

Aus dem Lehrstuhl
für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene
Prof. Dr. Dr. Gessner
der Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

**Die Bedeutung des Gens *soxS* bei *E. coli*
und sein Einfluss auf Antibiotika-Efflux-Pumpen**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
der Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Stefanie Perpetua Eckhardt
geb. Kandler

2015

Aus dem Lehrstuhl
für medizinische Mikrobiologie und Hygiene
Prof. Dr. Dr. Gessner
der Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

**Die Bedeutung des Gens *soxS* bei *E. coli*
und sein Einfluss auf Antibiotika-Efflux-Pumpen**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
der Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Stefanie Perpetua Eckhardt
geb. Kandler

2015

Dekan:

Prof. Dr. Dr. Torsten E. Reichert

1. Prüfer:

Prof. Dr. Dr. André Gessner

2. Prüfer:

Prof. Dr. Ulrich Hohenleutner

Tag der mündlichen Prüfung:

20. Oktober 2015

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung	6
2	Einleitung	9
3	Material und Methoden	13
3.1	Material	13
3.1.1	Chemikalien und Plastikartikel.....	13
3.1.2	Enzyme.....	13
3.1.3	Antibiotika.....	13
3.1.4	Lösungen	14
3.1.5	Nährmedien	16
3.1.6	Kommerziell verfügbare Systeme für RNA- und DNA-Manipulation (kits)..	17
3.1.7	Primer	17
3.1.8	Geräte.....	19
3.1.9	Computerprogramme	20
3.1.10	Organismen, Plasmide und Vektoren.....	21
3.2	Methoden	23
3.2.1	DNA-Arbeitstechniken.....	23
3.2.1.1	Isolation genomischer DNA.....	23
3.2.1.2	Konzentrations- und Reinheitsgradbestimmung von DNA.....	23
3.2.1.3	Isolation von Plasmiden (Mini-Präparation).....	23
3.2.1.4	Restriktionsanalyse und –verdau	24
3.2.1.5	Behandlung mit alkalischer Phosphatase (CIP).....	24
3.2.1.6	Ligation	25
3.2.1.7	Elektrophorese von DNA in Agarosegelen	26
3.2.1.8	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen.....	26
3.2.2	Klonierung.....	27
3.2.2.1	Herstellung elektrokompenter Zellen.....	27
3.2.2.2	Transformation in elektrokompente Zellen (Elektroporation).....	27
3.2.2.3	Konjugation.....	28
3.2.2.4	Subklonierung von PCR-Produkten	28
3.2.2.5	Sequenzierung	29
3.2.3	RNA-Arbeitstechniken.....	29
3.2.3.1	Isolation von RNA.....	29

4 Inhaltsverzeichnis

3.2.3.2	DNase I-Verdau	29
3.2.3.3	Photometrische Konzentrationsbestimmung der RNA	30
3.2.3.4	Reverse Transkription.....	30
3.2.4	PCR-Techniken	31
3.2.4.1	Standard-PCR.....	31
3.2.4.2	PCR nach DNase I-Verdau von RNA.....	32
3.2.4.3	PCR zur Testung der spezifischen Amplifikation	33
3.2.4.4	real time-PCR.....	34
3.2.4.4.1	Spektrometrische Kontrolle des Probenmaterials	35
3.2.4.4.2	Quantifizierung	36
3.2.4.4.3	Fluoreszenzmessung mittels interkalierender Farbstoffe	37
3.2.4.4.4	Bewertung des <i>crossing points</i> (cps)	38
3.2.4.4.5	Effizienz.....	39
3.2.4.4.6	Berechnung mittels Delta-Delta-CP-Methode	39
3.2.4.4.7	Schmelzkurvenanalyse.....	40
3.2.4.4.8	Durchführung der <i>real time</i> -PCR.....	41
3.2.5	Reinigung von PCR-Produkten.....	41
3.2.6	Antibiotikaresistenztestung	42
3.2.7	Antibiotikaresistenztestung unter Einfluss von Paraquat.....	42
4	Ergebnisse.....	44
4.1	Konstrukte	44
4.1.1	Klonierungsstrategie für pCC1- <i>soxRS</i> und pCC1- <i>soxRSa</i>	46
4.1.2	Klonierungsstrategie für pUC19- <i>soxRS</i> und pUC19- <i>soxRSa</i>	47
4.1.3	Klonierungsstrategie für pUC19- <i>lacPr-soxS</i>	48
4.1.4	Klonierungsstrategie für pCC1- <i>lacPr-soxS</i>	48
4.1.5	Überprüfung der Klone	49
4.2	real time-PCR	50
4.2.1	Normalisierung mit dem <i>housekeeping</i> -Gen <i>gapA</i>	51
4.2.2	Festlegen der Signifikanz.....	54
4.2.3	Überprüfung der Spezifität der <i>real time</i> -PCR.....	54
4.2.4	<i>soxS</i> -Überexpression	55
4.2.5	<i>soxR</i> -Überexpression	56
4.2.6	Überprüfung der Einflussnahme auf ausgewählte Gene	57
4.3	Antibiotikaresistenztestung	58
4.3.1	Ermittlung der MHK mittels Epsilometerest (Etest®).....	59
4.3.1.1	MHK ausgewählter Fluorochinolone	61
4.3.1.2	MHK für Doxycyclin.....	62
4.3.1.3	MHK für Nalidixinsäure und Imipenem	62

5	Diskussion.....	63
5.1	Genotypische Untersuchungen mittels <i>real time</i> -PCR	63
5.1.1	Wahl der Methode	63
5.1.2	Diskussion der <i>real time</i> -PCR-Ergebnisse	64
5.1.2.1	Diskussion der genotypischen Ergebnisse für <i>soxS</i>	64
5.1.2.2	Diskussion der genotypischen Ergebnisse für <i>soxR</i>	66
5.1.2.3	Diskussion der genotypischen Ergebnisse für ausgewählte Effluxpumpengene.....	67
5.1.2.3.1	MarA	69
5.1.2.3.2	SdiA	70
5.1.2.3.3	AcrAB-TolC-Komplex.....	71
5.1.2.3.4	OmpF.....	75
5.1.2.3.5	mdfA	76
5.1.2.3.6	NorE	78
5.2	Phänotypische Untersuchungen mittels Epsilometertest - Diskussion der MHK- Ergebnisse.....	79
6	Ausblick.....	83
7	Abkürzungsverzeichnis.....	84
8	Literaturverzeichnis	87
9	Internetquellen.....	97
10	Abbildungsverzeichnis	98
11	Formelverzeichnis.....	99
12	Tabellenverzeichnis.....	99
13	Erklärung.....	100
14	Danksagung.....	101

1 Zusammenfassung

Ein häufiges Problem im klinischen Alltag sind die zunehmenden Resistenzen verschiedener Bakterien gegenüber Antibiotika. Im Rahmen einiger wissenschaftlicher Arbeiten zu diesem Themenkomplex wird angenommen, dass auch die Proteine SoxS und SoxR eine Rolle bei der Vermittlung von Resistenzen bei *E. coli* spielen (Miller & Sulavik, 1996).

Es wird vermutet, dass es sich bei dem Protein SoxS um einen Transkriptions-Aktivator in *Escherichia coli* handelt, welcher Gene stimuliert, die wiederum zu einer erhöhten Resistenz gegenüber oxidativem Stress und verschiedenen Antibiotika führen. Um die Transkription dieser Gene zu aktivieren, wird SoxS selbst durch die aktive Form von SoxR in seiner Struktur modifiziert. Die damit angestoßene Kaskade könnte zu einer gesteigerten Virulenz einer bakteriellen Infektion mit *E. coli* führen (Dempfle, 1996). Die Regulationseinheit aus SoxR und SoxS stellt auch ein Superoxid-Abwehrsystem dar, welches hierdurch an einer möglichen, sich ausbildenden Multiresistenz von *E. coli* beteiligt ist (Li & Dempfle, 1994; Amábile-Cuevas & Arredondo-García, 2013).

In dieser Arbeit sollte nun speziell das Regulon SoxRS und dessen Einfluss auf Effluxpumpen der Bakterienwand näher untersucht werden. Auch die Bedeutung oxidativen Stresses, welcher in dieser Arbeit durch Paraquat simuliert wurde, auf die Expression von *soxS* und *soxR* sowie auf verschiedene Effluxpumpen wurde näher untersucht. Die möglicherweise angestoßenen Veränderungen wurde dabei sowohl auf genotypischer Ebene mittels *real time*-PCR als auch auf phänotypischer Ebene mittels MHK-Testungen mit verschiedenen Antibiotika erfasst.

Im Rahmen von Vorarbeiten zu diesen Versuchen wurden verschiedene Klone generiert, um die mögliche Auswirkung konklusiv auf ihre tatsächliche im Genom zu Grunde liegende Ursache zurückführen zu können. Dabei wurde die Genomsequenz, welche für den Abschnitt *soxS* kodiert u.a. zusammen mit dem Locus *soxR* sowohl in *high copy*-Plasmide als auch in mittels Arabinose-Zugabe in ihrer Kopienzahl steuerbare *low copy*-Plasmide kloniert. Zudem wurde der Genlocus *soxS* in einem neu konstruierten Plasmid entkoppelt von *soxR* unter die Kontrolle des Genomabschnitts für den Promotor *lac* gestellt. Darüber hinaus

wurden auch Versuche mit inverser Orientierung des Genomabschnitts *soxRS* in diesen Plasmiden unternommen, um die mögliche Relevanz der Orientierung zu überprüfen.

Bei der Auswertung der *real time-PCR* zeigte sich, dass die Orientierung von *soxRS* eine wesentliche Rolle hinsichtlich des zu verzeichnenden Anstiegs der Expressionsrate spielt. Die Relevanz des Genomabschnitts *soxS* hinsichtlich der Reaktion auf Superoxide als Stressoren zeigte sich eindrücklich in dem deutlichen Anstieg der Expressionsrate von *soxS* und *soxR* unter dem Einfluss von Paraquat.

Des Weiteren wurden ausgehend von *soxS* und *soxR* die möglichen Veränderungen der Transkriptionsmenge verschiedener Proteine der Signaltransduktion (*MarA*, *SdiA*) sowie Proteine, die Effluxpumpen (*AcrAB-TolC*-Pumpenkomplex, *MdfA*, *NorE*) oder Porine der Zellwand (*OmpF*) bilden, untersucht. Für diese zusätzlich untersuchten Proteine ließen sich jedoch im Vergleich zum unveränderten Plasmidkonstrukt keine signifikanten Expressionsunterschiede für das jeweilige Gen feststellen. Neben der Erfassung genotypischer Veränderungen wurden auch Untersuchungen möglicher phänotypischer Veränderungen durch Testungen der generierten Konstrukte auf ihre jeweilige MHK gegenüber verschiedenen Antibiotika durchgeführt. Aus mehreren wissenschaftlichen Publikationen war bekannt, dass speziell bei Fluorochinolonen der Efflux aus dem Bakterium die Hauptursache einer verminderten Akkumulation dieser Medikamente im Bakterium darstellt (Pidcock, 1999). Neben einer Reihe von Fluorochinolonen wurden an den in dieser Arbeit generierten Konstrukten auch MHK-Veränderungen bei Versuchen mit Imipenem, Doxycyclin und Nalidixinsäure erfasst. Für die Konstrukte mit dem *low copy*-Plasmid waren - bis auf zwei Ausnahmen - keine signifikanten Veränderungen nachweisbar, während die Konstrukte mit dem *high copy*-Plasmid pUC19 fast durchweg einen signifikanten Anstieg der MHK gegenüber Fluorochinolonen und Doxycyclin zeigten. Darüber hinaus wurden alle MHK-Versuche parallel auch auf mit Paraquat vorbehandelten Platten durchgeführt. Durch diese zusätzliche Induktion konnten jedoch nur noch in geringen Umfang weitere Anstiege MHK erfasst werden.

Während die phänotypischen Ergebnisse dieser Arbeit sich mit den in verschiedenen wissenschaftlichen Publikationen beschriebenen Ergebnissen

8 Zusammenfassung

einer Zunahme der MHK in Bezug auf die ausgewählten Antibiotika decken, konnte eine alleinige Induktion verschiedener Proteine der Signaltransduktion und ausgewählter Effluxpumpen durch das Regulon SoxRS auf genotypischer Ebene nicht nachgewiesen werden.

2 Einleitung

Escherichia coli wurde 1885 als erstes spezifisches Darmbakterium durch Theodor Escherich beschrieben. Dabei handelt es sich um „ein gramnegatives, sporenloses, peritrich begeißeltes, deshalb bewegliches Stäbchen [...]“ (Hof et al., 2000, Kapitel „*Escherichia*“). *E. coli* ist der häufigste Vertreter der Enterobacteriaceae der natürlichen Darmflora (Kayser et al., 2001). Zudem ist „*E. coli* [...] der häufigste Erreger nosokomialer Infektionen“ (Hof et al., 2000, Kapitel „*Escherichia*“). Neben einer großen Bandbreite an Infektionen, die durch *E. coli* verursacht werden können, ist *E. coli* das gramnegative Bakterium, welches am häufigsten aus Blutkulturen isoliert wird. Zudem ist *E. coli* der verbreitetste Erreger von Harnwegsinfektionen. Das Bakterium steht in engem Zusammenhang mit dem Auftreten einer spontanen oder auch postoperativen Peritonitis sowie mit Haut- und Weichteilinfektionen von polymikrobieller Ätiologie. In der Kinderheilkunde wird *E. coli* auch als Erreger der neonatalen Meningitis gefürchtet und ist eine der führenden Ursachen von Lebensmittelinfektionen weltweit (1).

Mit einem Anteil von 15 – 20 % ist *E. coli* der häufigste Sepsiserreger – vor *Staphylococcus aureus* mit einem Prozentsatz von 10 – 15 %.

Während „bei der intestinalen Infektion [mit *E. coli*] [...] eine antibiotische Therapie nicht zwingend angezeigt [ist], [kann] bei extraintestinalen *E.-coli*-Infektionen [...] nur die gezielte Chemotherapie nach Austestung der Erregerempfindlichkeit zum Erfolg führen.“ (Hof et al., 2000, Kapitel „*Escherichia*“) Jedoch konnte anhand einer Datenzusammenstellung des Robert-Koch-Instituts von Testergebnissen aus dem Jahr 2008 nachgewiesen werden, dass für *E. coli* sowohl im ambulanten und mehr noch im stationären Bereich erhebliche Resistenzraten bezogen auf die Gesamtzahl des eingesandten Untersuchungsmaterials bestehen (2).

Die European Medicines Agency (EMA) schlug unlängst Alarm: Sie sei beunruhigt über die Entwicklung von antimikrobiellen Resistenzen im innereuropäischen Vergleich. Zunehmend rückt daher der zum Teil unkontrollierte Einsatz von Antibiotika in der Tiermast in den Fokus des Interesses. Die EMA geht davon aus, dass durch einen kontrollierten Einsatz von

antimikrobiellen Substanzen in der Tiermast das rasche Fortschreiten der Antibiotikaresistenzentwicklung auch in der Humanmedizin gebremst werden kann (3).

Eine Resistenz „liegt vor, wenn Bakterien in Anwesenheit therapeutisch relevanter Konzentrationen eines [...] Antibiotikums ihre Vermehrung nicht einstellen. Sie sind gegenüber der Wirksubstanz unempfindlich.“ (Hof et al., 2000, Kapitel „Resistenz“) Die „Angriffspunkte der Antibiotika sind [dabei] Strukturen von Mikroorganismen, die beim Menschen nicht oder in anderer Form vorhanden sind.“ (Vogel & Lebert, 2004, S. 385)

Resistenz gegenüber Antibiotika kann – vereinfacht dargestellt - durch verschiedene Mechanismen erreicht werden:

- Die Bakterien produzieren antibiotikaabbauende Enzyme, wie etwa β -Lactamasen, Aminoglykosidasen oder Chloramphenicol-Acetyltransferasen.
- Die Bakterien bilden antibiotikaunempfindliche Zielstrukturen aus, indem beispielsweise Umstrukturierungen an der Untereinheit „A“ der DNA-Gyrase erfolgen, so dass bestimmte Antibiotika („Gyrasehemmer“) ihre Wirkung nicht regelrecht entfalten können.
- Bei manchen Bakterien kommt es zu einer Veränderung der Permeabilitätsbarriere. Dabei wird der aktive Transport des eingesetzten Antibiotikums durch die Zytoplasmamembran gestört oder die passive Diffusion in das Bakterium wird erschwert.
- Ein weiterer, wichtiger Mechanismus ist die Zunahme des aktiven Efflux des Antibiotikums aus dem Bakterium. Dabei befördern in der Zytoplasmamembran lokalisierte Proteine im Sinne von „Pumpen“ die bereits eingedrungenen Antibiotika wieder aus der Zelle (Hof et al., 2000, Kapitel „Resistenz“).

In dem 2013 erschienen Bericht „Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2012“ (1) wird berichtet, dass ein Großteil der *E. coli*-Isolate, welche dem europäischen EARS-NET gemeldet wurde, zumindest gegen eines der unter besonderer Beobachtung stehenden Antibiotika resistent war. Neben *E. coli* erfolgte eine Aufstellung von Resistenzdaten für sieben weitere bakterielle Mikroorganismen, welche für die europäische Gesundheitspolitik eine

herausragende Bedeutung haben (*Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter* species, *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*) (1).

Für *E. coli* gehören zu diesen unter „besonderer Beobachtung“ stehenden Antibiotika Aminopenicilline, Cephalosporine der dritten Generation, Fluoroquinolone, Aminoglycoside und Carbapeneme (1).

Es zeigte sich, dass bei mehr als der Hälfte der Isolate eine Aminopenicillinresistenz vorlag, gefolgt von einer Resistenz gegenüber Fluoroquinolonen und Cephalosporinen der dritten Generation. Viele der Isolate, welche eine Resistenz gegenüber Cephalosporinen der dritten Generation zeigten, waren ESBL-positiv und wiesen zusätzlich Resistenzen gegenüber weiteren antimikrobiellen Substanzen auf (1). Dabei steht ESBL für Extended-Spectrum- β -Lactamasen. Dies sind bakterielle Enzyme, sog. β -Lactamasen, welche ein erweitertes Spektrum β -Lactam-haltiger Antibiotika spalten können. Zu den β -Lactam-Antibiotika zählt man beispielsweise Penicilline, Cephalosporine, Monobactame und Carbapeneme (4).

Während der letzten vier-Jahres-Periode konnte eine prozentuale Zunahme an resistenten *E. coli*-Isolaten in ganz Europa beobachtet werden. Als besonders besorgniserregend wird dabei die Zunahme von Resistenzen gegenüber Cephalosporinen der dritten Generation, Aminoglycosiden und die Zunahme an kombinierten Resistenzen eingestuft (1).

Betrachtet man die Resistenzmechanismen bei *E. coli* detaillierter, finden sich eine Reihe von – zum Teil sehr spezifischen – Strategien (1):

- Produktion von β -Lactamasen
- Hemmung der bakteriellen DNA-Gyrase bzw. Topoisomerase
- Strukturelle Modifikation des Antibiotikaangriffspunktes als Resistenzmechanismus gegenüber Aminoglykosiden
- Plamid-vermittelte Quinolon-Resistenz
- Verringerung der Antibiotika-Akkumulation

Gemäß dem Titel dieser Arbeit soll die Verringerung der intrazellulären Antibiotika-Konzentration als Möglichkeit einer Resistenz von *E. coli* hier eine nähere Erklärung erfahren:

Die Verringerung der intrazellulären Antibiotika-Konzentration wird dabei zum einen durch einen verminderten Einstrom (Influx) an Antibiotika in die Zelle bewirkt. Zum anderen verfügen manche Bakterien über ein System, welches einen Ausstrom (Efflux) des Antibiotikums aus der Zelle bewirkt.

Die Modulation des Influx geschieht hauptsächlich durch die sogenannten Porine. Dabei handelt es sich um porenformende Transmembranproteine in der äußeren Membran von gramnegativen Bakterien, welche in dieser Form erstmals von Hiroshi Nikaido (2003) beschrieben wurden.

Ebenso sind die sog. Efflux-Pumpen, welche einen großen Teil des Transports bereits eingedrungener Agentien aus dem Bakterium übernehmen an einer Verringerung der intrazellulären Antibiotika-Konzentration beteiligt. Es wird vermutet, dass ein Teil der zunehmenden Resistenzentwicklung bei *E. coli* auf diesen Mechanismus zurückzuführen ist. Zwischenzeitlich wurden einige Efflux-Pumpen bereits einer intensiven Betrachtung unterzogen. Dem vermuteten Regulationssystem mit den Proteinen SoxS und SoxR wurde dabei lange jedoch nur wenig Beachtung geschenkt.

Anbetracht der verschiedenen Resistenzmechanismen in *E. coli* sollte in dieser Arbeit der Mechanismus der Effluxpumpen und dabei insbesondere der Genlokus *soxS* näher untersucht werden. Zudem sollten in diesem Zusammenhang die möglichen Auswirkungen auf die Expression von *soxR* und verschiedener Effluxpumpen analysiert werden. Auch die Effekte oxidativen Stresses auf *soxS* und *soxR* sowie weitere Effluxpumpen sollte einer genaueren Betrachtung unterzogen werden.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Chemikalien und Plastikartikel

Folgende Firmen lieferten die einzelnen Chemikalien:

Eppendorf, Roche, NEB, Sigma-Aldrich, Merck, GibcoBRL, AppliChem, J.T. Baker, Oxoid, Roth und USB Corporation. Plastikwaren wurden von Greiner Bio-One, Falcon/Becton Dickinson, Sarstedt, Roth, Eppendorf oder Biozym erworben. Bis auf diejenigen Chemikalien und Plastikartikel, die bereits steril geliefert wurden, wurden vor Verwendung alle bei 121°C und 2 bar autoklaviert oder mittels Sterilfiltration (Porendurchmesser 0,22 µm, Roth, Karlsruhe) filtriert.

3.1.2 Enzyme

Alle eingesetzten Restriktionsenzyme und entsprechend benötigte Puffer wurden von NEB, Frankfurt/Main, bezogen.

3.1.3 Antibiotika

Folgende Antibiotika kamen als Hemmhofstests zur Anwendung:

- Cefuroxim
- Cotrimoxazol
- Gentamycin

Folgende Antibiotika wurden bei den Epsilometer-Tests (=Etest®) eingesetzt:

- Chloramphenicol
- Ciprofloxacin
- Doxycyclin
- Imipenem
- Moxifloxacin
- Nalidixinsäure
- Norfloxacin

Die Etest®-Streifen wurden von der Firma AB Biodisk, Solna, Schweden bezogen.

Tabelle 1: Angabe zu Antibiotika für die Zugabe in Selektionsmedien:

Substanz	Hersteller	Gebrauchsverdünnung
Ampicillin	Sigma-Aldrich, Steinheim	100 µg/ml
Kanamycin	Merck, Darmstadt	50 µg/ml
Zeocin	Cayla, Toulouse, Frankreich	12,5 µg/ml
Chloramphenicol	Fluka & Riedel-de Haën, Seelze	12,5 µg/ml

Die Herstellung erfolgte nach Korrektur für den Anteil der aktiven Substanz.

3.1.4 Lösungen

Tabelle 2 zeigt die in dieser Arbeit verwendeten Lösungen, soweit sie nicht im Rahmen der einzelnen Versuchsbeschreibungen erwähnt sind. Alle Lösungen wurden, sofern sie für den Umgang mit RNA benötigt wurden, mit DEPC behandeltem H₂O dest. hergestellt.

Tabelle 2: Verwendete Lösungen

Lösung	Zusammensetzung, Konzentration
DEPC-H ₂ O	1 l H ₂ O bidest. mit 1 ml DEPC über Nacht im Abzug gerührt und anschließend autoklaviert

Ethidiumbromid (Gebrauchslösung)	5 mg/ml
SDS (Stammlösung)	10 mg/ml
Lysozym (Stammlösung)	20 mg/ml; gelöst in DEPC-H ₂ O
Loading dye 6 x	Saccharose 40 % Bromphenolblau 0,25 % Xylencyanol 0,25 %
TBE (Stammlösung 10 x)	Tris 128 g Borsäure 55 g 0,5 M EDTA (pH 8,0) 20 ml ad 1l mit H ₂ O bidest, eingestellt auf pH 8.3
TBE (Gebrauchslösung 0,5 x)	Stammlösung 1:20 verdünnt
TE	Tris·HCl (pH 8,0) 0,6 g EDTA 0,185 g ad 50 ml mit H ₂ O bidest, eingestellt auf pH 8.0
6 x Ladepuffer	60 mM EDTA 0,25 % Bromphenolblau 30 % Glycerin
0,85 % NaCl	8,5 g NaCl in 1 l H ₂ O bidest. gelöst und autoklaviert
NaOH 2 N	80 g NaOH-Plätzchen in 1 l DEPC- H ₂ O gelöst
Protease K	20 mg/ml
TBI (Angaben für 1 Liter Lösung)	RbCl 12 g MnCl ₂ ×4H ₂ O 9,9 g KaCl 30 ml (von 1M Stock pH 7.5) CaCl ₂ ×2H ₂ O 1,5 g Glycerol 150 g mit Eisessig (0,2 M) auf pH 5.8 eingestellt und steril filtriert
TBII (Angaben für 1 Liter Lösung)	MOPS 20 ml (von 0,5 M Stock pH 6.8) (Morpholinethan Sulfonsäure) RbCl 1,2 g CaCl ₂ × 2 H ₂ O 11 g Glycerin 150 g mit NaOH MOPS-Puffer auf pH 6.8 eingestellt und steril filtriert

3.1.5 Nährmedien

Die institutseigene Nährbodenküche fertigte die in dieser Arbeit verwandten Nährmedien nach Standardrezepturen an.

Folgende Nährmedien kamen in dieser Arbeit zur Verwendung:

- Luria-Bertani-Medium (LB)
(Zusammensetzung: 10 g Caseinpepton, 5 g Hefeextrakt, 10 g NaCl, 15 g Agar; ad 1 l mit H₂O bidest, pH 7,0)
Die Lösung wurde 11 min bei 121 °C bei 2 bar Überdruck autoklaviert. Das Medium wurde ggf. als Selektionsmedium mit einer Konzentration von 100 µg/ml Ampicillin, 50 µg/ml Kanamycin, 12,5 µg/ml Zeocin oder 12,5 µg/ml Chloramphenicol eingesetzt

- Mueller-Hinton-Medium
38 g des gebrauchsfertigen Mueller-Hinton-Agars wurden in 1 l H₂O dest. gelöst und für 15 min bei 121 °C bei 2 bar autoklaviert.

