

**Entstehung von Fluorchinolonresistenz bei**  
***Escherichia coli in vivo***

DISSERTATION ZUR ERLANGUNG DES DOKTORGRADES  
DER NATURWISSENSCHAFTEN (DR. RER. NAT.)  
DER NATURWISSENSCHAFTLICHEN FAKULTÄT III  
–BIOLOGIE UND VORKLINISCHE MEDIZIN–  
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG



vorgelegt von  
**Anne Rößger**  
aus Regensburg  
Januar 2008

Promotionsgesuch eingereicht am: 16.01.2008

Tag der mündlichen Prüfung: 02.04.2008

Die Arbeit wurde angeleitet von: PD Dr. med. Hans-Jörg Linde

Prüfungsausschuss: Vorsitz: Prof. Dr. rer. nat. Günther Hauska

1. Prüfer: Prof. Dr. rer. nat. Michael Thomm
2. Prüfer: PD Dr. med. Hans-Jörg Linde
3. Prüfer: Prof. Dr. rer. nat. Reinhard Wirth

## Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe des Literaturzitats gekennzeichnet.

Bei der Auswahl und Auswertung folgenden Materials haben mir die nachstehend aufgeführten Personen in der jeweils beschriebenen Weise unentgeltlich geholfen:

1. PD Dr. Hans-Jörg Linde (als Betreuer dieser Arbeit, Arbeitsgruppenleiter)

Weitere Personen waren an der inhaltlich-materiellen Herstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich hierfür nicht die entgeltliche Hilfe eines Promotionsberaters oder anderer Personen in Anspruch genommen. Niemand hat von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Anne Rößger  
Regensburg, 16.01.2008

1	Zusammenfassung.....	10
2	Einleitung .....	14
2.1	<i>Escherichia coli</i> .....	15
2.2	Bakterielle Resistenzentwicklung gegen Fluorchinolone.....	17
2.2.1	Struktur der Fluorchinolone.....	17
2.2.2	Eigenschaften von Fluorchinolonen .....	17
2.2.2.1	Pharmakodynamik .....	18
2.2.2.2	Wirkmechanismus der Fluorchinolone .....	18
2.2.2.3	Zielstruktur der Fluorchinolone.....	18
2.2.2.4	Veränderung der Genexpression durch Chinolone .....	19
2.2.2.5	Kinetik.....	20
2.3	Mechanismen der Fluorchinolonresistenz.....	20
2.3.1	Topoisomerasemutationen .....	21
2.3.2	Efflux und Influx .....	22
2.3.3	Plasmidvermittelte Resistenz.....	23
2.3.4	Chemische Modifizierung.....	24
2.3.5	Induktoren von Effluxsystemen .....	24
2.4	<i>In vitro</i> -Selektion.....	25
2.4.1	<i>In vitro</i> -Experimente.....	26
2.4.2	Fitness.....	26
2.4.3	Kompensatorische Mutationen.....	27
2.5	Vergleich von <i>in vitro</i> - zu <i>in vivo</i> -Mutanten .....	27
2.6	Fragestellung der Arbeit .....	29
3	Material und Methoden.....	32
3.1	Materialien.....	32
3.1.1	Organismen.....	32
3.1.2	Plasmide.....	32
3.1.3	Kits .....	34
3.1.4	Chemikalien, Plastikwaren und sonstige Hilfsmittel.....	34
3.1.5	Enzyme .....	34
3.1.6	Antibiotika.....	35
3.1.7	Lösungen.....	35
3.1.8	Nährmedien.....	36
3.1.9	Primer.....	37
3.1.10	Sequenzierung .....	41
3.1.11	Computerprogramme.....	42
3.1.12	Geräte .....	42
3.2	Methoden .....	43
3.2.1	Molekularbiologische Methoden.....	43
3.2.1.1	DNA-Arbeitstechniken.....	43
3.2.1.1.1	Isolierung von DNA.....	43
3.2.1.1.2	Isolation von Plasmiden .....	43
3.2.1.1.3	Restriktionsanalyse und -verdau.....	43
3.2.1.1.4	Elektrophorese von DNA in Agarosegelen.....	44
3.2.1.1.5	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen .....	45
3.2.1.1.6	Polymerase-Ketten-Reaktionen (PCR).....	45
3.2.1.1.6.1	Standard-PCR.....	45
3.2.1.1.6.2	RS-PCR (Restriction-Site-PCR) .....	46
3.2.1.1.6.3	Inverse PCR.....	48
3.2.1.1.6.4	Rep-PCR .....	49
3.2.1.1.6.5	Fusions-PCR.....	50
3.2.1.1.6.6	PCR zur Bestimmung der phylogenetischen Gruppe .....	51
3.2.1.1.7	Reinigung von PCR-Produkten .....	52
3.2.1.1.8	Klonierung von PCR-Produkten .....	52

3.2.1.1.9	Konzentrationsbestimmung von DNA .....	52
3.2.1.1.10	Behandlung mit alkalischer Phosphatase (CIP) .....	52
3.2.1.1.11	Ligation .....	53
3.2.1.2	RNA-Arbeitstechniken.....	53
3.2.1.2.1	Isolierung von RNA.....	53
3.2.1.2.2	Photometrische Konzentrationsbestimmung der RNA.....	53
3.2.1.2.3	DNaseI-Verdau .....	54
3.2.1.2.4	Reverse Transkription.....	54
3.2.1.2.5	Quantitative Real-time PCR.....	54
3.2.1.2.5.1	Quantifizierung von Real-time revers transkribierter RNA .....	54
3.2.1.2.5.2	Prinzip des LightCycler®s .....	55
3.2.1.2.5.3	Durchführung der Real-Time-PCR .....	56
3.2.1.2.5.4	Relative Quantifizierung von cDNA .....	56
3.2.1.2.6	Microarray.....	57
3.2.1.3	Herstellung kompetenter Zellen .....	58
3.2.1.3.1	Chemisch kompetente Zellen.....	58
3.2.1.3.2	Elektrokompetente Zellen .....	58
3.2.1.4	Transformation.....	59
3.2.1.5	Elektroporation.....	59
3.2.1.6	Konjugation.....	60
3.2.1.7	Phagentransduktion .....	60
3.2.1.7.1	Präparation des P1-Lysats.....	60
3.2.1.7.2	P1-Transduktion .....	61
3.2.1.8	Phänotypische Charakterisierung .....	61
3.2.1.8.1	Resistenzbestimmung mittels Etest®.....	61
3.2.1.8.2	Organic solvent tolerance (OST).....	61
3.2.1.8.3	Verwendung des API®20 E-Systems.....	62
3.2.1.8.4	Prüfung der Kanamycin-Resistenz.....	62
3.2.1.8.5	MHK-Bestimmung der Enterokokken .....	62
3.2.1.8.6	SIM-Test.....	63
3.2.1.8.7	Citrat-Test.....	63
3.2.1.8.8	MHK-Bestimmung mittels Mikrodilution.....	63
3.2.1.8.9	Untersuchung des aeroben und anaeroben Wachstumsverhaltens ....	64
3.2.1.8.10	Untersuchung des Wachstumsverhaltens in einer Mischkultur.....	64
3.2.1.9	Induktionsversuche.....	64
3.2.1.9.1	Induktionsversuche für visuelles System.....	64
3.2.1.9.2	Induktion für RNA-Isolierung .....	65
3.2.1.10	Biochemische Methoden.....	65
3.2.1.10.1	Southern Blotting .....	65
3.2.1.10.1.1	DNA-Isolierung.....	65
3.2.1.10.1.2	Verdau für Southern Blot.....	66
3.2.1.10.1.3	Herstellung einer mit Digoxigenin-markierten Sonde.....	66
3.2.1.10.1.4	Kapillarblot und Hybridisierung.....	66
3.2.1.10.2	HPLC (High Performance (Pressure) Liquid Chromatography) .....	66
3.2.1.10.2.1	Vorbereitung der Proben.....	67
3.2.1.10.2.2	Ablauf der Messungen mittels HPLC.....	67
3.2.1.10.2.3	Auswertung der Chromatogramme .....	68
3.3	Markierung mittels Reporterkonstrukt.....	68
3.3.1	Green fluorescent protein (Gfp) aus <i>Aequorea victoria</i> .....	68
3.3.2	Verwendung des <i>araB</i> -Promotors.....	69
3.4	Zellkultur.....	70
3.4.1	Verwendete Zellen.....	70
3.4.2	Verwendete Medien.....	70
3.4.3	Anzucht der Zellen.....	70

3.4.4	Splitten der Zellen.....	70
3.4.5	Einfrieren der Zellen .....	71
3.4.6	Auftauen von Zellen.....	71
3.4.7	Zelladhäsionsassay .....	71
3.4.7.1	Anzucht der HT-29-Zellen für den Adhäsionsassay .....	71
3.4.7.2	Anzucht der Keime für den Adhäsionsassay .....	71
3.5	Konfokale Lasermikroskopaufnahmen.....	72
3.5.1	Verwendete Medien und Puffer.....	72
3.5.2	Präparatherstellung und -fixierung .....	72
3.6	Tierversuch .....	73
3.6.1	Verwendete Tiere .....	73
3.6.2	Tierhaltung und Tierpflege .....	73
3.6.3	Ankunft und Eingewöhnungsphase.....	73
3.6.4	Gewichtsbestimmung der Ratten .....	73
3.6.5	Überprüfung des Futters auf Arabinose .....	74
3.6.6	Kolonisation des Rattendarms mit dem markierten <i>E. coli</i> .....	74
3.6.6.1	Kolonisation mit Hilfe von Wasser .....	74
3.6.6.2	Kolonisation mit Hilfe einer Sonde .....	74
3.7	Kontrolle der Stabilität der Kolonisation .....	74
3.7.1	Kotabnahme .....	74
3.7.2	Quantitative Verarbeitung von Kotproben .....	75
4	Ergebnisse .....	76
4.1	Chromosomale Markierung von <i>E. coli</i> mit <i>gfp</i> .....	76
4.1.1	Homologe Rekombination.....	76
4.1.1.1	Verwendung des <i>suicide</i> -Vektors pIVET <i>sacB</i> .....	77
4.1.1.2	Verwendung von $\lambda$ - <i>Red</i> -Systemen.....	78
4.1.1.2.1	pUC-araBPr-gbx .....	79
4.1.1.2.1.1	Klonierungsstrategie des Vektors pUC-araBPr-gbx.....	79
4.1.1.2.1.2	Überprüfung der Klone .....	79
4.1.1.2.1.3	Überprüfung der Gene <i>gam</i> , <i>bet</i> und <i>exo</i> auf ihre Funktionalität ..	79
4.1.1.2.2	pKD46-System.....	80
4.1.1.2.3	Herstellung des von homologen Bereichen flankierten Reportergens .	80
4.1.1.2.4	Chromosomale Integration des <i>gfp</i> in <i>E. coli</i> .....	82
4.1.1.3	Transduktion .....	83
4.1.2	Transposonmutagenese .....	83
4.1.2.1	Integration des <i>gfp</i> -Gens unter der Kontrolle des <i>araB</i> -Promotors in <i>suicide</i> -Vektor pLOF/Km.....	84
4.1.2.2	Konjugation mit pLOF/Km-araBPr- <i>gfp</i> .....	84
4.1.2.3	Transformation von pLOF/Km-araBPr- <i>gfp</i> in <i>E. coli</i> -4 .....	84
4.1.2.4	Phänotypische Untersuchung der entstandenen Klone <i>E. coli</i> -32 und <i>E. coli</i> -57 im Vergleich zum Wildtyp <i>E. coli</i> -4 .....	85
4.1.2.4.1	Wachstum von <i>E. coli</i> -32 und <i>E. coli</i> -57 unter aeroben und anaeroben Bedingungen im Vergleich zum Wildtyp <i>E. coli</i> -4 .....	85
4.1.2.4.2	Wachstum der Klone 57 und 32 in einer Mischkultur mit <i>E. coli</i> -4 .....	85
4.1.2.4.3	Antibiotikaresistenz.....	86
4.1.2.4.4	Organic Solvent Tolerance (OST) .....	86
4.1.2.4.5	Prüfung der biochemischen Profile mittels API®20 E- und Phoenix®-System .....	87
4.1.2.4.6	Untersuchung der Adhärenz mittels Zelladhäsionsassay .....	87
4.1.2.4.7	Darstellung der Adhärenz mittels Konfokalen Lasermikroskops .....	88
4.1.2.5	Genotypische Untersuchungen der <i>E. coli</i> -32 und <i>E. coli</i> -57 im Vergleich zum Wildtyp <i>E. coli</i> -4 .....	89
4.1.2.5.1	Rep-PCR .....	89
4.1.2.5.2	Phylogenetische Gruppe.....	89

4.1.2.6	Nachweis der chromosomalen Integration des Fragments Km-araPr-gfp im Klon <i>E. coli</i> -57.....	90
4.1.2.6.1	Plasmidisolierung.....	90
4.1.2.6.2	Southern Blot.....	91
4.1.2.6.3	Lokalisation der Integrationsstelle von pLOF/Km-araBPr-gfp .....	91
4.1.2.6.3.1	RS-PCR.....	91
4.1.2.6.3.2	Inverse PCR.....	92
4.2	Ratten-Selektionsmodell.....	92
4.2.1	Eingewöhnungsphase .....	92
4.2.2	Statusbestimmung der Darmflora .....	93
4.2.2.1	Phänotypische Charakterisierung ausgewählter Keime aus Rattenkot.....	93
4.2.2.1.1	Überprüfung auf Kanamycin-Resistenz.....	93
4.2.2.1.2	Untersuchung der Enterokokken auf Ampicillinresistenz.....	93
4.2.2.1.3	Untersuchung Laktose-positiver Keime auf Schwefelbildung, Indolproduktion, Beweglichkeit und Citratverwertung .....	93
4.2.2.1.4	Organic solvent tolerance (OST).....	94
4.2.2.1.5	Rep-PCR der <i>E. coli</i> -Isolate der nativen Rattendarmflora .....	94
4.2.2.1.6	Phylogenetische Gruppe der <i>E. coli</i> -Isolate aus dem Rattendarm.....	94
4.2.2.1.7	Plasmidisolierung bei <i>E. coli</i> -Isolaten aus der Normalflora der Ratte ..	95
4.2.2.1.8	MHK-Bestimmung der <i>E. coli</i> -Isolate aus der Normalflora der Ratte gegenüber Ciprofloxacin .....	95
4.2.2.1.9	Identifizierung der Laktose-negativen Kolonien aus der Normalflora der Ratte.....	95
4.2.3	Untersuchung des Rattenfutters auf Arabinose.....	95
4.2.4	Kolonisierung des Rattendarms mit <i>E. coli</i> -57.....	95
4.2.4.1	Ablauf der Kolonisierung .....	96
4.2.5	Bestimmung des Gewichts der Ratten.....	98
4.2.6	Gabe von Ciprofloxacin in unterschiedlichen Konzentrationen und verschiedenen Dosierungsschemata .....	98
4.2.6.1	Untersuchung der bei 160 µg/ml Ciprofloxacin isolierten Kanamycin-resistenten <i>E. coli</i> -4o1 und <i>E. coli</i> -4o2 .....	99
4.2.6.2	Bestimmung der Ciprofloxacinkonzentration mittels HPLC.....	100
4.3	Wirkung humaner Pharmazeutika auf die Induktion von Efflux .....	101
4.3.1	<i>High copy</i> -Plasmid-System.....	101
4.3.1.1	Klonierung der Reportergeren-Vektoren.....	101
4.3.1.1.1	Das <i>gfp</i> -Gen unter der Kontrolle des <i>norE</i> -Promotors.....	101
4.3.1.1.2	Das <i>gfp</i> -Gen unter der Kontrolle des <i>mdtM</i> -Promotors .....	102
4.3.1.1.3	Das <i>gfp</i> -Gen unter der Kontrolle des <i>rob</i> -Promotors .....	102
4.3.1.1.4	Das <i>gfp</i> -Gen unter der Kontrolle des <i>soxS</i> -Promotors .....	103
4.3.1.1.5	Das <i>gfp</i> -Gen unter der Kontrolle des <i>marRA</i> -Promotors .....	103
4.3.1.1.6	Das <i>gfp</i> -Gen unter der Kontrolle des <i>acrEF</i> -Promotors.....	103
4.3.1.2	Screening-System.....	104
4.3.1.3	Screening der Pharmazeutika.....	105
4.3.1.4	Induktion spezifischer Promotoren von Fluorchinolon-Transportern oder regulatorischer Proteinen.....	106
4.3.2	<i>Low copy</i> -Plasmid-System.....	106
4.3.2.1	Klonierung der Reportergeren-Vektoren.....	107
4.3.2.1.1	Das <i>gfp</i> -Gen unter der Kontrolle des <i>acrAB</i> -Promotors.....	107
4.3.2.1.2	Das <i>gfp</i> -Gen unter der Kontrolle des <i>acrEF</i> -Promotors.....	108
4.3.2.1.3	Das <i>gfp</i> -Gen unter der Kontrolle des <i>acrD</i> -Promotors.....	108
4.3.2.1.4	Das <i>gfp</i> -Gen unter der Kontrolle des <i>mdfA</i> -Promotors.....	108
4.3.2.1.5	Das <i>gfp</i> -Gen unter der Kontrolle des <i>marRA</i> -Promotors .....	108
4.3.2.1.6	Das <i>gfp</i> -Gen unter der Kontrolle des <i>rob</i> -Promotors .....	108

4.3.2.2	Überprüfung der Arabinose-abhängigen Transkription von pCC1_dB-Vektorgenen.....	108
4.3.2.3	Screening von Pharmazeutika .....	110
4.3.2.3.1	<i>E. coli</i> TM EPI300 mit pCC1-acrABPr-gfp.....	111
4.3.2.3.1.1	Wachstumsverhalten von <i>E. coli</i> TM EPI300 mit pCC1-acrABPr-gfp 111	
4.3.2.3.1.2	Untersuchung der <i>gfp</i> -Expression von pCC1-acrABPr-gfp.....	112
4.3.2.3.2	<i>E. coli</i> TM EPI300 mit pCC1-acrDPr-gfp .....	112
4.3.2.3.2.1	Wachstumsverhalten von <i>E. coli</i> TM EPI300 mit pCC1-acrDPr-gfp 112	
4.3.2.3.2.2	Untersuchung der <i>gfp</i> -Expression von pCC1-acrDPr-gfp.....	113
4.3.2.3.3	<i>E. coli</i> TM EPI300 mit pCC1-marRAPr-Tgfp .....	114
4.3.2.3.3.1	Wachstumsverhalten von <i>E. coli</i> TM EPI300 mit pCC1-marRAPr-Tgfp.....	114
4.3.2.3.3.2	Untersuchung der <i>gfp</i> -Expression von pCC1-marRAPr-Tgfp .....	115
4.3.2.3.4	<i>E. coli</i> TM EPI300 mit pCC1-robPr-Tgfp .....	116
4.3.2.3.4.1	Wachstumsverhalten von <i>E. coli</i> TM EPI300 mit pCC1-robPr-gfp.....	116
4.3.2.3.4.2	Auswirkungen auf die <i>gfp</i> -Expression von pCC1-robPr-Tgfp.....	117
4.3.2.4	Überprüfung auf Veränderung der Minimalen Hemmkonzentration (MHK) bei Substanzzusatz.....	118
4.4	Untersuchung der Auswirkung von Salizylat auf Virulenz/Adhärenz der uropathogenen <i>E. coli</i> -Stämme 1173 und 1267.....	121
4.4.1	Phänotypische Charakterisierung der <i>E. coli</i> -Isolate 1173 und 1267 .....	121
4.4.1.1	Resistenzbestimmung mittels Etest®.....	121
4.4.1.2	OST.....	121
4.4.2	Genotypische Charakterisierung der <i>E. coli</i> -Isolate 1173 und 1267 .....	122
4.4.2.1	Gentranskription bei <i>E. coli</i> 1173 und <i>E. coli</i> 1267 im Vergleich.....	123
4.4.2.1.1	Untersuchung von Effluxgenen und deren Regulatoren.....	123
4.4.2.1.2	Microarray.....	123
4.4.2.1.3	Untersuchung der Expression von Genen in Abhängigkeit von der Salizylatkonzentration .....	124
4.4.2.1.3.1	Untersuchung der <i>acrB</i> -Expression.....	124
4.4.2.1.3.2	Untersuchung der <i>motB</i> -Expression.....	125
4.4.2.1.3.3	Untersuchung der <i>hlyE</i> -Expression .....	126
4.4.2.1.3.4	Untersuchung der <i>sfaD/E</i> -Expression .....	128
4.4.2.1.3.5	Untersuchung der <i>marA</i> -Expression .....	129
4.4.2.2	Adhärenzunterschiede der Isolate 1173 und 1267 in der Abhängigkeit von der Salizylatkonzentration.....	130
5	Diskussion.....	133
5.1	GFP als Fluoreszenzmarker .....	133
5.2	Verwendung des <i>araB</i> -Promotors zur Steuerung der Gfp-Produktion.....	134
5.3	Chromosomale Markierung von <i>E. coli</i> mit <i>gfp</i> .....	134
5.3.1	Unterschiedliche Methoden zur chromosomalen Markierung durch homologe Rekombination.....	135
5.3.1.1	<i>Suicide</i> -Vektor-System .....	135
5.3.1.2	$\lambda$ - <i>Red</i> -System .....	137
5.3.1.3	Generelle Transduktion.....	140
5.3.2	Chromosomale Markierung mit Transposonmutagenese .....	142
5.3.2.1	Detektion der Integrationsstelle.....	144
5.4	Phänotypische Eigenschaften von <i>E. coli</i> -57, <i>E. coli</i> -32 und dem Wildtyp <i>E. coli</i> -4 im Vergleich .....	145
5.4.1	Biochemische Eigenschaften .....	145
5.4.2	Wachstum.....	145

5.4.3	Antibiotikaresistenz.....	146
5.4.4	Organic solvent tolerance .....	146
5.4.5	Adhärenz .....	146
5.5	Tierversuch .....	147
5.5.1	Auswirkungen der Kolonisation des Rattendarms mit <i>E. coli</i> -57 auf die Normalflora.....	147
5.5.2	Stabilität von <i>E. coli</i> -57 innerhalb der Normalflora.....	148
5.5.3	Selektion von Ciprofloxacin-resistenten Keimen <i>in vivo</i> .....	149
5.5.3.1	Einfluss der Mutationsrate auf die Entstehung von Resistenz .....	149
5.5.3.2	Erwerb von Antibiotikaresistenz über horizontalen Gentransfer .....	151
5.5.3.3	Auswirkung der Antibiotikum-Konzentration auf die Entstehung von resistenten <i>E. coli in vivo</i> .....	151
5.5.3.4	Zeitraum bis zur Entdeckung von resistenten <i>E. coli in vivo</i> .....	152
5.6	RT-PCR als Verfahren zu relativen Quantifizierung der Genexpression .....	152
5.7	Auswirkungen von pharmazeutischen Substanzen auf den Efflux .....	153
5.8	Auswirkung von unterschiedlichen Salizylatkonzentrationen auf Virulenz und Adhärenz der <i>E. coli</i> -Stämme 1173 und 1267 .....	155
5.9	Auswirkung von Pharmazeutika auf die MHK gegenüber Gentamicin, Norfloxacin und Ampicillin .....	160
6	Ausblick.....	163
7	Verzeichnisse.....	164
7.1	Abkürzungsverzeichnis.....	164
7.2	Literaturverzeichnis .....	167
8	Anhang.....	189
8.1	Microarraydaten .....	189
8.1.1	Effluxsysteme .....	189
8.1.2	Differentielle Transkription .....	190
8.2	Gelbilder.....	191
8.3	HPLC-Daten.....	195
9	Danksagung.....	196

## 1 Zusammenfassung

Die bakterielle Resistenzentwicklung stellt in der Humanmedizin ein zunehmendes Problem dar. *In vivo*-Modelle sind für die Untersuchung dieser Resistenzentwicklung von Mikroorganismen notwendig, da hier die Situation in einem Patienten – mit dem komplexen Zusammenspiel von Wirtsfaktoren, Normalflora und den interessierenden Organismen – simuliert werden kann. Die Akkumulation von Fluorchinolonresistenz-Mutationen kann einen Einfluss auf das Wachstumsverhalten haben. Unter der grob vereinfachenden Annahme, dass die Größe einer Kolonie der Teilungsrate entspricht, die für Überleben in gemischten Populationen bzw. der Auseinandersetzung mit dem Immunsystem des Wirts von entscheidender Bedeutung ist, zeigte sich sowohl bei *in vivo* als auch bei *in vitro* erzeugten Resistenz-Mutanten eine Veränderung der Fitness. Bei vergleichenden Untersuchungen von *in vivo* und *in vitro* erzeugten Resistenz-Mutanten zeigte sich, dass *in vitro*-Resistenz-Mutanten einen höheren Fitnessverlust aufweisen als *in vivo* erzeugte Resistenz-Mutanten. In seiner normalen Umgebung wird es dem Keim somit ermöglicht mit geringem oder ohne Fitnessverlust Resistenzen zu entwickeln.

Eine stabile phänotypische Markierung des in diesem Modell eingesetzten Keims ist nötig um die Resistenzentwicklung genau beobachten und untersuchen zu können. Diese Markierung erleichtert die spätere Identifizierung des eingesetzten Bakteriums innerhalb einer Mischkultur mit anderen Bakterien.

In dieser Arbeit sollte zuerst der aus dem Kot einer Ratte isolierte *Escherichia coli*-Stamm *E. coli*-4 chromosomal markiert werden. Ein Verlust oder der Transfer dieser Markierung auf ein anderes Bakterium sollte aufgrund der Integration in das Genom nur mit geringer Wahrscheinlichkeit stattfinden. Als Markergen wurde das *green fluorescent protein (gfp)* gewählt, da es eine einfache Detektion durch UV-Bestrahlung unter der Normalflora ermöglicht. Zur Vermeidung unerwünschter Effekte durch die konstitutive Expression des Reporterproteins Gfp während der Passage durch den Intestinaltrakt der Ratte – insbesondere für Gfp sind solche Phänomene beschrieben– wurde das *gfp*-Gen unter die Kontrolle des induzierbaren Promotors *araB* gebracht. Neben dem Markergen *gfp* wurde eine Kanamycin-Resistenzkassette in das Chromosom eingebracht. Die chromosomale Markierung erfolgte mittels Transposonmutagenese. Der daraus hervorgegangene Klon *E. coli*-57 zeigte im Vergleich zu seinem Wildtyp *E. coli*-4 kein verändertes biochemisches Verhalten, keine Veränderung im Wachstum (*in vitro*) in aeroben und anaeroben Milieu und keine Veränderung in der Adhärenz an humane Adenokarzinom-Zellen HT-29. Der Integrationsort der Markierung in das Genom von *E. coli*-57 konnte nicht festgestellt werden.

Im zweiten Teil der Arbeit sollte die Resistenzentwicklung des *gfp*-markierten *E. coli*-57 gegen Fluorchinolone *in vitro* und *in vivo* vergleichend untersucht werden.

Der *gfp*-markierte *E. coli*-57 war im *in vivo*-Selektionsmodell „Ratte“ ohne Antibiose kulturell über sechs Monate lang stabil nachweisbar. Die orale Gabe des Antibiotikums Ciprofloxacin über drei Tage verursachte bei *E. coli*-57 einen Verlust des *gfp*-Gens. Das Bandenmuster der Rep-PCR („*fingerprint*“-Methode) und die Ergebnisse des Southern Blot zeigten, dass es sich bei den entstandenen Kanamycin-resistenten Klonen *E. coli*-4o1 und *E. coli*-4o2 ursprünglich um *E. coli*-57 handelt. Die Klone zeigten im Vergleich zu *E. coli*-57 keine Veränderung der Minimalen Hemmkonzentration (MHK) gegen Ciprofloxacin.

Im dritten Teil der Arbeit sollte der induktive Einfluss von Substanzen auf die Expression von MDR-Transportern untersucht werden. Humanpathogene Bakterien besitzen eine Vielzahl solcher MDR-Transporter, deren differentielle Regulation eine Anpassung an die jeweilige Umwelt des Keims gewährleistet. Bisher sind wenige Substanzen bekannt, die als so genannte Induktoren eine Änderung der Expression von MDR-Transportsystemen verursachen (z. B. Azetylsalizylsäure).

Multiresistenz, d. h. Bakterien sind gegen eine Vielzahl von antibakteriellen Substanzklassen unempfindlich geworden, ist das Ergebnis des Zusammenwirkens von spezifischen Mechanismen und Uptake-/Efflux-Vorgängen durch *multi drug resistance* (MDR)-Transporter. Aufgrund dessen war ein weiteres Ziel dieser Arbeit die systematische Identifikation pharmakologischer Substanzen als Co-Medikation von Antibiotika, die Expressionssteigerungen von spezifischen MDR-Transportern auslösen.

Am Beispiel von den bekannten Fluorchinolon-Transportern AcrAB, AcrEF, AcrD, NorE, MdtH, MdtM und MdfA von *Escherichia coli* sollte in einem in Vorversuchen evaluierten Gfp-Reportersystem das induktive Potential dieser Pharmazeutika analysiert werden. Bei AcrAB handelt es sich um die am besten charakterisierte Effluxpumpe für Antibiotika in *E. coli*. Sie vermittelt eine hohe Resistenz gegenüber Fluorchinolonen. Das *mar*-Operon ist für die Regulation der Transkription von *acrAB*, *acrEF*, *acrD* und *mdfA* zuständig.

Für das Screening potentieller Induktoren wurden Reporterstämme generiert, die einen Vektor mit dem *gfp*-Reportergen unter der Kontrolle von jeweils einem Promotor der sieben bekannten Fluorchinolon-Pumpen tragen. Die in dem System ermittelte Gfp-Expression –gemessen als Fluoreszenz (visuelles Screening) oder als Transkription (Real-Time-PCR)– spiegelte das induktive Potential einer getesteten Substanz wieder.

Neben Azetylsalizylsäure wurden Ibuprofen, Ketoprofen, Paracetamol und die jeweiligen Lösungsmittel der Substanzen (100 %iger Ethanol oder 70 %iger Ethanol) auf induktive Wirkung hin untersucht. Azetylsalizylsäure wurde als einzige Substanz in 70 %igem Ethanol

gelöst. Für Ibuprofen, Ketoprofen und Paracetamol wurde 100 %iger Ethanol als Lösungsmittel verwendet.

Azetylsalizylsäure zeigte, wie erwartet, einen induktiven Effekt sowohl auf die Transkription von *acrAB* als auch auf die *marRA*-Transkription. Die Azetylsalizylatkonzentration von 5 mM verursachte eine 5-fache Hochregulation der *acrAB*-Transkription. Eine Steigerung der Expression von AcrAB um ein 2 bis 2,5-faches wurde durch 5mM Paracetamol und durch 5mM 70 %igen Ethanol verursacht. Bei 100 %igem Ethanol zeigte sich kein induktiver Effekt auf die *acrAB*-Transkription.

Die Expression von MarA wurde durch 5 mM Azetylsalizylsäure 3-fach hochreguliert. 5 mM Paracetamol verursachten eine 3,5-fache Hochregulation der *marA*-Transkription. Bei Ketoprofen war eine 2-fache, bei Ibuprofen und 100 %igem Ethanol eine fast 7-fache Hochregulation zu erkennen.

Eine Steigerung der Expression von *acrD* war bei allen fünf Substanzen zu beobachten. Azetylsalizylsäure (5 mM) regulierte die Expression um ein 3,5-faches, Paracetamol (5 mM) oder Ibuprofen (5 mM) um ein 4,5-faches und 70 %iger oder 100 %iger Ethanol um ein 3-faches hoch.

Eine Induktion des *acrEF*-Promotors oder des *norE*-Promotors war bei keiner der genannten Substanzen zu erkennen. Unter der Verwendung des Translationsenhancers von Cheng und Patterson zeigte sich eine Verstärkung der Translation von *norE* bei allen fünf im visuellen Screening-System ausgetesteten Substanzen.

Ibuprofen (5 mM) verursachte eine signifikante Erhöhung der minimalen Hemmkonzentration (MHK) von *E. coli* gegenüber Gentamicin und Norfloxacin um vier bis fünf Titerstufen.

Durch Salizylat kann auch die Virulenz und Adhärenz von Keimen verändert werden. Um die Auswirkungen von unterschiedlichen Salizylatkonzentrationen (5 mM–20 mM) auf *E. coli* zu untersuchen sollte die Adhärenz in der Zellkultur untersucht werden. Außerdem sollten die Expressionsänderungen von Adhärenz (*sfaD/E*, *motB*)- und Virulenzgenen (*hlyE*) mittels Real-Time-PCR (RT-PCR) untersucht werden. Die bei dieser Untersuchung verwendeten *E. coli*-Stämmen *E. coli* 1173 und *E. coli* 1267 zeigten bei einer Verwandtschaft unterschiedliche MHK (4 mg/l versus (vs) 256 mg/l) gegenüber Ciprofloxacin. Die stark erhöhte MHK von *E. coli* 1267 wird durch eine Deletion des C-Terminus des negativen Regulators MarA verursacht. Eine Erhöhung der Salizylatkonzentration verursachte bei *E. coli* 1267 keine Abnahme der Adhärenz. Bei *E. coli* 1173 zeigte sich im Zelladhäsionsassay bei einer Zunahme der Salizylatkonzentration von 5 mM auf 20 mM eine Abnahme der Adhärenz. Es konnte keine Veränderung in der Transkription der Gene *hlyE* (Hämolyisin), *sfaD/E* (S-Fimbrien) und *motB* (Motilität) in Abhängigkeit von der

Salizylatkonzentration beobachtet werden. Es war bei 20 mM Salizylat eine Steigerung der *acrB*-Transkription um den Faktor drei und eine 200-fache Steigerung der *marA*-Expression zu beobachten.

Im nicht-induzierten Zustand zeigten die Gene *hlyE*, *sfaD/E* und *motB* bei *E. coli* 1173 und *E. coli* 1267 im Vergleich keinen Expressionsunterschied.

## 2 Einleitung

Gegenstand der vorgelegten Dissertation ist die systematische vergleichende Untersuchung zur Resistenzentwicklung von *Escherichia coli* (*E. coli*) gegen Fluorchinolone *in vitro* und *in vivo*. Besonderes Augenmerk soll dabei erstens dem Einfluss der Induktion von Efflux durch humane Pharmazeutika und zweitens dem Zusammenhang zwischen Resistenzentwicklung und Pathogenität geschenkt werden.

Antibiotika werden in so verschiedenen Bereichen wie Humanmedizin, Tiermedizin, Tierzucht sowie der pflanzlichen Lebensmittelproduktion verwendet. Jede Anwendung von Antibiotika fördert die Selektion von resistenten Bakterien. Dies gilt insbesondere für die Substanzgruppe der (Fluor-) Chinolone (engl. Fluor-Quinolones), deren breiter Einsatz in der Humanmedizin wie der Lebensmittelproduktion zur Selektion von resistenten Mutanten und damit zur Einschränkung ihrer Anwendung geführt hat.

Am besten ist die Resistenzentwicklung gegenüber Fluorchinolonen derzeit bei klinischen Isolaten von *Enterobacteriaceae* dokumentiert. Nach nationalen Daten der Paul-Ehrlich-Gesellschaft ([www.p-e-g.de](http://www.p-e-g.de)) stieg der Anteil von Ciprofloxacin-resistenten *E. coli* in Deutschland in den Jahren von 1990 bis 2004 von 0,2 % auf 21,9 %. Im europäischen Vergleich besteht für Fluorchinolon-resistente *E. coli* ein deutliches Nord-Süd-Gefälle, bei dem im Süden von Europa ein Anteil von 25–50 % erreicht wird. (<http://www.rivm.nl/earss/>)

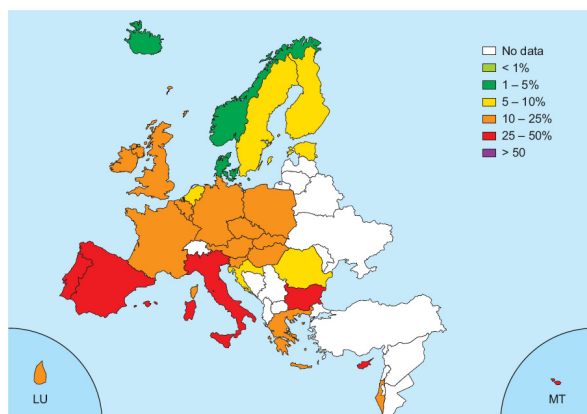


Figure 4.15. *Escherichia coli*: proportion of invasive isolates with resistance to fluoroquinolones in 2005.

**Abb. 1:** Anteil von invasiven *Escherichia coli*-Isolaten mit Fluorchinolon-Resistenz im Jahr 2005

**Quelle:** ([http://www.rivm.nl/earss/Images/EARSS %202005\\_tcm61-34899.pdf](http://www.rivm.nl/earss/Images/EARSS%202005_tcm61-34899.pdf))

Weil *E. coli* der häufigste Vertreter der *Enterobacteriaceae* im Darm des Menschen und Ciprofloxacin das am häufigsten eingesetzte Fluorchinolone ist, werden beide in der

vorliegenden Arbeit als Stellvertreter der *Enterobacteriaceae* bzw. der Fluorchinolone verwendet. Um die Resistenzentwicklung *in vivo* zu untersuchen, wurde ein Kolonisationsmodell im Rattendarm etabliert.

## 2.1 *Escherichia coli*

*E. coli* gehört innerhalb der Proteobakterien zu der Familie der *Enterobacteriaceae* und zählt zu den am intensivsten untersuchten Mikroorganismen sowohl aus dem Blickwinkel der humanpathogenen Bedeutung als auch der molekularbiologischen Grundlagenforschung.

*E. coli* kommt bei Mensch und Tier als Kommensale in der Normalflora des Gastrointestinaltrakts sowie der perianalen Haut vor. Isolate mit dieser Herkunft werden als fakultativ pathogen eingestuft, da sie bei Patienten mit Risikofaktoren zu so genannten nosokomialen (= im Krankenhaus erworbenen)

Infektionen führen<sup>131,141,179</sup>. Daneben besteht auch in der Umwelt (temperierte Erde, Süßwasserstrände) ein Reservoir von Vertretern von *E. coli*-Stämmen, die vermutlich nur eine geringe humanpathogene Bedeutung besitzen. Stämme aus der Umwelt lassen sich durch genotypische Merkmale von humanpathogenen Varianten abgrenzen<sup>6</sup>. Humanpathogene Stämme gehören meist zu den phylogenetischen Gruppen B2 und D<sup>41,66,124</sup>.

### Charakteristika *E. coli*

Gram-negative Stäbchen  
peritrich begeißelt  
fakultativ anaerob  
Laktose-positiv  
Mannit-positiv  
Glukose-positiv  
Oxidase-negativ  
Citrat-negativ  
H<sub>2</sub>S-Bildung-negativ  
nicht-sporenbildend

**Tab. 1:** Definition von Pathogenität, Virulenz, fakultativ pathogen und obligat pathogen

Begriff	Definition
Pathogenität	Fähigkeit eines Erregers eine Krankheit beim Wirt auszulösen
Virulenz	Maß der Fähigkeit eines Krankheitserregers einen Organismus zu infizieren
fakultativ pathogen	Keim erzeugt fallweise Krankheiten
obligat pathogen	Keim erzeugt immer eine Krankheit aus

Obligat pathogene Varianten von *E. coli* können bei Menschen und Tieren eine Reihe von spezifischen Krankheitsbildern auslösen können. Obligat pathogene und fakultativ pathogene *E. coli*-Stämme weisen eine unterschiedliche Anzahl und ein unterschiedliches Spektrum von offenen Leserahmen (*open reading frames*, ORFs) und regulatorischen Elementen auf<sup>66</sup>. Im Genom eines pathogenen Stammes können bis zu 10 % der für den apathogenen Laborstamm *E. coli* K12 spezifischen ORFs nicht detektiert werden. Bei

diesem Vergleich sind 27,2 % der translitierbaren ORFs zwischen dem pathogenen und dem kommensalen Stamm variabel und beinhalten das akzessorische Genom<sup>66</sup>. Die meisten der variablen chromosomalen Regionen bilden neben hypothetischen, nicht-klassifizierten und unbekanntem ORFs auch ORFs, die an der Lipopolysaccharid-Biosynthese beteiligt sind. Die konservierten *E. coli*-spezifischen Regionen des Genoms (= *core genome*) enthalten mindestens 3.100 translitierbare offene Leseraster des Stammes K12. Diese ORFs enthalten 232 Gene von *E. coli*, die für essentiell gehalten werden<sup>66</sup>.

Virulenzgene pathogener Bakterien befinden sich entweder auf mobilen genetischen Elementen (Bakteriophagen, Plasmide, Integrons) oder auf so genannten Pathogenitätsinseln. Die den Stämmen eigene Ausstattung an Pathogenitätsfaktoren und deren Expressionsmuster ist verantwortlich und entscheidend für die Auslösung eines bestimmten Krankheitsbildes<sup>131,159,289</sup>.

Bei extraintestinalen Erkrankungen wird eine Adaption an die neue Umgebung meist durch zusätzliche spezielle Pathogenitäts- und Virulenzfaktoren wie Adhäsine, Siderophore, Toxine, Invasine und eine Polysaccharid-Kapsel ermöglicht<sup>125</sup>. Eine Übersicht zu putativen Pathogenitätsfaktoren findet sich in Tabelle 2.

**Tab. 2:** Übersicht der putativen Pathogenitätsfaktoren von *E. coli*. Pathogenitätsfaktoren, die obligat zu einer klinisch manifesten Infektion führen, sind mit einem \* gekennzeichnet. Die in dieser Arbeit untersuchten Faktoren sind mit einem + gekennzeichnet.

<b>Bezeichnung einer Gruppe von Pathogenitäts- od. Virulenzfaktoren</b>	<b>Vertreter aus der jeweiligen Gruppe</b>
Adhäsine	CFAI/CFAII Typ-1-Fimbrien P-Fimbrien S-Fimbrien+ Intimin ( <i>eae</i> )
Invasine	Hämolysin+ Siderophore Shigella-ähnliches „Invasin“
Beweglichkeit, Chemotaxis	Flagellen+
Toxine	LT Toxin (Hitzelabiles Toxin) ST Toxin (Hitzestabiles Toxin) Shiga-ähnliches Toxin* Zytotoxine Endotoxin (LPS)

Bezeichnung einer Gruppe von Pathogenitäts- od. Virulenzfaktoren	Vertreter aus der jeweiligen Gruppe
Antiphagocytic surface properties	Kapsel K-Antigene LPS
Defense against serum bactericidal reaction	LPS  K-Antigene
Abwehr der Immunantwort	Kapsel K-Antigene LPS Antigen-Varianten
Genetic attributes	genetischer Austausch durch Transduktion u. Konjugation übertragbare Plasmide Resistenzfaktoren u. Antibiotika-Resistenz-Plasmide Toxin- u. andere Virulenzplasmide

## 2.2 Bakterielle Resistenzentwicklung gegen Fluorchinolone

### 2.2.1 Struktur der Fluorchinolone

Fluorchinolone sind eine Gruppe synthetisch hergestellter antibakterieller Substanzen, die als Grundstruktur ein bicyklisches aromatisches Ringsystem aufweisen. Ciprofloxacin ist der wichtigste klinische Vertreter<sup>7</sup>.

### 2.2.2 Eigenschaften von Fluorchinolonen

Fluorchinolone besitzen folgende klinisch wichtige Eigenschaften:

- schnelle Bakterizidie, z. T. auch auf ruhende Keime
- breites Aktivitätsspektrum (Gram-positiv, Gram-negativ, intrazelluläre Erreger)
- hohe orale Bioverfügbarkeit (i. d. R. > 90 %)
- gute Penetration in Gewebe, hohe intrazelluläre Konzentration (Vielfaches der Serumspiegel)
- günstiges Nebenwirkungsprofil

Diese Eigenschaften prädestinieren die Fluorchinolone zur Therapie von Harnwegsinfektionen, Pneumonien, Infekten von Weichteilen, Knochen und Haut im ambulanten und stationären Bereich.

### 2.2.2.1 Pharmakodynamik

Fluorchinolone ermöglichen ein schnelles Abtöten der Bakterien und sind somit bakterizid. Unter „Bakterizidie“ versteht man die Fähigkeit eines Antibiotikums die Zahl der lebenden Zellen um 3 log-Stufen innerhalb von 3 Stunden zu reduzieren<sup>112</sup>. Bei Fluorchinolonen lassen sich drei unterschiedliche Mechanismen, die zur Abtötung der Zellen führen, unterscheiden. Eine Typ-A-Bakterizidie zeigt sich bei Nalidixinsäure. Diese wirkt nur gegen sich teilende Bakterien und benötigt RNA- und Proteinsynthese. Bei Inhibierung der Proteinbiosynthese durch Zugabe von Rifampicin bzw. unter Wachstumsbedingungen ohne Zellteilung (Zellsuspension in PBS) zeigt sich keine bakterizide Wirkung.

Fluorchinolone mit Typ-B-Bakterizidie benötigen weder RNA- noch Proteinsynthese um einen bakteriziden Effekt aufzuweisen. Sie wirken auch gegenüber ruhenden Zellen. Für die Typ-C-Bakterizidie wird RNA- und Proteinsynthese benötigt. Die Zellen müssen sich jedoch nicht in Teilung befinden<sup>112</sup>. Eine Zusammenfassung zu Typ-A-, Typ-B- und Typ-C-Bakterizidie zeigt die folgende Tabelle 3<sup>112</sup>.

**Tab. 3:** Übersicht zu den unterschiedlichen Bakterizidie-Typen. „+“ entspricht ist nötig, „—“ entspricht nicht nötig

Voraussetzungen für	Typ-A-Bakterizidie	Typ-B-Bakterizidie	Typ-C-Bakterizidie
Wirkung			
RNA- und Proteinsynthese	+	—	+
Teilung der Zellen	+	—	—

### 2.2.2.2 Wirkmechanismus der Fluorchinolone

Die Fluorchinolone blockieren die DNA-Replikation<sup>62,228,268,303</sup>, die RNA-Synthese<sup>185,307</sup> und das Zellwachstum<sup>38,96</sup> über eine Arretierung der Topoisomerasen II und IV an der DNA.

### 2.2.2.3 Zielstruktur der Fluorchinolone

Bei *E. coli* gelangen die Fluorchinolone durch passive Diffusion und durch die Porine OmpF und OmpC in die Zelle und binden dann an ihre intrazellulären Zielstrukturen, die bakteriellen Topoisomerasen (DNA-Gyrase = Topoisomerase II; Topoisomerase IV)<sup>18</sup>.

Die Aufgabe der Gyrase besteht in der Einführung bzw. Aufhebung negativer Überspiralisierung in die DNA-Helix. Hierbei schneidet sie in einer ATP-abhängigen Reaktion

beide Stränge eines DNA-Segmentes, führt ein zweites Segment durch die Lücke und schließt diese wieder. Diese Überspiralisierung der DNA-Helix ermöglicht es erst das DNA-Molekül in der Bakterienzelle unterzubringen<sup>264,287</sup>.

Die Topoisomerase IV dekateniert ineinander greifende DNA-Moleküle (wie z. B. Plasmide, Tochterchromosomen), die während des Replikationsprozesses entstehen. Auch diese Reaktion verläuft unter Doppelstrangbruch und ATP-Verbrauch.

Das Enzym Gyrase ist ein Tetramer aus je zwei identischen Untereinheiten A und B, die von den Genen *gyrA* und *gyrB* kodiert werden. Die Topoisomerase IV besteht entsprechend der Gyrase aus den homologen Untereinheiten ParC und ParE<sup>75</sup>. *GyrA* und analog dazu ParC beinhalten das aktive Zentrum, welches den DNA-Doppelstrang schneidet und wieder ligiert, während *GyrB* und ParE für die Bindung von ATP als Energielieferant zuständig sind. Vergleicht man bei *E. coli* die DNA-Sequenzen von *gyrA* und *parC*, ergibt sich eine Homologie von 35,9 %. Zwischen *gyrB* und *parE* besteht eine Homologie von 40,1 %<sup>130</sup>. Trotz ihrer großen Ähnlichkeit sind die beiden Topoisomerasen nicht austauschbar. Die Funktion der DNA-Gyrase in der Bakterienzelle ist essentiell und kann durch kein anderes Enzym ersetzt werden.

Nach einem Modell zum Wirkmechanismus der Chinolone erfolgt die Inhibition der Nukleinsäure-Synthese durch Interaktion zwischen dem Fluorchinolon und einem aus DNA und Topoisomerase (*GyrA*- bzw. *ParC*-Untereinheit) gebildeten ternären Komplex<sup>74,107,111,260,308,315</sup>. Die Bindung des Fluorchinolons erfolgt wahrscheinlich zwischen der Helix-4-Struktur der *GyrA*- bzw. *ParC*-Untereinheit sowie Regionen in *GyrB* bzw. *ParE* und der DNA<sup>73</sup>. Durch Entfernung des Fluorchinolons und Zugabe von EDTA oder durch milde Hitzebehandlung kann der ternäre Komplex aufgelöst und der Doppelstrangbruch rückgängig gemacht werden. Diese Reversibilität deutet darauf hin, dass die entstandenen Strangbrüche selbst nicht letal sind<sup>73,183,228</sup>.

Die Hemmung der Gyrase und somit der Replikation erfolgt nach Zugabe von Fluorchinolon innerhalb von Minuten<sup>96,268</sup>. Diese schnelle Inhibierung ist reversibel<sup>96</sup> und ist vermutlich nicht die Ursache für den Zelltod. Bei der Topoisomerase IV erfolgt die Replikationshemmung in *E. coli* langsam, da die Topoisomerase IV hinter der Replikationsgabel agiert. Daher ist mehr Zeit für die Dissoziation des Komplexes und die Reparatur der Defekte<sup>138</sup>.

#### **2.2.2.4 Veränderung der Genexpression durch Chinolone**

Das SOS-Regulon besteht aus mehr als 30 Genen und wird von LexA unter günstigen Wachstumsbedingungen reprimiert. Die SOS-Antwort ist ein Reparaturmechanismus der Zelle, der nach schädigenden Einflüssen auf die DNA der Bakterien einsetzt<sup>179</sup>. Die

Expression des *recA*-Gens aus dem SOS-Regulon wird durch UV-Strahlung, Mitomycin und Chinolone induziert<sup>225</sup>. Die entstandenen DNA-Schäden induzieren die Proteasefunktion des RecA-Proteins, was zu einer Inaktivierung des LexA-Repressors führt. Normalerweise ist das RecA-Protein in Gegenwart von ATP für den Austausch von Komplementärsträngen bei der homologen Rekombination verantwortlich<sup>135,139,179</sup>.

Neben *recA* wird auch das Gen *sfiA* verstärkt abgelesen. Das SfiA-Protein inhibiert die Zellteilung und führt bei *E. coli* zur Bildung von langen und filamentösen Strukturen. Dieses *sfiA*-abhängige Wachstum der *E. coli*-Zellen ist eindeutig reversibel und hat daher wahrscheinlich keine entscheidende Rolle im schnellen Zelltod durch Fluorchinolone<sup>65,73,180</sup>. Da Fluorchinolone gesteigerte bakterizide Wirkung gegen Mutanten mit defektem SOS-Regulon zeigen<sup>160,225,300</sup>, scheint auch die Induktion der SOS-Antwort nur eine Komponente in dem komplexen Prozess der Bakterizidie der Fluorchinolone zu sein<sup>73,160,194,225,300</sup>.

Als nicht-spezifischer Faktor ist die Oberflächenhydrophobizität mitverantwortlich für die bakterielle Adhäsion. Die hydrophoben Eigenschaften sind für die Biofilmbildung und die Adhäsion an Epithelien verantwortlich. Unter subinhibitorischen Konzentrationen von Ciprofloxacin sinkt die Adhäsion von *E. coli* an Epithelzellen<sup>70,222,297,310</sup>. Allerdings zeigt sich eine gesteigerte Adhärenz an Plastikmaterialien wie z. B. Katheter<sup>15</sup>.

#### 2.2.2.5 Kinetik

Aufgrund der raschen enteralen Resorption wird der maximale Plasmaspiegel im Menschen bei oraler Gabe von Ciprofloxacin in der Regel nach 1,3 Stunden erreicht. Bei der Ratte ist dies schon nach 0,33 Stunden der Fall.

Die Halbwertszeit  $T_{1/2}$  von Ciprofloxacin liegt beim Menschen zwischen 4 und 5 Stunden. In der Ratte beträgt die Halbwertszeit 3 Stunden.

Die Ausscheidung der Fluorchinolone erfolgt nach vorheriger Metabolisierung in der Leber über den Urin und den Stuhl. Es finden sich für die verschiedenen Vertreter der Chinolone Unterschiede in der Ausscheidungsmenge über Stuhl und Urin. Nach oraler Gabe von Ciprofloxacin werden 44,7 % der Gesamtmenge und 11 % als Metabolite über den Urin ausgeschieden. Weitere 25 % der Gesamtmenge und 7,5 % als Metabolite werden über den Stuhl abgegeben. Im Gegensatz hierzu scheidet die Ratte 81 % über den Kot und 8,2 % über den Urin aus<sup>7,58</sup>.

### 2.3 Mechanismen der Fluorchinolonresistenz

Die Resistenzmechanismen gegen Fluorchinolone gehen größtenteils auf (Punkt-) Mutationen von chromosomalen Sequenzen zurück. Diese Mutationen verringern entweder

die Affinität der Zielstruktur (Untereinheiten GyrA/B der Topoisomerase II und ParC/E der Topoisomerase IV) zum Fluorchinolon, oder die Konzentration des Antibiotikums in der Zelle. Die Verringerung der Konzentration wird durch eine verminderte Permeabilität der Membranen und/oder aktiven Efflux hervorgerufen. Die von den Wachstumsbedingungen abhängige Mutationsrate wird von den Bakterien sehr genau kontrolliert. Die Mutationsrate *in vivo* wird von ganz spezifischen Stress-Bedingungen wie z. B. Begleitflora, Immunabwehr des Wirts, Antibiotika beeinflusst<sup>215</sup>. Da die MHK einer Ein-Schritt-Mutante weit unterhalb der Serumkonzentrationen liegt, die über mehrere Stunden bei einer Fluorchinolon-Therapie erreicht werden, kann eine klinisch relevante Resistenz (beträgt das 200-fache der Wildtyp-Resistenz), in einem Schritt im Serum bzw. Gewebe nicht selektioniert werden<sup>115</sup>. Laut Lewis *et al.* beträgt die Mutationsrate für jede einzelne dieser Mutationen zumindest  $10^{-7}$ <sup>161</sup>. Zur Überwindung des klinischen Grenzwertes in einem Schritt wären also mindestens  $10^{14}$  koloniebildende Einheiten (KBE) nötig, eine Zellzahl die unter physiologischen Bedingungen nicht auftritt<sup>171</sup>.

### 2.3.1 Topoisomerasemutationen

Zielstrukturveränderungen durch Punktmutationen betreffen bei Gram-negativen Bakterien die A-Untereinheit (*gyrA*) der DNA-Gyrase und die entsprechende Untereinheit (*parC*) der Topoisomerase IV. Generell konzentrieren sich Punktmutationen innerhalb der Gene für die Topoisomerase-Untereinheiten vorrangig auf die so genannte QRDR (*quinolone resistance determining region*). Bei *E. coli* liegt diese Region zwischen AS 67 bzw. 51 und AS 106. Der mutationsbedingte Austausch einzelner hochkonservierter Aminosäuren im Enzym führt zu einer Konformationsänderung, die entweder die Affinität zwischen Antibiotikum und Enzym, die Interaktion der Monomere oder die Affinität des Enzymkomplexes zum DNA-Strang verringert<sup>306,312,316</sup>.

Nahezu alle *high-level* Fluorchinolon-resistenten klinischen Isolate von *E. coli* besitzen eine Kombination aus Gyrase- und Topoisomerase IV-Mutationen<sup>103</sup>. Keine der bekannten Mutationen führt alleine zu einer klinisch relevanten Resistenz. Bis zu dem Erreichen einer klinisch relevanten Resistenz sind bei *E. coli* neben GyrA-Doppel-Mutationen in den Codons AS 83 und AS 87 auch Mutationen in der ParC-Untereinheit der Topoisomerase IV notwendig. Bei *E. coli* sind besonders häufig Mutationen, die die Aminosäuren AS 80 und AS 84 der ParC-Untereinheit betreffen, beteiligt<sup>103</sup>. Die Mutationen innerhalb von GyrA und ParC verringern die Affinität der Zielstrukturen (Untereinheiten GyrA/B der Topoisomerase II und ParC/E der Topoisomerase IV) für Fluorchinolone.

### 2.3.2 Efflux und Influx

Im Hinblick auf die Resistenzentwicklung gegen Fluorchinolone kommt Efflux als Mechanismus – in vielen Fällen im Synergismus mit einer verringerten Membranpermeabilität – möglicherweise eine größere Bedeutung zu als bisher angenommen wurde. Eine durch Efflux verursachte im Vergleich zur GyrA-Mutation eher geringe MHK-Erhöhung scheint auf den ersten Blick eine untergeordnete Rolle zu spielen, ermöglicht einer Subpopulation aber gegebenenfalls entsprechende Antibiotikakonzentrationen zu überleben, bis der Erwerb von anderen Mechanismen zu einer *high-level* Resistenz (Minimale Hemmkonzentration für Ciprofloxacin > 4 µg/ml) führt <sup>103</sup>.

Von 37 putativen MDR-Transportern (*multi drug resistance*) des *E. coli*-Genoms sind mindestens sieben (AcrAB, AcrEF, AcrD, MdfA, MdtK, MdtH und MdtM) am Efflux von Fluorchinolonen beteiligt <sup>210</sup>. Das am besten charakterisierte Effluxsystem bei den *Enterobacteriaceae* ist der zur RND-Familie (*resistance, nodulation, cell division*) der MDR-Transporter zählende AcrAB-TolC-Transporter von *E. coli* <sup>163,212,301</sup>. Neben dem zytoplasmatischen eigentlichen Pumpprotein AcrB wird dieser trimere Komplex noch von einem Membranfusionsprotein (AcrA) und dem Tunnelprotein TolC der äußeren Membran gebildet. AcrAB besitzt ein sehr breites Substratspektrum, denn neben Fluorchinolonen werden auch andere Antibiotika (u. a. Chloramphenicol, Tetrazyklin, Cefuroxim), Desinfektionsmittel (Triclosan) und lipophile Substanzen aktiv aus der Zelle entfernt <sup>78,176</sup>. Die Expression von AcrAB und der Mehrheit induzierbarer bakterieller Effluxsysteme wird auf der Ebene der Transkription durch spezifische oder globale Regulatoren kontrolliert. AcrAB wird auf einem geringen Level konstitutiv exprimiert, Änderungen der Expression sind fast immer Folge der Deregulation durch die Transkriptionsfaktoren AcrR, MarR/A, SoxS/R oder Rob <sup>97,208</sup>.

Eine gesteigerte Produktion der Untereinheiten des AcrAB-Effluxsystems in *E. coli* wird in der Mehrheit der bisher untersuchten klinischen Isolate durch Mutationen im *marRA*-Operon verursacht. Diese Mutationen führen zur Derepression des polycistronisch transkribierten Gens *marA* <sup>1</sup>. Als transkriptorischer Aktivator beeinflusst MarA neben den Genen des AcrAB-TolC-Transporters eine ganze Reihe von Genen, die als *mar*-Regulon zusammengefasst werden <sup>1</sup>. Der *mar*-Locus besteht aus zwei Operons, die den Operator *marO* flankieren. Das eine Operon kodiert für MarC, ein integrales Protein der Zytoplasmamembran, das möglicherweise eine Rolle in der Fluorchinolonresistenz spielt <sup>1</sup>. Das andere Operon *marRAB* kodiert für den Repressor MarR sowie für MarA und MarB <sup>45</sup>. MarA ist ein Transkriptionsaktivator, der einerseits durch Aktivierung von *micF* die Expression von *ompF* reprimiert <sup>45</sup>, andererseits die Expression der AcrAB-Effluxpumpe steigert <sup>214</sup>. Normalerweise wird die Expression von *marA* durch den Repressor MarR

reprimiert, bei Mutationen in *marR* oder *marO* kann *marA* aber konstitutiv transkribiert werden und es kommt zur Ausbildung des MAR-Phänotyps<sup>45</sup>. Die Funktion des Genprodukts von *marB* ist noch ungeklärt<sup>1</sup>. Asako *et al.* konnten 1997 zeigen, dass Mutationen in *marR*, die zu einer Überexpression von MarA und somit zur Ausprägung des MAR-Phänotyps führen, auch für Lösungsmittel-Toleranz in *E. coli* verantwortlich sind<sup>11</sup>.

Die intrazelluläre Menge an MarA wird neben MarR auch durch andere globale Regulatoren wie SoxS und Rob (MarA-Homologe) gesteuert. Eine detaillierte Darstellung der regulatorischen Kontrolle der Expression an AcrAB findet sich in Grikovic *et al.*<sup>97</sup>.

Bei *E. coli* ist der verringerte Einstrom von Chinolonen hauptsächlich auf eine Reduktion der Anzahl oder Veränderungen der OmpF-Porine in der äußeren Membran zurückzuführen<sup>104</sup>. Dies sind zum einen Mutationen in dem *ompF*-Gen selber, zum anderen können aber auch Mutationen im *mar*-Operon zu einer Reprimierung der *ompF*-Expression führen, was eine verminderte Fluorchinolon-Aufnahme zur Folge hat<sup>45,114</sup>.

### 2.3.3 Plasmidvermittelte Resistenz

Die bisher beschriebenen Mechanismen der Fluorchinolonresistenz sind alle chromosomal kodiert und können nicht horizontal auf andere Bakterien übertragen werden. 1998 berichteten Martinez-Martinez *et al.* über plasmidkodierte Fluorchinolon-Resistenz, die von *Klebsiella pneumoniae* auf *E. coli* übertragbar ist<sup>192</sup>. 2002 konnten Tran und Jacoby zeigen, dass diese Resistenz von dem *qnr*-Gen vermittelt wird, das Teil eines plasmidkodierten Integrons ist<sup>285</sup>. Der Resistenz-Mechanismus scheint nach bisherigen Vorstellungen auf einem Schutz der Gyrase (nicht aber der Topoisomerase IV) durch das Qnr-Protein zu beruhen. Strukturanalysen eines Qnr-Proteins aus *Enterococcus faecalis* (*E. faecalis*) zeigten, dass dieses Protein in Gestalt und Form der DNA ähnelt und elektrostatische Ähnlichkeiten zur DNA aufweist. Bei dem Vergleich der DNA-Sequenzen von *qnr*<sub>*E. faecalis*</sub> und *qnr*<sub>*E. coli*</sub> zeigte sich eine Homologie von 40 %<sup>10</sup>. Diese Fähigkeit die DNA nachzuahmen erklärt den inhibitorischen Effekt des Proteins auf die DNA-Gyrase und die Fluorchinolonresistenz. Ein ähnlicher Mechanismus kann bei Qnr-Protein aus *Klebsiella pneumoniae* erwartet werden<sup>10</sup>.

Qnr selbst vermittelt nur eine geringe Erhöhung der MHK um 1 –2 Titerstufen, es erleichtert aber die Selektion hochresistenter Mutanten und kann bereits bestehende Resistenz verstärken, wodurch *qnr* klinisch relevant sein könnte<sup>191,192</sup>.

In Japan wurde ein weiterer plasmid-vermittelter Mechanismus der Fluorchinolonresistenz entdeckt. In einem *E. coli*-Stamm wurde das plasmidkodierte Resistenzgen *qepA* identifiziert,

welches vermutlich für eine Effluxpumpe kodiert<sup>313</sup>. QepA zeigt deutliche Ähnlichkeit gegenüber Membrantransportern aus Aktinomyzeten (Gram-positive, filamentöse, GC-reiche Bakterien). Eine geringe Sequenzhomologie von *qepA* (weniger als 38 %) wurde mit der Effluxpumpe EmrB aus Gram-negativen Bakterien gefunden<sup>313</sup>. Die Transformation eines *qepA*-tragenden Plasmids in *E. coli* DH10B führt zu einem Anstieg der MHK gegenüber Norfloxacin von < 0,008 µg/ml auf 0,25 µg/ml<sup>313</sup>.

### 2.3.4 Chemische Modifizierung

Die chemische Modifizierung eines Antibiotikums durch eine Enzymaktivität kann die Inaktivierung des Antibiotikums zur Folge haben. Bekanntestes Beispiel ist die plasmidkodierte  $\beta$ -Lactamase, die  $\beta$ -Lactam-Antibiotika inaktiviert<sup>34</sup>. Robiscek *et al.* isolierten aus *E. coli* das plasmidkodierte Enzym aac(6')-Ib, welches über eine Azetylierung die Aktivität von Aminoglykosiden und bestimmten Fluorchinolonen (Ciprofloxacin, Norfloxacin) verringern kann<sup>240</sup>.

### 2.3.5 Induktoren von Effluxsystemen

Nicht nur über chromosomale Veränderungen kann es zur Induktion von Efflux und somit zur Resistenzentwicklung kommen, sondern auch über externe Faktoren wie z. B. Salizylat. Salizylat induziert in therapeutisch genutzten Konzentrationen die Expression von MarA durch eine Aufhebung der MarR-Repression<sup>2,189</sup>, während beispielsweise Paraquat durch die Oxidation des Repressors SoxR die Expression von SoxS fördert. Ethanol, „*pine oil*“, Naphthochinone (Plumbagin) und Gallensalze verursachen (als mögliche Induktoren) Efflux-Phänotypen<sup>177,202,258,283</sup> und rufen z. T. einen MAR-Phänotyp hervor.

Im Fall von Salizylat zeigte sich bei *in vitro* Untersuchungen zur Resistenzentwicklung in *E. coli*, dass Salizylat die natürliche Empfindlichkeit durch Effluxinduktion um den Faktor 8–10 verringert werden kann. Unter dem Einfluss von Salizylat (2 mM) konnten in 10<sup>10</sup> KBE Mutanten selektioniert werden, deren MHK mit 1 µg/ml vierfach über dem Wert einer Einschnitt-Mutante lag, während ohne Einfluss dieses Induktors keine resistenten Stämme selektioniert werden konnten<sup>84</sup>.

Die molekulare Wirkungsweise von Salizylat als ein Induktor auf den *Uptake/Efflux*-Komplex ist weitgehend aufgeklärt<sup>47</sup>. Salizylat inaktiviert durch sterische Bindung den Repressor MarR und verhindert die Dimerisierung und die Bindung an die Operator-Region des *marRAB*-Operons. Infolge der dadurch gesteigerten Produktion des globalen Regulators MarA kommt es zu einer Verringerung der Produktion von Porinen wie OmpF und möglicherweise OmpC<sup>245</sup>, sowie gleichzeitig zu einer gesteigerten Expression von AcrAB, was synergistisch zu einer verringerten Akkumulation von Antibiotika in der Zelle führt<sup>177</sup>.

Die Salizylat-induzierte Reduktion von OmpF wird durch die verstärkte Transkription der *antisense*-RNA *micF* gesteuert, deren Interaktion mit der mRNA von *ompF* die Translation verhindert<sup>245</sup>. Neben Salizylat haben auch Gewürze (z. B. Paprika, Estragon, Zimt) und Haushaltsprodukte (z. B. Senf, Haargel, Badeschaum, Chili-Knoblauch-Sauce) eine induzierende Wirkung auf das *mar*-Operon und somit auf AcrAB-TolC<sup>238</sup>.

Neben AcrAB-TolC wird zumindest die Transkription der Gene zweier weiterer MDR-Efflux-Pumpen (EmrAB und ErmKY) in *E. coli* von Salizylat induziert. Tetrazyklin und Chloramphenicol besitzen ebenfalls eine induzierende Wirkung auf diese Effluxpumpen<sup>170,279</sup>.

Neben Salizylat, Paraquat, Ethanol, Gallensalzen und Haushaltsprodukten sind bisher keine weiteren Induktoren identifiziert worden. Im Hinblick auf eine Resistenzentwicklung gegen Fluorchinolone verursachen Induktoren aber mit ihrer Wirkung auf den *Uptake/Efflux*-Komplex eine erhöhte Wahrscheinlichkeit der Selektion von Mutanten. Viele pharmakologische Substanzen (Medikamente bzw. deren Inhaltsstoffe), die während einer Antibiotika-Therapie zusätzlich verabreicht werden (Co-Medikation), sind in dieser Hinsicht noch nicht auf ihr Potential als Induktor untersucht worden. Besonders interessant sind dabei oral applizierte Medikamente, weil sie im Darm hohe Spiegel erreichen und dort mit einer großen *E. coli*-Population in Kontakt kommen. Da während einer Antibiotika-Therapie häufig Schmerzmittel mit anti-entzündlicher Wirkung verabreicht werden, sind diese Substanzen als potentielle Induktoren von Interesse.

## 2.4 *In vitro*-Selektion

Damit *E. coli* gegenüber Fluorchinolonen eine klinisch relevante Resistenz erreicht, müssen mehrere Targetmutationen akkumulieren<sup>103</sup>. Einzelne Mutationen führen zwar zu keiner klinisch relevanten Resistenz, allerdings können sie dem Organismus unter einem bestimmten Selektionsdruck einen entscheidenden Vorteil gegenüber Konkurrenten in der Normalflora verschaffen<sup>134,165,166</sup>. Das Muster Targetmutation/Steigerung des Efflux/Targetmutation zeigt sich bei der *in vitro*-Selektion von resistenten Keimen auf chinolonhaltigen Medien.

Bei der Selektion von resistenten Keimen *in vitro* zeigen sich veränderte Wachstumseigenschaften mit kleineren Koloniedurchmessern und eine verminderte Zellteilungsrate. Nach 200–300-maligem Passagieren dieser Selektanten zeigt sich wieder ein normaler Phänotyp mit einem normalen Spiralisierungsgrad der DNA<sup>253</sup>. Dieser Entwicklung liegen wahrscheinlich kompensatorische Mutationen zu Grunde.

### 2.4.1 *In vitro*-Experimente

Um die Art und die Abfolge der Mutationen genauer zu untersuchen wurden *in vitro*-Experimente mit *E. coli*-Stämmen durchgeführt. In diesen Versuchen wurde auf eine ciprofloxacinhaltige LB-Platte (0,064 µg/ml) ein *E. coli*-Stamm mit einer MHK von 0,003 µg/ml ausplattiert. Viele hieraus hervorgegangenen Selektanten zeigten danach veränderte Wachstumseigenschaften mit kleineren Koloniedurchmessern und verminderter Zellteilungsrate<sup>104,165,298</sup>. Neben einer verlängerten Generationszeit kam es zur Abnahme des negativen Superspiralisierungsgrads der DNA und zum Verlust der Typ-1-Fimbrienexpression<sup>13,14</sup>. Fimbrien vermitteln in einem ersten Schritt der Pathogenese die Adhärenz des Bakteriums an eine Zelle des Wirts. Keime mit verminderter Fimbrienexpression besitzen wahrscheinlich eine verminderte pathogene Potenz<sup>13,19</sup>.

### 2.4.2 Fitness

Der Fortpflanzungserfolg und somit das Wachstumsverhalten von Bakterien kann als „Fitness“ bezeichnet werden<sup>22,158,172,237</sup>. Es kann also ein Unterschied in der „Fitness“ angenommen werden, wenn sich Mutanten in der Koloniegröße und somit der Teilungsrate unterscheiden. Diese Teilungsrate ist für das Überleben in gemischten Populationen bzw. der Auseinandersetzung mit dem Immunsystem des Wirts von entscheidender Bedeutung<sup>99</sup>. Eine Veränderung der „Fitness“ kann sowohl bei *in vitro* als auch bei *in vivo* erzeugten Resistenz-Mutanten beobachtet werden<sup>22,158,237</sup>.

