

**Molekulare Grundlagen der Entstehung der Variante
AAC(6')-Ib-cr und deren Bedeutung
für die Aktivität von Fluorchinolonen im Vergleich zu
anderen plasmidkodierten und chromosomalen
Fluorchinolon-Resistenzmechanismen**

Dissertation

zur Erlangung des naturwissenschaftlichen Doktorgrades im Fachbereich Chemie der
Universität Hamburg

vorgelegt von

Nadine-Christine Emrich

aus Schotten

- Hamburg 2011 -

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Oktober 2008 bis Oktober 2011 unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Peter Heisig in der Abteilung für Pharmazeutische Biologie und Mikrobiologie am Institut für Biochemie und Molekularbiologie der Universität Hamburg angefertigt.

1. Gutachter: Prof. Dr. Peter Heisig

2. Gutachter: Prof. Dr. Ulrich Hahn

Disputationstermin: 08. Juni. 2012

Für meine Eltern

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Fluorchinolone (FQ) – Geschichte und Struktur.....	2
1.1.1	Wirkung der (Fluor)chinolone	4
1.2	Resistenzmechanismen gegenüber (Fluor)chinolonen (FQ) bei gramnegativen Bakterien	5
1.2.1	Die Mechanismen im Überblick	5
1.2.2	Chromosomale FQ-Resistenzmechanismen gramnegativer Erreger	6
1.2.3	Plasmidkodierte FQ-Resistenzmechanismen (<i>plasmid mediated quinolone resistance, PMQR</i>)	9
1.3	Die GNAT Superfamilie	13
1.3.1	Allgemeines	13
1.3.2	Die Struktur der GNAT Superfamilie	13
1.3.3	Die Aminoglykosid N-Acetyltransferasen.....	14
1.3.4	Die Aminoglykosid 6'-N-Acetyltransferasen	15
1.3.5	Die Aminoglykosid 6'-N-Acetyltransferasen Typ Ib	15
1.3.6	Die Aminoglykosid 6'-N-Acetyltransferasen Typ Iy.....	24
1.4	Zielstellung	28
2	Material und Methoden.....	29
2.1	Material	29
2.1.1	Geräte und Verbrauchsmaterialien.....	29
2.1.2	Software	31
2.1.3	Medien und Agar	31
2.1.4	Enzyme	32
2.1.5	Chemikalien, Lösungsmittel, fertige Puffer und Reagenzien	33
2.1.6	Antikörper	35
2.1.7	Antibiotika	36
2.1.8	Oligonukleotide	36
2.1.9	Degeneration der Primer	42
2.1.10	Bakterienstämme	42
2.1.11	Plasmide	44

Inhalt

2.1.12	Größenstandards für DNA- und Proteingele.....	46
2.2	Methoden.....	48
2.2.1	Arbeiten mit Bakterien.....	48
2.2.2	Arbeiten mit DNA	58
2.2.3	Arbeiten mit Protein.....	73
3	Ergebnisse	81
3.1	Molekulare Grundlagen der Entstehung der Variante AAC(6')-Ib-cr aus AAC(6')-Ib und <i>in vitro</i> Untersuchungen zur Herstellung einer AAC(6')-Ib-cr-analogen Mutation in einem anderen Typ AAC(6')-I	81
3.1.1	Untersuchungen zu AAC(6')-I, AAC(6')-Ib und AAC(6')-Ib-cr	81
3.1.2	Ortsgerichtete Mutagenese von AAC(6)-Ib-wt und Varianten	104
3.1.3	Untersuchung von weiteren klinischen Isolaten auf die Anwesenheit eines anderen Typ AAC(6')-I	107
3.1.4	Untersuchungen zu AAC(6')-Iy	110
3.1.5	Ortsgerichtete Mutagenese von AAC(6')-Iy	112
3.1.6	Zufallsmutagenese mittels Error-prone PCR.....	125
3.1.7	<i>In vitro</i> Evolution von AAC(6')-Ib-wt, den Varianten AAC(6')-Ib102 und AAC(6')-Ib179, sowie AAC(6')-Iy	134
3.2	Einfluss von plasmidkodierten und chromosomalen Resistenzmechanismen auf die Aktivität verschiedener Fluorchinolone in isogenen <i>Escherichia coli</i> Isolaten	169
3.2.1	Klonierung von PMFR (<i>plasmid mediated fluorquinolone resistance genes</i>) ..	169
3.2.2	Charakterisierung von fluorchinolonresistenten Mutanten mit einer Kombination von chromosomalen Mutationen und PMFR-Genen durch Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration von Finafloxacin, Ciprofloxacin, Moxifloxacin und Levofloxacin.....	171
3.2.3	<i>In vitro</i> Selektion von QepA1, QnrS1 und AAC(6')-Ib-cr in <i>E. coli</i> WT.....	178
4	Diskussion.....	181
4.1	Molekulare Grundlagen der Entstehung der Variante AAC(6')-Ib-cr aus AAC(6')-Ib und <i>in vitro</i> Untersuchungen zur Herstellung einer AAC(6')-Ib-cr-analogen Mutation in einem anderen Typ AAC(6')-I	182
4.1.1	Verbreitung von <i>aac(6')-Ib-cr</i> und Auswahl von <i>aac(6')-Ib</i> -positiven klinischen Isolaten	182

4.1.2	Charakterisierung der ausgewählten klinischen Isolate	183
4.1.3	Einfluss des N-Terminus auf die Funktion von AAC(6')-Ib und Vergleich der Deletionsmutanten	185
4.1.4	Einfluss der Varianten <i>aac(6')-Ib-wt</i> , <i>aac(6')-Ib7</i> und <i>aac(6')-Ib11</i> auf die Empfindlichkeit.....	188
4.1.5	Ortsgerichtete Mutagenese von AAC(6)-Ib-wt und Varianten	189
4.1.6	Untersuchung von weiteren klinischen Isolaten auf die Anwesenheit eines anderen Typ AAC(6')-I	192
4.1.7	<i>In silico</i> Analyse von AAC(6')-Ib-wt und AAC(6')-Iy	192
4.1.8	Ortsgerichtete Mutagenese von AAC(6')-Iy	193
4.1.9	Einfluss der eingeführten Mutationen in <i>aac(6')-Iy</i> auf die Dimerisierung von AAC(6')-Iy	194
4.1.10	Zufallsmutagenese mittels Fehler verursachender PCR	202
4.1.11	<i>In vitro</i> Mutagenese von <i>E. coli</i> CSH116.....	206
4.1.12	Einfluss der Mutation in der AcrR-(AcrS) Bindestelle von <i>E. coli</i> CSH116 64-8-33 auf die Effluxpumpenexpression.....	207
4.1.13	<i>In vitro</i> Selektion von <i>aac(6')-Ib-wt</i> , <i>aac(6')-Ib-102</i> , <i>aac(6')-Ib-179</i> und <i>aac(6')-Iy</i> in <i>E. coli</i> CSH116 64-8-33	208
4.1.14	Charakterisierung der Stämme <i>E. coli</i> CSH116 64-8-33 pHPNE19-05.1 sel 620 und <i>E. coli</i> CSH116 64-8-33 pHPNE19-05.1 sel 744.....	213
4.1.15	Fazit und Ausblick.....	214
4.2	Einfluss von plasmidkodierten und chromosomalen Resistenzmechanismen auf die Aktivität verschiedener Fluorchinolone in isogenen <i>Escherichia coli</i> Isolaten	215
4.2.2	Entstehung von Fluorchinolonresistenz-Mutationen in <i>E. coli</i> WT in Anwesenheit von QnrS, QepA und AAC(6')-Ib-cr.....	223
4.2.3	Fazit und Ausblick.....	225
5	a Zusammenfassung.....	226
5	b Summary	228
6	Literatur.....	230
7	Abkürzungsverzeichnis	239
8	Anhang.....	244
8.1	Gefahrenstoffhinweise.....	244

Inhalt

8.2	Poster und Veröffentlichungen	247
-----	-------------------------------------	-----

1 Einleitung

Antibiotika stellen in der Medizin eine Besonderheit dar, denn durch regelmäßige Anwendung können sie „verbraucht“ werden. Grund hierfür ist die Fähigkeit der Organismen Resistenzen gegenüber den eingesetzten Substanzen zu entwickeln. Bakterien sind in ihrer natürlichen Umgebung häufig schnell wechselnden Umweltbedingungen ausgeliefert. Durch ihre selektiv permeable Membran befinden sie sich ständig im Austausch mit ihrem Habitat und müssen sich den Bedingungen anpassen, um sich erfolgreich durchzusetzen.