- M9-Minimalmedium
(Zusammensetzung: 15 g Agar, 5 × M9–Stammlösung 200 ml, 20 ml Glukoselösung 20 % ad 1 l mit H₂O bidest.)
Nach dem Autoklavieren des Agars für 15 min bei 121 °C und 2 bar Überdruck erfolgt die Zugabe der Glukose und der M9-Stammlösung bei ca. 50 °C. Das Medium wurde ggf. als Selektionsmedium mit einer Konzentration von 100 µg/ml Ampicillin, 50 µg/ml Kanamycin oder 12,5 µg/ml Zeocin eingesetzt

3.1.6 Kommerziell verfügbare Systeme für RNA- und DNA-Manipulation (kits)

Tabelle 3: Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten kits

kit	Verwendung	Hersteller
DNeasy® Tissue kit	Isolierung genomischer DNA	QIAGEN, Hilden
First Strand cDNA Synthesis Kit	RT-PCR	Roche, Mannheim
LightCycler® FastStart DNA Master SYBR Green I	LightCycler®-PCR	Roche, Mannheim
NucleoSpin® Plasmid Quick Pure	Plasmidisolierung	MACHERY-NAGEL,
Omniscript RT kit	RT-PCR	QIAGEN, Hilden
pGEM®-T Easy Vector System	Klonierung von PCR-Produkten	Promega, Madison, USA
Qiaprep® Spin Miniprep kit	Plasmidisolierung	QIAGEN, Hilden
Qiafilter® Plasmid kit	Plasmidisolierung	QIAGEN, Hilden
Qiaquick® PCR Purification kit	Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus PCR oder Restriktionsverdau	QIAGEN, Hilden
Qiaquick® Gel Extraction kit	DNA-Extraktion aus Agarosegel	QIAGEN, Hilden
RNeasy® Mini kit	Isolierung von RNA	QIAGEN, Hilden
TOPO® Cloning 5-minute PCR Cloning kit	Subklonierung von PCR-Produkten	Invitrogen, Karlsruhe

3.1.7 Primer

In der Tabelle 4 werden die verwendeten Primer mit Nummer (= Name), Sequenz, Ziel-Gen, Schmelztemperatur und soweit bestehend die enthaltenen Schnittstellen aufgelistet.

Die Nummer der einzelnen Primer entstammt der laufenden Nummer der Liste der Arbeitsgruppe Linde. „Target“ bezieht sich auf die genetische Region, in der der Primer bindet. „ T_m “ gibt die berechnete *annealing*-Temperatur für diesen

Primer an. Die Berechnung beruht auf der Anzahl und Art der Basen in der Sequenz unter der Annahme, dass das Oligonukleotid vollständig an sein *target* bindet. Aus diesem Grund wurde die berechnete T_m für Primer mit Schnittstellen für Restriktionsenzyme, die nicht an die Targetsequenz binden, nicht übernommen.

Die Primer wurden mittels der Sequenz von *E. coli*-Stamm K12 mit der *Gene Bank* Accession number U00096 mit Hilfe der Programme SeqMan™ II und EditSeq™ entworfen.

Alle Primer wurden in einer Konzentration von 100 mM von Metabion, Martinsried hergestellt. Eine Ausnahme stellen M13 for/rev dar. Diese Primer wurden ausschließlich bei der Sequenzierung durch die Firma GeneArt, Regensburg, verwendet.

Tabelle 4: Übersicht über die verwendeten Primer

Nr.	<i>target</i>	Sequenz	T_m [°C]	Schnittstelle
M13 for	<i>pCR4</i>	GTAAAACGACGGCCAGT	-	-
M13 rev	<i>pCR4</i>	AACAGCTATGACCATG	-	
220	<i>acrA</i>	AGTTCGTCCTCAAGTTAGCG	57,3	
221	<i>acrA</i>	CGCTAATCGGAGAGGTGAC	58,8	
226	<i>acrB</i>	TGCTGAACTGGCGAAGATGGAACC	64,4	
300	<i>gyrA</i>	CGACCTTGCGAGAGAAAT	53,7	
301	<i>gyrA</i>	GTTCCATCAGCCCTTCAA	53,7	
858	<i>gapA</i>	CTGACATCGAGATCGTTGC	56,7	
859	<i>gapA</i>	GTTCTGGCAGTACTTTACC	54,5	
860	<i>acrR</i>	CATCCTCGATGTGGCTCTACG	61,8	
861	<i>acrB</i>	GACAGTACCATCGCGATACC	59,4	
862	<i>marA</i>	GATGTAAAAAGCGCGATTCGC	57,9	
863	<i>marA</i>	GTCCAGACGCAATACTGACG	59,4	
871	<i>acrR</i>	GCTTCAATACAATGTTTTAAC	50,0	
878	<i>gapA</i>	CATTGTTTTCCGTGCTGC	53,7	
879	<i>gapA</i>	GTAGAGGACGGGATGATGTTC	53,7	
898	<i>acrF</i>	CTTCCGTCTTCCTTCTTACC	57,3	
899	<i>acrF</i>	GTCACCATTACGCTCTTCC	56,7	
900	<i>tolC</i>	CGGAATTGCGTAAGTCTGC	56,7	

901	<i>tolC</i>	GCCTGTGTATAGGAAAGAACG	57,9	
906	<i>emrB</i>	CACTGCTGGTTATTGGTATCG	57,9	
907	<i>emrB</i>	GAGGCTGATACACAAGCAGC	59,4	
908	<i>acrD</i>	GTGATTTATGTCCTGCTGC	54,5	
909	<i>acrD</i>	CAGGCGGATAAACATTCG	53,7	
910	<i>mdfA</i>	GCAGCAAGCCATATTCATAGC	57,9	
911	<i>mdfA</i>	CTGATTGCTCCGCTACTTGG	59,4	
917	<i>norE</i>	GATATCTGTTCTTCCAGGTTGC	58,4	
918	<i>norE</i>	GTCCTGCGACATCAACAATACC	60,3	
920	<i>rob</i>	GGAATTCCATATGGATCAGGCCGGCATTATTTCG		NdeI
921	<i>rob</i>	GCTCTTCNTTATTAACGACGGATCGGAATC		SapI
924	<i>soxS</i>	AAGGCGTCAATCCCTCTTAA		
925	<i>soxS</i>	ATGTGGAGTCAGTGTGGAAC		
962	<i>acrS</i>	GAACAATTCCGCTGAAGG	53,7	
968	<i>acrS</i>	CAAAGCCGAAGCTCTGAAGACC	62,1	
975	<i>ompF</i>	GTAGCAGGTAAGTCAAAACGC	59,4	
976	<i>ompF</i>	GTAAGTCAAGTCAAAACGC	60,3	
997	<i>evgA</i>	GACCATCCTCTTGCTATCGC	59,4	
998	<i>evgA</i>	GTGCGAATGTGTAAGATCC	55,3	
999	<i>sdiA</i>	CCATGAAATTGAGCTTCAGGC	57,9	
1000	<i>sdiA</i>	CTATCTCTGCTGATGTTTTCCC	58,4	
1001	<i>baeR</i>	CATTGATTATCTGCGTGCTGC	57,9	
1002	<i>baeR</i>	GTCGAGAGATTCCAGCTTGC	59,4	
1034	<i>mdtH</i>	CTGTTGATGATGCAGGACAGTGC	62,4	
1035	<i>mdtH</i>	CGAAGCACTTAAGGTTTCACG	57,9	
1036	<i>mdtC</i>	GAGCAAACGCTGATTATCTCG	57,9	
1037	<i>mdtC</i>	GTGACTTGCCGTAGCCTTGTTGC	64,2	
1038	<i>mdtM</i>	GTTGATGGCGATTATCACCTCC	60,3	
1039	<i>mdtM</i>	GAAAGCATAACAGACTGGTGC	57,3	

3.1.8 Geräte

Folgende Geräte wurden benutzt:

- Ein Ultraspec 1000 Gerät von Pharmacia Biotech für spektrometrische Messungen.
- Das VITEK Colorimeter von bioMérieux Vitek, Hazelwood, USA zur Herstellung von Verdünnungen des Standards McFarland = 0,5 von Bakterien.

- Der Peltier ThermalCycler 200 von MJ Research zur Durchführung von PCR-Reaktionen.
- Ein Gene Pulser® zur Elektroporation
- Ein LightCycler® der Firma Roche, Mannheim diente zur Quantifizierung der cDNA.
- Zum Einsatz kamen auch Gelkammern der mechanischen Werkstatt der Universität Regensburg unter Verwendung der Stromquelle eines Microcomputer Electrophoresis Power Supply E425 von Consort. Diese wurden für Elektrophoresen verwendet, die entsprechenden Gele wurden bei UV-Licht der Wellenlänge $\lambda = 312 \text{ nm}$ (UV-Schirm von Bachofer, Reutlingen) fotografiert (EOS 300D / Canon) und ausgedruckt auf SONY UPP-110HP Type II High Density Printing Paper.
- Für DNA- und RNA-Manipulationen standen ein Thermomixer comfort der Firma Eppendorf und die Zentrifugen Centrifuge 5417 R von Eppendorf und Medifuge 15000 von Heraeus Sepatech zu Verfügung.
- Als UV-Lampe diente ein Gerät der Firma Micro-Bio-Tech, Stockholm, die sowohl langwelliges (365 nm) als auch kurzwelliges (254 nm) UV-Licht ausstrahlt.

3.1.9 Computerprogramme

Diese Arbeit inklusive der Diagramme und Vektorschemata wurde unter zu Hilfenahme von Microsoft® Office® (incl. der Programmteile Word®, Excel® und PowerPoint®) in den Versionen 2000, 2007 und 2010 angefertigt. Das Literaturverzeichnis wurde mit Einträgen aus dem ISI ResearchSoft Reference Manager Version 11 erstellt.

Die Literaturrecherche erfolgte mittels der Onlinedatenbank PubMed von NCBI (5).

Das *alignment* putativer Promotorsequenzen wurde mit Hilfe von BLAST (**B**asic **L**inear **A**lignment **S**earch **T**ool) von NCBI berechnet (6). *Alignments* von DNA-Sequenzen wurden auch im Programm SeqMan™ II vorgenommen.

Zur Bearbeitung von DNA-Sequenzen wurden die Programme DNASar SeqMan™ II, EditSeq™ und Lynnon BioSoft DNAMan™ der Version 5.2.9

verwendet. Das Programm DNAMan diente auch der Konstruktion von Vektorkarten.

Die Daten aus dem LightCycler® wurden mit der zugehörigen LightCycler Software Version 3.5 bzw. LightCycler® Software 4.0 (Roche, Mannheim) ausgewertet.

Die Speicherung der Graphen und Schmelzkurven aus dem LightCycler® wurde mit Paint Shop Pro 4, Version 4.12 (JASC Inc.) durchgeführt.

3.1.10 Organismen, Plasmide und Vektoren

Tabelle 5: Übersicht über die verwendeten Bakterien

Spezies	Stamm	Quelle
<i>Escherichia coli</i>	DH10B	RIMMH, Universität Regensburg
<i>Escherichia coli</i>	One Shot® TOP10	Invitrogen, Karlsruhe
<i>Escherichia coli</i>	TMEpi300	EPICENTRE®, Madison, USA
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922	LGC Promochem, Wesel
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1450	RIMMH, Universität Regensburg

Alle Organismen wurden über Nacht bei 37 °C in flüssigem Medium bei 200 U/min geschüttelt oder auf mit 1,5 % Agar-verfestigtem LB-Medium gezogen.

Der *E. coli*-Stamm DH10B exprimiert kein RecA, das homologe Rekombination durchführt. Daher wurde dieser Stamm für Klonierungen durch Elektroporation verwendet.

Zur Subklonierung von PCR-Produkten diente der Vektor pCR4® von Invitrogen. Dieser Vektor wird zusammen mit chemisch kompetenten Zellen *E. coli* One Shot® Top10 kommerziell von Invitrogen vertrieben. Das Plasmid pCR4®-TOPO® enthält eine Ampicillin- wie auch eine Kanamycin-Resistenzkassette und einen *lacZα-ccdB*-Promoter.

Für Klonierungen mit dem Vektor pCC1ΔB wurden Zellen des Stamms TMEpi300 (*E. coli*-Stamm TMEpi300 der Firma Epicentre) benötigt. Dieser Stamm produziert bei Induktion durch Arabinose das Protein des *trfA*-Gens, das zur Vermehrung dieser Plasmide obligat benötigt wird. Der Vektor pCC1ΔB liegt in

der Zelle als *single copy*-Plasmid vor, bis durch Zugabe von Arabinose ins Medium die Erhöhung der

Kopienzahl gezielt induziert wird. Durch die entsprechende Zugabe von Arabinose ist eine Kontrolle der Plasmidkopienzahl möglich.

Da es sich bei pCC1ΔB um einen *low copy*-Vektor handelt, können somit Vergleiche zwischen Plasmid-kodierten Genen im *high copy*-System mit pUC19 und dem *low copy*-System mit dem Plasmid pCC1ΔB gezogen werden. Das Plasmid pUC19 enthält ebenfalls eine Ampicillin-Resistenzkassette und einen *lacZ*-Promotor.

Der *E. coli*-Stamm ATCC 25922 wird nach Richtlinien des *Clinical and Laboratory Standards Institute* (Wayne, USA) bei Sensitivitätsbestimmungen von klinischen Isolaten gegenüber Antibiotika als sensibler Kontrollstamm verwendet.

Zur Bestimmung der Auflösungsgrenze des LightCycler® *real time*-PCR-Systems diente cDNA des *Klebsiella pneumoniae* Stamms 1450. Dieser Stamm stellt ein klinisches Isolat mit verringerter Sensitivität gegenüber Fluorchinolonen dar.

Tabelle 6: Verwendete kommerzielle Vektoren

Die Spalten „Restriktions-Stellen“ und „Marker“ stellen jeweils eine Auswahl dar.

Name	Restriktions-Stellen	Marker	Quelle
pUC19	AatII, NdeI, XbaI	Amp, lacZ	NEB
pCR4®-TOPO®	EcoRI, PstI	Amp, Km, lacZα-ccdB	Invitrogen
pCC1ΔB	BamHI	Chl, lacZ	Epicentre

Alle gentechnischen Arbeiten sind durch den Gentechnikantrag der AG Linde „Fluorchinolonresistenz durch Efflux“ abgedeckt.

3.2 Methoden

3.2.1 DNA-Arbeitstechniken

3.2.1.1 Isolation genomischer DNA

Für diese Arbeit wurden Übernachtskulturen des *E. coli*-Stamms TM EPI 300 bei 37°C und 200 Umdrehungen pro Minute herangezogen. Nach einer Nacht wurde ein ml in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß (ERG) überführt und bei 15.000 U/min (*Heraeus Sepatech* Medifuge von Heraeus Sepatech GmbH, Osterode am Harz) für 20 s zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und aus dem verbliebenen Pellet entsprechend des Hersteller-Protokolls des Qiagen DNeasy Tissue Kits (QIAGEN, Hilden) für gramnegative Bakterien genomische DNA isoliert.

3.2.1.2 Konzentrations- und Reinheitsgradbestimmung von DNA

Alle DNA-Konzentrationsbestimmungen erfolgten spektrometrisch mit einem Spektrometer der Firma Hellma, Jena, in Quarzküvetten (Schichtdicke 10 mm) bei Wellenlängen von $\lambda = 260$ nm und $\lambda = 280$ nm.

Mit der allgemein angewandten Formel, dass die optische Dichte von 1 bei einer Wellenlänge von 260 nm 50 µg DNA entspricht, wurde auf die jeweilige DNA-Konzentration rückgerechnet. Zur Abschätzung der Reinheit der DNA wurde der Quotient der Werte bei $\lambda = 260$ nm und $\lambda = 280$ nm pro jeweiliger Probe berechnet. Lag das Ergebnis zwischen 1,7 und 1,9, so wurde vom Vorliegen annähernd reiner DNA ausgegangen.

3.2.1.3 Isolation von Plasmiden (Mini-Präparation)

Zunächst wurde von den benötigten Stämmen jeweils eine Flüssigkultur hergestellt. Hierzu wurden mittels einer Einmalimpföse eine Kolonie von einer Anzuchtplatte in 7,5 ml flüssiges Medium (LB-Flüssigmedium bzw. LB-Selektivmedium mit 100 µg/ml Ampicillin oder 12,5 µg/ml Chloramphenicol) überimpft und bei 37 °C in einem Schüttler mit 200 Umdrehungen pro Minute

(U/min) über Nacht inkubiert. Die Zellen wurden anschließend bei 15.000 U/min für 20 s geerntet.

Die alkalische Lyse der geernteten Zellen erfolgte entsprechend den Herstellerangaben für den Qiaprep® Spin Miniprep Kit. Das Zelldebris wurde in einem nächsten Schritt ausgefällt und bei 15.000 U/min für 10 min abzentrifugiert. Die Reinigung der Plasmide erfolgt über eine Säule mit Silica-Matrix. Die genomische DNA verblieb somit auf der Säule.

3.2.1.4 Restriktionsanalyse und –verdau

Üblicherweise wurden 0,5 µl des Produkts einer Plasmidisolation zur Restriktionsanalyse verwandt und mit fünf bis zehn Units Enzym verdaut. Die Inkubationszeit betrug jeweils 1 h. Bei der Wahl der optimalen Inkubationstemperatur, der Wahl des Puffers sowie ggf. der Konzentration von BSA wurde gemäß den Herstellerangaben vorgegangen.

War ein Doppelverdau mit zwei Enzymen vorgesehen, wurde dieser nach Möglichkeit innerhalb einer Reaktion nach den Empfehlungen von NEB (New England Biolabs, Frankfurt am Main) durchgeführt.

Die entstandenen Fragmente wurden anschließend auf ein Agarosegel aufgetragen.

Analog dem geschilderten Vorgehen wurde jeweils der Restriktionsverdau ausgeführt. Dabei wurden 15–20 µl des Produkts einer Plasmidisolation mit 30–40 Units des jeweiligen Enzyms für 1 h bei der vom Hersteller vorgegebenen Reaktionstemperatur inkubiert. Gegebenenfalls wurden Fragmente, welche weiter untersucht werden sollten, aus dem Agarosegel mit Hilfe des Qiaquick® Gel Extraction Kits von QIAGEN eluiert.

3.2.1.5 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. Damit ist die Rezirkularisierung des Vektors nahezu ausgeschlossen.

Hierfür wurde folgender Ansatz verwendet:

DNA	30 μ l
Reaktionspuffer (NEB 3)	3 μ l
CIP	1–4 μ l
H ₂ O	x μ l
<hr/>	
Endvolumen	40 μ l

Das Gesamtvolumen der Reaktion wurde auf das 10-fache der in der Enzympräparation enthaltenen Menge an Glycerin angepasst. Nach 1 h Inkubation bei 37 °C wurden die so behandelten Vektoren über die Säulen des Qiaquick® PCR Purification Kits von QIAGEN gereinigt (s. 3.2.5 Reinigung von PCR-Produkten).

3.2.1.6 Ligation

Unter Ligation versteht man die enzymkatalysierte Verknüpfung zweier DNA- oder RNA-Segmente an ihren Enden. So wird dabei z. B. ein DNA-Fragment in ein Plasmid eingebracht. In dieser Arbeit wurden Ligationen nach folgendem Ansatz durchgeführt:

Vektor	x μ l
Insert	y μ l
T4-DNA-Ligase	1 μ l
T4-DNA-Ligase-Puffer	1,5 μ l
<hr/>	
Endvolumen	15 μ l

Alle Vektoren waren zuvor mit alkalischer Phosphatase behandelt worden, sofern sie nicht aus einem Doppelverdau mit inkompatiblen Enden entstanden waren.

Das Konzentrationsverhältnis von Vektor zu *insert* betrug 1:3. Die Wahl der Konzentration von Vektor zu *insert* erfolgte im Verhältnis 1:3.

Die Ligationsansätze wurden über Nacht bei einer Temperatur von 16 °C oder für ein bis zwei Stunden bei RT inkubiert. Um die Ligation zu stoppen, wurde der Ansatz für 10 min bei 70 °C inkubiert.

3.2.1.7 Elektrophorese von DNA in Agarosegelen

Zur Bestimmung der ungefähren Größe von DNA-Fragmenten wurde das Verfahren der Gelelektrophorese genutzt. Hierfür wurden Agarosegele hergestellt, deren Trennvermögen durch eine Variation der Konzentration der Agarose von 0,8 % weight per volume für Fragmente größer als 3 kb und bis zu 2 % w/v für kleinere Stücke angepasst wurde.

Die entsprechende Menge Agarose wurde in 50 ml 0,5 × TBE aufgekocht und nach Zugabe von 3 µl der Gebrauchslösung Ethidiumbromid in die Kammer der Größe 8 cm x 10 cm gegossen. Nach Polymerisation wurde das Gel mit 0,5 × TBE als Laufpuffer überschichtet. Anschließend wurden die Proben, die zuvor mit *loading dye* versetzt worden waren, aufgetragen und das Gel mit einem Längenstandard versehen. Die Laufzeit der Gele betrug ca. 40 min bei 60 bis 85 V (500 mA). Die Gele wurden unter UV-Licht der Wellenlänge $\lambda = 312$ nm fotografiert.

Die in dieser Arbeit verwendeten Längenstandards *DNA molecular weight marker II, VII* und *VIII* stammen von der Firma Roche, Mannheim (z. B. Standard VII von 359 bis 8.576 bp und Längenstandard VIII von 67 bis 1.114 bp), die 1 kb DNA-Leiter und die 100 bp DNA-Leiter wurden von PEQLAB, Erlangen produziert. Der Lambda DNA/Eco47I Marker 13 wurde durch die Firma Fermentas, St. Leon-Rot hergestellt.

3.2.1.8 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Um die jeweiligen Fragmente nach dem Auftrennen weiter in Experimente einsetzen bzw. einer genaueren Analyse unterziehen zu können, mussten

einzelne Fragmentbanden aus dem Agarosegel extrahiert werden. Dieses wurde mit Hilfe des Qiaquick®Gel Extraktion Kit der Firma QIAGEN nach den Vorgaben des Herstellers durchgeführt.

3.2.2 Klonierung

3.2.2.1 Herstellung elektrokompenter Zellen

Für die Herstellung elektrokompenter Zellen aus dem *E. coli*-Stamm TM EPI 300 wurden Übernachtskulturen dieses Stammes angelegt. Am Folgetag wurden jeweils drei ml der Übernachtskultur entnommen und mit 100 ml frischen LB-Mediums versetzt. Während einer weiteren Wachstumsphase bei 37 °C wurden immer wieder Messungen vorgenommen, bis eine OD₅₈₀ zwischen 0,5 und 1 erreicht war und die Kulturen für 20 Minuten auf Eis gelagert werden konnten.

Je 6 ml dieser Kulturen wurden abpipettiert und bei 4 °C mit der Zentrifuge 5417 R von Eppendorf bei 4.500 U/min für 3 min abzentrifugiert. Das entstandene Pellet wurde je zweimal mit 2 ml kaltem H₂O und einmal mit 1 ml 10 %igem Glycerin gewaschen. Nach jedem Waschschrift wurde kurz zentrifugiert, der Überstand vorsichtig abgenommen und verworfen. Abschließend wurde das Pellet in 40 µl 10 %igem Glycerin aufgenommen. Die damit entstandenen elektrokompenten Zellen wurden entweder sofort für eine Elektroporation verwendet oder mit flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur Verwendung bei –80 °C gelagert.

3.2.2.2 Transformation in elektrokompente Zellen (Elektroporation)

Die tiefgefrorenen, elektrokompenten Zellen wurden auf Eis aufgetaut. Anschließend wurden die enthaltenen 40 µl an elektrokompenten Zellen mit jeweils 2 µl des Ligationsansatzes oder der Plasmidpräparation versetzt und in eine eisgekühlte Küvetten der Schichtdicke 0,2 cm überführt. Hierbei war zu beachten, dass die Küvette, welche nun in den GenePulser der Firma Bio-Rad, München eingesetzt wurde, außen trocken getupft werden musste. Anschließend

wurde eine Spannung von 2,5 Volt angelegt. Damit wurde die Transformation induziert. Im Weiteren wurden die Zellen in 1 ml LB-Medium aufgenommen und für ca. 1 h bei 37 °C bebrütet. Nach dieser Phase wurden die Suspensionen auf Selektivmedium für die gesuchten Transformanten ausgebracht und ÜN bei 37 °C bebrütet.

Auf diesen Platten wachsende Klone wurden abgestrichen und ÜN in 3 ml des LB-Flüssigmediums mit entsprechendem Zusatz an Antibiotikum kultiviert. Nach einer anschließenden Plasmidpräparation wurden diese mittels einer Restriktionsanalyse überprüft. Bei Restriktionsanalysen konnte anhand unterschiedlicher Schnittmuster der Restriktionsenzyme die Orientierung der ligierten DNA-Abschnitte unterschieden werden. Bei Sequenzanalysen wurde mit geeigneten Primern die richtige Abfolge und Orientierung der inserierten Fragmente dokumentiert.

3.2.2.3 Konjugation

Unter Konjugation wird in dieser Arbeit die Übertragung eines Plasmids (Donor) auf einen Akzeptor, in diesem Fall der Stamm TM EPI 300 aus der Art *E. coli* verstanden. So wurden zur Konjugation je 500 µl einer Kultur des Donors und des Empfängers zusammen für 3 min bei 5.000 U/min zentrifugiert. Das Pellet mit 150 µl Überstand wurde für 4 h bei 37 °C erschütterungsfrei inkubiert und anschließend in 500 µl LB-Flüssigmedium aufgenommen.

3.2.2.4 Subklonierung 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.

Bei Routine-Subklonierung von PCR-Produkten wurden je 4 µl des PCR-Produkts mit 0,5 µl des pCR4®-Vektors nach Herstellerangaben (TOPO TA Cloning® for Sequencing, Version K) ligiert und in *E. coli* OneShot® TOP10-Zellen transformiert.