Da Antibiotika auf essentielle Genprodukte und Funktionen innerhalb der Zelle einwirken, beeinflussen Mutationen innerhalb dieser Gene den bakteriellen Stoffwechsel und das Wachstumsverhalten möglicherweise negativ. Bei Fluorchinolon-resistenten *Campylobacter* konnte gezeigt werden, dass es mit hoher Wahrscheinlichkeit vom genetischen Hintergrund abhängt, ob sich eine Mutation in GyrA positiv oder negativ auf die „Fitness“ auswirkt<sup>175</sup>. Bei *E. coli* (klinische Isolate), *Salmonella typhimurium* (*in vitro*-Mutanten) und *Mycobacterium tuberculosis* (klinische Isolate) mit Mutationen in *rpsL* (kodiert für das 30S ribosomale Protein S12) konnte keine messbare Reduktion der Wachstumsrate beobachtet werden<sup>21,23,232,248</sup>. Bei *Streptococcus pneumoniae* mit einer Mutation in GyrA oder ParC zeigte sich ein Fitnessverlust von bis zu 8%. Eine zweite Mutation verursachte bei *Streptococcus pneumoniae* keine weitere Erhöhung des Fitnessverlustes<sup>246</sup>.

In Bezug auf die Resistenz gegenüber Fluorchinolonen und deren Auswirkung auf die biologische „Fitness“ von *E. coli* wurde gezeigt, dass die Akkumulierung von Fluorchinolonresistenz-Mutationen eine starke Abnahme der „Fitness“ zur Folge hat. Diese zeigte sich sowohl *in vitro* als auch *in vivo*<sup>98,146</sup>.

Die Abnahme der Fimbrienexpression verschlechtert die Konkurrenzfähigkeit des Bakteriums gegenüber der Normalflora (bei der Kolonisation) und gegen das Immunsystem des Wirts<sup>13,19</sup>.

### 2.4.3 Kompensatorische Mutationen

Resistente Bakterien haben gegenüber ihren Wildtypen bei einer Antibiotika-haltigen Umgebung einen großen Selektionsvorteil, auch wenn sie im Vergleich zum Wildtyp einen „Fitnessnachteil“ haben. Dieser Vorteil wird sofort zum Nachteil, sobald der Selektionsdruck Antibiotikum wegfällt. Tritt dieser Fall ein, dann hat die resistente Mutante zwei Möglichkeiten um wieder konkurrenzfähig zu dem Wildtyp zu werden. Entweder revertiert die resistente Mutante die Mutation, die zur Antibiotika-Resistenz geführt hat und wird somit wieder Antibiotika-sensibel, oder es kommt zu kompensatorischen Mutationen, die den Fitnessverlust durch Resistenz-assoziierte Mutationen teilweise ausgleichen<sup>22,237</sup>. Die Wahrscheinlichkeit einer Revertierung der Mutation liegt zwischen  $10^{-11}$ – $10^{-9}$ <sup>104</sup>. Es handelt sich dabei um eine einzelne spezifische Nukleotidveränderung. Kompensatorische Mutationen treten mit einer Wahrscheinlichkeit von  $10^{-6}$  auf<sup>147</sup>. Es wird vermutet, dass die Kompensation durch Mutation in einem unbekanntem Gen (Deletion, Insertion, Basenpaarsubstitution usw.) entsteht, was eine höhere Mutationsrate zur Folge hat<sup>30,113,147</sup>. Kompensatorische Mutationen tragen so vermutlich zur Stabilisierung der Antibiotika-Resistenz in einer Bakterienpopulation<sup>22,158</sup>.

Bei einem chromosomal vorhandenen Resistenz-Gen kann eine „Revertierung“ der Resistenz über *gene silencing* erfolgen. In Anwesenheit des Selektionsdrucks „Antibiotikum“ wird das Resistenz-Gen abgelesen, in Abwesenheit wird es nicht exprimiert<sup>80</sup>.

## 2.5 Vergleich von *in vitro*- zu *in vivo*-Mutanten

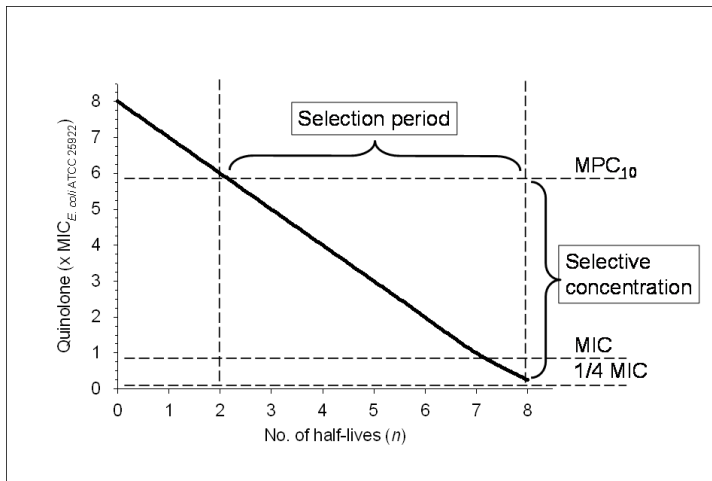
Grundsätzlich sind im Patienten (*in vivo*) Antibiotikakonzentrationen nicht so konstant wie unter *in vitro*-Bedingungen. Sie unterliegen während einer Therapie komplexen Mustern und schwanken im Zeitverlauf sowie gewebe- bzw. kompartimentabhängig. Insbesondere nach der letzten Gabe wird der gesamte Konzentrationsbereich vom Spitzenspiegel bis zum völligen Verschwinden der Substanz durchschritten. Diese notwendig auftretenden subinhibitorischen Antibiotikakonzentrationen sind vermutlich die optimale Umgebung für die Selektion von resistenten Mutanten innerhalb einer langsam wachsenden und ansonsten empfindlichen Bakterienpopulation<sup>55,71-73,81</sup>.

Zur Abschätzung des Selektionspotentials eines Antibiotikums wurde zusätzlich zur MHK (Minimale Hemmkonzentration) die MPC (*mutant prevention concentration*) eingeführt<sup>71-73</sup>. Der MPC-Wert definiert die niedrigste Antibiotikakonzentration, die das Wachstum von

Einschrittmutanten innerhalb einer Bakterienpopulation von  $10^{10}$  KBE inhibiert<sup>68</sup>. Um bei der MPC wachsen zu können, brauchen Bakterien zwei oder mehr Mutationen, die zur Resistenz führen. Die Wahrscheinlichkeit einer Mutation liegt unter  $10^{-7}$  und das würde bedeuten, dass eine Bakterienpopulation von mindestens  $10^{14}$  Zellen für das gleichzeitige Vorliegen von zwei unabhängigen Mutationen benötigt wird<sup>171</sup>. Das Auftreten von  $10^{14}$  Zellen bei einer Infektion ist unwahrscheinlich<sup>71</sup>. Im gesunden Darm befinden sich z. B.  $10^4$ – $10^6$  KBE/g Stuhl von *Enterobacteriaceae*<sup>164</sup>.

Im Prinzip repräsentiert das Intervall zwischen der geringsten Antibiotikakonzentration, die gerade noch das Wachstum einer sensiblen Wild-Typ-Population verhindert (MHK), und dem MPC-Wert den Konzentrationsbereich (*mutant selection window*, MSW), in dem resistente Mutanten selektiert werden können<sup>72,76,317</sup>. Die untere Grenze des MSW bildet die Antibiotikakonzentration, bei der noch ein Wachstumsvorteil eines resistenten Stammes gegenüber einem Wildtyp besteht, die Obergrenze ist die MPC<sup>71-73</sup>.

Oberhalb des MSW, also oberhalb der MPC, werden auch Einschritt-Mutanten inhibiert. Aus dem MPC-Wert, der Spitzenkonzentration und der Halbwertszeit einer Substanz lässt sich der Zeitraum (*mutant selection period*) prognostizieren, in dem resistente Keime entstehen (siehe Abbildung 2).



**Abb. 2:** Darstellung von „mutant selection period“ und „mutant selective concentration“

**Quelle:** Linde, H.J. Mutant prevention concentration of nalidixic acid, ciprofloxacin, clinafloxacin, levofloxacin, norfloxacin, ofloxacin, sparfloxacin or trovafloxacin for *Escherichia coli* under different growth conditions<sup>167</sup>

Daher sollte die Antibiotikakonzentration während einer Therapie nicht innerhalb des MSW sein. Dies sollte nicht nur für den Infektionsort gelten sondern auch für den Darm, da hier eine hohe Keimdichte ( $10^{12}$  Zellen/g Stuhl) herrscht und es zur Selektion von resistenten Mutanten kommen kann.

Bei dem Vergleich von *in vivo*-erzeugten Mutanten mit *in vitro*-erzeugten Mutanten von *Salmonella typhimurium* zeigt sich ein eindeutiger Unterschied in der MHK ( $2 \mu\text{g/ml}$  vs  $16 \mu\text{g/ml}$ )<sup>94</sup>. *In vivo*-Mutanten konnten den Resistenzlevel der *in vitro*-Mutanten ( $16 \mu\text{g/ml}$ ) gegenüber einem Fluorchinolon nicht erreichen. Des Weiteren wurden bei *in vitro*-erzeugten Mutanten Mutationen entdeckt, die bei *in vivo*-Mutanten bisher nicht gefunden werden konnten. Verschiedene Autoren diskutieren deswegen, ob der zu einem hohen Resistenzlevel führende Mechanismus schädlich sein könnte<sup>94,209</sup>.

Die Daten zur unterschiedlichen Resistenzentwicklung *in vivo* und *in vitro* zeigt, wie wichtig es ist anhand von Tiermodellen die Resistenzentwicklung von Mikroorganismen zu untersuchen. Diese *in vivo*-Modelle dienen zur Klärung der Fragen, die im Zusammenhang mit kompensatorischen Mutationen, Fitnessverlust und Pathogenität des Keims gestellt werden.

## 2.6 Fragestellung der Arbeit

Ziel der vorliegenden Dissertation war die systematische vergleichende Untersuchung zur Resistenzentwicklung von *E. coli* gegen Fluorchinolone *in vitro* und *in vivo*. Besonderes Augenmerk soll dabei auch dem Einfluss der Induktion von Efflux durch humane Pharmazeutika geschenkt werden.

Dabei sollten folgende Fragen beantwortet werden:

- Unterscheiden sich resistenzvermittelnde und ggf. kompensatorische Mutationen nach Selektion *in vitro* oder *in vivo* (bzgl. Häufigkeit)?
- Wie wirken sich verschiedene Dosierungsschemata quantitativ und qualitativ auf die Selektion von resistenten Mutanten aus (bzgl. Art des selektiven Resistenzmechanismus)?
- Welche Rolle spielt die Induktion von Efflux durch humane Pharmazeutika ohne eigene antimikrobielle Wirkung?

Im ersten Teil der Dissertation sollte die Resistenzentstehung in einem Kolonisationsmodell (Ratte) untersucht werden. Hierfür wurde der Darm der verwendeten Tiere mit *E. coli*-Stämmen, die durch ein Reporterogen (*gfp*) chromosomal markiert werden, kolonisiert. Nach erfolgreicher Kolonisation des Darms mit dem jeweiligen *gfp*-markierten Stamm sollten mit Chinolonen verschiedene in der Humanmedizin angewandte Dosierungsschemata simuliert werden. Mutanten mit erhöhter minimaler Hemmkonzentration (MHK) wurden mittels antibiotikahaltiger Screeningplatten und der Fluoreszenz aus der komplexen Darmflora isoliert und hinsichtlich ihrer Veränderungen im Vergleich zum Ausgangsstamm untersucht. Die Untersuchungen umfassten phänotypische und genotypische Methoden wie MHK-Bestimmung, *organic solvent tolerance*, Adhäsion, quantitative mRNA-Untersuchungen (RT-PCR).

Für die Markierung wurden Wildtypstämme von *E. coli* aus Rattenkot verwendet, um einen Stamm zu verwenden, der an das Habitat Rattendarm angepasst ist. Die Markierung sollte über homologe Rekombination an einer Stelle des Chromosoms erfolgen, an der eine Integration keinen offenen Leserahmen bzw. bekannte regulatorische Sequenzen zerstört. Die hierfür nötigen Konstrukte waren in Vorarbeiten bereits kloniert worden.

Im zweiten Teil dieser Arbeit sollte eine systematische Identifikation pharmakologischer Substanzen als Co-Medikation von Antibiotika, die Expressionssteigerungen von spezifischen MDR-Transportern auslösen, durchgeführt werden. Da humanpathogene Bakterien eine Vielzahl solcher Transporter besitzen, können sich die Keime durch die differentielle Regulation dieser Transporter an die jeweilige Umwelt anpassen. Bisher sind wenige Substanzen bekannt, die als so genannte Induktoren eine Änderung der Expression von MDR-Transportsystemen verursachen (z. B. Azetylsalizylsäure).

Am Beispiel der sieben bekannten Fluorchinolon-Transporter von *E. coli* (oder ihrer regulatorischen Proteine) sollte in einem in Vorversuchen evaluierten Gfp-Reportersystem das induktive Potential dieser Pharmazeutika analysiert werden. Die hierfür notwendigen Reporter-Stämme waren bereits in Vorarbeiten generiert worden. Zusätzlich zu den schon vorhandenen Reporter-Stämmen sollten noch weitere Reporter-Varianten mit Translationsverstärker generiert werden.

Die Wirkung potentieller Induktoren sollte anschließend mittels RT-PCR verifiziert und die mutmaßliche Signaltransduktionskette untersucht werden. Zusätzlich sollte die Rolle der identifizierten Induktoren *in vivo* anhand des vorher etablierten Tiermodells überprüft werden.

Die Ergebnisse dieser Arbeit bieten die Grundlage für eine verbesserte Dosierungsstrategie zur Vermeidung von Resistenz. Außerdem können aufgrund der hier erhaltenen Ergebnisse induktiv wirkende und resistenzfördernde Medikamente während einer Antibiotika-Therapie vermieden werden. Derzeit wird von verschiedenen Arbeitsgruppen an der Entwicklung von Efflux-Inhibitoren als Kombinationspartner von Chinolonen gearbeitet. Diese Efflux-Inhibitoren können im vorliegenden Modell auf ihre Wirksamkeit zur Verhütung von Resistenzentwicklung untersucht werden.

### 3 Material und Methoden

#### 3.1 Materialien

##### 3.1.1 Organismen

Die *E. coli*-Stämme DH10B (RIMMH, Universität Regensburg), *E. coli* TM EPI 300 (EPICENTRE®, Madison, USA), One Shot® TOP10 (Invitrogen), *E. coli*-Stamm 2685 aus der Ratte (RIMMH, Universität Regensburg), *E. coli*-Stamm 4 aus der Ratte (RIMMH, Universität Regensburg) und *E. coli* S17λpir (RIMMH, Universität Regensburg) wurden ÜN bei 37 °C in flüssigem Medium bei 200 U/min geschüttelt oder auf mit 1,5 % Agar verfestigtem LB-Medium gezogen.

##### 3.1.2 Plasmide

Es folgt eine tabellarische Aufstellung der verwendeten Plasmide:

**Tab. 4:** Übersicht über die verwendeten Plasmide

Plasmid	Eigenschaften	Bezugsquelle
pGEM-T	Klonierungs-, Expressionsvektor, Amp <sup>R</sup>	Promega, Mannheim
pCR4®-TOPO®	Klonierungs-, Expressionsvektor, Amp <sup>R</sup> , Km <sup>R</sup>	Invitrogen,
pUC19	Amp <sup>R</sup>	NEB
pIVETsacB	Amp <sup>R</sup>	Dr. M. Arnold, RIMMH
pMASC	Cm <sup>R</sup>	Dr. M. Arnold, RIMMH
pUC-gfp <sub>gen</sub>	Amp <sup>R</sup>	Dr. M. Arnold, RIMMH
pLOF/Km	Amp <sup>R</sup> , Km <sup>R</sup>	Dr. K. Timmis, Braunschweig <sup>61</sup>
pKD46	Amp <sup>R</sup>	<i>E. coli</i> Genetic Stock Center

Die in dieser Arbeit hergestellten Plasmide sind in der folgenden Tabelle zusammengefasst.

**Tab. 5:** Übersicht über die in dieser Arbeit angefertigten Plasmide

Plasmid	Organismus/ <i>E. coli</i> -Stamm	Beschreibung	Resistenzen
pUC-araBPr-gbx	TOP10	PCR-Pr. (1.899 bp) Lambda mit 1086+1128/ <i>Nde</i> I+ <i>Xba</i> I (1.888 bp) in pUC-araBPr/ <i>Nde</i> I+ <i>Xba</i> I (4.430 bp)	Amp

Plasmid	Organismus/ <i>E. coli</i> -Stamm	Beschreibung	Resistenzen
pUC-norEPrII-Tgfp	DH10B	Fusions-PCR-Pr. (1.002 bp) pUC-norEPrII-gfp mit 1113+1133 und 1131+1051/ <i>Bcl</i> I (999 bp) in pUC19/ <i>Bam</i> HI (3.685 bp)	Amp
pUC-mdtMPrI-gfp	TOP10	PCR-Prod. (1.005 bp) <i>E. coli</i> DH5α mit 1071+1072/ <i>Aat</i> II+ <i>Bbs</i> I (826) in pUC-gfpgen/ <i>Aat</i> II+ <i>Bbs</i> I (3.939 bp)	Amp
pUC-mdtMPrII-gfp	TOP10	PCR-Prod. (826 bp) <i>E. coli</i> DH5α mit 1072+1073/ <i>Aat</i> II+ <i>Bbs</i> I (826) in pUC-gfpgen/ <i>Aat</i> II+ <i>Bbs</i> I (3.760 bp)	Amp
pUC-acrEFPr-Tgfp	DH10B	Fusions-PCR-Pr. (1.232 bp) pUC-acrEFPr-gfp mit 977+1134 und pUC-acrABPr-Tgfp mit 1131+979/ <i>Bg</i> II (1.182 bp) in pUC19/ <i>Bam</i> HI (3.868 bp)	Amp
pCC1-acrABPr-gfp	TM EPI300	<i>Bg</i> II-Fragment (950 bp) aus pUC-acrABPr-gfp (3.153 bp) in pCC1_dB/ <i>Bam</i> HI (9.077 bp)	Cm
pCC1-acrDPr-gfp	TM EPI300	<i>Bg</i> II-Fragment (1.752 bp) aus pUC-acrDPr-gfp (3.955 bp) in pCC1_dB/ <i>Bam</i> HI (9.879 bp)	Cm
pCC1-acrEFPr-gfp	TM EPI300	<i>Bg</i> II-Fragment (1.157 bp) aus pUC-acrEFPr-gfp (3.360 bp) in pCC1_dB/ <i>Bam</i> HI (9.284 bp)	Cm
pCC1-mdfaPr-gfp	TM EPI300	<i>Bg</i> II-Fragment (1.738 bp) aus pUC-mdfAPr-gfp (3.941 bp) in pCC1_dB/ <i>Bam</i> HI (9.865 bp)	Cm
pCC1-marRAPr-Tgfpa	TM EPI300	<i>Bg</i> II-Fragment (994 bp) aus pCR4-marRAPr-Tgfpa (4.968 bp) in pCC1_dB/ <i>Bam</i> HI (9.121 bp)	Cm
pCC1-robPr-Tgfpa	TM EPI300	<i>Bg</i> II-Fragment (994 bp) aus pCR4-robPr-Tgfpa (4.968 bp) in pCC1_dB/ <i>Bam</i> HI (9.121 bp)	Cm

### 3.1.3 Kits

**Tab. 6:** Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten Kits

Kit	Verwendung	Hersteller
Qiaprep® Spin Miniprep kit	Plasmidisolierung	QIAGEN, Hilden
NucleoSpin®Plasmid Quick Pure	Plasmidisolierung	MACHEREY-NAGEL
Qiafilter™Plasmid Midi Kit	Plasmidisolierung	QIAGEN
Qiaquick® PCR Purification kit	Reinigung von PCR-Produkten oder Restriktionsverdauen	QIAGEN
Qiaquick® Gel Extraction kit	DNA-Reinigung aus dem Gel	QIAGEN
Rneasy Mini Kit	Isolierung von RNA	QIAGEN
Omniscript Reverse Transcriptase	RT-PCR	QIAGEN
First Strand cDNA Synthesis Kit for RT-PCR (AMV)	RT-PCR	Roche, Mannheim
LightCycler® FastStart DNA Master SYBR Green I,	Light Cycler	Roche
DNeasy® Tissue kit	Isolierung genomischer DNA	QIAGEN
TOPO® Cloning 5-minute PCR Cloning kit	Klonierung von PCR-Produkten	Invitrogen, Karlsruhe
pGEM®-T Easy Vector System	Klonierung von PCR-Produkten	PROMEGA, USA

### 3.1.4 Chemikalien, Plastikwaren und sonstige Hilfsmittel

Lösungsmittel und Feinchemikalien wurden von folgenden Firmen bezogen:

Merck, GibcoBRL, Roche, Sigma-Aldrich, J.T.Baker, Oxoid, Eppendorf, AppliChem, NEB, USB Corporation und Roth. Alle Chemikalien, soweit nicht bereits vom Hersteller sterilisiert, wurden vor Gebrauch entweder autoklaviert (121 °C und 2 bar Überdruck) oder steril-filtriert (Porendurchmesser 0,45 µm, Roth, Karlsruhe).

Alle Plastikwaren und sonstige Hilfsmittel wurden von den Firmen Greiner Bio-One, Eppendorf, Falcon/Becton Dickinson, Biozym, Roth und Sarstedt bezogen.

### 3.1.5 Enzyme

Alle eingesetzten Restriktionsenzyme wurden von NEB, Frankfurt/Main, bezogen.

### 3.1.6 Antibiotika

In der folgenden Tabelle sind alle in dieser Arbeit verwendeten Antibiotika zusammengefasst.

**Tab. 7:** Verwendete Antibiotika

Substanz	Hersteller	Gebrauchsverdünnung
Ampicillin	Sigma-Aldrich, Steinheim	100 µg/ml
Kanamycin	Merck, Darmstadt	50 µg/ml

### 3.1.7 Lösungen

Alle Lösungen wurden, sofern sie für den Umgang mit RNA benötigt wurden, mit DEPC behandeltem H<sub>2</sub>O dest. hergestellt.

**Tab. 8:** Verwendete Lösungen

Lösung	Zusammensetzung, Konzentration
Ethidiumbromid (Gebrauchslösung)	5 mg/ml
SDS (Stammlösung)	10 mg/ml
Lysozym (Stammlösung)	20 mg/ml; gelöst in DEPC-H <sub>2</sub> O
Loading dye 6 ×	Saccharose 40 % Bromphenolblau 0,25 % Xylencyanol 0,25 %
TBE (Stammlösung 10 ×)	Tris 128 g Borsäure 55 g 0,5 M EDTA (pH 8,0) 20 ml Ad 1l mit H <sub>2</sub> O bidest, einstellen auf pH 8.3
TBE (Gebrauchslösung 0,5 ×)	Stammlösung 1:20 verdünnen
TE	Tris·HCl (pH 8,0) 0,6 g EDTA 0,185 g Ad 50 ml mit H <sub>2</sub> O bidest, einstellen auf pH 8.0
6 × Ladepuffer	60 mM EDTA 0,25 % Bromphenolblau 30 % Glycerin

Lösung	Zusammensetzung, Konzentration
TBI (Angaben für 1 Liter Lösung)	RbCl 12 g MnCl <sub>2</sub> ×4H <sub>2</sub> 9,9 g KaCl 30 ml (von 1M Stock pH 7.5) CaCl <sub>2</sub> ×2H <sub>2</sub> O 1,5 g Glycerol 150 g Mit Eisessig (0,2 M) auf pH 5.8 einstellen → steril filtrieren
TBII (Angaben für 1 Liter Lösung)	MOPS 20 ml (von 0,5 M Stock pH 6.8) (Morpholinethan Sulfonsäure) RbCl 1,2 g CaCl <sub>2</sub> ×2H <sub>2</sub> O 11 g Glycerol 150 g Mit NaOH den MOPS-Puffer auf pH 6.8 einstellen → steril filtrieren

### 3.1.8 Nährmedien

Die Herstellung der Nährmedien und der Puffer PBS<sub>mit</sub> /PBS<sub>ohne</sub> erfolgte durch die Nährbodenküche des Instituts für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene der Universität Regensburg

Folgende Nährmedien wurden verwendet:

1. Luria-Bertani-Medium (LB) mit oder ohne Antibiotika (Ampicillin 100 µg/ml; Kanamycin 50 µg/ml)
2. Mueller-Hinton-Medium
3. M9-Minimalmedium mit oder ohne Kanamycin (50 µg/ml)
4. Kochblut-Agar
5. McConkey-Agar
6. MRS-Agar für Laktobazillen
7. Enterococcosel-Agar
8. Thioglykolat-Bouillon
9. Schädler-KV-Agar

### 3.1.9 Primer

Eine Liste aller verwendeten Primer befindet sich in Tabelle 9. Die Primer wurden mittels der Sequenz von *E. coli* – Stamm K12 mit der *Gene Bank* Accession number U00096 erstellt. Die Sequenzen für M13for und M13rev stammen vom Hersteller. Oligonukleotide wurden bis auf M13 for/rev von der Firma Metabion, Martinsried, in einer Konzentration von 100 mM hergestellt. Die Primer M13 for/rev wurden für die Sequenzierung durch die Firma GeneArt, Regensburg, verwendet.

**Tab. 9:** Sequenzen der verwendeten Primer (Oligonukleotide). Die Erkennungssequenz der Restriktionsenzyme ist grau hervorgehoben

Nr.	Referenz	Sequenz 5'-3'	Tm (in °C)	Schnittstelle
M13 for	pCR4	GTAAAACGACGGCCAGT		-
M13 rev	pCR4	AACAGCTATGACCATG		-
129	<i>gfp</i>	TGC <b>ATGCAT</b> TAATGCAGCTGGCAC	60,7	<i>NsiI</i>
130	<i>gfp</i>	TGC <b>ATGCAT</b> AGTTGGTAATGGTAGGG AC	65,1	<i>NsiI</i>
212	<i>gfp</i>	CACCCTCTCCACTGACAG		
213	<i>gfp</i>	GTGACCACATGGTACCTTC	55,1	
226	<i>acrB</i>	TGCTGAACTGGCGAAGATGGAACC	63,1	
263	REP_1	XXXGCGCCGXCATCAGGC	58,2	
264	REP_2	ACGTCTTATCAGGCCTAC	53,7	
381	<i>gfp</i>	GA <b>AGATCT</b> CATTAATGCAGCTGGCAC	63,2	<i>BglII</i>
776	<i>E. coli</i> 2685	CGt <b>AGATCT</b> TTGCCTCGTCGTTGTTAT TAACCATCGG	70,6	<i>BglII</i>
777	<i>E. coli</i> 2685	CGt <b>AGATCT</b> TGTAACAAGGGGCCGGT TAGGTGAG	71,9	<i>BglII</i>
801	<i>gfp</i>	TGACGGGAACTACAAGACG	57	
802	<i>gfp</i>	AATGGTTGTCTGGTAAAAGG	54	
858	<i>gapA</i>	CTGACATCGAGATCGTTGC	56,7	
859	<i>gapA</i>	GTTCTGGCAGTACTTTACC	54,5	
861	<i>acrB</i>	GACAGTACCATCGCGATACC	59,4	
862	<i>marA</i>	GATGTAAAAAGCGCGATTCCG	54,9	
863	<i>marA</i>	GTCCAGACGCAATACTGACG	60,5	
950	<i>acrB</i>	<b>GGATCC</b> TGGAAGTAAACGTCATTGG	63,0	<i>BamHI</i>
951	<i>acrA</i>	<b>GGATCC</b> GCGGTCGTTCTGATGCTCTC	69,5	<i>BamHI</i>
977	<i>acrSEF</i>	GT <b>GACGTCAGATCT</b> GATTAATTATTCA GGAAATAAATATATTCCG	66,6	<i>AatII, BglII</i>
979	<i>gfp</i>	GTAT <b>CTAGATCT</b> TGGTAATGGTAGGG ACCG	66,8	<i>BglII, XbaI</i>
1049	<i>norE</i>	CAGACGT <b>CTGATCA</b> GCTCTGGCAGGT CGTGTTCTCACG	75,9	<i>AatII, BclI</i>

Nr.	Referenz	Sequenz 5'-3'	T <sub>m</sub> (in °C)	Schnittstelle
1050	<i>norE</i>	GACATATGAACACCTTTTATTTGTAGT TATATG	60,8	<i>NdeI</i>
1051	<i>gfp</i>	GTCTAGATGATCAATTGGTAATGGTA GGGACCGGC	70,7	<i>BclI</i> , <i>XbaI</i>
1054	<i>gfp</i>	CGTCTAGAAGACATGAGTAAAGGAGA AGAACTTTTCACTGG	70,5	<i>XbaI</i> , <i>BbsI</i>
1086	<i>gam</i> , <i>bet</i> , <i>exo</i>	CTCATATGGATATTAATACTGAAACTG AG	59,6	<i>NdeI</i>
1087	<i>gam</i> , <i>bet</i> , <i>exo</i>	GAGGATCCATCATCGCCATTGCTCCCC AAATAC	70,8	<i>BamHI</i>
1097	<i>araBADPr</i>	GTGACGTCAGCCATACTTTTCATACTC CCACC	69,5	<i>AatII</i>
1098	<i>araBADPr</i>	GT CATATGTTCACTCCATCCAAAAAAA CGGGTATGG	68,3	<i>NdeI</i>
1113	<i>norEPr</i>	CAGACGTCTGATCAACTTAGAACTCC TGAAATCAGTTAAG	69,5	<i>AatII</i> , <i>BclI</i>
1116	<i>gfp</i>	CGATGCATTTATTTGTAGAGCTCATCC ATGCC	66,9	<i>NsiI</i>
1117	<i>araBADPr</i>	GTGAAGACTTACTCATCGTTTCACTCC ATCCAAAAAACGGGTATGG	72,9	<i>BbsI</i>
1118	<i>araBADPr</i>	GTGACGTCATGCATAGCCATACTTTT CATACTCCCACC	71,6	<i>AatII</i> , <i>NsiI</i>
1131	<i>gfp</i>	TTAACTTTATAAGGAGGAAAAACATAT GAGTAAAGGAGAAGAACTTTTCAC	68,6	
1133	<i>norEPr</i>	ATGTTTTTCTCCTTATAAAGTTAAAT GAACACCTTTTATTTGTAGTTATATG	67,1	
1134	<i>acrEFPr</i>	ATGTTTTTCTCCTTATAAAGTTAATA CTATTCCTCAAAAACCAAAGCGCG	70,2	
1150	<i>hspPr</i>	CATCTAGAATGCATCAGGCTAATCGC CAGGCTGG	71,9	<i>XbaI</i> , <i>NsiI</i>
1151	<i>gfp</i>	GAAGATCTTAATGCAGCTGGCAC	60,6	<i>BglII</i>
1176	<i>marRAPr</i>	CAGACGTCAGATCTGGTGGTTGTTAT CCTGTGTATCTGG	72,6	<i>AatII</i> , <i>BglII</i>

Nr.	Referenz	Sequenz 5'-3'	Tm (in °C)	Schnittstelle
1177	<i>marR</i> Pr	ATGTTTTTCCTCCTTATAAAGTTAAATT AGTTGCCCTGGCAAGTAATTAG	69,4	
1178	<i>rob</i> Pr	CAGACGTCAGATCTATTGTTACCATTT TTATCTATTACACG	67,4	<i>AatII</i> , <i>BglII</i>
1179	<i>rob</i> Pr	ATGTTTTTCCTCCTTATAAAGTTAAAA AATATCCTCATCCTTTCAACAACG	68,6	
1180	<i>soxS</i> Pr	CAGACGTCAGATCTAAATCGCTTTAC CTCAAGTTAACTTG	69,5	<i>AatII</i> , <i>BglII</i>
1181	<i>soxS</i> Pr	ATGTTTTTCCTCCTTATAAAGTTAAAA ATCTGCCTCTTTTCAGTGTTTCAG	69,4	
1182	pUC19	GGCCGCCTAGGCCTTTATCAGGGTTA TTGTCTCAT	76,6	
1183	<i>gfp</i>	GGCCGCCTAGGCCTTATTTGTAGAGC TCATCCATGCC	80,0	<i>SfiI</i>
1187	<i>eco</i>	CTACCTGCAGTATTGTTTGC	56,4	
1188	<i>mqo</i>	GAAAAAAGAGGACTGG	45,6	
1191	<i>eco</i>	GATGGTGATTGCTGATGGTGATTTTG CATGTGGCGTATGCTGATAAGACGCG	82,8	
1192	<i>mqo</i>	GCAAATGCGCCGCTAACAAAAGAAGC CATGCCGGATGTGGCACATC	83,4	
1193	<i>gfp</i>	GCAAAATCACCATCAGCAATCACCAT C	66,8	
1194	<i>neo</i>	CTTCTTTTGTTAGCGGCGCATTTC	65,8	
1195	<i>mqo</i>	GCAAATGCGCCGCTAACAAAAGAAGC CATGCCGGATGTGGCACATCATTACA ACGC	85,5	
1223	pLOF	GCAGTTTCATTTGATGCTCGATG	58,9	
1224	pLOF	GGTTGCATTCGATTCCTGTTTG	58,4	
1225	pLOF	GCTCGAGGCCGCGATTAATTC	62,1	
1381	<i>gfp</i>	CAAGACGCGTGCTGAAGTCAAGTT	62,7	
1388	<i>chuA</i>	GACGAACCAACGGTCAGGAT	59,4	
1389	<i>chuA</i>	TGCCGCCAGTACCAAAGACA	59,4	
1390	<i>yjaA</i>	TGAAGTGTGAGGAGACGCTG	59,4	

Nr.	Referenz	Sequenz 5'-3'	Tm (in °C)	Schnittstelle
1391	<i>yjaA</i>	ATGGAGAATGCGTTCCTCAAC	57,9	
1392	<i>tspE4C2</i>	GAGTAATGTCTGGGGCATTCA	57,3	
1393	<i>tspE4C2</i>	CGCGCCAACAAAGTATTACG	57,3	
1423	<i>gfp</i>	AGTGCCATGCCCGAAGGTTATGTA	71,9	
1521	pLOF	CTCAGTGGCCTGTTTTTAAGC	59,0	
1523	pLOF	CAAACAGGAATCGAATGCAACC	60,0	
1527	<i>parA</i>	GCATAAACGCTGGTCATGAAATGACG	66,0	
1528	<i>parA</i>	CGCGTACCAAACACATCACGCATATG	68,0	
1529	<i>redF</i>	TTCTCTGTTCCGGTCACACCACAT	65,0	
1530	<i>redF</i>	TTCAGCATCGCAACCGCATCAGA	65,0	
1531	<i>repE</i>	ATTGACCTCTGCGGAAGCCAGTAA	65,0	
1532	<i>repE</i>	AAACGCATGGCATAACGGATTGGTG	65,0	
1542	pLOF	CATCGAGCATCAAATGAAACTGC	61,0	
1554	RS- <i>PstI</i>	NNNNNNNNNNCTGCAG	51,0	<i>PstI</i>
1556	<i>sfaD/E</i>	GGAAAGGCAAATGGACAGGTATGG	51,0	
1557	<i>sfaD/E</i>	GCATGGAAAATAACGGAGGAG	65,0	
1558	<i>hlyE</i>	TCCCTGCTGGTAAGCTCACAAAGT	65,0	
1559	<i>hlyE</i>	ACGCCCGCAGCAATAGAATAGGAA	65,0	
1560	<i>motB</i>	TCTAAACATCGGGCGATTCTGGCT	65,0	
1561	<i>motB</i>	TGGTGATGTGGCTGATCTCCATCT	65,0	

### 3.1.10 Sequenzierung

100 ng DNA (Plasmid oder PCR-Produkt) und 100 pg Primer wurden an die Firma GeneArt, Regensburg, zur Sequenzierung gegeben. Die Primer M13 for und M13 rev wurden von der Firma GeneArt vor der Sequenzierung zur Probe gegeben.

In der gesamten Arbeit wurden die Schnittstellen für die Restriktionsenzyme über die Primer eingefügt. Die am Primer angefügten Schnittstellen sind in der Primerliste (siehe Tab. 9) zu finden.

Zur Bearbeitung von DNA-Sequenzen und Sequenzierdaten wurden die Programme *SeqMan*<sup>TM</sup> II (Dnastar, USA), *EditSeq*<sup>TM</sup> (Dnastar, USA) und Lynnon BioSoft DNAMan Version 5.2.9 (Lynnon, Kanada) sowie <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/> verwendet.

### 3.1.11 Computerprogramme

Diese Arbeit wurde mit Hilfe von Windows Word 2000 angefertigt. Vektorkarten wurden in Lynnon BioSoft DNAMan (Version 5.2.9) angefertigt und in Corel Draw (Version 11) bearbeitet. Das Literaturverzeichnis wurde mit Einträgen aus dem ISI ResearchSoft Reference Manager Version 10 erstellt. Die Literatur stammt aus der PubMed Datenbank von NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/PubMed/>).

Wie unter „Sequenzierung“ erwähnt dienen die Programme DNASTar *SeqMan*<sup>TM</sup> II, *EditSeq*<sup>TM</sup> und Lynnon BioSoft DNAMan Version 5.2.9 der Bearbeitung von Sequenzen.

Für die Bearbeitung der Fluoreszenzaufnahmen wurde die Software von Carl Zeiss Image Browser Version 4.0.0.157 und das Programm Microsoft PowerPoint 2000 verwendet.

LightCycler®-Daten wurden mit dem Programm LightCycler® Software 3.5 bzw. LightCycler® Software 4.0 (Roche, Mannheim) ausgewertet. Statistische Erhebungen wurden in dem Programm Excel 2000 (9.0.6926 SP3) unternommen, die graphische Darstellung der erhaltenen Werte erfolgt unter Verwendung des Programms SigmaPlot 10.0.

### 3.1.12 Geräte

Zur spektrometrischen Messung stand ein Smart Spec<sup>TM</sup>Plus Spectrophotometer der Firma BioRad, München, zur Verfügung.

Ein VITEK Colorimeter der Firma bioMérieux Vitek, Hazelwood, USA wurde zur Herstellung von Verdünnungen des Standards McFarland = 0,5 von Bakterien verwendet.

Zur Durchführung von PCR-Reaktionen wurde ein MJ Research PTC 200 Peltier ThermalCycler benützt.

Mit einem Gene Pulser<sup>®</sup> Gerät und den Küvetten von BioRad, München, wurden alle Elektroporationen durchgeführt.

Gelkammern zur Elektrophorese wurden von der Mechanischen Werkstatt der Universität Regensburg bereitgestellt. Als Stromquelle diente der Microcomputer Electrophoresis Power Supply E425 von Consort.

Agarosegele wurden bei UV-Licht der Wellenlänge  $\lambda = 312$  nm (UV-Schirm von Bachofer, Reutlingen) fotografiert und ausgedruckt auf SONY UPP-110HP Type II High Density Printing Paper.

Des Weiteren standen ein Thermomixer comfort von Eppendorf, und die Zentrifugen Centrifuge 5417 R von Eppendorf, Hamburg, Medifuge 15000 Heraeus Sepatech und eine Hettich Universal 30 RF, Tuttlingen, zur Verfügung.

Für die konfokalen Lasermikroskopaufnahmen wurde das Mikroskop Axiovert 200M LSM510 META von Zeiss verwendet.

Als UV-Lampe diente ein Gerät der Firma Micro-Bio-Tech, Stockholm, die sowohl langwelliges (365 nm) als auch kurzwelliges (254 nm) Licht ausstrahlt.

Zur Quantifizierung der cDNA diente ein LightCycler®-Gerät der Firma Roche, Mannheim.

## 3.2 Methoden

### 3.2.1 Molekularbiologische Methoden

#### 3.2.1.1 DNA-Arbeitstechniken

##### 3.2.1.1.1 *Isolierung von DNA*

Genomische DNA wurde mit Hilfe des Qiagen DNeasy Tissue Kit (QIAGEN, Hilden) unter Verwendung des Hersteller-Protokolls für Gram-negative Bakterien isoliert.

##### 3.2.1.1.2 *Isolation von Plasmiden*

Für eine schnelle Isolierung von Plasmid-DNA wurden Kits der Firmen QIAGEN und Macherey-Nagel, die das Prinzip der alkalischen Lyse nutzen, nach den Angaben der Hersteller verwendet.

##### 3.2.1.1.3 *Restriktionsanalyse und -verdau*

###### Restriktionsanalyse:

Plasmid-DNA:	1–2 µl
Enzym:	1 µl (5–10Units)
Puffer:	1 µl
BSA (optional):	1 µl
H <sub>2</sub> O:	X µl
Endvolumen	10 µl

Inkubationszeit 1 h

###### Restriktionsverdau:

Plasmid-DNA:	10–20 µl
Enzym:	1–3 µl (30–40Units)
Buffer:	1–3 µl
BSA (optional):	1–3 µl
H <sub>2</sub> O:	X µl
Endvolumen	20–30 µl

Inkubationszeit: 1,5 h

Sowohl für die Restriktionsanalyse als auch für den Restriktionsverdau wurde bei der Inkubationstemperatur, dem Puffer und der Zugabe von BSA den Herstellerangaben gefolgt. Doppelverdau mit zwei Enzymen wurden nach Möglichkeit in einer Reaktion nach Empfehlung von NEB durchgeführt. Anschließend wurden die Fragmente auf ein Agarosegel aufgetragen.

#### 3.2.1.1.4 *Elektrophorese von DNA in Agarosegelen*

Je nach Größe wurden DNA-Fragmente in 0,8 bis 2 %igen Agarosegelen (w/v Agarose in  $0,5 \times$  TBE mit  $0,5 \mu\text{g/ml}$  Ethidiumbromid) aufgetrennt. DNA-Proben wurden mit  $1 \times$  Ladepuffer versetzt. In 50 ml  $0,5 \times$  TBE wurde die entsprechende Menge an Agarose aufgekocht und mit  $2,5 \mu\text{l}$  Ethidiumbromid versetzt. Dies wurde dann in eine Gelkammer gegossen. Sobald das Gel auspolymerisiert war, wurde es mit  $0,5 \times$  TBE überschichtet. Die mit „loading dye“ versetzten Proben und der jeweilige DNA-Längenstandard wurden aufgetragen.

Der Gellauf erfolgte bei 60 bis 85 V (ca. 5 V/cm) in  $0,5 \times$  TBE bei RT. Fertig gelaufene Gele wurden bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 312 \text{ nm}$  fotografiert.

Als DNA-Längenstandards und zur Quantifizierung der eingesetzten DNA-Proben wurde spezifisch geschnittene DNA folgender Fragmentlängen (in bp) verwendet.

Standard II: Lambda-DNA/ <i>Hind</i> III	125, 564, 2.027, 2.322, 4.361, 6.557, 9.416, 23.130
Standard VII: SPP1 DNA/ <i>Eco</i> RI	81, 359, 492, 710, 718, 992, 1.164, 1.482, 1.515, 1.882, 1.953, 2.799, 3.639, 4.899, 6.106, 7.427, 8.576
Standard VIII: Mischung aus mit <i>Hpa</i> II bzw. <i>Dra</i> I und <i>Hind</i> III geschnittener pUCBM21-DNA	9, 26, 34, 37, 67, 110, 124, 147, 190, 242, 320, 404, 489, 501, 692, 900, 1.114
1 kb DNA-Leiter: sechs verschiedene Plasmide wurden vollständig verdaut	250, 500, 750, 1.000, 1.500, 2.000, 2.500, 3.000, 3.500, 4.000, 5.000, 6.000, 8.000, 10.000
100 bp DNA-Leiter: 11 einzelne, chromatographisch aufgereinigte DNA-Fragmente	80, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1.031
Marker 13: Lambda-DNA/ <i>Eco</i> 47I ( <i>Av</i> all)	308, 310, 345, 398, 433, 511, 513, 590, 597, 894, 974, 985, 1.284, 1.420, 1.611, 1.951, 2.005, 2.134, 2.555, 2.606, 3.676, 6.442, 6.555, 8.126

Die Standards II, VII und VIII stammen von der Firma Roche, die 1 kb DNA-Leiter und die 100 bp DNA-Leiter sind von PEQLAB. Der Marker 13 ist von der Firma Fermentas.

### 3.2.1.1.5 *Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen*

Nach dem Ausschneiden der entsprechenden Bande unter langwelligem UV-Licht aus dem Gel wurde zur Isolierung der DNA aus der Agarose der Qiaquick®Gel Extraktion kit der Firma QIAGEN nach den Richtlinien des Herstellers angewendet.

### 3.2.1.1.6 *Polymerase-Ketten-Reaktionen (PCR)*

#### 3.2.1.1.6.1 Standard-PCR

##### PCR mit Mastermix

Wenn nicht anders angegeben, wurden alle PCR-Reaktionen mit dem 2,5 × PCR MasterMix von Eppendorf durchgeführt.

##### PCR-Ansatz:

Plasmid-DNA oder gDNA	X µl
MasterMix	20 µl
Primer forward (100 mM)	1 µl
Primer reverse (100 mM)	1 µl
<u>H<sub>2</sub>O</u>	<u>Y µl</u>
Endvolumen	50 µl

##### Programm:

Denaturierung	94 °C (5 min)
30 Zyklen à	
Denaturierung	94 °C (40 sec)
Annealing	x °C (30 sec)
Elongation	72 °C (y min)
Letzte Elongation	72 °C (7 min)
Aufbewahrung	4 °C

Besitzen die Primer Schnittstellen, so wurde eine „annealing“-Temperatur zw. 52–54 °C gewählt. Die Elongationszeit wird aus der Länge des zu replizierenden DNA-Stücks berechnet. Pro 1 kb wird 1 Minute Elongationszeit benötigt.

Die siebenminütige Elongationszeit ist notwendig, um die A-Überhänge an den Enden des PCR-Produktes durch die DNA-Polymerase aus *Thermophilus aquaticus* herzustellen. Diese

Überhänge sind in späteren Klonierungsschritten mit den Kits von Invitrogen und Promega wichtig.

### PCR-Reaktion mit TaqPlus®Maxx™DNA Polymerase von Stratagene®

Lösungen:

10 × Reaktionspuffer für Taq-Polymerase: 20 mM TrisCl, pH 8,0

dATP: 10 mM

dCTP: 10 mM

dGTP: 10 mM

dTTP: 10 mM

TaqPlus®Maxx™DNA Polymerase (Stratagene®): 5 U/μl

Ansatz:

Plasmid-DNA od. gDNA(100–200ng) X μl

10 × Reaktionspuffer 5 μl

10 mM-dNTP-Mischung 4 μl

Taq-Polymerase 0,5 μl

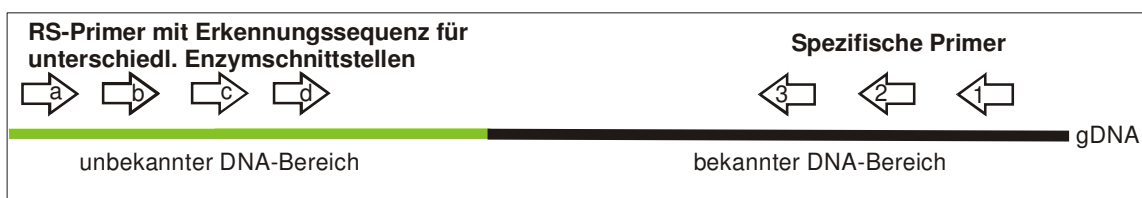
H<sub>2</sub>O Y μl

Endvolumen 50 μl

Es wurden insgesamt 30 Zyklen in einem DNA Thermal Cycler der Firma Perkin Elmer Cetus mit den unter Programm beschriebenen Einstellungen durchgeführt:

#### 3.2.1.1.6.2 RS-PCR (Restriction-Site-PCR)

Die RS-PCR <sup>249</sup> dient dazu die Umgebung einer bekannten Sequenz weiter zu sequenzieren. In einen bekannten Bereich werden drei spezifische Primer gelegt (1, 2 und 3). Ein zweiter Primer, ein so genannter RS-Primer, wird so erstellt, dass er an eine Enzymschnittstelle bindet (a, b, c, d).



**Abb. 3:** Lage der Primer bei der RS-PCR

Tab. 10: verwendete RS-Primer

Primer	Enzym, dessen Schnittstelle erkannt wird
1554	<i>Pst</i> I
1555	<i>Pst</i> I
236	<i>Sa</i> I
238	<i>Sma</i> I
232	<i>Bgl</i> I
233	<i>Eag</i> I
234	<i>Hind</i> III
235	<i>Sac</i> I
164	<i>Eco</i> RI
165	<i>Bam</i> HI
166	<i>Taq</i> alpha
167	<i>Bgl</i> I
168	<i>Sph</i> I

Ansatz:

gDNA	X µl
MasterMix	20 µl
spez. Primer Nr. 1 (100 mM)	1 µl
RS-Primer (100 mM)	1 µl
H <sub>2</sub> O	Y µl
Endvolumen	50 µl

Programm:

Denaturierung	94 °C
30 Zyklen à	
Denaturierung	94 °C
Annealing	50 °C
Elongation	72 °C (3–4 min)
Letzte Elongation	72 °C

Diese PCR wurde nun mit dem zweiten spezifischem Primer und dem PCR-Produkt der ersten PCR durchgeführt. Die PCR mit dem dritten Primer wurde mit dem PCR-Produkt der zweiten PCR als Zielsequenz durchgeführt.

Bei diesem PCR-Verfahren handelte es sich um eine *nested-PCR*.

Wenn das Fragment von der Größe her in den 2 *nested-PCRs* immer kleiner wurde handelt es sich um ein spezifisches PCR-Produkt handeln.

### 3.2.1.1.6.3 Inverse PCR

Ziel der inversen PCR<sup>286</sup> ist es von einer bekannten Sequenz ausgehend ein unbekanntes Teilstück an DNA zu analysieren. Hierfür wurde die genomische DNA zuerst mit einem Enzym, das mehrere Schnittstellen in der gewünschten Sequenz hat, verdaut.

Für den Verdau gilt folgender Ansatz:

DNA	2 µg
Enzym	2 µl
Puffer	2 µl
BSA (optional)	2 µl
<u>Wasser</u>	<u>X µl</u>
Endvolumen	20 µl

Der Ansatz wurde dann bei 37 °C für 1,5 h inkubiert.

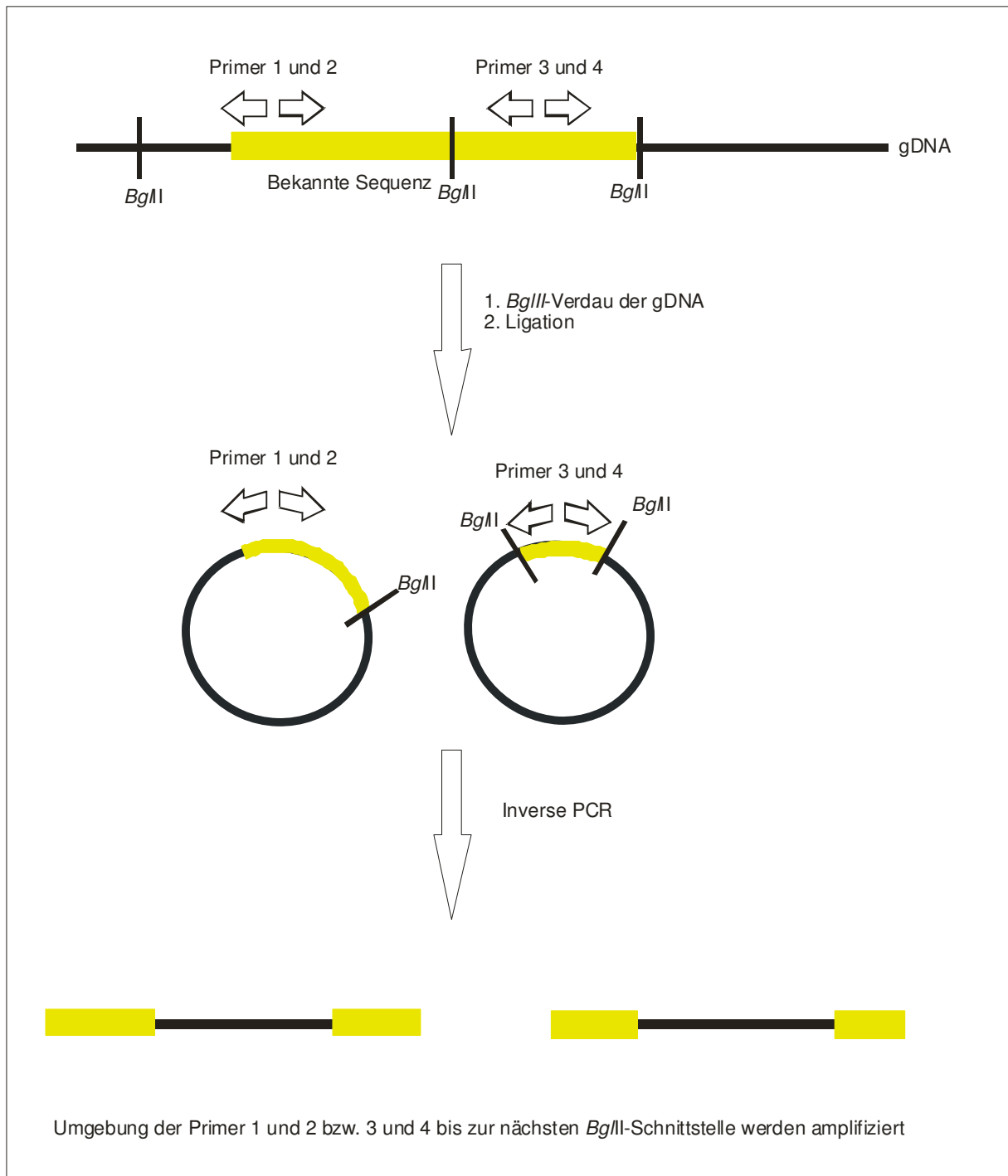
Danach wurde der Ansatz über den PCR-Purification-Kit von QIAGEN gereinigt. Nach der Reinigung folgte die Ligation.

Für die Ligation wurden einmal 12,5 µl des Verdau, einmal 12,5 µl einer 1:10-Verdünnung und einmal 12,5 µl einer 1:20-Verdünnung in den Ligationsansatz gegeben. Zu dem Ansatz wurden jeweils 1,5 µl Ligase-Buffer und 1 µl T4-Ligase gegeben. Der Ansatz wurde dann über Nacht bei 16 °C oder für 1–2 h bei Raumtemperatur inkubiert.

Um Einzelstränge zu erhalten, erhitzte man die fertige Ligation für 5 min auf 95 °C.

Für die Inverse PCR gilt folgender Ansatz:

Ligation	1 µl
Primer 1	1 µl
Primer 2	1 µl
Mastermix	20 µl
<u>H<sub>2</sub>O</u>	<u>27 µl</u>
Endvolumen	50 µl



**Abb. 4:** Übersicht zu dem Ablauf der Inversen PCR

#### 3.2.1.1.6.4 Rep-PCR

Bei der Rep-PCR<sup>124,294</sup> handelt es sich um eine Form der sog. „*fingerprint*“-Methode, die wegen vergleichsweise geringem Aufwand zur Bearbeitung großer Isolatezahlen geeignet ist. Der benutzte Primer bindet spezifisch an repetitive Sequenzen (*repetitive extragenic palindromic elements*), die in unterschiedlichen Abständen voneinander im Genom von *E. coli* lokalisiert sind. Somit ergibt sich bei der Auftrennung der amplifizierten Fragmente mittels Gelelektrophorese ein für den jeweiligen Stamm charakteristisches Bandenmuster.

Sind die Bandenmuster von mehreren Stämmen identisch, so handelt es sich um Keime mit einer Verwandtschaft.

Zuerst wurde eine Kolonie pro Keim in 25 µl Wasser gegeben. Danach wurde die Keimsuspension für 10 min bei 95 °C inkubiert. Nach dem Inkubationsschritt wird für 30 sec bei 13.000 x g zentrifugiert.

Ansatz:

gDNA	5 µl
MasterMix	10 µl
Rep-Primer 1	1 µl
Rep-Primer 2	1 µl
<u>H<sub>2</sub>O</u>	<u>8 µl</u>
Endvolumen	25 µl

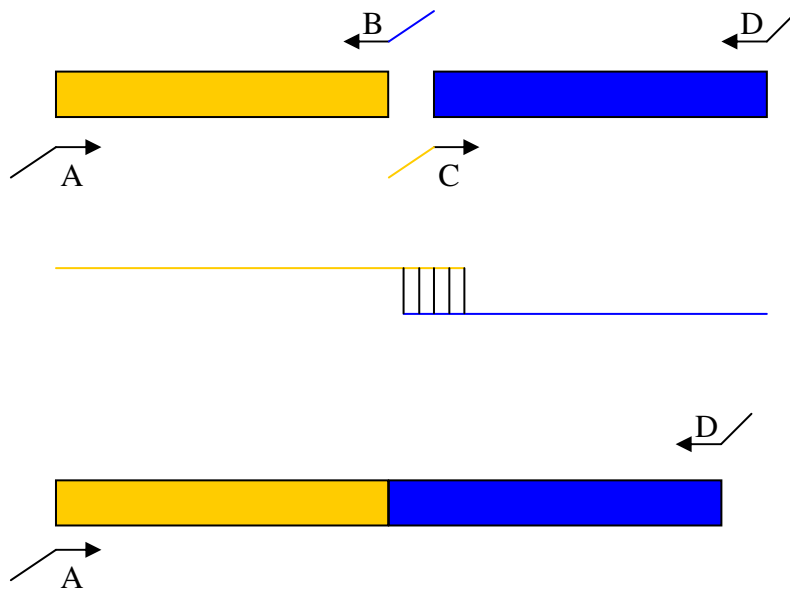
Programm:

Denaturierung	94 °C (4 min)
30 Zyklen à	
Denaturierung	96 °C (1 min)
Annealing	40 °C (1 min)
Elongation	65 °C (8 min)
Letzte Elongation	65 °C (16 min)

### 3.2.1.1.6.5 Fusions-PCR

Bei der Fusions-PCR handelt es sich um eine zweistufige Methode zur basenpaargenauen *in vitro* Fusion beliebiger DNA-Fragmente (<http://www.protocol-online.org>). Zunächst amplifiziert man die beiden zu fusionierenden Fragmente mit Hilfe der Primerpaare A und B bzw. C und D in zwei getrennten Standard-PCR-Reaktionen. Dabei werden die Primer B und C so gewählt, dass die Enden für 12 Basen komplementär zueinander sind; durch diese beiden Primer wird auch der Fusionspunkt festgelegt, während die Primer A und D 5'-Überhänge besitzen können, die eine spätere Klonierung erleichtern (siehe Abb. 5). Die beiden so erhaltenen PCR-Fragmente mussten über ein Agarosegel aufgereinigt werden, um die Primer aus der ersten Reaktion quantitativ von den Amplifikaten zu trennen. Im zweiten Schritt wurden die PCR-Produkte, ohne Zusatz jeglicher Primer, in eine Standard-PCR Reaktion mit 10 Zyklen und einer Annealingtemperatur von 50 °C eingesetzt. Durch die Komplementarität zwischen den beiden Primern B und C kommt es bei den Annealing Schritten zur dargestellten Basenpaarung (siehe Abb. 5). Die beiden Fragmente dienen sich

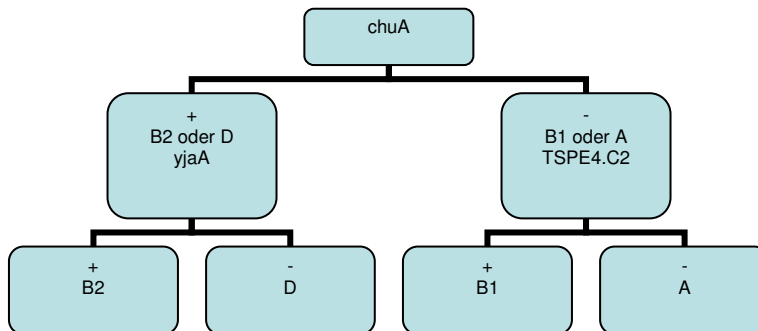
dabei gegenseitig als Primer. Während der Elongationsschritte wird der jeweils komplementäre Strang synthetisiert. Nach diesen 10 Zyklen werden die Primer A und D zum Reaktions-Mix gegeben und weitere 30 Zyklen durchgeführt, was zur Amplifikation des Fusionsproduktes führte (siehe Abb. 5).



**Abb. 5:** Die Fusions-PCR ist schematisch dargestellt. Primer sind durch Pfeile, ihre nicht bindenden 5'-Überhänge durch einen Knick symbolisiert. Basenpaarungen, die während der *Annealing* Phase entstehen können, sind durch senkrechte Striche angedeutet.

### 3.2.1.1.6.6 PCR zur Bestimmung der phylogenetischen Gruppe

Diese Methode wurde nach Clermont *et al.* (2000) durchgeführt. Es handelt sich um eine Triplex-PCR, bei der die Gene *chuA* (279 bp), *yjaA* (211 bp) und *tspE4C2* (152 bp) nachgewiesen werden. Für *chuA* wurden zur Amplifikation die Primer #1388 und #1389, für *yjaA* die Primer #1390 und 1391, für *tspE4C2* das Primerpaar #1392 und #1393 verwendet. Im Genom des *E. coli*-Stammes CFT073 (#AE014075) ist das *chuA*-Gen im Bereich von 4.086.073 bp bis 4.088.019 bp zu finden. Es ist 279 bp lang. Mit den Primern #1388 und #1389 wurde versucht das Gen aus dem jeweiligen *E. coli*-Isolat zu amplifizieren. Die Zuordnung zu den Gruppen A, B1, B2 oder D erfolgte über den Bestimmungsbaum (siehe Abb. 6).



**Abb. 6:** Baum zur Bestimmung der phylogenetischen Gruppe nach Clermont

### 3.2.1.1.7 *Reinigung von PCR-Produkten*

Für Restriktionsverdau, Sequenzierung und Klonierungen wurden PCR-Produkte mit dem Qiaquick® PCR Purification kit von QIAGEN nach Herstellerangaben gereinigt.

### 3.2.1.1.8 *Klonierung von PCR-Produkten*

Das pGEM®-T Easy Vector System der Firma Promega und das TOPO TA Cloning® for Sequencing System der Firma Invitrogen wurden jeweils nach Herstellerangaben zur Klonierung von PCR-Produkten verwendet.

### 3.2.1.1.9 *Konzentrationsbestimmung von DNA*

Mit Hilfe des Spektrometers der Firma Helma wurde bei den Wellenlängen von  $\lambda = 260$  nm und  $\lambda = 280$  nm die Konzentration der DNA bestimmt. Die Messung erfolgte in einer Quarzküvette (Schichtdicke 10 mm). Das Verhältnis beider Werte lag bei allen Messungen zwischen 1,8 und 2,0.

Eine  $OD_{260} = 1$  entspricht 50  $\mu\text{g}$  DNA pro  $\mu\text{l}$ .

### 3.2.1.1.10 *Behandlung mit alkalischer Phosphatase (CIP)*

Um eine Selbstligation von Klonierungsvektoren in Ligationsreaktionen zu verhindern, wurden bei dieser Reaktion die 5'-Phosphatgruppen mit Hilfe der alkalischen Phosphatase (CIP) abgespalten.

**Ansatz:**

DNA	30 $\mu$ l
Reaktionspuffer(NEB3)	3 $\mu$ l
CIP	1–4 $\mu$ l
<u>H<sub>2</sub>O</u>	<u>X <math>\mu</math>l</u>
Endvolumen	40 $\mu$ l

Nach 1 h Inkubation bei 37 °C wurde die so behandelte DNA über die Säulen des Qiaquick® PCR Purification kit von QIAGEN gereinigt.

**3.2.1.1.11 Ligation**

In den Standardligationsansatz wurden folgende Mengen an Vektor, Insert, Enzym und Puffer eingesetzt:

Vektor	x $\mu$ l
Insert	y $\mu$ l
T4-DNA-Ligase	1 $\mu$ l
<u>T4-DNA-Ligase-Puffer</u>	<u>1,5 <math>\mu</math>l</u>
Endvolumen	15 $\mu$ l

Idealerweise betrug das molare Verhältnis zwischen Vektor und Insert für die Ligation überstehender Enden 1:1 und bei glatten Enden 1:3. Die Ligationen wurden ÜN bei einer Temperatur von 16 °C oder für 1–2 h bei RT inkubiert. Um die Ligation zu stoppen, wurde der Ansatz für 10 min bei 70 °C inkubiert.

**3.2.1.2 RNA-Arbeitstechniken****3.2.1.2.1 Isolierung von RNA**

Die Isolation von RNA wurde aus 1 ml einer Kultur der  $OD_{580} = 1,0$  mit Hilfe des RNeasy® Kits der Firma QIAGEN nach Herstellerangaben durchgeführt.

**3.2.1.2.2 Photometrische Konzentrationsbestimmung der RNA**

Die Konzentration und Reinheit der präparierten RNA wurde photometrisch mit Hilfe des Spec<sup>TM</sup>Plus Spectrophotometer in Quarzküvetten bestimmt. Dazu wurde zunächst ein Aliquot der jeweiligen RNA-Probe 1:50 mit RNase-freiem Wasser verdünnt. Anschließend wurde ein UV-Absorptionsspektrum im Wellenlängenbereich von 260 nm und 280 nm aufgenommen. Über den Extinktionswert bei 260 nm kann nach dem Lambert-Beerschen Gesetz die RNA-Konzentration bestimmt werden ( $1 A_{260} = 40 \mu\text{g ssRNA/ml}$ ). Über das Verhältnis

A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub> läßt sich die Reinheit bestimmen (reine RNA: A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub> ≥ 2) (RNeasy® Mini Handbook, QIAGEN).

#### 3.2.1.2.3 *DNaseI-Verdau*

Um in den aufgereinigten RNA-Proben enthaltene DNA-Kontaminationen zu entfernen, wird die vermessene RNA einem *DNaseI*-Verdau unterzogen. In den *DNaseI*-Verdau wird 20 µg isolierte RNA eingesetzt und mit 40 Units *DNaseI* (Gesamtvolumen mit H<sub>2</sub>O auf 50 µl erhöht) 1 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wird die RNA entsprechend dem RNA Cleanup Protokoll aus dem RNeasy® Kit nach Herstellerangaben gereinigt. Zur Detektion verbliebener DNA-Kontaminationen dient eine PCR mit spezifischen Primern unter Standardbedingungen (siehe 3.2.1.1.6.1), wobei 500 ng der *DNaseI*-verdauten RNA bzw. 500 ng genomische DNA (als Positivkontrolle) als Matrize eingesetzt wird. Werden in der PCR Banden detektiert, so erfolgt nach Aufreinigung der RNA ein neuerlicher *DNaseI*-Verdau. Bei Abwesenheit spezifischer Banden wird die Reinheit und Konzentration der RNA erneut spektrophotometrisch bestimmt und die RNA für eine Reverse Transkription verwendet.

#### 3.2.1.2.4 *Reverse Transkription*

Die Umschreibung der erhaltenen DNA-freien RNA in cDNA erfolgte unter Verwendung des 1st strand cDNA Synthesis Kit for RT-PCR (AMV<sub>+</sub>) von Roche (Mannheim) mit „*random primers*“ (Hexanukleotide). In die Reaktion wurden 500 ng RNA eingesetzt. Während des ersten Inkubationsschrittes (25 °C, 10 min) findet das Binden der Startermoleküle statt, im nachfolgenden Schritt (42 °C, 1 h) wurde die RNA sukzessive revers transkribiert, was in der Synthese einzelsträngiger cDNA resultiert. Abschließend erfolgt eine Enzyminaktivierung bei 99 °C für 5 min, die gewonnene cDNA wird bei -20 °C gelagert. Als Kontrollen wurden in der Reversen Transkription jeweils Ansätze ohne AMV Reverse Transcriptase bzw. ohne cDNA als Matrize mitgeführt.

#### 3.2.1.2.5 *Quantitative Real-time PCR*

##### 3.2.1.2.5.1 *Quantifizierung von Real-time revers transkribierter RNA*

Für die Durchführung der realtime PCR-Analysen wurden ausschließlich Geräte und Reagenzien der Firma Roche (Mannheim) verwendet. Die Quantifizierung revers transkribierter genomischer RNA via *Real-Time* PCR erfolgte mit den Geräten LightCycler®<sup>TM</sup> und LightCycler®480 unter Verwendung des LightCycler® FastStart DNA Master SYBR Green I kits.

### 3.2.1.2.5.2 Prinzip des LightCycler®s

Die LightCycler®-Systeme der Firma Roche ermöglichen eine relative und „absolute“ Quantifizierung transgenspezifischer Transkripte<sup>79</sup>. Dabei erfolgt die Quantifizierung über die Detektion von Fluoreszenzsignalen mit Hilfe des Fluoreszenzfarbstoffes SYBR Green I, der sich in die kleine Grube der DNA einlagert. Der dsDNA-bindende Farbstoff ist hoch sensitiv, kann schon wenige Kopien/Reaktion detektieren<sup>86</sup>, und liefert ein stärkeres Signal als Ethidiumbromid. In ungebundenem Zustand weist der Farbstoff nur eine schwache vernachlässigbare Fluoreszenz auf, während er gebunden an DNA eine starke Fluoreszenz einer Wellenlänge von 530 nm zeigt (<http://www.roche-applied-science.com>). Sobald die DNA-Menge während der *Real-Time*-PCR (RT-PCR) ansteigt, erhöht sich proportional auch die Fluoreszenz. Der LightCycler® misst nach jedem Zyklus die Fluoreszenz der in den Kapillaren befindlichen Proben, wobei die Fluoreszenzdaten sich am Monitor verfolgen lassen. Die Software des LightCycler® errechnet *crossing points* (cps) als Maß für die *template*-Konzentration. Diese Punkte sind der Schnittpunkt einer Geraden durch die X-Achse mit einer Geraden gelegt durch den Punkt der größten Zunahme der Fluoreszenz. Der Graph entsteht aus dem Logarithmus der Fluoreszenz auf der Y-Achse und der Zyklenzahl auf der X-Achse. Die cps können als Maß für die Menge an *template* in der Reaktion gelten. Mehr Ausgangsmaterial an DNA führt in der Reaktion zu einem früheren Anstieg der Fluoreszenz und damit einem niedrigeren *crossing point*<sup>108</sup>.

Die PCR-Produkte im LightCycler®-System besitzen idealerweise eine Länge von ca. 500 bp, da längere Fragmente nicht mehr zuverlässig vom LightCycler®-System amplifiziert werden<sup>234</sup>. Für jeden Ansatz mit einem Primerpaar wurde auch eine negative Kontrolle ohne cDNA-*template* mitgeführt.

Da SYBER Green I auch an unspezifische Produkte wie Oligonukleotiddimere bindet, muss zusätzlich die spezifische Schmelztemperatur der einzelnen PCR-Produkte untersucht werden. Dazu wird am Ende jedes Laufs die Temperatur in der Kammer von 38 °C bis 99 °C in Schritten von 0,1 °C angehoben und die Fluoreszenz in den einzelnen Kapillaren kontinuierlich gemessen. Sobald die dsDNA mit ansteigender Temperatur zu denaturieren beginnt, wird SYBR Green I freigesetzt, was in einer plötzlichen Abnahme der Fluoreszenz resultiert. Die Schmelztemperatur wird dann aus der ersten Ableitung dieser Daten gewonnen. Da jedes dsDNA-Produkt seinen spezifischen Schmelzpunkt besitzt, können durch die Schmelzpunktanalyse spezifische und unspezifische PCR-Produkte, wie z. B. Primer-Dimere unterschieden werden.