Während in einem Zeitraum von 1975 bis 1984 eine nahezu unveränderte Resistenzlage zu beobachten war, stieg die Anzahl von resistenten Keimen den letzten Jahrzehnten drastisch an, vor allem gegenüber Fluorchinolonen (86). (Fluor)chinolone sind synthetisch hergestellte Antibiotika (122) und erst seit gut fünfzig Jahren im klinischen Gebrauch (91). Die Vielfalt der Veränderungen der resistenten Keime reicht von Mutationen in den Zielstrukturen des Antibiotikums, über das zufällige Ausschalten von regulatorischen Bereichen, die zu einem erhöhten Efflux der antimikrobiellen Substanzen führen, bis hin zu plasmidkodierten horizontal übertragbaren Mechanismen der Resistenz (71). Die Entdeckung einer Fluorchinolon-inaktivierenden Aminoglykosid 6'-N-Acetyltransferase AAC(6')-Ib-cr (124, 165), führte zu zwei Wendungen, denn in der Regel entstehen Antibiotikum-inaktivierende Enzyme in Stämmen, die selbst Antibiotikum-produzierend sind (38). Erstens sind (Fluor)chinolone synthetisch hergestellte Wirkstoffe, die vor der Einführung in den 1960er Jahren keine Berührung mit Bakterien hatten. Zweitens existiert nun nur eine Enzymvariante, die in der Lage ist, ein chemisch unterschiedliches, aber klinisch verwandtes Substrat einer anderen Antibiotikaklasse zu acetylieren (85). Die molekularen Grundlagen der Entstehung der Variante AAC(6')-Ib-cr sowie deren Bedeutung für die Aktivität von Fluorchinolonen im Vergleich zu anderen plasmidkodierten und chromosomalen Resistenzmechanismen ist bisher unbekannt. Die vorliegende Arbeit soll daher einen Beitrag zur Entstehung von AAC(6')-Ib-cr leisten und untersuchen ob eine cr-analoge Modifikation in einem anderen Typ einer Aminoglykosid 6'-N-Acetyltransferase möglich ist. Im Focus sollen aber auch Untersuchungen zur Aktivität eines „neuen“ Fluorchinolons gegenüber plasmidkodierten und chromosomalen Resistenzmechanismen im Vergleich zu „älteren“ Fluorchinolonen stehen.

1.1 Fluorchinolone (FQ) – Geschichte und Struktur

(Fluor)chinolone sind synthetisch hergestellte, antimikrobiell wirksame Substanzen, die sich strukturell vom Chinolin ableiten. Chinolone verfügen über ein Chinolingerüst, es werden aber auch Azaderivate wie beispielsweise Nalidixinsäure und Enoxacin mit einem Naphthyridingrundgerüst im weiteren Sinne dazugezählt. Im Gegensatz zum Chinolingerüst, welches nur an Position 1 ein Stickstoff besitzt, hat das Naphthyridingrundgerüst jeweils an den Positionen 1 und 8 ein Stickstoff (6, 9). Nalidixinsäure (Chinolon) gilt als Muttersubstanz der heutigen (Fluor)chinolone. Sie wurde 1962 zufällig in der Malaria Forschung als Nebenprodukt bei der Chloroquin-Synthese entdeckt und für eine Therapie gegen gramnegative *Enterobacteriaceae* mit geringen toxischen Nebenwirkungen beschrieben (91). Erst durch die Variation des Substitutionsmusters am Grundgerüst konnten noch wirksamere Antibiotika, mit verbesserten pharmakokinetischen und antibakteriellen Eigenschaften, hergestellt werden (150). Die Einführung eines Piperazinyls am C7-Atom (Pipemidsäure) verbesserte beispielsweise die Aktivität gegenüber gramnegativen Organismen und erweiterte das Spektrum um *Pseudomonas* spp. (6, 9). Ein Fluor-Atom am C6-Atom führte 1973 zum ersten Wirkstoff (Flumequin) mit geringfügiger Aktivität gegenüber grampositiven Erregern (9). Eine Kombination der beiden Substituenten, ein Piperazinyl am C7-Atom und ein Fluor-Atom am C6, brachte den Durchbruch: Norfloxacin, welches als erster Vertreter der Fluorchinolone galt, besitzt Aktivität gegenüber gramnegativen Mikroorganismen aus der Familie der *Enterobacteriaceae* und besitzt eine verbesserte Aktivität gegenüber grampositiven, war jedoch gegen atypische Erreger unwirksam (9). Norfloxacin wurde 1978 patentiert. Es folgten Pefloxacin (1979), Enoxacin (1980), Fleroxacin (1981), Ciprofloxacin (1981) und Ofloxacin (1982) (9).

Ciprofloxacin (Abbildung 1-1 (A)) besitzt einen apolaren Cyclopropylrest am N1-Atom, dadurch verbessert sich, neben den pharmakokinetischen Eigenschaften, die Aktivität gegenüber verschiedenen Enterobakterien, *Haemophilus influenzae* und *Pseudomonas aeruginosa* (135). Levofloxacin (Abbildung 1-1 (B)), das S-Enantiomer von Ofloxacin, ist die pharmakologisch aktive Form. Durch bestimmte Substitutionen am C8-Atoms lässt sich die anti-grampositive Wirkung steigern und es verbessert sich die Aktivität gegenüber atypischen Erregern, außerdem wird durch erhöhte Lipophilie die Halbwertszeit verlängert und die Gewebepenetration erhöht (6). Moxifloxacin (Abbildung 1-1 (C)), das einen

Azabicyclo-Substituenten anstelle des Piperazinyls am C7-Atom und eine Methoxygruppe am C8-Atom besitzt, hat eine deutliche gesteigerte Wirkung gegenüber grampositiven Erregern und Anaerobiern, zeichnet sich außerdem durch Lipophilie, eine verlängerte Halbwertszeit von >10 h und eine Verbesserung der oralen Verfügbarkeit aus (6, 13). Während Norfloxacin noch überwiegend bei Harnwegsinfekten eingesetzt wurde, wird Ciprofloxacin bei verschiedenen systemischen Infektionen, Levofloxacin und Moxifloxacin zusätzlich bei Atemwegsinfektionen eingesetzt (9, 93, 135).

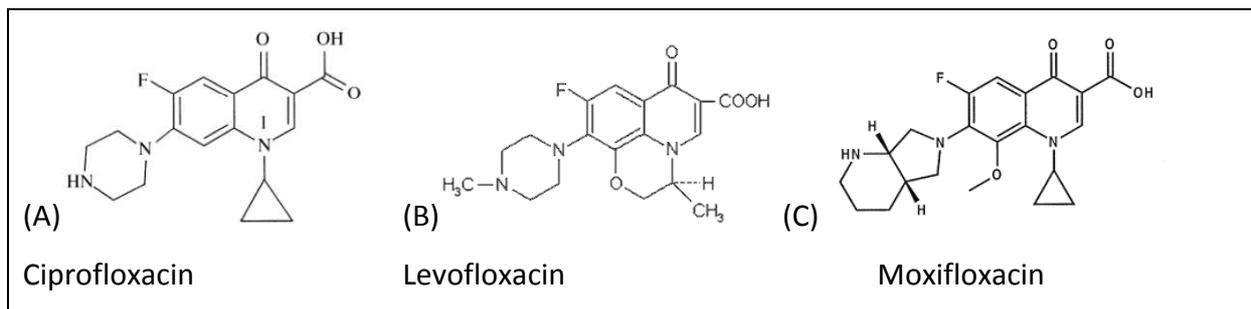


Abbildung 1-1 Strukturformeln von (A) Ciprofloxacin, (B) Levofloxacin und (C) Moxifloxacin.