Der Vektor pCR4®-TOPO® besitzt am 3'-Ende eine Thymidinbase als Überhang. An diesem Nukleotid ist eine Topoisomerase kovalent gebunden, die mit den

Adenosinüberhängen von PCR-Produkten den durchgängigen DNA-Strang wiederherstellt.

3.2.2.5 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.

Zur Auswertung von Sequenzierdaten wurden die Programme DNASTar *SeqMan*TM II (Dnastar, USA), *EditSeq*TM (Dnastar, USA) und Lynnon BioSoft DNAMan der Version 5.2.9 sowie <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/> (6) verwendet.

3.2.3 RNA-Arbeitstechniken

3.2.3.1 Isolation 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.

3.2.3.2 DNase I-Verdau

Die DNase I ist eine neutrale Base, die die enzymatische Spaltung zwischen der 5'-Phosphatgruppe und der 3'-Hydroxygruppe zweier Nukleotide ermöglicht. In der vorliegenden Arbeit wurde sie eingesetzt um eine DNA-Kontamination in den RNA-Proben zu entfernen.

In den DNase I-Verdau wurden 20 µg isolierte RNA eingesetzt und mit 40 Units DNase I (Gesamtvolumen mit H₂O auf 50 µl erhöht) 1 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die RNA entsprechend dem RNA Cleanup Protokoll aus dem RNeasy® Kit nach Herstellerangaben über eine Säule mit Silica-Matrix gereinigt.

Der vollständige Verdau wurde in einer PCR-Reaktion, in der kein Produkt entstehen durfte, nachgewiesen (s. 3.2.4.2 PCR nach DNase I-Verdau von RNA). Zusätzlich wurde 1 µl der gereinigten und dem DNase I-Verdau unterzogene RNA auf ein 0,8 % w/v Agarosegel aufgetragen. Zwei klare ribosomale Banden auf der Höhe von 1.542 bp (16 S rRNA) und 2.904 bp (23 S rRNA) zeigten intakte RNA nach der Behandlung mit DNase I an.

3.2.3.3 Photometrische Konzentrationsbestimmung der RNA

Die Konzentration der präparierten RNA wurde photometrisch mit Hilfe des Spec™ 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 (*extinctio*, lat. für „Auslöschung“) bei 260 nm kann nach dem Lambert-Beerschen Gesetz die RNA-Konzentration bestimmt werden ($A_{260} = 40 \mu\text{g ssRNA/ml}$). Über das Verhältnis A_{260}/A_{280} lässt sich die Reinheit bestimmen (reine RNA: $A_{260}/A_{280} \geq 2$) (RNeasy® Mini Handbook, QIAGEN).

Anschließend wurde 1 µl der Präparation auf ein 0,8 % w/v Agarose-Gel aufgetragen, um an Hand der ribosomalen Banden auf der Höhe 1.542 bp (16S rRNA) und 2.904 bp (23S rRNA) die Intaktheit der RNA beurteilen zu können.

Die derart überprüfte RNA wurde im Weiteren für die reverse Transkription verwendet.

3.2.3.4 Reverse Transkription

Als reverse Transkription bezeichnet man die Übersetzung von RNA in cDNA (c für engl. complementary DNA, dt. komplementäre DNA, DNA, die mit Hilfe des Enzyms reverse Transkriptase aus RNA synthetisiert wird). Dies erfolgte in dieser Arbeit unter Zuhilfenahme des First Strand cDNA Synthesis Kit for RT-PCR (AMV) von Roche, Mannheim mit *random primers* (Hexanukleotide) nach Herstellerangaben. In die Reaktion wurde je 2 µg RNA eingesetzt.

Während des ersten Inkubationsschrittes (25 °C, 10 min) findet das Binden der Primer statt, im nachfolgenden Schritt (42 °C, 1 h) wird die RNA sukzessive revers transkribiert. Hieraus resultiert einzelsträngige cDNA. Abschließend erfolgt eine Enzymaktivierung bei 99 °C für 5 min. Die gewonnene cDNA wurde bei -20 °C gelagert. Zur Kontrolle wurden parallel Ansätze ohne reverse Transcriptase bzw. ohne RNA als Matrize durchgeführt.

3.2.4 PCR-Techniken

3.2.4.1 Standard-PCR

Wenn nicht anders angegeben, wurden alle Standard-PCR-Reaktionen mit dem 2,5-fach konzentrierten (abgekürzt mit: 2,5 x) PCR MasterMix von Eppendorf, Hamburg, als gebrauchsfertig erhältliche Zusammenstellung von hitzestabiler DNA-Polymerase aus *Thermus aquaticus*, Nukleotiden und Puffern durchgeführt.

Pro Standard-PCR-Reaktion wurde folgender Ansatz pipettiert:

<i>template</i>	x µl
2,5 x PCR MasterMix	20 µl
Primer <i>forward</i> (100 mM)	1 µl
Primer <i>reverse</i> (100 mM)	1 µl
H ₂ O	y µl
<hr/>	
Gesamtvolumen	50 µl

Der Ansatz wurde anschließend in einen PTC-200 Thermo Cycler der Firma MJ Research, Reno, USA, eingesetzt, welcher nach folgendem Programm arbeitete:

Denaturierung	94 °C (5 min)
30 Zyklen à:	
Denaturierung	94 °C (40 s)
<i>annealing</i>	x °C (30 s)
Elongation	72 °C (y min)
abschließende Elongation	72 °C (7 min)
Aufbewahrungsphase	4 °C (kontinuierlich)

Als *template* dienten je 1 µl einer Plasmid- oder gDNA-Präparation bzw. 10 µl eines Schnellaufschlusses einer Bakterienkultur.

Der erste Denaturierungsschritt dient der Aktivierung des Enzyms. Die *annealing*-Temperatur richtete sich nach der berechneten Schmelztemperatur T_m (engl. temperature of melting) der benutzten Primer. Für Primer mit Schnittstellen für Restriktionsenzyme wurde eine *annealing*-Temperatur von 54 °C eingesetzt. Die Elongationszeit wird aus der Länge des zu replizierenden DNA-Stücks berechnet. Pro 1 kb wird 1 Minute Elongationszeit benötigt. Im letzten, sieben Minuten dauernden Elongationsschritt produziert die DNA-Polymerase aus *Thermus aquaticus* die für spätere Klonierungsschritte nötigen Adenosin-Überhänge an den PCR-Fragmenten.

Der Nachweis über ein entstandenes PCR-Produkts wird durch eine anschließend durchzuführende Gelelektrophorese erbracht.

3.2.4.2 PCR nach DNase I-Verdau von RNA

Ein weiteres Anwendungsgebiet für die Polymerasekettenreaktion war die Testung auf Vollständigkeit eines DNase I-Verdaus einer RNA-Präparation bzw. der Prüfung auf Verunreinigung der RNA-Präparation mit DNA. Nach dem Verdau sollte in der RNA-Präparation keine DNA mehr enthalten sein, die als *template* für eine PCR-Reaktion dient. Bestenfalls entsteht also kein spezifisches Produkt.

RNA-Präparation	1 µl
PCR MasterMix	20 µl
Primer <i>forward</i> 300/858 (100 mM)	1 µl
Primer <i>reverse</i> 301/859 (100 mM)	1 µl
H ₂ O	27 µl
<hr/>	
Gesamtvolumen	50 µl

Eingesetzt wurde je 1 µl der DNase I-verdauten und gereinigten RNA-Präparation und hieraus hergestellte Verdünnungen von 1:10, 1:50 und 1:100. Das *template*

für die Positiv-Kontrolle bestand in 1 µl gDNA des entsprechenden Stammes. Anschließend durchlief der obige Ansatz das folgende Programm im PTC-200 Thermo Cycler der Firma MJ Research, Reno, USA:

Denaturierung	94 °C (5 min)
30 Zyklen à	
Denaturierung	94 °C (30 s)
<i>annealing</i>	54 °C (30 s)
Elongation	72 °C (1 min)
abschließende Elongation	72 °C (7 min)
Aufbewahrungsphase	4 °C (kontinuierlich)

Nachdem die Proben dieses Programm durchlaufen hatten, wurden sie einer Gelelektrophorese unterzogen. Bei regelrechter Behandlung der Proben ließ sich nur im Fall der Positivkontrolle eine Bande auf diesem Gel nachweisen.

3.2.4.3 PCR zur Testung der spezifischen Amplifikation

Alle Primer, die in einer *real time*-PCR Verwendung finden sollten, wurden auf die Amplifikation des spezifischen Produkts getestet. Auf diese Weise wird eine Qualitätskontrolle der *real time*-PCR-Ergebnisse parallel zur Schmelzkurve des LightCycler® erreicht.

<i>template</i> (gDNA)	1 µl
PCR MasterMix	20 µl
Primer <i>forward</i> (10 mM)	1 µl
Primer <i>reverse</i> (10 mM)	1 µl
H ₂ O	27 µl
<hr/>	
Gesamtvolumen	50 µl

Dieser Ansatz durchlief folgendes Programm im Thermo Cycler:

Denaturierung	94 °C (5 min)
30 Zyklen à	
Denaturierung	94 °C (30 s)
<i>annealing</i>	55 °C (30 s)
Elongation	72 °C (30 s)
abschließende Elongation	72 °C (7 min)
Aufbewahrungsphase	4 °C (kontinuierlich)

Anschließend wurden die Proben auf ein Agarosegel aufgetragen und die Banden auf ihre ungefähre Größe hin mit der Größe des erwarteten Fragments verglichen. Konnte mittels Gelelektrophorese ein entsprechend großes Fragment nachgewiesen werden, wurde zudem eine Sequenzierung des Produkts durch die Firma GeneArt, Regensburg, veranlasst, welche den endgültigen Nachweis über die Basenabfolge erbrachte.

3.2.4.4 *real time*-PCR

Bei der *real time*-PCR handelt es sich um eine quantitative Echtzeit-PCR. Die Methode der Nukleinsäurevervielfältigung beruht auf dem Prinzip der Polymerasekettenreaktion bei der zudem die Möglichkeit besteht, Rückschlüsse auf die Menge des Ausgangsprodukts über die Quantifizierung der gewonnenen DNA zu ziehen (Bustin, 2000).

Es ist also eine relative und absolute Quantifizierung (s. 3.2.4.4.2 Quantifizierung) transgenspezifischer Transkripte möglich (Eleaume & Jabbouri, 2004): Dabei erfolgt die Quantifizierung über die Detektion von Fluoreszenzsignalen mit Hilfe interkalierender Farbstoffe wie SYBR Green I von Roche, Mannheim, oder Ethidiumbromid (s. 3.2.4.4.3 Fluoreszenzmessung mittels interkalierender Farbstoffe). Die Quantifizierung erfolgt also über Fluoreszenz-Messungen, die während eines PCR-Zyklus erfasst werden. Die Fluoreszenz nimmt proportional mit der Menge der PCR-Produkte zu, dabei

lassen sich die aktuell gemessenen Fluoreszenzdaten am Monitor verfolgen. Am Ende eines Laufs (der aus mehreren Zyklen besteht) wird anhand von erhaltenen Fluoreszenzsignalen die Quantifizierung in der exponentiellen Phase der PCR vorgenommen. Nur in der exponentiellen Phase der PCR (die wenige Zyklen in einem Lauf dauert) ist die korrekte Quantifizierung möglich, da während dieser Phase die optimalen Reaktionsbedingungen herrschen. Die Software des LightCyclers® von Roche, Mannheim, errechnet sog. *crossing points* (cps) als Maß für die *template*-Konzentration. (s. 3.2.4.4.4 Bewertung des *crossing points* (cps)).

Die Methode der *real time*-PCR unterscheidet sich somit von anderen quantitativen PCR-Methoden (qPCR), die erst nach Ablauf der PCR eine quantitative Auswertung, meist unter Einbeziehung einer gelelektrophoretischen Auftrennung der PCR-Fragmente, vornehmen (s. 3.2.4.1 Standard-PCR; 17). Die PCR-Produkte im LightCycler®-System besitzen idealerweise eine Länge von ca. 500 bp, da längere Fragmente nicht mehr zuverlässig vom LightCycler® amplifiziert werden (Rajeevan et al., 2001). Für jeden Ansatz mit einem Primerpaar wurde auch eine negative Kontrolle ohne cDNA-*template* mitgeführt.

3.2.4.4.1 Spektrometrische Kontrolle des Probenmaterials

Zudem erfolgte in der vorliegenden Arbeit die spektrometrische Vermessung der Konzentration der eingesetzten RNA. Vor dem Einbringen der RNA in die reverse Transkriptase-Reaktion erfolgte eine Konzentrationsbestimmung mittels Messung der optischen Dichte bei einer Wellenlänge von 260 nm. Hierdurch sollte sichergestellt werden, dass in die Reverse Transkriptase-Reaktion je 2 µg RNA eingesetzt werden. „Die Qualität des Probenmaterials, also der Gesamt-RNA, hat einen markanten Einfluss auf die Richtigkeit der quantitativen RT-PCR. Die Überprüfung der RNA-Qualität vor einer Expressionsmessung ist unabdingbar, um verlässliche RT-qPCR-Expressionsergebnisse zu erhalten.“ (Becker et al., 2009)

Diese Art der Konzentrationsbestimmung ist jedoch mit Fehlern behaftet, so dass nicht exakt gleiche Mengen RNA in die reverse Transkription eingesetzt werden

können. Zusätzlich entstehen bei der reversen Transkription nicht zuverlässig gleiche Mengen an cDNA in verschiedenen Ansätzen (Bustin, 2000).

Durch die parallele Messung von *housekeeping*-Genen wird jedoch versucht, die Unterschiede in der Konzentration der cDNA in verschiedenen Ansätzen auszugleichen (s. Absatz 3.2.4.4.2 Quantifizierung).

3.2.4.4.2 Quantifizierung

Hierbei ist zwischen einer relativen und absoluten Quantifizierung zu unterscheiden, die auf verschiedenen Rechenmodellen basieren und sich in ihrer Bezugsgröße unterscheiden:

Zur relativen Quantifizierung wird zumeist ein Referenz-Gen mitgemessen wird, um einen relativen Mengenvergleich durchzuführen (Romanowski et al., 2007). An dieses Referenzgen, welches als interne Kontrolle benötigt wird und bei der Auswertung der Resultate Variationen in der Ausgangsmenge der eingesetzten RNA ausgleichen soll, werden zweierlei Voraussetzungen gestellt: Zum einen soll diese interne Kontrolle leicht zu detektieren sein, zum anderen sollte deren Expression keinen Schwankungen im Zellzyklus und durch von außen einwirkende Faktoren wie etwa Stress unterliegen (Bustin, 2000).

In der vorliegenden Arbeit wurde das *housekeeping*-Gene *gapA* bei jeder neuen cDNA Präparation ebenfalls neu mitbestimmt. Zudem ist die mRNA von *gapA* in höherer Konzentration vorhanden als die RNA anderer Gene, deren Proteine nur in bestimmten Phasen des Lebenszyklus oder unter bestimmten Bedingungen vorhanden sind (Knippers, 2001). Daher erfolgte auch bei allen weiteren Untersuchungen die Bestimmung der *crossing points* im linearen Bereich der Messkurve.

Bei der absoluten Quantifizierung handelt es sich um eine weitaus kompliziertere Methoden, bei der die genaue Anzahl des in der Probe vorhandenen *templates* bestimmt werden soll.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Methode der relativen Quantifizierung gewählt.

Wie bereits ausgeführt, wird bei der relativen Quantifizierung im Rahmen der *real time*-PCR die Genexpression des Zielgens auf ein weiteres *housekeeping*-Gen (HKG) bezogen. Dieser Vorgang wird auch Normalisierung der Expressionsergebnisse genannt (Pfaffl, 2004).

Ein geeignetes HKG sollte folgende Voraussetzungen erfüllen: HKGs sollten grundlegende Zellfunktionen besitzen, in allen Zellen konstant aktiv sein und nach Möglichkeit sollten keine Expressionsunterschiede im Vergleich verschiedener Gewebe vorliegen (Wiedemann et al., 2004)

Vorteile der Normalisierung mittels HKG liegen in der Reduzierung der Varianz der Expressionsergebnisse, da Gewebe- und Matrixeffekte, unterschiedliche RNA Extraktionseffizienzen sowie Fehler bei der RT-PCR innerhalb einer experimentellen Probe gleichermaßen das Zielgen und das housekeeping-Gen betreffen. (Pfaffl, 2004)

In dieser Arbeit wurde als housekeeping Gen *gapA* (Abkürzung für: *glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase A*) verwendet. Das Gen *gapA* von *E. coli* weist eine enge strukturelle Ähnlichkeit mit eukaryontischen GAPDHs auf (Charpentier & Branlant, 1994).

3.2.4.4.3 Fluoreszenzmessung mittels interkalierender Farbstoffe

Als interkalierende Farbstoffe können DNA-bindende Farbstoffe wie Ethidiumbromid und SYBR Green I von Roche (Mannheim) verwendet werden. Diese beiden Fluoreszenzfarbstoffe lagern sich in die DNA ein, sie interkalieren bzw. binden an die doppelsträngige DNA, wodurch die Fluoreszenz dieser Farbstoffe ansteigt. Die Zunahme der *target*-DNA korreliert daher mit der Zunahme der Fluoreszenz von Zyklus zu Zyklus.

Ein Vorteil von SYBR Green I ist, dass dieser dsDNA-bindende Farbstoff hoch sensitiv ist, bereits wenige Kopien bzw. Reaktionen detektieren kann und ein stärkeres Signal als Ethidiumbromid liefert (Freeman et al., 1999).

Beim SYBR Green I handelt es sich um einen asymmetrischen Cyanin-Farbstoff, der zum Nachweis von doppelsträngiger DNA genutzt wird (Zipper et al., 2004; Yue et al., 1997; Haugland et al., 1995). Nach der Bindung an doppelsträngige DNA resultiert ein DNA-Fluoreszenzfarbstoff-Komplex, der blaues Licht bei einer

Wellenlänge $\lambda_{\max} = 494$ nm optimal absorbiert und grünes Licht bei $\lambda_{\max} = 521$ nm emittiert. Weitere, wenn auch deutlich schwächere Absorptionsmaxima liegen im UV-Bereich bei 284 nm und 382 nm (Zipper et al., 2004). In ungebundenem Zustand hingegen weist SYBR Green I nur eine schwache, vernachlässigbare Fluoreszenz auf (7).

Beim LightCycler®-System von Roche erfolgte die Messung der Fluoreszenz in jeder Kapillare bei $\lambda = 530$ nm, außerdem findet die Messung der Fluoreszenz am Ende der Elongation statt. Ein Nachteil bei der Methode mit interkalierenden Farbstoffen ist das Fehlen der Möglichkeit Multiplex-Messungen durchzuführen (Zipper et al., 2004). Bei einer Multiplex-PCR ist es jedoch sehr schwierig Wechselwirkungen zwischen den Oligonukleotiden vollständig auszuschließen (8).

Ein weiterer Nachteil des Verfahrens mit interkalierenden Farbstoffen ist die geringe Spezifität, da zwischen verschiedenen PCR-Produkten nicht unterschieden werden kann. Dieser Verfahrensnachteil lässt sich durch eine sog. Schmelzkurvenanalyse ausgleichen, bei der die Fragmentlänge und dadurch die Spezifität bestimmt werden kann (Wittwer et al., 2001).

3.2.4.4.4 Bewertung des *crossing points* (cps)

In der Anfangsphase der Amplifikation der Polymerasekettenreaktion ist die Menge an *template* sehr begrenzt, während die Menge der Produkte gegen Ende der Amplifikation derart ansteigt, dass es u. a. zur Hemmung durch die Produkte selbst kommt. Ein exponentieller und daher quantifizierbarer Anstieg findet sich nur in der Phase dazwischen. Um immer am Anfang der exponentiellen Phase messen zu können, wurde in dieser Arbeit jeweils der *crossing point* bestimmt. Dies ist der Punkt des Zyklus, an dem die detektierte Fluoreszenz erstmalig signifikant über die Hintergrundfluoreszenz ansteigt (Holzapfel & Wickert, 2007). Die *cps* können als Maß für die Menge an *template* in der Reaktion gelten. Mehr Ausgangsmaterial an DNA in der Reaktion führt somit zu einem früheren Anstieg der Fluoreszenz und damit einem früheren bzw. niedrigeren *crossing point*.

3.2.4.4.5 Effizienz

Da die Effizienz der PCR-Reaktion nicht für alle Ansätze gleich ist (Bustin, 2000), müssen die Rohdaten um Unterschiede in der Effizienz ausgeglichen werden. Es besteht eine lineare, umgekehrt proportionale Beziehung zwischen dem Logarithmus der eingesetzten Menge und dem *crossing point*. Aus einer für jedes Gen zu erstellenden Verdünnungsreihen lässt sich so die Steigung der Standardkurve mit Hilfe der LightCycler® Software berechnen. Dafür berechnet die Software eine Regressionsgerade aus den *crossing points* und dem dekadischen Logarithmus der Konzentration. Die Steigung dieser Geraden („*slope*“) geht direkt in die Berechnung der Effizienz ein.

Die Effizienz E kann dann durch Einsetzen dieses Wertes mit folgender Formel berechnet werden (Wiedemann et al., 2004):

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

Formel 1: Formel für die Berechnung der Effizienz E

3.2.4.4.6 Berechnung mittels Delta-Delta-CP-Methode

In das Berechnungsmodell müssen also die Effizienz, die *crossing points* für das Zielgen und das *housekeeping gen* einfließen.

Zur Anwendung kam deshalb in dieser Arbeit die sog. Delta-Delta-CP-Methode. „Das Berechnungsmodell setzt sich aus der Berechnung des Expressionsunterschiedes zwischen Behandlung und Kontrolle im Zielgen im Zähler und aus der Berechnung des Expressionsunterschiedes des Referenzgens im Nenner zusammen“ (Pfaffl, 2004). Dieses Berechnungsmodell geht jedoch von $n=1$ aus. In einem wissenschaftlichen Experiment ist es jedoch üblich, dass mehrere Wiederholungen durchgeführt werden. Deshalb wurden in dieser Arbeit die jeweiligen Werte für das betreffende Gen in Gruppen als

Mittelwerte zusammengefasst (Pfaffl, 2004). Diese Methode der Berechnung wird hier als Formel dargestellt:

$$R = \frac{(E_{\text{Zielgen}})^{\Delta CP_{\text{Zielgen}} \text{ (MW Kontrolle - MW Behandlung)}}}{(E_{\text{Referenzgen}})^{\Delta CP_{\text{Referenzgen}} \text{ (MW Kontrolle - MW Behandlung)}}}$$

Formel 2: Basisformel der Delta-Delta-CP-Methode (nach: Pfaffl, 2004).

Diese Formel fand zwischenzeitlich auch Eingang in ein spezielles RT-PCR Auswertprogramm, das sog. *REST* (= *Relative Expression Software Tool*) (Pfaffl et al., 2002). In dieser Arbeit kam dieses Auswertprogramm jedoch noch nicht zur Anwendung, da die Datenerfassung initial nicht auf dieses Programm ausgelegt worden war.

3.2.4.4.7 Schmelzkurvenanalyse

Da die doppelsträngige DNA von spezifischen PCR-Produkten einen höheren spezifischen Schmelzpunkt hat als unspezifisch entstehende sog. Primer-Dimere, ist somit eine Unterscheidung zwischen spezifischen und unspezifischen PCR-Produkten möglich. Die Höhe des Peaks der Schmelzkurve gibt annähernd Auskunft über die Menge des gebildeten Fragments.

Im Rahmen der Schmelzkurvenanalyse wird die DNA aufgeschmolzen, indem die Temperatur langsam aber kontinuierlich erhöht wird (von 50 °C auf 95 °C). Bei einer für das Fragment spezifischen Schmelztemperatur denaturiert der Doppelstrang zu zwei einzelsträngigen Fragmenten. Dabei wird der verwendete Fluoreszenzfarbstoff (in dieser Arbeit SYBR Green I) freigesetzt und das Gerät detektiert eine plötzlichen Abnahme der Fluoreszenz (s. Abbildung 7).

3.2.4.4.8 Durchführung der *real time*-PCR

Soweit nicht anders angegeben, wurde jeweils 1 µl einer cDNA Präparation verwendet. Es wurde für jeden Ansatz pro Primerpaar (s. Tabelle 4: Übersicht über die verwendeten Primer) folgender Mastermix hergestellt:

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

Anschließend durchlief der obige Ansatz das folgende Programm im LightCycler®:

Denaturierung	95 °C (10 min)
50 Zyklen à	
Denaturierung	95 °C (10 s)
<i>annealing</i>	55 °C (20 s)
Elongation	72 °C (30 s)
Schmelzkurve	40 °C – 99 °C

Der erste Denaturierungsschritt dient der Aktivierung des Enzyms, welches von einem Protein gegen Denaturierung bei niedrigen Temperaturen geschützt ist.

3.2.5 Reinigung von PCR-Produkten

Mittels des Qiaquick® PCR Purification Kit von QIAGEN wurden PCR-Produkte gereinigt, um für Restriktionsverdau, Klonierungsversuche sowie Sequenzanalysen zur Verfügung zu stehen.

Diese Reinigung wurde gemäß dem Protokoll von QIAGEN (Handbuch Seite 18, Version von 03/2001) durchgeführt. Als endgültige Elutionsmenge an EB-Puffer wurden in dieser Arbeit regelmäßig 30 µl verwendet.

3.2.6 Antibiotikaresistenztestung

Die Bestimmung der MHK gegenüber Antibiotika folgte gemäß den Richtlinien des *National Consensus Committee for Laboratory Standards* (9).

Zur Bestimmung der Antibiotikaresistenz wurden ÜN-Kulturen der jeweiligen Stämme in 0,85 % NaCl auf den Standard McFarland = 0,5 verdünnt.

Handelte es sich bei dem zu testenden Stamm um den Wildtyp von TM EPI 300 wurden Mueller-Hinton-Agarplatten verwendet, bei Stämmen die pCC1-Konstrukte enthielten, wurden Selektivmedien mit 12,5 µg/ml Chloramphenicol hergestellt und bei Klonen, welche pUC 19-Konstrukte enthielten wurde auf Platten mit 100 µg/ml Ampicillin getestet. Die entsprechenden Platten wurden mit den zugehörigen Stämmen vollständig beimpft und zusammen mit je einem Etest[®]-Streifen ÜN bei 37 °C inkubiert.