### 3.2.1.2.5.3 Durchführung der Real-Time-PCR

Als Matrize wurde jeweils 1 µl einer cDNA Präparation verwendet, soweit nicht anders angegeben. Es wurde für jeden Ansatz pro Primerpaar ein Mastermix hergestellt:

H <sub>2</sub> O	12,6 µl
MgCl <sub>2</sub>	2,4 µl
LightCycler® FastStart DNA Master SYBR Green I	2 µl
Primer forward (10 µM)	1 µl
Primer reverse (10 µM)	1 µl
<u>template</u>	1 µl
Gesamtvolumen	20 µl

#### Programm:

Denaturierung	95 °C (10 min)
50 Zyklen à	
Denaturierung	95 °C (10 sec)
Annealing	55 °C (20 sec)
Elongation	72 °C (30 sec)
Schmelzkurve	40 °C – 99 °C

Der erste Denaturierungsschritt dient zur Aktivierung des Enzyms, das mit einem Protein gegen Denaturierung bei niedrigen Temperaturen geschützt ist.

### 3.2.1.2.5.4 Relative Quantifizierung von cDNA

Theoretisch erfolgt in der logarithmisch-linearen Phase der PCR in jedem Zyklus eine Verdopplung der DNA-Kopienzahl. Eine PCR-Effizienz von zwei wird jedoch nur im Idealfall erreicht. Um verschiedene cDNA-Proben gleicher bp-Länge mittels RT-PCR hinsichtlich ihrer Kopienzahl vergleichen zu können, muss zunächst die für jedes PCR-Produkt spezifische Effizienz berechnet werden. Dazu wurden verschiedene Verdünnungen (1:5, 1:10 und 1:50) der zu untersuchenden cDNA-Probe hergestellt und in *Lightcycler*-Analysen eingesetzt. Die errechneten *crossing points* werden nach dem Lauf logarithmisch gegen die Verdünnungsstufen aufgetragen. Aus der sich ergebenden Regressionsgerade ermittelt sich der so genannte *slope*, die negative Steigung der Geraden. Unter Verwendung der negativen Steigung errechnet sich die PCR-Effizienz E wie folgt:

$$E = 10^{-1/\text{slope}}$$

Bei der relativen Quantifizierung wird die Expression der Zielgene mit der eines nicht regulierten *housekeeping*-Gens (HK) normalisiert. Dies reduziert die Varianz der Expressionsergebnisse, da unterschiedliche RNA-Extraktionseffizienzen sowie Fehler bei der RT-PCR innerhalb einer experimentellen Probe gleichermaßen das Zielgen und das HK betreffen. In den hier durchgeführten Experimenten wurde *gapA*, welches für die Glycerin-Aldehyd-Phosphat-Dehydrogenase kodiert, als HK verwendet.

Die Berechnung des Expressionsunterschiede (ratio) erfolgt über folgende Formel <sup>224</sup>:

$$\text{Ratio} = (E_{\text{Zielgen}})^{\Delta\text{CP}_{\text{Zielgen}}(\text{Kontrolle—Behandlung})} / (E_{\text{HK}})^{\Delta\text{CP}_{\text{HK}}(\text{Kontrolle—Behandlung})}$$

Idealerweise ist das Referenzgen (HK) nicht reguliert und sowohl in der Behandlung als auch in der Kontrolle sind die CPs identisch, d. h. die CPs heben sich in der Berechnungsformel im Nenner auf. Dadurch ist die berechnete ratio nur von den Expressionsunterschieden des Zielgens abhängig. Ist kein Expressionsunterschied vorhanden, so beträgt der Quotient 1. Ist der Quotient < 1 bedeutet dies, dass das untersuchte Gen in seiner Expression herunterreguliert wird. Eine Ratio > 1 bedeutet dementsprechend höhere Genexpression.

#### 3.2.1.2.6 **Microarray**

Es wurde der kommerziell verfügbare Microarray GeneChip® *E. coli Antisense Genome Array* der Firma Affymetrix, Santa Clara, USA verwendet.

Die Hybridisierung der Microarrays wurde vom Kompetenzzentrum für Fluoreszente Bioanalytik, Regensburg, durchgeführt.

Die RNA wurde im RIMMH isoliert und auf Trockeneis in das Kompetenzzentrum für Fluoreszente Bioanalytik gebracht.

Die Hybridisierung und Datenauswertung orientiert sich an den Arbeitsanleitungen der Firma Affymetrix ([http://www.affymetrix.com/products/arrays/specific/ecoli\\_antisense.affx](http://www.affymetrix.com/products/arrays/specific/ecoli_antisense.affx)) und an den MIAME (Minimum Information about a microarray experiment)-Standards <sup>16,29</sup>. Zur Hybridisierung wird zunächst Gesamt-RNA isoliert und in cDNA revers transkribiert. Die entstandene cDNA wird anschließend mit *DNaseI* fragmentiert und mit einer Terminalen Transferase am 3'-Ende mit einem Biotin-markierten ddUTP markiert.

Im Durchschnitt ist jedes Gen von *E. coli* auf dem Affymetrix-Chip durch 15 Sonden repräsentiert. Für jedes Gen gibt es zusätzlich ein Set von Sonden, die unspezifische Hybridisierung identifizieren sollen. Das Signal der Sonden wird zum Signal des Hintergrunds und zum Signal von Sonden für *gapA* abgeglichen. Das *housekeeping*-Gen *gapA* dient dabei als interne Kontrolle zur Überprüfung der Qualität der RNA-Präparation. Zusätzlich enthält der Chip Sonden für die Gene *bioB*, *bioC*, *bioD* und *cre*. Die cDNA für

diese Sonden wird vor der Hybridisierung der Reaktion in bestimmten Konzentrationen zugegeben, um die Hybridisierungseffizienz überprüfen zu können.

Die Sonden besitzen alle in etwa die gleiche Länge, um eine konstante Hybridisierungswahrscheinlichkeit zu gewährleisten. Vergleiche der relativen Genexpression zwischen einzelnen Genen sind nicht ohne Vorbehalt vorzunehmen, da die Effizienz der Reversen Transkription vor der Hybridisierung unterschiedlich ist<sup>17</sup>.

Nach der Hybridisierung wird die Fluoreszenz bei  $\lambda = 570$  nm gemessen.

Auf der Grundlage der empfohlenen Standards für die Auswertung eines Microarrays wurden bei der Auswertung der Signale die von Affymetrix empfohlenen cut-offs für Signaldetektion und Datenauswertung verwendet<sup>102</sup>.

Dabei werden bestimmte cut-offs für die Signaldetektion gesetzt. Bei der Auswertung der Signale ergibt sich ein p-Wert als Maß der Zuverlässigkeit der Detektion. Liegt der p-Wert des Signals berechnet über alle Sonden für ein Gen unter  $p = 0,04$ , vergibt die Software die Wertung P (Present). Liegt der Wert dagegen über  $p = 0,06$ , wird das Signal als A (Absent) beurteilt. Es sind auch Vergleiche der relativen Genexpression zwischen zwei Stämmen möglich. Bei einem Vergleich des Signals jeder Sonde mit ihrem Äquivalent in einem anderen Stamm werden Change p-Werte errechnet. Als I (Increase) gelten Change p-Werte  $< 0,0025$ , als D (Decrease) Change p-Werte  $> 0,0075$ .

### 3.2.1.3 Herstellung kompetenter Zellen

#### 3.2.1.3.1 *Chemisch kompetente Zellen*

##### Puffer:

eisgekühlter TBI und TBII (siehe Materialien und Methoden 3.1.7)

##### Durchführung:

In 2 ml LB-Medium ließ man über Nacht *E. coli* anwachsen. Am nächsten Tag wurden 0,5 ml der Übernachtskultur auf 50 ml LB-Medium gegeben und schüttelte die Kultur bei 37 °C schütteln, bis eine  $OD_{578}$  von 0,3–0,5 erreicht war. Nach Erreichen dieser  $OD_{578}$  wurde die Zellkultur für 5 min bei 4.500 U/min im GSA-Rotor pelletiert. Das Pellet wurde in 16 ml kaltem TBI resuspendiert. Der Resuspension folgte ein 15 minütige Inkubation auf Eis. Nach dieser Zeit wurden die Zellen bei 4.500 U/min im GSA-Rotor abzentrifugiert, um ein Pellet zu erhalten. Dieses wurde dann in 4 ml kaltem TBII resuspendiert. Von dieser Zellsuspension wurden dann jeweils 200  $\mu$ l in ein Cup gegeben und bei  $-80$  °C eingefroren.

#### 3.2.1.3.2 *Elektrokompetente Zellen*

##### Lösungen:

10 % Glycerin (steril)

H<sub>2</sub>O

beides eisgekühlt

#### Durchführung:

a) Herstellung im großen Maßstab <sup>69</sup>

Hierfür wurden 100 ml LB-Medium mit 1 ml aus einer frischen Übernachtskultur von *E. coli* angeimpft und dann bei 37 °C geschüttelt, bis eine OD<sub>578</sub> von 0,5–1 erreicht war. Danach wurden die Zellen für 20 min auf Eis inkubiert und bei 4 °C für 15 min bei 4.500 U/min abzentrifugiert. Das Pellet wurde mit 100 ml kaltem H<sub>2</sub>O (4 °C) gewaschen und dann wie zuvor zentrifugiert. Der zweite Waschschrift erfolgte mit 50 ml kaltem H<sub>2</sub>O (4 °C) und darauf folgte eine Zentrifugation bei 4 °C für 15 min bei 4.500 U/min. Der dritte und letzte Waschschrift erfolgte mit 2 ml 10 %igem, sterilem und kaltem Glycerin (4 °C). Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt wurde das Pellet in 250 µl 10%igem sterilem, kaltem Glycerin aufgenommen und in Aliquots von je 40 µl in flüssigem Stickstoff gefroren und bei –80 °C aufbewahrt.

b) Herstellung im kleinen Maßstab

Mit einer Übernachtskultur von *E. coli* wurden 100 ml LB-Medium angeimpft und bis zu einer OD<sub>578</sub> von 0,5 bei 37 °C geschüttelt. Sobald diese OD erreicht war wurden die Zellen für 20 min auf Eis inkubiert. In 2 ml Cups wurden drei Mal hintereinander je 2 ml Zellkultur bei 4.500 U/min für 3 min abzentrifugiert. Das aus dann insgesamt 6 ml erhaltene Pellet wurde je zweimal mit 2 ml kaltem H<sub>2</sub>O und einmal mit 1 ml 10 %igem Glycerin gewaschen. Nach jedem Waschschrift wurde kurz abzentrifugiert und der Überstand vorsichtig abgenommen. Zu jedem Pellet wurden 40 µl 10 %iges kaltes Glycerin gegeben und das Eppendorf-Gefäß bei –80 °C eingefroren.

#### **3.2.1.4 Transformation**

Chemisch kompetente Zellen wurden auf Eis aufgetaut und mit 2 µl des Ligationsansatzes oder der Plasmid-Miniprep versetzt. Nach einer Inkubation auf Eis von 30 min, einem Hitzeschock bei 42 °C für 30 sec und der anschließenden Zugabe von 1 ml LB-Medium ohne Antibiotika wurden die behandelten Zellen für 1 h bei 37 °C geschüttelt. Transformanten wurden durch Ausplattieren auf antibiotikahaltigem Medium selektioniert.

#### **3.2.1.5 Elektroporation**

Die tiefgefrorenen kompetenten Zellen wurden zuerst auf Eis aufgetaut. Währenddessen wird der GenePulser auf 2,5 V eingestellt. Danach gab man 40 µl von den Zellen zusammen

mit 1–2 µl Ligationsansatz oder Plasmid-Miniprep in eine eisgekühlte Küvette (Schichtdicke 0,2 cm). Es ist darauf zu achten, dass die Küvette von außen trocken ist, bevor man sie in die Apparatur stellte. Mit Hilfe elektrischer Spannung (2.5 Volt) wurde die Transformation induziert.

Anschließend wurden die Zellen in 1 ml LB-Medium aufgenommen und für ca. 1 h bei 37 °C geschüttelt. Die Selektion der Transformanten erfolgte durch Ausplattieren auf antibiotikahaltigem Agar. Die erhaltenen Klone wurden nach einer Miniprep mittels Restriktionsanalyse überprüft.

Um die Kompetenz der Zellen zu überprüfen, wurde parallel eine Transformation mit 1 ng eines pUC18 (Invitrogen, Karlsruhe) durchgeführt.

### **3.2.1.6 Konjugation**

Die Konjugation wurde zwischen dem *E. coli*-2685 und dem das Endkonstrukt beinhaltenden *E. coli* S17λpir durchgeführt. 100–500 µl des Donor- und des Akzeptorstammes wurden zusammen für 3 min bei 5.000 U/min zentrifugiert. 150 µl des Überstandes verblieben zusammen mit dem Pellet im Cup. Der Rest wurde abgenommen. Nach 4–6 h Inkubationszeit bei 37 °C ohne Erschütterung wurde das Pellet in 50–100 µl NaCl (0,85 %) aufgenommen und vorsichtig resuspendiert. Diese Suspension wurde dann in 2 ml NaCl gegeben, um aus ihr eine Verdünnungsreihe von 1:10 – 1:10.000 herzustellen. 100 µl der jeweiligen Verdünnungen wurden auf das Minimalmedium M9 mit 50 µg/ml Kanamycin ausplattiert und für 15–17 h bei 37 °C inkubiert.

### **3.2.1.7 Phagentransduktion**

#### **3.2.1.7.1 Präparation des P1-Lysats**

200 µl aus der Übernachtskultur des Donorstammes (Stamm mit knock-out Plasmid) wurden auf 200 µl oder 400 µl des P1-Lysats in einen 50 ml Erlenmeyerkolben gegeben und bei Raumtemperatur für 25 min ohne Schütteln inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden 18,5 ml LB-Medium, 0,5 ml 40 %ige Glukose und 1 ml 0,1 M CaCl<sub>2</sub>-Lösung zugegeben. Diese Mischung wurde dann mit guter Aeration über Nacht bei 37 °C geschüttelt. Danach folgte die Zugabe von 2 ml Chloroform um die Bakterien zu zerstören. Diesem Schritt folgte das Vortexen und dann eine Inkubation bei Raumtemperatur für 30 Minuten. Die entstandene Mischung wurde dann in Eppendorf-Gefäßen aliquotiert und für 5–10 Minuten bei 13.000 rpm zentrifugiert. Die Überstände (Phagen) wurden abgenommen und gepoolt. Aufbewahrt wurde das Phagen-Lysat bei 4 °C.

### 3.2.1.7.2 *P1-Transduktion*

200 µl wurden aus einer frischen Übernachtskultur des Rezipienten auf 200 µl des Phagen-Lysates gegeben. Nach einer 20minütigen Inkubation bei 37 °C ohne Schütteln wurden 400 µl Natrium-Citrat zugegeben, um die Infektion zu stoppen. Der Ansatz wurde dann in 3 ml TA7-Medium gegeben, gemischt und auf LB-Platten mit dem entsprechenden Antibiotikum gegeben. Die Platten wurden über Nacht bei 37 °C bebrütet.

### 3.2.1.8 Phänotypische Charakterisierung

#### 3.2.1.8.1 *Resistenzbestimmung mittels Etest®*

Um die Antibiotikaresistenz zu bestimmen, wurden ÜN-Kulturen der zu untersuchenden Stämme in 0,85 %igem NaCl auf den Standard McFarland = 0,5 verdünnt. Um auf Mueller-Hinton-Agarplatten einen dichten Bakterienrasen zu erhalten, wurden die Platten vollständig mit einem Tupfer beimpft. Zusammen mit einem Etest®-Streifen erfolgte bei 37 °C die Inkubation ÜN. Die Schnittstelle des Hemmhofes mit dem Streifen gibt anhand der Skala des Streifens die MHK an.

**Tab. 11:** verwendete Etest®-Streifen

Chloramphenicol	AB BIODISK, Solna, Schweden
Ciprofloxacin	AB BIODISK
Doxycyclin	AB BIODISK
Imipenem	AB BIODISK
Levofloxacin	AB BIODISK
Moxifloxacin	AB BIODISK
Nalidixinsäure	AB BIODISK

#### 3.2.1.8.2 *Organic solvent tolerance (OST)*

Zur Bestimmung des Wachstums in Gegenwart verschiedener Lösungsmittel wurden je 10 µl einer ÜN-Kultur der drei Stämme, verdünnt in 0,85 % NaCl auf den Standard McFarland = 0,5 auf LB Platten geimpft. Die Platten wurden nach Antrocknen der Kulturen mit dem jeweiligen Lösungsmittel vollständig überschichtet und mit Parafilm gegen Verdunstung des Lösungsmittels abgedichtet. Nach 3 Tagen Inkubation bei Raumtemperatur wurde das Wachstum protokolliert.

### 3.2.1.8.3 **Verwendung des API@20 E-Systems**

API Systeme bestehen aus Mikroröhrchen, die dehydrierte Substrate enthalten. Durch Zugabe der zu untersuchenden Bakteriensuspension werden die verschiedenen Substrate gelöst. Nach einer Inkubation von 18–24 bzw. 48 h (je nach Testsystem) bei genau definierter Temperatur wird das Reaktionsmuster abgelesen und durch Zuordnung von Zahlenwerten ein Profil erstellt. Das System ermöglicht die Durchführung von festgelegten biochemischen Untersuchungen, die anhand von Farbumschlägen entweder spontan oder nach Zugabe von Reagenzien abgelesen werden können und dann zur Auswertung in Triplets zusammengefaßt werden. Bei positivem Ausfall einer Reaktion wird dem ersten Test einer Dreiergruppe eine 1, dem zweiten Test eine 2 und dem dritten Test eine 4 zugeordnet. Bei negativen Ergebnissen wird eine Null notiert. Die 3 Ergebniszahlen der Triplets werden addiert und ergeben hintereinander gereiht die Profilnummer, welche entweder in Tabellen abgelesen werden kann oder mit Computerprogrammen ausgewertet wird. API 20E wird für Enterobakterien und andere Gramnegative Stäbchen mittels 23 standardisierter Reaktionen. (*Enterobacteriaceae* sind „Oxidase-negativ“, „Gram-negativ“, „Glucose-positiv“) verwendet.

Die Konzentration der Impflösung ist standardisiert und sollte eine Dichte nach dem McFarland Standard 0,5 aufweisen.

In 5 ml physiologische NaCl-Lösung 0,85 % wird ca. 1 Kolonie eingerührt, bis McFarland = 0,5 erreicht ist. Diese Impflösung wird blasenfrei in alle 23 Röhrchen eingefüllt; bei solchen mit einem Bechersymbol werden sowohl die Röhrchen als auch die Becherchen gefüllt. Ist eine Reaktion unterstrichene, so wird das jeweilige Röhrchen mit Mineralöl überschichtet. Die Bebrütung erfolgt bei 37 °C für 18–24 Stunden.

### 3.2.1.8.4 **Prüfung der Kanamycin-Resistenz**

Eine Tupfer voll Rattenkot wurde in 2 ml NaCl 0,85 % eingerührt. Aus dieser Suspension wurden 100 µl auf eine kanamycinhaltige (50 µg/ml) LB-Agarplatte ausplattiert.

### 3.2.1.8.5 **MHK-Bestimmung der Enterokokken**

Das zu testende Isolat wird in 3 ml einer 0,45 %igen Kochsalzlösung bis zu einem McFarland von 0,5 eingerührt. Diese Suspension wird dann zum Rehydrieren der Karte im VITEK-2-Gerät verwendet werden. Im Gerät wird die Suspension wird dann nochmals automatisch verdünnt und es folgt die Befüllung und Versiegelung der Karte automatisch. Dann wird die Karte in das VITEK-2-Inkubator-karussell transportiert. Das VITEK-2-Gerät misst das Wachstum in den einzelnen Kammern der Karte über einen definierten Zeitraum. Am Ende der Inkubationszeit wird der MHK-Wert für Ampicillin ermittelt.

#### 3.2.1.8.6 **SIM-Test**

Dieser „Sulphide Indole Motility“-Agar dient der Differenzierung von *Enterobacteriaceae* aufgrund ihrer H<sub>2</sub>S-Bildung, Indolproduktion und Beweglichkeit. Die H<sub>2</sub>S-Bildung wird durch eine schwarze Eisensulfid-Fällung angezeigt.

Die Inokulation erfolgt als Stich in die SIM-Agar-Hochschicht. Bei *E. coli* zeigt sich keine Schwärzung des Mediums, d. h. es kommt zu keiner H<sub>2</sub>S-Bildung. Es kommt bei *E. coli* zu einer roten Ringbildung nach Zugabe von Kovac's Reagenz, d. h. *E. coli* ist „Indol-positiv“ und ist somit in der Lage Tryptophan zu Indol umzuwandeln.

Kommt es zu einer Trübung des Agars, die sich über das gesamte Röhrchen erstreckt, handelt es sich um einen beweglichen Keim. Unbewegliche *Enterobacteriaceae* wachsen hingegen nur entlang des Stichkanals.

#### 3.2.1.8.7 **Citrat-Test**

Der Citrat-Agar dient der Identifizierung von *Enterobacteriaceae*. Einige Keime der *Enterobacteriaceae* können Citrat als einzige Kohlenstoffquelle zur Energiegewinnung verstoffwechseln. Bei der Verwertung von Citrat entstehen alkalische Produkte. Die Alkalisierung verursacht einen Farbumschlag des im Citrat-Agar enthaltenen Indikators von grün nach blau.

Die Inokulation erfolgt per Stich in den Citratagar (Röhrchen). Bei *E. coli* zeigt sich keine Citrat-Verwertung.

#### 3.2.1.8.8 **MHK-Bestimmung mittels Mikrodilution**

Zur Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration werden die Bakterien abgestuften Konzentrationen des Antibiotikums ausgesetzt.

##### Herstellung der Keimeinsaat:

Eine Kultur in der logarithmischen Wachstumsphase wurde auf den McFarland-Standard 0,5 eingestellt. Von dieser Suspension wurden dann 4 µl auf 2 ml 2-fach Mueller-Hinton-Medium gegeben.

Jeweils 100 µl Medium-Keim-Suspension wurde in die Wells einer 96-Well-Platte gegeben.

##### Herstellung der Antibiotikumverdünnungsreihe:

In einer externen Antibiotikumverdünnungsreihe wurden die gewünschten Antibiotikakonzentrationen, in diesem Fall Ciprofloxacin von 128 µg/ml bis 0,008µg/ml, hergestellt.

Da es in jedem Well zu einer 1:2-Verdünnung kommt wurde aus der Antibiotikastocklösung mit der doppelten Konzentration der Endkonzentration 100 µl herausgenommen und auf die 100 µl Medium-Keim-Suspension gegeben.

Als Negativkontrolle wurde ein Well nur mit Medium befüllt, in ein anderes Well wurde nur die Medium-Keim-Suspension als Wachstumskontrolle gegeben.

Um z. B. eine Konzentration von 64 µg/ml im Well zu erhalten wurden 100 µl der 128 µg/ml-haltigen Ciprofloxacinstocklösung zugegeben.

#### **3.2.1.8.9 Untersuchung des aeroben und anaeroben Wachstumsverhaltens**

Eine frische ÜN-Kultur wurde in NaCl (0,85 %) auf den Standard McFarland 0,5 verdünnt. Dieser Ansatz wurde nochmals 1:100 mit NaCl (0,85 %) verdünnt, d. h. es wurden 70 µl auf 7 ml 0,85 %iges NaCl gegeben. Aus dieser Verdünnung wurden 7 µl auf 70 µl Thioglykolat-Bouillon gegeben. Dieser Ansatz wurde dreimal durchgeführt. Als Referenz wurde in ein Well nur das Medium Thioglykolat vorgelegt.

Um das anaerobe Wachstumsverhalten zu untersuchen wurde auf den aeroben Ansatz vorsichtig 70 µl Paraffin pipettiert. Hier wurde als Negativkontrolle und Referenz Thioglykolat-Bouillon mit Paraffin verwendet.

#### **3.2.1.8.10 Untersuchung des Wachstumsverhaltens in einer Mischkultur**

In 0,85 % NaCl wurde der mit *gfp* markierte Klon, entweder *E. coli*-32 oder *E. coli*-57, auf den Standard McFarland 0,5 verdünnt. Auch der Wildtypstamm (*E. coli*-4) wurde auf McFarland 0,5 eingestellt. Von beiden Suspensionen wurde eine 1:1-Verdünnung hergestellt. Mit dieser Mischung wurde eine Verdünnungsreihe von  $10^{-1}$  bis  $10^{-4}$  durchgeführt. Von den einzelnen Verdünnungen wurden jeweils 100 µl auf je eine LB-Platte mit 0,1 % Arabinose ausplattiert. Nach Inkubation über Nacht bei 37°C konnte unter UV-Bestrahlung der jeweilige markierte Klon von dem Wildtypstamm unterschieden werden.

### **3.2.1.9 Induktionsversuche**

#### **3.2.1.9.1 Induktionsversuche für visuelles System**

200 µl einer ÜN-Kultur von dem das Reportergen-Konstrukt tragenden Stammes wurden in 4 ml LB-Medium gegeben, welches die Induktionslösung in einer Konzentration von 5 mM enthält. Nachdem diese Suspension über Nacht bei 37°C schüttelnd (200 U/min) inkubiert wurde, wurden jeweils 200 µl der Flüssigkultur in ein Well einer 96-Well-Platte gegeben und bei 3.000 U/min für 5 min herunterzentrifugiert. Nach Abnahme der Überstände wurde die

96-Well-Platte unter einer UV-Lampe betrachtet. Die Beurteilung erfolgte über die Stärke der Fluoreszenz.

#### 3.2.1.9.2 *Induktion für RNA-Isolierung*

400 µl einer 250 mM Induktionslösung wurden zusammen mit 1 ml einer Übernachtskultur des jeweiligen Keims mit LB-Medium auf ein Volumen von 20 ml gebracht. Diese Suspension wurde dann solange bei 37 °C bei 220 U/min geschüttelt, bis eine OD<sub>600</sub> von 1 erreicht war. Dann folgte die RNA-Isolierung wie unter 3.2.1.2.1 beschrieben.

### 3.2.1.10 Biochemische Methoden

#### 3.2.1.10.1 *Southern Blotting*

##### 3.2.1.10.1.1 *DNA-Isolierung*

Die hierfür notwendigen Puffer und Säulen stammten aus dem DNeasy® Tissue kit und dem Qiafilter™ Plasmid Midi Kit. Um genügend gDNA für einen Southern Blot zu isolieren, wurde folgendermaßen vorgegangen:

Zum Puffer B1 wurde RNaseA zugegeben (Endkonzentration 200 µg/ml). 3–6 ml einer Bakteriensuspension wurden für 5–10 min bei 4 °C bei 5.000 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgekippt und das Bakterienpellet in 3,5 ml präpariertem B1-Puffer resuspendiert. Nach Zugabe von 80 µl Lysozym (100 mg/ml) und 100 µl ProteaseK (20 mg/ml) wurde der Ansatz für mindestens 30 min bei 37 °C inkubiert. Im Anschluss wurden 4 ml vom Puffer B2 zugegeben und durch vortexen gemischt. Das Lysat wurde für 30 min oder länger bei 50 °C inkubiert. Sobald das Lysat klar war, wurde es nach kurzem vortexen auf die vorher mit 4 ml QBT-Puffer äquilibrierte Säule gegeben. Anschließend wurde die Säule zwei Mal mit 7,5 ml QC-Puffer gewaschen. Die Eluierung der genomischen DNA erfolgte mit 5 ml QF-Puffer. Die eluierte DNA wurde dann mit 3,5 ml Isopropanol gefällt und für 30 min auf 4 °C bei mehr als 15.000 × g zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen. Das entstandene Pellet wurde mit 2 ml kaltem 70 %igem Ethanol gewaschen und unter dem Flow getrocknet. Mit 0,1–2 ml TE-Puffer wurde die DNA über Nacht bei RT oder bei 55 °C für 1–2 h gelöst. Die Konzentration wurde dann wie unter 3.2.1.1.9 beschrieben gemessen.

### 3.2.1.10.1.2 Verdau für Southern Blot

Ansatz:

DNA	1–2 µg gDNA
Enzym	5 µl
Puffer	5 µl
BSA (optional)	5 µl
<u>H<sub>2</sub>O</u>	<u>X µl</u>
Endvolumen	50 µl

Der Verdau wurde über Nacht bei der von dem Enzym benötigten Temperatur inkubiert.

### 3.2.1.10.1.3 Herstellung einer mit Digoxigenin-markierten Sonde

Die Herstellung von einer Digoxigenin-markierten Sonde erfolgte nach Angaben von Roche Digoxigenin-11-2'-desoxy-uridin-5'phosphat, Alkali-stabil.

### 3.2.1.10.1.4 Kapillarblot und Hybridisierung

Die Durchführung des Kapillarblots und der Hybridisierung erfolgte nach den Angaben im DIG Application Manual for Filter Hybridization von Roche Molecular Biochemicals.

### 3.2.1.10.2 HPLC (*High Performance (Pressure) Liquid Chromatography*)

HPLC ist eine Sonderform der Säulenchromatographie, bei der Druck angewandt wird. HPLC dient der qualitativen und quantitativen Analyse von Substanzgemischen. Sie ist vielen analytischen Trennmethode in Bezug auf Trennleistung, Schnelligkeit und Aufwand überlegen und hat auch gegenüber der Gaschromatographie durch die großen Variationsmöglichkeiten bei stationärer und mobiler Phase viele Vorteile. Der limitierende Faktor ist die Unlöslichkeit der Probe im Fließmittel.

Die verwendete HPLC-Apparatur bestand aus folgenden Komponenten:

Pumpe LC 10 AS

Autosampler SIL-10A

Steuer-/Integrationssoftware Class-LC10 der Firma Shimadzu, Duisburg

Säulenofen ERC 125 der Firma ERC, Riermiling

Detektor Shimadzu RF10AXL (280/445 nm) der Firma Shimadzu, Duisburg

Säule Synergi Polar RP 4 µm (150x4.6 mm) der Firma Phenomenex, Aschaffenburg

Der benutzte Eluent bestand aus folgenden Komponenten:

H <sub>2</sub> O	840 ml
Tetrabutylammonium×HSO <sub>4</sub>	1.680 mg

85 %H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	840 µl
Acetonitril	160 ml

Der Eluent wurde vor Benutzung gefiltert.

Die für den externen und internen Standard benötigten Substanzen waren Gatifloxacin (Grünenthal, Aachen) und Ciprofloxacin (Firma Bayer, Leverkusen).

### **3.2.1.10.2.1 Vorbereitung der Proben**

#### 1. Aufbereitung des Kots der Ratten

Der von Ratten isolierte Kot wurde für 15 Minuten in einer Vakuumzentrifuge ohne zentrifugieren getrocknet. Danach wurde der getrocknete Kot mit 1 ml 5 mg/l Gatifloxacin-Extraktionslösung (5 ml Gatifloxacin 100 µg/ml, 40 ml H<sub>2</sub>O, 1 ml HClO<sub>4</sub>, 100 µl H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) gemischt und über Nacht bei Raumtemperatur geschüttelt. Gatifloxacin wurde hierbei als interner Standard benutzt. Am nächsten Tag wurde die Suspension für 10 Minuten bei 4 °C 13.000 U/min zentrifugiert. Jeweils 150 µl der Probe wurden in ein Mini-Vial gegeben.

#### 2. Aufbereitung der Wasserproben:

Aufgrund der unterschiedlichen Ciprofloxacinkonzentrationen im Wasser wurden 200 µl der Proben mit 0,8 µg/ml, 1,6 µg/ml, 3,2 µg/ml und 6,4 µg/ml Ciprofloxacin auf jeweils 2ml internen Standard gegeben. Bei den Konzentrationen 12,8 µg/ml, 25,6 µg/ml und 36 µg/ml wurden jeweils 100 µl der Wasserprobe auf 2 ml internen Standard gegeben.

Als interner Standard wurde Gatifloxacin (2 µg/ml) verwendet. Um die Konzentration von 2 µg/ml zu erreichen wurden 2 ml der Gatifloxacin-Stocklösung (100 µg/ml) auf 100ml Eluent gegeben.

Als externer Standard wurde eine Kombination von 0,5 µg/ml Ciprofloxacin und 2 µg/ml Gatifloxacin verwendet.

### **3.2.1.10.2.2 Ablauf der Messungen mittels HPLC**

Die zu analysierende Probe wird durch das Probeneinlaßsystem eingegeben und durch das Fließmittel auf die Trennsäule transportiert. Der Fluss beträgt 1,0 ml/min. Innerhalb der Trennsäule findet der chromatographische Prozess bzw. die Auftrennung des Probengemisches statt. Die einzelnen Bestandteile der Probe wandern nacheinander in den Detektor und erzeugen ein Signal, das durch einen Schreiber in ein Chromatogramm (Elutionskurve) überführt wird. Ein Integrator übernimmt dann die Auswertung des Chromatogramms. Auf der Höhe von 4,4 Minuten war der Peak von Ciprofloxacin zu sehen. Der Peak des internen Standards Gatifloxacin bildete sich bei 5,9 Minuten ab. Die

Elutionskurve stellt die Abhängigkeit für die Konzentration der eluierten Substanzen von der Zeit dar.

### 3.2.1.10.2.3 Auswertung der Chromatogramme

Um die in der Probe enthaltene Konzentration zu bestimmen wurden folgende Formeln verwendet:

$$C_{\text{Cip.Probe}}(\mu\text{g/ml}) = \frac{(\text{Peakfläche}_{\text{Cip-Probe}} \times C_{\text{Cip-externer Standard}} \times \text{Peakfläche}_{\text{Gati-externer Standard}})}{(\text{Peakfläche}_{\text{Cip-externer Standard}} \times \text{Peakfläche}_{\text{Gati-interner Standard}})}$$

Aufgenommene Ciprofloxacinkonzentration in  $\mu\text{g}$ :

$$C_{\text{Cip-aufgenommen}}(\mu\text{g}) = \text{Trinkmenge (ml)} \times C_{\text{Cip im Trinkwasser}}(\mu\text{g/ml})$$

Ausscheidung in (%):

$$\text{Ausscheidung (\%)} = (\text{Peakfläche}_{\text{Cip-Probe}} \times 100) / C_{\text{Cip-aufgenommen}}$$

## 3.3 Markierung mittels Reporterkonstrukt

### 3.3.1 Green fluorescent protein (Gfp) aus *Aequorea victoria*

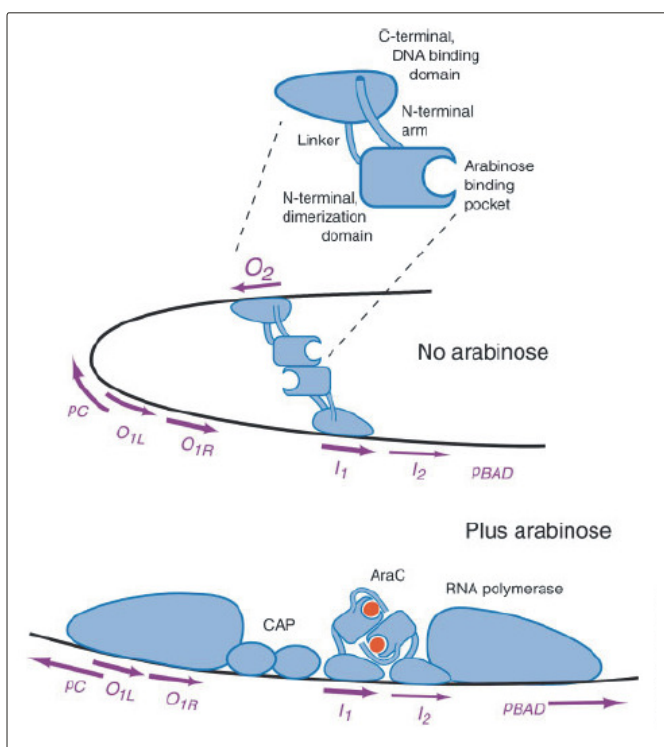
Bei *gfp* handelt es sich um ein für ein autofluoreszierendes Protein kodierendes Gen. Es wurde bei der Tiefseequalle *Aequorea victoria* gefunden. *In vivo* kommt es durch eine kalziumabhängige Oxidation von Coelenterazin zu der Biolumineszenz des Photoproteins Aequorin. Bei dieser Reaktion wird die freiwerdende Energie in Form von blauem Licht abgegeben. Dieses blaue Licht (509 nm) stimuliert Gfp zur Emission von grünem Licht<sup>116,117,276</sup>. Die Biolumineszenz von *Aequorea victoria* hängt also von Coelenterazin, Aequorin,  $\text{Ca}^{2+}$  und dem Gfp ab, wobei Aequorin und Gfp eng miteinander assoziiert sind<sup>117</sup>. Das Absorptionsspektrum von Gfp hat einen deutlichen Gipfel bei 395 nm sowie einen kleineren bei 470 nm. Die Amplituden dieser beiden Maxima von nativem Gfp sind stark von Temperatur, Ionenstärke, der Proteinkonzentration und dem pH-Wert abhängig<sup>35,121,122</sup>. Die Primärstruktur des Gfp besteht aus 238 Aminosäuren mit einer Molekülmasse von 26,8 kDa.

Gfp kann sowohl in Eukaryoten als auch in Prokaryoten exprimiert werden, da es außer Sauerstoff keinerlei exogene Faktoren, Kofaktoren oder Enzyme benötigt<sup>121,122,157</sup>.

Für die Klonierung wurde das von *Stratagene* stammende *gfp*-Gen (optimiert nach Cramer *et al.*) verwendet<sup>53</sup>.

### 3.3.2 Verwendung des *araB*-Promotors

Der *araB*-Promotor ist dem *araBAD*-Operon vorgeschaltet. Für die Induktion der Expression des *araBAD*-Operons ist das *araC*-Genprodukt wichtig. Bei AraC handelt es sich um ein Protein mit zwei Funktionen. In der Abwesenheit von Arabinose bindet AraC die „regulatory sites“  $I_1$  und  $O_1$  und unterdrückt somit die *AraBAD*-Operon-Transkription aufgrund von DNA-Schleifenbildung. Der AraC-Spiegel wird autoreguliert durch die Bindung des überschüssigen AraC an  $O_1$ . Bindet Arabinose an AraC, so bindet dieses an  $I_1$  und  $I_2$ , aber nicht mehr an  $O_1$ . AraC kontaktiert dann die RNA-Polymerase und hilft dieser bei der Bindung an den schwachen Arabinose-Operon Promotor (siehe Abbildung 7)<sup>251</sup>.



**Abb. 7:** Regulation der Transkription des Arabinose-Operons in *Escherichia coli*

**Quelle:** Schleif, R.: AraC protein: a love-hate relationship<sup>251</sup>

Die Genexpression kann somit effizient abgeschaltet bzw. inhibiert werden solange L-Arabinose-freie Medien verwendet werden und indem die AraC-Antagonisten D-Arabinose oder D-Fruktose zugegeben werden<sup>100</sup>. Aufgrund dieser engen Kontrolle können schädliche oder unerwünschte Effekte infolge der *gfp*-Expression verhindert werden<sup>100</sup>. Dies ist wichtig,

da keine Expression des *gfp*-Gens während der Darmpassage stattfinden soll um einen Verlust in der Konkurrenzfähigkeit aufgrund von Protein- und Energieverlust zu vermeiden.

### 3.4 Zellkultur

#### 3.4.1 Verwendete Zellen

Bei HT-29-Zellen handelt es sich um humane Adenokarzinom-Zellen (DSMZ ACC 299). Die adhärenente Zellen wachsen in Monolayern und bilden große Kolonien. ([http://www.dsmz.de/human\\_and\\_animal\\_cell\\_lines/info.php?dsmz\\_nr=299&from=cell\\_line\\_index&select=H&term=&preselect=human:hamster:mouse:rat:insect:other&firstload=0](http://www.dsmz.de/human_and_animal_cell_lines/info.php?dsmz_nr=299&from=cell_line_index&select=H&term=&preselect=human:hamster:mouse:rat:insect:other&firstload=0)).

#### 3.4.2 Verwendete Medien

McCoy`s+10 %FCS:            500 ml McCoy`s  
   50–55 ml FCS

Einfriermedium:            500 µl DMSO  
   1 ml FCS  
   3,5 ml McCoy`s

Trypsin (0,5 %)/EDTA (0,2 %)

Waschlösung:                PBS

#### 3.4.3 Anzucht der Zellen

Die Anzüchtung der Zellen erfolgte in Flaschen von BD Falcon™ mit den Größen von 175 cm<sup>3</sup>, 75 cm<sup>3</sup> oder 50 cm<sup>3</sup>. Auf 1ml Zellsuspension wurde das entsprechende Volumen an Medium gegeben, bis der Flaschenboden bedeckt war.

#### 3.4.4 Splitten der Zellen

Zuerst wurde das verbrauchte McCoy`s Medium abgekippt. Darauf folgten zwei Waschschrte mit ~10 ml PBS (zugeben, schwenken und abkippen). Anschließend wurden 2 ml Trypsin/EDTA zugegeben. Die Flaschen wurden dann für 5–10 min im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Danach wurden die Zellen durch Klopfen vom Flaschenboden gelöst. Die Zellen wurden dann in 9 ml McCoy`s Medium resuspendiert. In eine neue Zellkulturflasche wurde 1 ml der Zellsuspension auf z. B. 10 ml Medium gegeben. Diese neue Flasche wurde dann bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und 95 % Feuchtigkeit inkubiert, bis ein Zellrasen ohne Löcher auf dem Flaschenboden zu erkennen war.

### 3.4.5 Einfrieren der Zellen

Als Vorbereitung wurde das Einfriermedium (siehe 3.4.2) auf Eis gestellt, ein Cryo-Cup beschriftet und die Zentrifuge auf 4 °C eingestellt. Zuerst wurde das gebrauchte McCoy's Medium von den Zellen abgekippt und die Zellen mit ~10 ml PBS gewaschen. Danach wurden 2 ml Trypsin/EDTA zugegeben und die Kultur für 5–10 min in den Brutschrank bei 37 °C gestellt. Die Zellen wurden dann durch Klopfen vom Flaschenboden gelöst. Nachdem die Zellen in 9 ml Medium gut resuspendiert wurden, ist die Zellsuspension in ein Bluecap überführt worden und bei 4 °C, 300 x g für 5 min zentrifugiert worden. Der Überstand wurde abgesaugt, die Zellen in 1 ml Einfriermedium resuspendiert und in ein Cryo-Cup überführt. Das Cup wurde sofort auf Eis gestellt und bei —100 °C gelagert.

### 3.4.6 Auftauen von Zellen

Die tiefgefrorenen Zellen wurden bei Raumtemperatur aufgetaut. Sobald die Zellen aufgetaut waren, wurden sie sofort in eine 25 cm<sup>3</sup>-Zellkulturflasche mit McCoy's Medium überführt, da es sich bei DMSO um ein Zellgift handelt. Diese Flasche wurde über Nacht bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und 95 % Feuchtigkeit inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Zellen in eine 75 cm<sup>3</sup>-Zellkulturflasche überführt.

### 3.4.7 Zelladhäsionsassay

#### 3.4.7.1 Anzucht der HT-29-Zellen für den Adhäsionsassay

Nachdem die Zellen vom Flaschenboden gelöst worden sind wurden diese für 5 Minuten bei 4 °C und 300 U/min abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und die Zellen in 5–10 ml Medium aufgenommen. Von dieser Zellsuspension wurden 10 µl auf 90 µl Medium gegeben. Dieser Ansatz wurde auf die Zählkammer „Neubauer improved“ (0,100 mm Tiefe Depth, Profondeur, 0,0025 mm<sup>2</sup>) von Labor<sup>OPTIK</sup> aufgetragen. Danach wurde die Zellzahl pro Milliliter bestimmt und das benötigte Volumen für die gewünschte Zellzahl berechnet. Für den Zelladhäsionsassay wurden immer 2×10<sup>6</sup> Zellen pro Well ausgesät. Die benötigte Menge der Zellsuspension wurde dann in jedes Well einer 24-Well-Platte gegeben und auf ein Gesamtvolumen von 1 ml mit McCoy's Medium gebracht. Die Platte wurde dann für 24 h im Zellkulturinkubator aufbewahrt, um ein Absetzen und Adhärenz der Zellen an den Well-Boden zu erreichen.

#### 3.4.7.2 Anzucht der Keime für den Adhäsionsassay

Neben den zu untersuchenden Keimen wurde als Positiv-Kontrolle ein *Citrobacter*-Stamm (*Citrobacter freundii* 3009, Würzburg) und als Negativ-Kontrolle ein *Escherichia coli* HB101 mit ausgetestet. 2 ml LB-Medium wurden mit einer geeigneten Menge Übernachtskultur

angeimpft, sodass die Kultur nach 2 h eine OD<sub>600</sub> von 0,4–0,6 erreicht hatte. Danach wurden die Kulturen auf eine OD<sub>600</sub> von 0,1 verdünnt. Pro Well wurden dann 25 µl der verdünnten Kultur zugesetzt, gemischt und für 2–4 h in einem CO<sub>2</sub>-Inkubator bei 37 °C inkubiert. Danach wurde der infizierte HT-29-Zellrasen mit PBS<sub>MIT</sub> acht Mal gewaschen. Danach folgte die Lyse der Epithelzellen mit je 1 ml 0,1 %igem Triton®X-100 für 10 Minuten auf einem Schüttler. Die Anzahl der epithelzellassoziierten Bakterien wurde dann durch Ausplattieren geeigneter Verdünnungen des Lysats bestimmt.

### 3.5 Konfokale Lasermikroskopaufnahmen

#### 3.5.1 Verwendete Medien und Puffer

PBS<sub>OHNE</sub>

Paraformaldehyd

Triton®X-100

Sytox Green (Invitrogen)

Eindeckmedium:           10 g Mowiol 4.88 (Hoechst)  
                                  40 ml PBS (w/o Ca<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup>)  
                                  → 24 h rühren  
                                  20 ml Glycerol zugeben  
                                  → 24 h rühren bei 4 °C  
                                  → 20 min bei 15.000 x g zentrifugieren  
                                  → Überstand portionieren  
                                  1 mg/ml DABCO (Sigma) in fertigem Mowiol lösen  
                                  → Lagerung bei 4 °C

#### 3.5.2 Präparatherstellung und -fixierung

200 µl der HT-29-Zellen (ca.  $1 \times 10^4$ - $1 \times 10^5$  Zellen) wurden in ein Chamber Slide™ System Lab-Tek®II von Nalge Nunc International gegeben und über Nacht bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Am nächsten Tag wurde der mit Arabinose induzierte Klon *E. coli*-57 mit einer MOI (Multiplicity of Infection; Bakterienzahl pro Eukaryonten-Zelle) zwischen 1 und 10 auf die HT-29-Zellen gegeben. Danach wurden die Chamber Slides für zwei Stunden bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Darauf folgten drei vorsichtige Waschschriffe mit jeweils 500 µl PBS<sub>OHNE</sub>. Auf die gewaschenen Zellen wurden jetzt jeweils 800 µl 4% iges Paraformaldehyd gegeben und bei 37 °C für 30 Minuten inkubiert. Nach der Inkubationszeit folgten wieder zwei vorsichtige Waschschriffe mit PBS<sub>OHNE</sub>, wobei der Waschpuffer für fünf Minuten auf den Zellen blieb. Nach den beiden Waschschriffen folgte eine 15minütige Inkubation mit 0,1 %igem Triton®X-100 bei 37 °C. Danach wurden wieder zwei 5minütige Waschschriffe mit

PBS<sub>OHNE</sub> durchgeführt. Hierauf folgte die Zugabe von 250 µl 1:10.000 verdünntem Sytox Green (500 nM). Der Farbstoff wurde für 30 min bei Raumtemperatur auf den Zellen gelassen. Nach der Inkubationszeit folgten drei 5 minütige vorsichtige Waschschrritte. Danach wurde der Waschpuffer sehr gut abgesaugt und mit einem Heber die Kammern entfernt. Der Objektträger wurde kurz in Milipore-Wasser getaucht und im Dunkeln getrocknet. Sobald der Objektträger trocken war, wurde 100 µl Eindeckmedium auf das Deckglas gegeben und mit einer Spitze verstrichen. Das Deckglas wurde dann auf den Objektträger gelegt und die Luftblasen entfernt. Das Präparat wurde dann über Nacht in Alufolie gewickelt im Kühlschrank fixiert.

### **3.6 Tierversuch**

#### **3.6.1 Verwendete Tiere**

Bei den verwendeten Tieren handelt es sich um zehn weibliche spezifisch pathogen freie F-344 Fischer Ratten im Alter von 30–35 Tagen von Charles River.

#### **3.6.2 Tierhaltung und Tierpflege**

Die Ratten wurden jeweils im Paar in einem Käfig mit Filterdeckel gehalten. Trinkwasser wurde nach Kontrolle und Notierung der Trinkmenge drei Mal pro Woche gewechselt. Es wurde Trinkwasser verwendet, das vor dem ersten Gebrauch auf *Pseudomonas aeruginosa* getestet wurde. Die Wasserflaschen wurden nach vierwöchigem Gebrauch gereinigt und autoklaviert. Den Ratten wurde von sniff das arabinosefreie Alleinfutter V 1535-000 Ratten/Mäuse ad libitum gegeben. Der Käfig wurde einmal pro Woche oder alle zehn Tage gewechselt. Die Streu wurde zum Autoklavieren gegeben. Auch der gesamte Käfig wurde nach grober Reinigung und Säuberung mit 70 %igem Ethanol zum Autoklavieren gegeben. In einen neuen Käfig wurden circa zwei Zentimeter Streu eingebracht und dann die Tiere umgesetzt.

#### **3.6.3 Ankunft und Eingewöhnungsphase**

Die Ratten wurden gleich nach ihrer Ankunft in zweier-Gruppen eingeteilt und an den Ohren markiert. In der Eingewöhnungsphase wurden die Tiere mehrmals täglich besucht, um sie an die versuchsdurchführende Person zu gewöhnen. Hierbei wurde mit ihnen geredet und sie wurden sowohl am Bauch als auch am Rücken berührt.

#### **3.6.4 Gewichtsbestimmung der Ratten**

Um das Gewicht der Ratten zu bestimmen wurde eine Kiste, die auf einer Waage stand, mit jeder Ratte einzeln besetzt. Die Gewichtsbestimmung wurde alle 2 Wochen durchgeführt.

### 3.6.5 Überprüfung des Futters auf Arabinose

Der *E. coli*-57 wurde in gelöstem Rattenfutter mit LB-Medium über Nacht inkubiert.

### 3.6.6 Kolonisation des Rattendarms mit dem markierten *E. coli*

Der erste Kolonisationsversuch des Rattendarms erfolgte, als die Ratten 65 Tage alt waren. Der zweite Kolonisationsversuch wurde im Alter von 85 Tagen durchgeführt.

#### 3.6.6.1 Kolonisation mit Hilfe von Wasser

Die Zellen einer frischen Übernachtskultur des *E. coli*-57 wurden bei 4 °C und 4.500 U/min abzentrifugiert und mehrmals mit PBS gewaschen. Nach den Waschschritten wurden die Zellen in PBS resuspendiert und die OD<sub>600</sub> bestimmt. Die OD<sub>600</sub> betrug ungefähr 3. Von dieser Suspension wurden 103 µl auf 300 ml Leitungswasser gegeben. Dies entsprach einer Keimmenge von 10<sup>6</sup> Zellen/ml. Dieses mit *E. coli*-57 versetzte Wasser wurde den Ratten zum Trinken gegeben. Der Kolonisationsversuch mit Wasser wurde an drei aufeinanderfolgenden Tagen wiederholt.

#### 3.6.6.2 Kolonisation mit Hilfe einer Sonde

Die Zellen einer frischen Übernachtskultur des *E. coli*-57 wurden bei 4°C und 4.500 U/min abzentrifugiert und mehrmals mit PBS gewaschen. Nach den Waschschritten wurden die Zellen in PBS resuspendiert und die OD<sub>600</sub> bestimmt. Die OD<sub>600</sub> betrug ungefähr 3. Von dieser Suspension wurden 300 µl den Ratten per Feeding Needle 18 Gauge/50 mm Long von der Firma Fine Science Tools verabreicht. Dies entsprach einer Keimmenge von 9×10<sup>8</sup> Zellen. Dieser Kolonisationsschritt wurde an drei aufeinander folgenden Tagen wiederholt. Um dem markierten Stamm *E. coli*-57 einmalig einen Selektionsvorteil zu verschaffen, wurde sieben Tage nach der letzten Kolonisation den Ratten für 24 h 100 ml mit 160 µg Kanamycin versetztes Wasser verabreicht.

### 3.7 Kontrolle der Stabilität der Kolonisation

Über drei Monate wurde Kot abgenommen und auf Kanamycinhaltige LB-Agarplatte verimpft um das Vorhandensein des *E. coli*-57 zu überprüfen.

#### 3.7.1 Kotabnahme

Zur Kotabnahme wurden die Ratten aus dem Käfig genommen und jeweils einzeln in einen anderen Käfig ohne Streu gesetzt. Die Ratten gaben nach etwas Bewegung ohne Probleme ihren Kot ab. Der verwendete Käfig wurde nach jeder einzelnen Kotabnahme mit 70 %igem Ethanol gesäubert.

### 3.7.2 Quantitative Verarbeitung von Kotproben

Zur Bestimmung der Keimzahl in den Kotproben der Ratten wurden folgende Untersuchungen durchgeführt.

Um den Feuchtigkeitsgehalt der Probe zu bestimmen, wurde ein Aliquot vor und nach der Trocknung gewogen. Ein weiteres Aliquot, dessen Gewicht auch bestimmt wurde, wurde in 1 ml NaCl (0,85 %) suspendiert und es wurde eine Verdünnungsreihe angefertigt. Die einzelnen Verdünnungen wurden auf Selektivagarplatten (CSB-Agar, McConkey-Agar, Enterococcosel-Agar, Schädler-KV-Agar, MRS-Agar, Sabouraud-Agar) ausplattiert. Das restliche Aliquot wurde 1:2 mit 70 %igem Ethanol versetzt und für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Inkubationsphase wurde eine Verdünnungsreihe angelegt, die auf CSB ausplattiert wurde.

## 4 **Ergebnisse**

### 4.1 Chromosomale Markierung von *E. coli* mit *gfp*

Es gibt unterschiedliche Techniken der chromosomalen Markierung. Zum einen kann das Markergen, in dieser Arbeit das *green fluorescent protein (gfp)*, transposon-vermittelt in das Genom eingebracht werden. Hier kann der Integrationsort nicht vorhergesagt oder vorherbestimmt werden. Dies ist ein Nachteil, da durch die Insertion an einen unbekanntem Ort die Funktionsfähigkeit eines Gens gestört werden kann. Ist dies ein für die Zelle essentielles Gen so hat die Integration für die Zelle unbekanntem Konsequenzen. Die Integration kann störend oder im schlimmsten Fall letal für die Zelle sein<sup>31,105,227</sup>. Die Reversibilität der Integration und der womöglich entstehende Gendefekt sind die Nachteile dieser Art der Integration.

Über einen  $\lambda$ -Phagen besteht eine weitere Möglichkeit der chromosomalen Markierung. Diese Art der Integration ist nur im lysogenen Status stabil. Häufig sind Helferphagen oder Plasmide notwendig, um die Lysogenie des rekombinanten  $\lambda$ -Vektors zu erzeugen. Daher ist dieses System für eine reversible Integration von DNA ins Genom geeignet<sup>105,227</sup>. Der Nachteil dieser Art der Integration liegt darin, dass es über einen  $\lambda$ -Phagen nicht möglich ist, das Reportergen irreversibel zu integrieren.

Die homologe Rekombination bietet die Möglichkeit der gezielten Integration an einer Stelle, die – soweit durch Genomanalyse abschätzbar – sowohl keinen Gendefekt erzeugt als auch langfristig stabil ist. Durch die homologen Bereiche wird das Ziel der Integration festgelegt<sup>128,257</sup>.

#### 4.1.1 Homologe Rekombination

Als Genort zur homologen Rekombination wurde der Bereich von 1.619.393 bp–1.620.806 bp (1.413 bp) aus dem *E. coli*-K12-Genom gewählt, da dieser in keinem offenen Leserahmen liegt und keine weitere Funktion dieses Genabschnittes bekannt ist. Die Überprüfung auf offene Leserahmen wurde mit Hilfe des Programms *EditSeq*<sup>TM</sup> durchgeführt. Die Homologie zwischen den beiden Bereichen von *E. coli*-K12 und *E. coli*-2685 beträgt 97 %. Aufgrund der Homologie der beiden Bereiche wurde angenommen, dass auch bei *E. coli*-2685 kein offener Leserahmen von der Integration betroffen ist.

Um das zu rekombinierende Fragment – bestehend aus den beiden flankierenden Rekombinations-bereichen, der Kanamycin-Resistenzkassette und dem unter der Kontrolle eines Promotors stehenden Reportergen *gfp* – in den zu markierenden *E. coli* aus der Ratte chromosomal einzubringen wurden folgende Methoden angewendet.

#### 4.1.1.1 Verwendung des *suicide*-Vektors pIVET*sacB*

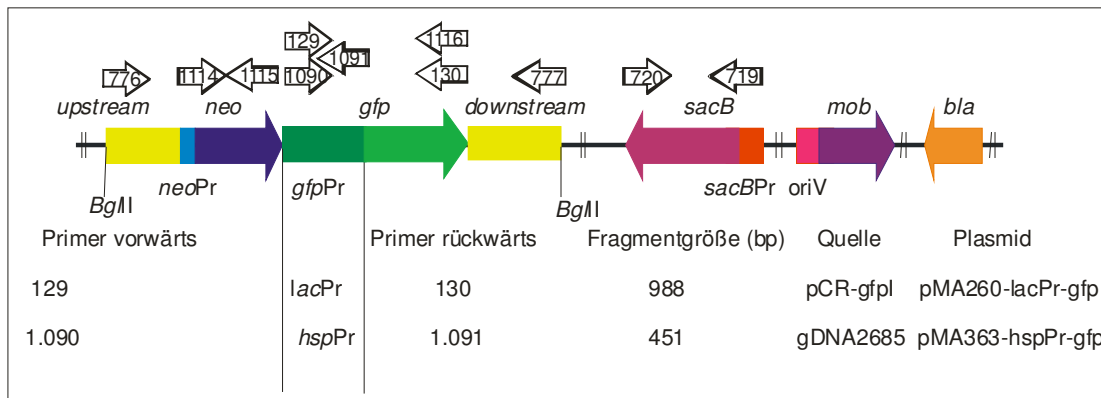
Bei *suicide*-Vektoren handelt es sich um konditionale Replikationssysteme, die entweder auf der An- oder Abwesenheit eines Replikationsproteins, wie beispielsweise dem durch *pir* kodierten Protein Pir<sup>196</sup> oder auf einem Temperatur-sensitiven Replikationsprotein, wie beispielsweise dem RepA16 Protein<sup>181</sup>, beruhen.

Der in dieser Arbeit verwendete Vektor pIVET*sacB* besitzt den *oriV* R6K, der für eine autonome Replikation das Pir-Protein des Phagen  $\lambda$  benötigt wird. Daher kann der Vektor nur in Stämmen wie *E. coli* S17 $\lambda$ *pir* replizieren, in denen das Pir-Protein exprimiert wird. Ist dieses Protein nicht vorhanden, so kann der Vektor nicht replizieren, so dass durch Selektionsdruck mit einem Antibiotikum auf die homologe Rekombination der Rekombinationsbereiche inklusive der Resistenzkassette und dem Reporter-genkonstrukt selektiert werden kann<sup>182,233</sup>. Die Anwesenheit von  $\lambda$ -Phagen im Genom des *E. coli*-2685 und somit des *pir*-Gens konnte über eine PCR mit  $\lambda$ -Phagen-spezifischen Primern und genomischer DNA von *E. coli*-2685 als *template* ausgeschlossen werden.

Neben dem *oriV* R6K ist das aus *Bacillus subtilis* stammende, für Gram-negative Bakterien konditional letale Markergen *sacB* im Vektor enthalten. Die Expression dieses Gens, welches für das sekretorische Enzym Levansucrase kodiert, ist in Anwesenheit von 5–10 % Saccharose letal für Gram-negative Bakterien<sup>274</sup>. Mit dem Gen *sacB* lassen sich *single*-Rekombinanten, die den gesamten Vektor integriert haben, von Doppel-Rekombinanten, die den *suicide*-Vektor verloren haben, durch Wachstum auf Agarplatten mit 10 % Saccharose und 50  $\mu$ g/ml Kanamycin unterscheiden.

Außerdem enthält der Vektor pIVET*sacB* die für die Konjugation wichtigen *mob*-Gene. Diese sind für die Mobilisierung des Plasmids zuständig<sup>182</sup>, was neben der Transformation auch die Konjugation der *suicide*-Vektoren in *E. coli*-2685 ermöglicht.

In Vorversuchen mit den pIVET*sacB*-Reporter-gen-Konstrukten pMA360-lacPr-gfp und pMA363-hspPr-gfp (siehe Abb. 8) entstanden weder bei der Transformation noch bei der Konjugation geeigneten Rekombinanten.



**Abb. 8:** Schema zu dem Aufbau der *suicide*-Vektoren pMA360-lacPr-gfp und pMA363-hspPr-gfp

Um das *sacB*-Gen auf seine Funktionalität zu testen wurden die beiden pIVET*sacB*-Reportergergen-Konstrukte in den Laborstamm *E. coli* S17 $\lambda$ pir transformiert und auf LB-Platten, die neben Kanamycin (50  $\mu$ g/ml) auch 10 % Saccharose enthielt, ausplattiert. Ist das *sacB*-Gen intakt, dürfen auf der jeweiligen Platte keine Kolonien entstehen. Nach der Transformation zeigte sich auf der saccharosehaltigen Platte Koloniebildung und nach Induktion Fluoreszenz. Auf einer nur Kanamycin enthaltenden Platte zeigte der jeweilige Stamm auch gutes Wachstum und Fluoreszenz. Dies lässt darauf schließen, dass das *sacB*-Gen nicht funktionsfähig war. Die Sequenzierung des *sacB*-Gens der pIVET*sacB*-Reportergergenkonstrukte ergab keine Hinweise auf einen Gendefekt.

Der *oriV* und die *mob*-Gene zeigten bei der Sequenzierung keinen Defekt und können somit nicht der Grund für das Missglücken der homologen Rekombination sein.

Auf einem Standardgel war in der Plasmidisolierung der entstandenen Klone eine Bande zu erkennen. Die entstandenen Klone bei der Transformation des isolierten Plasmids zeigten Kanamycin-Resistenz und nach Induktion Fluoreszenz. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass das pIVET*sacB*-Reportergergenkonstrukt für die Resistenz und Fluoreszenz der entstandenen Keime verantwortlich ist.

#### 4.1.1.2 Verwendung von $\lambda$ -Red-Systemen

Die homologe Rekombination unter Verwendung von  $\lambda$ -Red-Systemen basiert auf den Proteinen Gam, Bet und Exo. Die Gene *gam*, *bet* und *exo* stammen aus dem  $\lambda$ -Phagen, wobei *bet* und *exo* für die *red*-Rekombination zuständig sind. Die beiden Genprodukte von *bet* und *exo* leiten die Rekombination zwischen eingebrachter linearer DNA und der Wirts-DNA ein, nachdem Gam die RecBCD-Exonuklease V inhibiert. Diese Gene befinden sich sowohl auf dem *high copy*-Vektor pUC-araBPr-gbx als auch auf dem *low copy*-Vektor pKD46. Beide Vektoren wurden zur homologen Rekombination eingesetzt, da *high copy*-Vektoren wie z. B. pUC-araBPr-gbx als kompetitive Inhibitoren die homologe Rekombination beeinträchtigen könnten.

Um ungewollte Rekombinationsereignisse unter nicht-induzierten Bedingungen zu verhindern befinden sich bei beiden Vektoren die Gene *gam*, *bet* und *exo* unter der Kontrolle des *araB*-Promotors (siehe 3.3.2).

Bei der Untersuchung des biochemischen Profils von 6 *E. coli*-Isolaten mit Hilfe des API E 20-Systems zeigte sich, dass alle Isolate in der Lage waren Arabinose als Kohlenstoffquelle zu nutzen.

In Vorversuchen wurden die *E. coli*-Stämme 2685 und 4 im Hinblick auf ihre Arabinoseverstoffwechselung hin untersucht. Hierfür wurde das Plasmid pUC-araBPr-gfp in *E. coli*-2685, *E. coli*-4, als Positiv-Kontrolle in *E. coli* TM EPI300 und als Negativ-Kontrolle in *E. coli* TOP10 transformiert und mit 0,01 %iger Arabinoselösung induziert. Außer bei der Negativ-Kontrolle war bei den restlichen Klonen unter UV-Bestrahlung (Wellenlänge 365 nm) eine grüne Fluoreszenz zu erkennen. Eine Induktion des Vektors pUC-araBPr-gfp im Laborstamm *E. coli* TOP10 ist nicht möglich, da diesem Stamm das *araC*-Gen fehlt.

#### 4.1.1.2.1 pUC-araBPr-gbx

##### 4.1.1.2.1.1 Klonierungsstrategie des Vektors pUC-araBPr-gbx

Zur Konstruktion des Plasmids pUC-araBPr-gbx wurde zunächst der *araB*-Promotor (357 bp) aus dem *E. coli* TM EPI300-Genom mit den Primern #1097 und #1098 vervielfältigt. In *E. coli* K12 (#U00096) ist der homologe Bereich von 70.392 bp bis 70.046 bp zu finden. Dieser Promotor wurde nach einem Doppelverdau mit *Aat*II und *Nde*I in den *Aat*II- und *Nde*I-geschnittenen pUC19 kloniert. Der entstandene Vektor pUC-araBPr (2.781 bp) wurde mit den Enzymen *Nde*I und *Xba*I geschnitten. In diese Schnittstellen wurde die *gbx*-Kassette (*gam*, *bet*, *exo*) ligiert, nachdem sie über PCR mit den Primern #1086 und #1087 aus dem Phagen genom Lambda vervielfältigt (1.899 bp) und mit denselben Enzymen geschnitten (1.888 bp) wurde. Der resultierende Vektor wurde als pUC-araBPr-gbx bezeichnet und ist 4.430 bp groß. Dieses Plasmid wurde in die *E. coli*-Stämme 2685 und 4 transformiert.

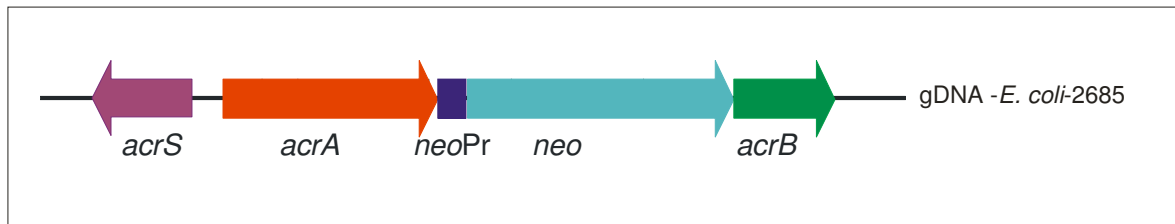
##### 4.1.1.2.1.2 Überprüfung der Klone

Die Richtigkeit der Plasmide wurde über eine Restriktionsanalyse und durch eine Sequenzierung des insertierten Fragments überprüft.

##### 4.1.1.2.1.3 Überprüfung der Gene *gam*, *bet* und *exo* auf ihre Funktionalität

Um die Gene *gam*, *bet* und *exo* des Plasmids pUC-araPr-gbx auf Funktionsfähigkeit zu testen, wurde versucht das Gen *acrB* über Integration einer Kanamycinkassette zu deletieren. Hierfür wurde aus dem Vektor pCR4-*acrAB*-neo (6.863 bp) das *acrAB*-neo-Fragment (2.879 bp) über PCR mit den Primern #950 und #951 vervielfältigt.

Das PCR-Produkt wurde über Transformation in den das Plasmid pUC-araBPr-gbx enthaltenden *E. coli*-2685 eingebracht. Die hierbei entstandenen Klone zeigten phänotypisch eine Kanamycin- und Ampicillinresistenz. Um zu überprüfen, ob sich die erwartete Insertion innerhalb von *acrB* befindet, wurde der entsprechende Abschnitt sequenziert. Die Sequenzierungsergebnisse zeigten, dass die Kanamycinkassette an der gewünschten Stelle in das Genom des *E. coli*-2685 integriert ist. Dieser Klon wurde als *E. coli*-2685-*acrAB*::km bezeichnet (vgl. Abb. 9).



**Abb. 9:** genomische Integration der *neo*-Kassette in *E. coli*-2685

In einem weiteren Versuch sollte die Kanamycinkassette in die Gene *acrEF* integrieren. Hierfür wurde aus dem Vektor pUT8 (8.723 bp) das *acrEF-neo*-Fragment (2.858 bp) über PCR mit den Primern #952 und #953 amplifiziert. Das PCR-Produkt wurde in den das Plasmid pUC-araBPr-gbx enthaltenden *E. coli*-2685 transformiert. Dabei entstanden keine Klone.

Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass die Gene *gam*, *bet* und *exo* im pUC-araBPr-gbx funktionsfähig sind und der Ort der Integration für die homologe Rekombination eine Rolle spielt.