Finafloxacin (Abbildung 1-2), ein neues Breitspektrum Fluorchinolon, welches zur Gruppe der 8-Cyano Derivate gehört, besitzt ein Chiralitätszentrum im C7-Substituenten, welches zur antibakteriellen Wirkung bei einem pH-Wert von 5,0-6,0 führt. Finafloxacin zeigt in saurem Milieu exzellente Wirkung gegenüber gramnegativen und grampositiven Erregern wie *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. mirabilis*, *M. morgani* und *H. pylori*, sowie *S. aureus*, *S. saprophyticus* und *S. agalactiae* (20, 88, 166).

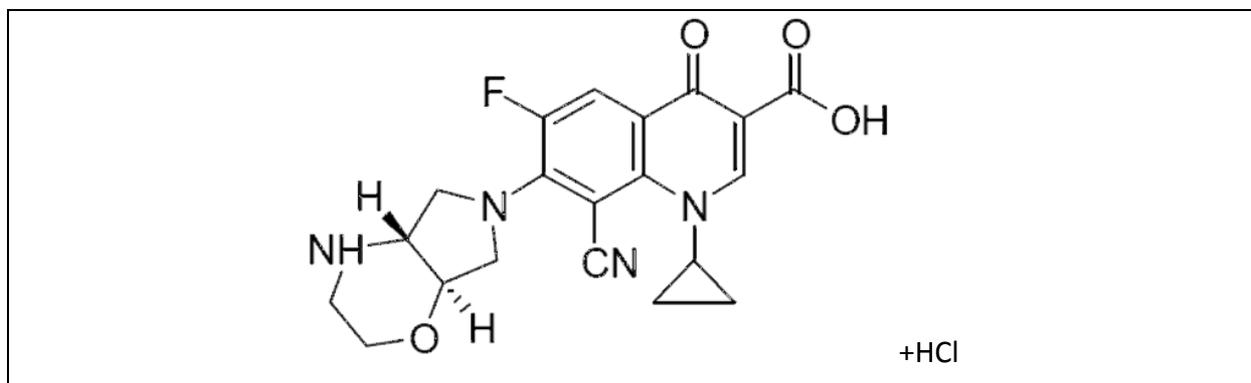


Abbildung 1-2 Strukturformel von Finafloxacin in Anwesenheit von HCl.

Während Finafloxacin bei saurem Milieu (pH 5,0 bis 6,5) sehr gute antibakterielle Wirkung zeigt, zeigt zum Beispiel Ciprofloxacin bei einem neutralem pH-Wert ein sehr gutes Ergebnis (68, 88).

1.1.1 Wirkung der (Fluor)chinolone

(Fluor)chinolone wirken konzentrationsabhängig bakterizid (66). Der Wirkmechanismus der Fluorchinolone beruht auf einer Störung der DNA-Replikation durch Hemmung bakterieller Typ-II Topoisomerasen, wie der DNA-Gyrase und der Topoisomerase IV. Das primäre Target der (Fluor)chinolone ist in grampositiven Mikroorganismen die Topoisomerase IV, das sekundäre die DNA-Gyrase, in gramnegativen Bakterien ist es umgekehrt (49, 72, 149).

Prokaryontische Typ-II Topoisomerasen sind Heterotetramere, die aus zwei jeweils identischen Untereinheiten bestehen. Dabei wird die aktive Form des DNA-Gyrase-Holoenzym von jeweils zwei Untereinheiten A (GyrA) und B (GyrB) (A_2B_2), die von den Genen *gyrA* und *gyrB* kodiert werden, gebildet. Die Gene *parC* und *parE* kodieren für die Untereinheiten C (ParC) und E (ParE), von denen jeweils zwei Untereinheiten (C_2E_2) die Topoisomerase IV bilden (81, 114). Die DNA-Gyrase führt hierbei energieabhängig, d.h. unter ATP-Hydrolyse negative Supercoils in relaxierte DNA ein, während Topoisomerase IV-Moleküle das Bakterienchromosom nach der DNA-Replikation (Decatenierung) trennen (5, 41, 162).

(Fluor)chinolone binden weder an ein Gyrase-Molekül, noch an die DNA allein, sondern an einen Komplex aus DNA und Enzym, Mg^{2+} -Ionen stabilisieren hierbei den ternären Komplex aus Enzym, DNA und (Fluor)Chinolon (66). Durch den ternären Komplex (*cleavage complex*) verschiebt sich das Gleichgewicht der „normalen“ Reaktion in Richtung Topoisomerase IV-Cleavage und die Religation wird verhindert. Dadurch erhöht sich die Anzahl der DNA-Doppelstrangbrüche (5). Entscheidend für den Zelltod ist die SOS-Antwort, die durch die Doppelstrangbrüche und die Inaktivierung des LexA-Repressors (dieser wird von RecA gebunden) ausgelöst wird (31, 102). Durch die Induktion des SOS-Regulons, als Stress-Antwort der Zelle, kommt es zur Induktion von *sfiA*, dadurch kommt zur Bildung von Filamenten. Zelluläre Prozesse wie Replikation, Transkription, etc. werden durch die Veränderung der DNA-Topologie eingestellt, die Zellteilung durch Verhinderung der

Septumbildung unterdrückt und die Expression von DNA-Reparaturenzymen gesteigert bis im „Normalfall“ alle Schäden beseitigt sind (40, 51, 69). Aufgrund der Stabilität des Komplexes kann die Reparatur der Doppelstrangbrüche nicht ausgeführt werden, dadurch kommt es zur vermehrten Bildung von Mutationen, was wiederum zum sogenannten langsamen Zelltod führt (161). Zum schnellen Zelltod kommt es durch die Bildung von Hydroxyl-Radikalen (*reactive oxygen species*, ROS) aus der Fenton-Reaktion (74, 75), in der Eisenionen die Reduktion von Wasserstoffperoxid vermittelt, die zur oxidativen Schädigung von DNA (105), Proteinen und Lipiden (46) führt. Die Eisen(II)ionen entstehen bei der Reaktion von Eisen-Schwefel-Proteinen (*Fe-S clusters*) mit Hyperoxiden, deren Bildung durch die Gyrasehemmung induziert wird (42).

Wenige Jahre nach der Einführung der (Fluor)chinolone zeigte sich eine deutliche Resistenzentwicklung von zuvor sensiblen Erregern (87), die sowohl chromosomal kodiert als auch plasmidkodiert sein können.

1.2 Resistenzmechanismen gegenüber (Fluor)chinolonen (FQ) bei gramnegativen Bakterien

1.2.1 Die Mechanismen im Überblick

Grundsätzlich werden primäre und sekundäre Resistenzen unterschieden. Während eine primäre Resistenz generell in einer bestimmten Spezies existiert, ist die sekundäre Resistenz eine erworbene Eigenschaft. Man unterscheidet drei Grundmechanismen der sekundären Resistenz (66):

- (1) eine Veränderung der Zielstruktur,
- (2) eine Verringerung der Antibiotikumkonzentration am Wirkort und
- (3) eine Inaktivierung des Antibiotikums.

Dabei können die Resistenzmechanismen sowohl Mutationen in chromosomalen Genen, als auch zusätzliche, plasmidkodierte und damit horizontal übertragbare Eigenschaften betreffen.