Die Schnittstelle des Hemmhofes mit der auf den Etest[®]-Streifen aufgedruckten Skala gibt die MHK an. Das Vorgehen fußt auf den mitgelieferten Verfahrensanweisungen der Herstellerfirma der Etest[®]-Streifen (AB Biodisk, Solna, Schweden). Die Dokumentation erfolgte schriftlich.

3.2.7 Antibiotikaresistenztestung unter Einfluss von Paraquat

Paraquat ist eine quartäre Ammoniumverbindung, welche als Kontaktherbizid ausgebracht wurde (10). In der experimentellen Forschung dient Paraquat häufig dazu, biologische Systeme oxidativem Stress zu unterziehen. Seine Rolle bei der Induktion oder Repression von *soxR* und *soxS* wird in der experimentellen Wissenschaft seit Jahren sehr kontrovers diskutiert.

In der vorliegenden Arbeit sollte nach der Testung der MHK der Wildtypen im Vergleich zu den Konstrukten mit einer variierendem Kopienzahl an *soxR* und *soxS*, die Auswirkung von oxidativem Stress auf eine mögliche Änderung der

Kopienzahl dieser Gentranskripte und eine möglicherweise damit verbundene Änderung der MHK in Bezug auf ausgewählte Antibiotika untersucht werden.

Aus 30 mg Paraquat und destilliertem Wasser wurde unter den vom Hersteller empfohlenen Sicherheitsvorkehrungen eine 2 mM-Lösung hergestellt. Auf jeder der Agarplatten wurden je 850 µl dieser Lösung gleichmäßig mit dem Drygalski-Spatel verteilt und die Platten ÜN im Brutschrank belassen. Bezogen auf die Füllmenge der Agarplatten betrug die Endkonzentration 100 µM Paraquat. In den Versuch wurden ebenso wie bei der zuvor durchgeführten Antibiotikaresistenztestung für den Wildtyp TMEPI 300 Mueller-Hinton-Agarplatten verwendet, bei Stämmen die pCC1-Konstrukte enthielten, wurde Paraquat auf Selektivmedien mit 12,5 µg/ml Chloramphenicol mit dem Drygalski-Spatel ausgebracht und bei Klonen, welche pUC 19-Konstrukte enthielten wurden Platten mit 100 µg/ml Ampicillin mit Paraquat bestrichen. Eine Gegenüberstellung bzw. Vergleich der MHK, also ohne Einfluss von Paraquat und unter dessen Einfluss, wurde für die Antibiotika Chloramphenicol, Ciprofloxacin, Norfloxacin, Levofloxacin, Gatifloxacin und Moxifloxacin vorgenommen. Wie bereits unter 3.2.6 besprochen, wurde der Wert angegeben, welcher an der Schnittstelle des Hemmhofes mit der auf den Etest[®]-Streifen aufgedruckten Skala abzulesen war.

4 Ergebnisse

4.1 Konstrukte

Es wurden daher verschiedene Plasmidkonstrukte generiert, die zu unterschiedlichen Expressionsleveln von *soxS* in *E. coli* führen sollten (s. Tabelle 7). Diese wurden in weitere Versuche eingesetzt um die dadurch möglicherweise entstehenden sowohl phäno- als auch genotypische Veränderungen mit unveränderten Stämmen vergleichen zu können.

Um das Regulationssystem von *soxS* genauer untersuchen zu können, wurde *soxS* zum einen zusammen mit seinem Regulator *soxR* und andererseits unter der Kontrolle des *lac*-Promotors in das jeweilige Plasmid transformiert.

Die Nummerierung der Konstrukte erfolgte durch Zuordnung freier Ziffern in der arbeitsgruppeneigenen Stammbank der AG Linde.

Tabelle 7: Übersicht über die verwendeten bzw. klonierten Stämme

Stammnr.	Stammeigenschaften			
	Host	Plasmid	Insert	Paraquat-Induktion
# 89	TM EPI 300	pCC1	<i>soxRS</i> in regelrechter Orientierung	
# 89 induz.	TM EPI 300	pCC1	<i>soxRS</i> in regelrechter Orientierung	erfolgt
# 92	TM EPI 300	pCC1	<i>soxRS</i> in reverser Orientierung	
# 92 induz.	TM EPI 300	pCC1	<i>soxRS</i> in reverser Orientierung	erfolgt
# 122	TM EPI 300	ohne	Ohne	
#130	TM EPI 300	pCC1	ohne _dB	
#130 induz.	TM EPI 300	pCC1	ohne _dB	erfolgt
#191	TM EPI 300	pUC19	<i>soxRS</i> in regelrechter Orientierung	
# 192	TM EPI 300	pUC19	<i>soxS</i> unter der Kontrolle des <i>lac</i> -Promotors	

Die genomische DNA von TransforMax™ EPI300™ (TM EPI 300) *E. coli* diente als template für alle in dieser Arbeit durch PCR-amplifizierten DNA-Fragmente.

Als Insertionsort dieser Sequenzen wurde neben einem *high copy*-Plasmid *pUC19* auch ein *low copy*-Plasmid *pCC1* gewählt. Durch Klonierung in das durch L-Arabinose in seiner Kopienzahl steuerbare *pCC1_dB*-Plasmid bestand die Möglichkeit die Kopienzahl im einzelnen Bakterium feiner zu beeinflussen. Während der *pMB1* Replikationsursprung den *pUC19* zu einem *high copy*-Plasmid macht (Lin-Chao et al., 1992), verfügt der *pCC1*-Vektor sowohl über den *E. coli* F-Faktor *single copy*-Replikationsursprung als auch über den *high copy*-(*oriV*)-Replikationsursprung (Wild et al., 2002). Die Initiation der Replikation über *oriV* benötigt das TrfA-Protein. TrfA steht unter der Kontrolle des *araB*-Promotors, daher kann in diesem Stamm über die L-Arabinosekonzentration im Medium die TrfA-Expression und damit die Replikation von *pCC1* in einem Bereich zwischen 1-70 Kopien sehr genau reguliert werden.

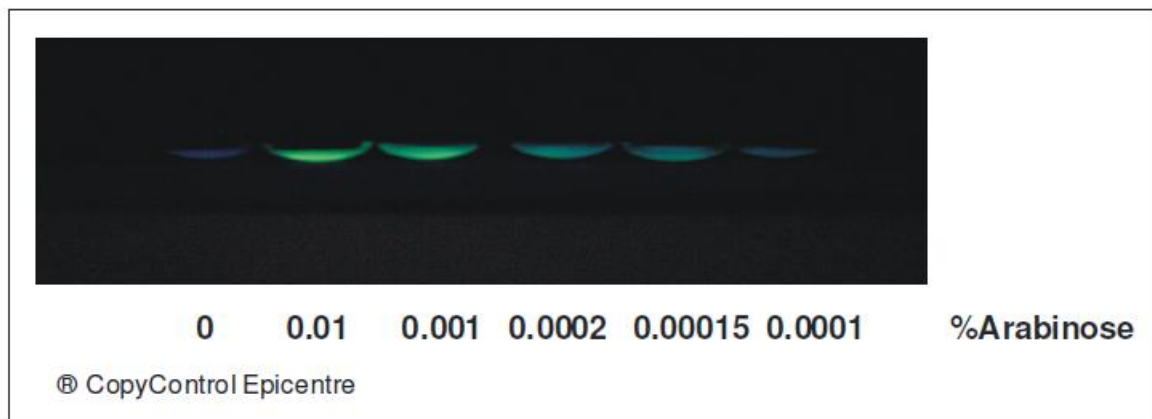


Abbildung 1: Induktion von pCC1-gfp mit Arabinose (Linde, 2004).

Angegeben werden die jeweiligen Konzentrationen von Arabinose

Speziell die beiden Vektoren *pCC1_dB* und *pUC19* wurden also verwendet, um die Möglichkeit zu haben, die Auswirkung von sehr unterschiedlichen Plasmidkopienzahlen pro Zelle zu untersuchen.

Damit sollte sehr verschiedenhohe *level* an *soxS* erreicht werden und zusätzlich sollte die Möglichkeit bestehen, mögliche Einflüsse auf Antibiotika-Effluxvorgänge abgestuft nachzuweisen.

4.1.1 Klonierungsstrategie für pCC1-*soxRS* und pCC1-*soxRSa*

Der *copy control* pCC1-Vektor beinhaltet eine Schnittstelle für BamH I (s. Abbildung 2: der blaue Pfeil verweist auf die BamH I-Schnittstelle). Nach enzymatischer Spaltung wurde in diese das Gentranskript *soxRS* eingefügt. Der für *soxRS* kodierende Abschnitt umfasst 1011 Basenpaare, wurde mit Hilfe der Primer 965 und 966 amplifiziert und vor der Ligation mit BamH1 verdaut. Das *soxRS*-Fragment wurde in beiden möglichen Orientierungen in den Vektor kloniert. Diese reverse Orientierungen wird in dieser Arbeit durch den Zusatz „a“ angezeigt: *soxRS* bzw. *soxRSa* (s. Abbildung 5). Das ligierte Plasmid hat eine Gesamtlänge von 9128 bp.

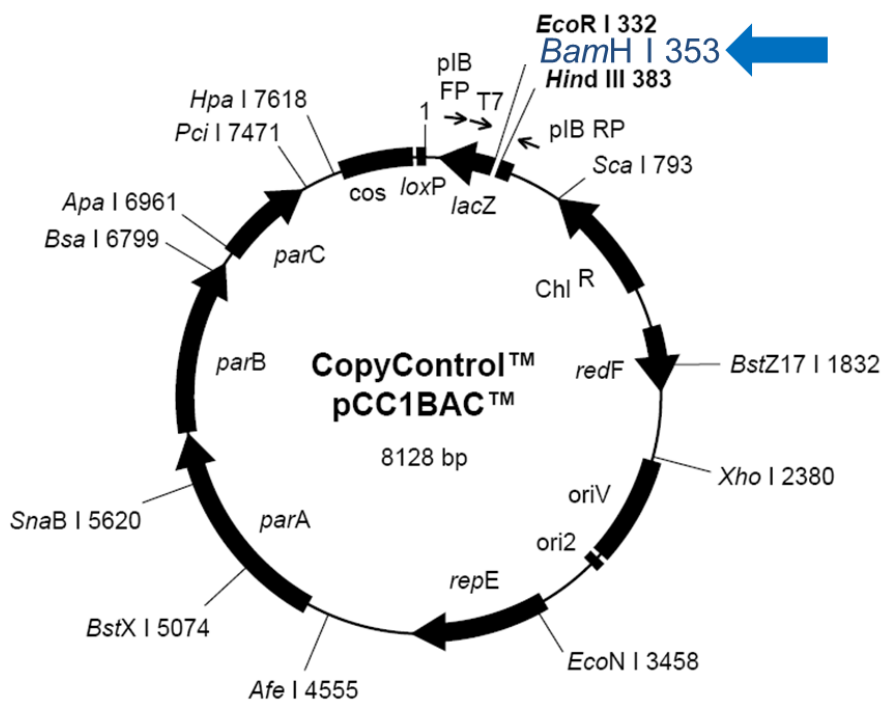


Abbildung 2: Der copy control pCC1-Vektor mit einer Auswahl an Enzymschnittstellen (11).

Der blaue Pfeil verweist auf die BamH I-Enzymschnittstelle.

4.1.2 Klonierungsstrategie für pUC19-soxRS und pUC19-soxRSa

Der Vektor pUC19 beinhaltet in seiner *multiple cloning site* (MCS) eine Schnittstelle für das Enzym BamH I (s. Abbildung 3: der blaue Pfeil verweist auf die BamH I-Schnittstelle). In diese Schnittstelle wurden die mit BamH I vorbereiteten Fragmente *soxRS* bzw. *soxRSa* eingefügt. „a“ steht wiederum für die reverse Orientierung des Fragments *soxRS*.

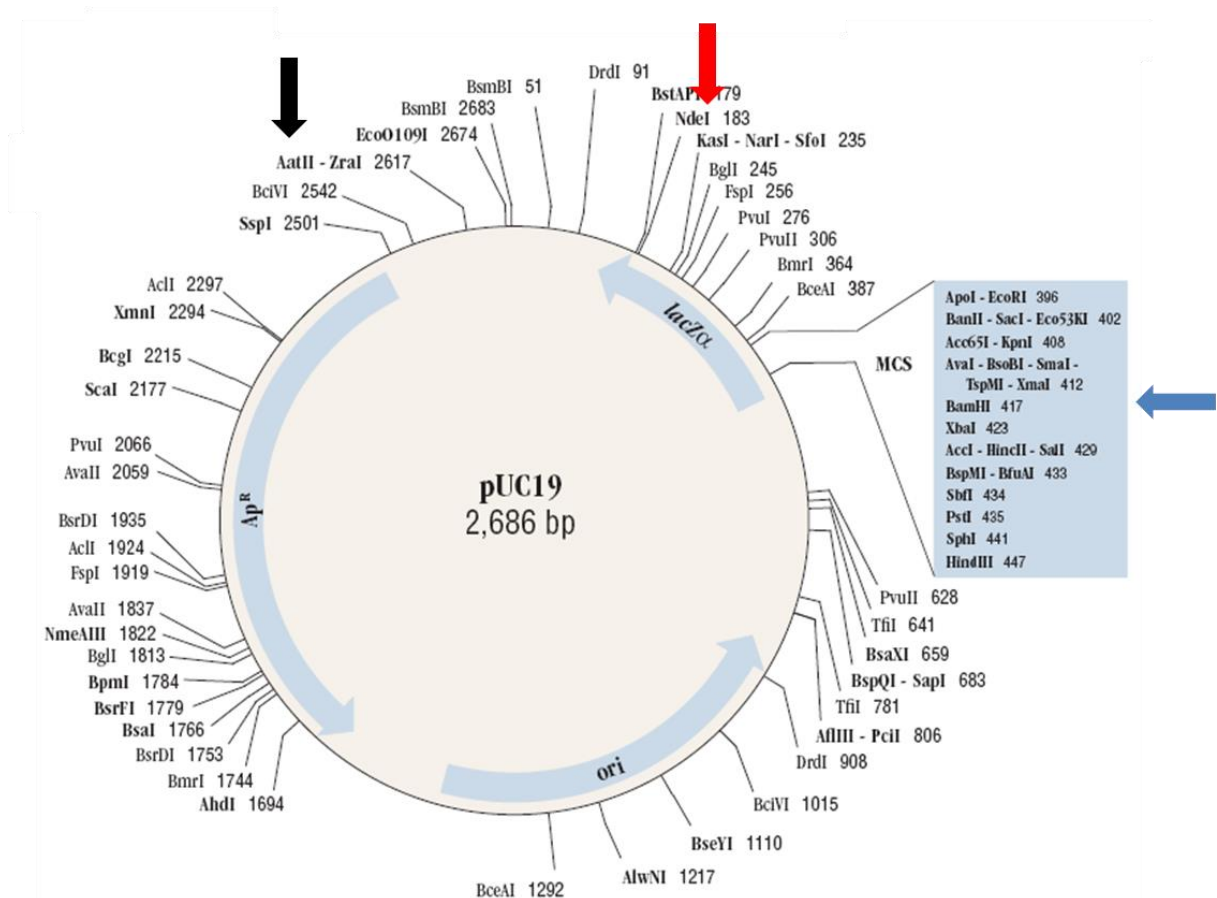


Abbildung 3: Das *high copy*-Plasmid pUC19 (12). Der blaue Pfeil verweist auf die BamH I-Enzymschnittstelle. Der schwarze bzw. rote Pfeil verweist auf die Schnittstelle AatII bzw. NdeI.

Die Klonierung des *soxRS*-kodierenden Bereiches in pUC19 erfolgt ebenso wie in den pCC1_dB. Das *soxRS*-Fragment wurde in beiden möglichen Orientierungen in den Vektor kloniert. Die neu generierten Plasmide hatten eine Gesamtlänge von 3687 bp.

4.1.3 Klonierungsstrategie für pUC19-*lacPr-soxS*

In den pUC19 wurde das *soxS*-Gen unter der Kontrolle des *lac*-Promotors kloniert. Zu diesem Zweck wurde der pUC19 ebenso wie die *lac*-Promotor-Sequenz (141 bp, Primer 645 und 956) mit AatII und NdeI verdaut (s. Abbildung 3: der schwarze bzw. rote Pfeil verweist auf die Enzymschnittstellen, dadurch entfällt ein Abschnitt des Plasmids von 253 Basenpaaren). Das neu entstandene Plasmid pUC19-*lacPr* wurde ebenso wie das *soxS*-DNA-Fragment (400 bp, Primer 967 und 966) mit BamHI und NdeI enzymatisch aufgespalten. Dadurch wurde ein 234 bp langes Fragment, welches für *lacZα* kodiert (s. Abbildung 3), im Vektor inaktiviert. Es wurde damit sichergestellt, dass keine konkurrierende Promotorsequenz vor der im nächsten Schritt einzufügenden Gensequenz für *soxS* abgelesen wird. Im folgenden Schritt wurde dann das mit den Enzymen NdeI und BamH I vorbereitete Amplifikat *soxS* in den Vektor integriert.

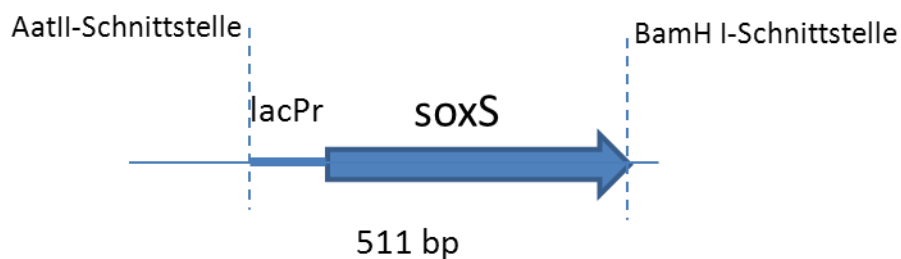


Abbildung 4: Insert *lacPr-soxS* (Adaption nach: Pomposiello & Demple, 2001)

4.1.4 Klonierungsstrategie für pCC1-*lacPr-soxS*

In den CopyControl pCC1™ Cloning-Ready Vektor (Epicentre, Madison, USA; siehe Abbildung 2) sollte das Gen *soxS* unter der Kontrolle des *lac*-Promotors kloniert werden (s. Abbildung 4). Vorab wurde die Sequenz *lacPr-soxS* mit den entsprechenden Primern am zuvor sequenzierten pUC19-*lacPr-soxS* amplifiziert und in den CopyControl pCC1™ Cloning-Ready Vektor ligiert. Das entstehende Plasmid pCC1-*lacPr-soxS* umfasst 8743 bp.

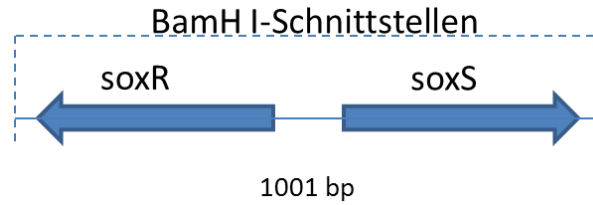


Abbildung 5: Schematische Darstellung des Inserts *soxRS*. In reverser Orientierung als *soxRSa* bezeichnet. (Adaption nach: Pomposiello & Demple, 2001)

4.1.5 Überprüfung der Klone

Die Korrektheit der Plasmide bzw. die Überprüfung der Insertorientierung wurde über eine Restriktionsanalyse (s. Abbildung 6) und jeweils durch eine Sequenzierung (Firma GeneArt, Regensburg) des inserierten Fragments überprüft.

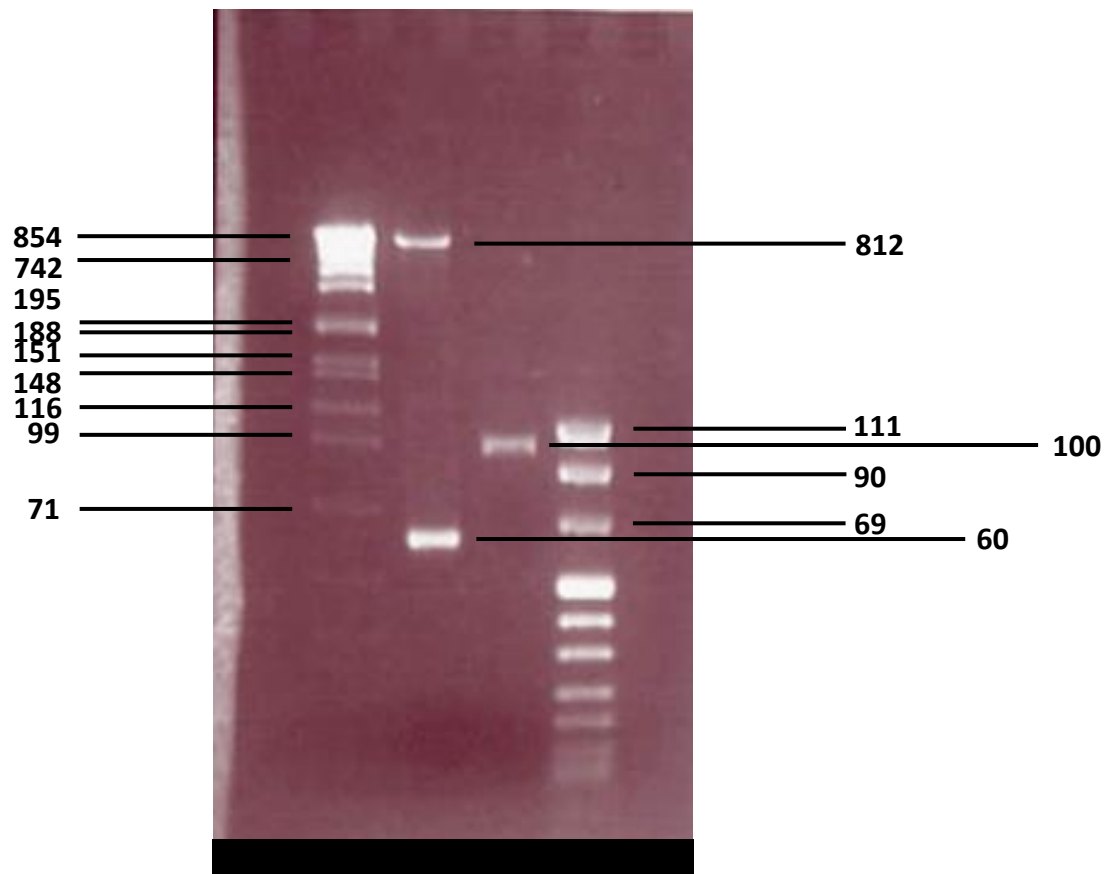


Abbildung 6: Beispiel eines Kontrollgels (1,5 % Agarose) des Plasmids *pCC1-lacPr-soxS* (die Zahlenangaben stehen für die Anzahl der bp)

In die erste Spur wurde der „DNA molecular weight marker VII“ von Roche aufgetragen, Spur 2 zeigt neben dem ligierten Plasmid pCC1 (8127 bp) das Insert *lacPr-soxS* (616 bp), In Spur 3 ist das Insert *soxRS* (1001 bp) zu sehen und in Spur 4 wurde der „DNA molecular weight marker VIII“ von Roche als Standard aufgetragen.

4.2 real time-PCR

Im Weiteren sollten genotypische Unterschiede der generierten Stämme im Vergleich zu den ursprünglichen Stämmen ohne Plasmid bzw. zu Stämmen mit unveränderten pCC1- und pUC19-Plasmiden untersucht werden. Im Focus des Interesses lagen neben einer möglichen Veränderung des Expressionslevels von *soxS* und *soxR*, der Einfluss des Stressors Paraquat hierauf und einige putative Antibiotika-Effluxpumpen, welche möglicherweise durch eine Veränderung am Expressionslevel von *soxS* in ihrer Expression beeinflusst werden. Als Methode zur Ermittlung etwaiger Unterschiede wurde hier die *real time*-PCR gewählt.

Nach Anzucht der jeweiligen Stämme auf Nährmedien erfolgte die RNA-Isolation aus diesen Klonen. Vor dem Einbringen der RNA in die die reverse Transkriptase-Reaktion erfolgte eine Konzentrationsbestimmung mittels Messung der optischen Dichte bei einer Wellenlänge von 260 nm. Hierdurch sollte sichergestellt werden, dass in die reverse Transkriptase-Reaktion je 2 µg RNA eingesetzt werden. „Die Qualität des Probenmaterials, also der Gesamt-RNA, hat einen markanten Einfluss auf die Richtigkeit der quantitativen RT-PCR. Die Überprüfung der RNA-Qualität vor einer Expressionsmessung ist unabdingbar, um verlässliche RT-qPCR-Expressionsergebnisse zu erhalten.“ (Becker et al., 2009)

4.2.1 Normalisierung mit dem *housekeeping*-Gen *gapA*

Nach dem Einsetzen einer definierten Menge an RNA in die reverse Transkriptase-Reaktion bedarf es weiterhin einiger Vorkehrungen um valide Ergebnisse mit dem LightCycler®-Verfahren zu erhalten. „Bei der relativen Quantifizierung wird die Expression der Zielgene mit der eines nicht regulierten *housekeeping*-Gens normalisiert. Dabei werden nicht die absoluten Startkopienzahlen oder –konzentrationen bestimmt, sondern die Expression des zu untersuchenden Gens wird auf ein zweites, ubiquitär und homogen exprimiertes Gen bezogen. Die Vorteile der Normalisierung liegen in der Reduzierung der Varianz der Expressionsergebnisse, da Gewebe- und Matrixeffekte, unterschiedliche RNA Extraktionseffizienzen sowie Fehler bei der reversen Transkription innerhalb einer experimentellen Probe gleichermaßen das Zielgen und das *housekeeping* Gen betreffen“ (Pfaffl, 2004).

In dieser Arbeit wurde *gapA* als *housekeeping*-Gen verwendet. Neben den für dieses *housekeeping*-Gen entworfenen Primern wurde auch mit anderen Primern mit Hilfe einer jeweils hergestellten Verdünnungsreihe eine Standardkurve erstellt werden. Die Effizienz E der Reaktion lässt sich dann aus der Steigung der Standardkurve („*slope*“) nach

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

berechnen (Wiedemann et al., 2004). Lediglich für *soxR* wurde die Effizienz mit Hilfe der Methode von Tichopad et al. (2002) verwendet.

