation and iron depletion. *J Bacteriol*, 185. doi:10.1128/jb.185.1.221-230.2003
- Vega, D. E., & Young, K. D. (2014). Accumulation of periplasmic enterobactin impairs the growth and morphology of *Escherichia coli* tolC mutants. *Mol Microbiol*, 91(3), 508-521. doi:10.1111/mmi.12473
- Veinger, L., Diamant, S., Buchner, J., et al. (1998). The small heat-shock protein IbpB from *Escherichia coli* stabilizes stress-denatured proteins for subsequent refolding by a multichaperone network. *J Biol Chem*, 273(18), 11032-11037.
- Vogelstein, B., & Gillespie, D. (1979). Preparative and analytical purification of DNA from agarose. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 76(2), 615-619.
- Wandersman, C., & Delepelaire, P. (1990). TolC, an *Escherichia coli* outer membrane protein required for hemolysin secretion. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 87(12), 4776-4780.

-
- Wilde, R. J., & Guest, J. R. (1986). Transcript analysis of the citrate synthase and succinate dehydrogenase genes of *Escherichia coli* K12. *J Gen Microbiol*, 132(12), 3239-3251. doi:10.1099/00221287-132-12-3239
- Wiriyathanawudhiwong, N., Ohtsu, I., Li, Z. D., et al. (2009). The outer membrane TolC is involved in cysteine tolerance and overproduction in *Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 81(5), 903-913. doi:10.1007/s00253-008-1686-9
- Xu, Y., Lee, M., Moeller, A., et al. (2011). Funnel-like Hexameric Assembly of the Periplasmic Adapter Protein in the Tripartite Multidrug Efflux Pump in Gram-negative Bacteria. *J Biol Chem*, 286(20), 17910-17920. doi:10.1074/jbc.M111.238535
- Yamamoto, K., & Ishihama, A. (2006). Characterization of Copper-Inducible Promoters Regulated by CpxA/CpxR in *Escherichia coli*. *Biosci Biotechnol Biochem*, 70(7), 1688-1695. doi:10.1271/bbb.60024
- Yamanaka, H., Kobayashi, H., Takahashi, E., et al. (2008). MacAB is involved in the secretion of *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin II. *J Bacteriol*, 190(23), 7693-7698. doi:10.1128/JB.00853-08
- Yamanaka, H., Nomura, T., Fujii, Y., et al. (1998). Need for TolC, an *Escherichia coli* outer membrane protein, in the secretion of heat-stable enterotoxin I across the outer membrane. *Microb Pathog*, 25(3), 111-120. doi:10.1006/mpat.1998.0211
- Zgurskaya, H. I., Krishnamoorthy, G., Ntrel, A., et al. (2011). Mechanism and function of the outer membrane channel TolC in multidrug resistance and physiology of enterobacteria. *Frontiers in Microbiology*, 2. doi:10.3389/fmicb.2011.00189
- Zhang, A., Altuvia, S., Tiwari, A., et al. (1998). The OxyS regulatory RNA represses *rpoS* translation and binds the Hfq (HF-I) protein. *The EMBO Journal*, 17(20), 6061-6068. doi:10.1093/emboj/17.20.6061
- Zhang, A., Rosner, J. L., & Martin, R. G. (2008). Transcriptional activation by MarA, SoxS and Rob of two *tolC* promoters using one binding site: a complex promoter configuration for *tolC* in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol*, 69(6), 1450-1455. doi:10.1111/j.1365-2958.2008.06371.x
- Zhao, S., & Fernald, R. D. (2005). Comprehensive Algorithm for Quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction. *Journal of computational biology : a journal of computational molecular cell biology*, 12(8), 1047-1064. doi:10.1089/cmb.2005.12.1047
- Zheng, M., & Storz, G. (2000). Redox sensing by prokaryotic transcription factors. *Biochem Pharmacol*, 59(1), 1-6. doi:10.1016/S0006-2952(99)00289-0
- Zhou, X., Keller, R., Volkmer, R., et al. (2011). Structural basis for two-component system inhibition and pilus sensing by the auxiliary CpxP protein. *J Biol Chem*, 286(11), 9805-9814. doi:10.1074/jbc.M110.194092