#### 4.1.1.2.2 ***pKD46*-System**

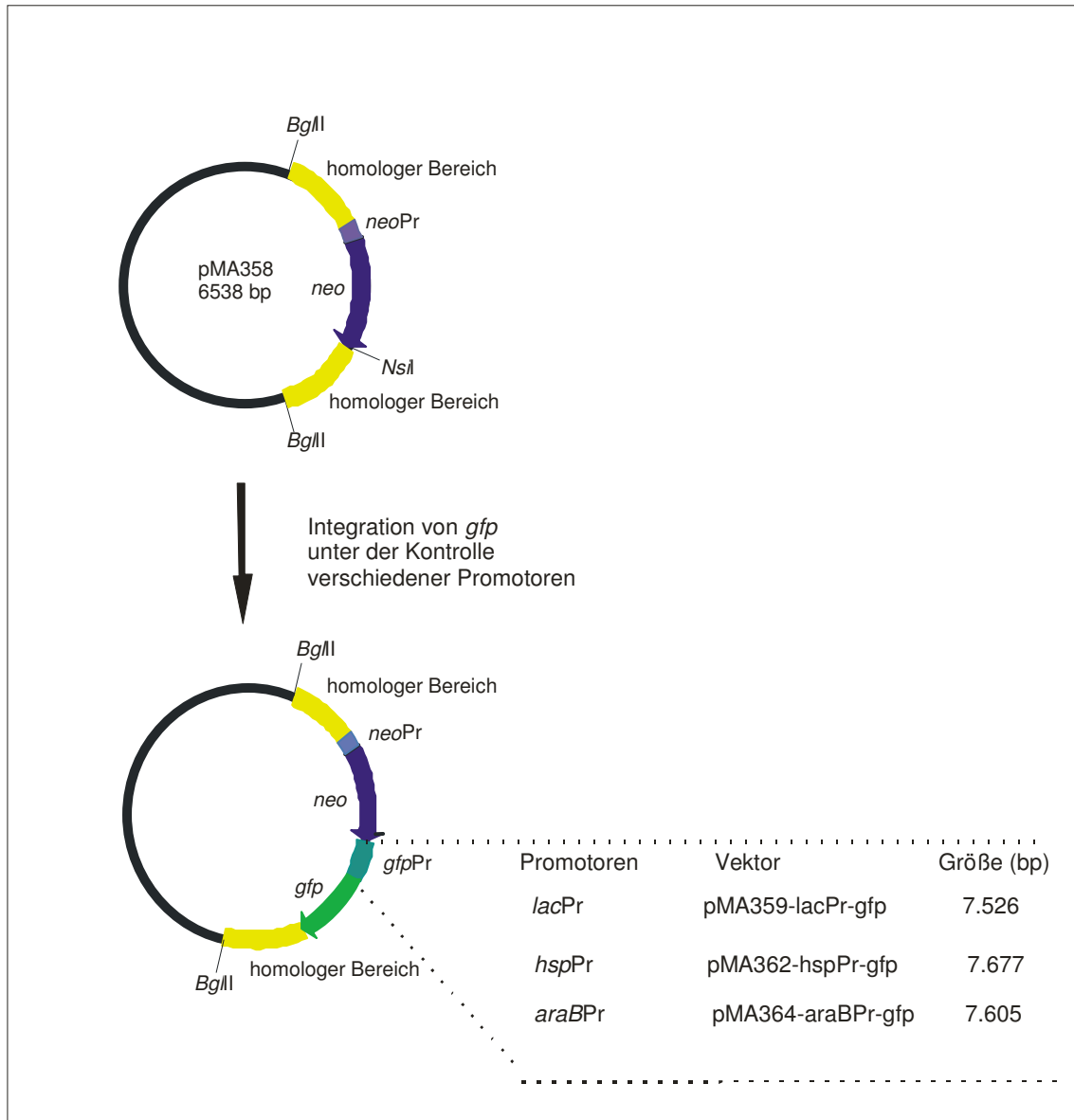
In dem Vektor pKD46<sup>56</sup> sind, wie auch im pUC-araPr-gbx, neben der Ampicillin-Resistenzkassette auch die  $\lambda$ -Red Rekombinasegene *gam*, *bet* und *exo* unter der Kontrolle des Arabinose-Promotors vorhanden. Ein Vorteil dieses Systems ist, dass nach einer erfolgreichen homologen Rekombination das Plasmid pKD46 aufgrund dessen hitzeempfindlichen oriR101 über einen Hitzeschritt ausselektioniert werden kann.

Das Plasmid pKD46 wurde in *E. coli*-4 transformiert.

#### 4.1.1.2.3 **Herstellung des von homologen Bereichen flankierten Reportergens**

Als homologer Bereich wurde ein nicht-kodierender Bereich im Genom des aus der Ratte isolierten *E. coli*-2685 verwendet. Dieser Bereich ist 1.429 bp lang und liegt *downstream* von *marCRAB*. Das Fragment entspricht im Genom von *E. coli*-K12 mit der *Gene Bank Accession number* #U00096 dem Bereich von 1.619.393 bp bis 1.620.806 bp und ist zu

diesem zu 70 % homolog. Mit den Primern #776 und #777 wurde dieses Stück amplifiziert und in Vorarbeiten die Plasmiden pMA364-araBPr-gfp (7.610 bp), pMA359-lacPr-gfp (7.542 bp) und pMA362-hspPr-gfp (7.692 bp) kloniert. Eine Übersicht zu den entstandenen Plasmiden ist in der folgenden Abbildung 10 zu finden.



**Abb. 10:** Übersicht zur Integration des *gfp*-Gens

Aus den jeweiligen Plasmiden wurde dann das für die Transformation DNA-Fragment mittels PCR gewonnen. Die Größe der jeweiligen PCR-Produkte geht aus folgender Tabelle hervor:

**Tab. 12:** Übersicht der zu transformierenden Fragmente mit Angabe des Ausgangsplasmids, der Fragmentgröße und des enthaltenen Promotors

Ausgangsplasmid	Primerkombination	Fragmentgröße [bp]	Promotor
pMA364-araBPr-gfp	776+777	3.655	induzierbar d. Arabinose
pMA359-lacPr-gfp	776+777	3.579	konstitutiv
pMA362-hspPr-gfp	776+777	3.729	induzierbar durch Hitze
pMA368-lacPr-dsred	776+777	3.573	konstitutiv

#### 4.1.1.2.4 *Chromosomale Integration des gfp in E. coli*

Das jeweilige PCR-Produkt wurde in kompetente *E. coli*, die entweder das Plasmid pUC-araBPr-gbx oder pKD46 enthielten, transformiert. Bei der ersten Transformation in pUC-araBPr-gbx enthaltende *E. coli*-Stämme entstanden bei allen Konstrukten Kanamycin-resistente Klone, die nach Induktion keine Fluoreszenz zeigten. Die Überprüfung durch PCR zeigte entweder keine Integration an der gewünschten Stelle oder nur eine Integration der Resistenzkassette. Die zweite Transformation von PCR-Produkten aus den Vektoren pMA359-lacPr-gfp und pMA364-araBPr-gfp führte zu Klonen, bei denen nach Induktion eine Fluoreszenz zu erkennen war. Eine PCR zeigte, dass keine Integration zwischen den homologen Bereichen stattgefunden hatte. Um auszuschließen, dass sich das Reportergen *gfp* noch auf einem replikationsfähigen Plasmid befand, wurde eine Plasmidisolierung durchgeführt. Die entstandenen Klone bei der Transformation des aus *E. coli*-2685-pMA359-lacPr-gfp und des aus *E. coli*-2685-pMA364-araPr-gfp isolierten Plasmids zeigten Wachstum auf Kanamycin-haltigen Agarplatten und nach Bestrahlung mit langwelligem UV-Licht (Wellenlänge 365 nm) eine grüne Fluoreszenz. Dieses Ergebnis legt nahe, dass die homologe Rekombination des Reportergenfragments mit einem Plasmid ablief und sich das Reportergen *gfp* und die Resistenzkassette daher auf einem Plasmid befinden und somit übertragbar sind. Da bei einer Plasmidpräparation aus den *E. coli*-Wildtyp-Stämmen, die der Transformation des Plasmids pUC-araBPr-gbx vorausging, keine Plasmide isoliert werden konnten, ist es wahrscheinlich, dass die homologe Rekombination des Reportergenfragments mit dem eingebrachten pUC-araBPr-gbx ablief. Die Transformation der Rekombinationsfragmente in pKD46 enthaltendene *E. coli*-4 ergab keine Klone.

In einem neuen Versuchsansatz wurde für die homologe Rekombination eine andere Stelle im Genom von *E. coli* gewählt. Aus dem Genom des *E. coli*-2685 wurde mit den Primern #1187 und #1188 ein Bereich amplifiziert, der keinen ORF enthält und dessen Funktion

unbekannt ist. Das amplifizierte Stück war 1.058 bp lang und befindet sich im Genom von *E. coli*-K12 mit der *Gene Bank Accession number* #U00096 im Bereich von 2.301.973 bp bis 2.303.513 bp. Über Fusions-PCR mit den Primern #1187, #1188, #1191, #1192, #1193, #1194 und #1195 wurde die Reporter-gen-Resistenzkassette aus den Vektoren pMA359-lacPr-gfp und pMA362-hspPr-gfp mit den neuen homologen Bereichen ligiert.

Das jeweilige PCR-Produkt wurde in kompetente *E. coli*-2685, die das Plasmid pUC-araBPr-gbx enthielten, transformiert. Aus der Transformation entstanden bei allen PCR-Produkten keine Klone. Als Positivkontrolle wurde das Gen *acrAB* mit Hilfe der Kanamycinkassette erfolgreich deletiert.

Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass entweder die Bereiche für die homologe Rekombination ungeeignet sind und/oder die Integration von *gfp* für den Keim einen Nachteil bringt.

#### 4.1.1.3 Transduktion

Unter Transduktion versteht man den Transfer von genetischem Material über eine Virusinfektion. In dieser Arbeit wurde eine generalisierte Transduktion durchgeführt. Bei dieser Art der Transduktion entstehen die transduzierenden Partikel durch lytisches Wachstum. Diese enthalten nur chromosomale DNA des Wirtes. Nach der Infektion und Übertragung des Partikelinhaltes kommt es zum Austausch der homologen Rezipienten-DNA durch die transduzierte DNA. Hierfür wird das *rec*-System benötigt<sup>198</sup>.

Als Donorstamm diente der *E. coli*-2685-Stamm, der den Vektor pMA364-araBPr-gfp enthielt. Als Rezipient wurde der Wildtypstamm *E. coli*-2685 verwendet. Die Transduktion wurde wie in Materialien und Methoden (siehe 3.2.1.7) beschrieben durchgeführt. Die hierbei entstandenen Klone zeigten phänotypisch eine Resistenz gegenüber Kanamycin, aber keine Fluoreszenz nach promotor-spezifischer Induktion mit 0,1 % Arabinose. Die PCR mit den Primern #1118 und #1116 bestätigte, dass das eingebrachte Fragment *araBPr-gfp* in den Selektanten nicht vorhanden war.

#### 4.1.2 Transposonmutagenese

Das Plasmid pLOF/Km ist ein auf dem Transposon Tn10 basierender Transposon-Vektor, der Gene übertragen kann. Das Transpositionssystem besteht aus einer IS10R-Transposase, die sich außerhalb des mini-Tn10-Elements befindet und von einem *tac*-Promotor reguliert wird, sowie aus einer Sequenz von *MluI*-*SfiI*-*NotI*-*MluI*-Restriktionsschnittstellen zwischen den *inverted repeats* des übertragbaren Elements Tn10. Die *inverted repeats* sind bei Tn10 in entgegengesetzter Richtung angeordnet. Die *SfiI*-Schnittstelle wurde für die Integration von Fremd-DNA benützt. In die *NotI*-Schnittstelle wurde die Kanamycin-Resistenzkassette kloniert. Das Plasmid

pLOF/Km beinhaltet außerdem den RP4 *conjugal transfer origin* (oriT), der notwendig ist für den Transfer in verschiedene Gram-negative Bakterien. Der Vektor kann sich in Bakterien, die das R6K-spezifische Pir-Protein nicht besitzen, nicht replizieren. Bei dem für Transformationen verwendeten Stamm handelt es sich um *E. coli* S17 $\lambda$ pir. Dieser Stamm enthält die für die Replikation des Vektors notwendigen *pir*-Gene. Neben der Kanamycin-Resistenz befindet sich eine Ampicillin-Resistenz auf dem Vektor ([http://www.belspo.be/bssm/db/plasmid\\_details2.asp?NM=pLOF/Km](http://www.belspo.be/bssm/db/plasmid_details2.asp?NM=pLOF/Km))<sup>105</sup>.

#### 4.1.2.1 Integration des *gfp*-Gens unter der Kontrolle des *araB*-Promotors in *suicide*-Vektor pLOF/Km

Das *gfp*-Gen wurde zusammen mit dem *araB*-Promotor mittels PCR mit den Primern #1182 und #1183 aus dem Vektor pUC-*araBPr-gfp* gewonnen. Nach einem *Sfi*I-Verdau wurde das 1.192 bp große Fragment in die *Sfi*I-Schnittstelle des Vektors pLOF/Km ligiert. Dieses Plasmid wurde als pLOF/Km-*araBPr-gfp* bezeichnet und ist 11.092 bp groß.

Das Ligationsprodukt wurde dann in *E. coli* S17 $\lambda$ pir transformiert. Über einen Restriktionsverdau mit *Sfi*I und mittels Sequenzierung von *araBPr-gfp* wurden die entstandenen Plasmide auf Richtigkeit kontrolliert.

#### 4.1.2.2 Konjugation mit pLOF/Km-*araBPr-gfp*

Der Versuch, den Vektor pLOF/Km-*araBPr-gfp* durch Konjugation von *E. coli* S17 $\lambda$ pir auf die Stämme *E. coli*-2685 oder *E. coli*-4 zu transferieren, brachte keine Klone mit der gewünschten Insertion. Sowohl bei dem ersten als auch bei dem zweiten Versuch war nach 48 h bei 37 °C Koloniebildung zu erkennen. Ein Teil dieser Klone zeigte nach Subkultur auf Kanamycin-haltigen LB-Platte (50  $\mu$ g/ml) kein Wachstum. Bei fünf Klonen war deutliches Wachstum auf einer LB-Platte mit Kanamycin (50  $\mu$ g/ml) zu erkennen. Nach Induktion der Reporterexpression mit 0,1 % Arabinose zeigte sich bei diesen Klonen jedoch keine Fluoreszenz.

#### 4.1.2.3 Transformation von pLOF/Km-*araBPr-gfp* in *E. coli*-4

Bei dem ersten und zweiten Versuch der Transformation des pLOF/Km-*araPr-gfp* in kompetente *E. coli*-4 entstanden insgesamt 57 Klone. Diese Klone zeigten nach Induktion mit 0,1 %iger Arabinose die erwartete Fluoreszenz. Aufgrund der Stärke der Fluoreszenz wurden aus den 57 Klonen Klon Nummer 32 (*E. coli*-32) und Klon Nummer 57 (*E. coli*-57) ausgewählt.

#### 4.1.2.4 Phänotypische Untersuchung der entstandenen Klone *E. coli*-32 und *E. coli*-57 im Vergleich zum Wildtyp *E. coli*-4

##### 4.1.2.4.1 Wachstum von *E. coli*-32 und *E. coli*-57 unter aeroben und anaeroben Bedingungen im Vergleich zum Wildtyp *E. coli*-4

Als Maß für das Wachstum wurde in dieser Arbeit die Zu- oder Abnahme der Zellzahl gemessen in OD betrachtet.

Das Wachstumsverhalten unter nicht-induzierenden Bedingungen von den beiden Klonen *E. coli*-32 und *E. coli*-57 unter aeroben und anaeroben Bedingungen zeigte gegenüber dem Wildtyp *E. coli*-4 einen nicht signifikanten Unterschied.

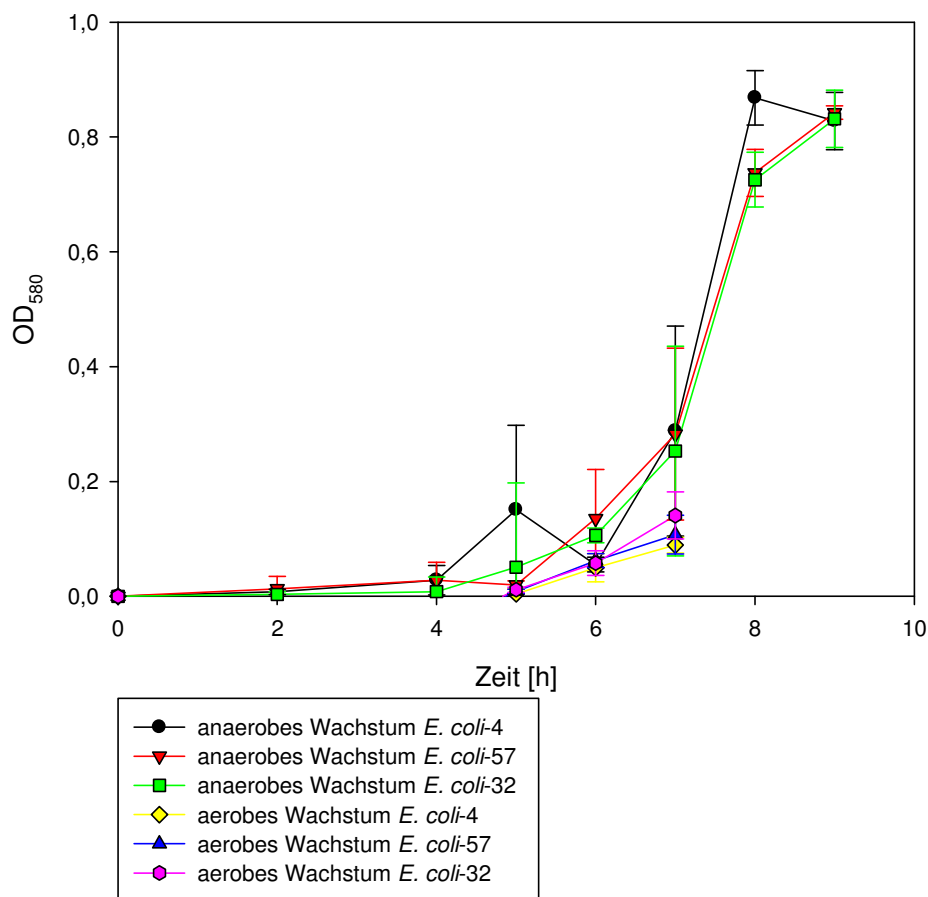


Abb. 11: Aerobes und anaerobes Wachstum von *E. coli*-4, *E. coli*-57 und *E. coli*-32 im Vergleich.

##### 4.1.2.4.2 Wachstum der Klone 57 und 32 in einer Mischkultur mit *E. coli*-4

Die Mischkulturen bestanden aus dem Wildtyp *E. coli*-4 und einem der beiden Klone.

Der Versuch wurde wie in Materialien und Methoden (siehe 3.2.8.10) durchgeführt.

Das Keimwachstum unter induzierten Bedingungen (0,1 % Arabinose) entsprach sowohl zwischen Wildtyp *E. coli*-4 und *E. coli*-32 als auch zwischen Wildtyp *E. coli*-4 und *E. coli*-57

einem Verhältnis von 1:1. Das bedeutet, dass die Klone *E. coli*-32 und *E. coli*-57 *in vitro* in der Anwesenheit von *E. coli*-4 unter induzierenden Bedingungen keinen Wachstumsnachteil durch die Integration des *gfp*-Gens haben.

#### 4.1.2.4.3 Antibiotikaresistenz

Sowohl das Wildtyp-Isolat *E. coli*-4 als auch die Klone *E. coli*-32 und *E. coli*-57 wurden mittels Etest® auf ihre Empfindlichkeit gegenüber einer Reihe von Antibiotika überprüft. Es zeigte sich kein Unterschied der Minimalen Hemmkonzentrationen zwischen den einzelnen Stämmen.

**Tab. 13:** Minimale Hemmkonzentration (mg/l) von *E. coli*-32 und *E. coli*-57 im Vergleich zu *E. coli*-4

Antibiotika	MHK (mg/l)		
	<i>E. coli</i> -4	<i>E. coli</i> -32	<i>E. coli</i> -57
Ciprofloxacin	0,008	0,008	0,008
Moxifloxacin	0,016	0,016	0,016
Chloramphenicol	2	2	2
Doxycyclin	3	3	3

#### 4.1.2.4.4 Organic Solvent Tolerance (OST)

Zwischen den Klonen *E. coli*-32, *E. coli*-57 und dem Wildtypstamm *E. coli*-4 zeigte sich in Bezug auf die *organic solvent tolerance* kein Unterschied.

Sobald Cyclohexan zugegeben wurde, zeigte sich bei allen drei Keimen kein Wachstum.

**Tab. 14:** Wachstum der Stämme *E. coli*-4 sowie der Klone *E. coli*-32 und *E. coli*-57 in Gegenwart verschiedener Lösungsmittel. „+“ entspricht Wachstum und „—“ kein Wachstum.

Lösungsmittel	Wachstum		
	<i>E. coli</i> -4	<i>E. coli</i> -32	<i>E. coli</i> -57
100 % Oktan	+	+	+
75 % Oktan, 25 % Hexan	+	+	+
75 % Oktan, 25 % Cyclohexan	+	+	+
50 % Oktan, 50 % Hexan	+	+	+
25 % Oktan, 75 % Hexan	+	+	+
100 % Hexan	—	—	—
75 % Hexan, 25 % Cyclohexan	—	—	—
25 % Oktan 75 % Cyclohexan	—	—	—
50 % Hexan, 50 % Cyclohexan	—	—	—

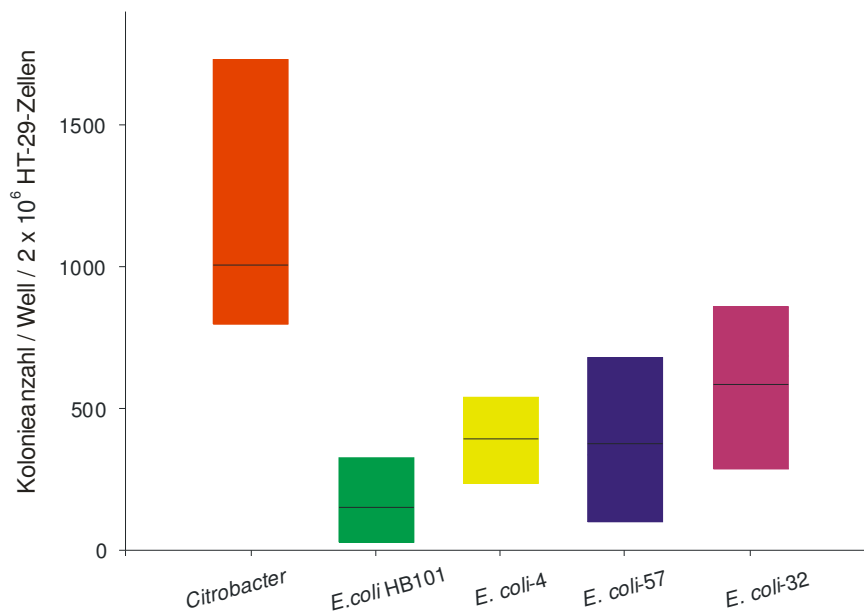
Lösungsmittel	Wachstum		
	<i>E. coli-4</i>	<i>E. coli-32</i>	<i>E. coli-57</i>
25 % Hexan, 75 % Cyclohexan	—	—	—
100 % Cyclohexan	—	—	—

#### 4.1.2.4.5 **Prüfung der biochemischen Profile mittels API®20 E- und Phoenix®-System**

Bei der Auswertung der Ergebnisse ergaben sich keine Unterschiede zwischen dem Wildtyp *E. coli-4* und den Klonen *E. coli-32* und *E. coli-57*. Dies deutet darauf hin, dass die Integration des Transposons keine Deletion der Gene verursacht hat, die für die Verstoffwechslung der 21 getesteten Substrate benötigt werden. Die drei Keime zeigten im API®20 E-System alle das Profil 5-1-4-4-5-7-2. Alle drei Stämme konnten Arabinose verstoffwechseln, was eine wichtige Voraussetzung für die Induktion des unter der Kontrolle des *araB*-Promotor stehenden *gfp*-Gens ist.

#### 4.1.2.4.6 **Untersuchung der Adhärenz mittels Zelladhäsionsassay**

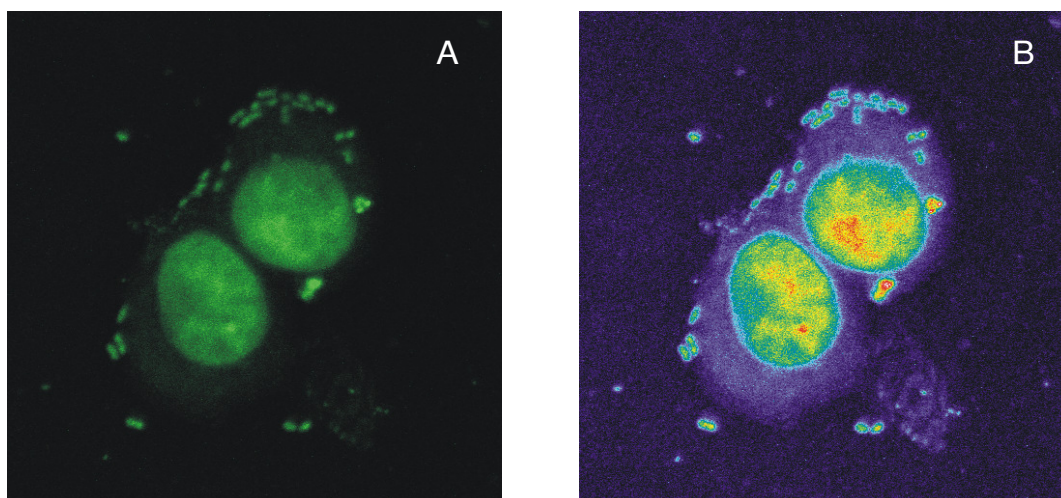
Mittels sechs unabhängig voneinander durchgeführten Zelladhäsionsassays wurden die drei Stämme *E. coli-4*, *E. coli-32* und *E. coli-57* in Bezug auf ihre Adhärenzfähigkeit an die menschlichen Kolonkarzinomzellen HT-29 untersucht. Hierbei wurde eine gering verbesserte Adhärenz bei *E. coli-32* festgestellt, die in Abbildung 12 dargestellt ist. Da der Klon *E. coli-57* dem Wildtyp *E. coli-4* ähnlicher ist, wurde für die weiteren Versuche der Klon *E. coli-57* verwendet.



**Abb. 12:** Adhärenz der Keime an HT-29-Zellen; *Citrobacter* wurde als Positiv-Kontrolle und *E. coli* HB101 als Negativ-Kontrolle verwendet. Die schwarze Linie in den Boxen gibt den Mittelwert der Kolonieanzahl an. Die Boxen geben die Streuung der Kolonieanzahl an. Die Angaben beziehen sich auf sechs voneinander unabhängige Versuche.

#### 4.1.2.4.7 Darstellung der Adhärenz mittels Konfokalen Lasermikroskops

Die Aufnahmen mit dem konfokalen Lasermikroskop bestätigten die Adhärenz des Klons *E. coli*-57 an HT-29-Zellen (siehe Abb. 13).

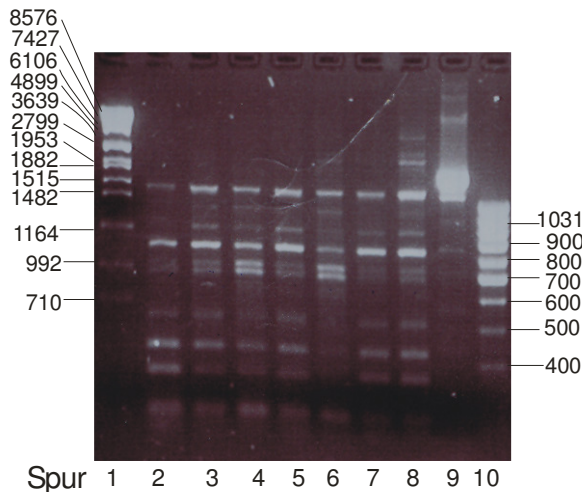


**Abb. 13:** Adhärenz von mit Arabinose induzierten *E. coli*-57 an HT-29. Die Anfärbung der Zellkerne von HT-29 erfolgte mit Sytox-Green. Die Aufnahmen wurden mit dem Lasermikroskop-System Axiovert 200M LSM510 META von Carl Zeiss gemacht. C-Apochromat 40x/1.2W corr wurde als Objektiv eingesetzt. Öl wurde als Immersionsmedium verwendet.

#### 4.1.2.5 Genotypische Untersuchungen der *E. coli*-32 und *E. coli*-57 im Vergleich zum Wildtyp *E. coli*-4

##### 4.1.2.5.1 Rep-PCR

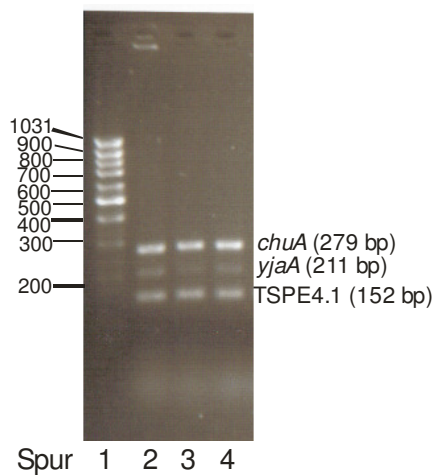
Die Rep-PCR wurde mit *E. coli*-4, *E. coli*-32 und *E. coli*-57 wie in Materialien und Methoden (siehe 3.2.1.1.6.4) beschrieben durchgeführt. Die Klone *E. coli*-32 und *E. coli*-57 unterscheiden sich in ihrem Rep-PCR-Muster nicht von *E. coli*-4.



**Abb. 14:** Gelbild der Rep-PCR. Spur 1: Standard VII (Roche); Spuren 2–5: *E. coli*-Isolate aus dem Rattenkot; Spur 6: *E. coli*-4; Spur 7: *E. coli*-32; Spur 8: *E. coli*-57; Spur 9: Positivkontrolle genomische DNA von *E. coli*-2685 mit #776+#777; Spur 10: Standard VIII (Roche)

##### 4.1.2.5.2 Phylogenetische Gruppe

Der Wildtyp *E. coli*-4 konnte aufgrund seines Bandenmusters bei der PCR mit den Primern #1388, #1389, #1390, #1391, #1392 und #1393 der phylogenetischen Gruppe B2 zugeordnet werden. Die Klone *E. coli*-32 und *E. coli*-57 zeigten dasselbe Bandenmuster wie *E. coli*-4 und wurden auch der Gruppe B2 zugeordnet (siehe 3.2.1.1.6).



**Abb. 15:** Gelbild zur Bestimmung der phylogenetischen Gruppe; Spur 1: Standard VIII (Roche); Spur 2: *E. coli-4*; Spur 3: *E. coli-32*; Spur 4: *E. coli-57*

Aufgrund der bisher erhaltenen Ergebnisse wurde der Klon *E. coli-57* für die weiteren Versuche ausgewählt.

#### **4.1.2.6 Nachweis der chromosomalen Integration des Fragments Km-araPr-gfp im Klon *E. coli-57***

##### **4.1.2.6.1 Plasmidisolierung**

Um auszuschließen, dass sich das Reporter-gen *gfp* und die Kanamycin-Resistenzkassette bei dem Klon *E. coli-57* auf einem Plasmid befindet, wurde eine Plasmidisolierung durchgeführt. Auf einem Standardgel (siehe Anhang 8.2, Abb. 39) waren mehrere Banden auf unterschiedlicher Höhe (bei ca. 10.000 bp, bei ca. 8.000 bp und bei ca. 4.000 bp) zu erkennen. Die Plasmidisolierung aus dem Wildtypstamm *E. coli-4* lieferte auf einem Gel auch mehrere Banden, die sich in ihrer Größe von denen bei *E. coli-57* unterschieden (ca. 7.400 bp, ca. 5.000 bp; ca. 3.300 bp). Die Plasmidpräparation (Qiafilter™ Plasmid Midi Kit) aus dem Klon 57 wurde in chemisch kompetente *E. coli* TM EPI300 transformiert. Die hieraus entstandenen Klone zeigten keine Kanamycin-Resistenz und Fluoreszenz nach Induktion durch Arabinose. Dieses Ergebnis legt nahe, dass sich das Reporter-gen *gfp* und die Resistenzkassette nicht auf einem Plasmid befindet.

#### 4.1.2.6.2 **Southern Blot**

Zum Nachweis der chromosomalen Integration des *gfp* wurde ein Southern Blot mit einer Sonde für *gfp* durchgeführt. Die Herstellung einer mit Digoxigenin-11-2`-desoxy-uridin-5`-phosphat markierten Sonde für das *gfp*-Gen mit den Primern #1116 und #1381 (409 bp) oder mit der Primerkombination #1116 und #1423 (471 bp) funktionierte auch nach Veränderung einzelner PCR-Parameter nicht. Daher wurde eine Primerkombination innerhalb der Kanamycinkassette des pLOF/Km-araBPr-*gfp* gewählt. Mittels PCR und den Primern #1224 und #1542 (417 bp) wurde eine Digoxigenin-markierte Sonde hergestellt. Mit dieser Sonde wurde dann ein Southern Blot durchgeführt. Als Enzym für den Verdau der DNA des Klons *E. coli*-57 wurde *Pst*I verwendet. Die Detektion der Sondengensequenz war erfolgreich. Nach der Entwicklung des Films war eine eindeutige Bande bei ca. 8.000 bp zu erkennen. Dieses Ergebnis konnte dreimal reproduziert werden. Das Ergebnis legt nahe, dass sich die Kanamycinkassette innerhalb des Genoms befindet. Da sich sowohl das Gen *neo* als auch das *gfp*-Gen zwischen den *inverted repeats* des Transposons befanden, ist es sehr wahrscheinlich, dass auch das Fragment araBPr-*gfp* innerhalb des Genoms lokalisiert ist.

#### 4.1.2.6.3 **Lokalisation der Integrationsstelle von pLOF/Km-araBPr-*gfp***

##### 4.1.2.6.3.1 **RS-PCR**

Zur Lokalisation der Integrationsstelle wurde mit einem der 12 *restriction-site*-Primer (RS-Primer) #164-#168, #232-238, #1554 und den spezifischen Primern #1225, #1224 und #1223 eine RS-PCR mit der genomischen DNA des Klones *E. coli*-57 wie in Materialien und Methoden (siehe 3.2.1.1.6.2) beschrieben durchgeführt. Die Primer #1225, #1224 und #1223 sind für die Kanamycin-Resistenzkassette spezifisch. Die für das Reportergen *gfp* unter der Kontrolle des *araB*-Promotors verwendeten spezifischen Primer waren #1116, #212 und #1117. Die bei der RS-PCR entstandenen Produkte wurden nach Subklonierung sequenziert. Die Sequenzierungen der jeweiligen Produkte ergaben die Sequenz des Mini-Tn10-Transposons aus pLOF/Km-araPr-*gfp*. Die Sequenz nach der Transposonsequenz war zwischen 100 bp und 200 bp und unterschied sich bei den entstandenen RS-PCR-Produkten. Bei der Sequenzanalyse zeigte NCBI Blast keine signifikanten Ähnlichkeiten zu Genen aus *E. coli* an. Bei einer Verlängerung der Elongationszeit von 3 auf 4 min in der PCR entstanden keine längeren Produkte. Daher ist wahrscheinlich die Primerbindungsstelle für die Länge der Produkte die Ursache.

Diese Ergebnisse zeigten, dass sich die Erkennungsstellen der 12 RS-Primer zu nahe an der Integrationsstelle des Resistenz- und Reportergens befinden.

#### 4.1.2.6.3.2 Inverse PCR

Die genomische DNA von *E. coli*-57 wurde jeweils mit einem der Enzyme *BspEI*, *BstXI*, *NcoI*, *BbsI*, *AatII*, *SalI*, *SapI*, *BlnI*, *NotI*, *BglI*, *PstI*, *BglII*, *KpnI* oder *SphI* über Nacht verdaut. Diese Enzyme wurden aufgrund ihrer Schnittstelle innerhalb des Transposons ausgewählt.

Danach folgte die Ligation bei 16 °C über Nacht. Die darauf folgende PCR wurde mit den auf die Schnittstelle abgestimmten Primern (siehe Tab. 15) durchgeführt. Dabei ergaben sich keine PCR-Produkte.

**Tab. 15:** Zusammenfassung der Schnittstellen und der verwendeten Primerkombinationen für die inverse PCR

<b>Schnittstelle</b>	<b>Primerkombination 1</b>	<b>Primerkombination 2</b>
<i>BspEI</i>	#1223 + #802 #1223 + #1116 #1223 + #1183	#1117 + #1054 #1117 + #381 #1117 + #1151 #1117 + #129
<i>BstXI</i>	#1223 + #1117	
<i>NcoI</i>	#1223 + #802 #1223 + #1116 #1223 + #1183	#1117 + #1054 #1117 + #381 #1117 + #1151 #1117 + #129
<i>BbsI</i>	#1223 + #1117	#1117 + #213
<i>AatII</i>	#1223 + #1117	
<i>SalI</i>	#1223 + #1117	
<i>SapI</i>	#1223 + #1117	
<i>BlnI</i>	#1223 + #1117	
<i>NotI</i>		#1117 + #213
<i>BglI</i>		#1117 + #213
<i>PstI</i>	#1223 + #1117	
<i>BglII</i>	#1223 + #1117	
<i>SphI</i>	#1223 + #1117	
<i>MfeI</i>	#1223 + #1117	
<i>BamHI</i>	#1223 + #1117	

## 4.2 Ratten-Selektionsmodell

### 4.2.1 Eingewöhnungsphase

Nach Ankunft der 10 weiblichen, 30–35 Tage alten, spezifisch pathogen freien Fischer-Ratten F-344 wurde eine zweiwöchige Eingewöhnungsphase durchgeführt.

#### 4.2.2 Statusbestimmung der Darmflora

Die Statusbestimmung der Darmflora wurde bei allen 10 Ratten sowohl vor als auch nach der Kolonisation des Rattendarms mit dem Klon *E. coli*-57 durchgeführt. Insgesamt wurde 8 Mal vor der Kolonisation und 11 Mal nach der Kolonisation die Statusbestimmung der Darmflora durchgeführt. Den Hauptanteil der Darmflora sowohl vor als auch nach der Kolonisierung bestimmten die *Lactobacillus* spp. . Danach folgten *Enterokokken*, Gram-negative Keime und obligat anaerobe Keime. Sporenbildner wurden im Kot der Ratte weder vor noch nach der Kolonisation mit dem Klon 57 nachgewiesen.

**Tab. 16:** Mediane der Keimzahl auf eingesetztes Gewicht (in mg) mit Korrekturfaktor vor und nach der Kolonisation

Keim	Keimzahl vor Kolonisation	Keimzahl nach Kolonisation
Gram-negative	$2,49 \times 10^4$	$3,06 \times 10^4$
Enterokokken	$6,38 \times 10^4$	$3,98 \times 10^4$
Laktobazillen	$1,57 \times 10^7$	$1,52 \times 10^6$
obligat anaerob Keime	$3 \times 10^3$	$2,68 \times 10^3$

#### 4.2.2.1 Phänotypische Charakterisierung ausgewählter Keime aus Rattenkot

##### 4.2.2.1.1 Überprüfung auf Kanamycin-Resistenz

Vor der Kolonisation wurde der Rattenkot auf Kanamycin-resistente Keime untersucht. Außer Enterokokken zeigten keine Keime Wachstum auf Kanamycin-haltigen Agarplatten (50 µg/ml). Enterokokken besitzen eine natürliche Resistenz gegenüber Kanamycin und zeigten daher Wachstum.

##### 4.2.2.1.2 Untersuchung der Enterokokken auf Ampicillinresistenz

Alle 87 *Enterokokken*-Isolate (pro Ratte zwischen 5 und 10 Isolaten) waren Ampicillin-sensibel und wurden daher als *Enterococcus faecalis* identifiziert.

##### 4.2.2.1.3 Untersuchung Laktose-positiver Keime auf Schwefelbildung, Indolproduktion, Beweglichkeit und Citratverwertung

Alle 85 Laktose-positiven Keime isoliert aus Kot der 10 Ratten (pro Ratte zwischen 4 und 9 Isolate) zeigten Wachstum im gesamten SIM-Medium. Dieses Ergebnis legte nahe, dass es sich um bewegliche Keime handelte.

Es war keine Citratverwertung oder Schwefelbildung zu erkennen (siehe 3.2.1.8.6 und 3.2.1.8.7). Dies deutete darauf hin, dass es sich um *E. coli* handelt.

#### 4.2.2.1.4 **Organic solvent tolerance (OST)**

Bei 56 *E. coli*-Isolaten kam es zu folgenden Ergebnissen:

**Tab. 17:** Wachstum der 56 *E. coli*-Isolate in Gegenwart verschiedener Lösungsmittel. „+“ entspricht Wachstum und „—“ kein Wachstum

Lösungsmittel	Wachstum
100 % Oktan	+
100 % Hexan	+ (bei 4 Isolaten); — (bei 52 Isolaten)
100 % Cyclohexan	—
50 % Oktan, 50 % Hexan	+
50 % Oktan, 50 % Cyclohexan	—
50 % Hexan, 50 % Cyclohexan	—
25 % Oktan, 75 % Hexan	+
25 % Oktan, 75 % Cyclohexan	—
25 % Hexan, 75 % Cyclohexan	—
75 % Oktan, 25 % Hexan	+
75 % Oktan, 25 % Cyclohexan	+
75 % Hexan, 25 % Cyclohexan	—

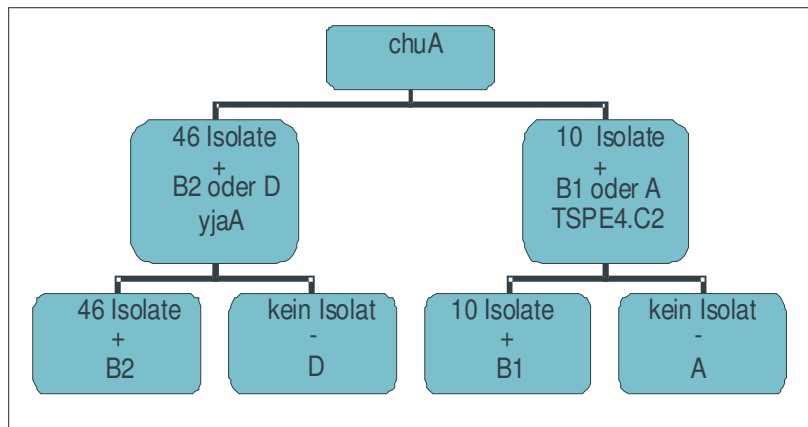
#### 4.2.2.1.5 **Rep-PCR der *E. coli*-Isolate der nativen Rattendarmflora**

Mit den Primern #263 und #264 erfolgte eine PCR mit jeweils 1 µl genomischer DNA als *template*. Aus den 56 Rep-PCR-Ergebnissen ließen sich sechs verschiedene Bandenmuster erkennen (siehe Anhang 8.2, Abb. 40–45).

#### 4.2.2.1.6 **Phylogenetische Gruppe der *E. coli*-Isolate aus dem Rattendarm**

Zur Charakterisierung der *E. coli*-Isolate aus der Normalflora der Ratten wurde ihre phylogenetische Gruppe bestimmt (siehe Materialien und Methoden 3.2.1.1.6.6).

Mit den Primern #1388 und #1389 wurde das Gen *chuA* aus dem jeweiligen *E. coli*-Isolat amplifiziert. Bei 46 Isolaten war die PCR positiv. Diese Isolate gehören somit entweder zur Gruppe B2 oder D. Ist die Amplifikation des Gens *yjaA* mit den Primern #1390 und #1391 positiv, so gehören die Isolate der Gruppe B2 an. 46 von 56 getesteten *E. coli* gehörten der phylogenetischen Gruppe B2 an. Bei den restlichen 18 % handelte es sich um Isolate der phylogenetischen Gruppe B1.



**Abb. 16:** phylogenetischer Stammbaum mit Gruppeneinteilung der Isolate

#### 4.2.2.1.7 **Plasmidisolierung bei *E. coli*-Isolaten aus der Normalflora der Ratte**

Bei allen 56 Isolaten waren Plasmide mit jeweils unterschiedlicher Größe von ca. 3.000 bp bis 8.000 bp auf einem Standardgel zu erkennen.

#### 4.2.2.1.8 **MHK-Bestimmung der *E. coli*-Isolate aus der Normalflora der Ratte gegenüber Ciprofloxacin**

Die MHK gegenüber Ciprofloxacin war bei 8 *E. coli*-Isolate 0,004 mg/l. Bei 48 Isolaten betrug die MHK von 0,008 mg/ml.

#### 4.2.2.1.9 **Identifizierung der Laktose-negativen Kolonien aus der Normalflora der Ratte**

Der Indolnachweis der auf McConkey-Platten als Laktose-negativ identifizierten Kolonien war positiv. Bei diesen Keimen handelte es sich um den Keim *Proteus mirabilis*.

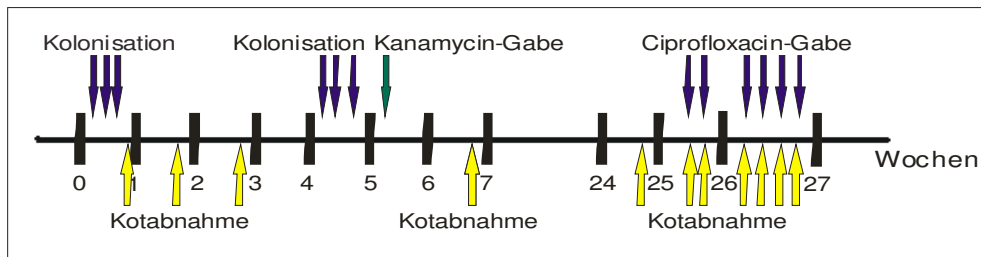
### 4.2.3 **Untersuchung des Rattenfutters auf Arabinose**

Um sicher zu gehen, dass der markierte *E. coli*-57 während der Passage des Rattendarms keinen Kontakt zu L-Arabinose hat und kein Gfp exprimiert wird, wurde der *E. coli*-57 mit Rattenfutter über Nacht inkubiert. Bei der Betrachtung unter UV-Licht zeigte sich keine grüne Fluoreszenz.

### 4.2.4 **Kolonisierung des Rattendarms mit *E. coli*-57**

Den Ratten wurde wie im Schema dargestellt über Sonde oder Trinkwasser entweder *E. coli*-57-Suspension oder PBS verabreicht. Vor und nach der Kolonisation fanden Kotabnahmen statt. Die Kolonisation des Rattendarms mit *E. coli*-57 war über ein halbes

Jahr stabil. Hierauf folgte die Ciprofloxacin-Gabe in unterschiedlicher Dosierung.



**Abb. 17:** Schema über zeitlichen Ablauf der Kolonisation

Den Ratten aus den Käfigen 1 und 3 (Ratte 1o, 1-, 3o und 3-) wurde der markierte *E. coli*-57 per Sonde verabreicht, den Tieren aus den Käfigen 2 und 4 (Ratte 2o, 2-, 4o und 4-) wurde der Keim über das Trinkwasser gegeben. Die Ratten aus dem Käfig 5 (Ratte 5o und 5-) wurden als Negativ-Kontrolle mitgeführt. Diesen Tieren wurde an jedem Kolonisationstag PBS per Sonde verabreicht. Die Nummern der Ratten bestanden aus der Käfignummer (1–4) und o, wenn die Tiere mit einem Loch im Ohr markiert waren. Die Ratte mit der Bezeichnung 1o war aus dem Käfig 1 und hatte als Markierung ein Loch im Ohr. Das Tier mit der Bezeichnung 2- war aus dem Käfig 2 und hatte kein Loch im Ohr.

#### 4.2.4.1 Ablauf der Kolonisierung

##### 1. Kolonisationstag

Die Zellen aus einer Übernachtskultur wurden wie in Materialien und Methoden unter 3.6.4 beschrieben vorbehandelt. Bei der OD-Messung bei 580 nm ergab sich ein Wert von 2,90. Unter der Annahme, dass 1 OD  $10^9$  Zellen entspricht (Dneasy®Tissue Handbook, Qiagen), kongruiert eine OD von 2,9 mit einer Keimkonzentration von  $2,9 \times 10^9$  Zellen/ml. 300  $\mu$ l dieser Suspension wurden den Tieren aus Käfig 1 und 3 per Sonde appliziert. Diese 300  $\mu$ l entsprechen einer Keimmenge von  $8,7 \times 10^8$  Zellen. Als Kontrolle wurde den Tieren aus Käfig 5 300  $\mu$ l PBS<sub>ohne</sub> per Sonde appliziert. Den Tieren in Käfig 2 und 4 wurde der Keim *E. coli*-57 per Trinkwasser verabreicht. Auf 300 ml Trinkwasser wurden 103  $\mu$ l Keimsuspension ( $OD_{580} = 2,9$ ) gegeben. Dies entspricht einer Keimkonzentration von  $10^6$  Zellen/ml.

## 2. Kolonisationstag

Die OD-Messung bei 580 nm ergab 3, das entspricht eine Keimkonzentration von  $3 \times 10^9$  Zellen/ml. 300  $\mu$ l dieser Suspension wurden den Tieren aus Käfig 1 und 3 per Sonde appliziert. Diese 300  $\mu$ l entsprechen einer Keimmenge von  $9 \times 10^8$  Zellen. Als Kontrolle wurde den Tieren aus Käfig 5 PBS<sub>ohne</sub> (300  $\mu$ l) per Sonde appliziert.

## 3. Kolonisationstag

Die Messung der OD bei 580 nm ergab 3,12 ( $3,12 \times 10^9$  Zellen/ml). 300  $\mu$ l dieser Keimsuspension wurde, wie am ersten Kolonisationstag, den Tieren aus Käfig 1 und 3 per Sonde appliziert. 300  $\mu$ l enthielten  $9,36 \times 10^8$  Zellen. Als Kontrolle wurde den Tieren aus Käfig 5 300  $\mu$ l PBS<sub>ohne</sub> per Sonde appliziert. Den Tieren in Käfig 2 und 4 wurde der Keim per Wasser verabreicht. Auf 500 ml wurden 160,25  $\mu$ l Keimsuspension ( $OD_{580} = 3,12$ ) gegeben. Dies entspricht einer Keimkonzentration von  $10^6$  Zellen/ml.

Nach dem dritten Kolonisationstag erfolgte eine Kontrolle des Status der Darmflora der Ratten. Hierbei stellte sich heraus, dass die Kolonisation der Tiere per Trinkwasser nicht erfolgreich war. Daraufhin wurden alle Tiere nochmals per Sonde kolonisiert.

## 4. Kolonisationstag

Die Messung der  $OD_{580}$  ergab 3,12 ( $3,12 \times 10^9$  Zellen/ml). 300  $\mu$ l der Suspension wurden wiederum den Tieren aus Käfig 1, 2, 3 und 4 per Sonde appliziert. Diese 300  $\mu$ l enthalten  $9,36 \times 10^8$  Zellen. Als Kontrolle wurde den Tieren aus Käfig 5 300  $\mu$ l PBS<sub>ohne</sub> per Sonde appliziert.

## 5. Kolonisationstag

Über Nacht war die Ratte 1o aus dem Käfig 1 verstorben. Die durchgeführte Obduktion ergab keine Hinweise auf die Todesursache (Dr. T. Spruss, Tierärztlicher Dienst, Regensburg). Bei der Keimgabe per Sonde wurde wahrscheinlich der Ratte eine Verletzung zugeführt, die zu einer Sepsis führte und somit zum Tod. Bei der Ratte 2o wurde von einer weiteren Kolonisation abgesehen, da der Allgemeinzustand bedenklich war. Das Tier wirkte im Vergleich zu den anderen Ratten erschöpft und müde.

Die OD-Messung bei 580 nm der gewaschenen und resuspendierten Keimsuspension ergab 2,6, das entspricht einer Keimkonzentration von  $2,6 \times 10^9$  Zellen/ml. 300  $\mu$ l dieser Zellsuspension wurde den Tieren aus Käfig 1, 2, 3 und 4, mit Ausnahme der Ratte 2o, per Sonde appliziert. Diese 300  $\mu$ l entsprachen einer Keimmenge von  $7,8 \times 10^8$  Zellen. Den Kontrolltieren aus Käfig 5 wurde je 300  $\mu$ l PBS<sub>ohne</sub> per Sonde appliziert.

## 6. Kolonisationstag

Über Nacht war die Ratte 2o verstorben. Bei der Obduktion zeigten sich keine Organveränderungen oder andere Hinweise auf Erkrankungen. Daher wurde als Todesursache eine Sepsis angenommen, die durch eine Verletzung der Speiseröhre bei der

Keimapplikation per Sonde verursacht wurde. Da Ratten keine Einzelgänger sind, wurde nach Befragung des Tierarztes die Ratte 1- mit einem Dreieck am Ohr markiert und zu Ratte 2- in den Käfig 2 gegeben, damit soziale Umgebung und somit die Versuchsbedingungen bei allen Versuchstieren gleich waren.

Die OD-Messung bei 580 nm ergab 3,12 ( $3,12 \times 10^9$  Zellen/ml). 300  $\mu$ l dieser Zellsuspension wurden den Tieren aus Käfig 2, 3 und 4 per Sonde appliziert. Diese 300  $\mu$ l entsprechen einer Keimmenge von  $9,36 \times 10^8$  Zellen. Als Kontrolle wurde den Tieren aus Käfig 5 300  $\mu$ l PBS<sub>ohne</sub> per Sonde appliziert.

Sieben Tage nach der letzten Kolonisation wurde einmalig allen Tieren für 24 h Trinkwasser mit einer Kanamycinkonzentration von 50  $\mu$ g/ml gegeben. Durchschnittlich wurde pro Tier eine Menge von 50 ml innerhalb dieser 24 h aufgenommen. Da Kanamycin oral nicht resorbiert wird hat es eine sehr gute Wirksamkeit im Darm. Dies sorgte für einen Selektionsvorteil des *E. coli*-57 innerhalb der Darmflora.

Die Kolonisation des Rattendarms mit *E. coli*-57 war über sechs Monate lang stabil.

Innerhalb von sechs Monate starben vier weitere Ratten aus der Versuchstiergruppe aus ungeklärter Ursache (Obduktion Dr. T. Spruss)

#### **4.2.5 Bestimmung des Gewichts der Ratten**

Bei allen Ratten wurde eine stetige Zunahme des Gewichts beobachtet.

#### **4.2.6 Gabe von Ciprofloxacin in unterschiedlichen Konzentrationen und verschiedenen Dosierungsschemata**

Für diese Versuchsreihe wurden alle Ratten in Einzelhaltung genommen, da nur auf diese Weise die Trinkmenge pro Tier bestimmt werden konnte.

Die Tiere wurden in Zweier-Gruppen eingeteilt. Der ersten Gruppe, die aus zwei mit dem Stamm *E. coli*-57 kolonisierten Tieren bestand, wurde sechs Tage lang jeden Tag eine höhere Ciprofloxacinkonzentration verabreicht (siehe Tab. 18). Die zweite Gruppe, die aus zwei Tieren der Kontrollgruppe bestand, bekam nur jeden zweiten Tag eine höhere Ciprofloxacinkonzentration (siehe Tab. 19). Das Antibiotikum wurde über das Trinkwasser nach folgenden Schemata verabreicht:

**Tab. 18:** Gruppe mit täglich höheren Ciprofloxacinkonzentration

Tag 1	20 µg/ml
Tag 2	40 µg/ml
Tag 3	80 µg/ml
Tag 4	160 µg/ml
Tag 5	320 µg/ml
Tag 6	640 µg/ml

**Tab. 19:** Gruppe mit am zweiten Tag ändernder Ciprofloxacinkonzentration

Tag 1	20 µg/ml
Tag 2	20 µg/ml
Tag 3	40 µg/ml
Tag 4	40 µg/ml
Tag 5	80 µg/ml
Tag 6	80 µg/ml

Bei den täglichen Kotabnahmen und dem Screening auf Gram-negative, Laktose-positive Keime stellte sich heraus, dass sich ab einer Ciprofloxacinkonzentration von 640 µg/ml kein Wachstum auf dem Selektivmedium McConkey mehr zeigte.

Bei der ersten Gruppe konnten zwei Kanamycin-resistente *E. coli*, *E. coli-4o1* und *E. coli-4o2*, nach der Gabe von 160 µg/ml Ciprofloxacin (Trinkwasser) aus dem Kot isoliert werden.

#### 4.2.6.1 Untersuchung der bei 160 µg/ml Ciprofloxacin isolierten Kanamycin-resistenten *E. coli-4o1* und *E. coli-4o2*

Die Keime *E. coli-4o1* und *E. coli-4o2* zeigten Wachstum auf Kanamycin-haltigen LB-Agarplatten mit 0,1 % Arabinose, aber keine Fluoreszenz. Bei einer PCR mit den Primerkombinationen #1117 und #1116, #1118 und #1523, #801 und #1523 und #213 und #1523 zum Nachweis des Fragments *araBPr-gfp* im Ganzen oder nur einem Teil davon entstanden keine Produkte. Um auszuschließen, dass sich die Kanamycin-Resistenz auf einem replikationsfähigen Plasmid befindet, wurde bei beiden Klonen eine Plasmidisolierung durchgeführt. Auf einem Standardgel war in der jeweiligen Plasmidisolierung eine Bande bei circa 4.000 bp zu erkennen. Die Plasmidpräparation wurde in den zur Arabinoseverstoffwechselung fähigen Wildtypstamm *E. coli-2685* transformiert und auf Kanamycin-haltigen LB-Agarplatten ausplattiert. Es wurde kein Wachstum beobachtet. Auch eine PCR mit den Primerkombinationen #1523 + #1225 und #1223 + #1521 ergab keine Produkte.

Diese Ergebnisse legen nahe, dass sich die Resistenzkassette sowohl bei *E. coli*-4o1 als auch bei *E. coli*-4o2 nicht auf einem Plasmid befindet.

Mittels Rep-PCR und der Bestimmung der phylogenetischen Gruppe konnte gezeigt werden, dass beide Isolate im Genotyp dem markierten Stamm *E. coli*-57 entsprechen.

Auch bei der *organic solvent tolerance* waren keine Unterschiede zwischen *E. coli*-4o1, *E. coli*-4o2 und dem Stamm *E. coli*-57 zu erkennen.

Die gesamten Ergebnisse lassen annehmen, dass die beiden Stämme *E. coli*-4o1 und *E. coli*-4o2 von dem Stamm *E. coli*-57 abstammen, jedoch während der Behandlung der Ratte mit Ciprofloxacin die Reportergermarkierung komplett verloren haben.

Die Bestimmung der MHK gegenüber Ciprofloxacin mittels Mikrodilution ergab bei allen drei Keimen den Wert 0,008 mg/l. Da es zu keiner Veränderung der MHK gegenüber Ciprofloxacin bei *E. coli*-4o1 und *E. coli*-4o2 gekommen ist, waren diese Klone für weitere Untersuchungen der Resistenzentwicklung nicht brauchbar.

#### **4.2.6.2 Bestimmung der Ciprofloxacinkonzentration mittels HPLC**

Die im Kot vorhandene Ciprofloxacinkonzentration wurde mit Hilfe von HPLC bestimmt (genauen Daten siehe Anhang 8.3). Unter der Annahme, dass alles verbrauchte Trinkwasser von den Tieren aufgenommen worden war, wurden 26,5 % der Dosis Ciprofloxacin im Kot ausgeschieden. Der Prozentsatz der ausgeschiedenen Menge fiel auf 21,9 % ab, wenn nicht die nominale Konzentration im Trinkwasser, sondern die tatsächlich gemessene Ciprofloxacinkonzentration für die Berechnung verwendet wurde. Die Berechnung erfolgte mit Hilfe der Formeln aus Materialien und Methoden (siehe 3.2.1.10.2.3).

Mit den Messungen im Kot konnte nicht unterschieden werden zwischen der nicht resorbierten Menge Ciprofloxacin und der Menge Ciprofloxacin, die nach Resorption über die Galle wieder ausgeschieden worden war. In der Massenbilanz sind auch Metabolite von Ciprofloxacin nicht berücksichtigt, da diese nicht bestimmt wurden.

### 4.3 Wirkung humaner Pharmazeutika auf die Induktion von Efflux

Um pharmakologische Substanzen zu identifizieren, die Expressionssteigerungen spezifischer Fluorchinolon-Transporter oder regulatorischer Proteine auslösen und damit die intrinsische Resistenz von *E. coli* erhöhen, wurden in einem Gfp-Reportersystem klinisch häufig verabreichte Pharmazeutika auf ihr induktives Potential untersucht. Es wurde ein Screening-System für *E. coli* entwickelt, in dem eine Fluoreszenzänderung beobachtet wird, wenn eine beliebige Substanz zur Veränderung der Expression Efflux-assoziiierter Gene führt. Das System basiert auf *E. coli*-Stämmen mit einem Reporter-gen-Plasmid, auf dem das *gfp*-Gen jeweils unter der Kontrolle des Promotors eines der sieben Fluorchinolon-Transporter bzw. der globalen Regulatoren MarA, Rob und SoxS steht. Um das Fluoreszenzsignal zu verstärken, wurde zwischen Promotor und Reporter-gen ein von Cheng und Patterson<sup>37</sup> beschriebener Translationsenhancer eingefügt, der laut Miller und Lindow die Translation bis zu 80-fach verstärken kann<sup>201</sup>. Diese Signalverstärkung erscheint insbesondere dann wichtig, wenn der zu untersuchende Promotor nur zu einer schwachen Transkription führt.

#### 4.3.1 High copy-Plasmid-System

##### 4.3.1.1 Klonierung der Reporter-gen-Vektoren

Folgende Reporter-gen-Vektoren wurden schon in Vorarbeiten kloniert:

- pUC-acrABPr-gfp
- pUC-acrEFPr-gfp
- pUC-acrDPr-gfp
- pUC-mdfAPr-gfp
- pUC-mdtHPr-gfp
- pUC-acrABPr-Tgfp
- pUC-mdtKPr-Tgfp

##### 4.3.1.1.1 Das *gfp*-Gen unter der Kontrolle des *norE*-Promotors

Um das *gfp*-Gen unter die Kontrolle des *norE*-Promotors zu bringen, wurde der Genabschnitt per PCR mit den Primern #1049 und #1050 (972 bp) aus dem *E. coli*-Genom TM EPI300 vervielfältigt. Im *E. coli*-Genom K12 (*Gene Bank* #U00096) entspricht dieser Abschnitt dem Bereich von 1.740.525 bp bis 1.741.478 bp und wurde als *norEPrI* bezeichnet. Als Alternative wurde auch noch eine PCR mit den Primern #1113 und #1150 (233 bp) durchgeführt. Der amplifizierte Abschnitt befindet sich im *E. coli*-Genom K12 (#U00096) an der Position von 1.741.267 bp bis 1.741.479 bp und wurde als *norEPrII* benannt. Der

jeweilige Promotor wurde nach dem Verdau mit *AatII* und *NdeI* in den mit den gleichen Enzymen geschnittenen Vektor pUC19 integriert. Die resultierenden Vektoren wurden als pUC-*norEP*I (3.396 bp) und pUC-*norEP*II (2.657 bp) bezeichnet. In die beiden Vektoren wurde nach einem Doppelverdau mit *NdeI* und *XbaI* das aus dem Vektor pCR4-*gfp*genIV (4.739 bp) mit *FauI*- und *XbaI*-geschnittene Fragment (762 bp) ligiert. Aus unklaren Gründen ergab die Klonierung des Plasmids pUC-*norEP*I-*gfp* keine Klone. Die Klonierung des Vektors pUC-*norEP*II-*gfp* (3.180 bp) war erfolgreich.

Um die Translation des *gfp*-Gens zu verstärken wurde über Fusions-PCR (#1113 und #1051) aus den PCR-Produkten pUC-*norEP*II-*gfp* mit #1113 und #1133 (242 bp) und pUC-*acrABPr*-*Tgfp* mit den Primern #1131 und #1051 (795 bp) der *norE*-PromotorII vor das *Tgfp*-Gen kloniert. Das Fusions-PCR-Produkt (1.012 bp) wurde nach einem *BglII*-Verdau in einen mit *Bam*HI-geschnittenen pUC19 ligiert. Das entstandene Plasmid wurde als pUC-*norEP*II-*Tgfp* (3.685 bp) bezeichnet.

#### 4.3.1.1.2 **Das *gfp*-Gen unter der Kontrolle des *mdtM*-Promotors**

Der *mdtM*-Promotor wurde per PCR mit den Primern #1071 und #1072 (1.005 bp; *mdtMP*I) oder alternativ mit #1073 und #1072 (826 bp, *mdtMP*II) aus dem *E. coli*-Genom DH5 $\alpha$  amplifiziert. Im *E. coli*-Stamm K12 (*Gene Bank* #U00096) ist der homologe Bereich des *mdtMP*I von 4.567.523 bp bis 4.566.540 bp zu finden. Der *mdtMP*II entspricht bei *E. coli* K12 dem Bereich von 4.567.343 bp bis 4.566.540 bp. Die Promotoren wurden nach einem Doppelverdau mit *AatII* und *BbsI* in den mit denselben Enzymen geschnittenen Vektor pUC-*gfp*gen (2.953 bp) kloniert. Die resultierenden Vektoren wurden als pUC-*mdtMP*I-*gfp* (3.939 bp) und pUC-*mdtMP*II-*gfp* (3.760 bp) bezeichnet.

#### 4.3.1.1.3 **Das *gfp*-Gen unter der Kontrolle des *rob*-Promotors**

Im Genom des *E. coli*-Stammes K12 (#U00096) ist der *rob*-Promotor im Bereich von 4.633.544 bp bis 4.633.334 bp zu finden. Der Bereich wurde mit den Primern #1178 und #1179 aus dem Genom von *E. coli* TM EPI300 amplifiziert. Seine Länge beträgt 249 bp. Das mit dem *enhancer* (von Cheng und Patterson<sup>37</sup> beschrieben) verstärkte *gfp* wurde über eine PCR mit den Primern #1131 und #979 aus dem Vektor pUC-*acrABPr*-*Tgfp* amplifiziert. Dieses 790 bp lange *Tgfp*-Fragment wurde über Fusions-PCR mit dem *rob*-Promotor verbunden. Die PCR wurde mit den Primern #1178 und #979 durchgeführt. Das entstandene Fusions-PCR-Produkt (1.014 bp) wurde mit *AatII* und *XbaI* verdaut. Bei der Klonierung des geschnittenen PCR-Produkts in den *AatII*- und *XbaI*-geschnittenen Vektor pUC-*gfp*gen entstanden keine Klone.

#### 4.3.1.1.4 **Das *gfp*-Gen unter der Kontrolle des *soxS*-Promotors**

Der *soxS*-Promotor wurde über eine PCR mit den Primern #1180 und #1181 aus dem *E. coli*-Genom TM EPI300 amplifiziert. Das entstandene Fragment ist 124 bp lang und entspricht im *E. coli*-Genom K12 (#U00096) dem Bereich von 4.275.492 bp bis 4.275.407 bp. Das *gfp*-Gen wurde mit *enhancer* aus dem Vektor pUC-*acrABPr-Tgfp* mit den Primern #1131 und #979 amplifiziert (790 bp) und über Fusions-PCR (#1180 und #979) hinter den *soxS*-Promotor kloniert. Diese Fusions-PCR funktionierte aus unbekannter Ursache nicht. Bei einem alternativen Klonierungsversuch wurde der Vektor pUC19 mit *Bam*HI geschnitten. Aus dem Vektor pCR4-*soxSPR-Tgfp* (4.968 bp) wurde über einen *Bgl*II-Verdau das für die Ligation nötige Insert gewonnen (994 bp). Die Ligation des Fragments *soxSPR-Tgfp* in den *Bam*HI-geschnittenen Vektor funktionierte nicht.

#### 4.3.1.1.5 **Das *gfp*-Gen unter der Kontrolle des *marRA*-Promotors**

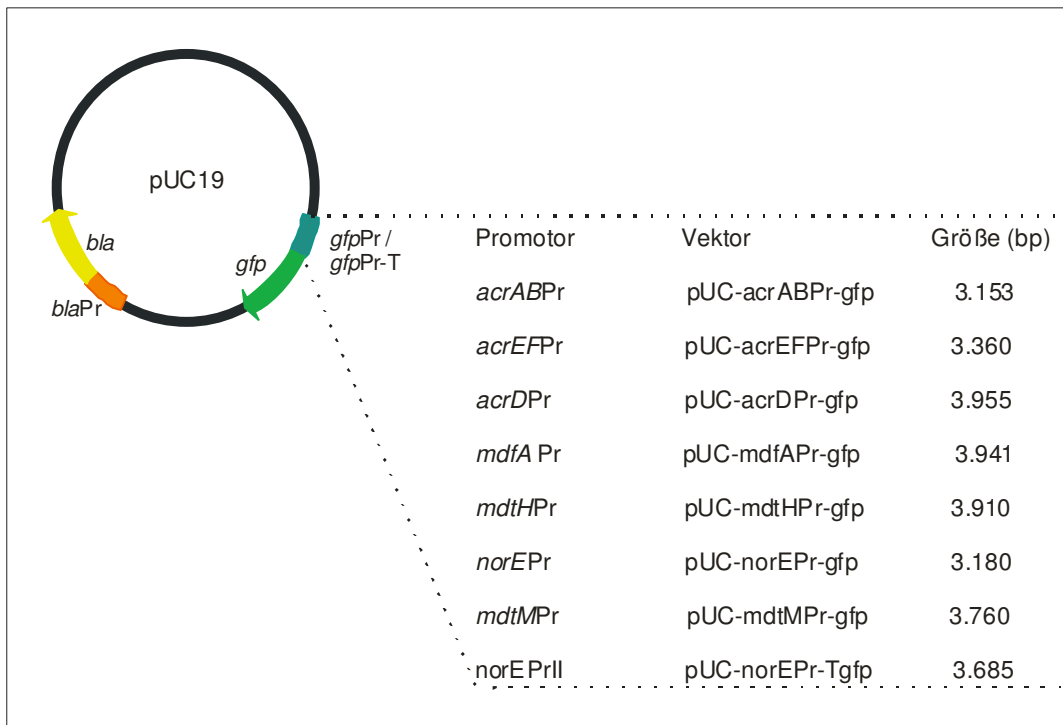
Um das *gfp*-Gen unter die Kontrolle des *marRA*-Promotors und unter die Translationsverstärkung des *enhancers* (von Cheng und Patterson<sup>37</sup> beschrieben) zu bringen wurde der Promotor per PCR mit den Primern #1176 und #1177 (249 bp) aus dem *E. coli*-Genom TM EPI300 vervielfältigt. Im *E. coli*-Genom K12 (*Gene Bank* #U00096) entspricht dieser Abschnitt dem Bereich von 1.616.933 bp bis 1.617.143 bp. Das *gfp*-Gen wurde zusammen mit dem *enhancer* per PCR (#1131 und #979) aus dem Plasmid pUC-*acrABPr-Tgfp* amplifiziert. Der *marRA*-Promotor und das *Tgfp*-Fragment wurden über Fusions-PCR mit den Primern #1176 und #979 miteinander verbunden. Dieses Produkt (1014 bp) wurde dann mit den Enzymen *Aat*II und *Xba*I verdaut und in einen mit denselben Enzymen geschnittenen Vektor pUC-*gfp*gen (2.198 bp) versucht zu ligieren. Diese Ligation war aus unbekannter Ursache nicht erfolgreich.

Alternativ wurde versucht das *Bgl*II-Fragment (994 bp) aus pCR4-*marRAPr-Tgfp*a in einen mit *Bam*HI geschnittenen pUC19 zu klonieren, um das Plasmid pUC-*marRAPr-Tgfp* (3.680 bp) zu erhalten. Bei dieser Klonierung entstanden keine korrekten Plasmide.

#### 4.3.1.1.6 **Das *gfp*-Gen unter der Kontrolle des *acrEF*-Promotors**

Der *acrEF*-Promotor wurde über eine PCR mit den Primern #977 und #1134 aus dem pUC-*acrEFPr-gfp* amplifiziert. Das entstandene Fragment ist 437 bp lang und entspricht im *E. coli*-Genom K12 (*Gene Bank* #U00096) dem Bereich von 3.411.487 bp bis 3.411.885 bp. Das *gfp*-Gen wurde mit *enhancer* aus dem Vektor pUC-*acrABPr-Tgfp* mit den Primern #1131 und #979 amplifiziert (790 bp) und über Fusions-PCR (#977 und #979) mit dem *acrEF*-Promotor verbunden. Dieses Fusions-PCR-Produkt war 1.232 bp lang und wurde mit *Bgl*II verdaut (1.182 bp). Dieses Fragment wurde dann in einen mit *Bam*HI geschnittenen

pUC19 ligiert. Der hieraus resultierende Vektor wurde als pUC-acrEFPr-Tgfp (3.868 bp) bezeichnet.