Tabelle 8: Übersicht über die einzelnen Effizienzen

Name des Gens	Effizienz ($E=10^{-1}/\text{slope}$)
<i>gapA</i>	1,97
<i>soxS</i>	2,00
<i>soxR</i>	1,85
<i>marA</i>	1,98
<i>sdiA</i>	2,08
<i>tolC</i>	1,86
<i>ompF</i>	1,91
<i>norE</i>	2,00
<i>mdfA</i>	2,15
<i>acrB</i>	2,02

Diese Effizienzen (s.Tabelle 8) flossen in die Berechnung der relativen Genexpression mittels der sog. delta-delta-CP-Methode ein. Dadurch ergibt sich für die jeweils untersuchten Gene die sog. effizienzkorrigierte ratio. Diese gibt den relativen Genexpressionsunterschied als n-fache Expression an (Holzapfel & Wickert, 2007). Siehe Tabelle 9: relativer Genexpressionsunterschied der untersuchten Gene (Angabe als n-fache Expression).

Tabelle 9: relativer Genexpressionsunterschied der untersuchten Gene (Angabe als n-fache Expression)

Gene (n-fach)	TM EPI 300 + pCC1 Paraquat INDUZIERT bezogen auf TM EPI 300 + pCC1	TM EPI 300 + pCC1 + soxRS bezogen auf TM EPI 300 + pCC1	TM EPI 300 + pCC1 + soxRS Paraquat INDUZIERT bezogen auf TM EPI 300 + pCC1	TM EPI 300 + pCC1 + soxRSa bezogen auf TM EPI 300 + pCC1	TM EPI 300 + pCC1 + soxRSa Paraquat INDUZIERT bezogen auf TM EPI 300 + pCC1	TM EPI 300 + pUC19 + soxRS bezogen auf TM EPI 300 + pCC1	TM EPI 300 + pUC19 + soxS + lac-Prom. bezogen auf TM EPI 300 + pCC1	TM EPI 300 + pUC19 + soxRS bezogen auf TM EPI 300 ohne Plasmid	TM EPI 300 + pUC19 + soxS + lac-Prom. bezogen auf TM EPI 300 ohne Plasmid
<i>soxS</i>	1,29	47,48	2060,35	18,42	327,63	5,31	4,14	3,41	2,41
<i>soxR</i>	1,42	56,30	3149,85	3,44	59,88	7,99	2,5	3,37	1,02
<i>marA</i>		0,83		0,59	1,86	1,36	2,48		
<i>sdiA</i>		1,08		0,50	2,20	1,31			
<i>tolC</i>		1,27		1,15	2,34	1,69	2,48		
<i>ompF</i>		0,87		1,26	3,57	1,93	2,43		
<i>norE</i>		0,94		0,90	2,63	0,85	2,1		
<i>mdfA</i>		0,61		0,80	1,27	0,90	2,84		
<i>acrB</i>		0,74		1,02	1,42	1,22	1,66		

4.2.2 Festlegen der Signifikanz

Als signifikant wurde eine n-fache-Überexpression von $\geq 12,50$ gewertet. Durch zahlreiche Beispielrechnungen konnte nachgewiesen werden, dass unterhalb dieses Wertes der Einfluss der berechneten Effizienz in dieser Arbeit eine zu große Gewichtung erfährt. Nimmt man bei den verschiedenen Berechnungen statt der aus den Verdünnungsreihen erhaltenen Effizienz-Werte Effizienzen zwischen 1,5 und 2,2 als Basis bzw. Grundzahl in die Berechnung nach der Formel 2 (Pfaffl, 2004) auf, so ist das Ergebnis, also der Wert der Potenz bis 12,50 zu sehr durch die Basis beeinflusst.

Zwar kann das System durchaus auch unterhalb dieses Wertes Veränderungen der Genexpression anzeigen, jedoch sind diese vermutlich noch nicht von biologischer Relevanz. Es handelt sich jedoch nicht um ein on-off-System, vielmehr sind die Übergänge wohl fließend.

4.2.3 Überprüfung der Spezifität der *real time*-PCR

Die Spezifität des jeweiligen PCR-Produkts konnte durch eine Schmelzkurvenanalyse am Ende der RT-PCR überprüft werden (s. Abbildung 7). Zudem wurden die PCR-Produkte nach dem Ende des eingegebenen RT-PCR-Programms auf ein 1,5 % Agarose-Gel aufgetragen. Markante Banden auf Höhe des zu erwartenden PCR-Produkts wurden als Bestätigung der LightCycler®-Ergebnisse angesehen. Es konnten dabei die erwarteten Banden nachgewiesen werden. Zudem wurden als zusätzliches Kontrollinstrument parallel Ansätze ohne Reverse Transkriptase bzw. ohne cRNA als Matrize durchgeführt. Als weiteres Kontrollinstrument wurden Amplifikate durch die Firma GeneArt sequenziert um ihre Identität zu kontrollieren.

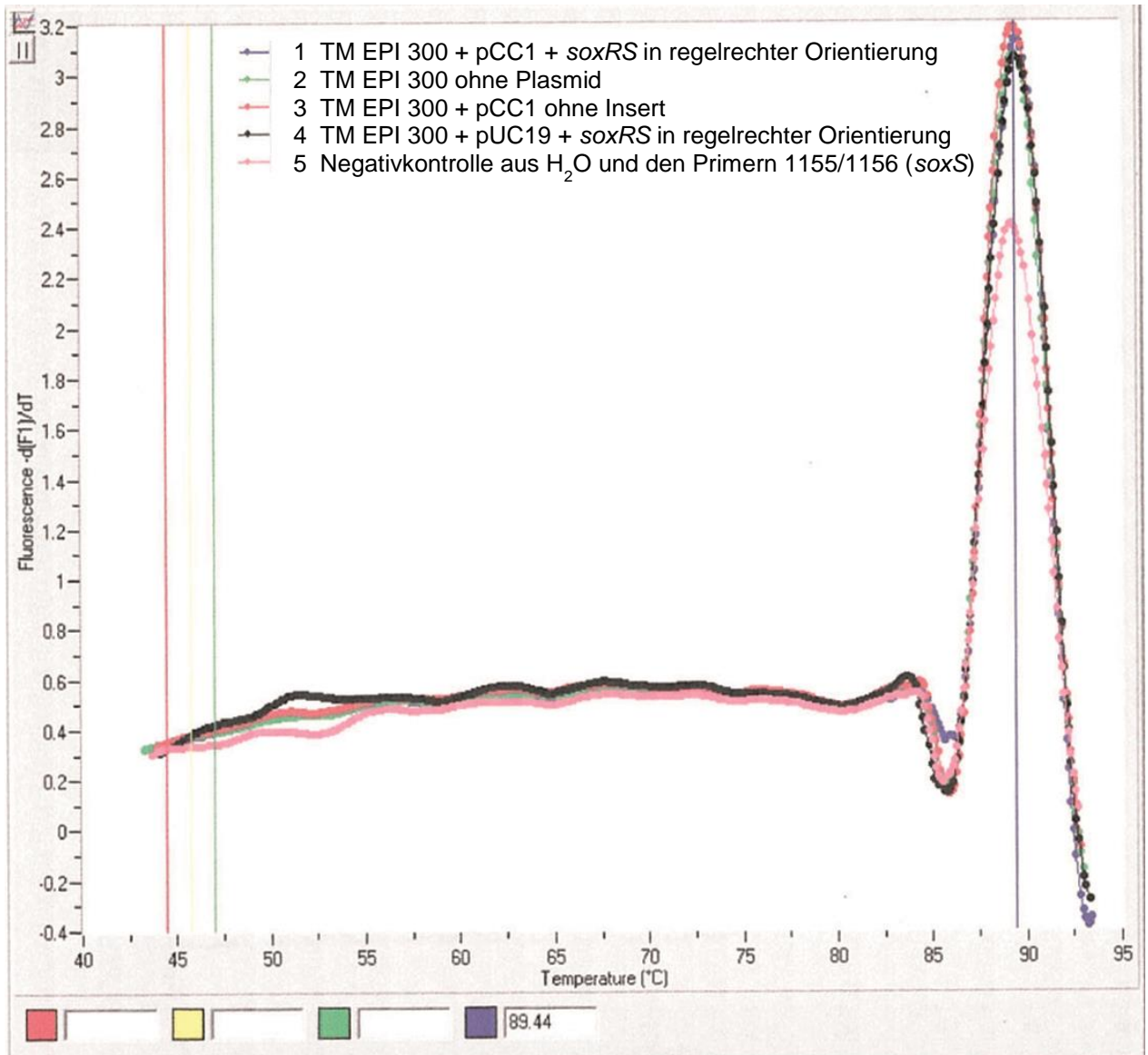


Abbildung 7: Schmelzkurve ausgewählter *soxS*-Amplifikate und der Negativkontrolle ohne *template* (die *peaks* überlagern sich).

4.2.4 *soxS*-Überexpression

In der Tabelle 9 sind alle Stämme, welche sich auf den Stamm TM EPI 300 mit dem Plasmid pCC1 beziehen, gelb hinterlegt. Grün hinterlegt sind alle Stämme, welche sich auf den Stamm TM EPI 300 ohne Plasmid beziehen. Der jeweilige Vergleichsstamm dient für diese Stämme als eine Art Nullprobe und wurde gleich

eins gesetzt. Der angegebene Zahlenwert in der Tabelle 9 ist das Ergebnis der Berechnung des relativen Genexpressionsunterschiedes nach der sog. Delta-Delta-CP-Methode. In diese Berechnung fließt der Mittelwert der *crossing point*-Rohdaten aus den *real time*-PCR-Experimenten zu dem jeweiligen Gen ein (siehe auch 3.2.4.4.6 „Berechnung mittels Delta-Delta-CP-Methode“). Eine signifikante und deutliche Anhebung des Expressionslevels von *soxS* ließ sich mittels dieser Berechnung im Stamm TM EPI 300 mit pCC1 Vektor und der Insertion von *soxRS* in regelrechter Orientierung nachweisen (47,48-fach). Des Weiteren konnte bei reverser Anordnung von *soxRS* ebenfalls im Plasmid pCC1 ein deutlich geringerer, jedoch signifikanter Anstieg der Expression von *soxS* nachgewiesen werden (18,42-fach). Durch die Induktion mit Paraquat wird dieser Effekt bei beiden Stämmen massiv verstärkt: Während es bei reverser Anordnung von *soxRS* zu einem Anstieg des Expressionslevels von *soxS* um rund das 18-fache ($327,63 \div 18,42 = 17,79$) im Vergleich zum nicht induzierten Stamm kommt, wird die Expression von *soxS* durch die Induktion von Paraquat bei regulärer Anordnung von *soxRS* um das 43-fache ($2060,35 \div 47,48 = 43,39$) im Vergleich zum nichtinduzierten Stamm gesteigert. Die Orientierung bzw. Anordnung der Gensequenz von *soxRS* spielt also eine wichtige Rolle bei der Expression von *soxS* im Stamm TM EPI 300 mit dem Plasmid pCC1.

Betrachtet man jedoch das Expressionslevel von *soxS* in den Stämmen mit puc19 in TM EPI 300, so lässt sich dort kein signifikanter Anstieg der Expression an *soxS* in Verbindung mit dem *high copy*-Plasmid nachweisen.

4.2.5 *soxR*-Überexpression

Identisch verhält es sich mit der Expression von *soxR* im Vektor pCC1 mit *soxRS* in regelrechter Orientierung. Auch hier findet sich ein signifikanter Anstieg von *soxR*, welcher durch die vorherige Induktion des konstruierten Stammes mit Paraquat massiv beeinflusst wird, so dass es durch die Induktion zu einem Anstieg um das 56-fache im Vergleich zum nicht mit Paraquat behandelten Stamm kommt (s. Tabelle 9: relativer Genexpressionsunterschied der untersuchten Gene (Angabe als n-fache Expression)). Auch in Bezug auf die Orientierung von *soxRS* lassen sich hierbei Parallelen erkennen: Wurde *soxRS* in

reverser Orientierung in das Plasmid pCC1 eingebracht, konnte kein signifikanter Anstieg des Expressionslevels an *soxR* detektiert werden. Erst durch die Einflussnahme von Paraquat ist ein signifikanter Anstieg der Expression von *soxR* erkennbar.

Betrachtet man die Expression von *soxR* in Stämmen mit dem *high copy*-Plasmid pUC19, decken sich die Ergebnisse für die Expression von *soxR* und *soxS*. In diesen Konstrukten konnte kein signifikanter Anstieg für *soxR* nachgewiesen werden.

4.2.6 Überprüfung der Einflussnahme auf ausgewählte Gene

Bezüglich der Hypothese einer möglicherweise erfolgten Induktion der Expression von *marA*, *ompF*, *tolC*, *acrB*, *sdiA*, *mdfA* und *norE* durch *soxS* war bereits aus den Rohdaten der *real time*-PCR erkennbar, dass sowohl die unveränderten Bakterienstämme, als auch die Bakterienstämme mit unverändertem Plasmid im Vergleich zu den genetisch manipulierten Stämmen keine signifikanten Unterschiede aufwiesen. So variieren die entsprechenden Rohdaten mit einer maximalen Differenz von 1,59 bei *marA*. Bei den übrigen untersuchten Genen sind die Differenzen der Rohdaten geringer. Auch nach dem Einbeziehen der entsprechenden Effizienzen konnten keine signifikanten Veränderungen der Expression dieser Gene durch die genetischen Manipulationen an *soxS* nachgewiesen werden.

Die in dieser Arbeit erhobenen Daten sprechen gegen eine durch *real time*-PCR nachzuweisende Einflussnahme von *soxS* auf die Regulation von *marA*, *ompF*, *tolC*, *acrB*, *sdiA*, *mdfA* und *norE*. Dies gilt sowohl für die Konstrukte mit pUC19, als auch mit pCC1 und für die jeweils induzierten Stämme.

Als Negativkontrollen wurden sowohl ein Vergleich mit einem Bakterienstamm ohne Plasmid also auch mit einem unveränderten Plasmid pCC1 gezogen. Da sich dabei keine wesentlichen Unterschiede ergaben, sind die oben beschriebenen Effekte nicht allein durch die Anwesenheit eines unveränderten Plasmids bedingt. Zudem wurde als Negativkontrolle für die Paraquat-Induktionsversuche ein Stamm mit einem unveränderten pCC1 mit Paraquat induziert und in Bezug zu

dem identischen, jedoch nicht induzierten Stamm gesetzt. Da sich hierbei Werte um eins ergaben, ist die alleinige Induktion durch Paraquat kein Auslöser eines Genexpressionsunterschiedes hinsichtlich der getesteten Gene.

4.3 Antibiotikaresistenztestung

Während die *real time*-PCR genotypische Veränderungen hinsichtlich der Expression von *soxS* und ausgewählter Gene erkennbar machen sollte, sollten die konstruierten Bakterienstämme zudem auf eventuell auftretende Veränderungen ihrer Antibiotikaresistenz, also auf mögliche phänotypische Veränderungen mit den unveränderten Stämmen verglichen werden. Im Rahmen der Planung vor dem experimentellen Teil dieser Arbeit war vermutet worden, dass eine möglicherweise nachgewiesene Überexpression von *soxS* zu einer Zunahme der Resistenz gegenüber Antibiotika führen könnte, welche gemäß einiger Publikationen durch MDR ("*multidrug resistance*")-Effluxpumpen aus der Zelle eliminiert werden (Van Bambeke et al., 2000; Tenover, 2006). Zudem sollte durch das Einbringen eines Stressors, im vorliegenden Fall Paraquat, eine möglicherweise dadurch verursachte Veränderung der MHK im Vergleich erfasst werden können.

Zur Antibiotikaresistenztestung wurde das Epsilometertestverfahren (sog. Etest®) angewandt. Auf diesen Etest®-Streifen ist die jeweilige MHK direkt abzulesen.

Jede der Testungen erfolgte mindestens zweimal. Angegeben wurde schließlich der zweimal identisch abgelesene Wert.

Zusätzlich zur Testung der in ihrem Genom manipulierten Stämme wurde auch ein vorab mit Arabinose induzierter Stamm mit seinem nicht induzierten Pendant auf eine möglicherweise auftretende Änderung der MHK getestet. Die einzelnen Stämme wurden zudem auf Paraquat-vorbehandelte Platten aufgebracht, um mögliche Effekte dieses Stressors auf die MHK des jeweiligen Stammes überprüfen zu können.

4.3.1 Ermittlung der MHK mittels Epsilometer-Test (Etest®)

Für die Antibiotikaresistenztestung mittels Etest®-Streifen wurden exemplarisch die folgenden Stämme ausgewählt:

- TM EPI 300 mit dem unveränderten Plasmid pCC1:
als Negativkontrolle
- TM EPI 300 mit dem Plasmid pCC1 und *soxRS* in regelrechter Orientierung
- TM EPI 300 mit dem Plasmid pCC1 und *soxRS* in reverser Orientierung
- TM EPI 300 mit dem Plasmid pCC1 und *soxRS* in reverser Orientierung,
jedoch vorab mit **Arabinose induziert**
- TM EPI 300 mit dem Plasmid pUC19 und *soxRS* in regelrechter Orientierung
- TM EPI 300 mit dem Plasmid pUC19 und *soxS* unter der Kontrolle des *lac*-Promotors

Die Ergebnisse der Testung zeigt die Tabelle 10. Als relevant wurden diejenigen Testergebnisse erachtet, die sich um mehr als eine Skalierungseinheit auf dem Etest®-Streifen unterschieden (diese werden „**fett**“-gedruckt hervorgehoben).

Tabelle 10: Ergebnisse der Etest®-Reihe

Antibiotika	TM EPI 300 + pCC1	TM EPI 300 + pCC1 + soxRS	TM EPI 300 + pCC1 + soxRSa	TM EPI 300 + pCC1 + soxRS Arabinose INDUZIERT	TM EPI 300 + pUC19 + soxRS	TM EPI 300 + pUC19 + lacPr-soxS
Fluorochinolone:						
- Ciprofloxacin	0,003	0,003	0,003	0,004	0,004	0,006
- Ciprofloxacin auf Paraquat-vorbehandelten Platten	0,016	0,016	0,016	0,012	0,012	0,012
- Norfloxacin	0,032	0,047	0,032	0,047	0,047	0,094
- Norfloxacin auf Paraquat-vorbehandelten Platten	0,094	0,190	0,125	0,190	0,190	0,190
- Levofloxacin	0,008	0,012	0,012	0,012	0,023	0,023
- Levofloxacin auf Paraquat-vorbehandelten Platten	0,032	0,047	0,047	0,047	0,032	0,032
- Gatifloxacin	0,002	0,003	0,003	0,003	0,004	0,006
- Gatifloxacin auf Paraquat-vorbehandelten Platten	0,008	0,012	0,012	0,012	0,006	0,008
- Moxifloxacin	0,003	0,006	0,006	0,006	0,012	0,012
- Moxifloxacin auf Paraquat-vorbehandelten Platten	0,032	0,016	0,047	0,032	0,032	0,016
Doxycyclin	0,75	0,75	0,75	1	1,5	1,5
Nalidixinsäure	0,75	0,75	0,75			
Imipenem	0,19	0,25	0,19			

4.3.1.1 MHK ausgewählter Fluorochinolone

Im Vergleich zwischen dem unveränderten pCC1-Plasmid und den Konstrukten mit pCC1 ergeben sich bei der Testung der Antibiotika Ciprofloxacin, Gatifloxacin, Levofloxacin, Norfloxacin und Moxifloxacin keine relevanten Änderungen der MHK. Dies steht im Widerspruch zu der initialen Vermutung einer Erhöhung der MHK durch Veränderungen in der Position *soxS* im Genom des Plasmids pCC1. Zumal bei der genotypischen Betrachtung im Rahmen der *real time*-PCR nachgewiesen werden konnte, dass *soxS* zusammen mit *soxR* in regelrechter Orientierung im Plasmid pCC1 eine Überexpression erfährt. Auch die Induktion des Konstrukts mit *soxRS* in reverser Orientierung in pCC1 mit Arabinose führt nur in Bezug auf Norfloxacin und unter Anwesenheit von Paraquat zu einer relevanten Anhebung der MHK. Für die Antibiotika Ciprofloxacin, Gatifloxacin, Levofloxacin und Moxifloxacin kommt es hierdurch zu keiner Änderung der MHK, obwohl für dieses induzierte Konstrukt genotypisch eine relevante Überexpression von *soxS* nachgewiesen werden konnte.

Auch die Anzucht auf mit Paraquat vorbehandelten Platten erbrachte hinsichtlich einer Erhöhung der MHK im Vergleich zum Stamm mit dem unveränderten Plasmid pCC1, welcher zur Kontrolle ebenfalls auf eine Agarplatte mit Paraquat aufgebracht worden war, keine wesentlichen Veränderungen der MHK der ausgewählten Fluorochinolone.

Eine Ausnahme bildete hier nur Norfloxacin: hier weist der Stamm mit pCC1 und *soxRS* in regelrechter Orientierung eine wesentliche Erhöhung der MHK auf. Für diesen Stamm war in der *real time*-PCR eine relevante Überexpression von *soxS* nachgewiesen worden. Zudem ist die bereits erwähnte Erhöhung der MHK bei Norfloxacin für das induzierte Konstrukt zu nennen.

Auffällig ist jedoch für alle Versuchsreihen mit Paraquat-vorbehandelten Platten, dass über alle Substanzklassen hinweg die jeweilige MHK auch für den Stamm mit unverändertem Plasmid pCC1 höher liegt, als ohne Vorbehandlung mit Paraquat.

Vergleicht man die MHK des Stammes mit unverändertem pCC1-Plasmid mit der MHK der Konstrukte mit pUC19, so divergieren die Ergebnisse für diese fünf

Antibiotika. Während für Ciprofloxacin und Norfloxacin nur hinsichtlich des Stammes mit pUC19 und *soxS* unter der Kontrolle des *lac*-Promotors eine bedeutsame Erhöhung der MHK erkennbar ist, weisen bei Testung mit Levofloxacin, Gatifloxacin und Moxifloxacin beide Konstrukte mit pUC19 im Vergleich zum Stamm mit unverändertem pCC1-Plasmid eine relevante Anhebung der MHK auf.

Bei der genotypischen Betrachtung mittels *real time*-PCR hatte sich kein wesentlicher Anstieg der Expression von *soxS* in Verbindung mit dem *high copy*-Plasmid pUC19 im Vergleich zum Konstrukt mit unverändertem pCC1 nachweisen lassen.

4.3.1.2 MHK für Doxycyclin

Während auch für das Antibiotikum Doxycyclin hinsichtlich der Konstrukte mit pCC1 im Vergleich zum unveränderten Plasmid pCC1 keine bedeutenden Veränderungen nachweisbar sind, zeigt sich für die Konstrukte mit pUC19 bezogen auf die MHK für das unveränderte Plasmid pCC1 eine als relevant zu wertende Erhöhung der MHK.

Die Induktion mit Arabinose des Klons pCC1 mit *soxRS* in reverser Orientierung führt hingegen nur zu einer geringen, jedoch nicht wesentlichen Steigerung der MHK für Doxycyclin.

4.3.1.3 MHK für Nalidixinsäure und Imipenem

Für die Konstrukte mit pCC1 kam es bei der Testung der MHK gegenüber Nalidixinsäure und Imipenem im Vergleich zum unveränderten Plasmid pCC1 zu keinen bedeutenden Veränderungen.

Eine Testung der pUC19-Konstrukte bzw. unter Paraquat oder Induktion erfolgte für diese Antibiotika nicht.

5 Diskussion

Ziel dieser Arbeit war es, die Bedeutung der Expression von *soxS* in *E. coli* näher zu untersuchen und mögliche Auswirkungen auf die Expression von *soxR* und verschiedener Effluxpumpen näher zu analysieren. Zudem sollte eine mögliche Einflussnahme durch oxidativen Stress, welcher in dieser Arbeit durch Paraquat simuliert wurde, auf *soxS* und *soxR*, sowie die in diesem Zusammenhang untersuchten Effluxpumpen ermittelt werden.

5.1 Genotypische Untersuchungen mittels *real time*-PCR

5.1.1 Wahl der Methode

Zur genauen Analyse der genotypischen Expression von *soxS*, *soxR* sowie weiterer ausgewählter Gene wurde deren Transkription untersucht. Sehr gut geeignet zur Transkriptionsanalyse von Genen ist die *real time*-PCR. Hauptvorteile der Methode sind eine hohe Sensitivität sowie der große dynamische Bereich in der Quantifizierung (Neusser, 2001). Zudem ermöglicht die *real time*-PCR den Verlauf der PCR in Echtzeit zu verfolgen und die amplifizierte Genfragmente zu quantifizieren (Holzapfel & Wickert, 2007).

Zur relativen Quantifizierung bzw. Normalisierung der Ergebnisse wurden begleitend nicht regulierte, sog. *housekeeping*-Gene (HKG) gemessen (Pfaffl, 2004). In dieser Arbeit wurde als HKG *gapA* (Abkürzung für: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase A) verwendet. *gapA* von *E. coli* weist eine enge strukturelle Ähnlichkeit mit eukaryontischen GAPDHs auf (Charpentier & Branlant, 1994).

Nach der Wahl des HKG lässt sich die relative Quantifizierung im Rahmen der *real time*-PCR weiter optimieren, indem man die unterschiedlichen *real time*-PCR-Effizienzen der untersuchten Faktoren mit berücksichtigt. Die auch in dieser Arbeit verwandte effizienz-korrigierte relative Quantifizierung stellt bis dato die genaueste Form der mRNA Quantifizierung dar (Pfaffl, 2001).

Die abschließende Berechnung erfolgte mittels Delta-Delta-CP-Methode (s. auch 3.2.4.4.6):

$$R = \frac{(E_{\text{Zielgen}})^{\Delta\text{CP}_{\text{Zielgen}} \text{ (MW Kontrolle - MW Behandlung)}}}{(E_{\text{Referenzgen}})^{\Delta\text{CP}_{\text{Referenzgen}} \text{ (MW Kontrolle - MW Behandlung)}}$$

Formel 2: Basisformel der Delta-Delta-CP-Methode (nach: Pfaffl, 2004).