1.2.2 Chromosomale FQ-Resistenzmechanismen gramnegativer Erreger

1.2.2.1 Veränderungen in den FQ-Zielstrukturen

Die ersten Resistenzmechanismen, die nach der therapeutischen Einführung der Chinolone Anfang 1960 und der Fluorchinolonen Anfang 1980 (6) beschrieben wurden, waren chromosomal kodiert. Häufig betreffen die Mutationen grampositiver und gramnegativer Bakterien einem hochkonservierten Bereich in GyrA, der zwischen Ala67 bis Gln106 lokalisiert ist, dieser Bereich wird als Chinolon-Resistenz-determinierende Region (*quinolone resistance-determining region*, QRDR) bezeichnet (174). Die Aminosäuren Asp426 und Lys447 von GyrB werden in Analogie ebenfalls als Chinolon-Resistenz-determinierende Region benannt (175). Die Untereinheiten GyrA/GyrB sind jeweils homolog zu den Untereinheiten ParC/ParE, entsprechend sind die Regionen der QRDR jeweils homolog und hochkonserviert (72).

Die Aminosäuren in GyrA Ser83 und Asp87 sind am häufigsten von Mutationen in resistenten Isolaten betroffen (15, 109), sie befinden sich in räumlicher Nähe zu Trp122 (66), dem aktiven Zentrum der DNA-Gyrase. Die Aminosäuren Ser83 und Asp87 stellen somit wichtige Positionen im Gyrase-Chinolon-DNA-Komplex dar. Eine Mutation Ser83Ala ist weitgehend ohne Wirkung auf die Gyrase-Aktivität, während eine Mutation an Position Asp87 zum Verlust von Supercoiling-Aktivität führt. Jedoch führt die Mutation an Position 83 als auch die an Position 87 zu einer Veränderung in der Wechselwirkung (Verringerung der Affinität) von (Fluor)chinolonen zum Gyrase-DNA-Komplex. Eine Mutation in GyrA an Position 83 (Ser83Leu) zeigt eine höhere Resistenz als eine Mutation an Position 87 (Asp87Gly) (15). Eine einzelne Mutation in *parC* (zum Beispiel in Codon 80 (AGC→ATC) mit einem Austausch Ser80Ile), hat keinen Effekt auf die Empfindlichkeit eines *E. coli* Stammes (11). Der Austausch der Aminosäure 426 (Asp426Asn) in GyrB führt zu einem schwachen Anstieg der MHK-Werte der Chinolone und ähnelt somit dem Effekt einer *gyrA*-Mutation. Ein Austausch von Lysin an Position 447 zu Glutaminsäure in GyrB führt lediglich zu einem MHK-Anstieg für solche Chinolone, die eine negative Nettoladung aufweisen (66). Eine einzelne Mutation führt jedoch nicht zu klinisch relevanter Resistenz, erst die Kombination von verschiedenen chromosomalen Mutationen bedingt die Hochresistenz der Erreger gegenüber (Fluor)chinolonen (11).

Eine (Fluor)chinolonresistenz tritt häufig schrittweise, durch eine Reihe von Mutationen (Schritten), zunächst in einem primären, gefolgt von Mutationen an einem sekundären Ziel auf. Eine zweite bzw. dritte Mutation geht dabei mit einer Erhöhung der Resistenz einher (72). Dabei liegen die Mutationen nicht immer in den Genen, die für die Zielstrukturen der (Fluor)chinolone kodieren.

1.2.2.2 Verringerung der FQ-Konzentration am Wirkort – Zunahme von Efflux und Verminderung von Influx

Eine Veränderung der Expression der *mexAB-oprK*-Effluxpumpe bei *P. aeruginosa* beispielsweise, führt zu reduzierter Akkumulation von antibakteriellen Substanzen in der Zelle (119). Auch eine Mutation in der *mtrAR*-Region bei gramnegativen *N. gonorrhoeae* (57) oder im *qacR* bzw. *arIRS-norA*-System von grampositiven *S. aureus*-Zellen (3, 56) führt zu einer gesteigerten Effluxaktivität. Eine Punktmutation im *marCRAB*(*multiple antibiotic resistance*)-Operon von *E. coli*, welches der Regulation der Expression des *acrAB*-Operons dient, das für die MDR(*multiple drug resistance*)-Effluxpumpe AcrAB-TolC kodiert (4, 130), führt ebenso zu einer gesteigerten Effluxaktivität, somit zur verringerten Konzentration von Antibiotikum in der Zelle und demzufolge zu verminderter Empfindlichkeit der Erreger (56).

Das *mar*-Operon (siehe Abbildung 1-3) in *E. coli* beeinflusst die Resistenz gegenüber (Fluor)chinolonen oder Antibiotika aus anderen Substanzklassen wie Tetracyclin und Chloramphenicol, sowie Superoxid-bildenden Agenzien (52, 53, 55). Das *mar*-Operon besteht aus der Operatorsequenz *marO*, wodurch die Gene *marC* bzw. *marRAB* reguliert werden (4). MarR (MarR-Regulator-Familie) fungiert als negativer Repressor der Sequenz *marRAB* durch Bindung am Promotor *P_{marRAB}* des Operators *marO*. Die Funktion von MarB ist derzeit unbekannt. MarA (AraC-Regulator-Familie) beeinflusst als globaler Aktivator die Expression von mehr als 60 Genen in *E. coli*, unter anderem *acrAB* und *micF*, dessen Antisense-RNA die *OmpF*-Expression dereprimiert (4, 14, 32, 39, 56, 99).

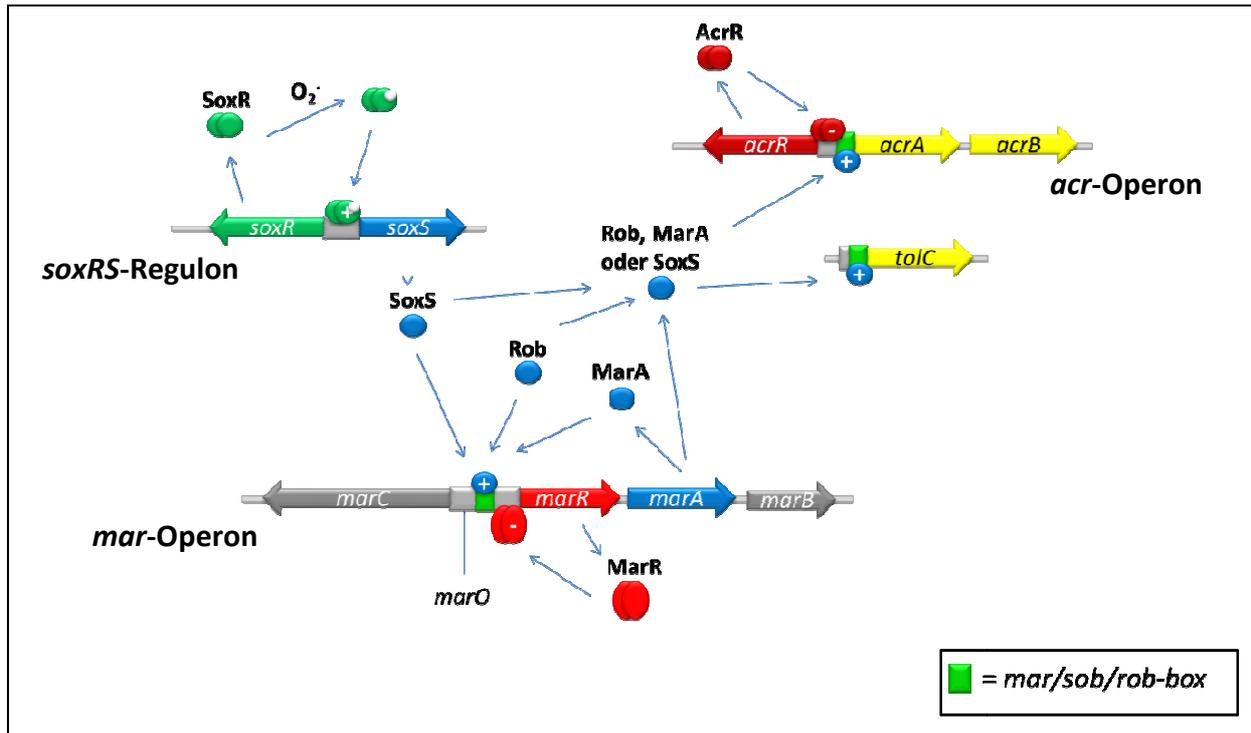


Abbildung 1-3 Schematische Darstellung der Regulation der Gene *acrAB* und *tolC*, nach Grkovic et al. (56), modifiziert.