**Abb. 18:** Aufbau der *gfp*-Reporter-gen-Vektoren

#### 4.3.1.2 Screening-System

In einem Vorversuch mit dem Kontroll-Stamm (*E. coli* DH10B mit pUC-*acrABPr*-Tgfp) konnte die Funktionalität des Systems gezeigt werden, in dem der Promotor des *acrAB*-Operons die *gfp*-Transkription steuert. Abbildung 18 zeigt die Fluoreszenzänderung dieses Stammes durch den bekannten Induktor Salizylat (0–5 mM). Ein induzierender Effekt ließ sich auch mit Ethanol nachweisen (siehe Abbildung 19), allerdings nur bis zu einer Konzentration von 0,57 %. Die Induktoren in den entsprechenden Konzentrationen zeigten keine Eigenfluoreszenz.



0 0,5 1 1,5 2 2,5 3 3,5 4 4,5 5 mM Salizylat

**Abb. 19:** Fluoreszenz des Reporterstammes *E. coli* DH10B mit pUC-*acrABPr*-Tgfp nach Induktion durch Salizylat. Angegeben sind die jeweiligen Konzentrationen des Induktors.



0,19 0,38 0,57 0,76 0,95 % Ethanol

**Abb. 20:** Fluoreszenz des Reporterstammes mit *E. coli* DH10B mit pUC-*acrABPr-Tgfp* nach Induktion durch Ethanol. Angegeben sind die jeweiligen Konzentrationen des Induktors.

#### 4.3.1.3 Screening der Pharmazeutika

Die Untersuchung der potentiellen Induktoren wurde in Flüssigkultur durchgeführt. Dabei wurden in 96-well-Mikrotiterplatten die Reporterstämme parallel mit unterschiedlicher Konzentrationen des putativen Induktors kultiviert und einschließlich nicht induzierter Kontrollkulturen hinsichtlich Fluoreszenzunterschieden untersucht.

Es wurden aus verschiedenen Kategorien Pharmazeutika gewählt, die aufgrund ihrer oralen Gabe einen Einfluss auf die Flora des Intestinaltraktes ausüben können. Es wurde darauf geachtet mit Konzentrationen des potentiellen Induktors zu arbeiten, die auch physiologisch erreicht werden können. Als Anhaltspunkt dienten dabei entsprechende Angaben bzw. bekannte Daten über die Konzentration des Medikaments im Serum bzw. Darm. Aufgrund der schlechten Löslichkeit von Medikamenten wurde auf den jeweiligen Wirkstoff in Reinsubstanz zurückgegriffen. Die Reinsubstanzen wurden entweder in 70 %igem oder 100 %igem Ethanol gelöst (siehe Tab: 20).

**Tab. 20:** Lösungsmittel der Reinsubstanz

Reinsubstanz	Lösungsmittel
Azetylsalizylsäure, Sigma-Aldrich, Steinheim	70 % Ethanol, Merck, Darmstadt
Ibuprofen, Sigma-Aldrich	100 % Ethanol, Merck
Ketoprofen, Sigma-Aldrich	100 % Ethanol
Paracetamol, Sigma-Aldrich	100 % Ethanol

Alle Substanzen wurden in einer Konzentration von 5 mM in die Versuche eingesetzt. Die induzierten Proben wurden hinsichtlich ihrer Fluoreszenz untersucht. Grüne Fluoreszenz wurde als positives und keine Fluoreszenz wurde als negatives Ergebnis gewertet.

Aufgrund von Eigenfluoreszenz konnten folgende Substanzen nicht auf ihren induktiven Effekt hin ausgetestet werden:

- Ethacridinlactat (Aug.Hedinger GmbH & Co., Stuttgart)
- Citrofresh (GDM Technologies, Australien)
- Paracetamol Saft (Hexal, Holzkirchen)
- Multivitamin Akt (Lichtenstein Pharmazeutika GmbH & Co., Koblenz-Kesselheim)

- Dynexan® (Kreussler Pharma, Wiesbaden)
- Cranberries (Seeberger, Ulm)
- Braunol (B|raun, Melsungen)
- Magnesiocard (Verla pharm, Tutzing)

#### 4.3.1.4 Induktion spezifischer Promotoren von Fluorchinolon-Transportern oder regulatorischer Proteinen

Für diese Versuche wurden *E. coli*-Stämme mit den jeweiligen Vektoren im nicht-induzierten Zustand beobachtet. Alle zeigten im nicht induzierten Zustand keine Fluoreszenz. In Tabelle 21 sind die Ergebnisse zu diesen Versuchen zusammengefasst.

**Tab. 21:** Übersicht zu Promotoren und Induktoren; T steht für *enhancer*; „+“ bedeutet Substanz hat induktiven Effekt auf Promotor; „—“ bedeutet Substanz hat keinen induktiven Effekt auf Promotor

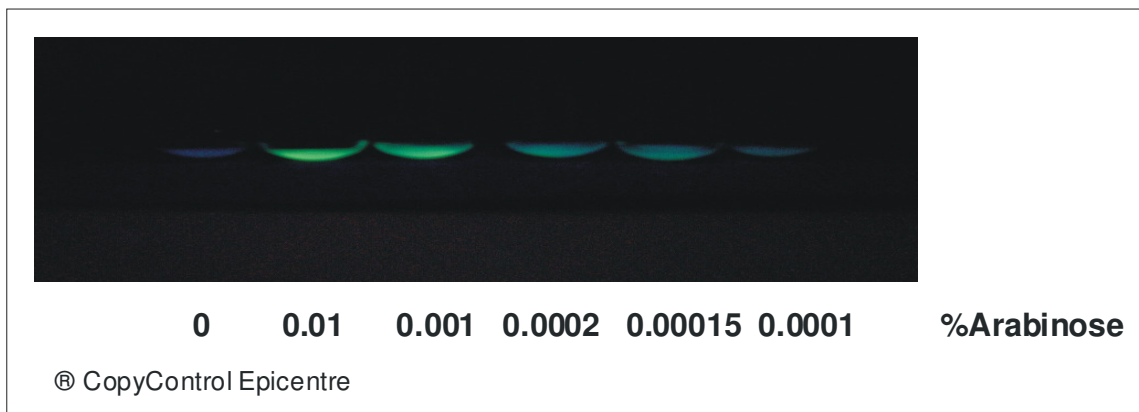
Substanz	Promotor							
	<i>acrAB</i>	<i>acrEF</i>	<i>acrD</i>	<i>norE</i>	<i>norE-T</i>	<i>mdtH</i>	<i>mdtM</i>	<i>mdfA</i>
Ethanol (70 %)	+	—	+	—	+	—	—	—
Ethanol (100 %)	+	—	+	—	+	—	—	—
Isopropanol	+	—	+	—	—	—	—	—
Methanol	+	—	+	—	+	—	—	—
Aceton	+	—	+	—	—	—	—	—
n-Dodekan	+	—	+	—	+	—	—	—
n-Oktan	+	—	+	—	+	—	—	—
Ibuprofen	+	—	+	—	+	—	—	—
Ketoprofen	+	—	+	—	+	—	—	—
Paracetamol	+	—	+	—	+	—	—	—
Azetylsalizylsäure	+	—	+	—	+	—	—	—

#### 4.3.2 Low copy-Plasmid-System

Die Verwendung eines *high copy*-Plasmids als Screening-Instrument birgt die Gefahr, dass durch die erhöhte Anzahl von Bindungsstellen eines Regulators nicht die exakten physiologischen Auswirkungen einer Induktion widerspiegelt werden. Um Gen-Dosis-Effekte durch die Verwendung eines *high copy*-Plasmides zu vermeiden, wurden die Fragmente mit den Promotor-*gfp*-Sequenzen aus dem pUC19 in den *low copy*-Vektor pCC1\_dB von EPICENTRE kloniert.

Der pCC1-Vektor besitzt sowohl den *E. coli*-Faktor *single copy*- als auch den *high copy*-(*oriV*)-Replikationsursprung. Die Initiation der Replikation über *oriV* erfordert das

TrfA-Protein. Im Stamm *E. coli* TM EPI300 steht *trfA* unter der Kontrolle des *araB*-Promotors, daher kann in diesem Stamm über die Arabinosekonzentration im Medium die TfrA-Expression und damit die Replikation von pCC1 in einem Bereich zwischen 1 und 70 Kopien pro Zelle sehr genau reguliert werden. Mittels eines pCC1-Derivates mit dem *gfp*-Gen unter der Kontrolle des *lac*-Promotors konnte die lineare Abhängigkeit der Kopienzahl von der Arabinosekonzentration visualisiert werden (siehe Abb. 21).



**Abb. 21:** Induktion von pCC1-gfp mit Arabinose (Linde *et al.* ICCAC 2003). Angegeben werden die jeweiligen Konzentrationen von Arabinose

Durch die Verwendung von *E. coli* TM EPI300 mit pCC1 als Reporter-gen-Vektor können so eventuell auftretende Gen-Dosis-Effekte analysiert und gegebenenfalls ausgeschlossen werden.

Eine genaue Detektion und Quantifizierung der Fluoreszenz in 96-well-Mikrotiterplatten war bei den pCC1-Konstrukten nicht möglich, da es sich bei dem Plasmid pCC1 um einen *low copy*-Vektor handelt. Geringe Veränderungen der Gfp-Expression – ausgelöst durch Induktion – konnten visuell nicht wahrgenommen werden. Aus diesem Grund wurde mittels RT-PCR im LightCycler® unter Verwendung von *gfp*-Primern die Reaktion der Promotoren auf Induktoren ausgetestet.

#### 4.3.2.1 Klonierung der Reporter-gen-Vektoren

##### 4.3.2.1.1 *Das gfp-Gen unter der Kontrolle des acrAB-Promotors*

Das *gfp*-Gen unter die Kontrolle des *acrAB*-Promotors wurde zusammen mit dem *acrAB*-Promotor per *Bgl*II-Verdau aus dem Vektor pUC-*acrAB*Pr-*gfp* gewonnen. Das 950 bp große Fragment wurde in den mit *Bam*HI geschnittenen pCC1\_dB kloniert. Dieses Plasmid wurde als pCC1-*acrAB*Pr-*gfp* bezeichnet und ist 9.077 bp groß.

#### 4.3.2.1.2 **Das *gfp*-Gen unter der Kontrolle des *acrEF*-Promotors**

Um das *gfp*-Gen unter der Kontrolle des *acrEF*-Promotors in den pCC1\_dB-Vektor zu bringen, wurde das Plasmid pUC-*acrEFPr-gfp* mit *Bgl*II verdaut und das hieraus resultierende Fragment (1.157 bp) in den *Bam*HI-geschnittenen pCC1\_dB ligiert. Der resultierende Vektor ist pCC1-*acrEFPr-gfp* (9.284 bp).

#### 4.3.2.1.3 **Das *gfp*-Gen unter der Kontrolle des *acrD*-Promotors**

Der *acrD*-Promotor und das *gfp*-Gen wurden über einen *Bgl*II-Verdau aus dem Vektor pUC-*acrDPr-gfp* erhalten. Der Vektor pCC1\_dB wurde mit *Bam*HI verdaut. Das *Bgl*II-verdaute Fragment *acrDPr-gfp* (1.752 bp) wurde dann in den *Bam*HI-geschnittenen pCC1\_dB-Vektor ligiert. Der Vektor wurde als pCC1-*acrDPr-gfp* bezeichnet und seine Größe beträgt 9.879 bp.

#### 4.3.2.1.4 **Das *gfp*-Gen unter der Kontrolle des *mdfA*-Promotors**

Das *gfp*-Gen unter der Kontrolle des *mdfA*-Promotors wurde zusammen mit dem *mdfA*-Promotor per *Bgl*II-Verdau aus dem Vektor pUC-*mdfAPr-gfp* gewonnen. Das 1.738 bp große Fragment wurde in den mit *Bam*HI geschnittenen pCC1\_dB kloniert. Dieses Plasmid wurde als pCC1-*mdfAPr-gfp* bezeichnet und ist 9.865 bp groß.

#### 4.3.2.1.5 **Das *gfp*-Gen unter der Kontrolle des *marRA*-Promotors**

Um das *gfp*-Gen unter der Kontrolle des *marRA*-Promotors zusammen mit *enhancer* in den pCC1\_dB-Vektor zu bringen, wurde das Plasmid pCR4-*marRAPr-Tgfp* mit *Bgl*II verdaut und das hieraus resultierende Fragment (994 bp) in den *Bam*HI-geschnittenen pCC1\_dB ligiert. Der resultierende Vektor wurde als pCC1-*marRAPr-Tgfp* (9.121 bp) bezeichnet.

#### 4.3.2.1.6 **Das *gfp*-Gen unter der Kontrolle des *rob*-Promotors**

Der *rob*-Promotor und das von einem *enhancer* verstärktem *gfp*-Gen wurden über einen *Bgl*II-Verdau aus dem Vektor pCR4-*robPr-Tgfp* erhalten. Der Vektor pCC1\_dB wurde mit *Bam*HI verdaut. Das *Bgl*II-verdaute Fragment *robPr-Tgfp* (994 bp) wurde dann in den *Bam*HI-geschnittenen pCC1\_dB-Vektor ligiert. Der hier entstandene Vektor wurde als pCC1-*robPr-Tgfp* bezeichnet und seine Größe beträgt 9.121 bp.

#### 4.3.2.2 **Überprüfung der Arabinose-abhängigen Transkription von pCC1\_dB-Vektorgenen**

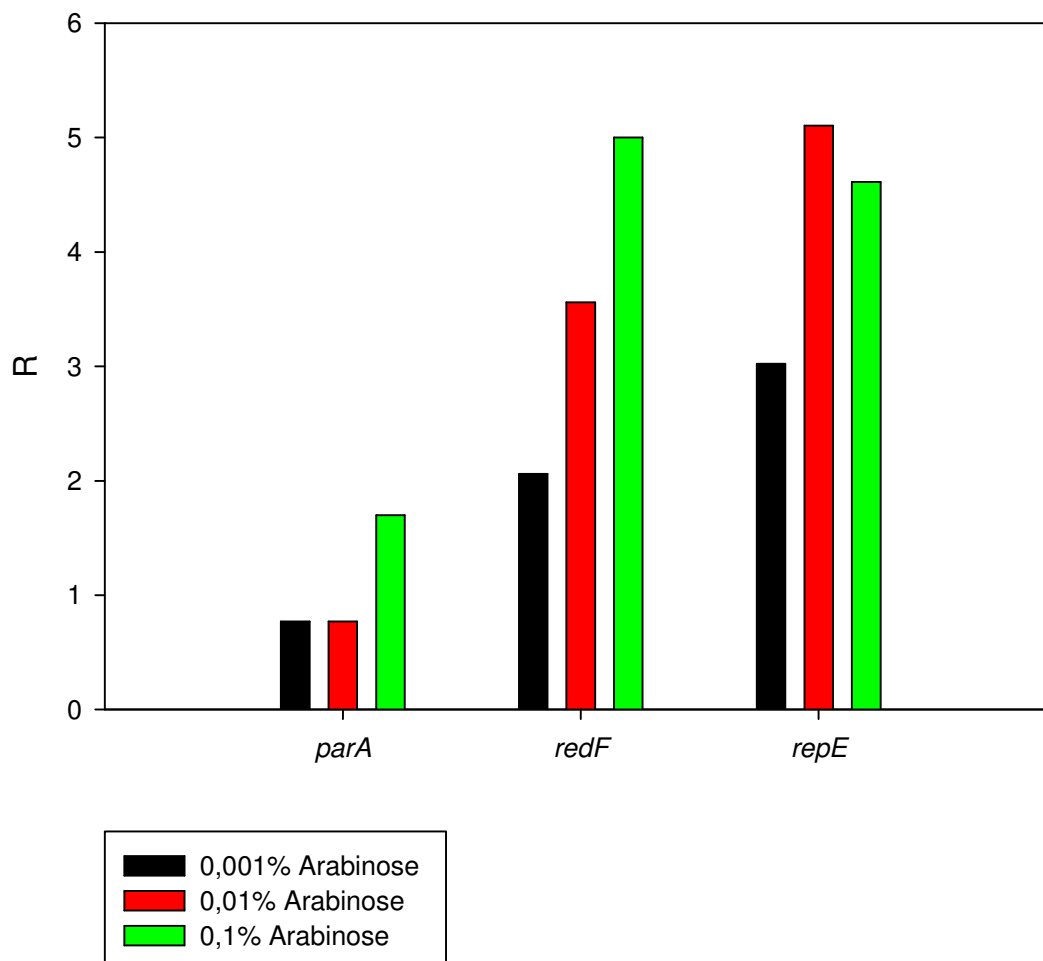
Um die Arabinose-abhängige Replikation des pCC1\_dB-Vektors zu überprüfen, wurde mittels quantitativer Real Time RT-PCR die Transkription der Plasmidgene *redF*, *repE* und *parA* (siehe Tab. 22) in Abhängigkeit von der Arabinosekonzentration untersucht. Als chromosomales Kontrollgen wurde *gapA* verwendet. Der Stamm *E. coli* TM EPI300 mit dem

Vektor pCC1\_dB wurde jeweils mit 0,001 %, 0,01 %, 0,1 % und 1 % Arabinose induziert. Nach der RNA-Isolierung, einem *DNaseI*-Verdau und einer Kontroll-PCR mit den Primern #776 und #777 wurde eine RT-PCR durchgeführt. Alle RT-Reaktionen waren aus derselben *DNaseI*-verdauten RNA Präparation hergestellt worden.

**Tab. 22:** Template für die Reaktionen war je 1  $\mu$ l cDNA

Target	Primer	Länge (bp)
<i>redF</i>	#1529/#1530	212
<i>repE</i>	#1531/#1532	279
<i>parA</i>	#1527/#1528	262
<i>gapA</i>	#858/#859	591

Alle drei untersuchten Plasmidgene zeigten eine Steigerung der Transkription (siehe Abb. 22). Bei *gapA* zeigte sich keine Veränderung der Expression durch eine Steigerung der Arabinosekonzentration.



**Abb. 22:** Arabinose-abhängige Transkription der pCC1-Vektorgene *parA*, *redF* und *repE*; R steht für die relative Genexpression (ratio) <sup>224</sup>

#### 4.3.2.3 Screening von Pharmazeutika

Auf ihr Potential als Induktor von Efflux sollten folgende Substanzen untersucht werden:

- Paracetamol
- Azetylsalizylsäure
- Ibuprofen
- Ketoprofen
- Ethanol 100 %
- Ethanol 70 %
- Diclofenac
- Phenylbutazon
- Indomethacin

Außer Azetylsalizylsäure, die in 70 % Ethanol gelöst wurde, waren alle Substanzen in 100 %igem Ethanol gelöst, so dass eine Stocklösung mit einer Konzentration von 250 mM entstand. Nach der Zugabe von gelöstem Phenylbutazon, Diclofenac oder Indomethacin zu flüssigem LB-Medium präzipitierten die Substanzen aus. Aus diesem Grund wurden sie für die Induktionsversuche nicht verwendet. Die restlichen Substanzen wurden mit einer Konzentration von 5 mM in die Induktionsversuche eingesetzt.

Die untersuchten pCC1-Vektoren befanden sich alle in dem *E. coli*-Stamm TM EPI300. Zur Isolierung von RNA wurde der Rneasy Mini Kit von QIAGEN verwendet.

Für die Herstellung der cDNA wurde spektrometrisch die Konzentration der Gesamt-RNA vermessen. Diese Art der Konzentrationsbestimmung ist mit Fehlern behaftet, so dass nicht exakt gleiche Mengen RNA in die Reverse Transkription eingesetzt werden konnten. Zusätzlich entstehen bei der Reversen Transkription nicht zuverlässig gleiche Mengen an cDNA in verschiedenen Ansätzen<sup>32</sup>. Dieser Unterschied in der Konzentration der cDNA in zwei Ansätzen lässt sich durch die parallele Bestimmung von *housekeeping*-Genen normalisieren. Analog zu diesem Konzept wurde das Gen *gapA*, das für die Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase des Kohlenhydrat-Stoffwechsels kodiert. In den vorliegenden Versuchen wurde als *housekeeping*-Gen das Plasmidgen *redF* verwendet, da das zu untersuchende *gfp*-Gen ebenfalls auf diesem Plasmid liegt und nicht chromosomal kodiert wird. Unter der Voraussetzung, dass die Menge an cDNA für diese Gene in allen Ansätzen gleich ist, lassen sich mit dem Unterschied der Werte für die *housekeeping*-Gene die Werte anderer Gene und zusätzlich die Kopienzahl des Plasmids normalisieren.

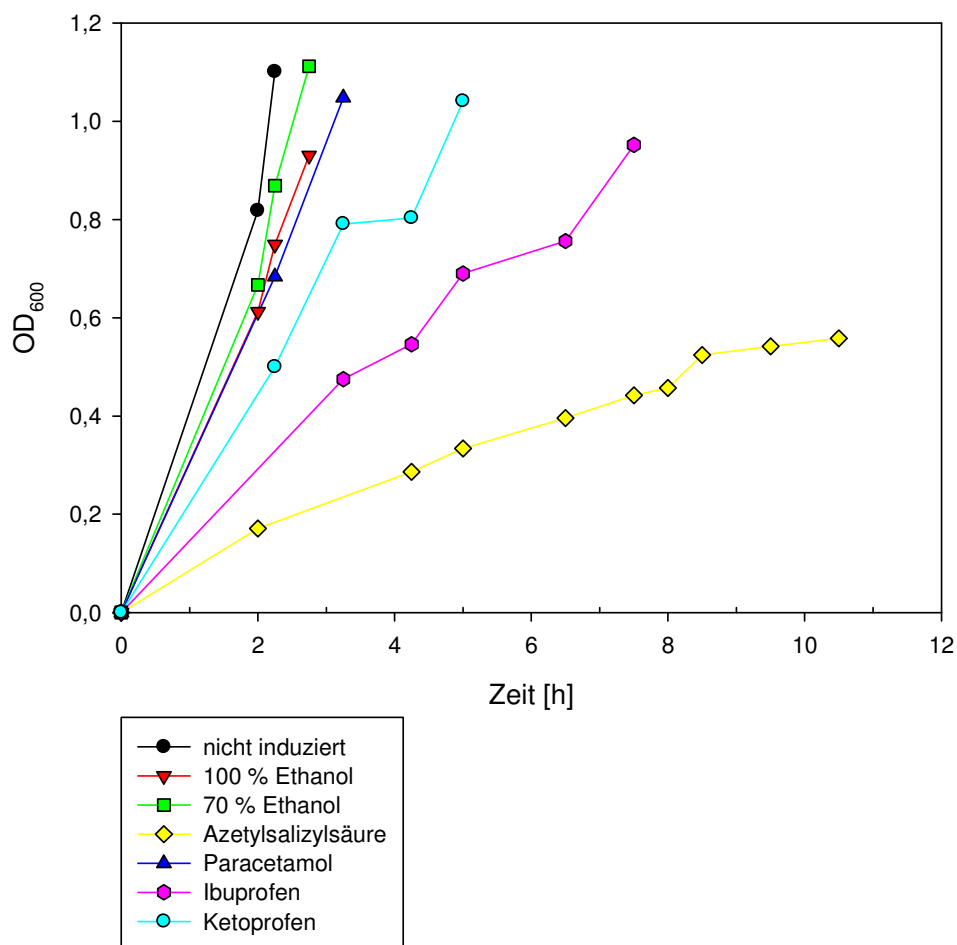
Bei jeder neuen cDNA-Präparation wurden die Werte für das *housekeeping*-Gen des Plasmids, *redF*, neu bestimmt.

#### 4.3.2.3.1 *E. coli* TM EPI300 mit pCC1-acrABPr-gfp

##### 4.3.2.3.1.1 Wachstumsverhalten von *E. coli* TM EPI300 mit pCC1-acrABPr-gfp

Bei der Untersuchung des Wachstumsverhaltens zeigte sich, dass der Keim durch die Zugabe von 5 mM Azetylsalizylsäure in seinem Wachstum stark gehemmt wird.

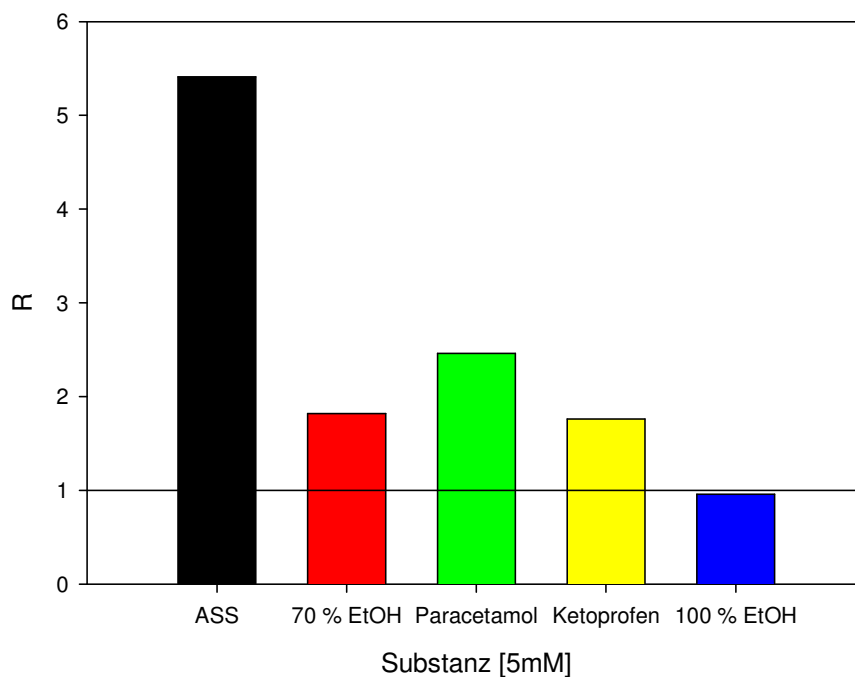
Durch die Zugabe von 70 %igem Ethanol, 100 %igem Ethanol und Paracetamol wurde das Wachstum nur geringfügig beeinträchtigt. Stärkeren Einfluss auf das Wachstum hatten Ketoprofen und Ibuprofen (siehe Abb. 23).



**Abb. 23:** Wachstumskurve von *E. coli* TM EPI300 mit pCC1-acrABPr-gfp in Abhängigkeit von der Pharmazeutikazugabe

#### 4.3.2.3.1.2 Untersuchung der *gfp*-Expression von pCC1-*acrABPr-gfp*

Die *gfp*-Expression wurde durch Azetylsalizylsäure (ASS) um das 5-fache hochreguliert. Paracetamol, das Lösungsmittel 70 %iger Ethanol und Ketoprofen bewirkten eine 2–2,5-fache Hochregulation der *gfp*-Expression. Bei 100 %igem Ethanol zeigte sich keine Wirkung (siehe Abb. 24). Bei Ibuprofen war es aus unbekanntem Gründen zu Problemen bei der RNA-Isolierung gekommen. Daher konnte das Induktionspotential von Ibuprofen nicht überprüft werden.

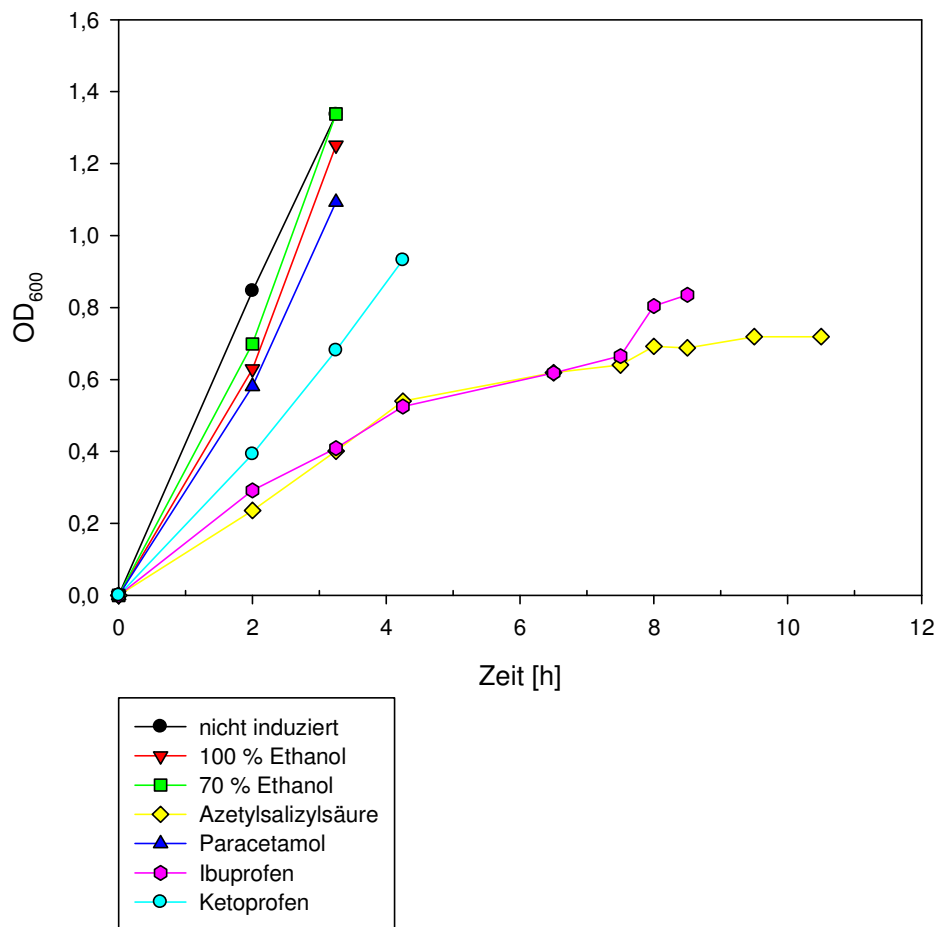


**Abb. 24:** Induktives Potential von Pharmazeutika auf die *gfp*-Expression bei pCC1-*acrABPr-gfp* in drei voneinander unabhängigen Versuchen. Bei R (ratio) handelt es sich um die relative Genexpression<sup>224</sup>.

#### 4.3.2.3.2 *E. coli* TM EPI300 mit pCC1-*acrDPr-gfp*

##### 4.3.2.3.2.1 Wachstumsverhalten von *E. coli* TM EPI300 mit pCC1-*acrDPr-gfp*

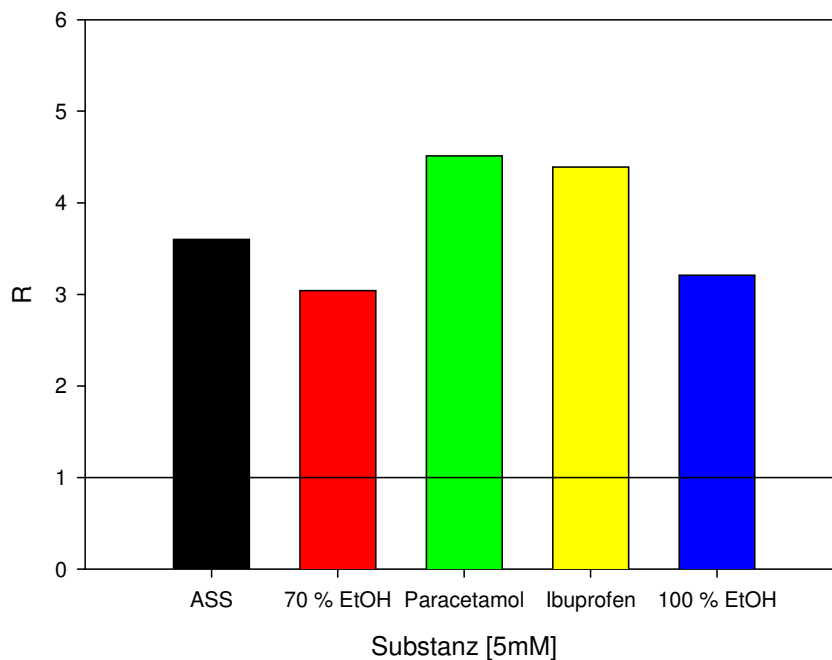
Die Untersuchung des Wachstumsverhaltens zeigte eindeutig, dass sich durch Azetylsalizylsäure (ASS) das Wachstum verschlechtert. Zwischen der nicht induzierten Probe, der Zugabe von 70 %igem Ethanol oder von 100 %igem und der Zugabe von Paracetamol bestand ein geringer Unterschied im Wachstum. Ibuprofen verminderte das Wachstum stärker als Ketoprofen (siehe Abb. 25).



**Abb. 25:** Wachstumskurve von *E. coli* TM EPI300 mit pCC1-acrDPr-gfp in Abhängigkeit von der Pharmazeutikazugabe

#### 4.3.2.3.2 Untersuchung der *gfp*-Expression von pCC1-acrDPr-gfp

Hier zeigte sich, dass Azetylsalizylsäure (ASS) 3,5-fach, Paracetamol 4,5-fach, Ibuprofen 4,5-fach, 70 %iger Ethanol 3-fach und 100 %iger Ethanol 3-fach die Transkription von *gfp* hochregulieren (siehe Abb. 26).

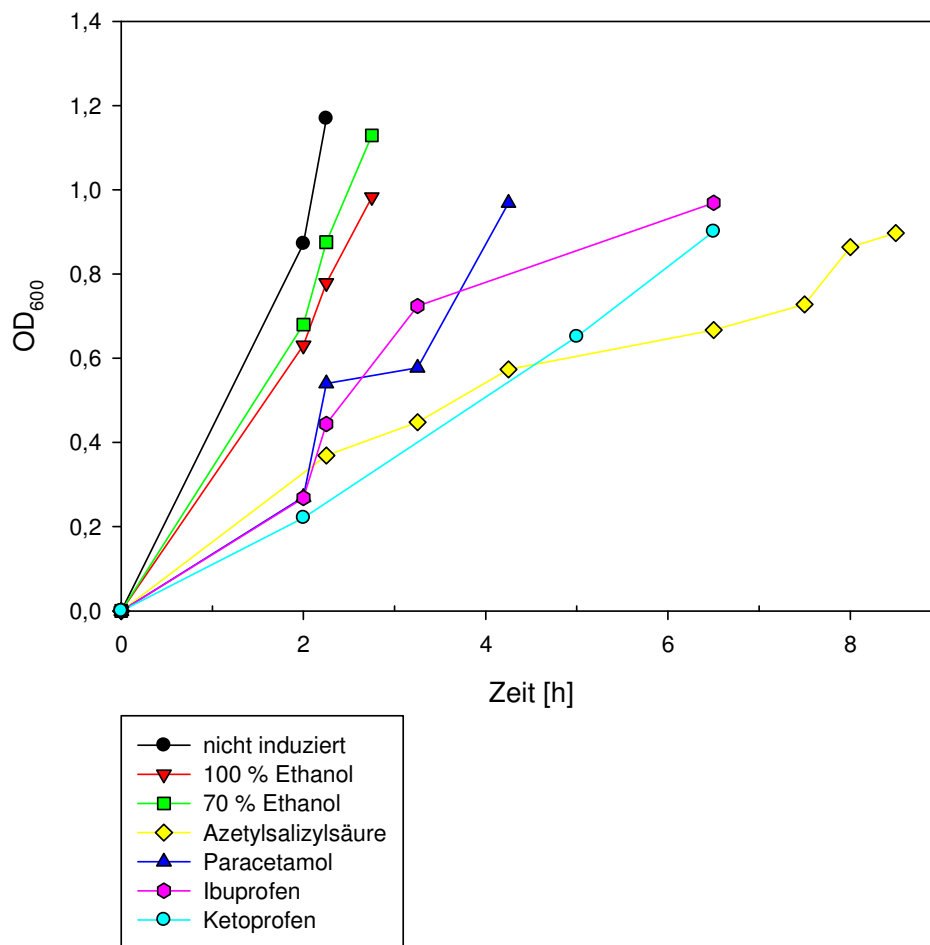


**Abb. 26:** Induktives Potential von Pharmazeutika auf die *gfp*-Expression bei pCC1-acrDPr-gfp in drei voneinander unabhängigen Versuchen. Bei R (ratio) handelt es sich um die relative Genexpression<sup>224</sup>.

#### 4.3.2.3.3 *E. coli* TM EPI300 mit pCC1-marRAPr-Tgfp

##### 4.3.2.3.3.1 Wachstumsverhalten von *E. coli* TM EPI300 mit pCC1-marRAPr-Tgfp

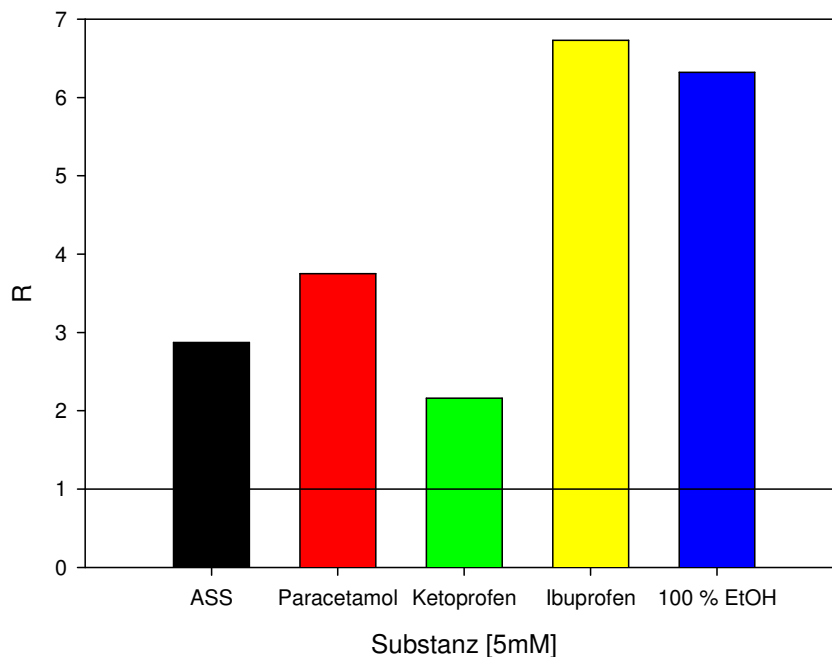
Wie bei den ersten beiden Konstrukten zeigte sich auch hier eindeutig, dass Azetylsalizylsäure für ein langsames Wachstum sorgt. Auch Ibuprofen und Ketoprofen verringerten das Wachstum merklich. Bei der nicht induzierten Probe, der mit 70 %igem Ethanol als Zusatz, der mit 100 %igem Ethanol als Zusatz und bei Paracetamol zeigten sich nur geringfügige Unterschiede im Wachstumsverhalten (siehe Abb. 27).



**Abb. 27:** Wachstumskurve von *E. coli* TM EPI300 mit pCC1-marRPr-Tgfp in Abhängigkeit von der Pharmazeutikazugabe

#### 4.3.2.3.3.2 Untersuchung der *gfp*-Expression von pCC1-marRPr-Tgfp

Hier zeigte sich bei allen getesteten Substanzen eine eindeutige Induktion der *gfp*-Expression. ASS reguliert die Expression von *gfp* 3-fach hoch. Bei Paracetamol zeigte sich eine 3,5-fache Hochregulation. Bei Ketoprofen war eine 2-fache, bei Ibuprofen und 100 %igem Alkohol eine fast 7-fache Hochregulation der *gfp*-Expression zu beobachten (siehe Abb. 28).

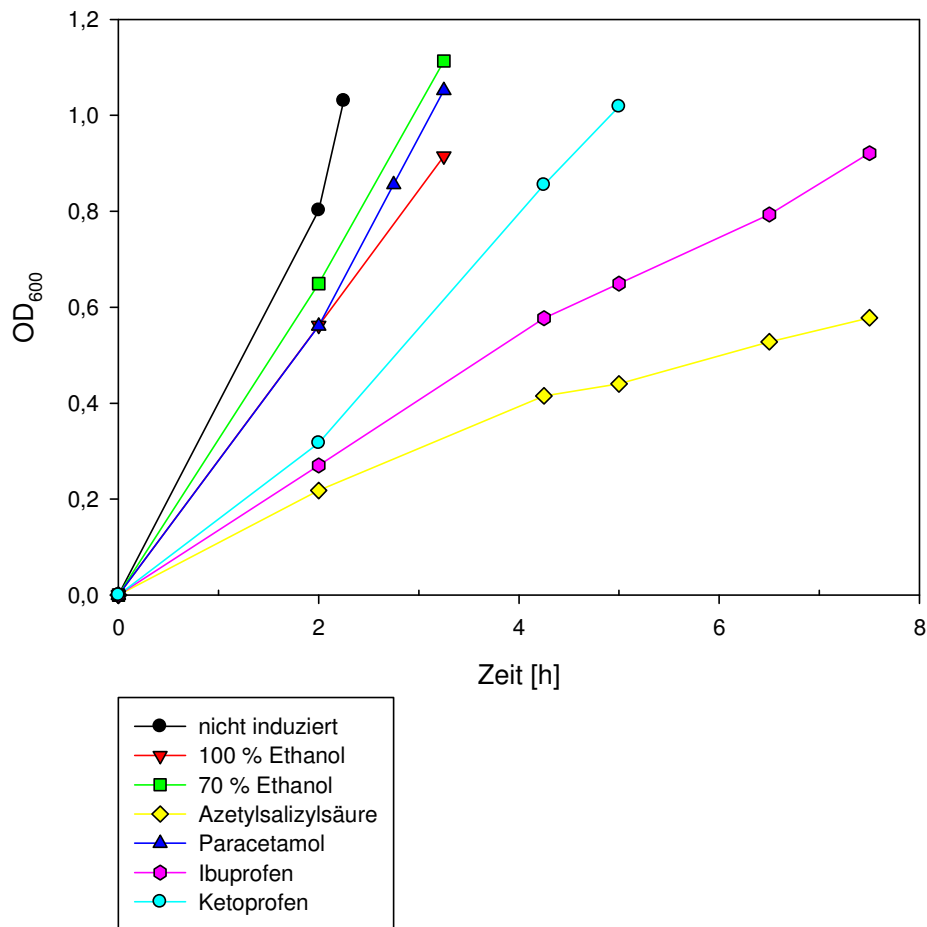


**Abb. 28:** Induktives Potential von Pharmazeutika auf die *gfp*-Expression bei pCC1-marRPr-Tgfp in drei voneinander unabhängigen Versuchen. R ist die relative Genexpression (ratio)<sup>224</sup>.

#### 4.3.2.3.4 *E. coli* TM EPI300 mit pCC1-robPr-Tgfp

##### 4.3.2.3.4.1 Wachstumsverhalten von *E. coli* TM EPI300 mit pCC1-robPr-gfp

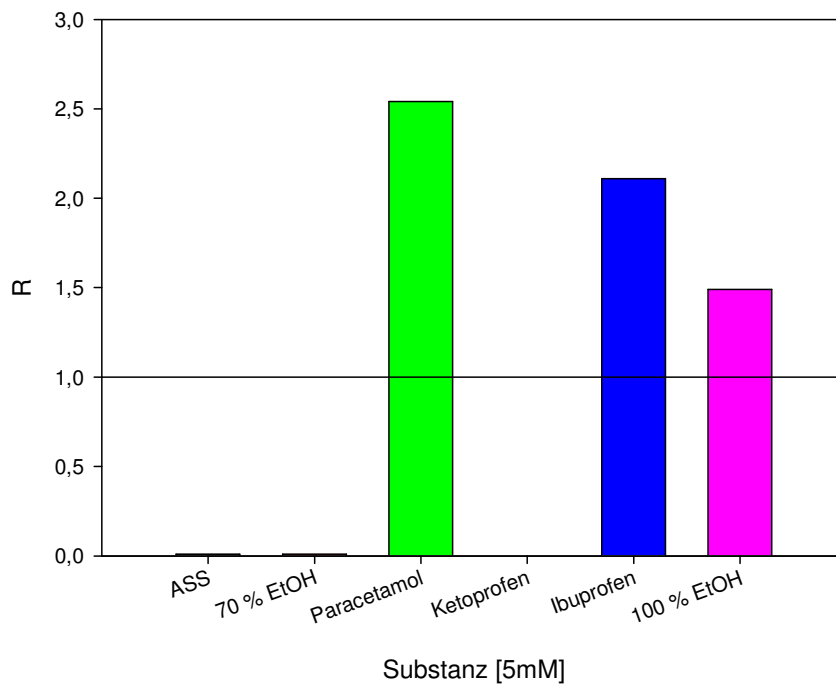
Auch hier konnte eindeutig gezeigt werden, dass die Zugabe von Azetylsalicylsäure das Wachstum hemmt. Neben Ketoprofen sorgte auch Ibuprofen für eine Verringerung der Wachstumsgeschwindigkeit. Die restlichen Proben (100 %iger Ethanol, 70 %iger Ethanol, Paracetamol) zeigten nur einen kleinen Unterschied im Wachstumsverhalten (siehe Abb. 29).



**Abb. 29:** Wachstumskurve von *E. coli* TM EPI300 mit pCC1-robPr-Tgfp in Abhängigkeit von der Pharmazeutikazugabe

#### 4.3.2.3.4.2 Auswirkungen auf die *gfp*-Expression von pCC1-robPr-Tgfp

Bei diesem Experiment gab es Probleme bei der Effizienzbestimmung für das Primerpaar #801 und #802. Aus unbekanntem Gründen schwankte die Effizienz zwischen 1,85 und 82,67. Dieses Problem konnte nicht durch eine Veränderung der Magnesiumchloridkonzentration behoben werden. Da es allerdings laut der Firma Roche (Technischer Support) nicht notwendig ist, für alle Proben die Effizienz der Primer #801 und #802 zu bestimmen, deren RNA-Isolierung und RT-PCR in einem Experiment gemacht wurde, wurde als Effizienz 1,85 verwendet. Es zeigte sich, dass es sowohl bei Zugabe von Azetylsalizylsäure (ASS) als auch bei der Zugabe von 70%igem Ethanol oder von Ketoprofen zu einer einfachen Abnahme der Genexpression kommt. Bei Paracetamol, Ibuprofen und 100%igem Ethanol kam es zu einer 1–2,5-fachen Zunahme der *gfp*-Transkription (siehe Abb. 30).



**Abb. 30:** Induktives Potential von Pharmazeutika auf die *gfp*-Expression bei pCC1-robPr-Tgfp in drei voneinander unabhängigen Versuchen. Bei R (ratio) handelt es sich um die relative Genexpression<sup>224</sup>.

#### 4.3.2.4 Überprüfung auf Veränderung der Minimalen Hemmkonzentration (MHK) bei Substanzzusatz

Bei diesem Versuch wurden LB-Platten die jeweilige Substanz in einer Konzentration von 5 mM zugesetzt und ein Etest® durchgeführt. Hier kam es zu folgenden Ergebnissen:

Es wurden die Reportergeren-Stämme *E. coli* DH10B mit pUC-acrDPr-*gfp* und *E. coli* TOP 10 mit pUC-acrABPr-*gfp* willkürlich ausgewählt. Alle Werte wurden doppelt bestimmt. Zur Austestung der Substanzwirkung auf die Ampicillin-Resistenz wurde das Wildtyp-Isolat aus der Ratte *E. coli*-4 verwendet. Bei Zugabe von Azetylsalizylsäure gab es bei den *E. coli*-Stämmen DH10B und TOP10 kein Wachstum auf der Platte. Daher konnte auch keine MHK-Bestimmung durchgeführt werden. Bei dem Wildtyp-Isolat *E. coli*-4 zeigte sich Wachstum auf der Azetylsalizylsäure-haltigen Agarplatte.

**Tab. 23:** MHK-Werte (mg/l) für Gentamicin und Norfloxacin des Stammes *E. coli* DH10B mit pUC-acrDPr-gfp. Beide Werte der MHK-Bestimmung sind angegeben. „n.i.“ bedeutet nicht induziert.

Antibiotikum	MHK (mg/l)				
	n.i.	Paracetamol	Ibuprofen	100 % Ethanol	70 % Ethanol
Gentamicin	0,38	0,75	1,5	0,75	0,75
Gentamicin	0,38	0,75	1,5	0,75	0,75
Norfloxacin	0,023	0,064	0,094	0,023	0,023
Norfloxacin	0,023	0,064	0,094	0,023	0,023

Diese Werte zeigten, dass es bei der Zugabe von Ibuprofen zu einer MHK-Steigerung gegenüber Gentamicin und Norfloxacin von vier bis fünf Titerstufen kam. Bei Paracetamol und Ethanol wurde gegenüber Gentamicin eine Steigerung von bis zu zwei Titerstufen gezeigt. Die Zugabe von 100%igem oder 70%igem Ethanol führte zu keiner Veränderung der MHK gegenüber der nicht-induzierten Probe.

**Tab. 24:** MHK-Werte (mg/l) für Gentamicin und Norfloxacin des Stammes *E. coli* TOP10 mit pUC-acrABPr-gfp. Beide Werte der MHK-Bestimmung sind angegeben. „n.i.“ bedeutet nicht induziert.

Antibiotikum	MHK (mg/l)				
	n.i.	Paracetamol	Ibuprofen	100 % Ethanol	70 % Ethanol
Gentamicin	0,5	0,75	1,5	0,75	0,75
Gentamicin	0,5	0,75	1,5	0,75	0,75
Norfloxacin	0,023	0,064	0,094	0,032	0,032
Norfloxacin	0,023	0,064	0,094	0,032	0,032

Auch hier konnte gezeigt werden, dass die MHK bei der Zugabe von Ibuprofen gegenüber Gentamicin um drei Titerstufen ansteigt. Gegenüber Norfloxacin verursachte die Zugabe von Ibuprofen einen Anstieg der MHK um ein vierfaches. Bei Paracetamol, 100%igem und 70%igem Ethanol kam es zu einer Steigerung der MHK um 1–2 Titerstufe.

**Tab. 25:** MHK-Werte (mg/l) für Ampicillin des Stammes *E. coli*-4. Beide Werte der MHK-Bestimmung sind angegeben. „n.i.“ bedeutet nicht induziert.

Antibiotikum	MHK (mg/l)				
	n.i.	Paracetamol	Ibuprofen	100 % Ethanol	70 % Ethanol
Ampicillin	4	4	6	4	6
Ampicillin	4	4	6	4	6

Auf die Ampicillin-MHK hatten Azetylsalizylsäure und Ibuprofen keine Wirkung. Bei Paracetamol, 100 % EtOH und 70 % EtOH kam es zu einer Steigerung der MHK um eine Titerstufe.

#### 4.4 Untersuchung der Auswirkung von Salizylat auf Virulenz/Adhärenz der uropathogenen *E. coli*-Stämme 1173 und 1267

Die *E. coli*-Stämme 1173 und 1267 sind *E. coli*-Isolate aus dem Urin einer Patientin, die zusätzlich zur Chemotherapie zweimal täglich 750 mg Ciprofloxacin erhalten hatte um eine Darmdekontaminierung durchzuführen. Der Stamm 1173 wurde zuerst isoliert.

##### 4.4.1 Phänotypische Charakterisierung der *E. coli*-Isolate 1173 und 1267

###### 4.4.1.1 Resistenzbestimmung mittels Etest®

Gegenüber allen getesteten Fluorchinolonen zeigte der Stamm 1267 im Vergleich zum Kontrollstamm *E. coli* ATCC 25922 eine starke Erhöhung der MHK. Auch gegenüber dem Isolat 1173 war sie um ein vielfaches höher (siehe Tab. 26).

**Tab. 26:** MHK-Bestimmung der *E. coli*-Stämme 1173 und 1267 im Vergleich mit dem Kontrollstamm *E. coli* ATCC 25922

Antibiotikum	Minimale Hemmkonzentration MHK (mg/l)		
	ATCC 25922	1173	1267
Nalidixinsäure	2	>256	>256
Chloramphenicol	2	2	16
Doxycyclin	2	6	32
Rifampicin	4	4	8
Imipenem	0,125	0,125	0,125
Ciprofloxacin	0,012	3	>32
Norfloxacin	0,047	8	>256
Ofloxacin	0,064	8	>32
Moxifloxacin	0,032	6	>32
Gatifloxacin	0,012	2	>32
Levofloxacin	0,064	4	>32
Clinafloxacin	0,008	1	4

###### 4.4.1.2 OST

OST ist bei *E. coli* meist vermittelt durch Überexpression des Effluxsystemes AcrAB-TolC. Auch das System AcrEF-TolC kann an der Ausbildung der *organic solvent tolerance* beteiligt sein <sup>11</sup>.

In Gegenwart von Cyclohexan zeigte der Stamm 1267 vergleichsweise stärkeres Wachstum. Unter diesen Bedingungen zeigte der Stamm 1173 sehr langsames Wachstum. Der

Durchmesser der entstandenen Kolonien bei Stamm 1267 war dreimal größer als der Durchmesser der Kolonien von Stamm 1173. Der Referenzstamm *E. coli* ATCC 25922 zeigte kein Wachstum unter diesen Bedingungen.

**Tab. 27:** Wachstum der klinischen Isolate *E. coli* 1173 und 1267 und des Referenzstammes *E. coli* ATCC 25922 in Gegenwart von Lösungsmitteln. „+“ entspricht gutem Wachstum, „+/-“ schlechtem Wachstum und „-“ keinem Wachstum

Lösungsmittel	Wachstum		
	ATCC 25922	1173	1267
n-Dekan	+	+	+
n-Nonan	+	+	+
n-Oktan	+	+	+
Hexan	+	+	+
Cyclohexan	—	+/-	+

#### 4.4.2 Genotypische Charakterisierung der *E. coli*-Isolate 1173 und 1267

Im Bandenmuster der PFGE nach *Xba*I-Verdau zeigte sich kein Unterschied zwischen den beiden Stämmen. Bei der vergleichenden Analyse der Sequenzen der Gene *gyrA/B* und *parC/E* der Isolate zu der *E. coli* K12-Sequenz (*Gene Bank* #U00096) zeigten sowohl der Stamm 1173 als auch 1267 identische Aminosäureaustausche in *GyrA* (S83L und D87Y) und in *ParC* (S80I). In den Sequenzen von *acrRAB* von beiden klinischen Isolaten befanden sich keine genomischen Veränderungen wie Insertion, Deletion oder Kettenabbruch durch Mutation eines Sinncodons in ein Stopcodon. Auf der ganzen Länge von ca. 5 kb für *acrRAB* befanden sich 4 Basenaustausche im Stamm 1173 gegenüber der Sequenz von *E. coli* K12 (#U00096), dagegen 49 Mutationen im Stamm 1267. Die 4 Basensubstitutionen des Stamms 1173 befinden sich nicht an den gleichen Positionen wie die Mutationen des Stamms 1267. Die Mehrzahl der Basenaustausche innerhalb der Gene führen lediglich zu konservativen Aminosäure-Austauschen. Des Weiteren wurde eine Deletion von 18 AS im C-terminalen Bereich von *MarR* im Stamm 1267 mittels Sequenzierung nachgewiesen.

In *acrF* zeigten beide Stämme identische Basenaustausche im Vergleich zu *E. coli* K12 (#U00096). Beide Stämme unterschieden sich voneinander nur in einer einzigen Substitution, die der Stamm 1267 gegenüber der *E. coli* K12-Sequenz (#U00096) besitzt. Anstelle eines Cytosins an Position 3.046 im Gen *acrF* der Stämme 1173 und K12 besitzt der Stamm 1267 ein Thymin.

Im Gen *acrS* besaßen die beiden Stämme 3 identische Mutationen gegenüber der Sequenz von *E. coli* K12 (#U00096), im Gen *acrE* 11. Keine dieser in beiden Stämmen identischen Mutationen führte zu einem Aminosäureaustausch im Protein. Im putativen Promotorbereich

zwischen *acrEF* und *acrS* (398 bp) befanden sich mit 14 (Stamm 1173) bzw. 23 (Stamm 1267) Basensubstitutionen gegenüber der Sequenz von *E. coli*-K12 (U#00096; von 3.411.488 bp bis 3.411.885 bp) viele Mutationen. In diesem Bereich stimmten die beiden klinischen Isolate in vier identischen Mutationen überein <sup>284</sup>.

#### 4.4.2.1 Gentranskription bei *E. coli* 1173 und *E. coli* 1267 im Vergleich

##### 4.4.2.1.1 Untersuchung von Effluxgenen und deren Regulatoren

Mittels gezielter Quantifizierung der Transkription in einer LightCycler®-RT-PCR wurde eine Gruppe von Genen untersucht, die für Effluxpumpen kodieren. Neben den Strukturgenen *acrAB*, *acrE*, *acrF*, *acrD*, *mdfA*, *norE*, *mdtC*, *mdtH*, *mdtM* und *emrB* wurden auch die Regulatorgene *acrR*, *acrS*, *sdiA*, *baeR*, *evgA*, *rob* und *soxS* untersucht. In diese Untersuchung wurden auch die Poringene *ompF* und *tolC* mit einbezogen, da AcrAB und AcrEF zusammen mit TolC ein funktionelles Effluxsystem bilden und eine Reduktion von OmpF zum Resistenzphänotyp beitragen kann <sup>17,85</sup>. Die Ergebnisse der LightCycler®-RT-PCR zeigten, dass die beiden Gene *acrF* und *marA* signifikant häufiger in Stamm 1267 transkribiert werden als im Stamm 1173. Die Erhöhung von MarA in der Zelle reprimiert die Transkription von *ompF* um den Faktor 65 im Stamm 1267 in Vergleich zu Stamm 1173 <sup>17,88</sup>. Außer bei *ompF* ließ sich keine signifikante Erniedrigung der Transkription eines der getesteten Gene feststellen. Bei den Genen *acrR*, *mdtC*, *soxS* und *tolC* liegt die Transkriptionsänderung im Bereich der Auflösungsgrenze des LightCycler®.

Hinweise auf eine erhöhte Transkription von *acrAB* im Stamm 1267 lieferte ein Northern Blot <sup>166</sup>. Im Gegensatz zu den Daten des Northern Blots <sup>166</sup> war keine Erhöhung der Transkription von *acrAB* zu beobachten. Eine leichte Erhöhung der Transkription ergibt sich auch für die Regulatoren *acrS* und *sdiA*. Der vom Gen *sdiA* kodierte Regulator aktiviert sowohl *acrEF* als auch *acrAB* <sup>284,302</sup>.

##### 4.4.2.1.2 Microarray

Bei der anschließenden Untersuchung des Transkriptom per Microarray stimmten die Ergebnisse der Gene *acrD*, *acrR*, *marA*, *ompD* und *soxS* mit den LightCycler®-Ergebnissen überein. Bei den Genen *acrS*, *emrB*, *evgA*, *rob* und *tolC*, deren gesteigerte bzw. verringerte Transkription nahe an der Auflösungsgrenze des LightCycler® liegen, ergaben sich Widersprüche zu den Ergebnissen des Microarray. Der Microarray ergab eine verringerte Expression von *rob* und *evgA*, die in der Größenordnung des Wertes von *ompF* liegt. Dagegen ist für *ompF* laut LightCycler® die Verringerung der Transkription mit dem Faktor 65 ein Vielfaches stärker ausgeprägt als für die Regulatoren *acrR*, *acrS*, *sdiA*, *baeR*, *evgA*,

*rob* und *soxS*. Bei *acrA* und *acrB* zeigte sich im Microarray eine gesteigerte Expression um den Faktor 3,7 bzw. 2,5.

Der *Microarray* ergab keinen Hinweis auf eine Beteiligung anderer Faktoren und Gene an der Ausbildung des Resistenzphänotyps. Alle weiteren Gene und ORF, für die der *Microarray* Änderungen der Transkription von  $I > 3$  bzw.  $D < -3$  ergeben hatte (s. Anhang), stehen vermutlich nicht in unmittelbarem Zusammenhang mit der Ausbildung von Antibiotikaresistenz (außer *emrAB*, *mdaA*, *ybjC* und *nfnB*). Abgesehen von *mdaA*, *ybjC* und *nfnB* sind diese Gene bislang nicht als Mitglieder der Regulons von MarA oder SdiA identifiziert worden<sup>17,302</sup>.

Bei den Genen *fliA* und *motA* zeigte sich eine verringerte Expression in *E. coli* 1267. Keine Änderung der Transkription war bei *sfa*, *hlyE* und *flhDC* zu beobachten<sup>284</sup>.

#### 4.4.2.1.3 Untersuchung der Expression von Genen in Abhängigkeit von der Salizylatkonzentration

Von dem Stamm 1173 wurden Gene ausgewählt, deren Expression sich eventuell in Abhängigkeit von der Salizylatkonzentration verändert<sup>47,129,148,149,231</sup>. Hierfür wurde der *E. coli*-Stamm 1173 mit 5 mM, 10 mM und 20 mM induziert. Nach der RNA-Isolierung und der Umschreibung in cDNA wurde die Expression per LightCycler®RT-PCR überprüft.

Als Referenzgen wurde hier bei allen Teilversuchen das *housekeeping*-Gen *gapA* verwendet, welches für die Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) kodiert. Mit den Primern #858 und #859 wurde innerhalb des *gapA*-Gens ein Fragment mit der Größe von 591 bp amplifiziert. Bei den unterschiedlichen Teilversuchen entstanden folgende Effizienzen:

**Tab. 28:** Effizienzen der RT-PCR-Reaktionen von *gapA* aus drei unabhängigen Versuchen

Probe	Effizienz 1	Effizienz 2	Effizienz 3
1173 nicht induziert	1,99	1,87	2,00
1173 5 mM Salizylat	1,92	2,02	2,00
1173 10 mM Salizylat	2,14	2,09	1,93
1173 20 mM Salizylat	1,87	1,90	1,93

Diese Effizienzen wurden jeweils in die Formel zur Berechnung der ratio<sup>224</sup> von *acrB*, *hlyE*, *sfaD/E* und *motB* (siehe Materialien und Methoden 3.2.1.2.5.4) eingesetzt.

##### 4.4.2.1.3.1 Untersuchung der *acrB*-Expression

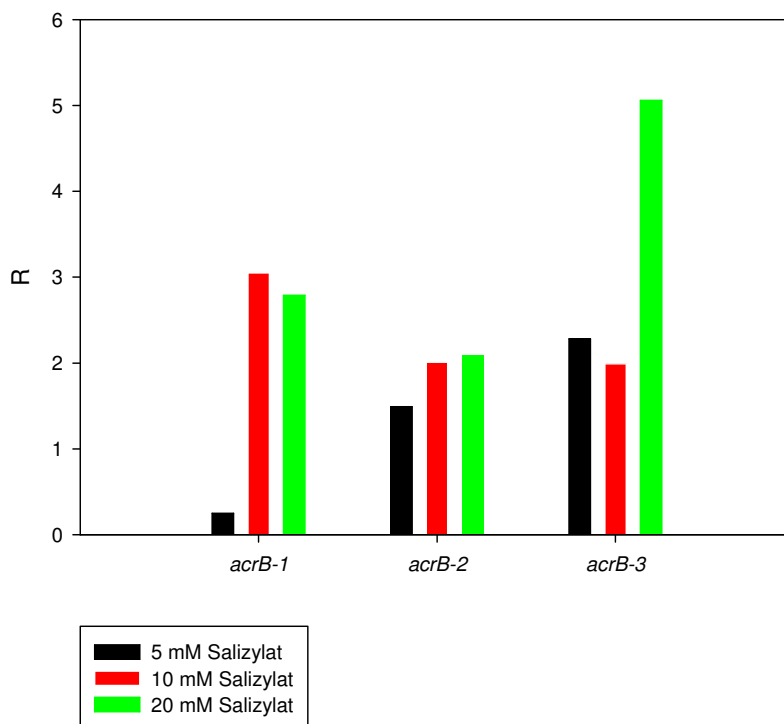
Der Komplex aus AcrAB-TolC bildet bei *E. coli* die wichtigste Effluxpumpe zum Export von Fluorchinolonen. In der Literatur ist bereits beschrieben, dass die Genexpression von *acrAB* durch die Zugabe von Salizylat hochreguliert wird<sup>47,177</sup>. Im *E. coli*-K12-Genom (#U00096)

befindet sich das Gen *acrB* im Bereich von 480.478 bp bis 483.627 bp. Aus diesem Bereich wurde in der RT-PCR ein 429 bp großes Fragment mit den Primern #226 und #861 amplifiziert. Bei der Effizienzbestimmung zeigten sich folgende Werte:

**Tab. 29:** Effizienzen der RT-PCR von *acrB* aus drei unabhängigen Versuchen

Probe	Effizienz 1	Effizienz 2	Effizienz 3
1173 nicht induziert	2,03	2,13	1,95
1173 5 mM Salizylat	2,1	2,11	2,21
1173 10 mM Salizylat	2,09	1,95	2,25
1173 20 mM Salizylat	2,19	2,13	2,12

Bei der Berechnung des Expressionsunterschiedes von *acrB* zeigte sich ein bis zu 5-facher Anstieg der Expression (siehe Abb. 31).



**Abb. 31:** Expressionsanstieg von *acrB* in Abhängigkeit von der Salizylatkonzentration bei drei unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen. Bei R (ratio) handelt es sich um die relative Genexpression<sup>224</sup>. „*acrB*-1“ bedeutet erster Versuch, „*acrB*-2“ bedeutet zweiter Versuch und „*acrB*-3“ bedeutet dritter Versuch.

#### 4.4.2.1.3.2 Untersuchung der *motB*-Expression

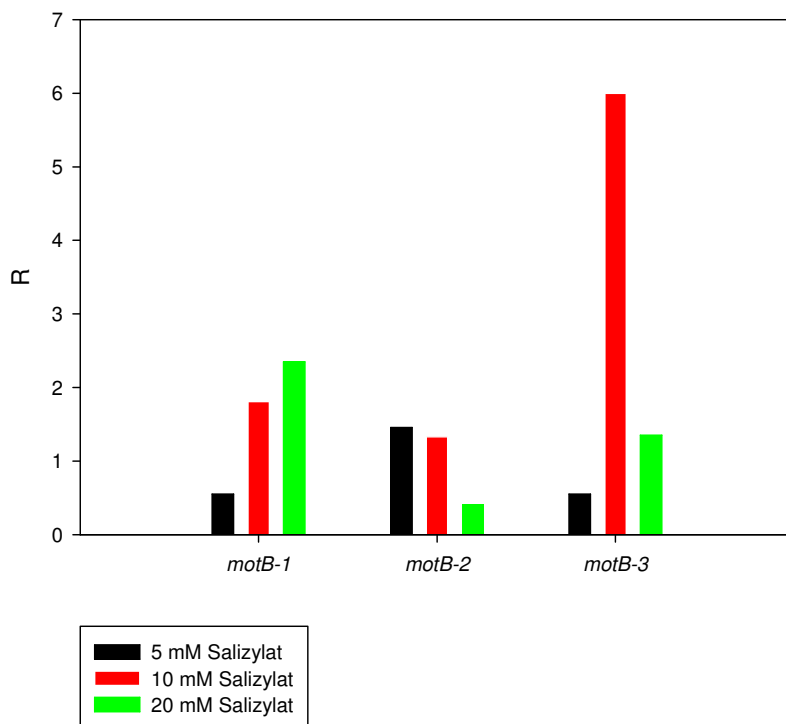
MotB bildet zusammen mit MotA den so genannten Ständer des Flagellenmotors. Dieser Komplex aus MotAMotB koppelt den Protonenfluss durch die Membran an die Rotorbewegung. Das Gen *motB* entspricht im *E. coli* K12-Genom (#U00096) dem Bereich

1.973.353 bp bis 1.974.279 bp. In der RT-PCR wurde ein 362 bp großes Fragment innerhalb des *motB*-Gens mit den Primern #1560 und #1561 amplifiziert. Es wurden folgende Effizienzen bestimmt:

**Tab. 30:** Effizienzen der RT-PCR von *motB* aus drei unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen

Probe	Effizienz 1	Effizienz 2	Effizienz 3
1173 nicht induziert	2,04	2,28	2,08
1173 5 mM Salizylat	3,08	2,33	2,61
1173 10 mM Salizylat	2,11	2,43	3,03
1173 20 mM Salizylat	2,29	2,37	2,18

Bei der Berechnung der Ratio (Expressionsunterschied) ergab sich kein Zusammenhang zwischen der Expression von MotB und der Salizylatkonzentration (siehe Abb. 32).



**Abb. 32:** graphische Darstellung des Expressionsanstiegs von *motB* in Abhängigkeit von der Salizylatkonzentration bei drei unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen. Bei R (ratio) handelt es sich um die relative Genexpression<sup>224</sup>. „*motB*-1“ bedeutet erster Versuch, „*motB*-2“ bedeutet zweiter Versuch und „*motB*-3“ bedeutet dritter Versuch.

#### 4.4.2.1.3.3 Untersuchung der *hlyE*-Expression

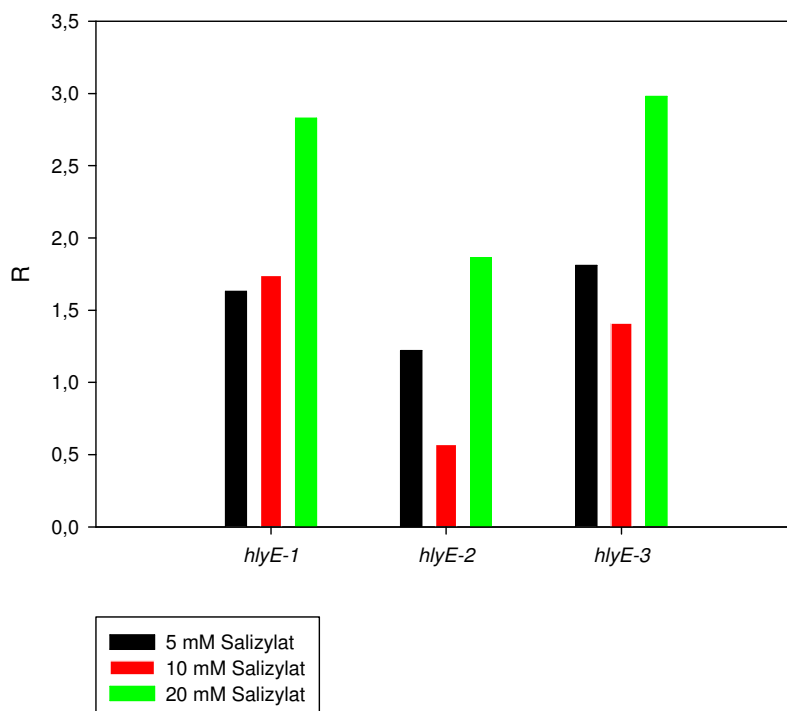
Das *hlyE*-Gen kodiert für ein latentes Hämolyisin. Im *E. coli* K12-Genom (#U00096) befindet es sich im Bereich 1.228.706 bp bis 1.229.617 bp. In der Real-Time-PCR wurde ein 209 bp

großes Fragment innerhalb des *hlyE*-Gens mit den Primern #1558 und #1559 amplifiziert. Bei der Effizienzbestimmung ergaben sich folgende Werte:

**Tab. 31:** Effizienzen der RT-PCR von *hlyE* aus drei unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen

Probe	Effizienz 1	Effizienz 2	Effizienz 3
1173 nicht induziert	1,90	2,16	2,04
1173 5mM Salizylat	2,02	1,91	2,09
1173 10mM Salizylat	1,70	1,89	1,96
1173 20mM Salizylat	1,91	1,85	1,95

Die Zugabe von Salizylat verursachte eine bis zu 3-fache Zunahme der Expression von *hlyE*. Durch Zugabe von unterschiedlichen Salizylatkonzentrationen zeigte sich hier weder eine Zu- noch eine Abnahme der Expression in Abhängigkeit von steigender Salizylatkonzentration (siehe Abb. 33).