5.1.2 Diskussion der *real time*-PCR-Ergebnisse

5.1.2.1 Diskussion der genotypischen Ergebnisse für *soxS*

Im Rahmen der Auswertung der LightCycler®-Daten mit Hilfe der effizienzkorrigierten Delta-Delta-CP-Methode hatte sich gezeigt, dass die Orientierung von *soxRS* eine wesentliche Rolle hinsichtlich eines Anstiegs der Expression spielte. Bereits Wu und Weiss hatten in frühen Arbeiten zur Identifizierung von *soxR* und *soxS* von der gegensätzlichen Orientierung dieser beiden Gene innerhalb des Regulons berichtet (Wu & Weiss, 1991; siehe auch Abbildung 5 im Ergebnisteil 4.1.4). Bei den Experimenten zu dieser Arbeit wurde das betreffende Regulon in den beiden möglichen Orientierungen in das Plasmid integriert. Dabei zeigte sich, dass nur die natürliche also regelrechte Orientierung des Inserts *soxRS* zu einer signifikanten Anhebung des Expressionslevels von *soxS* führte. Bei reverser Anordnung von *soxRS* ebenfalls im Plasmid pCC1 konnte kein als signifikant zu wertender Anstieg der Expression von *soxS* nachgewiesen werden. Bereits Wu und Weiss hatten erste Hinweise hierzu in ihren Experimenten gefunden und Überlegungen zur Orientierung des Regulons angestellt (Wu & Weiss, 1991). Diese Überlegungen konnten in der vorliegenden Arbeit bestätigt werden.

Ein weiterer sehr wichtiger Punkt bei der Auswertung der Expressionsdaten von *soxS* war die Induktion durch Paraquat.

Wenn in wissenschaftlichen Experimenten mit *E. coli* als Zielorganismus der Einfluss von oxidativem Stress untersucht werden soll, wird nahezu immer Paraquat verwendet. Die Antwort des Bakteriums auf oxidativen Stress durch diese Substanz wird als Beispiel des Umgangs mit schwerwiegenden Umwelteinflüssen auf den bakteriellen Zellorganismus genommen. Oxidativer Stress führt zur Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (reactive oxygen species = ROS), welche wiederum determinierende Effekte auf den Zellmetabolismus und andere physiologische Aktivitäten der Bakterienzelle haben. Bei *E. coli* haben sich aber einige metabolische Reaktionen bzw. Kaskaden herausgebildet, die es der Zelle ermöglichen, mit diesem Stress umzugehen und bestenfalls zu überleben. Als Schlüsselregulatoren bei der Abwehr von ROS-Auswirkungen wurden die Transkriptionsfaktoren OxyR und SoxRS identifiziert. Bei SoxRS kommt es im Rahmen der Antwortkaskade auf Stress durch Superoxide zu einer reversiblen Oxidation des Sensors SoxR, der dann seinerseits die Expression des Regulators SoxS steigert. Die Aktivierung dieses Regulators führt wiederum zur Aktivitätssteigerung weiterer Transkriptionsfaktoren und fördert die Bildung von Genen, welche wiederum den Efflux schädlicher Substanzen aus der Bakterienzelle verantworten (Rui et al., 2010).

So konnten Greenberg und Demple (1989) nachweisen, dass das *soxRS*-Regulon an der Regulierung von etwa 40 Proteinen, welche bei der Bewältigung von Superoxiden in *E. coli* eine Rolle spielen, beteiligt ist.

Es nicht verwunderlich, dass auch in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, dass *soxS* unter dem Einfluss von Paraquat deutlich stärker exprimiert wurde. In regelrechter Orientierung, welche auch hier wie bereits besprochen einen deutlichen Effekt zeigt. Im Plasmid pCC1 zeigte sich im Vergleich zum gleichen, jedoch nicht von Paraquat beeinflussten, Plasmid eine Steigerung der Expression um den Faktor 43. Mit den pUC19-Konstrukten waren im Rahmen der *real time*-PCR-Experimente keine Induktionsversuche mit Paraquat vorgenommen worden. Es wäre sicherlich interessant, in weiterführenden Arbeiten Induktionsversuche durchzuführen und diese in Vergleich zum Plasmid pCC1 zu setzen. Aufgrund der größeren Kopienzahl liegt die Vermutung nahe, dass ein deutlicher Induktionsnachweis durch die Zugabe von Paraquat erbracht werden könnte.

Interessant zu betrachten war auch die Feststellung, dass sich bei alleiniger Induktion des unveränderten Stamms pCC1 kein Effekt hinsichtlich einer

möglichen Induktion ergab, d.h. der errechnete Faktor gerundet bei eins lag (s. Tabelle 9: relativer Genexpressionsunterschied der untersuchten Gene (Angabe als n-fache Expression) und somit die erforderliche Funktion einer Negativkontrolle und Bezugsgröße erfüllt.

5.1.2.2 Diskussion der genotypischen Ergebnisse für *soxR*

Im Rahmen der Untersuchungen von Gaudu, Moon und Weiss zu SoxRS als Regulon bei oxidativem Stress konnte gezeigt werden, dass das aktive Fe-S-Zentrum des lokalen Regulators SoxR durch die entstehenden reaktiven Sauerstoffspezies oxidiert wird und in dieser Form die Expression von *soxS* aktiviert (Gaudu et al., 1997). Auch in dieser Arbeit bestätigen die Expressionsergebnisse im Rahmen der *real time*-PCR das gleichsinnige Expressionsverhalten von *soxR* und *soxS*. Konnte ein signifikanter Anstieg für SoxS nachgewiesen werden, war dies bis auf eine Ausnahme jeweils auch für SoxR möglich, unabhängig davon ob eine Induktion mit Paraquat stattgefunden hatte oder nicht. Dies ist einmal mehr ein Beweis für die enge Verknüpfung von *soxS* und *soxR*. Eine Ausnahme bildet der Stamm TM EPI 300 mit dem Plasmid pCC1 und *soxRS* in reverser Orientierung: Hier war für *soxS* ein Expressionsanstieg über die Signifikanzgrenze nachweisbar, während sich die Expression für *soxR* etwas darunter zeigte. Dennoch ist eine gleichförmige Tendenz erkennbar, so dass dies ein Effekt der Festlegung der Signifikanzgrenze sein dürfte. Betrachtet man die Expression von *soxR* musste das Ergebnis für den Stamm, in dem *soxS* unter Kontrolle des *lac*-Promotors gestellt worden war, nahe eins liegen. Diese Vermutung konnte durch die beschriebenen Versuche bestätigt werden. Der negative Nachweis einer vermehrten Expression von *soxR* für diesen Stamm fungiert gleichsam als Negativkontrolle und ist ein weiterer Hinweis in Bezug auf die Konklusivität der hier gezeigten Ergebnisse.

5.1.2.3 Diskussion der genotypischen Ergebnisse für ausgewählte Effluxpumpengene

Die Erhöhung der Antibiotikaresistenz in *E. coli* wird, wie bereits in der Einleitung angesprochen (s. Kapitel 2 Einleitung), durch eine Vielzahl an Mechanismen vermittelt. Um eine niedrige Konzentration des Antibiotikums am Wirkort zu erreichen, kann eine Möglichkeit sein, das in die Zelle eingedrungene Antibiotikum wieder aktiv mittels verschiedener Effluxpumpen aus dem Bakterium zu eliminieren. Eine weitere Möglichkeit ist, das Eindringen in die Zelle beispielsweise durch eine Reduktion oder Änderung der Empfindlichkeit der „Zugänge“ in die Zelle zu reduzieren.

Wie bereits mehrfach angesprochen, spielt der globale Regulator SoxS eine wichtige Rolle bei der Reaktion von *E. coli* auf oxidativen Stress (Li & Demple, 1994). Diese Tatsache konnte durch die Paraquat-Versuche eindrücklich nachgewiesen werden. Eine weitere interessante Eigenschaft von SoxS ist die Tatsache, dass SoxS ein Homolog von MarA ist und ebenso wie dieses zur Familie der XylS/AraC-Transkriptionsaktivatoren gehört (Wu & Weiss, 1991).

Bei MarA handelt es sich um einen der am besten untersuchten globalen Regulatoren in *E. coli*, welcher u. a. die Expression der Effluxpumpengene *acrAB-tolC* reguliert. Der *mar*-Locus besteht aus dem *marRAB*-Operon und dem divergent transkribierten Gen *marC* (Aleksun & Levy, 1997).

Die intrazelluläre Konzentration des globalen Aktivators MarA wird durch MarR reguliert, vergleichbar der Regulation von *soxS* durch SoxR. Sowohl MarR als auch MarA binden an die Operatorregion *marO*. MarA aktiviert die eigene Transkription und diejenige einer großen Gruppe von Genen, die dem *mar*-Regulon angehören. Die Aktivierung geschieht durch Bindung an sogenannte *marboxes*, bei denen es sich um DNA-Sequenzen von ca. 20 Basenpaaren handelt, die sich in der Nähe der Promotoren der entsprechenden Gene befinden. Teile des *mar*-Regulons sind z. B. *acrAB* und *tolC*, die über *marboxes* in Promotornähe verfügen (Aono et al., 1998; Aleksun & Levy, 1997). Aufgrund dieser engen Verknüpfung zwischen *soxS*, *marA*, *acrB* sowie *tolC* wurden diese Gene zur genaueren Untersuchung einer möglichen Steigerung ihrer Transkriptionsrate durch Manipulation am Gen *soxS* ausgewählt.

Wie bereits in der Einleitung ausführlich geschildert, gibt es eine große Bandbreite an Resistenzmechanismen, über die Bakterien zur „Verteidigung“ gegenüber Antibiotika verfügen können.

In dieser Arbeit sollte das Hauptaugenmerk auf den Antibiotikaefflux als Resistenzmechanismus gelegt werden. So wurden ausgehend von SoxS verschiedene Wege der Signaltransduktion untersucht. Die Abbildung 8 stellt einen schematischen Überblick über die in dieser Arbeit untersuchten Gene bzw. Proteine dar und verdeutlicht mögliche, bisher untersuchte Zusammenhänge zwischen den ausgewählten Faktoren. So werden die Proteine SoxS, SoxR, MarA und SdiA unter dem Oberbegriff „Regulatoren“ zusammengefasst (s. Tabelle 11: Übersicht über die Zugehörigkeit der untersuchten Gene), während TolC, OmpF, AcrB, MdfA und NorE in dieser Arbeit den „Effektoren“ der Zellwand zugeordnet werden. Innerhalb der Gruppe der Effektoren werden die an Effluxpumpen beteiligten Gene *tolC*, *acrB*, *mdfA* und *norE* genauer untersucht. Darüber hinaus wurde auch ein Porin der äußeren Membran, das Protein mit dem Namen *outer membrane porin F* (OmpF) einer genaueren Untersuchung unterzogen.

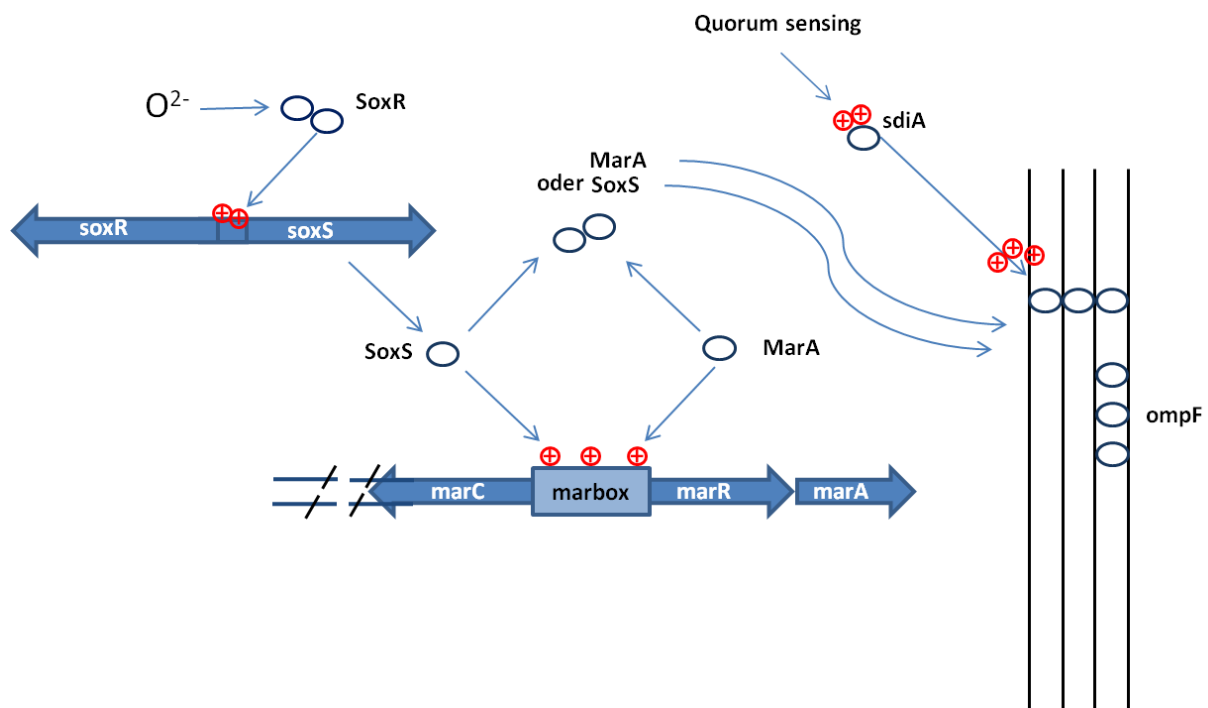


Abbildung 8: Schematische Darstellung der bekannten Regulationswege bzw. Zusammenhänge zwischen den untersuchten Genen bzw. Proteinen in *E. coli* (modifiziert nach: Grkovic et al., 2002).

Tabelle 11: Übersicht über die Zugehörigkeit der untersuchten Gene

Regulatoren	Effektoren	
	Effluxpumpenbestandteile	Porine
<i>soxS</i>	<i>tolC</i>	<i>ompF</i>
<i>soxR</i>	<i>acrB</i>	
<i>marA</i>	<i>mdfA</i>	
<i>sdiA</i>	<i>norE</i>	

5.1.2.3.1 MarA

Eine herausragende Rolle im Verlauf dieser Signalkaskade nimmt der globale Regulator MarA ein (s. Abbildung 8). Mar steht für **multiple antibiotic resistance**. Über MarA, welches Teil der AraC-Familie der Transkriptionsaktivatoren ist, weiß man, dass dieses seine eigene Transkription und die einer großen Zahl an Genen über die vermittelnde Bindung an die marbox aktiviert (Alekhun & Levy, 1997). Die marbox ist jedoch nicht nur Anlaufstelle für MarA, sondern geht ebenso mit SoxS sowie dem Regulatorprotein Rob Bindungen ein (Grkovic et al., 2002). Dies wird umso verständlicher wenn man die Homologie in weiten Teilen des Aufbaus von MarA und SoxS als auch ihre enge Verwobenheit bei der Signaltransduktion betrachtet. So stehen *E. coli* durch die Vermittlung von MarA höchst wirksame Mechanismen wie die Reduktion des Antibiotikainflux via OmpF kombiniert mit der Zunahme der AcrAB-TolC Effluxproteine bei der Antwort auf den Einfluss verschiedener Antibiotika zur Verfügung (Grkovic et al., 2002).

Aufgrund der in der wissenschaftlichen Literatur beschriebenen herausragenden Stellung des Proteins MarA bei der Signaltransduktion wurde auch im Rahmen dieser Arbeit eine genauere Untersuchung dieses Regulatorproteins vorgenommen.

Dabei konnte mittels *real time*-PCR, welche einen möglichen Anstieg der Transkription von *marA* nachweisen sollte, für die im Bereich *soxS* manipulierten

Konstrukte sowohl in Verbindung mit dem *low copy*-Plasmid pCC1 als auch mit dem *high copy*-Plasmid pUC19 kein relevanter Anstieg für *marA* nachgewiesen werden. Jedoch konnte hier kein Vergleich zu einer echten Nullkontrolle für *marA* gezogen werden, da die unveränderten Stämme aus Kostengründen nicht auf ihre Transkriptionsrate von *marA* getestet wurden. Möglicherweise wäre durch eine echte Nullkontrolle ein gering ausgeprägter, jedoch signifikanter Anstieg an *marA* nachweisbar gewesen. Darüber hinaus wurden nur nicht induzierte Stämme, also lediglich Stämme in denen der Transkriptionsanstieg von *soxS* zwar signifikant, jedoch nicht überaus ausgeprägt nachgewiesen wurde, auf die Transkriptmenge an *marA* untersucht. So bleibt zu diskutieren, ob die in der einzelnen Zelle vorliegende Menge an SoxS möglicherweise zu gering ist, den beschriebenen Weg der Signaltransduktion über das Verbindungsglied *marbox* anzustoßen. Diese Erklärungsversuche könnten durch die Untersuchung einer echten Nullkontrolle sowie insbesondere durch die Untersuchung der induzierten Stämme möglicherweise verifiziert werden. Die anschließenden Resistenztestungen mit Änderung der MHK einzelner Antibiotika zeigen, dass die Überexpression von *soxS* durchaus Effekte in Bezug auf die Abwehr gegenüber Antibiotika hat. Jedoch konnte in dieser Arbeit nicht nachgewiesen werden, dass dies via MarA erfolgte.

5.1.2.3.2 SdiA

Ein weiteres Protein in der Gruppe der Regulatoren, welches in dieser Arbeit untersucht wurde, ist SdiA. Wie aus der Abbildung 8 zu ersehen ist, nimmt SdiA in der Signaltransduktion von *E. coli* eine besondere Stellung ein. SdiA ist in mehreren Bakterienspezies, so auch bei *E. coli*, am *quorum sensing* und dabei insbesondere an der Vermittlung von Multiresistenzen gegenüber Stressoren wie Antibiotika aber auch Salicylaten beteiligt (Tavío et al., 2010).

SdiA wirkt dabei als Signalmolekül, das als Autoinduktor fungiert. Die Abkürzung bzw. der Proteinname SdiA steht dabei für „*suppressor of division inhibition*“. So konnten Tavío et al. zwischenzeitlich *in vitro* multiresistente *E. coli* selektieren, deren Pathogenität wohl maßgeblich über den *quorum sensing*-Regulator SdiA und eine Überproduktion von MarA vermittelt wurde (Tavío et al., 2010).

In dieser Arbeit wurden wiederum nur die nicht-induzierten Konstrukte sowohl des *low copy*-Plasmids pCC1 als auch des *high copy*-Plasmids pUC19 hinsichtlich SdiA untersucht. Dabei konnte kein signifikanter Anstieg für das regulierend eingreifende Signalprotein SdiA nachgewiesen werden. Jedoch beziehen sich diese Daten auf einen direkten Vergleich zu den Zahlen der *soxS*-Überexpression. Eine eigenständige Nullkontrolle fehlt für SdiA, so dass ein geringer, jedoch signifikanter Anstieg möglicherweise nicht detektiert werden konnte. Es besteht aber auch die Möglichkeit, dass das Stresslevel für die Zelle nicht hoch genug war, um eine Signaltransduktion via *quorum sensing* und damit über das Signalprotein SdiA auszulösen. Es wäre hinsichtlich dieser Theorie von Interesse, die Paraquat-induzierten Stämme auf die Expression von SdiA zu vergleichen.

5.1.2.3.3 AcrAB-ToIC-Komplex

Der AcrAB-ToIC-Komplex gehört der RND (Resistance Nodulation Division) Superfamilie der Effluxpumpen an (s. Tabelle 122; Van Bambeke et al., 2000).

Tabelle 12: Klassifikation von Effluxpumpen (modifiziert nach: Van Bambeke et al., 2000).

Transport-mechanismus	Superfamily	Familie	Bakterium (Auswahl)	
Sekundär aktive Transporter (Symports, Antiporter, Uniporter)	SMR (Small Multidrug Resistance)	Small Multidrug Efflux	EmrE von <i>E. coli</i>	
	MET (Multidrug Endosomal Transporter)			
	RND (Resistance Nodulation Division)		HAE1 (Hydrophobe Amphiphile Efflux)	Acr von <i>E. coli</i>
				Mex von <i>P. aeruginosa</i>
				MtrB von <i>N. gonorrhoe</i>
			HAE2 (Hydrophobe Amphiphile Efflux)	AmrB von <i>B. pseudomalei</i>
MFS		DHA12	TetA, B, E von <i>E. coli</i>	

	(Major Facilitator Superfamily)	(Drug H ⁺ Antiporters-12 spanners)	Bcr von <i>E. coli</i>
			NorA von <i>S. aureus</i>
		DHA14 (Drug H ⁺ Antiporters-14 spanners)	EmrB von <i>E. coli</i>
			MdfA von <i>E. coli</i>
			TetK von <i>S. aureus</i>
		OCT (Organic Cation Transporters)	
	SET (Sugar Efflux Transporters)	SetA von <i>E. coli</i>	
	MAR (Multi Antimicrobial Resistance)		NorM von <i>V. parahaemolyticus</i>
Primär aktive Transporter	ABC ATP Binding Cassette	DrugE1 (Drug Exporter-1)	MsrA von <i>S. epidermidis</i>
		DrugE2 (Drug Exporter-2)	LmrA von <i>L. lactis</i>
		MDR (Multidrug Resistance)	
		PDR (Pleiotropic Drug Resistance)	
		CT1 (Conjugate Transporter-1)	
		CT2 (Conjugate Transporter-2)	

Bis auf wenige Ausnahmen kommen nur RND-Pumpen in einer dreieggliederten Form vor, die einen direkten Verbindungsweg vom Zytoplasma über die innere und äußere Membran gramnegativer Bakterien hinweg schaffen. Dieser Komplex beinhaltet neben einem in der inneren Membran lokalisierten Protein und einem Kanal der äußeren Membran (den sog. *outer membrane factor* - OMF) ein periplasmatisches Adapter-Protein (das sog. *membrane fusion protein* - MFP). Wie die Abbildung 9 zeigt, ermöglicht es diese Konstruktion eingedrungene Stoffe direkt nach draußen in das umgebende Medium zu pumpen. Dies bedeutet für das Bakterium einen erheblichen Überlebensvorteil, da beispielsweise ein herausgeschleustes Medikament erst wieder die wenig permeable äußere Membran überwinden muss, um erneut in die Zelle einzudringen.

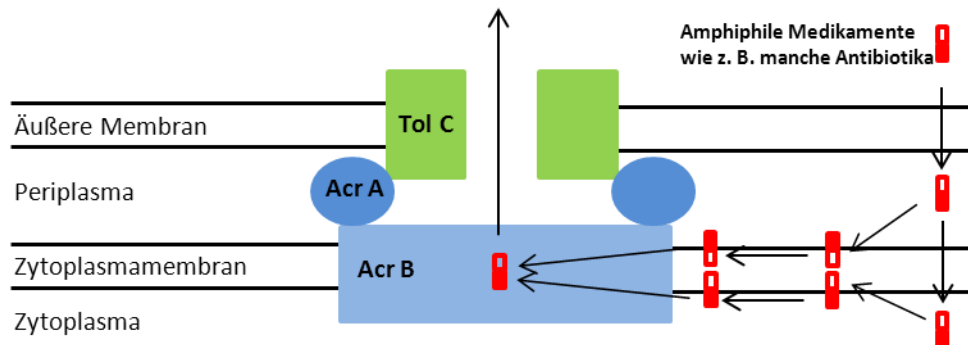


Abbildung 9: Der AcrAB-TolC-Effluxpumpenkomplex als Beispiel für den dreiteiligen Aufbau der RND-Pumpen (modifiziert nach: Nikaido, 2011).

Aufgrund des großen Pumpenkomplexes der RND-Pumpen, welcher eine direkte Verbindung zwischen dem Zellinneren und dem umgebenden Medium ermöglicht, sind gramnegative Bakterien wie *E. coli* in der Lage, eine sehr effektive Medikamentenresistenz aufzubauen (Nikaido, 2011). Im AcrAB-TolC-Effluxpumpenkomplex formt das Protein AcrB den Efflux-Transporter, während es sich bei AcrA um das Adapter-Protein handelt. TolC schließlich bildet einen Kanal in der äußeren Membran.

Man nimmt an, dass die hauptsächliche physiologische Rolle des Proteinkomplexes AcrAB-TolC darin besteht, *E. coli* vor der Wirkung von Gallensalzen und Fettsäuren – der physiologischen Umgebung im Körper - bzw. anderen physiologisch vorkommenden, hydrophoben Eindringlingen zu schützen, indem sie diese aus der Zelle schleusen.

Unter allgemeinen Stressbedingungen nimmt in *E. coli* die Transkription von *acrAB* als Bestandteil dieser komplex aufgebauten Effluxpumpe durch die induzierenden Regulatorproteine MarA, SoxS, und Rob deutlich zu (Pérez et al., 2012). So wurde in multiresistenten Stämmen eine vermehrte Expression von *acrAB* nachgewiesen (Ma et al., 1995).

Als Hauptbestandteile des AcrAB-TolC-Komplexes wurden in dieser Arbeit die Transkriptionsraten der Proteine AcrB sowie TolC untersucht. Mit der

Untersuchung von TolC konnte auch die Auswirkung von SoxS auf weniger dominante Pumpenkomplexe untersucht werden, da das Protein TolC nicht ausschließlich auf AcrAB beschränkt ist, sondern auch als Bestandteil weiterer Efflux-Pumpen fungiert (Kobayashi et al., 2001). Jedoch konnte für beide Proteine auch in den Stämmen mit starker Überexpression von *soxS* kein relevanter Expressionsunterschied in dieser Arbeit festgestellt werden.

Anders verhält es sich bei einer direkten Gegenüberstellung der Werte für den Stamm TM EPI 300 mit pCC1 und *soxRS* in regelrechter Orientierung und den identischen Stamm jedoch mit dem Plasmid pUC19 und *soxS* unter Kontrolle des *lac*-Promotors (siehe Tabelle 9: relativer Genexpressionsunterschied der untersuchten Gene (Angabe als n-fache Expression)). Bei diesem direkten Vergleich erkennt man einen deutlichen Anstieg sowohl für TolC als auch für AcrB im Stamm mit pUC19 und *soxS* unter Kontrolle des *lac*-Promotors (für TolC um den Faktor 1,95 und für AcrB um den Faktor 2,24).