Neben MarA sind auch SoxS und Rob globale Regulatoren der AraC-Regulatorfamilie (56). Sie binden an spezifische Motive die *marbox* genannt werden. In den Promotoren der *mar/sox/rob*-Regulons befinden sich diese Bindestellen (98). MarA bindet unter anderem an die *marbox* des *acrAB*-Promotors und aktiviert die Expression von AcrAB. Die MDR-Effluxpumpe AcrAB gehört zur Familie der RND(*resistance-nodulation-division*)-Typ Effluxpumpen und bildet zusammen mit TolC, einem Kanal der äußeren Membran, ein effektive Effluxpumpe (4). Die Überexpression von MarA und dessen homologen Aktivatoren SoxS und Rob, zu einer erhöhten Synthese von TolC (8). Folglich führt die Überexpression von MarA (SoxS, Rob), durch zum Beispiel Inaktivierung des Repressors MarR, zu einer gesteigerten Expression der dreigliedrigen MDR-Effluxpumpe AcrAB-TolC. Die Gene *acrAB* sind im *acr*-Operon zusammen mit *acrR* und *acrO*, in dem der Promotor *PacrAB* liegt, organisiert (56), siehe Abbildung 1-3. AcrR fungiert als Repressor der Gene *acrAB* (92). Ein weiteres regulatorisches Gen, *acrS* ist stromaufwärts von der *acrEF* lokalisiert. AcrEF ist ebenfalls eine Multidrug-Effluxpumpe und AcrS reprimiert die Gene *acrAB*. Eine Überexpression der Gene *acrR* und *acrS* vermindert die Expression von AcrAB (70). AcrR und AcrS binden eine palindromische Sequenz von 24 bp innerhalb der Protein-Bindestelle des

acrAB-Promotors (ca. 90 bp vor dem Startcodon) und können so die Gene *acrAB* regulierend beeinflussen (70, 125).

Durch den gesteigerten Efflux und durch eine verringerte Penetration antimikrobieller Substanzen, zum Beispiel durch Abnahme von OmpF-Porinen in der äußeren Membran gramnegativer Bakterien, wird die Empfindlichkeit bakterieller Erreger gegenüber einer Reihe von antimikrobieller Substanzen reduziert (33, 56, 130).

Die zunächst nur chromosomal kodierten Resistenzen, die sich gegenüber (Fluor)chinolonen entwickelten, konnten nur vertikal übertragen werden. Dieser Vorteil der (Fluor)chinolone ist jedoch seit einiger Zeit verloren, denn es finden sich zunehmend plasmidkodierte und durch horizontalen Gentransfer übertragbare Resistenzmechanismen gegenüber (Fluor)chinolonen (123).

1.2.3 Plasmidkodierte FQ-Resistenzmechanismen (*plasmid mediated quinolone resistance*, PMQR)

1.2.3.1 Das DNA-Gyrase/Topoisomerase IV-Schutzprotein Qnr

Nach der therapeutischen Einführung der (Fluor)chinolone in den sechziger bzw. achtziger Jahren, wurde neben den bereits beschriebenen chromosomalen Resistenzmutationen, 1987 von Munshi *et al.* ein plasmidkodierter Mechanismus beschrieben, der Resistenz gegenüber Nalidixinsäure vermittelt (111). Die Resistenz war auf einem 20-Megadalton Plasmid lokalisiert und lies sich aus *Shigella dysenteriae* Typ I durch Konjugation auf *E. coli* übertragen. Bei den Transkonjuganden vermutete man zunächst spontane Nalidixinsäure-resistente Mutanten, wobei das Plasmid selbst als Mutationsfaktor wirkte (35).

1998 wurde dann von Martínéz-Martínéz *et al.* ein plasmidkodiertes DNA-Gyrase/Topoisomerase IV-Schutzprotein, QnrA (*quinolone resistance*) auf Plasmid pMG252 aus *Klebsiella pneumoniae* beschrieben (100). Es wurden weitere Vertreter aus verwandten Klassen der DNA-Gyrase/Topoisomerase IV-Schutzproteine identifiziert: QnrS aus *Shigella flexneri* wurde 2003 beschrieben (126) und QnrB 2006 aus *Klebsiella pneumoniae* (76), QnrC auf Plasmid pHS9 aus *Proteus mirabilis* (163) und QnrD aus *Salmonella enterica* (26) im Jahre 2009. Außerdem wurde bereits 2005 von einem Qnr-ähnlichen Gen aus *Vibrio cholerae*, QnrVC (50, 117, 126, 147) berichtet. Von QnrA gibt mittlerweile sieben Varianten (QnrA1 bis QnrA7), von QnrS die Varianten QnrS1 bis QnrS4. Die Aminosäuresequenz von QnrA1 im

Einleitung

Vergleich zu QnrS1 weist zu 59 % Übereinstimmungen auf. Von QnrB existieren 24 Varianten, wobei die Aminosäuresequenz von QnrB1 zu 43 % bzw. 44 % Übereinstimmungen mit QnrA1 bzw. QnrS1 zeigt (126). QnrC zeigt eine Sequenzidentität von 64 % zu QnrA1, 41 % zu QnrB1, 59 % zu QnrS1 und zuletzt 43 % zu QnrD (163). QnrD zeigt im Vergleich dagegen 48 % zu QnrA1, 61 % zu QnrB1 und 41 % zu QnrS1 (26).

Das DNA-Gyrase bzw. Topoisomerase IV-Schutzprotein Qnr, gehört zur Gruppe der PRP(*pentapeptide repeat protein*)-Familie. Diese Proteine bestehen aus, bzw. enthalten Domänen aus Tandemwiederholungen von Aminosäuresequenzen mit einer Konsensussequenz von (Ser Tyr Ala oder Val)-(Asp oder Asn)(Leu oder Phe)-(Ser Tyr oder Arg) (Gly) (126, 156). Die hydrophoben Aminosäuren Leucin und Phenylalanin wechseln sich in der fünften Position ab (108). Qnr-Schutzproteine sind auf Typ 1 Integrons (118) oder konjugativen Plasmiden (127) lokalisiert und können so horizontal von Erreger zu Erreger übertragen werden.

Der Mechanismus der Qnr-Schutzproteine wurde am Beispiel von QnrA beschrieben. Dazu wurde die Aktivität von aufgereinigtem QnrA in einem Supercoiling-Assay mit Ciprofloxacin untersucht. Man fand heraus, dass QnrA allein das Supercoiling nicht beeinflusst (152), sondern das durch die Gyrase gelenkte DNA-Supercoiling inhibiert, indem es die Gyrase-Bindung zur DNA reduziert. Die QnrA-Schutzproteine imitieren dabei die Struktur der DNA (153). QnrA bindet die DNA-Gyrase, sowie die Topoisomerase IV aus *E. coli* direkt, die Ähnlichkeit (*DNA-mimicking*) zur DNA schützt vor der Wirkung der Chinolone (154). Zur Bindung von QnrA und DNA ist weder die Abwesenheit relaxierter DNA notwendig, noch Ciprofloxacin oder Energie in Form von ATP (Adenosin-Triphosphat). Die Anwesenheit von Enzym, DNA und Chinolon Komplex ist nicht erforderlich. Der Qnr-Gyrase-Komplex wird schneller geformt, als der Cleavage-Komplex. Chinolone binden erst später im katalytischen Zyklus und stabilisieren den ternären Komplex aus Chinolon-DNA-Gyrase. QnrA reduziert das Ziel der (Fluor)chinolone indem es die Bindung von DNA-Gyrase und DNA reduziert (152-154). Wie genau das Konkurrieren von QnrA und DNA um die Bindung der DNA-Gyrase, ohne deren Funktionsminderung, funktioniert, ist noch nicht bekannt (126).