**Abb. 33:** Expressionsanstiegs von *hlyE* in Abhängigkeit von der Salizylatkonzentration bei drei unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen. Bei R (ratio) handelt es sich um die relative Genexpression<sup>224</sup>. „*hlyE*-1“ bedeutet erster Versuch, „*hlyE*-2“ bedeutet zweiter Versuch und „*hlyE*-3“ bedeutet dritter Versuch

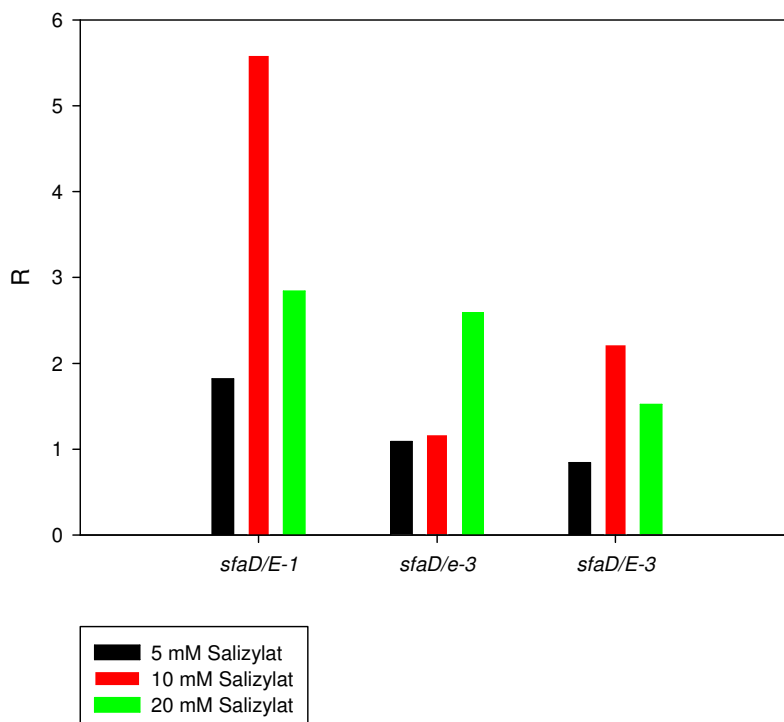
#### 4.4.2.1.3.4 Untersuchung der *sfaD/E*-Expression

Die Gene *sfaD* und *sfaE* gehören zu dem so genannten S-Fimbriengencluster, das sich im *E. coli* UTI89-Genom (#CP000243) im Bereich von 1.099.958 bp bis 1.101.242 bp befindet. In der Real-Time-PCR wurde ein 332 bp großes Fragment innerhalb der beiden Gene mit den Primern #1556 und #1557 amplifiziert. Bei der Effizienzbestimmung ergaben sich folgende Werte:

**Tab. 32:** Effizienzen der RT-PCR von *sfaD/E* aus drei unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen

Probe	Effizienz 1	Effizienz 2	Effizienz 3
1173 nicht induziert	1,92	2,14	2,05
1173 5 mM Salizylat	2,4	2,09	2,08
1173 10 mM Salizylat	1,85	1,99	1,90
1173 20 mM Salizylat	2,14	2,34	1,95

Es zeigte sich ein Anstieg der Expression bei Salizylatzugabe. Es war aber kein Gen-Dosis-Effekt zu erkennen, d.h. es zeigte sich kein Anstieg oder Abfall in Abhängigkeit von steigender Salizylatkonzentration (siehe Abb. 34).



**Abb. 34:** graphische Darstellung des Expressionsanstiegs von *sfaD/E* in Abhängigkeit von der Salizylatkonzentration bei drei unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen. Bei R (ratio) handelt es sich um die relative Genexpression<sup>224</sup>. „*sfaD/E*-1“ bedeutet erster Versuch, „*sfaD/E*-2“ bedeutet zweiter Versuch und „*sfaD/E*-3“ bedeutet dritter Versuch.

#### 4.4.2.1.3.5 Untersuchung der *marA*-Expression

MarA erscheint in der Regulation von *acrRAB* als bedeutendster Induktor für das *acrRAB*-Operon. In Wildtyp-Zellen wird MarA konstitutiv auf geringem Niveau exprimiert<sup>208</sup>. Bei Erhöhung des MarA-Spiegels in der Zelle z. B. aufgrund von Induktion durch Salizylat (Bindung an MarR führt zu einer Konformationsänderung des Repressors), wird die Transkription von *acrAB* und gleichzeitig seines Repressors *acrR* verstärkt<sup>184</sup>. Bei *E. coli* K12 (#U00096) befindet sich das Gen *marA* im Bereich von 1.617.598 bp bis 1.617.981 bp. Innerhalb dieses Bereiches wurde ein 359 bp großes Genfragment mit den Primern #862 und # 863 amplifiziert. Hierfür wurde erneut RNA in cDNA umgeschrieben. Daher mussten nicht nur die Effizienzen für *marA* bestimmt werden, sondern auch für das *housekeeping*-Gen *gapA*. Bei der Effizienzbestimmung zeigten sich folgende Werte für *gapA*.

**Tab. 33:** Effizienzen der RT-PCR von *gapA* aus drei unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen

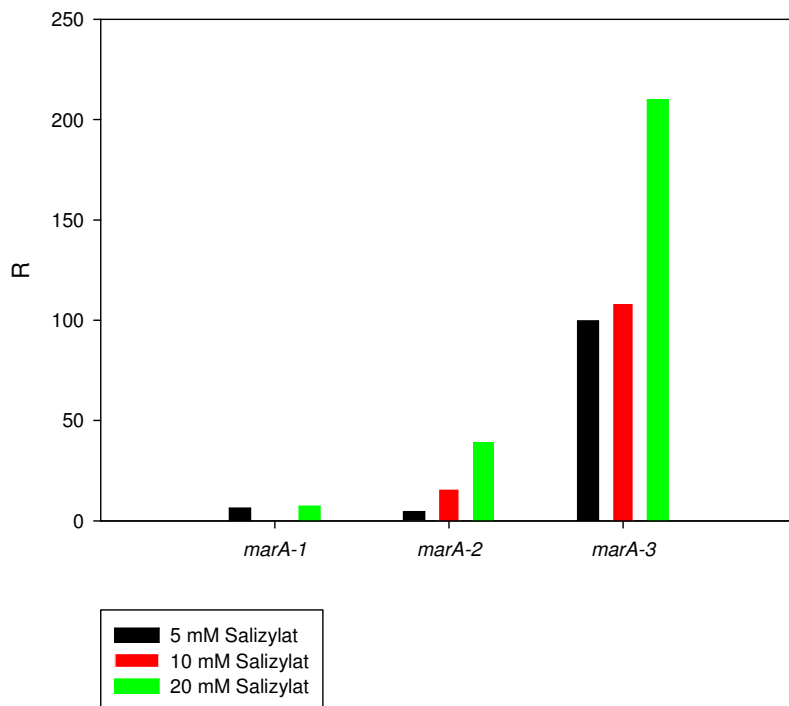
Probe	Effizienz 1	Effizienz 2	Effizienz 3
1173 nicht induziert	2,00	1,82	2,00
1173 5 mM Salizylat	2,14	2,09	1,93
1173 10 mM Salizylat	2,18	1,91	1,94
1173 20 mM Salizylat	2,02	1,83	2,20

Für *marA* ergaben sich folgende Werte für die Effizienzen

**Tab. 34:** Effizienzen der RT-PCR von *marA* aus drei unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen

Probe	Effizienz 1	Effizienz 2	Effizienz 3
1173 nicht induziert	2,13	2,29	2,34
1173 5mM Salizylat	2,17	2,08	2,21
1173 10mM Salizylat	1,97	1,94	1,80
1173 20mM Salizylat	1,90	1,97	2,06

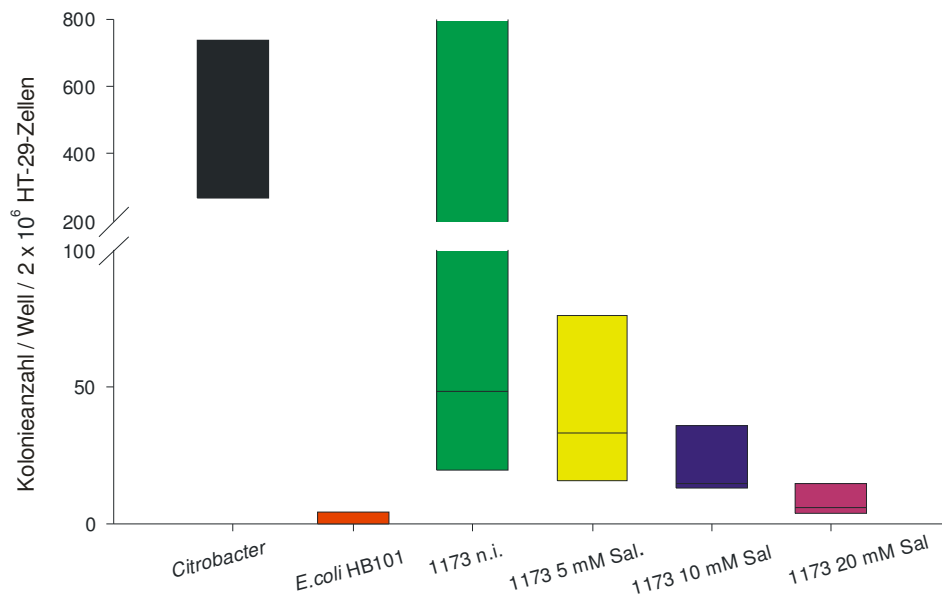
Die Berechnung der relativen Genexpression ergab einen eindeutigen, konzentrationsabhängigen Anstieg der *marA*-Expression. Bei einer Salizylatkonzentration von 20 mM wurde die Expression auf das 200-fache hochreguliert (siehe Abb. 35).



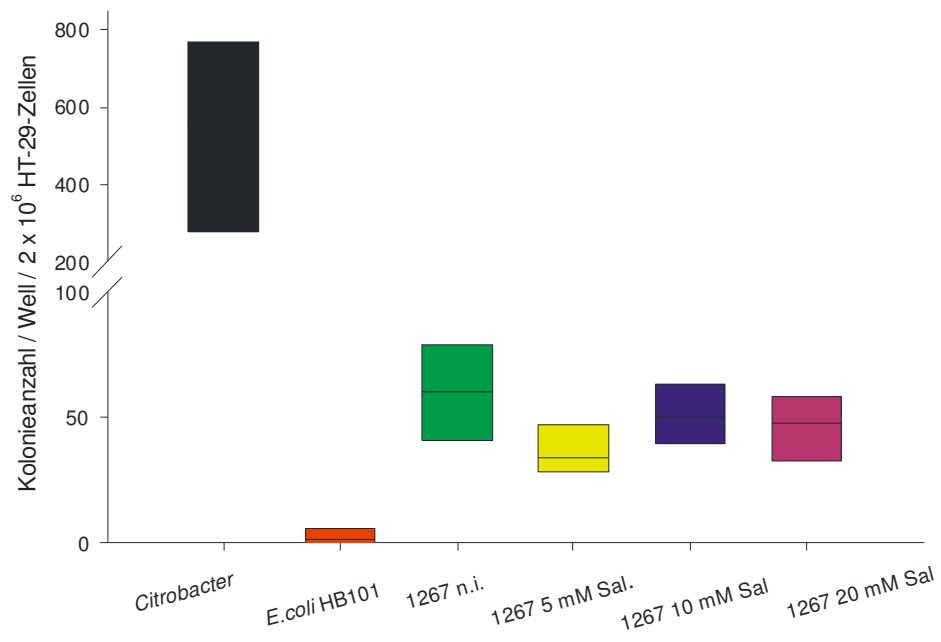
**Abb. 35:** graphische Darstellung des Expressionsanstiegs von *marA* in Abhängigkeit von der Salizylatkonzentration bei drei unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen. Bei R (ratio) handelt es sich um die relative Genexpression<sup>224</sup>. „*marA-1*“ bedeutet erster Versuch, „*marA-2*“ bedeutet zweiter Versuch und „*marA-3*“ bedeutet dritter Versuch.

#### 4.4.2.2 Adhärenzunterschiede der Isolate 1173 und 1267 in der Abhängigkeit von der Salizylatkonzentration

Die *E. coli*-Isolate 1173 und 1267 wurden über Nacht bei Konzentration von 0 mM bis 20 mM Salizylat in LB-Medium hochgezogen. Diese Flüssigkulturen wurden dann unter der Zugabe von der jeweiligen Salizylatkonzentration für den Zelladhäsionsassay vorbereitet. Bei der Auswertung der Ergebnisse zeigte sich bei dem Stamm 1173 eine der Adhäsion an HT-29-Zellen (siehe Abb. 36). Die Adhärenz des Vergleichstammes 1267 blieb unverändert (siehe Abb. 37).



**Abb. 36:** Adhäsion von *E. coli* 1173 an HT-29-Zellen in Abhängigkeit von der Salizylatkonzentration. *Citrobacter* wurde als Positiv-Kontrolle verwendet (zeigt sehr gute Adhärenz), *E. coli* HB101 wurde als Negativ-Kontrolle verwendet (schlecht adhätierender Keim).



**Abb. 37:** Adhäsion von *E. coli* 1267 an HT-29-Zellen in Abhängigkeit von der Salizylatkonzentration. *Citrobacter* wurde als Positiv-Kontrolle verwendet (zeigt sehr gute Adhärenz), *E. coli* HB101 wurde als Negativ-Kontrolle verwendet (schlecht adhärerender Keim).

## 5 Diskussion

### 5.1 GFP als Fluoreszenzmarker

In dieser Arbeit wurde das *gfp*-Gen als chromosomale Markierung eines *E. coli*-Isolates aus der Ratte verwendet. Für die Wahl von Gfp als Reporter war ausschlaggebend, dass es außer Sauerstoff und UV-Licht zur Fluoreszenz keine weiteren exogenen Faktoren benötigt<sup>35</sup>. Dadurch ermöglicht Gfp eine direkte Erkennung des markierten *E. coli* in Mischkulturen, die nach Passage des Rattendarms im Kot zu finden sind.

Im Gegensatz zu enzymatischen Reportern (wie z. B. Chloramphenicolacetyl-transferase<sup>90</sup>, Nuclease<sup>54</sup>,  $\beta$ -Glucuronidase<sup>123</sup>,  $\beta$ -Galactosidase<sup>119</sup> und Luciferase<sup>50</sup>) benötigt GFP für die Fluoreszenz außer Sauerstoff und UV-Licht keine anderen exogenen Substrate, Enzyme, Kofaktoren oder andere Energiequellen<sup>35</sup>. Ein weiterer Vorteil ist, dass die Fluoreszenz des Gfp tolerant gegenüber Hitze (bis 65 °C), alkalischem Milieu (pH 11), Detergentien (1 % SDS), Guanidiniumchlorid (6 M), Fixierung mit Formaldehyd sowie vielen Proteasen ist. Gfp zeigt auch im Fluoreszenzmikroskop praktisch keinen Photobleicheffekt<sup>35,64</sup>. Aufgrund dieser Eigenschaften bietet das Gfp-System neben anderen Anwendungsgebieten die Möglichkeit, *in vivo* Untersuchungen an Zellen und Organismen durchzuführen.

**Tab. 35:** Übersicht zu den unterschiedlichen Einsatzgebieten von GFP als Reporter

Untersuchung der Genexpression <sup>35,226,291</sup>
Untersuchung der Proteinlokalisierung <sup>291</sup>
Beobachtung der Motilität von Proteinen <sup>291</sup>
Kontrolle des therapeutischen Gentransfers <sup>152</sup>
Kontrolle von Transfektionen <sup>28,291</sup>
<i>in situ</i> Beobachtung von Zellwachstum und Zellbewegung <sup>5,291</sup>
Markierung von Organellen und Kompartimenten <sup>59</sup>
Untersuchung der Interaktionen von Mikroorganismen mit spezifischen Immunzellen <sup>64,90</sup>
Untersuchung der Gründung und Entwicklung von gemischten Bakterien-Populationen wie z. B. in Biofilmen und auf Pflanzenwurzeln <sup>24</sup>

Da durch die Kopplung von *gfp* an multiple bakterielle Promotoren die Genexpression untersucht werden kann, wurde es als Reporter für das in dieser Arbeit etablierte Screening-System von Pharmazeutika ausgewählt. Andere ausgetestete Substanzen zeigten unter UV-Licht Eigenfluoreszenz, die nicht von der Gfp-Fluoreszenz zu unterscheiden war.

Daher konnten diese Pharmazeutika im Hinblick auf einen induktiven Effekt unter Verwendung des Gfp als Reporter nicht weiter untersucht werden.

Die untersuchten markierten und entsprechend dem Promotor induzierten *E. coli* zeigten sowohl als Kolonie auf der Agarplatte als auch im Flüssigmedium unter der UV-Lampe eine grüne Fluoreszenz.

## 5.2 Verwendung des *araB*-Promotors zur Steuerung der Gfp-Produktion

Das bei plasmidmarkierten Keimen beobachtete schlechtere Wachstum von mit Gfp markierten Stämmen hängt mit dem aus dem Wildtyp stammenden *gfp*-Gen und der Expression von Gfp zusammen<sup>53</sup>.

Konstitutiv transkribiertes *gfp* kann toxische Effekte und somit eine Veränderung der Fitness des Bakteriums verursachen. Diesem Fitnessverlust liegt der Abzug an Aminosäuren und Energie zu Grunde, die für die Expression von Gfp verwendet werden. Als Folge entsteht eine verminderte Konkurrenzfähigkeit, wodurch der markierte *E. coli* von der ihn umgebenden Normalflora im späteren Modell verdrängt werden könnte<sup>105</sup>. Um diese Nebenwirkungen der Expression des Reporterproteins Gfp *in vivo* möglichst zu vermeiden, wurde das *gfp*-Gen unter die Kontrolle des induzierbaren *araB*-Promotors gebracht.

Aufgrund seiner Alles-oder-nichts-Genexpression und seiner „Dichtigkeit“ – d. h. im nicht-induzierten Zustand erfolgt keine Gfp-Expression – ist der *araB*-Promotor für die Kontrolle des Reportergens geeignet. Alles-oder-nichts-Genexpression bedeutet, dass die Zellen entweder maximal oder gar nicht induziert sind. Die induzierte Zellfraktion ändert sich, sobald die Menge an Induktionsmittel im Wachstumsmedium verändert wird<sup>137</sup>.

Bei den markierten Stämmen *E. coli*-57 und *E. coli*-32 war ohne den Induktor L-Arabinose keine Fluoreszenz unter UV-Licht zu erkennen. Dieses Ergebnis lässt vermuten, dass der *araB*-Promotor intakt ist.

Um sicher zu gehen, dass der markierte *E. coli*-57 während der Passage des Rattendarms keinen Kontakt zu L-Arabinose hat und kein Gfp exprimiert wird, wurde das Rattenfutter im Hinblick auf eine mögliche Induktion des *araB*-Promotors hin untersucht. Nach Inkubation von *E. coli*-57 mit Rattenfutter zeigte sich keine Fluoreszenz. Dieses Ergebnis legt nahe, dass im Rattenfutter keine L-Arabinose vorhanden ist. Somit kann es zu keiner Induktion der Gfp-Expression während der Darmpassage kommen.

## 5.3 Chromosomale Markierung von *E. coli* mit *gfp*

Da der Reporterstamm über einen längeren Zeitraum innerhalb der Darmflora nachweisbar sein sollte, war eine dauerhaft stabile Integration Voraussetzung für diese Arbeit. Gegenüber den Markierungen durch eingebrachte Plasmide hat die chromosomale Markierung mehrere

Vorteile. Die Wahrscheinlichkeit eines Verlusts des Reportergens oder eine unerwünschte Übertragung des Reportergens ist bei einer chromosomalen Markierung wesentlich geringer als bei der plasmidischen Markierung<sup>255,256</sup>. Ein weiterer Vorteil der chromosomalen Markierung mit *gfp* zusammen mit einer Resistenzkassette besteht in der Stabilität. Auch in der Abwesenheit von Antibiotikum als zusätzlichem Selektionsdruck ist diese Markierung relativ stabil, was bei einer Plasmidmarkierung nicht der Fall ist<sup>257</sup>. Diese Stabilität ist wichtig, da der Reporterstamm über einen längeren Zeitraum in einer Mischflora nachweisbar sein sollte. Diese dauerhafte stabile Integration war ausschlaggebend für die Wahl der Markierung. Um die Kolonisation des Rattendarms zu erleichtern und die Detektion des mit *gfp* markierten *E. coli* zu erleichtern, wurde zusätzlich eine Kanamycin-Resistenzkassette zusammen mit dem *gfp* in das Chromosom des *E. coli* eingebracht. Im Rahmen der Versuche konnte gezeigt werden, dass die chromosomale Markierung des *E. coli*-57 unter normalen und nicht-selektiven Bedingungen über einen Zeitraum von sechs Monaten im Darm stabil war.

### 5.3.1 Unterschiedliche Methoden zur chromosomalen Markierung durch homologe Rekombination

#### 5.3.1.1 *Suicide*-Vektor-System

In dieser Arbeit wurde das *suicide*-Vektor-System pIVET8 von Mahan *et al.* in modifizierter Form verwendet<sup>182</sup>. Die Replikation von pIVET8 ist am Startpunkt (*origin*) des Plasmids R6K vom Transkriptionsfaktor Pir (*pir*-Genprodukt) abhängig<sup>142</sup>. Das *pir*-Gen befindet sich nicht auf dem Plasmid pIVET8. Daher kommt es in *pir*-exprimierenden Stämmen zu einer Ausbildung der plasmidkodierten Gene wie z. B. der Ampicillinresistenz. Die Integration der plasmidkodierten Gene über homologe Rekombination in das Wirtsgenom führt ebenfalls zu deren Expression.

Ein Zielgen – in dieser Arbeit die homologen Bereiche des Zielgens, das unter der Kontrolle eines induzierbaren oder konstitutiv exprimierenden Promotors stehende *gfp*-Gen und die Kanamycin-Resistenzkassette – kann in dieses Plasmid eingebracht werden. Über die Kanamycin-Resistenz konnten Stämme, in denen sich das gesamte Plasmid über homologe Rekombination in das Zielgen integriert hat, isoliert werden. Da es für das in dieser Arbeit zu etablierende *in vivo*-Modell von großer Bedeutung war, dass der markierte Keim wenig Resistenzen mitbringt, wurde in den *suicide*-Vektor pIVET8 das Gen *sacB* außerhalb der homologen Bereiche eingebracht, um nach der homologen Rekombination die Vektorsequenz, die für eine Ampicillinresistenz kodiert, zu entfernen. Das Gen *sacB* stammt aus *Bacillus subtilis* und kodiert für das Enzym Levansucrase, die aus Saccharose im Medium für Gram-negative Organismen toxische Levane aufbaut<sup>236,239,273</sup>.

Mit dem *suicide*-Marker *sacB* lassen sich *Single*-Rekombinanten, die den gesamten Vektor integriert haben, von Doppel-Rekombinanten durch Wachstum auf Agarplatten mit 10 % Saccharose und 50 µg/ml Kanamycin unterscheiden. Bei der Selektion – zunächst nur auf Kanamycin-Resistenz ohne Saccharose – kann auf *Single*-Rekombinanten durch Wachstum in Saccharose-haltigem Medium Selektionsdruck für eine Doppelrekombination ausgeübt werden.

Im Rahmen der Versuche wurde kein markierter Klon mit Insertion der Reporter-gen-Resistenzkassette (Promotor-gfp-neo) in das Zielgen nach Transformation oder Konjugation der Konstrukte pMA360-lacPr-gfp und pMA363-hspPr-gfp in *E. coli*-2685 gefunden. Da die entstandenen Klone aber in der Lage sind, auf Selektivagarplatten mit Kanamycin zu wachsen, müssen sie resistent gegen Kanamycin sein. Entweder haben die Klone durch chromosomale Mutation oder durch den Erhalt eines Transposons eine Resistenz gegen Kanamycin entwickelt, oder sie haben die Kassette oder das gesamte Plasmid an einem anderen Ort in ihr Genom integriert als dem gewünschten. Ersteres ist unwahrscheinlich, da eine einzelne Spontanmutation zu keiner Kanamycin-Resistenz führen kann<sup>266</sup>. Die Übertragung eines die Kanamycin-Resistenz enthaltenden, genetischen und mobilen Elements wie z. B. eines Transposons ist unwahrscheinlich, da in diesem *in vitro*-Experiment der Kontakt zu einem Donor der Resistenz nicht gegeben war. Weder der Rezipient *E. coli*-2685 noch der Donor *E. coli* S17λpir ohne die Konstrukte pMA360-lacPr-gfp und pMA363-hspPr-gfp zeigten vor Durchführung der Transformation oder Konjugation eine Kanamycin-Resistenz.

Ein intrachromosomal vorhandenes Kanamycin-Resistenz-Gen kann nicht ausgeschlossen werden, da eine „Revertierung“ der Resistenz über *gene silencing* – in Anwesenheit des Selektionsdrucks Antibiotikum wird das Resistenz-Gen abgelesen, in Abwesenheit wird es nicht exprimiert – möglich ist<sup>171</sup>.

Das Vorhandensein des gesamten *suicide*-Plasmids könnte auf den Funktionalitätsverlust von SacB durch Deletion oder Punktmutation von *sacB* oder auf lysogene Phagen λ, die im Genom integriert sind und das zur Vermehrung des Plasmids nötige Pir-Protein produzieren, zurückgehen. Die Anwesenheit von λ-Phagen im Genom von *E. coli*-2685 kann ausgeschlossen werden, da die PCR auf die λ-Phagen-spezifischen Gene *gam*, *bet* und *exo* keine Produkte lieferte. Dieses Ergebnis legt nahe, dass die Reporter-gen-Resistenzkassette bzw. der Plasmidrest an andere Stelle im Genom integriert worden ist.

Da die entstandenen Klone neben der Kanamycin-Resistenz auch Ampicillin-Resistenz zeigten, muss das gesamte Konstrukt pMA360-lacPr-gfp oder pMA363-hspPr-gfp mit defektem *sacB*-Gen an einer anderen Stelle ins Genom integriert worden sein. Da in den

Originalkonstrukten pMA360-lacPr-gfp und pMA363-hspPr-gfp das Gen *sacB* keine Veränderung in der Sequenz zeigte ist die Deletion oder Punktmutation, die zum Defekt von SacB führte, vermutlich während der Transformation und Integration in das Genom von *E. coli*-2685 entstanden.

### 5.3.1.2 $\lambda$ -Red-System

Die aus dem  $\lambda$ -Phagen stammenden Gene *gam*, *bet* und *exo* unterstützen die homologe Rekombination bei *E. coli*. Die Genprodukte Gam und Bet leiten die Rekombination zwischen eingebrachter linearer DNA und der Wirts-DNA ein. Gam inhibiert die RecBCD-Exonuklease V. Die Gene *gam*, *bet* und *exo* befinden sich unter der Kontrolle des induzierbaren *araB*-Promotors auf einem Plasmid. Neben dem *high copy*-Vektor pUC-*araBPr-gbx* wurde auch unter der Verwendung des *low copy*-Vektors pKD46 versucht die homologe Rekombination durchzuführen. Bei diesen beiden  $\lambda$ -Red-Systemen wird die zu rekombinierende DNA als lineares PCR-Produkt über Transformation oder Elektroporation in *E. coli* eingebracht.

Im Vergleich zur homologen Rekombination über *suicide*-Vektoren hat das  $\lambda$ -Red-System mehrere Vorteile. Das für die homologe Rekombination benötigte Fragment muss in keinen Vektor eingebracht werden, sondern kann als lineares PCR-Produkt transformiert werden, da das Protein Gam durch Inaktivierung der Nukleasen RecBCD und SbcCD die Degradierung linearer DNA verhindert<sup>56,57,91</sup>. Außerdem kann über Entfernung des Selektionsdrucks Antibiotikum (bei pUC-*araBPr-gbx*) oder über Hitze (42 °C bei pKD46) auf den Verlust des die Gene *gam*, *bet* und *exo* tragenden Plasmids selektioniert werden. Zusätzlich ist bei beiden  $\lambda$ -Red-Systemen eine Regulation der Genexpression durch den *araB*-Promotor gegeben. Diese Regulation ist wichtig, da eine konstitutive und starke Expression von Gam wahrscheinlich für *E. coli* toxisch ist<sup>49,259</sup>. Ein Beweis dafür konnte nicht erbracht werden, da kein Unterschied im Wachstum von  $\lambda$ -Red-System-beinhaltenen *E. coli*-2685 zwischen Arabinose-induzierter und nicht-induzierter Kultur zu sehen war. Bei Maršić *et al.* zeigte sich ebenfalls keine Auswirkung der erhöhten Gam-Expression auf die Wachstumsrate von Wildtyp-*E. coli*<sup>188</sup>.

Ein Defekt der  $\lambda$ -Red-Systemen konnte ausgeschlossen werden, da die Integration der Kanamycin-Resistenzkassette über homologe Rekombination in das Zielgen *acrB* möglich war.

Arbeiten von Datsenko *et al.* zur Analyse des  $\lambda$ -Red-Systems pKD46 zeigten, dass homologe Bereiche von 36 bp bis 50 bp optimal sind, um eine homologe Rekombination mit Hilfe von pKD46 durchzuführen. Längere homologe Bereiche führen zu keiner Steigerung der Wahrscheinlichkeit der homologen Rekombination<sup>56</sup>.

Laut Lui *et al.* ist eine identische Sequenz von 5 bp innerhalb von 45 bp homologen Bereichs ausreichend, um eine unspezifische homologe Rekombination auszulösen<sup>168</sup>. Um eine homologe Rekombination an einer unerwünschten Stelle zu verhindern, wurden in dieser Arbeit homologe Bereiche mit einer Länge von 638 bp und 791 bp verwendet. Die Größe der homologen Bereiche beträgt das 12,7-fache bis 15,8-fache der von Datsenko *et al.* für das  $\lambda$ -*Red*-System pKD46 optimierten Länge<sup>56</sup>. Somit liegt die Vermutung nahe, dass die Länge der homologen Bereiche der Grund für das Fehlschlagen der homologen Rekombination bei der Verwendung des Systems pKD46 ist.

Ein weiterer Grund für das Fehlschlagen der homologen Rekombination kann ein geringer Unterschied der Nukleasen RecBCD und SbcCD von *E. coli*-Isolaten der Ratte im Vergleich zu Laborstämmen sein. Dieser Unterschied im Restriktionssystem führt zu einer unvollständigen Inaktivierung der Nukleasen durch Gam und somit zu einer Degradierung der transformierten PCR-Produkte. Da die homologe Rekombination der Kanamycin-Resistenzkassette unter Verwendung des  $\lambda$ -*Red*-Systems pUC-araBPr-gbx zu Kanamycin-resistenten Klonen führte, ist wahrscheinlich jedoch kein Unterschied im Restriktionssystem vorhanden.

Da es sich bei dem Vektor pKD46 um ein *low copy*-Plasmid handelt, wird Gam nicht im Überschuss produziert und somit kann womöglich die Gesamtmenge an Nukleasen nicht inaktiviert werden. Dies hätte wiederum den Abbau der linearen PCR-Produkte zur Folge<sup>205</sup>. Da von RecBCD 10 Moleküle pro Zelle vorhanden sind ist es eher unwahrscheinlich, dass die Gam-Expression für eine Inaktivierung nicht ausreicht<sup>281</sup>.

Die Problematik der vollständigen Inaktivierung der Nukleasen ist bei dem  $\lambda$ -*Red*-System pUC-araBPr-gbx nicht gegeben, da es sich um ein *high copy*-Plasmid handelt und Gam somit nach Induktion durch Arabinose im Überschuss produziert wird.

Ein Problem dieses Systems liegt in der hohen Kopienzahl und der dadurch verstärkten Genexpression des Vektors pUC-araBPr-gfp. Die Expression von Gam bewirkt, dass das pUC-araBPr-gfp-Plasmid nicht zirkulär repliziert sondern lineare Multimere produziert. Diese Multimere können die Rekombination inhibieren, da sie zum einen um Exo und Beta konkurrieren<sup>44,51,204,263</sup>, zum anderen kann die Bindung von Gam an den linearen Vektor pUC-araBPr-gfp zu einer Degradierung der linearen PCR-Produkte führen<sup>205</sup>. Diese Problematik spiegelte sich in der geringen Ausbeute an Klonen im Vergleich zur eingesetzten Keimzahl wieder. Bei einer erfolgten Transformation der von homologen Bereichen flankierten Resistenzkassette in  $1 \times 10^9$  Zellen von *E. coli*-2685 konnten zwischen zwei und fünf Klonen isoliert werden.

Bei der homologen Rekombination der Reporter-gen-Resistenzkassette (araBPr-gfp-neo) traten Probleme auf. Die erfolgte Integration der Resistenzkassette in den Bereich des *E. coli*-2685-Genoms von 1.619.393 bp bis 1.620.806 bp lässt darauf schließen, dass die homologen Bereiche keine oder für die homologe Rekombination nicht relevante Mutationen in ihrer Sequenz aufweisen und deshalb eine Integration an dieser Stelle möglich ist<sup>168</sup>. Die Sequenzierung der homologen Bereiche zeigte eine 97 %ige Homologie von *E. coli*-2685 zu *E. coli*-K12. Das Ausbleiben der homologen Rekombination bei der Reporter-gen-Resistenzkassette steht daher wahrscheinlich nicht im Zusammenhang mit den homologen Bereichen und der gewählten Integrationsstelle.

Auch die Länge der homologen Bereiche ist vermutlich nicht der Grund für das Ausbleiben der Integration von araBPr-gfp-neo, da mit denselben homologen Bereichen die Integration der Kanamycin-Resistenzkassette erfolgte. Murphy *et al.* und Poteete *et al.* zeigten, dass bei langen homologen Bereichen die Wahrscheinlichkeit der homologen Rekombination 100-fach niedriger ist, wenn RecA nicht vorliegt<sup>204,229</sup>. Bei kurzen homologen Bereichen trat nur eine geringfügige Reduktion der Wahrscheinlichkeit bei Abwesenheit von RecA auf. Das Vorhandensein von RecA wird in dem verwendeten *E. coli*-2685 angenommen, da es sich um ein Wildtyp-*E. coli*-Isolat handelt. Der Zusammenhang zwischen der Länge der homologen Bereiche, RecA und der Wahrscheinlichkeit der homologen Rekombination ist noch nicht geklärt, allerdings scheint die Länge der homologen Bereiche nicht die Ursache für diesen Unterschied zu sein<sup>49,206,262</sup>.

Die Bildung einer Sekundärstruktur nach dem Abbau von Monosacchariden am 5'-Ende der linearen DNA durch Exo scheidet ebenfalls als Grund für die nicht funktionierende homologe Rekombination aus, da die minimale freiwerdende Energie sowohl durch die Sekundärstrukturbildung bei der Kanamycin-Resistenzkassette als auch bei der Reporter-gen-Kanamycin-Resistenzkassette – beide flankiert von den homologen Bereichen – —138,94 kcal/mol beträgt. Außerdem bilden die für die homologe Rekombination zuständigen Bereiche gleiche Sekundärstrukturelemente aus, was wiederum gegen eine Beteiligung an der nicht richtig ablaufenden homologen Rekombination spricht.

Die Ausbildung einer Sekundärstruktur kann auch die Bindung von Bet behindern, was zur Folge hat, dass es zu keinem *annealing* von komplementären DNA-Einzelsträngen und zu keiner homologen Rekombination kommt. Da die Integration der Kanamycin-Resistenzkassette über homologe Rekombination ohne Probleme erfolgte, kann die Ausbildung von Sekundärstrukturen nicht der Grund für das Ausbleiben der homologen Rekombination bei der Reporter-gen-Resistenzkassette sein.

Bei dem Versuch mit der von den homologen Bereichen flankierten Reporter-gen-Resistenzkassette durchzuführen tauchte das Problem auf, dass das Fragment araBPr-gfp-

neo mit einem Vektor rekombinierte. Da aus dem Wildtyp *E. coli*-2685 vor dem Experiment keine Plasmide isoliert werden konnten, erfolgte die Rekombination wahrscheinlich mit dem im Versuch transformierten  $\lambda$ -*Red*-System pUC-araBPr-gbx. Diese unspezifische Rekombination erfolgte vermutlich aufgrund einer Sequenzhomologie des *araB*-Promotors, da kurze homologe Bereiche ausreichen, um eine unspezifische homologe Rekombination auszulösen<sup>168</sup>. Eine Isolierung des entstandenen Plasmids war nicht möglich. Die Beobachtung der Neubildung oder Veränderung von Plasmiden wurde auch schon in anderen Arbeiten gemacht<sup>51,168,242</sup>.

Die Expression des *gfp*-Gens kann zu toxischen Effekten sowie zu einer Veränderung der Fitness des Bakteriums führen. Diesem Fitnessverlust liegt der Abzug an Protein und Energie zu Grunde, der für die Expression von Gfp verwendet wird. Die toxischen Effekte machen sich in einem veränderten Wachstumsverhalten bemerkbar. Folglich entsteht eine verminderte Konkurrenzfähigkeit, wodurch der markierte Stamm von der ihn umgebenden Normalflora im späteren Modell verdrängt werden könnte<sup>105</sup>. In mehreren Arbeiten wurde keine Behinderung des Zellwachstums und der Zellfunktion aufgrund einer Plasmidmarkierung nachgewiesen<sup>35,42,95,255</sup>. In eigenen Versuchen zeigte sich jedoch ein deutlicher Unterschied in der Koloniegröße zwischen Reporter-gen-exprimierenden und nicht markierten *E. coli*-Stämmen. Dieser Effekt – ausgelöst durch die Gfp-Expression – war sowohl bei *high copy*- als auch *low copy*-Konstrukten zu beobachten<sup>241</sup>. Durch die chromosomale Integration und durch die Verwendung eines induktiven Promotors z. B. *araB*-Promotor können diese unerwünschten toxischen Effekte minimiert werden.

Die Gfp-Expression in dieser Arbeit war unter der Kontrolle des *araB*-Promotors. Dieser Promotor benötigt für die Genexpression neben L-Arabinose auch das *araC*-Genprodukt<sup>137</sup>. Bei dieser Expression handelt es sich um eine Alles-oder-nichts-Genexpression, d. h. die Zellen werden entweder maximal oder gar nicht induziert<sup>136,137</sup>. Da das Nährmedium für *E. coli*-2685 während der homologen Rekombination keine L-Arabinose enthält kann es zu keiner Expression des *gfp*-Gens kommen. Somit können keine toxischen Effekte auftreten, die zu einer Inhibierung der homologen Rekombination mit der Reporter-gen-Resistenzkassette führen.

Aufgrund der erfolgten und ortsspezifischen Integration der Kanamycin-Resistenzkassette über homologe Rekombination ist es unwahrscheinlich, dass die Rekombination der Reporter-gen-Resistenzkassette wegen der Schädigung des Gens nicht statt fand.

### 5.3.1.3 Generelle Transduktion

Beim Phagen P1 handelt es sich um den am häufigsten verwendeten, generell transduzierenden Phagen für *E. coli*<sup>275</sup>. Hierbei kann prinzipiell jedes chromosomale oder plasmidkodierte bakterielle Gen über den „*headful packaging*“ Mechanismus in einen

Phagenpartikel verpackt und in *E. coli* transduziert werden<sup>265</sup>. Befindet sich im Genom des Rezipienten *E. coli* ein homologer Bereich zu der transduzierten DNA, so erfolgt homologe Rekombination.

Der Grund für die Transduktion von bakteriellen Genen liegt in der relativ geringen Sequenzspezifität des Genproduktes des Phagen P1, das für die Erkennung der *pac-sites* verantwortlich ist. Dadurch kommt es zu einem Fehler in der DNA-Verpackung, da sowohl auf Plasmiden als auch auf dem Bakterienchromosom *pac*-ähnliche Signale registriert werden<sup>265,275</sup>. Auf dem Chromosom von *Salmonella typhimurium* existieren mindestens 6 bis 10 *pac*-ähnliche Sequenzen, die versehentlich erkannt und geschnitten werden können<sup>252,296</sup>. Durch das schrittweise Voranschreiten der „Verpackung“ kann theoretisch jedes bakterielle Gen anstelle der Phagen-DNA in den Phagenkopf gelangen. Die Häufigkeit, mit der ein chromosomaler Marker durch P1 übertragen wird, hängt von seiner Entfernung zu den *pac-sites* ab, sowie von der Ähnlichkeit der Basensequenz zur echten *pac-site* des Phagen<sup>252,296</sup>.

Als Donorstamm der bakteriellen DNA für die Transduktion wurde der den Vektor pMA364-araBPr-gfp tragende *E. coli*-2685 mit dem Phagen P1 infiziert. Nach erfolgreicher Infektion erfolgte die Transduktion in *E. coli*-2685. Da sich auf dem Plasmid pMA364-araBPr-gfp das von homologen Bereichen flankierte Fragment araBPr-gfp-neo befindet, ist nach der Transduktion eine homologe Rekombination zu erwarten.

Aus der Transduktion sind in diesen Versuchen Kanamycin-resistente Keime hervorgegangen. Bei keinem der erhaltenen Klone zeigte sich nach Induktion mit 0,1 %iger Arabinose grüne Fluoreszenz unter UV-Licht.

Da bei der Transduktion zwischen dem Donorstamm *E. coli*-2685, der das Plasmid pMA364-araBPr-gfp trägt, und dem Rezipient *E. coli*-2685 Kanamycin-resistente Klone hervorgegangen sind, kann ein Fehler bei der Transduktion ausgeschlossen werden.

Eine mögliche Ursache für die entstandenen Kanamycin-resistenten und nicht fluoreszenten Klone kann die Entfernung von araBPr-gfp zu der *pac-site* auf dem Plasmid pMA364-araBPr-gfp sein. Da aber die Länge des bei der P1-Transduktion übertragbaren Fragments bis zu 100 kb betragen kann<sup>132,195,275</sup> und die Größe des gesamten Plasmids pMA364-araBPr-gfp 7.605 bp beträgt, können weder die *pac-site* noch die Länge des zu übertragenden Fragments die Ursache für die Kanamycin-resistenten und nicht fluoreszenten Klone sein.

Wahrscheinlich liegt auch bei der homologen Rekombination über Transduktion das Problem bei der Integration des *gfp*-Gens als Marker und nicht im System.

### 5.3.2 Chromosomale Markierung mit Transposonmutagenese

*E. coli* können drei Typen von transponierbaren genetischen Elementen besitzen: Insertionssequenzen, Transposons und Bakteriophagen, die sich über den Weg der Transposition vermehren. Insertionselemente und Transposons haben zwei wichtige Merkmale gemeinsam. Sie tragen beide Gene, die für eine Transposase kodieren und besitzen an ihren Enden umgekehrte Sequenzwiederholungen (*inverted repeats*) mit einer Länge von 20–1.000 bp. Im Unterschied zu Insertionselementen tragen Transposons zusätzliche Gene, die z. B. für eine Antibiotikaresistenz kodieren<sup>139,179</sup>. Transposons werden für die genetische Analyse und Manipulation von Bakterien häufig verwendet<sup>20,61</sup>. Da der Ort der Integration nicht vorhergesagt oder vorherbestimmt werden kann, können sie durch Integration die Funktionsfähigkeit eines Gens stören. Ist dies für die Zelle ein essentielles Gen, so hat die Integration für die Zelle unbekannt Konsequenzen. Diese kann störend oder im schlimmsten Fall letal für die Zelle sein<sup>31,105,227</sup>. Die Integration kann aber auch Vorteile durch die Übertragung von z. B. Resistenzgenen bringen<sup>290</sup>. Das in dieser Arbeit verwendete System pLOF/Km-araBPr-gfp trägt ein zusammengesetztes Mini-Tn10-Transposon. Die für den Phänotyp verantwortlichen DNA-Abschnitte (Kanamycin-Resistenz, Fluoreszenz nach Induktion) werden von *inverted repeats* umgeben, die eine Länge von 70 bp haben. Die Transposase befindet sich außerhalb der mobilen Einheit und wird nicht übertragen. Ein Vorteil von Mini-Transposons ist die stabile Integration der von den *inverted repeats* flankierten Gene in das *E. coli*-Genom, da keine Übertragung der Transposase erfolgt. Eine Retransposition des Mini-Transposons ist nicht möglich, da die Tn10-Transposase schlecht *in trans* wirkt<sup>290</sup>. Ein weiterer Vorteil des Verlusts der Transposase besteht darin, dass der Rezipient nicht immun ist gegenüber weiteren Transpositionen. Die Übertragung des Mini-Tn10 erfolgt mit Hilfe eines *suicide*-Vektors. Der Vektor pLOF/Km besitzt den *oriV* R6K, der für eine autonome Replikation das Pir-Protein des Phagen  $\lambda$  benötigt. Daher kann der Vektor nur in Stämmen replizieren, die das Pir-Protein exprimieren. Ist dieses Protein nicht vorhanden, so kann der Vektor nicht replizieren. In diesem Fall kann durch Selektionsdruck mit dem Antibiotikum Kanamycin auf die Transposition der mobilen Einheit selektiert werden. Für den Transfer in verschiedene Gram-negative Bakterien ist der RP4 *conjugal transfer origin* (*oriT*) notwendig<sup>61,139,271</sup>.

Aus der Übertragung des pLOF/Km-araBPr-gfp von *E. coli* S17 $\lambda$ pir über Konjugation in *E. coli*-4 und *E. coli*-2685 gingen keine Klone mit erfolgter Transposition hervor. Dies kann auf eine geringe Frequenz durch RP4-vermittelten Transfer zurückgeführt werden. Verschiedene Eigenschaften wie z. B. das Restriktionssystem des Rezipienten oder das Fehlen von essentiellen *envelope functions* können zu dieser geringen Übertragungsfrequenz führen<sup>61</sup>. Neben der geringen Transferfrequenz über Konjugation

kann es bei der Transposition selbst zu einem Problem kommen. Viele verschiedene Wirtsfaktoren mit unterschiedlichen Funktionen können die Transposition beeinflussen<sup>290</sup>. Bei *in vitro*-Studien zeigte sich, dass für eine erfolgreiche Transposition ein DNA-Protein-Komplex, auch Transposom genannt, benötigt wird. Die Bildung des Tn10-Transposoms wird durch *nucleoid-associated host proteins* wie *integration host factor* (IHF), *heat unstable nucleoid protein* (HU) und *histone-like nucleoid structuring protein* (H-NS) erleichtert<sup>36,52,154,187,277</sup>. Diese Proteine erleichtern durch Bindung der Transposon-DNA die Ausbildung der richtigen Anordnung der Transposon-Enden und der Zielsequenz innerhalb des Transposoms. Ihre Verfügbarkeit ist für das Auftreten der Transposition entscheidend<sup>290</sup>. Da die Menge an *nucleoid-associated host proteins* während den unterschiedlichen Phasen des Wachstums variiert<sup>3</sup>, ist ein Unterschied in der Transpositionsfrequenz zu erwarten. Die Hypothese, dass die Abnahme von bestimmten Nährstoffen, der Eintritt in die stationäre Phase oder andere stress-induzierende Situationen die Transposition beeinflussen wurde bereits von *McClintock* aufgestellt<sup>193</sup>. Da es bei der Durchführung der Konjugation weder zu einer Abnahme der Nährstoffe noch zu einer stress-induzierenden Situation oder zum Eintritt in die stationäre Phase gekommen ist, kann dies nicht die Ursache für Ausbleiben der Transposition nach der Konjugation sein.

Eine weitere Ursache für das Fehlschlagen der Konjugation kann die Empfindlichkeit des Systems sein. Bei der Konjugation handelt es sich um einen Vorgang der leicht unterbrochen werden kann, da die während einer Konjugation ausgebildete Plasmidbrücke äußerst instabil ist und schon bei geringster Erschütterung zerstört wird<sup>139</sup>.

Da die Transposition nach Übertragung des Plasmids pLOF/Km-araBPr-gfp mittels Transformation in *E. coli*-4 ohne Probleme ablief, ist es naheliegend, dass die Transposition nach Konjugation entweder aufgrund einer geringen Transferfrequenz des pLOF/Km-araBPr-gfp von *E. coli* S17λpir in *E. coli*-4 scheiterte oder es zu einer Zerstörung der Plasmidbrücke kam.

Aufgrund der Tatsache, dass bei *E. coli*-2685 die Transposition weder nach Konjugation noch nach Transformation Selektanten hervorbrachte, kann das Problem nicht in der geringen Übertragungsfrequenz oder dem Verlust der Plasmidbrücke liegen, da die Transformation unabhängig von der Übertragungsfrequenz abläuft. Daher trat das Problem vermutlich während der Transposition auf. Die Abwesenheit eines der für die Bildung des Transposoms wichtigen Proteine kann als Ursache in Frage kommen.

### 5.3.2.1 Detektion der Integrationsstelle

Zur Lokalisierung der genauen Integrationsstelle des Mini-Tn10-Transposons in *E. coli*-57 wurden mehrere Verfahren angewendet.

Inverse PCR war eine der ersten Methoden die es ermöglichte von einer bekannten Gensequenz ausgehend unbekannte angrenzende DNA-Sequenzen zu analysieren. Die Methode verwendet eine Strategie, bei der einige Restriktionsenzyme verwendet werden, um ein geeignetes Fragment der DNA zu erhalten, die auch die bekannte Gensequenz einschließt. Dieses Segment wird anschließend über intramolekulare Ligation zirkularisiert. Die Ligation wird dann als *template* in die PCR mit divergenten Primer (aus der bekannten Sequenz heraus) eingesetzt<sup>286</sup>. Für die Lokalisation der Integrationsstelle des Mini-Tn10-Transposons in *E. coli*-57 wurden die Enzyme *BspEI*, *BstXI*, *NcoI*, *BbsI*, *AatII*, *SaII*, *SapI*, *BlnI*, *NotI*, *BglI*, *PstI*, *BglII*, *KpnI* oder *SphI* aufgrund ihrer Schnittstellen im Transposon gewählt. Die Primer wurden in Abhängigkeit von der Restriktionsschnittstelle verwendet. Die PCR, mit auf die Schnittstellen im Transposon abgestimmten Primern, ergab keine Produkte. Ursächlich hierfür kann die Entfernung zwischen den jeweiligen Restriktionsschnittstellen sein und damit die Länge des Fragments. Sind die Enden eines DNA-Fragments zu weit voneinander entfernt, ist die Wahrscheinlichkeit gering, dass diese sich für eine Ligation finden und somit eine Zirkularisierung des Fragments stattfindet. Diese Zirkularisierung ist Voraussetzung für die Entstehung von PCR-Produkten. Eine weitere Ursache für dieses Ergebnis kann ein unvollständiger Restriktionsverdau sein. Schneidet das verwendete Restriktionsenzym die DNA nicht vollständig, so sind zu große DNA-Fragmente die Folge. Es kommt aufgrund des Abstands der Enden zu keiner Zirkularisierung.

Neben inverser PCR wurde auch die Methode der RS-PCR zur Lokalisation der Integrationsstelle des Mini-Tn10-Transposons verwendet<sup>249</sup>. Die Sequenzierung der bei dieser Methode erhaltenen PCR-Produkte ergab neben der Transposonsequenz zwischen 50–200 bp lange DNA-Fragmente. Diese Fragmente zeigten laut dem Programm NCBI Blast keine signifikante Ähnlichkeit zu der Sequenz aus *E. coli*.

Längere Elongationszeiten bei der RS-PCR ergaben keine längeren Produkte. Vermutlich liegen die Restriktionsschnittstellen, die für die RS-Primer als Erkennungssequenz dienten, zu nahe an der Transposon-Integrationsstelle. Es wurden 12 verschiedene Restriktionsschnittstellen als Erkennungssequenz für die Primer gewählt. Es wäre möglich über weitere RS-PCRs mit anderen RS-Primern die Integrationsstelle des Mini-Tn10-Transposons zu lokalisieren.

## 5.4 Phänotypische Eigenschaften von *E. coli*-57, *E. coli*-32 und dem Wildtyp *E. coli*-4 im Vergleich

### 5.4.1 Biochemische Eigenschaften

Die Ergebnisse aus der Überprüfung der biochemischen Fähigkeiten mittels Phoenix®- und API E20-System zeigten, dass bei *E. coli*-32 und *E. coli*-57 im Vergleich zu *E. coli*-4 kein Unterschied in den biochemischen Eigenschaften besteht. Dieses Ergebnis lässt vermuten, dass die Integration des *gfp* und der Kanamycin-Resistenzkassette über Transposonmutagenese zu keiner Störung eines für die untersuchten Stoffwechselwege wichtigen Gens geführt hat.

### 5.4.2 Wachstum

Als Indikator für die Konkurrenzfähigkeit wurde das Wachstum der markierten Stämme *E. coli*-57 und *E. coli*-32 untersucht. Sowohl schlechteres Wachstum als auch verminderte Adhärenz der markierten Stämme führen zu einer Abnahme der Konkurrenzfähigkeit. Die Folge ist eine schlechte Detektion des markierten Stammes innerhalb der Kotflora, da er sich gegenüber dieser nur sehr schwer durchsetzen kann.

Die markierten Stämmen *E. coli*-57, *E. coli*-32 und der Wildtyp *E. coli*-4 zeigten unter aeroben Bedingungen keinen Unterschied im Wachstum. Da im Darm der Ratte anaerobe Verhältnisse herrschen und in *E. coli* dadurch andere Stoffwechselwege als in aerober Umgebung ablaufen, war auch die Untersuchung des Wachstums unter anaeroben Bedingungen wichtig. Auch unter anaeroben Bedingungen war kein Unterschied im Wachstum zwischen den einzelnen Stämmen zu erkennen.

Bei dem Vergleich des aeroben mit dem anaeroben Wachstums von *E. coli*-57, *E. coli*-32 und dem Wildtyp *E. coli*-4 war eine geringe Veränderung des Wachstums zu erkennen. Die Wachstumsrate unter anaeroben Bedingungen war leicht erhöht gegenüber der Rate unter aeroben Bedingungen. Ein Grund hierfür ist vielleicht, dass die unter aeroben Wachstumsbedingungen von *E. coli*-57 gebildeten toxischen Produkte wie Wasserstoffperoxid, Superoxid sowie Hydroxylradikale nicht ausreichend entgiftet werden konnten<sup>120</sup>. Ein weiterer Grund für den Wachstumsunterschied zwischen aeroben und anaeroben Bedingungen kann die schlechte Löslichkeit von Sauerstoff in Flüssigkeiten sein. Dieser kann nach Verbrauch nur durch Diffusion ersetzt werden kann<sup>179</sup>. Da die Wachstumsversuche von *E. coli*-57, *E. coli*-32 und dem Wildtyp *E. coli*-4 ohne Schütteln durchgeführt wurden, war keine ausreichende Sauerstoffversorgung der Keime gegeben und die Mikroorganismen konnten nicht unter optimalen aeroben Bedingungen ihr Wachstumsverhalten zeigen. Die anaeroben Kulturen hatten optimale Bedingungen. Mit Hilfe von Parafin wurde die Diffusion des Sauerstoffs in das Medium verhindert. Außerdem wurde

für die Untersuchung des Wachstums unter anaeroben Bedingungen Thioglykolat verwendet. Dieses Medium schafft ein reduzierendes Milieu und ist mit einem Redoxindikator versetzt. Dieser Farbstoff verändert in Gegenwart von Sauerstoff seine Farbe und zeigt somit an ob und wie weit Sauerstoff in das Medium eingedrungen ist <sup>40,179</sup>.

### 5.4.3 Antibiotikaresistenz

Die minimalen Hemmkonzentrationen von *E. coli*-57 und *E. coli*-32 gegenüber Ciprofloxacin, Moxifloxacin, Chloramphenicol und Doxycyclin zeigten keinen Unterschied zu den MHKs von *E. coli*-4. Daraus kann man schließen, dass keines der die minimale Hemmkonzentration gegenüber den Antibiotika verursachenden Gene von der Integration des Transposons betroffen war.

### 5.4.4 Organic solvent tolerance

*Organic solvent tolerance* (OST) wird bei *E. coli* meist vermittelt durch Überexpression des Effluxsystems AcrAB-ToIC <sup>8,11,305</sup>. Auch das paraloge System AcrEF-ToIC kann an der Ausbildung von OST beteiligt sein <sup>140</sup>.

In Bezug auf die *organic solvent tolerance* zeigte sich zwischen den Klonen *E. coli*-57, *E. coli*-32 und dem Wildtypstamm *E. coli*-4 kein Unterschied. Dieses Ergebnis legt nahe, dass durch die chromosomale Markierung bei *E. coli*-57 und *E. coli*-32 kein für die Effluxsysteme AcrAB-ToIC und AcrEF-ToIC kodierendes oder regulierendes Gen in seiner Funktion gestört wird.

### 5.4.5 Adhärenz

Um sich in einem Kompartiment des Wirtsorganismus auf Dauer niederlassen zu können, muss ein Bakterium die Fähigkeit besitzen, Bindungsstellen an der Zellmembran zu finden und an diesen zu adhären. Auf diese Weise können z. B. Bakterien, die den Urogenitaltrakt besiedeln, verhindern, durch den Harnfluss weggespült zu werden. Auch wird die massive Besiedlung mit adhärenen Darmbakterien auf der Epitheloberfläche des Intestinaltraktes als Schutzmechanismus gegen pathogene Keime angesehen. Dabei bilden apathogene Darmbakterien eine Art Schutzschicht auf dem Epithel und halten somit mögliche Bindungsstellen für Pathogene besetzt. Auch im Zusammenhang mit probiotischen Bakterien ist ein starkes Adhäsionsvermögen immer wieder als wichtiges Selektionskriterium genannt worden <sup>77</sup>. Als *in vitro*-Modell zur Adhäsionsprüfung dienen meist die intestinalen Epithelzelllinien Caco-2 sowie HT-29 <sup>211</sup>.

In dieser Arbeit wurden im Zelladhäsionsassay HT-29-Zellen verwendet. Bei den Untersuchungen von *E. coli*-57, *E. coli*-32 und dem Wildtyp *E. coli*-4 zeigte sich bei *E. coli*-32

eine stärkere Adhärenz im Vergleich zu *E. coli*-4. *E. coli*-57 unterschied sich in seinem Adhärenzverhalten nicht von dem Wildtyp *E. coli*-4.

In den Versuchen dieser Arbeit wurde auch deutlich, dass bei den getesteten Stämmen *E. coli*-57, *E. coli*-32 und dem Wildtyp *E. coli*-4 die Fähigkeit zur Adhäsion vorhanden, wenn auch im Vergleich zur Positivkontrolle (*Citrobacter*) gering ausgeprägt ist.

Die Übertragung der Erfahrungen aus einem *in vitro*-Modell auf die Situation *in vivo* ist allerdings problematisch, da das Adhäsionsvermögen nicht nur von spezie- sondern auch von wirts- bzw. modellspezifischen Faktoren abhängen kann. Von Isolauri *et al.* wurde bereits angedeutet, dass auch Stämme, die *in vitro* kein starkes Adhäsionsvermögen zeigen, dennoch ein hohes Maß an Kompetitivität mit anderen Keimen aufweisen können<sup>118</sup>.

Bei Untersuchungen des probiotischen Stammes *E. coli* Nissle zeigte sich diese Abhängigkeit der Adhärenz von modell- sowie wirtsspezifischen Faktoren<sup>26,169</sup>.

Hierbei können z. B. unterschiedliche Differenzierungsgrade der verwendeten Zelllinien eine Rolle spielen oder die Palette an exprimierten Oberflächenmolekülen. Auch die komplexeren Bedingungen *in vivo* wie verschiedene Zelltypen und eine breite Darmflora unterschiedlicher Ausprägung im System können das Adhärenzvermögen eines Keims verändern.

Obwohl die Adhärenzfähigkeit *in vitro* nur eine geringe Aussage zu der Adhärenz *in vivo* zulässt, wurde der Klon *E. coli*-57 im Selektionsmodell Ratte eingesetzt, da dieser Klon keine Veränderung des Adhärenzverhaltens im Vergleich zu dem Wildtyp *E. coli*-4 *in vitro* zeigte.

## 5.5 Tierversuch

In diesem Teil der Arbeit wurde der Darm von Fischer-Ratten mit dem Reporterstamm *E. coli*-57 kolonisiert. Ohne Selektionsdruck war die Kolonisation des Rattendarms über sechs Monate lang stabil. Während einer Therapie mit Fluorchinolonen (Ciprofloxacin) sollte die Resistenzentwicklung des markierten *E. coli*-57 beobachtet werden. Die hierbei aus dem Kot der Ratten isolierten Klone *E. coli*-4o1 und *E. coli*-4o2 zeigten zwar Kanamycin-Resistenz, aber keine Fluoreszenz, was auf den Verlust der *gfp*-Reportergergenkassette hindeutet. Die MHK gegenüber Ciprofloxacin der isolierten Klone *E. coli*-4o1 und *E. coli*-4o2 zeigte im Vergleich zu *E. coli*-57 keine Veränderung.

### 5.5.1 Auswirkungen der Kolonisation des Rattendarms mit *E. coli*-57 auf die Normalflora

Vor als auch nach der Kolonisation war in der Zusammensetzung der Darmflora kein signifikanter Unterschied zu erkennen. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass die einmalige Anwendung von Kanamycin nur einen geringen Einfluss auf den Gesamtstatus hatte. Auch ein übermäßiges Durchsetzungsvermögen von *E. coli*-57 gegenüber den anderen Keimen

kann ausgeschlossen werden, da die Keimzahl der Gram-negativen Bakterien vor und nach der Kolonisation keinen relevanten Unterschied zeigte und die Anzahl von *E. coli*-57 nicht variierte.

### 5.5.2 Stabilität von *E. coli*-57 innerhalb der Normalflora

In Arbeiten von Schultz *et al.* wurde ein probiotischer, plasmidisch mit *gfp* markierter *E. coli* Nissle in den Darm von Ratten eingebracht<sup>254,255</sup>. Nach 14 Tagen war der Nissle-Stamm in so geringer Konzentration vorhanden, dass er erst mit Hilfe von Selektionsdruck auf die Resistenzkassette des Plasmids aus der Mischkultur des Rattenkots isoliert werden konnte. Ein ebenfalls plasmidisch markiertes *E. coli*-Isolat aus der Ratte war ohne Selektionsdruck über 45 Tage stabil Teil der Normalflora<sup>254,255</sup>. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde in der vorliegenden Arbeit ein *E. coli*-Isolat aus der Ratte für die chromosomale Markierung verwendet. Durch eine bessere Adaptation und Adhäsionsmechanismen konnte der chromosomal markierte Stamm *E. coli*-57 über einen Zeitraum von sechs Monaten lang im Rattenkot nachgewiesen werden.

Die Gabe von Ciprofloxacin mit ansteigender Konzentration -von 20 µg/ml bis 640 µg/ml- verursachte eine Abnahme der Gram-negativen Keime und auch eine Abnahme des Kanamycin-resistenten *E. coli*-57. Am letzten Tag der Antibiose waren keine Gram-negativen Keime im Kot nachweisbar. Zwei Tage nach Beendigung der Antibiose konnten Kanamycin-resistente Keime (*E. coli*-4o1; *E. coli*-4o2) isoliert werden, die nach Induktion mit Arabinose keine Fluoreszenz zeigten. Die Ergebnisse der Rep-PCR und des Southern Blots deuten darauf hin, dass es sich um Stämme handelt, die eng miteinander verwandt sind. *E. coli*-4o1 und *E. coli*-4o2 wiesen einen kompletten Verlust des Reporter gens (*araBPr-gfp*) auf, da bei keiner PCR zum Nachweis dieses Fragments oder Teile dieses Fragments Produkte entstanden. Auch sieben Tage nach Beendigung der Antibiotikagabe konnte der markierte Keim *E. coli*-57 nicht nachgewiesen werden. Da ohne Antibiose der markierte Keim *E. coli*-57 über sechs Monate lang im Darm der Ratte stabil war, muss ein direkter Zusammenhang zwischen der Ciprofloxacin-Gabe und dem Verlust des Reporter gens *araBPr-gfp* bestehen. Bei Ciprofloxacin handelt es sich um ein Antibiotikum, das aufgrund seiner Wirkung auf die Topoisomerasen II und IV einen Effekt auf das *supercoiling* der DNA hat. In Arbeiten von Peter *et al.* und Bagel *et al.* konnte gezeigt werden, dass eine Veränderung des Spiralisierungsgrades der DNA sowohl eine induktive als auch eine hemmende Wirkung auf die Genexpression haben kann<sup>14,223</sup>. Dieses Ergebnis legt nahe, dass es durch die Gabe von Ciprofloxacin zu einer Auflockerung der negativen Überspiralisierung der genomischen DNA von *E. coli*-57 kam. Dies führte wahrscheinlich zu einer Induktion der Genexpression von *gfp*. Diese Gfp-Expression während der

Darmpassage war offensichtlich für *E. coli*-57 ein Fitness-Nachteil und führte zu einer verminderten Konkurrenzfähigkeit. Vermutlich hat der markierte Keim *E. coli*-57 den Störfaktor – das Fragment araBPr-gfp – aus seinem Genom entfernt.

Eine weitere Ursache für den Verlust des Reportergens bei den isolierten Klonen *E. coli*-4o1 und *E. coli*-4o2 kann das Auslösen der gfp-Expression aufgrund einer Mutation im araB-Promotor sein. Dies kann zu einer kontinuierlichen Expression des gfp-Gens führen. Dadurch hat der markierte *E. coli*-57 einen Wachstumsnachteil. Um dies zu verhindern hat der *E. coli*-57 wahrscheinlich das araBPr-gfp-Fragment aus seinem Genom entfernt.

Auch der nicht realisierbare Selektionsdruck auf das gfp-Gen kann ein Grund für den Verlust des Reportergens sein. *E. coli* zeigen in Abhängigkeit von der Populationsstruktur, dem Lifestyle und der ökologischen Nische einen signifikanten Unterschied in ihren Genverlust-Raten<sup>106</sup>. Die Wahrscheinlichkeit des Verlusts der Kanamycin-Resistenzkassette ist aufgrund des dadurch erworbenen Selektionsvorteils eher gering. Der Verlust des Reportergens und nicht des gesamten Mini-Tn10-Transposons legt nahe, dass die Integration des Transposons kein essentielles Gen in dessen Funktionalität behindert.

### 5.5.3 Selektion von Ciprofloxacin-resistenten Keimen *in vivo*

Die nach der Antibiotikagabe aus dem Kot isolierten Kanamycin-resistenten, von *E. coli*-57 abstammenden *E. coli*-4o1 und *E. coli*-4o2 zeigten keine Erhöhung in ihrer MHK gegenüber Ciprofloxacin. Die Verwandtschaft dieser Stämme wurde durch ein identisches Rep-PCR-Muster bestätigt. Diese Ergebnisse legen nahe, dass es während der Antibiose durch spontane Mutationen zu keiner für die Resistenzentwicklung gegenüber Ciprofloxacin bedeutsamen Veränderung im Genom des *E. coli*-57 gekommen ist.

#### 5.5.3.1 Einfluss der Mutationsrate auf die Entstehung von Resistenz

Normalerweise treten Mutationen mit einer Wahrscheinlichkeit von  $10^{-9}$ - $10^{-12}$  pro Basenpaar auf<sup>30</sup>. Um einer Anhäufung von Mutationen entgegenzuwirken, haben Bakterien Mechanismen entwickelt, die der Korrektur von *mismatch nucleotides* dienen und die Genauigkeit der Replikation erhöhen. Das *mismatch repair system* (MMR) entfernt falsch zugeordnete Basen aus dem neu synthetisierten Strang und bewahrt die Sequenz mit der richtigen Base<sup>199</sup>. Mutationen innerhalb der Gene *mthLS*, *uvrD* und *dam*, die Teil des MMRs sind, können bei *E. coli* eine bis zu 1.000-fach höhere Mutationsrate als Wildtyp-*E. coli* verursachen. Diese Stämme werden Mutator-Stämme genannt<sup>155,190,199,200</sup>. Da die Mutationsrate eine zentrale Rolle bei der Entwicklung von Antibiotika-Resistenz spielt, können die Anwesenheit von Mutator-Stämmen innerhalb einer Bakterienpopulation die Entstehung von Resistenz-Mutationen verstärken<sup>92,200</sup>. Eine Verbindung zwischen hoher bakterieller Mutationsrate und schneller Resistenzentwicklung konnte bei *in*

*in vitro*-Experimenten und in Tiermodellen (*in vivo*) gezeigt werden<sup>92,250,280</sup>. Komp-Lindgren *et al.* konnten zeigen, dass eine hohe Mutationsrate von klinischen *E. coli*-Isolaten eine signifikante Rolle bei der Resistenzentwicklung durch Punktmutationen haben kann<sup>145</sup>. Bei Mutator-Stämmen aus der Gattung *Pseudomonas aeruginosa* konnte innerhalb einer dreitägigen Antibiotikatherapie eine sofortige Resistenzentwicklung gegenüber den zur Therapie verwendeten Antibiotika beobachtet werden<sup>216</sup>. Die Tatsache, dass Mutator-Stämme eher eine Akkumulation von Mutationen zeigen, kann auch zu einer höheren Sterberate aufgrund von letalen Mutationen führen<sup>93,190</sup>.

Theoretische und experimentelle Daten konnten auch zeigen, dass es unter bestimmten Bedingungen von Vorteil ist ein Mutator zu sein<sup>186,267,278</sup>. Aufgrund ihrer hohen Mutationsrate können sich Mutator-Stämme schneller an Umweltveränderungen anpassen als ein Wildtyp-Stamm<sup>282</sup>. Dadurch kann der Mutator-Stamm eine höhere Zelldichte in Zusammenhang mit adaptiven Mutationen erreichen, wenn diese einen Selektionsvorteil bedeuten<sup>60</sup>.

Cirz *et al.* konnten zeigen, dass Mutator-Stämmen von *E. coli* eine 800-fach höhere Mutationsrate aufweisen als normale Wildtyp-*E. coli*. Das Antibiotikum Ciprofloxacin verursachte bei *E. coli*-Mutator-Stämmen eine 4-fache Steigerung der Mutationsrate. Ciprofloxacin verursacht die Spaltung des LexA-Repressors. Dies führt über eine Aktivierung der SOS-Antwort zu einer Verringerung der 800-fachen Mutationsrate auf das 4-fache<sup>39</sup>.

Die unveränderte MHK gegenüber Ciprofloxacin bei *E. coli*-4o1 und *E. coli*-4o2 im Vergleich zu *E. coli*-57 deutet darauf hin, dass sich der markierte *E. coli*-57 nicht an die Ciprofloxacin-Konzentration über Mutation adaptiert hat. Dieses Ergebnis legt nahe, dass es sich bei *E. coli*-57 nicht um einen Mutator-Stamm handelt.

Um diese Vermutung zu bestätigen kann ein *mutation frequency assay* oder ein *mutation rate assay* durchgeführt werden. Bei diesen Assays wird Rifampicin am häufigsten verwendet, da Rifampicinresistenz durch eine von 69 verschiedenen Punktmutationen innerhalb des Zielgens *rpoB* vermittelt wird<sup>89,153</sup>. Der Unterschied in der Mutationsrate zwischen Wildtypstamm *E. coli*-4 und *E. coli*-57 kann bestimmt werden durch die Messung des phänotypischen Auftretens von Rifampicinresistenz. Ist bei *E. coli*-57 eine Erhöhung der Mutationsrate zu beobachten, so handelt es sich um einen Mutatorstamm.

Die Wahrscheinlichkeit der Resistenzentwicklung ist auch abhängig von der *target size*, das heißt wie viele Gene und Basenveränderungen eine Resistenz vermitteln<sup>190</sup>. Bei *E. coli* werden sieben Punktmutationen in dem Gen *gyrA* benötigt um eine Fluorchinolon-Resistenz zu verursachen, wobei nur drei Mutationen in *parC* zu einer Resistenz führen<sup>110,190</sup>. Eine

Akkumulation von Punktmutationen führt zu einer schrittweisen Erhöhung der MHK. Die einzelnen Mutationen in *gyrA* verursachen eine verschieden hohe Erhöhung der MHK vom ein- bis zum 19-fachen Wert des Ausgangsstammes<sup>87</sup>. Die Aminosäuresubstitution Ser83Leu in GyrA verursacht eine minimale Hemmkonzentration  $\geq 1 \mu\text{g/ml}$ <sup>82,295</sup>. Eine Doppelmutation in *gyrA* hat eine MHK von  $0,5 \mu\text{g/ml}$  zur Folge<sup>288</sup>.