Es bleibt also zu diskutieren, ob durch die deutlich höhere Kopienzahl des pUC19 auch eine deutlich höhere Menge an Pumpengenomen vorliegt. Inwieweit dies lediglich ein Effekt des Plasmids ist, oder möglicherweise ein alternativer Aktivierungsweg zu diskutieren ist, konnte in dieser Arbeit nicht geklärt werden. Möglich wäre diese Prüfung eines alternativen Aktivierungswegs durch umfangreichere Testungen von Wildtypen bzw. feinerer Abstufung der Plasmidkopienzahlen im Bakterium beispielsweise durch eine Anzucht von pCC1 mit Hilfe einer Arabinoseverdünnungsreihe.

Wie bereits unter 3.1.10 Organismen, Plasmide und Vektoren) geschildert, ist die genaue Steuerung der Kopienzahl durch die Zugabe von Arabinose der große Vorteil der Verwendung von pCC1 in derartigen Experimenten. Zudem müsste eine Gegenüberstellung eines unveränderten pUC19 erfolgen und mehrfache Wiederholungen durchgeführt werden, um eine zu starke Wichtung einzelner Werte ausschließen zu können.

5.1.2.3.4 OmpF

Das Protein OmpF zählt zu den „Effektoren“ der Zellwand. Innerhalb der Gruppe der Effektoren nimmt OmpF neben den direkt an Effluxpumpen beteiligten Proteinen wie TolC, AcrB, MdfA und NorE eine Sonderstellung ein. Bei OmpF handelt es sich um ein Porin der äußeren Membran. Dabei steht „omp“ als Abkürzung für „*outer membrane porin*“. Der Entdecker und Namensgeber der Porine, Hiroshi Nikaido, definiert Porine in einem sehr engen Rahmen als nicht-spezifische Diffusionskanäle der äußeren Membran (Nikaido et al., 1983). Dabei ist zwar prinzipiell ein Molekülaustausch in beide Richtungen möglich ist, jedoch ist der Durchtritt von Molekülen aus der extrazellulären Umgebung um ein Vielfaches schneller möglich als die Diffusion von Molekülen aus dem Periplasma durch das Porin in das extrazelluläre Medium (13). So wird OmpF hauptsächlich bei der passiven Aufnahme verschiedener Stoffe aus der Umgebung des Bakteriums genannt (Chou et al., 1993).

Im Hinblick auf die Fragestellung dieser Arbeit war insbesondere der Regulationsweg von OmpF via *soxRS*-Locus von besonderem Interesse. Dabei kommt es unter dem Einfluss von SoxRS und somit als Antwort auf oxidativen Stress (oder auch unter der Anwesenheit von Salicylaten) zu einer vermehrten Expression von *micF*-antisense-RNA, welche zu einer reduzierten Translation von *ompF* führt. Im Detail kann es beispielsweise unter dem Einfluss von Salicylaten zu einer Aktivierung des Redoxsensors SoxR kommen, der wiederum als Aktivator von *soxS* fungiert (Chubiz & Rao, 2011).

Unter der Annahme, dass die Expressionsrate von *ompF* unter dem Einfluss einer vermehrten Menge an SoxS bzw. SoxR abnimmt (Chubiz & Rao, 2011), sollten die in dieser Arbeit erhobenen Daten einer Diskussion unterzogen werden. Vergleicht man die erhobenen Daten, so sind zwischen den Bakterienstämmen mit unverändertem Plasmid im Vergleich zu den genetisch manipulierten Stämmen keine signifikanten Unterschiede in Bezug auf die Expressionsrate von *ompF* nachweisbar. Zu diskutieren ist, inwieweit der als alternativer Aktivierungsweg zu betrachtende Weg der *mar*-box-Aktivierung über SoxS eine deutliche Veränderung der Expressionsrate von *ompF* auslösen kann. Insbesondere wenn man die Ergebnisse ins Verhältnis zum Aktivierungsweg über MarA und Rob setzt. Es wäre möglich, diese Annahme zu überprüfen,

indem man parallel einen Ansatz mit einer erhöhten Transkriprate an MarA bzw. Rob analysiert und schließlich diese drei parallelen Ansätze miteinander vergleicht. Auf diesen Kontrollschritt musste aus Kostengründen verzichtet werden.

Eine weitere Überlegung hinsichtlich der Frage, warum keine reduzierte Expressionsrate an *ompF* im Rahmen der Experimente der vorliegenden Arbeit nachweisbar war, ist die möglicherweise zu geringe Kopienzahl an *soxS* bzw. *soxR*. Genaue Angaben oder etwa ein Schwellenwert, ab welchem es zu einer Reduktion von *ompF* kommt, konnten bisher nicht in der Literatur recherchiert werden.

Inwieweit der Einfluss von OmpF sich jedoch zusammen mit anderen Effekten phänotypisch im Rahmen der Antibiotikaresistenztestung auswirkt, ist dagegen Spekulation. Auffallend ist aber, dass einige signifikante Veränderungen der Resistenz gegenüber einzelnen Antibiotika nachweisbar waren.

So konnte ein signifikanter Anstieg der MHK bei der Testung einzelner genetisch manipulierter Stämme gegenüber Fluorochinolonen nachgewiesen werden. Dies belegen einzelne Zahlen für Norfloxacin aber auch bei der Testung von Doxycyclin konnten signifikante Veränderungen nachgewiesen werden (vergl. Tabelle 10: Ergebnisse der Etest®-Reihe). Auffällig dabei ist, dass der signifikante MHK-Anstieg vermehrt bei Stämmen mit einer *soxS*-Überexpression in pUC19 zu beobachten war. Auch in Bezug auf Doxycyclin lässt sich diese Aussage treffen. Es bleibt also zu diskutieren, ob ein additiver Effekt durch eine u.a. reduzierte *ompF*-Transkription zu der phänotypischen Unterscheidbarkeit geführt hat. Diese Überlegungen stützen wiederum auch die These, dass evtl. höhere Plasmidkopienzahlen an *soxS* zu signifikanten Veränderungen geführt hätten. (s. auch Kapitel 5.2 Phänotypische Untersuchungen mittels Epsilometertest - Diskussion der MHK-Ergebnisse).

5.1.2.3.5 mdfA

MdfA wird den *multidrug* (*mdr*)-Transportern zugerechnet. Diese Membranproteine ermöglichen den aktiven Export eines breiten Spektrums strukturell verschiedener chemischer Substanzen bzw. Medikamente aus der

Zelle und führen dadurch zu einer höheren Resistenz der Zelle gegenüber potenziell toxischen Substanzen. Sie unterhalten damit einen der Hauptmechanismen der bakteriellen Resistenz gegenüber verschiedenen Antibiotika bis hin zu einer erhöhten Resistenz verschiedener Tumorarten gegenüber Chemotherapeutika (Fluman et al., 2009).

MdfA stellt dabei den *multidrug*-Transporter in *E. coli* schlechthin dar.

Klar erkennbar ist, dass Zellen, die MdfA mit Hilfe eines *multicopy* Plasmids exprimieren, wesentlich resistenter gegenüber einer sehr facettenreichen Gruppe von kationischen oder zwitterionischen, lipophilen Stoffen wie etwa Ethidiumbromid, Rifampicin und Tetracyclinen sind. Überraschenderweise ermöglicht MdfA auch Resistenzen gegenüber ungeladenen, klinisch bedeutsamen Antibiotika wie etwa Chloramphenicol, Erythromycin sowie bestimmten Aminoglycosiden und Fluoroquinolonen (Edgar & Bibi, 1997).

Unter der Annahme, dass bei *in vitro*-Experimenten gezeigt werden konnte, dass eine Überexpression des Transkriptionsregulators Rob zu einer Zunahme der minimalen Hemmkonzentration von Norfloxacin durch eine vermehrte Expression der MdfA-Effluxpumpe führt (Linde, 2004), sollte auch ein möglicher Zusammenhang zwischen der Überexpression von *soxS* und einer Veränderung der Expression von MdfA in dieser Arbeit untersucht werden.

Unterzieht man nun die erhobenen Daten einer genaueren Betrachtung, zeigen sich in den Stämmen mit starker *soxS*-Überexpression keine signifikanten Expressionsunterschiede für MdfA. Vergleicht man jedoch die Werte innerhalb der Gruppe der erfassten Werte für MdfA, so zeigt sich ein deutlicher Anstieg für den Stamm in dem *soxS* unter Kontrolle des *lac*-Promotors in das Plasmid pUC19 eingeschleust wurde und dem Konstrukt mit *soxRS* und dem *low copy*-Plasmid pCC1. So konnte im Konstrukt mit pUC19 im Vergleich zum Konstrukt mit pCC1 eine um das 4,5-fache höhere Expression an MdfA nachgewiesen werden. Dies scheint jedoch kein Effekt der Überexpression von *soxS* zu sein, da dieses Protein in diesem Stamm weniger exprimiert wurde als dies im Konstrukt mit pCC1 der Fall war. Möglicherweise handelt es sich dabei um einen Effekt, der durch die Höhe der Kopienzahl des Puc19 bedingt ist, da bereits Bibi et al. MdfA Plasmid-kodiert nachweisen konnten (Bibi et al., 2001). Ein Aktivierungsweg mittels SoxS konnte dabei nicht explizit nachgewiesen werden. Es scheint also

unabhängig von SoxS eine Aktivierung stattgefunden zu haben. Dieser in weiteren Experimenten auf den Grund zu gehen, erscheint folgerichtig.

5.1.2.3.6 NorE

Als letztes in der Reihe der zu analysierenden Proteine wurde NorE auf seine möglicherweise vorkommende Beeinflussung durch Sox untersucht.

Die als *norE* bezeichnete Sequenz kodiert eine *multidrug*-Effluxpumpe. Im Allgemeinen handelt es sich bei dem Begriff „Effluxpumpe“ um einen eher nicht mehr gebräuchlichen Ausdruck für Membran-ATPasen und Membrantransporter (sog. Carrier) mit einem weit gefächerten Wirkspektrum (Pos, 2009). Deren Spektrum deckt sich im Fall von NorE weitgehend mit dem Spektrum der anderen beiden *E. coli*-Chinolon-Pumpen AcrAB und MdfA. Eine separate Überexpression jeder dieser drei Pumpen (NorE, AcrAB, MdfA) resultiert in einer annähernd identischen Höhe der Chinolon-Resistenz, während eine simultane Überexpression dieser Pumpen zu einer synergistischen Zunahme der Chinolon-Resistenz führt (Yang et al., 2003).

Von NorE ist bekannt, dass dessen Überexpression ebenso wie bei MdfA in einigen Laborstämmen zu einer um das 2 – 4-fach erhöhten Zunahme der minimalen Hemmkonzentration gegenüber Ciprofloxacin und Norfloxacin führt. Hinzukommt, dass die Überexpression von *acrAB* zusammen mit *mdfA* oder eben *norE* synergistisch wirken und aus diesem Zusammenspiel eine Zunahme der MHK einiger Laborstämmen gegenüber Fluoroquinolonen resultiert (Yang et al., 2003).

Die Höhe der Resistenzzunahme gegenüber Fluoroquinolonen durch eine vermehrte Expression von *mdfA* und *norE* kann zudem weiter durch eine kombinierte Induktion der Überproduktion des AcrAB-TolC-Komplexes gesteigert werden (Swick et al., 2011).

In dem Wissen, dass Aono et al. in ihren Experimenten zu dem wegweisenden Artikel von 1998 zeigen konnten, dass durch die Überexpression von *soxS* eine Zunahme der Synthese der TolC-Komponente des AcrAB-TolC-Pumpenkomplexes resultiert, sollte nun der reziproke Weg einer möglichen

Induktion der Expression von *norE* durch SoxS anhand von LightCycler®-Versuchen untersucht werden.

Analysiert man unter diesen Annahmen die in dieser Arbeit erhobenen Daten, zeigen sich für die Stämme mit starker *soxS*-Überexpression keine signifikanten Expressionsunterschiede für NorE. Vergleicht man jedoch die Werte innerhalb der NorE-Gruppe, zeigt sich beim Vergleich zwischen dem TM EPI 300-Stamm mit pCC1 und *soxRS* in regelrechter Orientierung auf der einen Seite und dem identischen Stamm mit dem Plasmid pUC19 in den *soxS* unter Kontrolle des *lac*-Promotors auf der anderen Seite ein Anstieg der Expressionsrate um den Faktor 2,14 (siehe Tabelle 9). Es bleibt zu diskutieren, inwieweit dies lediglich ein Effekt der höheren Plasmidkopienzahl ist. Für diese Theorie spricht auch der nachweisbare Anstieg an NorE durch Induktion der Plasmidkopienzahl an pCC1 durch Paraquat bei dem ansonsten identischen Stamm TM EPI 300 mit pCC1 und *soxRS* in reverser Orientierung.

5.2 Phänotypische Untersuchungen mittels Epsilometertest - Diskussion der MHK-Ergebnisse

Während mit Hilfe der LightCycler®-Versuche die möglichen phänotypischen Veränderungen erfasst werden sollten, bot sich mit Hilfe der Testungen der jeweiligen MHK gegenüber verschiedenen Antibiotika die Möglichkeit der Untersuchung eventuell auftretender phänotypischer Veränderungen. Wie bereits erwähnt, gibt es eine Reihe verschiedener Resistenzmechanismen in *E. coli*, die zu einer Erhöhung der minimalen Hemmkonzentration gegenüber schädigenden Antibiotika führen. Neben dem bereits detailliert dargestellten Efflux sind dies beispielsweise Zielmutationen, posttranslationale bzw. posttranskriptionale Modifikationen oder auch eine reduzierte Aufnahme der Antibiotika durch Veränderungen der Zellwand (Piddock, 1999).

Speziell der Efflux von Antibiotika aus dem Bakterium ist bei Fluorochinolonen die Hauptursache einer verminderten Akkumulation dieser Medikamente im Bakterium (Piddock, 1999). So lag es auf der Hand, dass insbesondere eine Reihe von Fluorochinolonen in die vorliegende Testung mit einbezogen wurde. Dabei fiel die Wahl auf insgesamt fünf Antibiotika (Ciprofloxacin, Gatifloxacin,

Levofloxacin, Norfloxacin, Moxifloxacin), die zu den Meistverordneten zählen. Neben diesen fünf Antibiotika, welche der zweiten (Ciprofloxacin, Norfloxacin), dritten (Levofloxacin) und vierten (Gatifloxacin, Moxifloxacin) Generation der Chinolone zugeordnet werden, wurde mit Nalidixinsäure zudem ein Chinolon der ersten Generation in die Testreihe aufgenommen.

Jedoch wurde Efflux als Resistenzmechanismus auch für andere Substanzklassen wie etwa für Tetracycline als relevant identifiziert (Sn et al., 2013). Als bekannter Vertreter dieser Substanzklasse wurde Doxycyclin in die Testreihe aufgenommen.

Auch für die Substanzklasse der Carbapeneme mit dem in dieser Reihe stellvertretend getestetem Imipenem wurden bereits in der Vergangenheit Testungen in Zusammenhang mit dem Effluxsystem vorgenommen (Collu et al., 2012).

Eine in der Mikrobiologie gängige Methode zur Erfassung der MHK ist der Epsilometertest (Etest®), der auch in dieser Arbeit zur Anwendung kam. Vorteil dieser Methode ist insbesondere die leichte Handhabung, wobei hier die gute Ablesbarkeit der Ergebnisse durch die auf den Teststreifen aufgedruckten Skalierung und die damit gegebene gute Vergleichbarkeit der Ergebnisse im Vordergrund steht. Zudem handelt es sich beim Epsilometertest um ein relativ kostengünstiges Verfahren. Dem gegenüber steht der Nachteil, dass dieser sehr gebräuchliche Test auch etwas benutzerabhängig ist, was sich durch die Auftragechnik der Bakteriensuspension ergibt. Dieser geringe Nachteil lässt sich aber relativ gut umgehen, wenn alle Bakteriensuspensionen einer Testreihe von jeweils dem gleichen Untersucher mit jeweils identischer Handbewegung aufgebracht werden. Zudem ist auf eine für alle Nährmedien gleiche Bearbeitungs- bzw. Bebrütungszeit und -temperatur zu achten, da nur identische Rahmenbedingen eine aussagekräftige und sichere wissenschaftliche Beurteilung gewährleisten. Ein noch anzuführender theoretischer Nachteil dieser Testmethode ist die schwierige Ablesbarkeit bei enger Skalierung und nicht vollständig rasenartigem Bewuchs des Nährmediums am Schnittpunkt mit dem Teststreifen. Dieser Fall trat jedoch in dieser Arbeit nicht ein, so dass dieser methodische Nachteil nicht zu Tragen kam.

Für die Konstrukte mit dem Plasmid pCC1 sind - bis auf zwei Ausnahmen – keine signifikanten Veränderungen nachweisbar. Hier kommt möglicherweise die geringe Kopienzahl des *low copy*-Plasmids pCC1 zum Tragen. Diese These könnte durch die beiden „Ausreißer“ gestützt werden, da diese auf vorbehandelten und damit theoretisch höheren Kopienzahlen aufweisenden Platten auftraten. Der Effekt der Vorbehandlung ist insgesamt gut erkennbar – es lassen sich nahezu durchgängig höhere MHK-Werte ablesen. Damit lässt sich klar nachweisen, dass Paraquat in hohem Maß als Stressor wirkt und die Bakterien damit einen höheren Umsatz haben. Durch den höheren Umsatz der Bakterien wiederum wird in Folge der gesteigerten (Stoffwechsel-)Aktivität auch der Efflux aus dem einzelnen Bakterium vermehrt angestoßen, so dass es erst bei höheren Antibiotika-Konzentrationen im Vergleich zu nicht vorbehandelten Nährmedien zu einem Wachstumshemmnis bzw. -abbruch kommt.

Wie bereits kurz angesprochen, zeigten sich für die Konstrukte mit dem Plasmid pCC1 zwei signifikante Ausnahmen. Im Vergleich zu dem Stamm TM EPI 300 mit dem unveränderten Plasmid pCC1 als Negativkontrolle fanden sich nur in Bezug auf Norfloxacin für die genetisch veränderten Konstrukte mit pCC1 teilweise signifikante Erhöhungen der MHK. Es bleibt also zu diskutieren, weshalb dies nur für das Fluorochinolon Norfloxacin jedoch nicht für die übrigen, getesteten Fluorochinolone zu verzeichnen war.

Zum einen könnte dies in der spezifischen chemischen Struktur von Norfloxacin begründet liegen, welche möglicherweise speziell dieses Fluorochinolon zu einer leichteren Ausschleußung/Exkretion aus dem Bakterium begünstigt. Eine Überprüfung dieser These kann jedoch aktuell nicht angeboten werden.

Zum anderen weiß man auch aus der klinischen Anwendung von Norfloxacin über dessen wesentlich schlechtere Plasmaproteinbindung im Vergleich zu den übrigen, gängigen Fluorochinolonen. Diese liegt für Norfloxacin lediglich bei nur 10 – 15 % und weist daher auch die mit Abstand geringste Resorptionsquote im menschlichen Organismus von lediglich 40 % auf. Aufgrund dieser schlechten Gewebegängigkeit dient Norfloxacin im klinischen Alltag nahezu ausschließlich der Behandlung von Harnwegsinfektionen (Mutschler et al., 2001).

Eine Überlegung in Bezug auf die hier gefundenen Ergebnisse mit einer signifikanten Erhöhung der MHK einzelner Konstrukte gegenüber Norfloxacin könnte daher auch dessen schlechtere Bindung an intrazelluläre bakterielle

Proteine sein, so dass Norfloxacin in der Zellflüssigkeit verstärkt ungebunden zur Verfügung steht und somit auch den Effluxpumpen in größerem Maß zur Verfügung steht als die übrigen getesteten Fluorochinolone. Jedoch konnte auch diese These in der hier vorgestellten Arbeit nicht überprüft werden.

Des Weiteren bleibt noch die Diskussion der TM EPI 300-Konstrukte mit dem Plasmid pUC19. Die erhobenen Ergebnisse wurden jedoch alleine auf TM EPI 300-Konstrukte mit dem Plasmid pCC1 bezogen. So dass der Hauptkritikpunkt in Bezug auf diese Ergebnisse eine fehlende zweite Bezugsgröße mit einem unveränderten pUC19 im Sinne einer Negativkontrolle sein muss. So sind die hier vermehrt als signifikant gewerteten Ergebnisse nur eingeschränkt aussagekräftig, so lange diese zweite Negativkontrolle fehlt.

Aufgrund dieser methodischen Schwäche ist anzunehmen, dass zumindest ein Teil der als signifikant zu wertenden MHK-Anstiege der höheren Kopienzahl des *high copy*-Plasmids pUC19 und damit einer auch zu erwartenden höheren Anzahl an Effluxpumpen im Vergleich zu den Konstrukten mit dem *low copy*-Plasmid pCC1 geschuldet ist.

Auffällig ist zudem, dass es in Zusammenhang mit dem Plasmid pUC19 insbesondere bei den nicht vorbehandelten Platten im Vergleich zu den mit Paraquat induzierten Platten zu einer signifikanten Erhöhung der MHK kam. Es bleibt zu diskutieren, ob bei der hohen Zahl an Plasmidkopien und damit zu erwartend hohen Zahl an Effluxpumpen eine Art Sättigungsgrenze bereits erreicht war, so dass durch die zusätzliche Induktion nur noch in geringen Umfang weiteren Effekte in Bezug auf die MHK erzielt werden konnten und es daher bei den Konstrukten mit pUC19 auf den mit Paraquat vorbehandelten Platten somit zu keinen signifikanten Ergebnissen mehr kommen konnte.

Bemerkenswert sind darüber hinaus die Ergebnisse der Konstrukte mit pUC19 für das der Substanzklassen der Tetracycline zugeordnete Doxycyclin. Hierbei zeigte sich für die Konstrukte mit pUC19 bezogen auf die MHK für das unveränderte Plasmid pCC1 eine als signifikant zu wertende Erhöhung der MHK. Diese Ergebnisse entsprechen den ursprünglich zugrunde gelegten Überlegungen eines Zusammenhangs zwischen Effluxpumpen und der Substanzklasse der Tetracycline (Sn et al., 2013). Auch hier scheint der Effekt der höheren Kopienzahl durch das *high copy*-Plasmid pUC19 für die Erhöhung der MHK ausschlaggebend.

6 Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass nur die natürliche, also regelrechte Orientierung des Inserts *soxRS* zu einer signifikanten Anhebung des Expressionslevels von *soxS* führte. Bei reverser Anordnung von *soxRS* ebenfalls im Plasmid pCC1 konnte kein als signifikant zu wertender Anstieg der Expression von *soxS* nachgewiesen werden. Bereits Wu und Weiss hatten erste Hinweis hierzu in ihren Experimenten gefunden und Überlegungen angestellt. Eine konkrete Bestätigung wurde durch diese Arbeiten nicht gegeben (Wu & Weiss, 1991). Um die in dieser Arbeit postulierten Ergebnisse zur Genorientierung weiter zu verifizieren, sollten speziell weitere Testungen hinsichtlich der Orientierung erfolgen. So könnte mit Hilfe von Western-blots die Funktion des Genomabschnitts näher untersucht werden.

Des Weiteren waren in dieser Arbeit mit den pUC19-Konstrukten im Rahmen der *real time*-PCR-Experimente keine Induktionsversuche mit Paraquat vorgenommen worden. Es wäre sicherlich interessant, in weiterführenden Arbeiten Induktionsversuche vorzunehmen und diese in Vergleich zu dem Plasmid pCC1 zu setzen. Aufgrund der größeren Kopienzahl liegt die Vermutung nahe, dass ein deutlicher Induktionssprung durch die Zugabe von Paraquat erreicht werden könnte.

Alle Induktionsversuche in Rahmen dieser Arbeit wurden mit Paraquat vorgenommen. Gerade im Hinblick auf die klinische Relevanz wären jedoch auch Versuche mit im klinischen Alltag verwendeten Stoffen wie etwa Triclosan, welches Bestandteil von Desinfektionsmitteln ist, als einzusetzendes Lösungsmittel wünschenswert.

7 Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
ATP	Adenosintriphosphat
bidest.	zweifachdestilliert
BLAST	<i>Basic Linear Alignment Search Tool</i>
bp	Basenpaare
BSA	bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
C	Celsius
ca.	circa
cDNA	für engl. complementary DNA, dt.= komplementäre DNA
CIP	Alkalische Phosphatase
cm	Zentimeter
cp	<i>crossing point</i>
cps	<i>crossing points</i>
Da	Dalton
DEPC	Diethylpyrocarbonat
d. h.	das heißt
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dsDNA	DoppelstrangDNA
EB-Puffer	Elutionspuffer
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
engl.	englisch
ERG	Eppendorf-Reaktionsgefäß
ESBL	Extended-Spectrum-Beta-Laktamasen
et al.	für lateinisch <i>et alii</i> , dt. = und andere
evtl.	eventuell
Fe	chemisches Symbol für Eisen
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
gDNA	genomische DNA
ggf.	gegebenenfalls
h	Stunde
H ₂ O	chemische Formel für Wasser
HKG	<i>housekeeping-Gen(e)</i>
kb	Kilobasenpaare
LB	Luria-Bertani

M	molar
mA	Milliampere
MDR	<i>multidrug resistance</i>
MFP	<i>membrane fusion protein</i>
MFS	<i>Major Facilitator Superfamily</i>
MHK	minimale Hemmkonzentration
min	Minute
Min	Minuten
ml	Milliliter
mm	Millimeter
NCCLS	<i>National Consensus Committee for Laboratory Standards</i>
NEB	<i>New England Biolabs</i>
NF	Normalisierungsfaktor
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
OMF	<i>outer membrane factor</i>
ori	<i>origin of replication</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> , bzw. Polymerase-Kettenreaktion
pg	Pikogramm
qPCR	quantitative PCR
RIMMH	Regensburger Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RND	Resistance Nodulation Division
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
RT-PCR	<i>real time</i> -PCR, reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
S	Svedberg, Maßeinheit für den Sedimentationskoeffizienten
s	Sekunden
SDS	<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i> = Natriumlaurylsulfat
SMR	<i>Small Multidrug Resistance</i>
ssRNA	<i>single strand</i> RNA = Einzelstrang-RNA
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
T _m	Schmelztemperatur (engl. temperature of melting)
TM EPI 300	TransforMax™ EPI300™ <i>E. coli</i>
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U/min	Umdrehungen pro Minute
ÜN	über Nacht
UV	ultraviolett

86 Abkürzungsverzeichnis

V	Volt
w/v	weight per volume
z. B.	zum Beispiel
λ	Lambda, in der Physik das Formelzeichen für die Wellenlänge
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter

8 Literaturverzeichnis

Alekshun M. N., Levy S. B. (1997): Regulation of chromosomally mediated multiple antibiotic resistance: the *mar* regulon. *Antimicrob Agents Chemother.* 41: 2067-2075.