Das Aktivitätsniveau der Qnr-Schutzproteine, welches durch die Höhe der Expression bedingt und auch von Aminosäuremodifikation beeinflusst wird, ist nur ein Aspekt der Wirkung der Qnr-Schutzproteine sowie der Höhe der Resistenz, die durch sie vermittelt wird (129). Letzten Endes ist die Höhe der Resistenz von der Klasse der Qnr, vom Expressionsniveau und der Promotorregion abhängig (129, 169).

1.2.3.2 Die FQ-spezifische Effluxpumpe QepA und die MDR-Effluxpumpe OqxAB

In den Jahren 2002, 2007 bzw. 2003 wurden bereits weitere FQ-Resistenz vermittelnde Mechanismen beschrieben. Es handelte sich hier um die FQ-spezifischen Effluxpumpen QepA1 (171) und QepA2 (25), sowie um die MDR-Effluxpumpe OqxAB (61).

QepA, später als QepA1 bezeichnet, wurde 2002, lokalisiert auf Plasmid pHPA, in *E. coli* C316 gefunden. QepA1 besteht aus 511 Aminosäuren und zeichnet sich durch einen GC-Gehalt von 72 % aus. Zellen mit einer Kopie des *qepA1*-Gens zeigen eine signifikant reduzierte Akkumulation gegenüber Norfloxacin (171). Während *qepA1* von IS26 flankiert und mit *rmtB* assoziiert ist, ist *qepA2* von ISCR3C flankiert und steht nicht in Assoziation mit einem bestimmten Gen (126). QepA2 wurde in *E. coli* BicA gefunden (25). Analysen zeigten, dass Nukleotid-Insertionen zu den Veränderungen Ala99Gly und Val134Ile im Protein führten (116, 171). QepA1 und QepA2 prägen den gleichen Phänotyp aus (25). QepA verleiht eine verminderte Empfindlichkeit gegenüber hydrophilen Fluorchinolonen wie Norfloxacin, Ciprofloxacin und Enrofloxacin was mit einer 32- bis 64-fachen Erhöhung der MHK einhergeht (116, 171).

QepA gehört zur Familie der MFS(major-facilitator-superfamily) Membrantransporter und besitzt 14 TMS(transmembrane segment) und 7 spezifische Motive A, B, C, D1, E, F und H (171). Der Transporter arbeitet Fluorchinolon-spezifisch, untersuchte antimikrobielle Substanzen wie Ampicillin, Erythromycin, Kanamycin oder Tetracyclin zeigen keinen Effekt (170).

OqxAB, eine weitere Effluxpumpe wurde 2003 auf einem konjugativen Plasmid, pOLA52 entdeckt. pOLA52 wurde in *Escherichia coli* aus Schweinegülle isoliert. OqxAB vermittelt Resistenz gegen das Antibiotikum und Wachstumsförderer Olaquinox (145). Das Chinoxalindi-N-Oxid Olaquinox (Oqx) ist ein weit verbreiteter Wachstumsförderer bei Schweinen (1), dessen antibiotische Aktivität auf der Induktion des Abbaus von DNA in proliferierenden und

nicht proliferierenden Zellen liegt (148). Auch Resistenz gegen Ampicillin, Chloramphenicol und Ciprofloxacin konnte gezeigt werden (60, 145). Die MDR-Effluxpumpe OqxAB gehört zum RND(*resistance-nodulation-division*)-Typ (62).

1.2.3.3 Die Aminoglykosid 6'-N-Acetyltransferase Typ Ib-cr

Als weitere übertragbare Fluorchinolonresistenz wurde 2003 von Wang *et al.* ein neuer Mechanismus beschrieben, der 2006 von Robicsek *et al.* näher dargestellt wurde. Es handelte sich hierbei um eine neue Variante der Aminoglykosid 6'-N-Acetyltransferase Typ Ib (AAC(6')-Ib). Die Aminoglykosid 6'-N-Acetyltransferase Typ Ib-cr (AAC(6')-Ib-cr, -cr für *ciprofloxacin resistance*) unterscheidet sich von AAC(6')-Ib durch zwei Mutationen (W102R und D179Y) und ist in der Lage, neben Kanamycin, Tobramycin und Amikacin auch die synthetisch hergestellten C7-piperazinyl-Fluorchinolone Ciprofloxacin und Norfloxacin zu acetylieren und somit unwirksam zu machen (124, 165).

Diese Erkenntnis lieferte zwei Wendungen, denn in der Regel entstehen Antibiotikum-inaktivierende Enzyme in Stämmen, die selbst Antibiotikum-produzierend sind (38). Erstens sind Fluorchinolone synthetisch hergestellte Wirkstoffe, die vor der Einführung in den 1960er Jahren keine Berührung mit Bakterien hatten. Zweitens existiert nun nur eine Enzymvariante, die in der Lage ist, ein chemisch unterschiedliches, aber klinisch verwandtes Substrat einer anderen Antibiotikaklasse zu acetylieren (85).

In ersten Untersuchungen von *aac(6')-Ib-cr*-positiven Stämmen wurde festgestellt, dass es zwischen der *aac(6')-Ib-cr*-Prävalenz und des Alters des Patienten, des Geschlechts des Patienten oder des stationären Zustands, keine Beziehung gibt. Des Weiteren gibt es keinen Zusammenhang zwischen der Anwesenheit von *qnrA*, *qnrB* oder *qnrS* Gene und *aac(6')-Ib-cr* (115). In einer Studie von Ruiz *et al.* wurde das *aac(6')-Ib-cr* Gen vor allem in Klasse 1 Integrons gefunden oder in Verbindung mit dem Transposon Tn1721 in *E. coli* und mit dem *aac(3)-II* Gen in *Klebsiella* (131). Bisher wurde nur von plasmidkodierten Kopien von *aac(6')-Ib-cr* berichtet (24, 123), 2012 wurde *aac(6')-Ib-cr* nun zum ersten Mal chromosomal kodiert beschrieben (131). Die Variante AAC(6')-Ib-cr wurde bisher nur mit beiden Veränderungen (W102R und D179Y) gefunden. Versuche von Robicsek *et al.* zeigen, dass *in vitro* erzeugte Mutanten mit einer D179Y-Mutation bereits einen um zwei Verdünnungsstufen erhöhten MHK-Wert von Ciprofloxacin besitzen (124).

Die Aminoglykosid 6'-N-Acetyltransferasen AAC(6')-Ib und dessen neue Variante AAC(6')-Ib-cr gehören als Aminoglykosid N-Acetyltransferasen, kurz AgNAT, zur Familie der GCN5(*general control nonderepressible-5*)-verwandten N'-Acetyltransferasen (GNAT Superfamilie) (104, 158).

1.3 Die GNAT Superfamilie

1.3.1 Allgemeines

Die Familie der GNATs gehört zu den am besten untersuchten Proteinen innerhalb der Gruppe der N-Acetyltransferasen. Ca. 140 Proteine gehören zu dieser Familie, unter anderem auch eukaryontische Serotonin N-Acetyltransferasen (SNAT oder AANAT) oder Histon N-Acetyltransferasen (HAT) (158), Transkriptionsaktivatoren aus Hefen oder Tetrahymenen, wie zum Beispiel GCN5 (19) oder Hpa2 (7) und die humane P/CAF HAT (172). Allgemein gesagt katalysieren Enzyme dieser Familie den Transfer einer Acetylgruppe eines Acetyl-Coenzym A (Acetyl-KoA, Donor) zum primären Amin eines Akzeptors (43).