Da sich keine Erhöhung der minimalen Hemmkonzentration gegenüber Ciprofloxacin bei *E. coli*-4o1 und *E. coli*-4o2 im Vergleich zu *E. coli*-57 zeigte, ist es offensichtlich zu keiner für die Resistenz gegen Ciprofloxacin relevanten Mutation gekommen.

### 5.5.3.2 Erwerb von Antibiotikaresistenz über horizontalen Gentransfer

Horizontaler Gentransfer kann durch den Austausch von Plasmiden, Transposons und chromosomaler DNA Resistenz vermitteln. Da keine Erhöhung der Ciprofloxacin-MHK von *E. coli*-57 und von *E. coli*-Isolaten aus dem Rattenkot vor der Ciprofloxacin-Gabe zu sehen war, ist es wahrscheinlich, dass keine genetischen, mobilen Elemente vorhanden sind, die eine Steigerung der Resistenz gegenüber Ciprofloxacin vermitteln können.

### 5.5.3.3 Auswirkung der Antibiotikum-Konzentration auf die Entstehung von resistenten *E. coli in vivo*

Drlica *et al.* zeigte, dass bei Fluorchinolonen die Konzentration des Antibiotikums für die Entstehung von resistenten Keimen eine entscheidende Bedeutung hat.

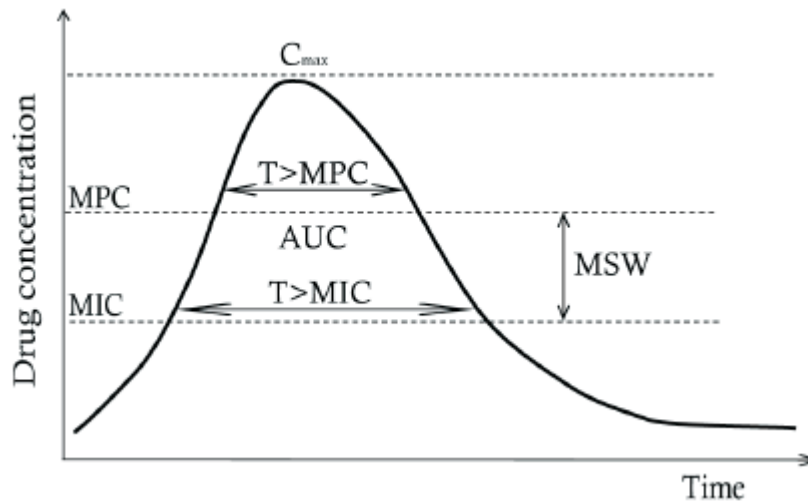
Der Konzentrationsbereich, der die Selektion auf resistente Einzelschrittmutanten unterstützt, wird als *mutant selection window* (MSW) bezeichnet. Außerhalb dieses Konzentrationsbereiches wird der Erwerb von Resistenz verringert oder sogar verhindert<sup>71,72,76</sup>. Diese Hypothese bestätigen *in vitro*-<sup>76,94</sup> und *in vivo*-Experimente<sup>4,55,81</sup>.

Almeida *et al.* konnten in einem Mausmodell beobachten, dass es zu keiner Selektion von resistenten *Mycobacterium tuberculosis* kommt, wenn eine Moxifloxacinkonzentration verwendet wird, die außerhalb des MSW liegt<sup>4</sup>. Cui *et al.* und Etienne *et al.* zeigten, dass eine Selektion von resistenten *Staphylococcus aureus* und *Streptococcus pneumoniae* ohne Ausnahme innerhalb des MSW erfolgt.

Basierend auf der Annahme, dass Mengen von  $1,77 \mu\text{g/g}$  bis  $64,36 \mu\text{g/g}$  Ciprofloxacin im Kot – das entspricht einer Ciprofloxacinkonzentration von  $0,1\text{--}3,7 \mu\text{g/ml}$  – nicht zu einer Konzentration innerhalb des *mutant selection windows* führte, ist das Ausbleiben einer Selektion von Mutanten mit veränderter Mindesthemmkonzentration eine logische Folge.

#### 5.5.3.4 Zeitraum bis zur Entdeckung von resistenten *E. coli in vivo*

Wie man in Abbildung 37 sehen kann, wird das MSW von der Konzentration des Antibiotikums und der Zeit nach der Fluorchinolongabe bestimmt.



**Abb. 38:** Schematische Darstellung des *mutant selection window* (MSW)

**Quelle:** Marcusson, L. Resistance to Fluoroquinolones in *Escherichia coli*: Prevention, Genetics and Fitness Costs

Bei Almeida *et al.* zeigten sich erst vier Wochen nach Ende der Gabe von Moxifloxacin resistente Keime von *Mycobacterium tuberculosis*<sup>4</sup>. Daher ist anzunehmen, dass der einwöchige Zeitraum nach der Antibiotikagabe für die Selektion von gegenüber Ciprofloxacin-resistenten *E. coli*-57 zu kurz war.

## 5.6 RT-PCR als Verfahren zu relativen Quantifizierung der Genexpression

Das Verfahren der RT-PCR hat den Vorteil mehrere Gene gleichzeitig in sehr kurzer Zeit vermessen zu können<sup>309</sup>. Ein weiterer Vorteil ist die hohe Sensitivität von PCR-Verfahren. Trotz Unsicherheiten in der Bestimmung aufgrund der unterschiedlichen Effizienz der Reversen Transkription und der PCR-Reaktion bei verschiedenen Ansätzen, die durch Normalisierung abgeglichen werden müssen, kann man in einer RT-PCR eine genauere Quantifizierung erreichen<sup>32</sup>. Daher wurde kein Northern Blot durchgeführt, trotz der besseren Spezifität im Vergleich zum in dieser Arbeit verwendeten LightCycler®-Verfahren mit SYBR Green.

Bei dem LightCycler®-Verfahren wird die gesamte doppelsträngige DNA im Ansatz erfasst<sup>203</sup>. Unspezifische PCR-Produkte und Primer-Dimere werden dabei ebenso erfasst wie das spezifische Produkt<sup>32</sup>. Die Messung einer Schmelzkurve dient als Qualitätskontrolle. Ein unspezifisches Produkt, wie z. B. Primer-Dimere in der Negativkontrolle, schmelzen bei einer niedrigeren Temperatur als ein spezifisches Produkt auf. In der Messkurve entsteht bei einer bestimmten Temperatur jeweils ein *peak* der Fluoreszenz<sup>32,203,309</sup>. Für die

durchgeführten Experimente musste gewährleistet sein, dass trotz z. T. geringer *template*-Konzentrationen kleine Unterschiede in der Expression zuverlässig quantifiziert werden. Aus diesem Grund wurde aus Verdünnungsreihen mit cDNA der jeweiligen Probe von 1:5, 1:10 und 1:50 die Effizienz der Umschreibung von RNA in cDNA bestimmt. Abweichungen vom idealen Faktor 2 kommen aufgrund von Schwankungen der *crossing points* und der daraus gebildeten Mittelwerte zustande<sup>203</sup>. Unsauberkeiten beim Pipettieren rufen, insbesondere bei niedrigen *template*-Konzentrationen, große Unterschiede in den *crossing points* hervor<sup>32</sup>. Neben Pipettierfehlern gehen statistisch erfassbare Schwankungen der *template*-Konzentration bei der RT-Reaktion in die Berechnung der Unterschiede ein, so dass die berechneten Faktoren des Transkriptionsunterschiedes mit großen Fehlern behaftet sind<sup>203</sup>. Fehler in der Vermessung der RNA vor dem Einsatz in die RT-Reaktion und verschiedene Effizienzen der Reversen Transkriptase aufgrund der Sekundärstruktur der RNA führen zu weiteren Unterschieden<sup>32,86</sup>. Um diese Unterschiede zu normalisieren, erfolgte eine Bestimmung der Konzentration der cDNA des *housekeeping*-Gens *gapA*, das unabhängig von äußeren Bedingungen in jeder Zelle gleich transkribiert wird<sup>32</sup>. Ohne Normalisierung der Messwerte würden dann z. T. sehr große Transkriptionsunterschiede vorgespiegelt, die tatsächlich auf unterschiedliche Konzentrationen von cDNA in der Probe beruhen<sup>86</sup>.

Bei dem *housekeeping*-Gen *gapA* handelt es sich um eines der am besten etablierten Standards für die Normalisierung. Dieses Gen kodiert für die Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase aus der Glykolyse und wird in jeder Zelle konstitutiv auf hohem Niveau transkribiert<sup>32</sup>. Fehler in der Bestimmung für ein Gen werden durch den Wert des *housekeeping*-Gens normalisiert.

In die Berechnung des Transkriptionsunterschieds eines Gens wurde die Effizienz der PCR-Reaktion miteinbezogen, da die Effizienz zweier Reaktionen selten identisch ist<sup>86</sup>. Kleine Veränderungen in der Effizienz bedingen einen großen Unterschied in den berechneten Werten, weshalb die Bestimmung der Effizienz der PCR-Reaktionen eine der größten Fehlerquellen darstellt<sup>203</sup>. Theoretisch ist ein Wert der Effizienz größer als zwei nicht möglich. Ergaben sich Werte größer als zwei und bestätigten sich diese in allen drei voneinander unabhängigen Versuchen, wurden sie dennoch zur Berechnung verwendet.

## 5.7 Auswirkungen von pharmazeutischen Substanzen auf den Efflux

Im Hinblick auf die Regulation von MarA, SoxS oder Rob bzw. der Strukturgene der Effluxsysteme sind bisher erst wenige Substanzen aus der Umwelt bekannt, die die Expression beeinflussen. So induziert Salizylat in therapeutisch genutzten Konzentrationen die Expression von MarA durch eine Aufhebung der MarR-Repression<sup>2,189</sup>, während

Paraquat durch die Oxidation von SoxR die Expression von SoxS fördert. Rob wird durch Decanoat und einige unkonjugierte Gallensäuren aktiviert<sup>243</sup>. Zudem wird seine Expression auf Transkriptionsebene durch SoxS beeinflusst<sup>197</sup>.

Außerdem verursacht Ethanol, „pine oil“, Naphthochinolone (Plumbagin), einige Gewürze, Haushaltsprodukte und Gallensalze (als mögliche natürliche Induktoren) Efflux-Phänotypen<sup>177,202,238,258,283</sup> und rufen z. T. einen MAR Phänotyp hervor. Im Falle von Salizylat ist die molekulare Wirkungsweise eines Induktors auf den *Uptake/Efflux*-Komplex weitgehend aufgeklärt<sup>47</sup>. Salizylat inaktiviert den Repressor MarR und verhindert dessen Bindung an die Operator-Region des *marRAB*-Operons. Infolge der dadurch gesteigerten Produktion des globalen Regulators MarA kommt es zu einer Verringerung der Produktion von Membranproteinen, wie OmpF und möglicherweise OmpC<sup>235,245</sup>, und einer gleichzeitigen gesteigerten Expression von AcrAB, was zu einer verringerten Akkumulation von Antibiotika in der Zelle führt<sup>177</sup>. Die von Salizylat induzierte OmpF-Reduktion wird durch die verstärkte Transkription der *antisense*-RNA *micF* gesteuert, deren Interaktion mit der *ompF*-mRNA die Translation verhindert<sup>235,245</sup>. Neben AcrAB-TolC wird zumindest die Transkription der Gene zweier weiterer MDR-Efflux-Pumpen (*emrAB* und *emrKY*) in *E. coli* von Salizylat, sowie zusätzlich von Tetrazyklin und Chloramphenicol induziert<sup>170,279</sup>.

Die gesteigerte Expression von MarA und AcrAB bei Anwesenheit von Salizylat konnte auch in dieser Arbeit über RT-PCR nachgewiesen werden. Es zeigte sich, dass es zu einer 3-fachen Expressionssteigerung von AcrAB in Abhängigkeit von der Salizylatkonzentration kommt. Die Expression von MarA konnte durch ansteigende Mengen an Salizylat erhöht werden. Aufgrund der Regulationsverhältnisse war eine Erhöhung der Transkription von *acrAB* bei erhöhter Transkription von *marA* zu erwarten.

Desweiteren konnte eine 1,5–2,5-fache Steigerung der relativen Genexpression (ratio) von *acrAB* nach Induktion mit Paracetamol oder Ketoprofen in dieser Arbeit gezeigt werden. Nach Induktion mit Paracetamol lag die relative Genexpression von *acrAB* bei einem Wert von 2,5 und nach Induktion mit Ketoprofen ergab sich der Wert 1,5. Diese Werte stellen keinen signifikanten Anstieg der Genexpression dar, da dieser Transkriptionsunterschied an den zur Berechnung verwendeten Effizienzen ( $> 2$ ) liegen kann. Auch Pipettierfehlern und Schwankungen in der *template* Konzentration können einen scheinbaren Anstieg der Expression zur Folge haben<sup>203</sup>. Die 1,5-fache Steigerung der Genexpression nach Induktion mit 70 %igem Ethanol war nicht überraschend, da diese Beobachtung bereits in der Literatur beschrieben ist<sup>115,177</sup>.

Der Anstieg der Genexpression von *marRA* durch Ibuprofen, Ketoprofen oder Paracetamol wird wahrscheinlich nicht durch die jeweilige Substanz selbst ausgelöst, sondern durch das Lösungsmittel 100 %iger Ethanol. Man sieht sowohl bei Ibuprofen, Ketoprofen und

Paracetamol als auch bei 100 % Ethanol als Induktor einen bis zu 7-fachen Anstieg der Genexpression.

Auch bei *acrD* konnte durch Gabe von ASS, Paracetamol und Ibuprofen ein Anstieg der Genexpression beobachtet werden. Dieser wurde vermutlich durch das jeweilige Lösungsmittel - bei ASS 70 %iger Ethanol, bei Paracetamol und Ibuprofen 100 %iger Ethanol - verursacht, da auch nach Induktion mit Ethanol eine Expressionssteigerung zu beobachten war.

Die Ergebnisse der RT-PCR von pCC1-robPr-gfp sind aufgrund der Probleme bei der Etablierung des Systems zweifelhaft. Starke Schwankungen in der Effizienz können zu einem scheinbaren Anstieg oder Abfall der Genexpression führen<sup>203</sup>.

Die Wachstumsuntersuchungen von *E. coli* TM EPI 300-Stämmen mit den pCC1-Reporter-Gen-Konstrukten wurden durchgeführt, da die Bindung von Regulationsfaktoren an den Promotor auf dem Reporter-Gen-Plasmid eine Veränderung der Regulation des chromosomalen Promotors zur Folge haben kann. Dadurch kann es zu Veränderungen in der Genexpression kommen. Diese Veränderung kann sich im Wachstumsverhalten von *E. coli* TM EPI 300 bemerkbar machen. Bei den *E. coli* TM EPI 300-Stämmen mit pCC1-*acrABPr-gfp*, mit pCC1-*acrDPr-gfp*, mit pCC1-*marRPr-Tgfp* und mit pCC1-*robPr-Tgfp* zeigte sich im nicht-induzierten Zustand kein Unterschied im Wachstumsverhalten. Dieses Ergebnis lässt die Vermutung zu, dass durch die zusätzliche Bindungsstelle für Regulationsfaktoren keine Veränderung der Expression von Genen, die mit dem Wachstumsverhalten in Verbindung stehen, verursacht wurde. Die Zugabe von Azetylsalicylsäure, Ibuprofen, Ketoprofen, Paracetamol, 70 %igem Ethanol und 100 %igem Ethanol zeigte bei allen vier *E. coli* TM EPI 300-Stämmen (mit pCC1-*acrABPr-gfp*, mit pCC1-*acrDPr-gfp*, mit pCC1-*marRPr-Tgfp* und mit pCC1-*robPr-Tgfp*) eine Hemmung des Wachstums. In der Reihenfolge 70 %iger Ethanol, 100 %iger Ethanol, Paracetamol, Ketoprofen, Ibuprofen und Azetylsalicylsäure nahmen die Wachstumsraten ab. Die stärkere Abnahme der Wachstumsrate bei Zugabe von Paracetamol, Ketoprofen, Ibuprofen und Azetylsalicylsäure ist auf die jeweilige Reinsubstanz zurückzuführen, da die Zugabe von 70 %igem oder 100 %igem Ethanol zu einer geringen Veränderung der Wachstumskurve führt.

### **5.8 Auswirkung von unterschiedlichen Salizylatkonzentrationen auf Virulenz und Adhärenz der *E. coli*-Stämme 1173 und 1267**

Bei diesen beiden *E. coli*-Stämmen handelte es sich um klinische Isolate, die aus einem Patienten nach Antibiotikatherapie gewonnen wurden. Das erste Isolat wird als Stamm 1173 bezeichnet, das zweite als Stamm 1267. Bei der Resistenzbestimmung wiesen die beiden

Stämme erhöhte MHK-Werte gegenüber Fluorchinolonen auf. Die Sequenzierung der Gene *gyrA* und *parC* ergab Veränderungen der Topoisomerasen, welche zu einer MHK-Erhöhung auf 16 mg/l führen können<sup>166</sup>. Die MHK-Werte gegenüber allen Fluorquinolonen des Stammes 1267 liegen um ein Vielfaches höher gegenüber den Werten von 1173. Der *E. coli*-Stamm 1173 zeigt im Vergleich zum sensiblen Kontrollstamm ATCC 25922 eine erhöhte MHK bei allen Antibiotika ausgenommen Imipenem, Chloramphenicol und Rifampicin. Zwischen den einzelnen klinischen Isolaten bestehen die größten Unterschiede in der MHK bei Fluorquinolonen, Chloramphenicol und Doxycyclin.

Das *E. coli*-Isolat 1267 zeigte im Vergleich zu 1173 in Gegenwart von Cyclohexan ein stärkeres Wachstum. Der Kontrollstamm *E. coli* ATCC 25922 zeigte kein Wachstum in der Anwesenheit von Cyclohexan. Microarray- und RT-PCR-Daten zeigten bei Stamm 1267 im Vergleich zu Stamm 1173 eine erhöhte Transkription von *marA* und folglich eine verringerte Transkription von *ompF*<sup>284</sup>.

Eine induzierende Wirkung von Salizylat auf den Efflux ist bereits in der Literatur beschrieben. Salizylat inhibiert den Repressor MarR. Als Folge wird der globale Regulator MarA verstärkt exprimiert<sup>47</sup>. Dies wiederum führt zu einer verringerten Expression von OmpF<sup>245</sup> und zu einer verstärkten Expression von AcrAB<sup>47</sup>. Die reprimierende Wirkung von Salizylat auf OmpF wird bei *E. coli* 1267 durch die Überexpression von MarA verstärkt. Diese beiden Tatsachen führen bei *E. coli* 1267 im Vergleich zum Stamm 1173 zu einer stärkeren Reduktion der Anzahl der OmpF-Porine in der äußeren Membran<sup>104,235,245</sup>. Dadurch wird der Einstrom von Salizylat verringert und somit sein induzierender oder reprimierender Einfluss auf die Genexpression gesenkt. Die Überexpression von AcrAB hat eine Steigerung des Efflux zur Folge. Dadurch wird der Ausstrom von Salizylat gefördert und wiederum die Wirkung von Salizylat auf die Genexpression verringert. Aus diesen Gründen zeigte sich wahrscheinlich die Unabhängigkeit der Adhärenz von der Salizylatkonzentration bei *E. coli* 1267. Für die Hypothese, dass sowohl Salizylat als auch die MarA-Überexpression eine Wirkung auf die Adhärenz haben, spricht auch die Tatsache, dass sowohl *E. coli* 1267 als auch *E. coli* 1173 gleiche Adhärenz im nicht-induzierten Zustand - ohne Salizylatzugabe - zeigten. Dieses Ergebnis spricht auch gegen einen starken Einfluss des LB-Mediums auf die Expression von OmpF. LB-Medium reprimiert die *lrp*-Genexpression um das 4–10-fache. Das Gen *lrp* kodiert für das *leucine responsive regulatory protein* (Lrp). Dieses Protein hat sowohl eine Wirkung auf OmpF, als auch auf die Fimbriengencuster *fim*<sup>25</sup>, *pap*<sup>27,292</sup> und *sfa*<sup>293</sup>. In Leucin-reichen Medien, wie z. B. im LB-Medium wird die Genexpression von *lrp* durch Leucin reprimiert. Diese Repression hat eine Verringerung der Genexpression von den drei Fimbriengencustern und von *ompF* zur Folge<sup>33</sup>. Da sich im nicht-induzierten Zustand sowohl bei *E. coli* 1267 als auch bei *E. coli* 1173 gleiches Adhärenzverhalten zeigt, spielt die

Regulation durch Lrp bei den Fimbriengenen und bei *ompF* wahrscheinlich eine geringe Rolle. Hätte Lrp eine starke Wirkung auf Fimbriengene und *ompF*, so müsste auch im nicht-induzierten Zustand ein Unterschied zwischen dem MarA-überexprimierenden *E. coli* 1267 und *E. coli* 1173 zu sehen sein.

Von Salizylat ist auch eine Wirkung auf die Flagellen- und Fimbrienbildung bekannt. Durch Fimbrien, Außenmembranproteine (*outer membrane proteins*, OMPs) und andere Adhäsine wird *E. coli* die Adhärenz an Epithelien ermöglicht<sup>149</sup>.

P-Fimbrien werden häufig mit akuter, unkomplizierter Nierenbeckenentzündung in Verbindung gebracht. Källenius *et al.*<sup>126</sup> konnten diese bei über 90 % der Stämme nachweisen, die dieses Krankheitsbild verursachten, während bei den Krankheitsbildern „Zystitis“ oder „asymptomatische Bakteriurie“ nur jeweils 20 % der Stämme diese Fimbrienart besaßen. Das Gencluster der P-Fimbrien besteht aus elf Genen<sup>127</sup>. Für die Bindung an die  $\alpha$ Gal- $\beta$ -(1-4)-Gal-haltigen Glykolipidrezeptoren der Uroepithelzellen und Endothelzellen der Nieren ist die PapG-Untereinheit verantwortlich<sup>311</sup>. Aufgrund der Tatsache, dass kein Gen aus dem P-Fimbriengencluster über den durchgeführten *Microarray* auf Anwesenheit und auf Expressionsstärke hin überprüft werden konnte, wurde auf eine weitere Untersuchung dieser Gene bei *E. coli* 1173 und *E. coli* 1267 verzichtet.

Nicht nur bei UPEC, sondern auch bei einer Vielzahl von anderen Enterobakterien werden Typ-1-Fimbrien häufig gefunden. Typ-1-Fimbrien sind für die Bindung an Rezeptoren des Harntrakts und des Gastrointestinaltrakts verantwortlich<sup>271</sup>. Im Harntrakt ist dieser Fimbrientyp Voraussetzung für Persistenz und Wachstum in dieser Nische<sup>217</sup>. Die FimH-Untereinheit ist für die Bindung an mannosehaltige Rezeptoren verantwortlich. Punktmutationen innerhalb von *fimH* können die Bindungskapazität und somit die Virulenz der Erreger steigern<sup>9</sup>. Holden *et al.* konnten zeigen, dass die Expression von Genen des Typ-1-Fimbriengenclusters (bestehend aus den Genen *fimA–fimI*) durch PapB, eine Untereinheit des P-Fimbriengenclusters, bei normaler Wildtyp-Expression inhibiert wird<sup>109</sup>. Da *fimH* über *Microarray* weder bei *E. coli* 1173 noch bei *E. coli* 1267 nachgewiesen werden konnte, liegt die Vermutung nahe, dass die Expression von PapB zu einer Inhibierung der *fim*-Genexpression führt. Aus diesem Grund wurde das *fim*-Gencluster in die Untersuchung des Zusammenhangs zwischen Adhärenz und Salizylatgabe nicht mit einbezogen.

Neben den P-Fimbrien und den Typ-1-Fimbrien werden noch so genannte S-Fimbrien (Sfa) bei uropathogenen *E. coli* gefunden. Das S-Fimbriengencluster besteht aus neun Genen (*sfaA–sfaH* und *sfaS*). S-Fimbrien können bei *E. coli* aus verschiedenen Habitaten nachgewiesen werden<sup>220</sup>. Ihre sialinsäurehaltigen Rezeptoren finden sich nicht nur im Harntrakt, sondern auch im Gehirn, so dass S-Fimbrien auch häufig bei *E. coli*-Isolaten der

Neugeborenenmeningitis nachgewiesen werden<sup>101</sup>. Eine geringe klinische Relevanz zeigt sich bezüglich Nierenbeckenentzündungen und Harnwegsinfektionen<sup>156</sup>.

Neben der geringen Repression der *sfa*-Genexpression durch das LB-Medium<sup>33,293</sup> ist auch eine inhibierende Wirkung von  $\beta$ -Lactoglobulin auf die Expression von Sfa bekannt<sup>221</sup>.

Da die Gene *sfaD* und *sfaE* sowohl bei *E. coli* 1173 als auch bei *E. coli* 1267 im Microarray nachweisbar waren, wurden sie in die nähere Betrachtung des Zusammenhangs von Adhärenz und Salizylatgabe mit einbezogen. Die Gene *sfaD* und *sfaE* sind in die Biogenese der S-Fimbrien involviert. Bei der Zugabe von Salizylat in unterschiedlichen Konzentrationen zeigte sich bei *E. coli* 1173 keine Veränderung in der Genexpression. Dies lässt vermuten, dass die *sfa*-Genexpression von Salizylat nicht beeinflusst wird und somit nicht verantwortlich ist für die Abnahme der Adhärenz von *E. coli* 1173 an HT-29-Zellen.

Auch die Motilität von *E. coli* spielt eine wichtige Rolle bei der Adhäsion, Biofilmformierung und Kolonisation von einem Wirt oder Zielorgan<sup>230</sup>. Für die Flagellensynthese werden fast 50 Gene und viel Energie benötigt<sup>144</sup>. Daher unterliegt die Synthese von Flagellen einer strengen Regulation durch Außenfaktoren wie z. B. Temperatur, Osmolarität, pH oder Interaktion des *E. coli* mit dem Wirt<sup>162,178,261,272</sup>. Das Hauptoperon für die Regulation der Flagellensynthese bei *E. coli* ist *flhDC*, welches für den Transkriptionsaktivator FlhD<sub>2</sub>C<sub>2</sub> kodiert<sup>143</sup>. Dieser Aktivator beeinflusst die Expression der Gene für die Regulation des Flagellenaufbaus und für die Flagellenmotorproteine *motA* und *motB*, sowie diejenigen Gene, die für die Chemotaxis zuständig sind<sup>144</sup>. FlhD<sub>2</sub>C<sub>2</sub> hat auch eine Wirkung auf das Gen *fliA*, welches für den Faktor  $\sigma^{28}$  kodiert. Dieser Faktor wird speziell für die Expression von Flagellenproteinen (Flagellin), Motor- und Chemotaxisproteinen benötigt<sup>213</sup>. Die Expressionsabnahme von *fliA* bei *E. coli* 1267 hängt wahrscheinlich mit der Überexpression von *marA* zusammen. Bei *Salmonella choleraesuis* konnte neben dieser Beobachtung auch eine Abnahme der Adhärenz an Caco-2-Zellen gezeigt werden. Diese wurde durch eine Abnahme der Motilität und der Flagellinproduktion verursacht (<http://proquest.umi.com/pqdlink?did=1115102061&Fmt=7&clientI%20d=79356&RQT=309&VName=PQD>).

Aufgrund der Abnahme der *fliA*-Expression, verursacht durch die MarA-Überexpression bei *E. coli* 1267 (Daten Microarray), wäre im Vergleich zu *E. coli* 1173 neben einer Abnahme der Adhärenz auch eine Abnahme in der *motA*- und *motB*-Expression zu erwarten, da sowohl *motA* und *motB* als auch *fliA* unter der Regulation von *flhDC* stehen. Bei *motA* zeigte sich eine Abnahme der Expression bei dem Stamm 1267 im Vergleich zu dem Isolat 1173. Keine Veränderung der Genexpression zeigte sich bei *motB*. Aufgrund der Tatsache, dass *motA* und *motB* unter gleicher Kontrolle stehen, ist anzunehmen, dass es auch bei *motB* zu einer Transkriptionsabnahme gekommen ist, die im Microarray aufgrund einer Ungenauigkeit nicht beobachtet wurde.

Bei *E. coli* 1173 konnte die Beobachtung gemacht werden, dass durch steigende Salizylatkonzentrationen die MarA-Expression zunimmt und die Adhärenz abnimmt. Bei *E. coli* 1267 kam es trotz der Überexpression von MarA und der Gabe von Salizylat im Zelladhäsionsassay zu keiner Verringerung der Adhärenz. Dieses Ergebnis legt nahe, dass die Ausbildung von Adhärenz unter der Kontrolle einer komplexen Regulation steht. MarA verursacht wahrscheinlich als eine Art Repressor eine Abnahme der Adhärenz.

In Bezug auf die Flagellensynthese konnte Kunin *et al.* zeigen, dass in der Anwesenheit von Salizylat und der dadurch verursachten Steigerung der MarA-Expression keine Flagellinproduktion stattfindet<sup>148</sup>.

Die LightCycler®-Ergebnisse in der vorliegenden Arbeit zeigten, dass in *E. coli* 1173 Salizylat keine Auswirkung auf die Genexpression von *motB* hat. Daher ist *motB* vermutlich nicht für die Abnahme der Adhärenz – durch Salizylat ausgelöst – verantwortlich.

Es besteht nicht nur ein Zusammenhang zwischen Salizylat und der Fimbrien- oder Flagellenproduktion, sondern auch zwischen Salizylat und Virulenzfaktoren. Salizylat verursacht bei *Klebsiella pneumoniae* eine Verminderung der Proteinproduktion für die Polysaccharid-Kapsel<sup>67</sup>. Bei *Staphylococcus aureus* bewirkt Salizylat eine Reduktion der *hlyA*-Expression<sup>150</sup>. *HlyA* kann auch bei *E. coli* im Genom vorhanden sein. Die phänotypische Testung der *E. coli*-Isolate 1173 und 1267 auf Salizylat-haltigem Blutagar zeigte keine Hämolyse. Dies lässt vermuten, dass es sich um eine schwache Induktion der *hlyA*-Transkription handelt oder dass das Gen *hlyA* bei den Isolaten nicht vorhanden ist.

Eine weitere mögliche Ursache für die geringe Expression oder das Fehlen des *hlyA*-Gens bei *E. coli* 1173 und bei *E. coli* 1267 ist, dass eine Interferenz zwischen den Regulationsmechanismen für die Produktion von HlyA und HlyE vermutet wird. Aus diesem Grund können nicht beide Gene im *E. coli*-Chromosom vorhanden sein<sup>133</sup>. Das Gen *hlyA* konnte über den Microarray nicht ausgetestet werden. Die Untersuchung des Gens *hlyE* im Microarray zeigte eine deutliche Expression von *hlyE* sowohl bei *E. coli* 1173 als auch bei *E. coli* 1267. Das Gen *hlyE* kodiert für ein Poren-bildendes Toxin und kommt in *E. coli*<sup>12,63,83,173,218,219,299</sup> und in den *Salmonella enterica* Serovaren Typhi und Paratyphi vor<sup>174</sup>. Ein funktionelles *hlyE*-Gen ist auch in dem nicht-pathogenen *E. coli* K12 vorhanden, allerdings wird es unter normalen Laborbedingungen nur auf niedrigem Niveau produziert<sup>173,304</sup>. Erst durch eine verstärkte Expression kann HlyE in Epithelzellen die Ca<sup>2+</sup>-Signaltransduktion beeinflussen, Apoptose von menschlichen und von aus der Maus stammenden Makrophagen induzieren und Hämolyse von menschlichen Erythrozyten verursachen<sup>151,269,270</sup>. Die Zugabe von Salizylat in unterschiedlichen Konzentrationen verursachte keine Veränderung in der *hlyE*-Genexpression von *E. coli* 1173. Dieses Ergebnis lässt vermuten, dass Salizylat keine Wirkung auf die Expression von HlyE hat.

## 5.9 Auswirkung von Pharmazeutika auf die MHK gegenüber Gentamicin, Norfloxacin und Ampicillin

Bei Gentamicin handelt es sich um ein Antibiotikum aus der Gruppe der Aminoglykoside. Gentamicin ist ein sekundäres Stoffwechselprodukt von *Micromonospora*. Über die Blockierung der A-Stelle am Elongationsribosom wird die Bildung des für die Proteinbiosynthese notwendigen Initiationskomplexes verhindert und somit kommt es zu einer Störung in der Translation<sup>141</sup>. In einer Deletionsstudie konnte gezeigt werden, dass in *E. coli* die Expression der RND-Pumpe (*resistance-nodulation-division*) *acrD* für die Resistenz gegen Aminoglykoside wie Gentamicin verantwortlich ist<sup>244</sup>.

Bei der Zugabe von Azetylsalizylsäure zeigte sich bei den beiden Laborstämmen *E. coli* DH10B und *E. coli* TOP10 kein Wachstum auf der Platte. Das Lösungsmittel von Azetylsalizylsäure war Ethanol. Da auf der Platte mit Ethanol in unterschiedlichen Konzentrationen Wachstum zu sehen war, liegt die Vermutung nahe, dass für das Ausbleiben des Wachstums die Reinsubstanz Azetylsalizylsäure verantwortlich ist. Sowohl bei Wildtyp *E. coli* als auch bei Laborstämmen konnte dieses Phänomen des schlechteren Wachstums in Flüssigkultur beobachtet werden. Vermutlich führt die Induktion des Efflux durch Salizylat zu einer hauptsächlich auf Effluxpumpen ausgerichteten Proteinbiosynthese. Dadurch verringert sich wahrscheinlich die Wachstumsrate aufgrund von Proteinmangel.

Die Zugabe von Paracetamol, 100%igem Ethanol oder 70%igem Ethanol führte zu einer Erhöhung der Gentamicin-MHK um eine Titerstufe. Da die Auswertung des Etest® visuell erfolgte, sind Schwankungen um eine Titerstufe möglich.

Eine MHK-Erhöhung von fünf Titerstufen zeigte sich in der Anwesenheit von Ibuprofen. Wahrscheinlich handelt es sich bei Ibuprofen um eine Substanz, die auf die Genexpression der Effluxpumpe *acrD* eine induzierende Wirkung hat. Diese Vermutung konnte auch durch die Ergebnisse des Screening-Systems bestätigt werden. Die Inkubation mit Ibuprofen verursachte eine eindeutige Fluoreszenz bei dem das Konstrukt pUC-*acrDPr-gfp* enthaltenden *E. coli*. Auch eine Abhängigkeit der Fluoreszenz von der Ibuprofenkonzentration konnte beobachtet werden. Bei 1–2 mM Ibuprofen zeigte sich keine Fluoreszenz. Von 3–5 mM Ibuprofen war eine eindeutige Fluoreszenz zu sehen, ab 6 mM konnte aufgrund von ausbleibendem Wachstum die Fluoreszenz nicht bestimmt werden. Auch im LightCycler® war eine Steigerung der *gfp*-Expression bei pCC1-*acrDPr-gfp* durch die Zugabe von Ibuprofen zu beobachten. Diese Ergebnisse lassen die Vermutung zu, dass Ibuprofen ein Induktor für *acrD* ist oder eine Wirkung auf das Regulationssystem von *acrD* hat.

Norfloxacin zählt wie Ciprofloxacin zu der Gruppe der Fluorchinolone. Es hemmt neben der Topoisomerase II (DNA-Gyrase) auch die Topoisomerase IV. Resistenz von *E. coli* gegen Norfloxacin wird durch die Effluxpumpe NorE vermittelt<sup>46,314</sup>. Die minimale Hemmkonzentration von Norfloxacin veränderte sich nicht oder nur um eine Titerstufe durch die Zugabe von 70 %igem Ethanol oder 100 %igem Ethanol. Im Screening-System konnte nur unter der Verwendung eines Translationsverstärkers ein induktiver Effekt von Ethanol auf die *gfp*-Expression bei pUC-norEPrII-Tgfp beobachtet werden. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass Ethanol auf die Expression von *norE* einen geringen Einfluss hat. Daher führt die Anwendung von Ethanol wahrscheinlich nicht zu einer klinisch relevanten MHK-Erhöhung. Die Minimale Hemmkonzentration gegen Norfloxacin wurde von Paracetamol um ein dreifaches erhöht. Die Auswertung der Ergebnisse des visuellen Screening-Systems zeigte ebenfalls, dass Paracetamol eine induzierende Wirkung auf die *gfp*-Expression des Plasmids pUC-norEPrII-Tgfp hat. Da die Verwendung von Ethanol zur Induktion des *norE*-Promotors eine nicht signifikante Wirkung zeigte, ist wahrscheinlich Paracetamol für die MHK-Erhöhung verantwortlich. Die induzierende Wirkung von Paracetamol kann eine direkte Wirkung auf den Promotor haben oder die Regulatoren des *norE*-Promotors beeinflussen.

Bei Ibuprofen zeigte sich eine MHK-Erhöhung gegenüber Norfloxacin. Die minimale Hemmkonzentration wurde um ein vierfaches erhöht. Die Vermutung, dass Ibuprofen eine induzierende Wirkung auf den *norE*-Promotor hat konnte auch durch die Ergebnisse des Screening-Systems bestätigt werden. Mit Ibuprofen war eine eindeutige Fluoreszenz bei dem das Konstrukt pUC-norEPrII-Tgfp enthaltenden *E. coli* zu beobachten.

Da Ibuprofen sowohl eine Wirkung auf die MHK gegen Norfloxacin als auch gegen Gentamicin hat, besteht die Möglichkeit, dass Ibuprofen eine Wirkung auf einen gemeinsamen Regulator von *norE* und *acrD* hat.

Coban *et al.* machten bei *Salmonella enterica* die Beobachtung, dass ein Defekt in AcrAB oder SoxRS zu keiner Veränderung der MHK gegenüber Chinolonen führt, wenn Ibuprofen als Induktor verwendet wird (Ausnahme Levofloxacin). Bei Wildtyp-*E. coli* zeigte sich ein 2-8-facher Anstieg der MHK gegenüber Chinolonen durch Zugabe von Ibuprofen<sup>43</sup>. SoxS ist ein positiver Regulator des *mar*-Operons. Durch die Bindung von SoxS an *marO* wird die *marRAB*-Transkription aktiviert. Die Folge ist eine gesteigerte Expression des Effluxpumpensystems AcrAB-TolC<sup>97</sup>. Dadurch kommt es zu einer Erhöhung der MHK gegenüber Chinolonen. Aufgrund der Homologie von *acrB* zu *acrD*<sup>207,247</sup> kann die Aktivierung der Transkription von *marRAB* eine Steigerung der AcrD-Expression

verursachen. Da AcrD laut einer Deletionsstudie für Aminoglykosidresistenz verantwortlich ist, folgt der AcrD-Expressionssteigerung eine Erhöhung der MHK gegenüber Gentamicin<sup>244</sup>. Die Regulation der *norE*-Transkription bei *E. coli* ist bisher in der Literatur nicht beschrieben. Eine weitere Ursache für die Änderung der minimalen Hemmkonzentrationen kann die Wirkung von Ibuprofen auf die Expression des Außenmembranproteins OmpF sein. Eine verringerte Expression von OmpF führt zu einer Verringerung der intrazellulären Menge an Gentamicin oder Norfloxacin. Dies hat allerdings nur eine geringe Veränderung der MHK zur Folge<sup>48</sup>. Daher ist es wahrscheinlich, dass Ibuprofen nicht nur auf die *ompF*-Expression einwirkt, sondern auch Gene in deren Expression beeinflusst, die im Efflux und in der Membranpermeabilität eine Rolle spielen.

Die minimale Hemmkonzentration gegenüber Ampicillin veränderte sich bei der Zugabe von Paracetamol, 100 %igem Ethanol und 70 %igem Ethanol um eine Titerstufe. Diese MHK-Veränderung ist aufgrund des visuellen Auswertungsverfahrens als nicht signifikant einzustufen.

## 6 **Ausblick**

Die Kolonisation des Rattendarms mit *E. coli*-Stämmen, die durch ein Reporter-gen (*gfp*) chromosomal markiert sind, bietet die Möglichkeit eines direkten phänotypischen und genotypischen Vergleichs des sensiblen Ausgangsstammes mit einem rekultiviertem Isolat, das im Laufe einer Antibiotika-Therapie im Kontext der Normalflora diese Empfindlichkeit verloren hat.

Aufgrund des Verlustes der *gfp*-Reporter-genkassette bei *E. coli*-57 nach Durchlauf der Darm-passage unter Antibiose muss ein Wildtypstamm mit einem anderen Reporter-gen z. B. *dsred* chromosomal markiert werden.

Mit derartig markierten Stämmen kann die Auswirkung unterschiedlicher Dosierungs-Schemata des Antibiotikums und die Wirkung von z. B. Aspirin auf die Resistenzentwicklung *in vivo* nachvollzogen werden.

Ciprofloxacin gehört zum Substratspektrum von MDR-Transport-Systemen in *E. coli*. Diese Effluxsysteme spielen sowohl bei der Ausprägung als auch bei der Entstehung von Fluorchinolon-Resistenz eine wichtige Rolle. Dementsprechend richtet sich ein zunehmendes Interesse auf die Regulation solcher Efflux-Systeme. Diese Arbeit zielte auf die Identifikation von induktiven Substanzen, die eine verstärkte Expression von spezifischen MDR-Transportern auslösen. So generierte Daten bilden die Grundlage für den langfristigen Erhalt der antimikrobiellen Aktivität vorhandener Fluorchinolone und eine Vermeidung von Resistenzentwicklung. Der Zusammenhang zwischen der induktiven Wirkung von Ibuprofen (5 mM) auf die Transkription von *acrD* und *norE* und die durch Ibuprofen verursachte MHK-Steigerung sollte unter Verwendung von Deletionsmutanten genauer untersucht werden.

Die Abnahme der Adhärenz von *E. coli* 1173 an HT-29 bei steigender Salizylatkonzentration (0 mM–20 mM) sollte im Vergleich zu der durch Salizylat unveränderten Adhärenz von *E. coli* 1267 mittels Transkriptom-Analyse untersucht werden. Die subtraktive Transkriptomanalyse solcher sehr eng verwandter Stämme mittels Microarray ermöglicht die Identifizierung quantitativer Veränderungen im Transkriptionsmuster. Da sich bei einer Salizylatkonzentration von 20 mM der Adhärenzunterschied am stärksten zeigte, sollte die für den Microarray benötigte RNA aus *E. coli* 1173 und *E. coli* 1267 isoliert werden, die mit 20 mM Salizylat induziert wurden.

## 7 Verzeichnisse

### 7.1 Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
A	Absent
Abb.	Abbildung
<i>acrB</i>	<i>acrB</i> -Gen
<i>acrABPr</i>	Promotor der <i>acrAB</i> -Gene
<i>acrEFPr</i>	Promotor der <i>acrEF</i> -Gene
<i>acrDPr</i>	Promotor des <i>acrD</i> -Gens
Amp	Ampicillin
<i>ara</i>	Gene des <i>ara<sub>BAD</sub></i> -Operons
<i>araBPr</i>	Promotor des <i>ara<sub>BAD</sub></i> -Operons
ASS	Azetylsalizylsäure
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
ATP	Adenosintriophosphat
BLAST	<i>Basic Linear Alignment Search Tool</i>
bp	Basenpaar
BSA	Bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CFU	<i>colony forming units</i>
Cip	Ciprofloxacin
CIP	Alkalische Phosphatase
cm	Zentimeter
cp	crossing point
d. h.	das heißt
DNA	Desoxyribnukleinsäure
DABCO	1,4-DiAzaBiCyclo[2.2.2]oktan
dATP	desoxyAdeninriphosphat
dCTP	desoxyCytosinriphosphat
ddUTP	didesoxyUracilriphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dGTP	desoxyGuanidinriphosphat
DNA	<i>desoxyribonucleic acid</i>
dNTPS	Nukleotid-Triphosphate
dsDNA	double strand DNA
dTTP	desoxyThymidinriphosphat
E	Effizienz
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EAEC	Enteraggregative <i>E. coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EHEC	Enterohämorrhagische <i>E. coli</i>
EPEC	Enteropathogene <i>E. coli</i>
ETEC	Enterotoxische <i>E. coli</i>
evtl.	eventuell
FACS	<i>Fluorescence Activated Cell Sorter</i>
Gati	Gatifloxacin
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
gDNA	genomische DNA
Gfp	<i>Green fluorescent protein</i>
ggf.	gegebenenfalls
h	Stunde

<b>Abkürzung</b>	<b>Bedeutung</b>
HK	Housekeeping-Gen
<i>hlyE</i>	<i>hlyE</i> -Gen
H <sub>2</sub> O	Wasser
<i>hsp</i>	Gene für Hitze-Schock-Proteine
<i>hspPr</i>	Promotor des Hitze-Schock-Gene
HU	heat unstable nucleoid protein
HUS	Hämolytisch-urämisches Syndrom
H-NS	histone-like nucleoid structuring protein
IHF	Integration Host Factor
kb	Kilobasenpaare
KBE	Koloniebildende Einheit
Km	Kanamycin
<i>lac</i>	Gene des Lactose-Operons
<i>lacPr</i>	Promotor des <i>lac</i> -Operons
LB	Luria-Bertani
LPS	Lipopolysaccharidschicht
LT	hitzelabil
M	Molar
<i>marA</i>	<i>marA</i> -Gen
<i>marRAPr</i>	Promotor des <i>marRA</i> -Operons
MOI	Multiplicity Of Infection
MPC	mutant prevention concentration
<i>mdfAPr</i>	Promotor des <i>mdfA</i> -Gens
MDR	multi drug resistance
<i>mdtHPr</i>	Promotor des <i>mdtH</i> -Gens
<i>mdtMPr</i>	Promotor des <i>mdtM</i> -Gens
MHK	Minimale Hemmkonzentration
MIAME	Minimum Information about a microarray experiment
min	Minute
mm	Millimeter
MMR	mismatch repair system
MOPS	Morpholinethan Sulfonsäure
<i>motB</i>	<i>motB</i> -Gen
MSW	mutant selection window
NaCl	Natriumchlorid
pg, ng, µg, mg, g	Pico-, Nano-, Mikro-, Milli-, Gramm
pl, nl, µl, ml, l	Pico-, Nano-, Mikro-, Milli-, Liter
<i>norEPr</i>	Promotor des <i>norE</i> -Gens
OD	Optische Dichte
ORI	<i>origin of replication</i>
ORF	<i>open reading frame</i>
OST	Organic Solvent Tolerance
P	Present
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PCR-Prod.	PCR-Produkt
PFGE	<i>Pulsed Field Gel Electrophoresis</i>
pH	<i>pondus hydrogenii</i> (negativer, dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration)
pIVET	<i>plasmid in vivo expression technology</i>
Pr	Promotor
QRDR	Quinolone resistance determining region
RIMMH	Regensburger Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene
RNA	Ribonukleinsäure
RND	resistance, nodulation, cell division

<b>Abkürzung</b>	<b>Bedeutung</b>
<i>rob</i>	<i>rob</i> -Gen
<i>robPr</i>	Promotor des <i>rob</i> -Gens
RS	restriction-site
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transcription-PCR
SDS	Natriumdodecylsulfat
<i>sfaD/E</i>	<i>sfaD/E</i> -Gen
sec	Sekunde
sog.	so genannt
<i>soxSPr</i>	Promotor des <i>soxS</i> -Gens
ssRNA	single strand RNA
ST	hitze stabil
Tab.	Tabelle
Taq-Polymerase	<i>Thermophilus aquaticus</i> -DNA-Polymerase
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TE	Tris-EDTA-Puffer
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
u	und
U	Units
U/min	Umdrehungen pro Minute
ÜN	über Nacht
UV	Ultra Violett
V	Volt
vs	versus
w/v	weight per volume
X-Gal	5-Brom-4-Chlor-3-indoyl-D-galaktopyranosid
z. B.	zum Beispiel
z. T.	zum Teil

## 7.2 Literaturverzeichnis

1. **Alekshun, M. N. and S. B. Levy.** 1997. Regulation of chromosomally mediated multiple antibiotic resistance: the *mar* regulon. *Antimicrob. Agents Chemother.* **41**:2067-2075.
2. **Alekshun, M. N. and S. B. Levy.** 1999. Alteration of the repressor activity of MarR, the negative regulator of the *Escherichia coli marRAB* locus, by multiple chemicals In vitro. *J. Bacteriol.* **181**:4669-4672.
3. **Ali, A. T., A. Iwata, A. Nishimura, S. Ueda, and A. Ishihama.** 1999. Growth phase-dependent variation in protein composition of the *Escherichia coli* nucleoid. *J. Bacteriol.* **181**:6361-6370.
4. **Almeida, D., E. Nuermberger, S. Tyagi, W. R. Bishai, and J. Grosset.** 2007. In vivo validation of the mutant selection window hypothesis with moxifloxacin in a murine model of tuberculosis. *Antimicrob. Agents Chemother.* **51**:4261-4266.
5. **Amsterdam, A., S. Lin, and N. Hopkins.** 1995. The *Aequorea victoria* green fluorescent protein can be used as a reporter in live zebrafish embryos. *Dev. Biol.* **171**:123-129.
6. **Anderson, K. L., J. E. Whitlock, and V. J. Harwood.** 2005. Persistence and differential survival of fecal indicator bacteria in subtropical waters and sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**:3041-3048.
7. **Andersson, M. I. and A. P. MacGowan.** 2003. Development of the quinolones. *J. Antimicrob. Chemother.* **51 Suppl 1**:1-11.
8. **Aono, R.** 1998. Improvement of organic solvent tolerance level of *Escherichia coli* by overexpression of stress-responsive genes. *Extremophiles.* **2**:239-248.
9. **Aprikian, P., V. Tchesnokova, B. Kidd, O. Yakovenko, V. Yarov-Yarovoy, E. Trinchina, V. Vogel, W. Thomas, and E. Sokurenko.** 2007. Interdomain interaction in the FimH adhesin of *Escherichia coli* regulates the affinity to mannose. *J. Biol. Chem.* **282**:23437-23446.
10. **Arsene, S. and R. Leclercq.** 2007. Role of a *qnr*-like gene in the intrinsic resistance of *Enterococcus faecalis* to fluoroquinolones. *Antimicrob. Agents Chemother.* **51**:3254-3258.
11. **Asako, H., H. Nakajima, K. Kobayashi, M. Kobayashi, and R. Aono.** 1997. Organic solvent tolerance and antibiotic resistance increased by overexpression of *marA* in *Escherichia coli* 1. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**:1428-1433.
12. **Atkins, A., N. R. Wyborn, A. J. Wallace, T. J. Stillman, L. K. Black, A. B. Fielding, M. Hisakado, P. J. Artymiuk, and J. Green.** 2000. Structure-function relationships of a novel bacterial toxin, hemolysin E. The role of alpha G. *J. Biol. Chem.* **275**:41150-41155.
13. **Bagel, S., Heisig, P., and Wiedemann, B.** Fluoroquinolone resistance of *Escherichia coli* frequently is associated with decreased expression of type-1 fimbriae. C-37-52. 1997. Toronto, Program anashington, D.C.d abstracts of the 37th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy. American Society for Microbiology, W. 28-9-1997.

14. **Bagel, S., V. Hullen, B. Wiedemann, and P. Heisig.** 1999. Impact of *gyrA* and *parC* mutations on quinolone resistance, doubling time, and supercoiling degree of *Escherichia coli* 1. *Antimicrob. Agents Chemother.* **43**:868-875.
15. **Balague, C. E., C. S. de Ruiz, R. Rey, A. M. de Duffard, and M. E. Nader-Macias.** 2002. Effect of the herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid on uropathogenic *Escherichia coli* virulence factors. *Toxicology* **177**:143-155.
16. **Ball, C. A., G. Sherlock, H. Parkinson, P. Rocca-Sera, C. Brooksbank, H. C. Causton, D. Cavalieri, T. Gaasterland, P. Hingamp, F. Holstege, M. Ringwald, P. Spellman, C. J. Stoeckert, Jr., J. E. Stewart, R. Taylor, A. Brazma, and J. Quackenbush.** 2002. Standards for microarray data. *Science* **298**:539.
17. **Barbosa, T. M. and S. B. Levy.** 2000. Differential expression of over 60 chromosomal genes in *Escherichia coli* by constitutive expression of MarA. *J Bacteriol* **182**:3467-3474.
18. **Barnard, F. M. and A. Maxwell.** 2000. Interaction of quinolone drugs with DNA gyrase. *ASM Annual Meeting A100*.
19. **Bauernfeind, A.** 1997. Comparison of the antibacterial activities of the quinolones Bay 12- 8039, gatifloxacin (AM 1155), trovafloxacin, clinafloxacin, levofloxacin and ciprofloxacin [published erratum appears in *J Antimicrob Chemother* 1998 Jun;41(6):672]. *J. Antimicrob. Chemother.* **40**:639-651.
20. **Berg, D. E.** 1989. Mobile DNA.
21. **Bjorkman, J., D. Hughes, and D. I. Andersson.** 1998. Virulence of antibiotic-resistant *Salmonella typhimurium*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **95**:3949-3953.
22. **Bjorkman, J., I. Nagaev, O. G. Berg, D. Hughes, and D. I. Andersson.** 2000. Effects of environment on compensatory mutations to ameliorate costs of antibiotic resistance [see comments]. *Science* **287**:1479-1482.
23. **Bjorkman, J., P. Samuelsson, D. I. Andersson, and D. Hughes.** 1999. Novel ribosomal mutations affecting translational accuracy, antibiotic resistance and virulence of *Salmonella typhimurium*. *Mol. Microbiol.* **31**:53-58.
24. **Bloemberg, G. V., G. A. O'Toole, B. J. Lugtenberg, and R. Kolter.** 1997. Green fluorescent protein as a marker for *Pseudomonas* spp. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**:4543-4551.
25. **Blomfield, I. C., P. J. Calie, K. J. Eberhardt, M. S. McClain, and B. I. Eisenstein.** 1993. Lrp stimulates phase variation of type 1 fimbriation in *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* **175**:27-36.
26. **Boudeau, J., A. L. Glasser, S. Julien, J. F. Colombel, and A. Darfeuille-Michaud.** 2003. Inhibitory effect of probiotic *Escherichia coli* strain Nissle 1917 on adhesion to and invasion of intestinal epithelial cells by adherent-invasive *E. coli* strains isolated from patients with Crohn's disease. *Aliment. Pharmacol. Ther.* **18**:45-56.
27. **Braaten, B. A., J. V. Platko, M. W. van der Woude, B. H. Simons, F. K. de Graaf, J. M. Calvo, and D. A. Low.** 1992. Leucine-responsive regulatory protein controls the expression of both the pap and fan pili operons in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **89**:4250-4254.

28. **Brand, A.** 1995. GFP in *Drosophila*. *Trends Genet.* **11**:324-325.
29. **Brazma, A., P. Hingamp, J. Quackenbush, G. Sherlock, P. Spellman, C. Stoeckert, J. Aach, W. Ansorge, C. A. Ball, H. C. Causton, T. Gaasterland, P. Glenisson, F. C. Holstege, I. F. Kim, V. Markowitz, J. C. Matese, H. Parkinson, A. Robinson, U. Sarkans, S. Schulze-Kremer, J. Stewart, R. Taylor, J. Vilo, and M. Vingron.** 2001. Minimum information about a microarray experiment (MIAME)-toward standards for microarray data. *Nat.Genet.* **29**:365-371.
30. **Bridges, B. A.** 2001. Hypermutation in bacteria and other cellular systems. *Philos.Trans.R.Soc.Lond B Biol.Sci.* **356**:29-39.
31. **Burlage, R. S., Z. K. Yang, and T. Mehlhorn.** 1996. A transposon for green fluorescent protein transcriptional fusions: application for bacterial transport experiments. *Gene* **173**:53-58.
32. **Bustin, S. A.** 2000. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J.Mol.Endocrinol.* **25**:169-193.
33. **Calvo, J. M. and R. G. Matthews.** 1994. The leucine-responsive regulatory protein, a global regulator of metabolism in *Escherichia coli*. *Microbiol.Rev.* **58**:466-490.
34. **Cao, V., T. Lambert, and P. Courvalin.** 2002. ColE1-like plasmid pIP843 of *Klebsiella pneumoniae* encoding extended-spectrum beta-lactamase CTX-M-17. *Antimicrob.Agents Chemother.* **46**:1212-1217.
35. **Chalfie, M., Y. Tu, G. Euskirchen, W. W. Ward, and D. C. Prasher.** 1994. Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science* **263**:802-805.
36. **Chalmers, R., A. Guhathakurta, H. Benjamin, and N. Kleckner.** 1998. IHF modulation of Tn10 transposition: sensory transduction of supercoiling status via a proposed protein/DNA molecular spring. *Cell* **93**:897-908.
37. **Cheng, X. and T. A. Patterson.** 1992. Construction and use of lambda PL promoter vectors for direct cloning and high level expression of PCR amplified DNA coding sequences. *Nucleic Acids Res.* **20**:4591-4598.
38. **Chow, R. T., T. J. Dougherty, H. S. Fraimow, E. Y. Bellin, and M. H. Miller.** 1988. Association between early inhibition of DNA synthesis and the MICs and MBCs of carboxyquinolone antimicrobial agents for wild-type and mutant [*gyrA nfxB(ompF) acrA*] *Escherichia coli* K-12. *Antimicrob.Agents Chemother.* **32**:1113-1118.
39. **Cirz, R. T. and F. E. Romesberg.** 2006. Induction and inhibition of ciprofloxacin resistance-conferring mutations in hypermutator bacteria. *Antimicrob.Agents Chemother.* **50**:220-225.
40. **Claros, M. C., D. M. Citron, and E. J. Goldstein.** 1995. Survival of anaerobic bacteria in various thioglycolate and chopped meat broth formulations. *J.Clin.Microbiol.* **33**:2505-2507.
41. **Clermont, O., S. Bonacorsi, and E. Bingen.** 2000. Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. *Appl.Environ.Microbiol.* **66**:4555-4558.
42. **Clontech.** 1999. Living Colors User Manual. Clontech.

43. **Coban, A. Y., A. Birinci, B. Ekinci, and B. Durupinar.** 2004. Effects of acetyl salicylate and ibuprofen on fluoroquinolone MICs on *Salmonella enterica* serovar typhimurium in vitro. *J.Chemother.* **16**:128-133.
44. **Cohen, A. and A. J. Clark.** 1986. Synthesis of linear plasmid multimers in *Escherichia coli* K-12. *J.Bacteriol.* **167**:327-335.
45. **Cohen, S. P., H. Hächler, and S. B. Levy.** 1993. Genetic and functional analysis of the multiple antibiotic resistance (*mar*) locus in *Escherichia coli*. *J.Bacteriol.* **175**:1484-1492.
46. **Cohen, S. P., D. C. Hooper, J. S. Wolfson, K. S. Souza, L. M. McMurry, and S. B. Levy.** 1988. Endogenous active efflux of norfloxacin in susceptible *Escherichia coli*. *Antimicrob.Agents Chemother.* **32**:1187-1191.
47. **Cohen, S. P., S. B. Levy, J. Foulds, and J. L. Rosner.** 1993. Salicylate induction of antibiotic resistance in *Escherichia coli*: activation of the *mar* operon and a *mar*-independent pathway. *J.Bacteriol.* **175**:7856-7862.
48. **Cohen, S. P., L. M. McMurry, D. C. Hooper, J. S. Wolfson, and S. B. Levy.** 1989. Cross-resistance to fluoroquinolones in multiple-antibiotic-resistant (Mar) *Escherichia coli* selected by tetracycline or chloramphenicol: decreased drug accumulation associated with membrane changes in addition to OmpF reduction. *Antimicrob.Agents Chemother.* **33**:1318-1325.
49. **Copeland, N. G., N. A. Jenkins, and Court DL.** 2001. Recombineering: a powerful new tool for mouse functional genomics. *Nat.Rev.Genet.* **2**:769-779.
50. **Corthier, G., C. Delorme, S. D. Ehrlich, and P. Renault.** 1998. Use of luciferase genes as biosensors to study bacterial physiology in the digestive tract. *Appl.Environ.Microbiol.* **64**:2721-2722.
51. **Court DL, J. A. Sawitzke, and L. C. Thomason.** 2002. Genetic engineering using homologous recombination. *Annu.Rev.Genet.* **36**:361-388.
52. **Craigie, R., D. J. Arndt-Jovin, and K. Mizuuchi.** 1985. A defined system for the DNA strand-transfer reaction at the initiation of bacteriophage Mu transposition: protein and DNA substrate requirements. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **82**:7570-7574.
53. **Cramer, A., E. A. Whitehorn, E. Tate, and W. P. Stemmer.** 1996. Improved green fluorescent protein by molecular evolution using DNA shuffling. *Nat.Biotechnol.* **14**:315-319.
54. **Cuatrecasas, P., S. Fuchs, and C. B. Anfinsen.** 1967. Catalytic properties and specificity of the extracellular nuclease of *Staphylococcus aureus*. *J.Biol.Chem.* **242**:1541-1547.
55. **Cui, J., Y. Liu, R. Wang, W. Tong, K. Drlica, and X. Zhao.** 2006. The mutant selection window in rabbits infected with *Staphylococcus aureus*. *J.Infect.Dis.* **194**:1601-1608.
56. **Datsenko, K. A. and B. L. Wanner.** 2000. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **97**:6640-6645.

57. **Datta, S., N. Costantino, and Court DL.** 2006. A set of recombineering plasmids for gram-negative bacteria. *Gene* **379**:109-115.
58. **Davis, R. L., J. R. Koup, J. Williams-Warren, A. Weber, and A. L. Smith.** 1985. Pharmacokinetics of three oral formulations of ciprofloxacin. *Antimicrob.Agents Chemother.* **28**:74-77.
59. **De Giorgi, F., M. Brini, C. Bastianutto, R. Marsault, M. Montero, P. Pizzo, R. Rossi, and R. Rizzuto.** 1996. Targeting aequorin and green fluorescent protein to intracellular organelles. *Gene* **173**:113-117.
60. **de Visser, J. A.** 2002. The fate of microbial mutators. *Microbiology* **148**:1247-1252.
61. **de, L., V and K. N. Timmis.** 1994. Analysis and construction of stable phenotypes in gram-negative bacteria with Tn5- and Tn10-derived minitransposons. *Methods Enzymol.* **235:386-405**:386-405.
62. **Deitz, W. H., T. M. Cook, and W. A. Goss.** 1966. Mechanism of action of nalidixic acid on *Escherichia coli*. 3. Conditions required for lethality. *J.Bacteriol.* **91**:768-773.
63. **del Castillo, F. J., S. C. Leal, F. Moreno, and C. del, I.** 1997. The *Escherichia coli* K-12 sheA gene encodes a 34-kDa secreted haemolysin. *Mol.Microbiol.* **25**:107-115.
64. **Dhandayuthapani, S., L. E. Via, C. A. Thomas, P. M. Horowitz, D. Deretic, and V. Deretic.** 1995. Green fluorescent protein as a marker for gene expression and cell biology of mycobacterial interactions with macrophages. *Mol.Microbiol.* **17**:901-912.
65. **Diver, J. M. and R. Wise.** 1986. Morphological and biochemical changes in *Escherichia coli* after exposure to ciprofloxacin. *J.Antimicrob.Chemother.* **18 Suppl D**:31-41.
66. **Dobrindt, U., F. Agerer, K. Michaelis, A. Janka, C. Buchrieser, M. Samuelson, C. Svanborg, G. Gottschalk, H. Karch, and J. Hacker.** 2003. Analysis of genome plasticity in pathogenic and commensal *Escherichia coli* isolates by use of DNA arrays. *J.Bacteriol.* **185**:1831-1840.
67. **Domenico, P., S. Schwartz, and B. A. Cunha.** 1989. Reduction of capsular polysaccharide production in *Klebsiella pneumoniae* by sodium salicylate. *Infect.Immun.* **57**:3778-3782.
68. **Dong, Y., X. Zhao, J. Domagala, and K. Drlica.** 1999. Effect of fluoroquinolone concentration on selection of resistant mutants of *Mycobacterium bovis* BCG and *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob.Agents Chemother.* **43**:1756-1758.
69. **Dower, W. J., J. F. Miller, and C. W. Ragsdale.** 1988. High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Res.* **16**:6127-6145.
70. **Drago, L., E. De Vecchi, B. Mombelli, L. Nicola, M. Valli, and M. R. Gismondo.** 2001. Activity of levofloxacin and ciprofloxacin against urinary pathogens. *J.Antimicrob.Chemother.* **48**:37-45.
71. **Drlica, K.** 2001. A strategy for fighting antibiotic resistance. *ASM News* **67**:27-33.
72. **Drlica, K.** 2003. The mutant selection window and antimicrobial resistance. *J.Antimicrob.Chemother.* **52**:11-17.

73. **Drlica, K., M. Malik, R. J. Kerns, and X. Zhao.** 2007. Quinolone-mediated bacterial death. *Antimicrob.Agents Chemother.*
74. **Drlica, K. and X. Zhao.** 1997. DNA gyrase, topoisomerase IV, and the 4-quinolones. *Microbiol.Mol Biol Rev.* **61**:377-392.
75. **Drlica, K. and X. Zhao.** 1999. DNA topoisomerase IV as a quinolone target. *Current Opinion in Anti-Infective Investigational Drugs* **1**:435-442.
76. **Drlica, K. and X. Zhao.** 2007. Mutant selection window hypothesis updated. *Clin.Infect.Dis.* **44**:681-688.
77. **Dunne, C., L. O'Mahony, L. Murphy, G. Thornton, D. Morrissey, S. O'Halloran, M. Feeney, S. Flynn, G. Fitzgerald, C. Daly, B. Kiely, G. C. O'Sullivan, F. Shanahan, and J. K. Collins.** 2001. In vitro selection criteria for probiotic bacteria of human origin: correlation with in vivo findings. *Am.J.Clin.Nutr.* **73**:386S-392S.
78. **Eckert, B. and C. F. Beck.** 1989. Overproduction of transposon Tn10-encoded tetracycline resistance protein results in cell death and loss of membrane potential. *J.Bacteriol.* **171**:3557-3559.
79. **Eleaume, H. and S. Jabbouri.** 2004. Comparison of two standardisation methods in real-time quantitative RT-PCR to follow *Staphylococcus aureus* genes expression during in vitro growth. *J.Microbiol.Methods* **59**:363-370.
80. **Enne, V. I., A. A. Delsol, J. M. Roe, and P. M. Bennett.** 2006. Evidence of antibiotic resistance gene silencing in *Escherichia coli*. *Antimicrob.Agents Chemother.* **50**:3003-3010.
81. **Etienne, M., D. Croisier, P. E. Charles, C. Lequeu, L. Piroth, H. Portier, K. Drlica, and P. Chavanet.** 2004. Effect of low-level resistance on subsequent enrichment of fluoroquinolone-resistant *Streptococcus pneumoniae* in rabbits. *J.Infect.Dis.* **190**:1472-1475.
82. **Everett, M. J., Y. F. Jin, V. Ricci, and L. J. Piddock.** 1996. Contributions of individual mechanisms to fluoroquinolone resistance in 36 *Escherichia coli* strains isolated from humans and animals. *Antimicrob.Agents Chemother.* **40**:2380-2386.
83. **Fernandez, S. V., J. Xing, V. Kapur, S. J. Libby, R. G. Barletta, and R. A. Moxley.** 1998. Regulation of the *Escherichia coli sheA* gene and characterization of its encoded hemolytic activity. *FEMS Microbiol.Lett.* **168**:85-90.
84. **Fisher, L. M., J. M. Lawrence, I. C. Josty, R. Hopewell, E. E. Margerrison, and M. E. Cullen.** 1989. Ciprofloxacin and the fluoroquinolones. New concepts on the mechanism of action and resistance. *Am.J.Med.* **87**:2S-8S.
85. **Fralick, J. A.** 1996. Evidence that TolC is required for functioning of the Mar/AcrAB efflux pump of *Escherichia coli* 1. *J.Bacteriol.* **178**:5803-5805.
86. **Freeman, W. M., S. J. Walker, and K. E. Vrana.** 1999. Quantitative RT-PCR: pitfalls and potential. *Biotechniques* **26**:112-115.
87. **Friedman, S. M., T. Lu, and K. Drlica.** 2001. Mutation in the DNA Gyrase A Gene of *Escherichia coli* That Expands the Quinolone Resistance-Determining Region. *Antimicrob.Agents Chemother.* **45**:2378-2380.

88. **Gambino, L., S. J. Gracheck, and P. F. Miller.** 1993. Overexpression of the MarA positive regulator is sufficient to confer multiple antibiotic resistance in *Escherichia coli*. *J.Bacteriol.* **175**:2888-2894.
89. **Garibyan, L., T. Huang, M. Kim, E. Wolff, A. Nguyen, T. Nguyen, A. Diep, K. Hu, A. Iverson, H. Yang, and J. H. Miller.** 2003. Use of the rpoB gene to determine the specificity of base substitution mutations on the *Escherichia coli* chromosome. *DNA Repair (Amst)* **2**:593-608.
90. **Geoffroy, M. C., C. Guyard, B. Quatannens, S. Pavan, M. Lange, and A. Mercenier.** 2000. Use of green fluorescent protein to tag lactic acid bacterium strains under development as live vaccine vectors. *Appl.Environ.Microbiol.*2000.Jan.;66.(1.):383.-91. **66**:383-391.
91. **Ghigo, J-M.** Lambda Red-mediated gene manipulation in gram-negative bacteria: The 3-step PCR (3T-PCR) protocol. 12-3-2004.
92. **Giraud, A., I. Matic, M. Radman, M. Fons, and F. Taddei.** 2002. Mutator bacteria as a risk factor in treatment of infectious diseases. *Antimicrob.Agents Chemother.* **46**:863-865.
93. **Giraud, A., M. Radman, I. Matic, and F. Taddei.** 2001. The rise and fall of mutator bacteria. *Curr.Opin.Microbiol.* **4**:582-585.
94. **Giraud, E., A. Brisabois, J. L. Martel, and E. Chalus-Dancla.** 1999. Comparative studies of mutations in animal isolates and experimental *in vitro*- and *in vivo*-selected mutants of *Salmonella* spp. suggest a counterselection of highly fluoroquinolone-resistant strains in the field. *Antimicrob.Agents Chemother.* **43**:2131-2137.
95. **Gory, L., M. C. Montel, and M. Zagorec.** 2001. Use of green fluorescent protein to monitor *Lactobacillus sakei* in fermented meat products. *FEMS Microbiol.Lett.* **194**:127-133.
96. **Goss, W. A., W. H. Deitz, and T. M. Cook.** 1965. MECHANISM OF ACTION OF NALIDIXIC ACID ON *ESCHERICHIA COLI*.II. INHIBITION OF DEOXYRIBONUCLEIC ACID SYNTHESIS. *J.Bacteriol.* **89**:1068-1074.
97. **Grkovic, S., M. H. Brown, and R. A. Skurray.** 2002. Regulation of bacterial drug export systems. *Microbiol.Mol.Biol.Rev.* **66**:671-701, table.
98. **Gualco, L., A. M. Schito, G. C. Schito, and A. Marchese.** 2007. In vitro activity of prulifloxacin against *Escherichia coli* isolated from urinary tract infections and the biological cost of prulifloxacin resistance. *Int.J.Antimicrob.Agents* **29**:679-687.
99. **Gustafsson, I., O. Cars, and D. I. Andersson.** 2003. Fitness of antibiotic resistant *Staphylococcus epidermidis* assessed by competition on the skin of human volunteers. *J.Antimicrob.Chemother.* **52**:258-263.
100. **Guzman, L. M., D. Belin, M. J. Carson, and J. Beckwith.** 1995. Tight regulation, modulation, and high-level expression by vectors containing the arabinose PBAD promoter. *J.Bacteriol.* **177**:4121-4130.
101. **Hacker, J., H. Kestler, H. Hoschutzky, K. Jann, F. Lottspeich, and T. K. Korhonen.** 1993. Cloning and characterization of the S fimbrial adhesin II complex of an *Escherichia coli* O18:K1 meningitis isolate. *Infect.Immun.* **61**:544-550.