Amábile-Cuevas C. F., Arredondo-García J. L. (2013): Nitrofurantoin, phenazopyridine and the superoxide-response regulon *soxRS* of *Escherichia coli*. *J Infect Chemother.* Jun 13

Aono R., Tsukagoshi N., Yamamoto M. (1998): Involvement of outer membrane protein TolC, a possible member of the *mar-sox* regulon, in maintenance and improvement of organic solvent tolerance of *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol.* 180: 938-944.

Van Bambeke F., Balzi E., Tulkens P. M. (2000): Antibiotic efflux pumps. *Biochemical Pharmacology.* 60: 457–470.

Becker Ch., Riedmaier I., Pfaffl M. W. (2009): RNA-Qualitätskontrolle in der Genexpressionsanalytik. *BIOspektrum* 05: 512-515.

Bibi E., Adler J., Lewinson O., Edgar R. (2001): MdfA, an interesting model protein for studying multidrug transport. *J Mol Microbiol Biotechnol.* 3(2): 171-7.

Bradford P. A. (2001): Extended-spectrum beta-lactamases in the 21st Century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. *Clin Microbiol Rev.* 14(4): 933–951.

Bush K., Jacoby G. A., Medeiros A. A. (1995): A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob Agents Chemother.* 39(6): 1211– 1233.

Bustin S. A. (2000): Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J Mol Endocrinol.* 25(2):169-193.

Bustin S. A., Benes V., Garson J. A., Hellemans J., Huggett J., Kubista M., Mueller R., Nolan T., Pfaffl M. W., Shipley G. L., Vandesompele J., Wittwer C.

T. (2009): The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem.* 55(4): 611-22.

Charpentier B., Branlant C. (1994): The *Escherichia coli* gapA gene is transcribed by the vegetative RNA polymerase holoenzyme E sigma 70 and by the heat shock RNA polymerase E sigma 32. *J Bacteriol.* 176(3): 830–839.

Chou J. H., Greenberg J. T., Demple B. (1993): Posttranscriptional repression of *Escherichia coli* OmpF protein in response to redox stress: positive control of the micF antisense RNA by the soxRS locus. *J Bacteriol.* 175(4): 1026-31.

Chubiz L. M., Rao C. V. (2011): Role of the mar-sox-rob regulon in regulating outer membrane porin expression. *J Bacteriol.* 193(9): 2252-2260.

Cohen S. P., McMurry L. M., Hooper D. C., Wolfson J. S., Levy S. B. (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(8): 1318–1325.

Collu F., Vargiu A. V., Dreier J., Cascella M., Ruggerone P. (2012): Recognition of imipenem and meropenem by the RND-transporter MexB studied by computer simulations. *J Am Chem Soc.* 134(46): 19146-58.

Delihias N., Forst S. (2001): MicF: an antisense RNA gene involved in response of *Escherichia coli* to global stress factors. *J Mol Biol.* 313(1): 1-12.

Demple B. (1996): Redox signaling and gene control in the *Escherichia coli* soxRS oxidative stress regulon - a review. *Gene.* 179(1): 53-7.

Edgar R., Bibi E. (1997): MdfA, an *Escherichia coli* multidrug resistance protein with an extraordinarily broad spectrum of drug recognition. *J Bacteriol.* 179(7): 2274-80.

Eleaume H., Jabbouri S. (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(3): 363-70.

Fluman N., Bibi E. (2009): Bacterial multidrug transport through the lens of the major facilitator superfamily. *Biochim Biophys Acta.* 1794(5): 738-47.

Fluman N., Cohen-Karni D., Weiss T., Bibi E. (2009): A promiscuous conformational switch in the secondary multidrug transporter MdfA. *J Biol Chem.* 284(47): 32296-304.

Freeman W. M., Walker S. J., Vrana K. E. (1999): Quantitative RT-PCR: pitfalls and potential. *Biotechniques.* 26(1): 112-22, 124-5.

Furukawa H., Tsay J. T., Jackowski S., Takamura Y., Rock C. O. (1993): Thiolactomycin resistance in *Escherichia coli* is associated with the multidrug resistance efflux pump encoded by *emrAB*. *J Bacteriol.* 175(12): 3723-9.

Gaudu P., Moon N., Weiss B. (1997): Regulation of the *soxRS* oxidative stress regulon. Reversible oxidation of the Fe-S centers of SoxR in vivo. *J Biol Chem.* 272(8):5082-6.

Garavito R. M., Rosenbusch J. P. (1980): Three-dimensional crystals of an integral membrane protein: an initial x-ray analysis. *J Cell Biol.* 86(1): 327-9.

Greenberg J. T., Demple B. (1989): A global response induced in *Escherichia coli* by redox-cycling agents overlaps with that induced by peroxide stress. *J Bacteriol.* 171: 3933-3939.

Greenberg J. T., Monach P., Chou J. H., Josephy P. D., Demple B. (1990): Positive control of a global antioxidant defense regulon activated by superoxide-generating agents in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA.* 87(16): 6181-5.

Grkovic S., Brown M. H., Skurray R. A. (2002): Regulation of bacterial drug export systems. *Microbiol Mol Biol Rev.* 66(4):671-701, table of contents.

Gu M., Imlay J. A. (2011): The SoxRS response of *Escherichia coli* is directly activated by redox-cycling drugs rather than by superoxide. *Mol Microbiol.* 79(5): 1136–1150.

Haugland R. P., Yue S. T., Millard P. J., Roth B. L. (1995): Cyclic-substituted unsymmetrical cyanine dyes. US Patent Number: US5436134A.

Hof H., Müller R. L., Dörries R. (2000): Mikrobiologie – Duale Reihe. Georg Thieme Verlag, Stuttgart. 1. Auflage, S. 373-376 (2.11.3, Kapitel „*Escherichia*“) und S. 268-274 (1.4.6, Kapitel „Resistenz“).

Holzapfel B., Wickert L. (2007): Die quantitative Real-Time-PCR (qRT-PCR). Methoden und Anwendungsgebiete. *Biologie in unserer Zeit*. 37(2): 120-126.

Holzgrabe U. (2013): Antibiotika: Neue Wirkstoffe in der Pipeline. *Pharmazeutische Zeitung online*. Ausgabe 20/2013.

Jair K. W., Fawcett W. P., Fujita N., Ishihama A., Wolf R. E. Jr. (1996): Ambidextrous transcriptional activation by SoxS: requirement for the C-terminal domain of the RNA polymerase alpha subunit in a subset of *Escherichia coli* superoxide-inducible genes. *Mol Microbiol*. 19(2): 307-17.

Jakubik M. (2011): Generierung und Charakterisierung von konditionalen *Bdp1-knockout*-Mausmodellen - Analysen des Transkriptionsfaktor III_B-Komplexes. Dissertation, Universität Köln.

Kayser F. H., Bienz K. A., Eckert J., Zinkernagel R. M. (2001): *Medizinische Mikrobiologie: verstehen - lernen – nachschlagen*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart. 10. Auflage, S. 2-42.

Kobayashi N., Nishino K., Yamaguchi A. (2001): Novel macrolide-specific ABC-type efflux transporter in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*. 183(19): 5639-44.

Koebnik R., Locher K. P., Van Gelder P. (2000): Structure and function of bacterial outer membrane proteins: barrels in a nutshell. *Mol Microbiol*. 37(2): 239-53.

Knippers R. (2001): *Molekulare Genetik*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart. 8. Auflage, S. 431 ff (Kapitel 15: „Messenger-RNA im Cytoplasma“).

Lewinson O., Adler J., Poelarends G. J., Mazurkiewicz P., Driessen A. J., Bibi E. (2003): The *Escherichia coli* multidrug transporter MdfA catalyzes both electrogenic and electroneutral transport reactions. *Proc Natl Acad Sci USA*. 100(4): 1667-72.

Lewinson O., Bibi E. (2001): Evidence for simultaneous binding of dissimilar substrates by the *Escherichia coli* multidrug transporter MdfA. *Biochemistry*. 40(42): 12612-8.

Li Z., Demple B. (1994): SoxS, an activator of superoxide stress genes in *Escherichia coli*. Purification and interaction with DNA. *J Biol Chem*. 269(28): 18371-7.

Lin-Chao C., Chen W. T., Wong T. T. (1992): High copy number of the pUC plasmid results from a Rom/Rop-suppressible point mutation in RNA II. *Mol Microbiol.* 6(22): 3385–93.

Linde H. J. (2004): Overexpression of Rob increases MIC to norfloxacin by upregulation of the MdfA efflux pump in *Escherichia coli in vitro*. European Society of clinical microbiology and infectious diseases. Abstract number: 10.1111/j.1198-743X.2004.902_o280.x

Lomovskaya O., Lewis K. (1992): Emr, an *Escherichia coli* locus for multidrug resistance. *Proc Natl Acad Sci USA.* 89(19): 8938-42.

Ma D., Alberti M., Lynch C., Nikaido H., Hearst J. E. (1996): The local repressor AcrR plays a modulating role in the regulation of *acrAB* genes of *Escherichia coli* by global stress signals. *Mol Microbiol.* 19(1): 101-12.

Ma D., Cook D.N., Alberti M., Pon N.G., Nikaido H., Hearst J. E. (1995): Genes *acrA* and *acrB* encode a stress-induced efflux system of *Escherichia coli*. *Mol Microbiol.* 16(1): 45-55.

Martin R. G., Bartlett E. S., Rosner J. L., Wall M. E. (2008): Activation of the *Escherichia coli* *marA/soxS/rob* regulon in response to transcriptional activator concentration. *J Mol Biol.* 380(2): 278-84.

Miller P. F., Sulavik M. C. (1996): Overlaps and parallels in the regulation of intrinsic multiple-antibiotic resistance in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol.* 21(3): 441-8.

Mutschler E., Geisslinger G., Kroemer H. K., Schäfer-Korting M. (2001): *Mutschler Arzneimittelwirkungen – Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie.* Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart. 8. Auflage: S. 813 – 815.

Neusser M. (2001): Schnelles Verfahren der PCR-Optimierung mit Real-Time-PCR. *BIOspektrum.* 6: 539-541.

Nikaido H. (2003): Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. *Microbiol Mol Biol Rev.* 67(4): 593-656.

Nikaido H. (2011): Structure and mechanism of RND-type multidrug efflux pumps. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol.* 77: 1-60.

Nikaido H., Rosenberg E. Y., Foulds J. (1983): Porin channels in *Escherichia coli*: studies with beta-lactams in intact cells. *J Bacteriol.* 153(1): 232-40.

Nikaido H., Zgurskaya H. I. (2001): AcrAB and related multidrug efflux pumps of *Escherichia coli*. *J Mol Microbiol Biotechnol.* 3(2): 215-8.

Nishino K., Nikaido E., Yamaguchi A. (2009): Regulation and physiological function of multidrug efflux pumps in *Escherichia coli* and *Salmonella*. *Biochim Biophys Acta.* 1794(5): 834-43.

Nishino K., Yamaguchi A. (2001): Analysis of a complete library of putative drug transporter genes in *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 183(20): 5803-12.

Nordmann P., Poirel L. (2005): Emergence of plasmid-mediated resistance to quinolones in *Enterobacteriaceae*. *J Antimicrob Chemother.* 56(3): 463-9.

Nunoshiba T., Hidalgo E., Amábile-Cuevas C. F., Demple B. (1992): Two-stage control of an oxidative stress regulon: the *Escherichia coli* SoxR protein triggers redox-inducible expression of the *soxS* regulatory gene. *J Bacteriol.* 174(19): 6054-60.

Nunoshiba T., Hidalgo E., Li Z., Demple B. (1993): Negative autoregulation by the *Escherichia coli* SoxS protein: a dampening mechanism for the *soxRS* redox stress response. *J Bacteriol.* 175(22): 7492-4.

Okusu H., Ma D., Nikaido H. (1996): AcrAB efflux pump plays a major role in the antibiotic resistance phenotype of *Escherichia coli* multiple-antibiotic-resistance (Mar) mutants. *J Bacteriol.* 178(1): 306-8.

Paulsen I. T., Park J. H., Choi P. S., Saier M. H. Jr. (1997): A family of gram-negative bacterial outer membrane factors that function in the export of proteins, carbohydrates, drugs and heavy metals from gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol Lett.* 156(1): 1-8.

Pérez A., Poza M., Aranda J., Latasa C., Medrano F. J., Tomás M., Romero A., Lasa I., Bou G. (2012): Effect of Transcriptional Activators SoxS, RobA, and RamA on Expression of Multidrug Efflux Pump AcrAB-TolC in *Enterobacter cloacae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 56(12): 6256-66.

Pfaffl M. W. (2001): A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 29(9): e45.

Pfaffl M. W. (2004): Real-time RT-PCR: Neue Ansätze zur exakten mRNA Quantifizierung. *BIOspektrum*. 10: 92-95.

Pfaffl M. W., Horgan G. W., Dempfle L. (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(9): e36.

Piddock L. J. (1999): Mechanisms of fluoroquinolone resistance: an update 1994-1998. *Drugs*. 58 Suppl 2: 11-8.

Pomposiello P. J., Bennik M. H., Demple B. (2001): Genome-wide transcriptional profiling of the *Escherichia coli* responses to superoxide stress and sodium salicylate. *J Bacteriol.* 183(13): 3890-902.

Pomposiello P. J., Demple B. (2001): Redox-operated genetic switches: the SoxR and OxyR transcription factors. *Trends Biotechnol.* 19(3): 109-14.

Pos K. M. (2009): Drug transport mechanism of the AcrB efflux pump. *Biochim Biophys Acta.* 1794(5): 782-93.

Rahmati S., Yang S., Davidson A. L., Zechiedrich E. L. (2002): Control of the AcrAB multidrug efflux pump by quorum sensing regulator SdiA. *Mol Microbiol.* 43(3): 677-85.

Rajeevan M. S., Ranamukhaarachchi D. G., Vernon S. D., Unger E. R. (2001): Use of real-time quantitative PCR to validate the results of cDNA array and differential display PCR technologies. *Methods.* 25(4): 443-51.

Rand J. D., Danby S. G., Greenway D. L., England R. R. (2002): Increased expression of the multidrug efflux genes *acrAB* occurs during slow growth of *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Lett.* 207(1): 91-5.

Rasmussen R.: Quantification on the LightCycler. (pp 21-34). In: **Meuer S., Wittwer C., Nakagawara K.-I.** (2001): *Rapid Cycle Real-time PCR. Methods and Applications.* Springer Press, New York. 66736-9, 21-34.

Rodríguez-Martínez J. M. (2005): Mechanisms of plasmid-mediated resistance to quinolones. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 23(1): 25-31.

Romanowski T., Markiewicz A., Bednarz N., Bielawski K. P. (2007): Housekeeping genes as a reference in quantitative real-time RT-PCR. *Postepy Hig Med Dosw.* 61: 500-10.

Rui B., Shen T., Zhou H., Liu J., Chen J., Pan X., Liu H., Wu J., Zheng H., Shi Y. (2010): A systematic investigation of *Escherichia coli* central carbon metabolism in response to superoxide stress. *BMC Syst Biol.* 4: 122.

Rutledge R. G., Côté C. (2003): Mathematics of quantitative kinetic PCR and the application of standard curves. *Nucleic Acids Res.* 31(16): e93.

Saier M. H. Jr., Beatty J. T., Goffeau A., Harley K. T., Heijne W. H., Huang S. C., Jack D. L., Jähn P. S., Lew K., Liu J., Pao S. S., Paulsen I. T., Tseng T. T., Virk P. S. (2000): The major facilitator superfamily. *J Mol Microbiol Biotechnol.* 2(2): 257-79.

Sigal N., Cohen-Karni D., Siemion S., Bibi E. (2006): MdfA from *Escherichia coli*, a model protein for studying secondary multidrug transport. *J Mol Microbiol Biotechnol.* 11(6): 308-17.

Sn A. B., Bm A. M., As A. A., Ae E., Iy M. (2013): *Escherichia coli* tetracycline efflux determinants in relation to tetracycline residues in chicken. *Asian Pac J Trop Med.* 6(9): 718-22.

Swick M. C., Morgan-Linnell S. K., Carlson K. M., Zechiedrich L. (2011): Expression of multidrug efflux pump genes *acrAB-tolC*, *mdfA*, and *norE* in *Escherichia coli* clinical isolates as a function of fluoroquinolone and multidrug resistance. *Antimicrob Agents Chemother.* 55(2):921-4.

Tavío M. M., Aquili V. D., Poveda J. B., Antunes N. T., Sánchez-Céspedes J., Vila J. (2010): Quorum-sensing regulator *sdiA* and *marA* overexpression is involved in *in vitro*-selected multidrug resistance of *Escherichia coli*. *J Antimicrob Chemother.* 65(6): 1178-86.

Tenover F. C. (2006): Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. *Am J Infect Control.* 34 (5 Suppl 1): S 3-10; discussion S 64-73.

Tichopad A., Dzidic A., Pfaffl M. W. (2002): Improving quantitative real-time RT-PCR reproducibility by boosting primer-linked amplification efficiency. *Biotechnology Letters.* 24: 2053-2056.

Tran J. H., Jacoby G. A., Hooper D. C. (2005): Interaction of the plasmid-encoded quinolone resistance protein Qnr with *Escherichia coli* DNA gyrase. *Antimicrob Agents Chemother.* 49(1): 118-25.

Vogel F., Lebert C. (2004): Infektionen in Klinik und Praxis. Wiss. Verlagsgesellschaft, Stuttgart. S. 385.

Wenzel S. C., Muller R. in: **Sahm H., Antranikian G., Stahmann K.-P., Takors R.** (2013): Industrielle Mikrobiologie. Springer Spektrum, Berlin.

White D. G., Goldman J. D., Demple B., Levy S. B. (1997): Role of the *acrAB* locus in organic solvent tolerance mediated by expression of *marA*, *soxS*, or *robA* in *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 179(19): 6122-6.

Wiedemann B., Heisig P. (1999): Bakterielle Resistenz gegenüber Chinolonen (Ciprofloxacin). *Chemotherapie Journal.* 8(3): 99-107.

Wiedemann C., Schulz H. L., Weber B. H. F. (2004): Quantitative real-time PCR – Eine Frage der Normalisierung. *BIOspektrum.* 10(1): 99-102.

Wild J., Hradecna Z., Szybalski W. (2002): Conditionally amplifiable BACs: switching from single-copy to high-copy vectors and genomic clones. *Genome Res.* 12(9): 1434-44.

Witte W., Mielke M. (2003): β -Laktamasen mit breitem Wirkungsspektrum - Grundlagen, Epidemiologie, Schlussfolgerungen für die Prävention. *Bundesgesundheitsbl - Gesundheitsforsch – Gesundheitsschutz.* 46: 881–890.

Wittwer C. T., Herrmann M. G., Gundry C. N., Elenitoba-Johnson K. S. (2001): Real-time multiplex PCR assays. *Methods.* 25(4): 430-42.

Wu J., Weiss B. (1991): Two divergently transcribed genes, *soxR* and *soxS*, control a superoxide response regulon of *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 173(9): 2864-2871.

Wu J., Weiss B. (1992): Two-stage induction of the *soxRS* (superoxide response) regulon of *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 174(12): 3915-20.

Yang S., Clayton S. R., Zechiedrich E. L. (2003): Relative contributions of the *AcrAB*, *MdfA* and *NorE* efflux pumps to quinolone resistance in *Escherichia coli*. *J Antimicrob Chemother.* 51(3): 545-56.

Yoshida T., Qin L., Egger L. A., Inouye M. (2006): Transcription regulation of *ompF* and *ompC* by a single transcription factor, *OmpR*. *J Biol Chem.* 281(25): 17114-23.

Yue S. T., Singer V. L., Roth B. L., Mozer T. J., Millard P. J., Jones L. J., Jin X., Haugland R. P. (1997): Substituted unsymmetrical cyanine dyes with selected permeability. US Patent Number: US5658751A.

Zipper H., Brunner H., Bernhagen J., Vitzthum F. (2004): Investigations on DNA intercalation and surface binding by SYBR Green I, its structure determination and methodological implications. *Nucleic Acids Res.* 32(12): e103.

9 Internetquellen

- (1) "Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2012":
<http://ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/antimicrobial-resistance-surveillance-europe-2012.pdf>
- (2) ARS (Antibiotika-Resistenz-Surveillance in Deutschland):
http://www.ihph.de/dokumente/90818_ARS_Bonn_1.pdf
- (3) www.ema.europa.eu/ema/index.jsp%3Fcurl%3Dpages/special_topics/general/general_content_000439.jsp
- (4) www.doccheck.com
 - Stichwort „ β -Lactam-Antibiotika“; aufgerufen am 27.12.2013
- (5) <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/PubMed>
- (6) <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>
- (7) <http://www.roche-applied-science.com>
- (8) www.protocol-online.org/prot/Molecular_Biology/PCR/Multiplex_PCR/index.html
- (9) Richtlinien des National Consensus Committee for Laboratory Standards (NCCLS) -> seit 01.01.2005: <http://clsi.org/standards/>
- (10) www.hortipendium.de/Herbizid
- (11) www.genomeprojectsolutions.com/pdfs/pcc1BAC.pdf
- (12) Vektorkarte puc19:
www.neb.com/~media/NebUs/Page%20Images/Tools%20and%20Resources/Interactive%20Tools/DNA%20Sequences%20and%20Maps/pUC19_map.pdf
- (13) www.jacobs-university.de/node/15601

10 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Induktion von pCC1-gfp mit Arabinose (Linde, 2004).....	45
Abbildung 2: Der copy control pCC1-Vektor mit einer Auswahl an Enzymschnittstellen (11).	46
Abbildung 3: Das <i>high copy</i> -Plasmid pUC19 (12).	47
Abbildung 4: Insert <i>lacPr-soxS</i>	48
Abbildung 5: Schematische Darstellung des Inserts <i>soxRS</i>	49
Abbildung 6: Beispiel eines Kontrollgels (1,5 % Agarose).....	49
Abbildung 7: Schmelzkurve ausgewählter <i>soxS</i> -Amplifikate und	55
Abbildung 8: Schematische Darstellung der bekannten Regulationswege bzw. Zusammenhänge zwischen den untersuchten Genen bzw. Proteinen in <i>E. coli</i>	68
Abbildung 9: Der AcrAB-TolC-Effluxpumpenkomplex	73

11 Formelverzeichnis

Formel 1: Formel für die Berechnung der Effizienz E	39
Formel 2: Basisformel der Delta-Delta-CP-Methode.....	40

12 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Angabe zu Antibiotika für die Zugabe in Selektionsmedien:.....	14
Tabelle 2: Verwendete Lösungen	14
Tabelle 3: Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten kits	17
Tabelle 4: Übersicht über die verwendeten Primer	18
Tabelle 5: Übersicht über die verwendeten Bakterien.....	21
Tabelle 6: Verwendete kommerzielle Vektoren.....	22
Tabelle 7: Übersicht über die verwendeten bzw. klonierten Stämme	44
Tabelle 8: Übersicht über die einzelnen Effizienzen	52
Tabelle 9: relativer Genexpressionsunterschied der untersuchten Gene	53
Tabelle 10: Ergebnisse der Etest®-Reihe.....	60
Tabelle 11: Übersicht über die Zugehörigkeit der untersuchten Gene.....	69
Tabelle 12: Klassifikation von Effluxpumpen.....	71

13 Erklärung

Ich erkläre hiermit, 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 der Quelle gekennzeichnet. Insbesondere habe ich nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- bzw. Beratungsdiensten (Promotionsberater oder andere Personen) in Anspruch genommen. Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeit 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.

Zachenberg, im August 2015

Stefanie Perpetua Eckhardt

14 Danksagung

Zunächst möchte ich mich bei Herrn PD Dr. Hans-Jörg Linde bedanken, der der Ideengeber zu dieser Arbeit war und diese Promotion ermöglicht hat.

Zu meinem großen Bedauern war es ihm während der schriftlichen Auswertung nicht mehr möglich, diese Arbeit weiter zu betreuen. Dass dies von Herrn Prof. Dr. Dr. Gessner und Herrn Dr. Dr. Martin Ehenschwender übernommen wurde, bedeutet mir sehr viel und ich möchte Beiden ganz herzlich dafür danken.

Bei der gesamten AG Linde möchte ich mich für die Hilfsbereitschaft, Kollegialität und entspannte Arbeitsatmosphäre bedanken. Insbesondere gilt hier Herrn Dr. Matthias Arnold mein ausdrücklicher Dank. Neben der wissenschaftlich fundierten Anleitung war er auch eine große freundschaftliche Stütze während des experimentellen Teils dieser Promotion. Geradezu wundervoll war „unsere“ Arbeitsgruppen-MTA Frau Christine Irtenkauf. Ein ganz liebes „Danke schön“ geht an die AG Reischl, die mir bei der *real time*-PCR mit Rat und Tat zur Seite stand und die Benutzung des LightCyclers® zu allen (Un-)Zeiten ermöglichte.

Mein ganz persönlicher Dank gilt meinen Eltern Marlene und Georg Kandler. Mein Ehemann Dr. Alexander Eckhardt stand emotional und fachlich immer an meiner Seite, besonders wenn es mal nicht so lief. Nur er weiß, wieviel Arbeit und Wochenenden in dieser Arbeit stecken. Danke für Alles!

Das wundervollste zum Schluss: Ohne unsere Töchter Marlene und Charlotte hätte ich vermutlich keine Promotion mehr abgeschlossen. Sie sind der größte Ansporn und Glücksquelle für uns.