1.3.2 Die Struktur der GNAT Superfamilie

Die primäre Sequenz der Proteine der GNAT Superfamilie besteht aus vier konservierten Motiven von A bis D in folgender Anordnung vom N-Terminus zum C-Terminus: C, D, A und B. (siehe Abbildung 1-5, Seite 16, Grau hinterlegte Sequenzen) Die beachtlichste Konservierung betrifft die Motive A und B, die Motiv C und D sind hingegen am wenigsten konserviert. Drei weitere Motive E-G sind zum Beispiel in der Aminoglykosid 6'-N-Acetyltransferasen Typ Iy bekannt. Trotz der funktionellen Variation dieser Enzyme ist die Topologie der GNAT-Enzyme nahezu identisch (18, 43, 97, 112):

Die Faltung der Proteine (Sekundärstruktur) beginnt am N-Terminus mit einem β -Faltblatt (β_1) gefolgt von α -Helices α_1 und α_2 und drei antiparallel verlaufenden β -Faltblattstrukturen β_2 , β_3 und β_4 . Zentral folgt eine weitere α -Helix (α_3) und ein fünftes β -Faltblatt (β_5). Zuletzt folgen eine vierte α -Helix (α_4) und ein weiteres β -Faltblatt (β_6), siehe Abbildung 1-4. Das in Dunkelblau dargestellte β -Faltblatt am C-Terminus kann sowohl vom Monomer selbst, als auch durch eine zweite Kette in einem Dimer gebildet werden. Das Faltblatt β_0 am N-Terminus ist nur sehr wenig konserviert (158).

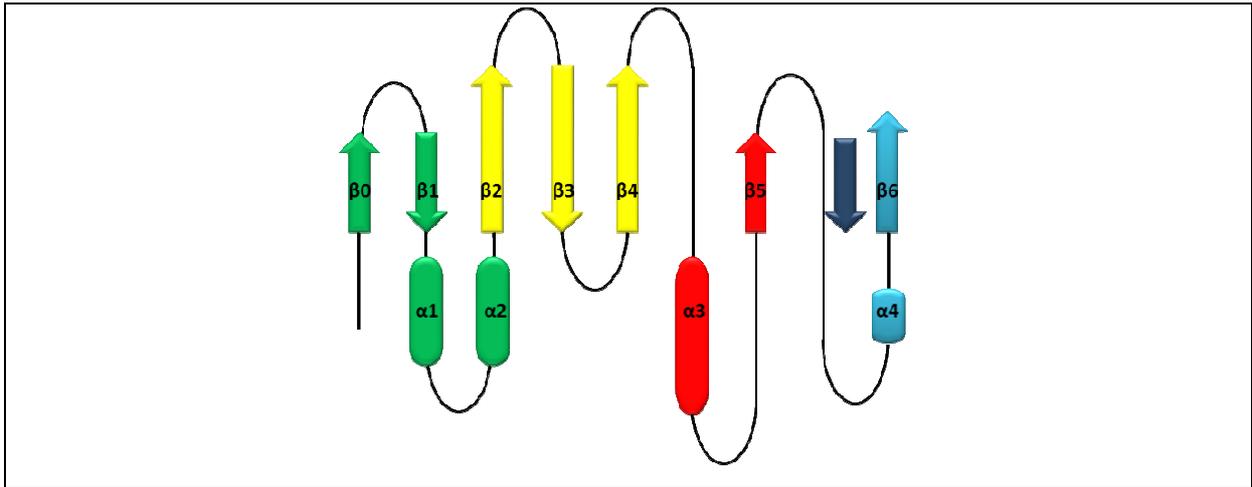


Abbildung 1-4 Topologie der Faltung von GNAT-Proteinen, aus Vetting *et al.* (158). Vom N-Terminus beginnend mit den Sekundärstrukturen in Grün $\beta 1$, $\alpha 1$ und $\alpha 2$, in Gelb $\beta 2$, $\beta 3$, in Rot $\alpha 3$ und $\beta 5$ und zuletzt in hellblau $\alpha 4$ und $\beta 6$. $\beta 0$ am N-Terminus ist nur wenig konserviert. Das in Dunkelblau dargestellte β -Faltblatt am C-Terminus kann sowohl vom Monomer, als auch durch eine zweite Kette eines Dimers gebildet werden.

1.3.3 Die Aminoglykosid N-Acetyltransferasen

Die Aminoglykosid N-Acetyltransferasen (AAC) vermitteln Resistenz gegenüber Aminoglykosid-Antibiotika (kurz Aminoglykosiden), ähnlich wie Aminoglykosid Kinasen (Phosphotransferasen, APH) oder Adenyltransferasen (Aminoglykosid Nukleotidyltransferasen, ANT). Während APHs und ANTs einen Hydroxylrest (45) am Aminoglykosid verändern (*O*-Phosphorylierung, bzw. *O*-Adenylierung/*O*-Nukleotidylierung), acetylieren AACs einen primären Aminrest ($R-NH_2$) am Aminoglykosid (*N*-Acetylierung) und führen somit zur Inaktivierung der Substanz (18).

Aminoglykosid modifizierende Enzyme sind in der Regel monofunktional, mit Ausnahme von einigen bisher bekannten bifunktionellen Enzymen wie AAC(6')/APH(2'') (36) (hier ist AAC(6') gleich AAC(6')-Ie (142)), ANT(3'')-Ii/AAC(6')-IId (83) und AAC(3)-Ib/AAC(6')-Ib'(84).

Als Kofaktor der Aminoglykosid N-Acetyltransferasen dient Acetyl-Koenzym A, dessen Pantotheinrest keilförmig zwischen den Faltblättern $\beta 4$ und $\beta 5$ gebunden ist (Acetyl-CoA Bindestelle) (43, 146). Ähnlich wie bei anderen GNAT-Enzymen gehören die β -Faltblätter 4 und 5, sowie die Helix $\alpha 3$ (zusammen als $\beta\alpha\beta$ -core bezeichnet) zum hochkonservierten Motiv A (siehe Abbildung 1-5, Seite 16) (120). Dabei spielt $\beta 4$ eine essentielle Rolle in der Bindung des Acetyl-KoAs und besitzt Aminosäuren, die wesentlich für die katalytische Aktivität sind (158).

Aminoglykosid N-Acetyltransferasen acetylieren regioselektiv die Positionen 1, 3, 2' und 6' der Aminoglykoside. Danach werden die Enzyme in vier Hauptklassen eingeteilt: AAC(1), AAC(3), AAC(2') und AAC(6'), jeweils benannt nach dem Ort der Acetylierung (18, 95, 160).

1.3.4 Die Aminoglykosid 6'-N-Acetyltransferasen

Von den 6'-N-acetylierenden Transferasen existieren insgesamt drei Gruppen, die sich durch ihr spezifisches Substratprofil unterscheiden (142):

- (1) AAC(6')-I, welches Resistenz gegenüber Tobramycin, Dibekacin, Amikacin, 5-Episisomicin, Netilmicin, 2'-N-Ethylnetilmicin und Sisomicin vermittelt,
- (2) das bereits erwähnte bifunktionelle Enzym AAC(6')/APH(2''), welches Resistenz gegenüber Gentamicin, Tobramycin, Dibekacin, Netilmicin, 2'-N-Ethylnetilmicin, 6'-N-Ethylnetilmicin, Amikacin, Isepamicin, 5-Episisomicin und Fortimicin vermittelt und zuletzt
- (3) AAC(6')-II, welches Resistenz gegenüber Gentamicin, Tobramycin, Dibekacin, Netilmicin, 2'-N-Ethylnetilmicin und Sisomicin vermittelt (142).

Von Gruppe AAC(6')-I sind ca. 30 Untergruppen identifiziert (18), unter anderem AAC(6')-Ia, AAC(6')-Ic aus *Serratia marcescens*, AAC(6')-Id, lokalisiert in Tn4000, AAC(6')-Ie entspricht dem aminoterminalen Teil von AAC(6')/APH(2''), AAC(6')-If, AAC(6')-Ig und AAC(6')-Ih aus *Acinetobacter* spp., sowie AAC(6')-Ii aus *Enterococcus faecium* (142). Des Weiteren existieren die Varianten AAC(6')-Ij, AAC(6')-Ik, AAC(6')-Il, AAC(6')-Im, AAC(6')-Iq, AAC(6')-Ir, AAC(6')-Is, AAC(6')-It, AAC(6')-Iu, AAC(6')-Iv, AAC(6')-Iw, AAC(6')-Ix, AAC(6')-Iy, AAC(6')-Iz, sowie vier Untergruppen von AAC(6')-II (18): AAC(6')-IIa, AAC(6')-IIb (23), AAC(6')-IIc und AAC(6')-IId (18). Am häufigsten vertreten ist die Untergruppe AAC(6')-Ib (Gruppe AAC(6')-I), welche häufig als Genkassette in Klasse 1 Integrons (59), oder innerhalb von Transposons auf Plasmiden lokalisiert ist (18).