102. **Hatfield, G. W., S. P. Hung, and P. Baldi.** 2003. Differential analysis of DNA microarray gene expression data. *Mol.Microbiol.* **47**:871-877.
103. **Heisig, P.** 1996. Genetic evidence for a role of *parC* mutations in development of high-level fluoroquinolone resistance in *Escherichia coli*. *Antimicrob.Agents Chemother.* **40**:879-885.
104. **Heisig, P. and R. Tschorny.** 1994. Characterization of fluoroquinolone-resistant mutants of *Escherichia coli* selected in vitro. *Antimicrob.Agents Chemother.* **38**:1284-1291.
105. **Herrero, M., V. de Lorenzo, and K. N. Timmis.** 1990. Transposon vectors containing non-antibiotic resistance selection markers for cloning and stable chromosomal insertion of foreign genes in gram-negative bacteria. *J.Bacteriol.* **172**:6557-6567.
106. **Hershberg, R., H. Tang, and D. A. Petrov.** 2007. Reduced selection leads to accelerated gene loss in *Shigella*. *Genome Biol.* **8**:R164.
107. **Hiasa, H., D. O. Yousef, and K. J. Marians.** 1996. DNA strand cleavage is required for replication fork arrest by a frozen topoisomerase-quinolone-DNA ternary complex. *J Biol.Chem.* **271**:26424-26429.
108. **Higuchi, R., C. Fockler, G. Dollinger, and R. Watson.** 1993. Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology (N.Y.)* **11**:1026-1030.
109. **Holden, N. J., M. Totsika, E. Mahler, A. J. Roe, K. Catherwood, K. Lindner, U. Dobrindt, and D. L. Gally.** 2006. Demonstration of regulatory cross-talk between P fimbriae and type 1 fimbriae in uropathogenic *Escherichia coli*. *Microbiology* **152**:1143-1153.
110. **Hooper, D. C.** Personal communication. 1999.
111. **Hooper, D. C. and J. S. Wolfson.** 1993. Mechanism of bacterial resistance to quinolones. *Quinolone Antimicrobial Agents Chapter 5*:97-118.
112. **Howard, B. M., R. J. Pinney, and J. T. Smith.** 1993. 4-Quinolone bactericidal mechanisms. *Arzneimittelforschung.* **43**:1125-1129.
113. **Hudson, R. E., U. Bergthorsson, J. R. Roth, and H. Ochman.** 2002. Effect of chromosome location on bacterial mutation rates. *Mol.Biol.Evol.* **19**:85-92.
114. **Hüllen, V., Heisig, P., and Wiedemann, B.** Role of *marR* mutations in the development of clinical resistance of *Escherichia coli* against fluoroquinolones. C-64-57. 1997. Toronto, Program and abstracts of the 37th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy. American Society for Microbiology, Washington, D.C. 28-9-1997.
115. **Hüllen, V., P. Heisig, and B. Wiedemann.** 1999. Induktion des MAR-Phänotyps als mögliche Ursache für die Entwicklung der Fluorchinolon-Resistenz bei *E. coli*. *Chemotherapie Journal* **8. Jahrgang**:79-81.

116. **Inouye, S. and F. I. Tsuji.** 1994. *Aequorea* green fluorescent protein. Expression of the gene and fluorescence characteristics of the recombinant protein. FEBS Lett. **341**:277-280.
117. **Inouye, S. and F. I. Tsuji.** 1994. Evidence for redox forms of the *Aequorea* green fluorescent protein. FEBS Lett. **351**:211-214.
118. **Isolauri, E., P. V. Kirjavainen, and S. Salminen.** 2002. Probiotics: a role in the treatment of intestinal infection and inflammation? Gut **50 Suppl 3**:III54-III59.
119. **Israelsen, H., S. M. Madsen, A. Vrang, E. B. Hansen, and E. Johansen.** 1995. Cloning and partial characterization of regulated promoters from *Lactococcus lactis* Tn917-lacZ integrants with the new promoter probe vector, pAK80. Appl.Environ.Microbiol. **61**:2540-2547.
120. **Iuchi, S. and L. Weiner.** 1996. Cellular and molecular physiology of *Escherichia coli* in the adaptation to aerobic environments. J.Biochem. **120**:1055-1063.
121. **Jatsch, L. and H. Zentgraf.** 2000. "Green Fluorescent Protein" (GFP) - ein Reportermolekül mit Eigenfluoreszenz Teil I: Eigenschaften des GFP. Mikrobiologie **10**:5-11.
122. **Jatsch, L. and H. Zentgraf.** 2000. "Green Fluorescent Protein" (GFP) - ein Reportermolekül mit Eigenfluoreszenz Teil II: GFP-Mutanten. Mikrobiologie **10**:83-89.
123. **Jefferson, R. A., S. M. Burgess, and D. Hirsh.** 1986. beta-Glucuronidase from *Escherichia coli* as a gene-fusion marker. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A **83**:8447-8451.
124. **Johnson, J. R. and T. T. O'Bryan.** 2000. Improved repetitive-element PCR fingerprinting for resolving pathogenic and nonpathogenic phylogenetic groups within *Escherichia coli*. Clin.Diagn.Lab Immunol. **7**:265-273.
125. **Johnson, J. R., A. L. Stell, and P. Delavari.** 2001. Canine feces as a reservoir of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*. Infect.Immun. **69**:1306-1314.
126. **Kallenius, G., R. Mollby, S. B. Svenson, I. Helin, H. Hultberg, B. Cedergren, and J. Winberg.** 1981. Occurrence of P-fimbriated *Escherichia coli* in urinary tract infections. Lancet **2**:1369-1372.
127. **Kallenius, G., R. Mollby, and J. Winberg.** 1980. In vitro adhesion of uropathogenic *Escherichia coli* to human periurethral cells. Infect.Immun. **28**:972-980.
128. **Kalogeraki, V. S. and S. C. Winans.** 1997. Suicide plasmids containing promoterless reporter genes can simultaneously disrupt and create fusions to target genes of diverse bacteria. Gene **188**:69-75.
129. **Kang, G., K. A. Balasubramanian, R. Koshi, M. M. Mathan, and V. I. Mathan.** 1998. Salicylate inhibits fimbriae mediated HEp-2 cell adherence of and haemagglutination by enteroaggregative *Escherichia coli*. FEMS Microbiol.Lett. **166**:257-265.
130. **Kato, J., Y. Nishimura, R. Imamura, H. Niki, S. Hiraga, and H. Suzuki.** 1990. New topoisomerase essential for chromosome segregation in *E. coli*. Cell **63**:393-404.

131. **Kayser, F. H., K. A. Bienz, J. Eckert, and R. M. Zinkernagl.** 2001. Medizinische Mikrobiologie. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York.
132. **Kenzaka, T., K. Tani, A. Sakotani, N. Yamaguchi, and M. Nasu.** 2007. High-frequency phage-mediated gene transfer among *Escherichia coli* cells, determined at the single-cell level. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**:3291-3299.
133. **Kerenyi, M., H. E. Allison, I. Batai, A. Sonnevend, L. Emody, N. Plaveczyk, and T. Pal.** 2005. Occurrence of *hlyA* and *sheA* genes in extraintestinal *Escherichia coli* strains. *J. Clin. Microbiol.* **43**:2965-2968.
134. **Kern, W. V., M. Oethinger, A. S. Jellen-Ritter, and S. B. Levy.** 2000. Non-target gene mutations in the development of fluoroquinolone resistance in *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**:814-820.
135. **Khanin, R., V. Vinciotti, and E. Wit.** 2006. Reconstructing repressor protein levels from expression of gene targets in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **103**:18592-18596.
136. **Khlebnikov, A., K. A. Datsenko, T. Skaug, B. L. Wanner, and J. D. Keasling.** 2001. Homogeneous expression of the P(BAD) promoter in *Escherichia coli* by constitutive expression of the low-affinity high-capacity AraE transporter. *Microbiology* **147**:3241-3247.
137. **Khlebnikov, A., T. Skaug, and J. D. Keasling.** 2002. Modulation of gene expression from the arabinose-inducible *araBAD* promoter. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **29**:34-37.
138. **Khodursky, A. B. and N. R. Cozzarelli.** 1998. The mechanism of inhibition of topoisomerase IV by quinolone antibacterials. *J. Biol. Chem.* **273**:27668-27677.
139. **Knippers, R.** 2001. Molekulare Genetik. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York.
140. **Kobayashi, K., N. Tsukagoshi, and R. Aono.** 2001. Suppression of hypersensitivity of *Escherichia coli* *acrB* mutant to organic solvents by integrational activation of the *acrEF* operon with the IS1 or IS2 element. *J. Bacteriol.* **183**:2646-2653.
141. **Köhler, W. and R. Ansorg.** 2001. Medizinische Mikrobiologie.
142. **Kolter, R. and D. R. Helinski.** 1978. Construction of plasmid R6K derivatives in vitro: characterization of the R6K replication region. *Plasmid* **1**:571-580.
143. **Komeda, Y.** 1986. Transcriptional control of flagellar genes in *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* **168**:1315-1318.
144. **Komeda, Y., K. Kutsukake, and T. Iino.** 1980. Definition of additional flagellar genes in *Escherichia coli* K12. *Genetics* **94**:277-290.
145. **Komp, L. P., A. Karlsson, and D. Hughes.** 2003. Mutation rate and evolution of fluoroquinolone resistance in *Escherichia coli* isolates from patients with urinary tract infections. *Antimicrob. Agents Chemother.* **47**:3222-3232.
146. **Komp, L. P., L. L. Marcusson, D. Sandvang, N. Frimodt-Møller, and D. Hughes.** 2005. Biological cost of single and multiple norfloxacin resistance mutations in *Escherichia coli* implicated in urinary tract infections. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**:2343-2351.

147. **Kugelberg, E., S. Lofmark, B. Wretling, and D. I. Andersson.** 2005. Reduction of the fitness burden of quinolone resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *J.Antimicrob.Chemother.* **55**:22-30.
148. **Kunin, C. M., T. H. Hua, and L. O. Bakaletz.** 1995. Effect of salicylate on expression of flagella by *Escherichia coli* and *Proteus*, *Providencia*, and *Pseudomonas* spp. *Infect.Immun.* **63**:1796-1799.
149. **Kunin, C. M., T. H. Hua, R. L. Guerrant, and L. O. Bakaletz.** 1994. Effect of salicylate, bismuth, osmolytes, and tetracycline resistance on expression of fimbriae by *Escherichia coli*. *Infect.Immun.* **62**:2178-2186.
150. **Kupferwasser, L. I., M. R. Yeaman, C. C. Nast, D. Kupferwasser, Y. Q. Xiong, M. Palma, A. L. Cheung, and A. S. Bayer.** 2003. Salicylic acid attenuates virulence in endovascular infections by targeting global regulatory pathways in *Staphylococcus aureus*. *J.Clin.Invest* **112**:222-233.
151. **Lai, X. H., I. Arencibia, A. Johansson, S. N. Wai, J. Oscarsson, S. Kalfas, K. G. Sundqvist, Y. Mizunoe, A. Sjostedt, and B. E. Uhlin.** 2000. Cytocidal and apoptotic effects of the ClyA protein from *Escherichia coli* on primary and cultured monocytes and macrophages. *Infect.Immun.* **68**:4363-4367.
152. **Lalwani, A. K., J. J. Han, B. J. Walsh, S. Zolotukhin, N. Muzyczka, and A. N. Mhatre.** 1997. Green fluorescent protein as a reporter for gene transfer studies in the cochlea. *Hear.Res.* **114**:139-147.
153. **Lambert, P. A.** 2005. Bacterial resistance to antibiotics: modified target sites. *Adv.Drug Deliv.Rev.* **57**:1471-1485.
154. **Lavoie, B. D. and G. Chaconas.** 1990. Immunoelectron microscopic analysis of the A, B, and HU protein content of bacteriophage Mu transpososomes. *J.Biol.Chem.* **265**:1623-1627.
155. **LeClerc, J. E., B. Li, W. L. Payne, and T. A. Cebula.** 1996. High mutation frequencies among *Escherichia coli* and *Salmonella* pathogens. *Science* **274**:1208-1211.
156. **Leeker, A., B. Kreft, J. Sandmann, J. Bates, G. Wasenauer, H. Muller, K. Sack, and S. Kumar.** 1997. Tamm-Horsfall protein inhibits binding of S- and P-fimbriated *Escherichia coli* to human renal tubular epithelial cells. *Exp.Nephrol.* **5**:38-46.
157. **Leff, L. G. and A. A. Leff.** 1996. Use of green fluorescent protein to monitor survival of genetically engineered bacteria in aquatic environments. *Appl.Environ.Microbiol.* **62**:3486-3488.
158. **Levin, B. R., V. Perrot, and N. Walker.** 2000. Compensatory mutations, antibiotic resistance and the population genetics of adaptive evolution in bacteria. *Genetics* **154**:985-997.
159. **Levine, M. M., J. G. Xu, J. B. Kaper, H. Lior, V. Prado, B. Tall, J. Nataro, H. Karch, and K. Wachsmuth.** 1987. A DNA probe to identify enterohemorrhagic *Escherichia coli* of O157:H7 and other serotypes that cause hemorrhagic colitis and hemolytic uremic syndrome. *J.Infect.Dis.* **156**:175-182.

160. **Lewin, C. S., B. M. Howard, N. T. Ratcliffe, and J. T. Smith.** 1989. 4-quinolones and the SOS response. *J.Med.Microbiol.* **29**:139-144.
161. **Lewis, K.** 2000. Programmed death in bacteria. *Microbiol.Mol.Biol.Rev.* **64**:503-514.
162. **Li, C., C. J. Louise, W. Shi, and J. Adler.** 1993. Adverse conditions which cause lack of flagella in *Escherichia coli*. *J.Bacteriol.* **175**:2229-2235.
163. **Li, X. Z. and H. Nikaido.** 2004. Efflux-mediated drug resistance in bacteria. *Drugs* **64**:159-204.
164. **Linde, H. J.** 2005. Helferlein Medizinische Mikrobiologie Stichworte zu Klinik - Diagnostik - Therapie - Hygiene.
165. **Linde, H. J., F. Notka, C. Irtenkauf, J. Decker, J. Wild, H. H. Niller, P. Heisig, and N. Lehn.** 2002. Increase in MICs of ciprofloxacin *in vivo* in two closely related clinical isolates of *Enterobacter cloacae*. *J.Antimicrob.Chemother.* **49**:625-630.
166. **Linde, H. J., F. Notka, M. Metz, B. Kochanowski, P. Heisig, and N. Lehn.** 2000. *In vivo* increase in resistance to ciprofloxacin in *Escherichia coli* associated with deletion of the C-terminal part of MarR. *Antimicrob.Agents Chemother.* **44**:1865-1868.
167. **Linde, H. J., Schmiedl, I., Hübner, M., and Lehn, N.** Mutant Prevention Concentration von Ciprofloxacin und Moxifloxacin gegenüber *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* und *Streptococcus pneumoniae*. Forschungswerkstatt Moxifloxacin 2001. 2001. Wuppertal, Bayer AG.
168. **Liu, P., N. A. Jenkins, and N. G. Copeland.** 2003. A highly efficient recombineering-based method for generating conditional knockout mutations. *Genome Res.* **13**:476-484.
169. **Lodinova-Zadnikova, R. and U. Sonnenborn.** 1997. Effect of preventive administration of a nonpathogenic *Escherichia coli* strain on the colonization of the intestine with microbial pathogens in newborn infants. *Biol.Neonate* **71**:224-232.
170. **Lomovskaya, O., K. Lewis, and A. Matin.** 1995. EmrR is a negative regulator of the *Escherichia coli* multidrug resistance pump EmrAB. *J Bacteriol.* **177**:2328-2334.
171. **Low, D. E.** 2001. Antimicrobial drug use and resistance among respiratory pathogens in the community. *Clin.Infect.Dis.* **33 Suppl 3**:S206-S213.
172. **Lucas, C.** Fitness and Synergy. 2000.
173. **Ludwig, A., S. Bauer, R. Benz, B. Bergmann, and W. Goebel.** 1999. Analysis of the SlyA-controlled expression, subcellular localization and pore-forming activity of a 34 kDa haemolysin (ClyA) from *Escherichia coli* K-12. *Mol.Microbiol.* **31**:557-567.
174. **Ludwig, A., C. Tengel, S. Bauer, A. Bubert, R. Benz, H. J. Mollenkopf, and W. Goebel.** 1995. SlyA, a regulatory protein from *Salmonella typhimurium*, induces a haemolytic and pore-forming protein in *Escherichia coli*. *Mol.Gen.Genet.* **249**:474-486.

175. **Luo, N., S. Pereira, O. Sahin, J. Lin, S. Huang, L. Michel, and Q. Zhang.** 2005. Enhanced *in vivo* fitness of fluoroquinolone-resistant *Campylobacter jejuni* in the absence of antibiotic selection pressure. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **102**:541-546.
176. **Ma, D., D. N. Cook, M. Alberti, N. G. Pon, H. Nikaido, and J. E. Hearst.** 1993. Molecular cloning and characterization of *acrA* and *acrE* genes of *Escherichia coli*. *J.Bacteriol.* **175**:6299-6313.
177. **Ma, D., D. N. Cook, M. Alberti, N. G. Pon, H. Nikaido, and J. E. Hearst.** 1995. Genes *acrA* and *acrB* encode a stress-induced efflux system of *Escherichia coli*. *Mol.Microbiol.* **16**:45-55.
178. **Macnab, R. M. and J. S. Parkinson.** 1991. Genetic analysis of the bacterial flagellum. *Trends Genet.* **7**:196-200.
179. **Madigan, M. T., J. M. Martinko, and J. Parker.** 2001. Brock Mikrobiologie.
180. **Maguin, E., H. Brody, C. W. Hill, and R. D'Ari.** 1986. SOS-associated division inhibition gene *sfiC* is part of excisable element e14 in *Escherichia coli*. *J.Bacteriol.* **168**:464-466.
181. **Maguin, E., P. Duwat, T. Hege, D. Ehrlich, and A. Gruss.** 1992. New thermosensitive plasmid for gram-positive bacteria. *J.Bacteriol.* **174**:5633-5638.
182. **Mahan, M. J., J. W. Tobias, J. M. Slauch, P. C. Hanna, R. J. Collier, and J. J. Mekalanos.** 1995. Antibiotic-based selection for bacterial genes that are specifically induced during infection of a host. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **92**:669-673.
183. **Malik, M., X. Zhao, and K. Drlica.** 2006. Lethal fragmentation of bacterial chromosomes mediated by DNA gyrase and quinolones. *Mol.Microbiol.* **61**:810-825.
184. **Maneewannakul, K. and S. B. Levy.** 1996. Identification for *mar* mutants among quinolone-resistant clinical isolates of *Escherichia coli*. *Antimicrob.Agents Chemother.* **40**:1695-1698.
185. **Manes, S. H., G. J. Pruss, and K. Drlica.** 1983. Inhibition of RNA synthesis by oxolinic acid is unrelated to average DNA supercoiling. *J.Bacteriol.* **155**:420-423.
186. **Mao, E. F., L. Lane, J. Lee, and J. H. Miller.** 1997. Proliferation of mutators in A cell population. *J.Bacteriol.* **179**:417-422.
187. **Margolin, W. and M. M. Howe.** 1986. Localization and DNA sequence analysis of the C gene of bacteriophage Mu, the positive regulator of Mu late transcription. *Nucleic Acids Res.* **14**:4881-4897.
188. **Marsic, N., S. Roje, I. Stojiljkovic, E. Salaj-Smic, and Z. Trgovcevic.** 1993. In vivo studies on the interaction of RecBCD enzyme and lambda Gam protein. *J.Bacteriol.* **175**:4738-4743.
189. **Martin, R. G. and J. L. Rosner.** 1995. Binding of purified multiple antibiotic-resistance repressor protein (MarR) to *mar* operator sequences. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **92**:5456-5460.
190. **Martinez, J. L. and F. Baquero.** 2000. Mutation frequencies and antibiotic resistance. *Antimicrob.Agents Chemother.* **44**:1771-1777.

191. **Martinez-Martinez, L., A. Pascual, I. Garcia, J. Tran, and G. A. Jacoby.** 2003. Interaction of plasmid and host quinolone resistance. *J.Antimicrob.Chemother.* **51**:1037-1039.
192. **Martinez-Martinez, L., A. Pascual, and G. A. Jacoby.** 1998. Quinolone resistance from a transferable plasmid. *Lancet* **351**:797-799.
193. **McClintock, B.** 1984. The significance of responses of the genome to challenge. *Science* **226**:792-801.
194. **McDaniel, L. S., L. H. Rogers, and W. E. Hill.** 1978. Survival of recombination-deficient mutants of *Escherichia coli* during incubation with nalidixic acid. *J.Bacteriol.* **134**:1195-1198.
195. **McKane, M. and R. Milkman.** 1995. Transduction, restriction and recombination patterns in *Escherichia coli*. *Genetics* **139**:35-43.
196. **Metcalf, W. W., W. Jiang, L. L. Daniels, S. K. Kim, A. Haldimann, and B. L. Wanner.** 1996. Conditionally replicative and conjugative plasmids carrying *lacZ alpha* for cloning, mutagenesis, and allele replacement in bacteria. *Plasmid* **35**:1-13.
197. **Michan, C., M. Manchado, and C. Pueyo.** 2002. SoxRS down-regulation of *rob* transcription. *J.Bacteriol.* **184**:4733-4738.
198. **Miller, J. H.** 1992. A short course in bacterial genetics a laboratory manual and handbook for *Escherichia coli* and related bacteria.
199. **Miller, J. H.** 1996. Spontaneous mutators in bacteria: insights into pathways of mutagenesis and repair. *Annu.Rev.Microbiol.* **50**:625-643.
200. **Miller, K., A. J. O'Neill, and I. Chopra.** 2002. Response of *Escherichia coli* hypermutators to selection pressure with antimicrobial agents from different classes. *J.Antimicrob.Chemother.* **49**:925-934.
201. **Miller, W. G. and S. E. Lindow.** 1997. An improved GFP cloning cassette designed for prokaryotic transcriptional fusions. *Gene* **191**:149-153.
202. **Moken, M. C., L. M. McMurry, and S. B. Levy.** 1997. Selection of multiple-antibiotic-resistant (*mar*) mutants of *Escherichia coli* by using the disinfectant pine oil: roles of the *mar* and *acrAB* loci. *Antimicrob.Agents Chemother.* **41**:2770-2772.
203. **Morrison, T. B., J. J. Weis, and C. T. Wittwer.** 1998. Quantification of low-copy transcripts by continuous SYBR Green I monitoring during amplification. *Biotechniques* **24**:954-8, 960, 962.
204. **Murphy, K. C.** 1998. Use of bacteriophage lambda recombination functions to promote gene replacement in *Escherichia coli*. *J.Bacteriol.* **180**:2063-2071.
205. **Murphy, K. C. and K. G. Campellone.** 2003. Lambda Red-mediated recombinogenic engineering of enterohemorrhagic and enteropathogenic *E. coli*. *BMC.Mol.Biol.* **4**:11.
206. **Muyrers, J. P., Y. Zhang, and A. F. Stewart.** 2001. Techniques: Recombinogenic engineering--new options for cloning and manipulating DNA. *Trends Biochem.Sci.* **26**:325-331.

207. **Nikaido, H.** 1996. Multidrug efflux pumps of gram-negative bacteria. *J.Bacteriol.* **178**:5853-5859.
208. **Nikaido, H.** 1998. Multiple antibiotic resistance and efflux  
1. *Curr.Opin.Microbiol.* **1**:516-523.
209. **Nilsson, A. I., O. G. Berg, O. Aspevall, G. Kahlmeter, and D. I. Andersson.** 2003. Biological costs and mechanisms of fosfomycin resistance in *Escherichia coli*. *Antimicrob.Agents Chemother.* **47**:2850-2858.
210. **Nishino, K. and A. Yamaguchi.** 2001. Analysis of a complete library of putative drug transporter genes in *Escherichia coli*. 1. *J.Bacteriol.* **183**:5803-5812.
211. **O'Sullivan, D. J.** 2001. Screening of intestinal microflora for effective probiotic bacteria. *J.Agric.Food Chem.* **49**:1751-1760.
212. **Oethinger, M., W. V. Kern, A. S. Jellen-Ritter, L. M. McMurry, and S. B. Levy.** 2000. Ineffectiveness of topoisomerase mutations in mediating clinically significant fluoroquinolone resistance in *Escherichia coli* in the absence of the AcrAB efflux pump. *Antimicrob.Agents Chemother.* **44**:10-13.
213. **Ohnishi, K., K. Kutsukake, H. Suzuki, and T. Iino.** 1990. Gene *fliA* encodes an alternative sigma factor specific for flagellar operons in *Salmonella typhimurium*. *Mol.Gen.Genet.* **221**:139-147.
214. **Okusu, H., D. Ma, and H. Nikaido.** 1996. AcrAB efflux pump plays a major role in the antibiotic resistance phenotype of *Escherichia coli* multiple-antibiotic-resistance (Mar) mutants. *J.Bacteriol.* **178**:306-308.
215. **Oliver, A., R. Canton, P. Campo, F. Baquero, and J. Blazquez.** 2000. High frequency of hypermutable *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis lung infection. *Science* **288**:1251-1254.
216. **Oliver, A., B. R. Levin, C. Juan, F. Baquero, and J. Blazquez.** 2004. Hypermutation and the preexistence of antibiotic-resistant *Pseudomonas aeruginosa* mutants: implications for susceptibility testing and treatment of chronic infections. *Antimicrob.Agents Chemother.* **48**:4226-4233.
217. **Orndorff, P. E. and C. A. Bloch.** 1990. The role of type 1 pili in the pathogenesis of *Escherichia coli* infections: a short review and some new ideas. *Microb.Pathog.* **9**:75-79.
218. **Oscarsson, J., Y. Mizunoe, B. E. Uhlin, and D. J. Haydon.** 1996. Induction of haemolytic activity in *Escherichia coli* by the *slyA* gene product. *Mol.Microbiol.* **20**:191-199.
219. **Oscarsson, J., M. Westermarck, L. Beutin, and B. E. Uhlin.** 2002. The bacteriophage-associated *ehly1* and *ehly2* determinants from *Escherichia coli* O26:H-strains do not encode enterohemolysins per se but cause release of the ClyA cytolysin. *Int.J.Med.Microbiol.* **291**:625-631.
220. **Ott, M., J. Hacker, T. Schmoll, T. Jarchau, T. K. Korhonen, and W. Goebel.** 1986. Analysis of the genetic determinants coding for the S-fimbrial adhesin (*sfa*) in different *Escherichia coli* strains causing meningitis or urinary tract infections. *Infect.Immun.* **54**:646-653.

221. **Ouwehand, A. C. and S. J. Salminen.** 1998. Adhesion inhibitory activity of beta-lactoglobulin isolated from infant formulae. *Acta Paediatr.* **87**:491-493.
222. **Oviedo, P., M. Quiroga, E. Pegels, E. Husulak, and M. Vergara.** 2000. Effects of subinhibitory concentrations of ciprofloxacin on enterotoxigenic *Escherichia coli* virulence factors. *J.Chemother.* **12**:487-490.
223. **Peter, B. J., J. Arsuaga, A. M. Breier, A. B. Khodursky, P. O. Brown, and N. R. Cozzarelli.** 2004. Genomic transcriptional response to loss of chromosomal supercoiling in *Escherichia coli*. *Genome Biol.* **5**:R87.
224. **Pfaffl, M. W., G. W. Horgan, and L. Dempfle.** 2002. Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Res.* **30**:e36.
225. **Piddock, L. J., R. N. Walters, and J. M. Diver.** 1990. Correlation of quinolone MIC and inhibition of DNA, RNA, and protein synthesis and induction of the SOS response in *Escherichia coli*. *Antimicrob.Agents Chemother.* **34**:2331-2336.
226. **Piddock, L. J. V. and JJ. Earnshaw.** 1989. Mechanism of resistance to quinolones and clinical perspectives. *Antimicrob.Chemother.J.* **23**:475-483.
227. **Platt, R., C. Drescher, S. K. Park, and G. J. Phillips.** 2000. Genetic System for Reversible Integration of DNA Constructs and *lacZ* Gene Fusions into the *Escherichia coli* Chromosome. *Plasmid* **43**:12-23.
228. **Pohlhaus, J. R. and K. N. Kreuzer.** 2005. Norfloxacin-induced DNA gyrase cleavage complexes block *Escherichia coli* replication forks, causing double-stranded breaks in vivo. *Mol.Microbiol.* **56**:1416-1429.
229. **Poteete, A. R., C. Rosadini, and C. St Pierre.** 2006. Gentamicin and other cassettes for chromosomal gene replacement in *Escherichia coli*. *Biotechniques* **41**:261-2, 264.
230. **Pratt, L. A. and R. Kolter.** 1998. Genetic analysis of *Escherichia coli* biofilm formation: roles of flagella, motility, chemotaxis and type I pili. *Mol.Microbiol.* **30**:285-293.
231. **Price, C. T., I. R. Lee, and J. E. Gustafson.** 2000. The effects of salicylate on bacteria. *Int.J.Biochem.Cell Biol.* **32**:1029-1043.
232. **Pym, A. S., B. Saint-Joanis, and S. T. Cole.** 2002. Effect of *katG* mutations on the virulence of *Mycobacterium tuberculosis* and the implication for transmission in humans. *Infect.Immun.* **70**:4955-4960.
233. **Rainey, P. B. and G. M. Preston.** 2000. In vivo expression technology strategies: valuable tools for biotechnology. *Curr.Opin.Biotechnol.* **11**:440-444.
234. **Rajeevan, M. S., D. G. Ranamukhaarachchi, S. D. Vernon, and E. R. Unger.** 2001. Use of real-time quantitative PCR to validate the results of cDNA array and differential display PCR technologies. *Methods* **25**:443-451.
235. **Ramani, N. and K. Boakye.** 2001. Salicylate inhibits the translation and transcription of *ompF* in *Escherichia coli*. *Can.J.Microbiol.* **47**:1053-1057.

236. **Recorbet, G., C. Robert, A. Givaudan, B. Kudla, P. Normand, and G. Faurie.** 1993. Conditional suicide system of *Escherichia coli* released into soil that uses the *Bacillus subtilis sacB* gene. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**:1361-1366.
237. **Reynolds, M. G.** 2000. Compensatory evolution in rifampin-resistant *Escherichia coli*. *Genetics* **156**:1471-1481.
238. **Rickard, A. H., S. Lindsay, G. B. Lockwood, and P. Gilbert.** 2004. Induction of the *mar* operon by miscellaneous groceries. *J. Appl. Microbiol.* **97**:1063-1068.
239. **Ried, J. L. and A. Collmer.** 1987. An *nptI-sacB-sacR* cartridge for constructing directed, unmarked mutations in gram-negative bacteria by marker exchange- eviction mutagenesis. *Gene* **57**:239-246.
240. **Robicsek, A., J. Strahilevitz, G. A. Jacoby, M. Macielag, D. Abbanat, C. H. Park, K. Bush, and D. C. Hooper.** 2006. Fluoroquinolone-modifying enzyme: a new adaptation of a common aminoglycoside acetyltransferase. *Nat. Med.* **12**:83-88.
241. **Roessger, A.** Diplomarbeit, Genomische Markierung eines *Escherichia coli* mit einem Reporter gen (*green fluorescent protein, gfp*). 2004.
242. **Rong, R., M. M. Slupska, J. H. Chiang, and J. H. Miller.** 2004. Engineering large fragment insertions into the chromosome of *Escherichia coli*. *Gene* **336**:73-80.
243. **Rosenberg, E. Y., D. Bertenthal, M. L. Nilles, K. P. Bertrand, and H. Nikaido.** 2003. Bile salts and fatty acids induce the expression of *Escherichia coli* AcrAB multidrug efflux pump through their interaction with Rob regulatory protein. *Mol. Microbiol.* **48**:1609-1619.
244. **Rosenberg, E. Y., D. Ma, and H. Nikaido.** 2000. AcrD of *Escherichia coli* is an aminoglycoside efflux pump. *J. Bacteriol.* **182**:1754-1756.
245. **Rosner, J. L., T. Chai, and J. Foulds.** 1991. Regulation of OmpF porin expression by salicylate in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **173**:5631-5638.
246. **Rozen, D. E., L. McGee, B. R. Levin, and K. P. Klugman.** 2007. Fitness costs of fluoroquinolone resistance in *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **51**:412-416.
247. **Saier, M. H., Jr., R. Tam, A. Reizer, and J. Reizer.** 1994. Two novel families of bacterial membrane proteins concerned with nodulation, cell division and transport. *Mol. Microbiol.* **11**:841-847.
248. **Sander, P., B. Springer, T. Prammananan, A. Sturmfels, M. Kappler, M. Pletschette, and E. C. Bottger.** 2002. Fitness cost of chromosomal drug resistance-conferring mutations. *Antimicrob. Agents Chemother.* **46**:1204-1211.
249. **Sarkar, G., R. T. Turner, and M. E. Bolander.** 1993. Restriction-site PCR: a direct method of unknown sequence retrieval adjacent to a known locus by using universal primers. *PCR. Methods Appl.* **2**:318-322.
250. **Schaaff, F., A. Reipert, and G. Bierbaum.** 2002. An elevated mutation frequency favors development of vancomycin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **46**:3540-3548.

251. **Schleif, R.** 2003. AraC protein: a love-hate relationship. *Bioessays* **25**:274-282.
252. **Schmieger, H.** 1982. Packaging signals for phage P22 on the chromosome of *Salmonella typhimurium*. *Mol.Gen.Genet.* **187**:516-518.
253. **Schulte, A., Bagel, S., Wiedemann, B., and Heisig, P.** Compensation of the costs of fluoroquinolone resistance in *Escherichia coli*. 762. 2000. 40th Interscience Conference of Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Toronto, September 17 -20.
254. **Schultz, M., S. Watzl, T. A. Oelschlaeger, H. C. Rath, C. Gottl, N. Lehn, J. Scholmerich, and H. J. Linde.** 2005. Green fluorescent protein for detection of the probiotic microorganism *Escherichia coli* strain Nissle 1917 (EcN) in vivo. *J.Microbiol.Methods* **61**:389-398.
255. **Schultz, M., Watzl, S., Ölschläger, T., Rath, H. C., Göttl, C., Lehn, N., Schölmerich, J., and Linde, H.** Use of green fluorescent protein for visualisation of the probiotic microorganism *Escherichia coli* strain Nissle 1917 *in vivo*. submitted. 2003.
256. **Scott, K. P., Mercer, D. K., Glover, L. A., and Flint, H. J.** The green fluorescent protein as a visible marker for lactic acid bacteria in complex ecosystems. 26, 219-230. 1998.
257. **Scott, K. P., D. K. Mercer, A. J. Richardson, C. M. Melville, L. A. Glover, and H. J. Flint.** 2000. Chromosomal integration of the green fluorescent protein gene in lactic acid bacteria and the survival of marked strains in human gut simulations. *FEMS Microbiol.Lett.* **182**:23-27.
258. **Seoane, A. S. and S. B. Levy.** 1995. Characterization of MarR, the repressor of the multiple antibiotic resistance (*mar*) operon in *Escherichia coli*. *J.Bacteriol.* **177**:3414-3419.
259. **Sergueev, K., D. Yu, S. Austin, and D. Court.** 2001. Cell toxicity caused by products of the p(L) operon of bacteriophage lambda. *Gene* **272**:227-235.
260. **Shea, M. E. and H. Hiasa.** 1999. Interactions between DNA helicases and frozen topoisomerase IV-quinolone-DNA ternary complexes\*. *J.Biol.Chem.* **274**:22747-22754.
261. **Shi, W., C. Li, C. J. Louise, and J. Adler.** 1993. Mechanism of adverse conditions causing lack of flagella in *Escherichia coli*. *J.Bacteriol.* **175**:2236-2240.
262. **Shizuya, H., B. Birren, U. J. Kim, V. Mancino, T. Slepak, Y. Tachiiri, and M. Simon.** 1992. Cloning and stable maintenance of 300-kilobase-pair fragments of human DNA in *Escherichia coli* using an F-factor-based vector. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **89**:8794-8797.
263. **Silberstein, Z., S. Maor, I. Berger, and A. Cohen.** 1990. Lambda Red-mediated synthesis of plasmid linear multimers in *Escherichia coli* K12. *Mol.Gen.Genet.* **223**:496-507.
264. **Sinden, R. R. and D. E. Pettijohn.** 1981. Chromosomes in living *Escherichia coli* cells are segregated into domains of supercoiling. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **78**:224-228.

265. **Skorupski, K., J. C. Pierce, B. Sauer, and N. Sternberg.** 1992. Bacteriophage P1 genes involved in the recognition and cleavage of the phage packaging site (pac). *J.Mol.Biol.* **223**:977-989.
266. **Smith, C. A. and E. N. Baker.** 2002. Aminoglycoside antibiotic resistance by enzymatic deactivation. *Curr.Drug Targets.Infect.Disord.* **2**:143-160.
267. **Sniegowski, P. D., P. J. Gerrish, and R. E. Lenski.** 1997. Evolution of high mutation rates in experimental populations of *E. coli*. *Nature* **387**:703-705.
268. **Snyder, M. and K. Drlica.** 1979. DNA gyrase on the bacterial chromosome: DNA cleavage induced by oxolinic acid. *J.Mol.Biol.* **131**:287-302.
269. **Soderblom, T., A. Laestadius, C. Oxhamre, A. Aperia, and A. Richter-Dahlfors.** 2002. Toxin-induced calcium oscillations: a novel strategy to affect gene regulation in target cells. *Int.J.Med.Microbiol.* **291**:511-515.
270. **Soderblom, T., C. Oxhamre, S. N. Wai, P. Uhlen, A. Aperia, B. E. Uhlin, and A. Richter-Dahlfors.** 2005. Effects of the *Escherichia coli* toxin cytolysin A on mucosal immunostimulation via epithelial Ca<sup>2+</sup> signalling and Toll-like receptor 4. *Cell Microbiol.* **7**:779-788.
271. **Sokurenko, E. V., V. Chesnokova, D. E. Dykhuizen, I. Ofek, X. R. Wu, K. A. Krogfelt, C. Struve, M. A. Schembri, and D. L. Hasty.** 1998. Pathogenic adaptation of *Escherichia coli* by natural variation of the FimH adhesin. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **95**:8922-8926.
272. **Soutourina, O. A., E. Krin, C. Laurent-Winter, F. Hommais, A. Danchin, and P. N. Bertin.** 2002. Regulation of bacterial motility in response to low pH in *Escherichia coli*: the role of H-NS protein. *Microbiology* **148**:1543-1551.
273. **Steinmetz, M., D. Le Coq, S. Aymerich, G. Gonzy-Treboul, and P. Gay.** 1985. The DNA sequence of the gene for the secreted *Bacillus subtilis* enzyme levansucrase and its genetic control sites. *Mol.Gen.Genet.* **200**:220-228.
274. **Steinmetz, M., D. Le Coq, S. Aymerich, G. Gonzy-Treboul, and P. Gay.** 1985. The DNA sequence of the gene for the secreted *Bacillus subtilis* enzyme levansucrase and its genetic control sites. 1. *Mol.Gen.Genet.* **200**:220-228.
275. **Sternberg, N.** 1990. Bacteriophage P1 cloning system for the isolation, amplification, and recovery of DNA fragments as large as 100 kilobase pairs. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **87**:103-107.
276. **Suarez, A., A. Guttler, M. Stratz, L. H. Staendner, K. N. Timmis, and C. A. Guzman.** 1997. Green fluorescent protein-based reporter systems for genetic analysis of bacteria including monocopy applications. *Gene* **196**:69-74.
277. **Swingle, B., M. O'Carroll, D. Haniford, and K. M. Derbyshire.** 2004. The effect of host-encoded nucleoid proteins on transposition: H-NS influences targeting of both IS903 and Tn10. *Mol.Microbiol.* **52**:1055-1067.
278. **Taddei, F., M. Radman, J. Maynard-Smith, B. Toupance, P. H. Gouyon, and B. Godelle.** 1997. Role of mutator alleles in adaptive evolution. *Nature* **387**:700-702.

279. **Tanabe, H., K. Yamasak, M. Furue, K. Yamamoto, A. Katoh, M. Yamamoto, S. Yoshioka, H. Tagami, H. A. Aiba, and R. Utsumi.** 1997. Growth phase-dependent transcription of *emrKY*, a homolog of multidrug efflux *emrAB* genes of *Escherichia coli*, is induced by tetracycline. *J.Gen.Appl.Microbiol.* **43**:257-263.
280. **Tanabe, K., T. Kondo, Y. Onodera, and M. Furusawa.** 1999. A conspicuous adaptability to antibiotics in the *Escherichia coli* mutator strain, *dnaQ49*. *FEMS Microbiol.Lett.* **176**:191-196.
281. **Taylor, A. and G. R. Smith.** 1980. Unwinding and rewinding of DNA by the RecBC enzyme. *Cell* **22**:447-457.
282. **Tenaillon, O., B. Toupance, H. Le Nagard, F. Taddei, and B. Godelle.** 1999. Mutators, population size, adaptive landscape and the adaptation of asexual populations of bacteria. *Genetics* **152**:485-493.
283. **Thanassi, D. G., L. W. Cheng, and H. Nikaido.** 1997. Active efflux of bile salts by *Escherichia coli*. *J.Bacteriol.* **179**:2512-2518.
284. **Theisen, U.** Diplomarbeit; Identifizierung und Charakterisierung von putativen Antibiotika-Resistenzmechanismen in *Enterobacteriaceae*.
285. **Tran, J. H., G. A. Jacoby, and D. C. Hooper.** 2005. Interaction of the plasmid-encoded quinolone resistance protein QnrA with *Escherichia coli* topoisomerase IV. *Antimicrob.Agents Chemother.* **49**:3050-3052.
286. **Triglia, T., M. G. Peterson, and D. J. Kemp.** 1988. A procedure for in vitro amplification of DNA segments that lie outside the boundaries of known sequences. *Nucleic Acids Res.* **16**:8186.
287. **Trun, N. J. and J. F. Marko.** 1998. Architecture of a Bacterial Chromosome. *ASM News* **64**:276-283.
288. **Truong, Q. C., S. Ouabdesselam, D. C. Hooper, N. J. Moreau, and C. J. Soussy.** 1995. Sequential mutations of *gyrA* in *Escherichia coli* associated with quinolone therapy. *J.Antimicrob.Chemother.* **36**:1055-1059.
289. **Tschape, H. and A. Fruth.** 2001. Enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Contrib.Microbiol.* **8**:1-11.
290. **Twiss, E., A. M. Coros, N. P. Tavakoli, and K. M. Derbyshire.** 2005. Transposition is modulated by a diverse set of host factors in *Escherichia coli* and is stimulated by nutritional stress. *Mol.Microbiol.* **57**:1593-1607.
291. **Valdivia, R. H., A. E. Hromockyj, D. Monack, L. Ramakrishnan, and S. Falkow.** 1996. Applications for green fluorescent protein (GFP) in the study of host-pathogen interactions. *Gene* **173**:47-52.
292. **van der Woude, M. W., B. A. Braaten, and D. A. Low.** 1992. Evidence for global regulatory control of pilus expression in *Escherichia coli* by Lrp and DNA methylation: model building based on analysis of *pap*. *Mol.Microbiol.* **6**:2429-2435.
293. **van der Woude, M. W. and D. A. Low.** 1994. Leucine-responsive regulatory protein and deoxyadenosine methylase control the phase variation and expression of the *sfa* and *daa* pili operons in *Escherichia coli*. *Mol.Microbiol.* **11**:605-618.

294. **Versalovic, J., T. Koeth, and J. R. Lupski.** 1991. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acids Res.* **19**:6823-6831.
295. **Vila, J., J. Ruiz, F. Marco, A. Barcelo, P. Goni, E. Giralt, and T. Jimenez de Anta.** 1994. Association between double mutation in *gyrA* gene of ciprofloxacin-resistant clinical isolates of *Escherichia coli* and MICs. *Antimicrob. Agents Chemother.* **38**:2477-2479.
296. **Vogel, W. and H. Schmieger.** 1986. Selection of bacterial pac sites recognized by *Salmonella* phage P22. *Mol. Gen. Genet.* **205**:563-567.
297. **Vranes, J., Z. Zagar, and S. Kurbel.** 1996. Influence of subinhibitory concentrations of ceftazidime, ciprofloxacin and azithromycin on the morphology and adherence of P-fimbriated *Escherichia coli*. *J. Chemother.* **8**:254-260.
298. **Wagenlehner, F. M., P. Heisig, C. Irtenkauf, F. Notka, J. Decker, N. Lehn, and H. Linde.** 2003. Clinically significant borderline resistance of sequential clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*. *Int. J. Antimicrob. Agents* **22**:367-373.
299. **Wallace, A. J., T. J. Stillman, A. Atkins, S. J. Jamieson, P. A. Bullough, J. Green, and P. J. Artymiuk.** 2000. *E. coli* hemolysin E (HlyE, ClyA, SheA): X-ray crystal structure of the toxin and observation of membrane pores by electron microscopy. *Cell* **100**:265-276.
300. **Walters, R. N., L. J. Piddock, and R. Wise.** 1989. The effect of mutations in the SOS response on the kinetics of quinolone killing. *J. Antimicrob. Chemother.* **24**:863-873.
301. **Wang, H., J. L. Dzink-Fox, M. Chen, and S. B. Levy.** 2001. Genetic characterization of highly fluoroquinolone-resistant clinical *Escherichia coli* strains from China: role of *acrR* mutations. *Antimicrob. Agents Chemother.* **45**:1515-1521.
302. **Wei, Y., J. M. Lee, D. R. Smulski, and R. A. LaRossa.** 2001. Global impact of *sdiA* amplification revealed by comprehensive gene expression profiling of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **183**:2265-2272.
303. **Wentzell, L. M. and A. Maxwell.** 2000. The complex of DNA gyrase and quinolone drugs on DNA forms a barrier to the T7 DNA polymerase replication complex. *J. Mol. Biol.* **304**:779-791.
304. **Westermarck, M., J. Oscarsson, Y. Mizunoe, J. Urbonaviciene, and B. E. Uhlin.** 2000. Silencing and activation of ClyA cytotoxin expression in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **182**:6347-6357.
305. **White, D. G., J. D. Goldman, B. Demple, and S. B. Levy.** 1997. Role of the *acrAB* locus in organic solvent tolerance mediated by expression of *marA*, *soxS*, or *robA* in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **179**:6122-6126.
306. **Wiedemann, B. and P. Heisig.** 1994. Mechanisms of quinolone resistance. *Infection* **22 (Suppl 2)**:S73-S79.
307. **Willmott, C. J., S. E. Critchlow, I. C. Eperon, and A. Maxwell.** 1994. The complex of DNA gyrase and quinolone drugs with DNA forms a barrier to transcription by RNA polymerase. *J. Mol. Biol.* **242**:351-363.

308. **Willmott, C. J., S. E. Critchlow, I. C. Eperon, and A. Maxwell.** 1994. The complex of DNA gyrase and quinolone drugs with DNA forms a barrier to transcription by RNA polymerase\*. *J.Mol.Biol.* **242**:351-363.
309. **Wittwer, C., K. M. Ririe, and R. Rasmussen.** 1997. Fluorescence Monitoring of Rapid Cycle PCR for Quantification, p. 129-144. *In: F. Ferré (ed.), Gene Quantification.* Birkhäuser.
310. **Wojnicz, D. and S. Jankowski.** 2007. Effects of subinhibitory concentrations of amikacin and ciprofloxacin on the hydrophobicity and adherence to epithelial cells of uropathogenic *Escherichia coli* strains. *Int.J.Antimicrob.Agents* **29**:700-704.
311. **Wullt, B., G. Bergsten, M. Samuelsson, and C. Svanborg.** 2002. The role of P fimbriae for *Escherichia coli* establishment and mucosal inflammation in the human urinary tract. *Int.J.Antimicrob.Agents* **19**:522-538.
312. **Yamagishi, J., H. Yoshida, M. Yamayoshi, and S. Nakamura.** 1986. Nalidixic acid-resistant mutations of the *gyrB* gene of *Escherichia coli*. *Mol Gen.Genet.* **204**:367-373.
313. **Yamane, K., J. Wachino, S. Suzuki, K. Kimura, N. Shibata, H. Kato, K. Shibayama, T. Konda, and Y. Arakawa.** 2007. New plasmid-mediated fluoroquinolone efflux pump, QepA, found in an *Escherichia coli* clinical isolate. *Antimicrob.Agents Chemother.* **51**:3354-3360.
314. **Yang, S., S. R. Clayton, and E. L. Zechiedrich.** 2003. Relative contributions of the AcrAB, MdfA and NorE efflux pumps to quinolone resistance in *Escherichia coli*. *J.Antimicrob.Chemother.* **51**:545-556.
315. **Yoshida, H., M. Nakamura, M. Bogaki, H. Ito, T. Kojima, H. Hattori, and S. Nakamura.** 1993. Mechanism of action of quinolones against *Escherichia coli* DNA gyrase. *Antimicrob.Agents Chemother.* **37**:839-845.
316. **Yoshida, T., T. Muratani, S. Iyobe, and S. Mitsuhashi.** 1994. Mechanism of high-level resistance to quinolones in urinary tract isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob.Agents Chemother.* **38**:1466-1469.
317. **Zhao, X.** 2003. Clarification of MPC and the mutant selection window concept. *J.Antimicrob.Chemother.* **52**:731-733.

## 8 Anhang

### 8.1 Microarraydaten

#### 8.1.1 Effluxsysteme

**Tab.34:** Transkription von Genen und Regulatoren der Effluxpumpen nach Microarray-Hybridisierung im Stamm *E. coli* 1267 verglichen mit Stamm *E. coli* 1173. Die Tabelle ist erstellt aus der Datei des Kompetenzzentrums für Fluoreszenz Bioanalytik, Regensburg.

ProbeSet ID	1267_vs_1173_Signal	1267_vs_1173_Detection	1267_vs_1173_Detection p-value	1267_vs_1173_Signal Log Ratio	1267_vs_1173_Fold Change	1267_vs_1173_Change	1267_vs_1173_Change p-value	1173_Signal	1173_Detection	1173_Detection p-value
acrA_b0463_at	1031,2	P	0,000491	1,9	3,7	I	0,000002	304,9	P	0,001165
acrB_b0462_at	718,1	P	0,000613	1,3	2,5	I	0,000011	246,4	P	0,006575
acrD_b2470_at	72,6	A	0,069878	0,4	1,3	NC	0,196667	58,3	A	0,197123
acrF_b3266_at	27	A	0,345472	0,3	1,2	NC	0,520505	18,3	A	0,167138
acrR_b0464_at	97,9	P	0,000494	-0,6	-1,5	D	0,999996	150,7	P	0,000327
envR_b3264_at	18,2	P	0,034572	-0,7	-1,6	NC	0,971452	30,2	P	0,002693
baeR_b2079_at	77	A	0,127994	-0,1	-1,1	NC	0,5	90,4	A	0,230151
emrB_b2686_at	84,6	P	0,002693	1,1	2,1	I	0,00021	27,7	A	0,266065
evgA_b2369_at	47,7	P	0,000327	-1,6	-3,0	D	0,999999	137,1	P	0,000327
marA_b1531_at	2003,7	P	0,000491	4,5	22,6	I	0,000002	93,2	P	0,000491
cmr_b0842_at	79,1	P	0,000327	0	1,0	NC	0,5	79,5	P	0,000893
yegO_b2076_at	70,3	P	0,000893	-0,3	-1,2	NC	0,960677	93,4	P	0,001081
yceL_b1065_at	48,5	P	0,012921	-0,8	-1,7	NC	0,536288	101,3	P	0,004591
yjiO_b4337_at	52,4	P	0,003203	-0,3	-1,2	NC	0,5	50,1	P	0,011548
ydhE_b1663_at	67,3	P	0,003203	-0,2	-1,1	NC	0,5	79,2	P	0,013378
ompF_b0929_at	92,2	P	0,003799	-1,9	-3,7	D	0,999999	362,4	P	0,000403
rob_b4396_at	93,1	P	0,017732	-1,6	-3,0	D	0,999998	244	P	0,005504
sdiA_b1916_at	96,5	P	0,003815	0,4	1,3	NC	0,007414	56,9	P	0,006575
soxS_b4062_at	198,3	P	0,000735	0,3	1,2	NC	0,015005	159,4	P	0,000603
tolC_b3035_at	975,9	P	0,000327	1,3	2,5	I	0,000001	346,9	P	0,000403

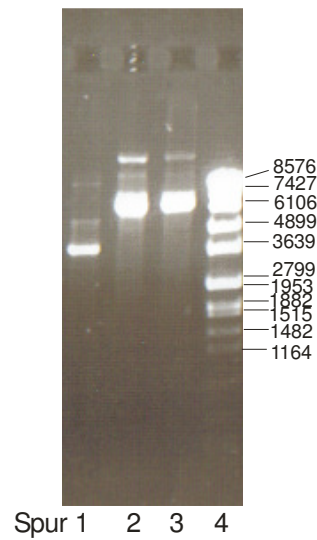
## 8.1.2 Differentielle Transkription

**Tab.35:** Differentiell transkribierte Gene und ORF im Stamm *E. coli* 1267 gegenüber *E. coli* 1173 mit  $I > 3$  bzw.  $D < 3$

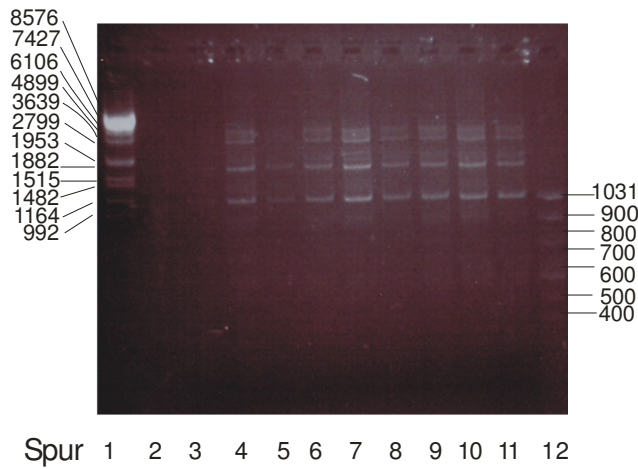
ProbeSet ID	1267_vs_1173_Signal	1267_vs_1173_Detection	1267_vs_1173_Detection p-value	1267_vs_1173_Signal Log Ratio	1267_vs_1173_Fold Change	1267_vs_1173_Change	1267_vs_1173_Change p-value	1173_Signal	1173_Detection	1173_Detection p-value
clpB_b2592_at	77,5	P	0,009283	-3,2	-9,2	D	0,999998	793,4	P	0,000762
INM13X_II_5_at	0,5	P	0,028457	-2,5	-5,7	D	0,997902	10,2	P	0,026111
yjiM_b4357_at	58,9	P	0,000613	-2,4	-5,3	D	0,999998	296,3	P	0,000491
rbsD_b3748_at	199	P	0,000403	-2,3	-4,9	D	0,999999	741,7	P	0,000327
dppA_b3544_at	71,6	P	0,000944	-2,3	-4,9	D	0,999998	484,7	P	0,000491
yjfO_b4189_at	286,6	P	0,000327	-2,3	-4,9	D	0,999994	1543,4	P	0,000327
ybdQ_b0607_at	158,4	P	0,000494	-2,1	-4,3	D	0,999999	636,8	P	0,000403
yecI_b1902_at	69,8	P	0,005297	-2	-4,0	D	0,999999	243,3	P	0,001886
sseA_b2521_at	170	P	0,007298	-2	-4,0	D	0,999999	632,4	P	0,000603
yfiA_b2597_at	539,7	P	0,000327	-2	-4,0	D	0,999999	2085,2	P	0,000327
glgS_b3049_at	75,9	P	0,000327	-2	-4,0	D	0,999999	302,7	P	0,000327
ygfJ_b2877_at	49,5	P	0,000893	-1,9	-3,7	D	0,999998	194	P	0,000403
yjfN_b4188_at	155,3	P	0,012921	-1,9	-3,7	D	0,999983	564,6	P	0,005504
ybjW_b0873_at	50,5	P	0,007827	-1,8	-3,5	D	0,999998	171,3	P	0,000613
ynaF_b1376_at	223,2	P	0,000613	-1,8	-3,5	D	0,999998	801	P	0,000613
b2146_at	182,4	P	0,000491	-1,8	-3,5	D	0,999998	563,2	P	0,000491
mgIB_b2150_at	134	P	0,001432	-1,8	-3,5	D	0,999997	498,1	P	0,000491
yhil_b3487_at	98,4	P	0,000944	-1,8	-3,5	D	0,999922	325,2	P	0,000762
ybeL_b0643_at	217,9	P	0,000494	-1,7	-3,2	D	0,999999	693,4	P	0,000327
uspA_b3495_at	529,9	P	0,000327	-1,7	-3,2	D	0,999999	1595,8	P	0,000327
dctA_b3528_at	98,3	P	0,005297	-1,7	-3,2	D	0,999905	259,9	P	0,003203
araC_b0064_at	32,1	P	0,015454	-1,6	-3,0	D	0,999999	131,4	P	0,000893
yciD_b1256_at	99,2	P	0,000403	-1,6	-3,0	D	0,999999	314,2	P	0,000327
b1725_at	112,2	P	0,000327	-1,6	-3,0	D	0,999999	366,9	P	0,000327
melR_b4118_at	66,8	P	0,005504	-1,6	-3,0	D	0,999997	202,9	P	0,000944
yadG_b0127_at	241,8	P	0,000327	1,6	3,0	I	0,000016	89,2	P	0,002257
kdsA_b1215_at	234,5	P	0,000327	1,6	3,0	I	0,000002	72,9	P	0,002257
ribA_b1277_at	601,1	P	0,000491	1,6	3,0	I	0,000002	224,6	P	0,001165
yecS_b1918_at	147,1	P	0,001165	1,6	3,0	I	0,000019	114,4	P	0,015164
b2889_at	351,3	P	0,001886	1,6	3,0	I	0,000003	95	P	0,020444
yggJ_b2946_at	449,3	P	0,000327	1,6	3,0	I	0,000001	117,6	P	0,001081
yhdG_b3260_at	341,8	P	0,001081	1,6	3,0	I	0,000041	125,1	P	0,013378
tyrU_b3977_f_at	343,9	P	0,000491	1,6	3,0	I	0,000002	71,8	P	0,015164

ProbeSet ID	1267_vs_1173_Signal	1267_vs_1173_Detection	1267_vs_1173_Detection p-value	1267_vs_1173_Signal Log Ratio	1267_vs_1173_Fold Change	1267_vs_1173_Change	1267_vs_1173_Change p-value	1173_Signal	1173_Detection	1173_Detection p-value
glyT_b3978_at	404,3	P	0,000327	1,6	3,0	I	0,000001	130,3	P	0,000603

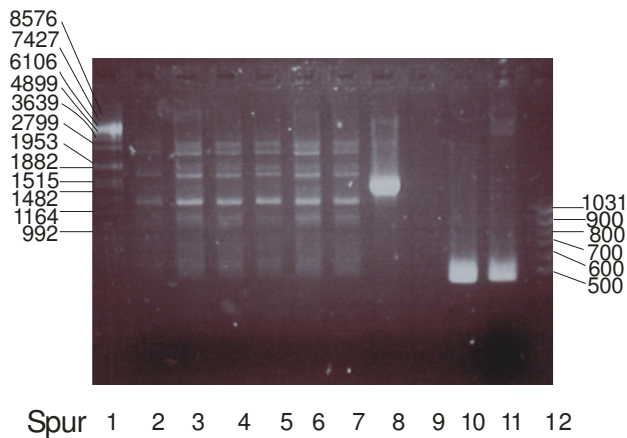
## 8.2 Gelbilder



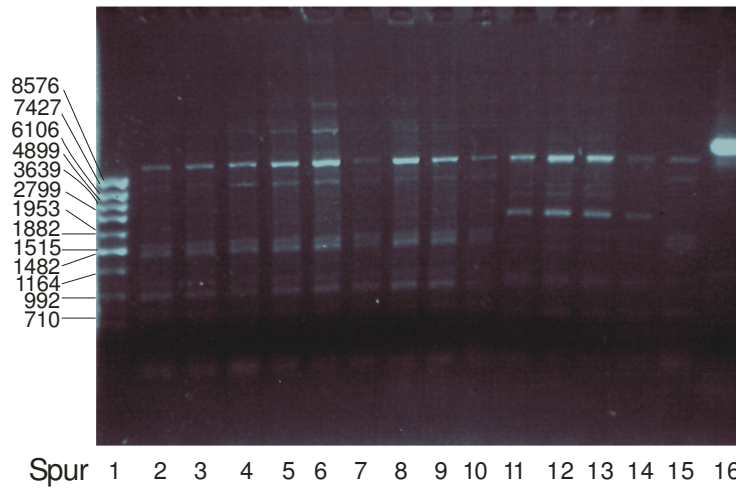
**Abb. 39:** Gelbild Plasmidisolierung aus *E. coli*-4 (Spur 1), *E. coli*-32 (Spur 2) und *E. coli*-57 (Spur3); Spur 4: Standard VII (Roche)



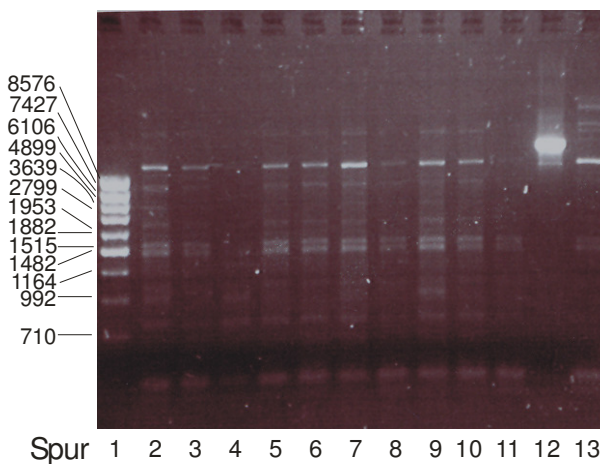
**Abb. 40:** Gelbild der Rep-PCR. Spur 1: Standard VII (Roche); Spuren 2–11: *E. coli*-Isolate aus dem Rattenkot; Spur 12: Standard VIII (Roche)



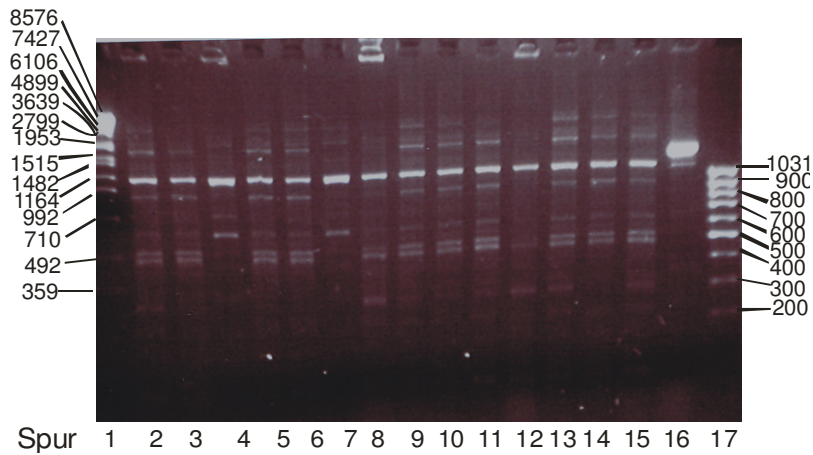
**Abb. 41:** Gelbild der Rep-PCR. Spur 1: Standard VII (Roche); Spuren 2–7: *E. coli*-Isolate aus dem Rattenkot; Spur 8: Positivkontrolle genomische DNA von *E. coli*-2685 mit #776 und #777; Spur 9: frei; Spur 10 und 11: pUC-araBPr-gfp mit #1116 und #1423 Spur 12: 100 bp DNA-Leiter (peqlab)



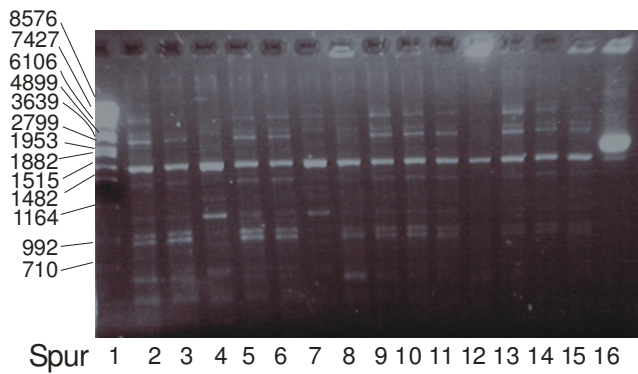
**Abb. 42:** Gelbild der Rep-PCR. Spur 1: Standard VII (Roche); Spuren 2–15: *E. coli*-Isolate aus dem Rattenkot; Spur 16: Positivkontrolle genomische DNA von *E. coli*-2685 mit #776 und #777



**Abb. 43:** Gelbild der Rep-PCR. Spur 1: Standard VII (Roche); Spuren 2–11 und 13: *E. coli*-Isolate aus dem Rattenkot; Spur 12: Positivkontrolle genomische DNA von *E. coli*-2685 mit #776 und #777



**Abb. 44:** Gelbild der Rep-PCR. Spur 1: Standard VII (Roche); Spuren 2–15: *E. coli*-Isolate aus dem Rattenkot; Spur 16: Positivkontrolle genomische DNA von *E. coli*-2685 mit #776 und #777; Spur 17: 100 bp DNA-Leiter (peqlab)



**Abb. 45:** Gelbild der Rep-PCR. Spur 1: Standard VII (Roche); Spuren 2–15: *E. coli*-Isolate aus dem Rattenkot; Spur 16: Positivkontrolle genomische DNA von *E. coli*-2685 mit #776 und #777

## 8.3 HPLC-Daten

	Konz. (µg/ml)							Int. Standard		Konz. (µg/ml)		Konz. (µg/g)	
	Cip	Gati				Cipro	Cipro	Gati	Gati	Cipro	Cipro	Cipro	Cipro
						4,4min		5,9min					
						Fläche	Höhe	Fläche	Höhe	Fläche	Höhe	Fläche	Höhe
SR	1,00	4,00				105977	10798	113363	9094				
SR	1,00	4,00				99521	10235	108583	8701				
<b>MW</b>	<b>1,00</b>	<b>4,00</b>				<b>102749</b>	<b>10517</b>	<b>110973</b>	<b>8898</b>				
	<b>Gew</b>	<b>I.S.</b>	<b>I.S.</b>		<b>RF</b>	<b>0,27</b>	<b>0,21</b>						
	<b>g</b>	<b>µg/ml</b>	<b>µg/g</b>	<b>Ratte</b>	<b>µg/ml</b>								
	0,047	5,00	107	2-	0	0	0	138214	10772	0	0	0,00	0,00
	0,145	5,00	34	2-	0	0	0	121923	9555	0	0	0,00	0,00
	0,104	5,00	48	3o	0,8	23903	2437	118047	9524	0,22	0,22	2,62	2,60
	0,070	5,00	72	4o	0,8	10926	1114	119121	9516	0,10	0,10	1,77	1,77
	0,101	5,00	50	5o	0,8	20464	2129	113597	9109	0,19	0,20	2,41	2,45
	0,113	5,00	44	5-	0,8	24001	2460	117119	9407	0,22	0,22	2,45	2,45
	0,054	5,00	93	5o	0,8	18902	1946	127086	10241	0,16	0,16	3,73	3,73
	0,114	5,00	44	5-	0,8	26797	2867	117912	9463	0,25	0,26	2,70	2,82
	0,080	5,00	63	3o	1,6	55448	5797	123267	9838	0,49	0,50	7,60	7,80
	0,051	5,00	97	4o	1,6	23614	2400	127797	10242	0,20	0,20	4,86	4,83
	0,047	5,00	106	5o	1,6	30401	3194	125880	10083	0,26	0,27	6,93	7,12
	0,058	5,00	86	5-	1,6	73144	7459	123267	9870	0,64	0,64	13,83	13,80
	0,029	5,00	175	5o	1,6	72002	7424	120734	9651	0,64	0,65	28,20	28,49
	0,047	5,00	106	5-	1,6	138154	14161	116499	9256	1,28	1,29	33,85	34,21
	0,043	5,00	115	3o	3,2	79730	8265	138013	10405	0,62	0,67	17,99	19,37
	0,040	5,00	125	4o	3,2	49411	5134	125535	10058	0,43	0,43	13,31	13,52
	0,048	5,00	105	5o	3,2	80254	8287	124563	9943	0,70	0,71	18,31	18,55
	0,056	5,00	90	5-	3,2	95629	9898	125098	9936	0,83	0,84	18,57	18,96
	0,060	5,00	83	5o	3,2	88148	9034	126963	10067	0,75	0,76	15,60	15,79
	0,100	5,00	50	5-	3,2	116735	12010	123824	9809	1,02	1,04	12,77	12,99
	0,099	5,00	50	3o	6,4	48003	4985	119682	9660	0,43	0,44	5,45	5,49
	0,030	5,00	165	4o	6,4	24677	2546	125236	10029	0,21	0,21	8,79	8,87
	0,110	5,00	46	5o	25,6	263391	26533	75860	5939	3,75	3,78	42,66	43,00
	0,064	5,00	78	5-	25,6	395119	40236	128516	10074	3,32	3,38	64,36	65,50
	0,024	5,00	209	3o	12,8	96831	9816	133094	10666	0,79	0,78	41,15	40,77
	0,065	5,00	77	4o	12,8	186846	19164	127733	10113	1,58	1,60	30,26	30,70

## 9 **Danksagung**

Zunächst bedanke ich mich ganz herzlich bei Herrn PD Dr. med. Hans-Jörg Linde, der mir diese Promotion ermöglicht hat. Ohne seine kompetente Unterstützung und Betreuung wäre diese Arbeit nicht zustande gekommen.

Herrn Prof. Dr. rer. nat. Michael Thomm danke ich für die bereitwillige und unkomplizierte Übernahme des Erstgutachtens.

Bei der gesamten AG Linde möchte ich mich für die Hilfsbereitschaft, Kollegialität und entspannte Arbeitsatmosphäre bedanken.

Ein ganz liebes Dankeschön geht an die AG Reischl, die mir in Sachen Real-Time-PCR mit Rat und Tat zur Seite standen und die Benutzung des LightCyclers zu allen Zeiten ermöglichten.

Herrn Dr. Thilo Spruss danke ich für die Unterstützung bei der Durchführung der Tierversuche.

Bei Herrn Prof. Dr. Frieder Kees bedanke ich mich für die Hilfe und Unterstützung bei der Durchführung der HPLC-Experimente.

Der größte Dank gilt meinen Eltern, die mir mein Studium ermöglicht haben und immer an mich geglaubt haben.

Last but not least möchte ich mich bei Reinhard bedanken, der mich in schweren Zeiten stets aufgemuntert und motiviert hat.