1.3.5 Die Aminoglykosid 6'-N-Acetyltransferasen Typ Ib

1.3.5.1 AAC(6')-Ib, dessen Varianten und deren Eigenschaften

Von *aac(6')-Ib* (alt: *aacA4*) existieren verschiedene Varianten, die bereits näher untersucht wurden: *aac(6')-Ib-cr* (*aacA4-cr*) und *aac(6')-Ib7* bzw. *-Ib8*, sowie die Variante *aac(6')-Ib11* (23, 124). Die Proteine AAC(6')-Ib7/8 und AAC(6')-Ib11 unterscheiden sich von AAC(6')-Ib durch eine bzw. zwei Aminosäuresubstitutionen, sowie durch ein verändertes

Einleitung

Substratspektrum bezüglich Gentamicin und Amikacin (23). AAC(6′)-Ib (im Folgenden auch AAC(6′)-Ib-wt benannt) besitzt die Kombination Q116/L117, AAC(6′)-Ib7/8 besitzen die Kombination Q116/S117 und AAC(6′)-Ib11 besitzt die Kombination L116/S117 (23) (Proteinbezeichnung nach *E. coli* Stamm DJ33-7 Protein-Accession Nr. AEP16466). Die Variante AAC(6′)-Ib-cr entspricht im Bereich 116/117 (Motiv A) der Wildtyp Form (AAC(6′)-Ib-wt), also Q116/L117, vergleiche zum Beispiel *Escherichia coli* Stamm DJ33-7 Protein-Accession Nr. AEP16466 (siehe Abbildung 1-5, Gelb hinterlegt) und Stamm 1387 (pHS1387) Protein-Accession Nr. ACD56150 oder *Enterobacter cloacae* Stamm E79 Protein-Accession Nr. ADU16118 und *Klebsiella pneumoniae* Stamm Kp51 Protein-Accession Nr. ADU16107. AAC(6′)-Ib-cr besitzt, aufgrund von zwei Aminosäuresubstitutionen an den Positionen 102 und 179 (W102R und D179Y, vergleiche Abbildung 1-5, Türkis hinterlegt) ein neues Substratprofil: AAC(6′)-Ib-cr ist in der Lage neben Aminoglykosiden, die Fluorchinolone Ciprofloxacin und Norfloxacin zusätzlich zu acetylieren, vergleiche Abschnitt 1.2.3.3, Seite 12 (124).

1	MSNAKTKLGI	TKYSIVTNSN	DSVTLRLMTE	HDLAMLYEWL	NRSHIVEWWG	Motiv C
51	GEEARPTLAD	VQEQYLPSVL	AQESVTPYIA	MLNGEPIGYA	QSYVALGSGD	Motiv D
101	GRWEEETDPG	VRGIDQLLAN	ASQLGKGLGT	KLVRALVELL	FNDPEVTKIQ	Motiv A
151	TDPSPSNLRA	IRCYEKAGFE	RQGTVTTPYG	PAVYMQTRQ	AFERTRSDA*	Motiv B

Abbildung 1-5 Aminosäuresequenz der Aminoglykoside 6′-N-Acetyltransferase Typ Ib-cr (AAC(6′)-Ib-cr) des *Escherichia coli* Stammes DJ33-7 (Protein-Accession Nr. AEP16466), 199 aa (amino acid). Grau hinterlegt sind die Motive C, D, A und B. Dunkelblau/Lila/Dunkelblau entspricht dem β 4/ α 3/ β 5-cores des Motivs A (120). Gelb hinterlegt sind die Aminosäuren 116/117. Türkis hinterlegt sind die Aminosäuren 102 und 179. Rot dargestellt ist die Aminosäure D115.

Eine Erklärung, warum lediglich Ciprofloxacin und Norfloxacin von AAC(6′)-Ib-cr acetyliert werden können, findet sich auf molekularer Ebene. Ciprofloxacin und Norfloxacin besitzen einen Piperazinring mit einem unsubstituierten sekundären Amin (R-NH-R), welches in der Reaktion acetyliert wird (124). Üblicherweise acetylieren die AAC(6′)-Enzyme die primären 6-Aminogruppen (R-NH₂) des 6-Desoxy-6-Glucosaminrings von Aminoglykosiden (95).

Ähnlich wie bei AAC(6′)-Ib11 (23), genügen bei der Variante AAC(6′)-Ib-cr ebenfalls nur zwei Mutationen, um das Substratprofil zu verändern. Die Fluorchinolone Gatifloxacin oder

Sparfloxacin beispielsweise, die an dem Piperazinring angrenzenden Kohlenstoffatom ein oder mehrere Substitutionen besitzen, werden von AAC(6')-Ib-cr nicht acetyliert. Perfloxacin, das am Stickstoffatom einen Substituenten besitzt, wirkt sogar als Inhibitor des Enzyms (160).

Die Acetylierungsaktivität von AAC(6')-Ib-wt zeigt bei einem pH-Wert von 5,6 ein pH-Optimum, während AAC(6')-Ib-cr ein pH-Optimum von pH 6,1 zur Acetylierung von Aminoglykosiden und ein pH-Optimum von pH 7,7 zur Acetylierung von Fluorchinolonen zeigt (160).

1.3.5.2 Essentielle Aminosäuren von AAC(6')-Ib

In einem Alanin-Scanning Experiment mit AAC(6')-Ib-wt, indem zu untersuchende Aminosäuren in Alanin (A) mutiert wurden, konnte festgestellt werden, dass die Substitutionen R112A, G113A und I114A (Motiv A, β 4) zu reduzierten MHK-Werten für Amikacin und zu relativ hohen MHK-Werten für Kanamycin führen. Die Mutationen L118A bzw. D115A (Motiv A, β 4) führen zu weniger (Restaktivität) bzw. keiner Acetylierungsaktivität. Die Aminosäure bzw. Position D115 (Abbildung 1-5, Seite 16, Rot markiert) ist daher wesentlich für die enzymatische Aktivität des Enzyms (120).

Die Mutationen F169L, F169A bzw. F169Y (Motiv B) beispielsweise führen zu einem thermosensitiven (keine Aktivität bei 42°C, reduzierte Aktivität bei 37°C), einem Enzym mit Aktivitätsverlust bzw. zu einem Enzym mit wenig Aktivität. Eine Veränderung von Y164A bzw. E165A (Motiv B) führt zu einer Veränderung der Aminoglykosidspezifität (Verlust der Amikacinresistenz, während die Kanamycinresistenz unverändert bleibt) bzw. zu einem Verlust der gesamten Acetylierungsaktivität (29, 144) (Proteinbezeichnung nach *E. coli* Stamm DJ33-7 Protein-Accession Nr. AEP16466).

1.3.5.3 Die Tertiärstrukturen von AAC(6')-Ib-wt und dessen Varianten

Das Enzym AAC(6')-Ib-wt und dessen Variante AAC(6')-Ib-cr wurden als Monomer auskristallisiert bzw. liegen in Lösung als Monomer vor. Die Kristallisation von AAC(6')-Ib-cr gelang nicht (104, 160). In Abbildung 1-6 (A) ist die monomere Tertiärstruktur des Enzyms AAC(6')-Ib-wt abgebildet. Von AAC(6')-Ib11 ist bekannt, dass ein Gleichgewicht zwischen Monomeren und Dimeren vorliegt (104). In Abbildung 1-6 (B) ist die Tertiärstruktur von AAC(6')-Ib11 als Dimer in Überlagerung mit AAC(6')-Ib-wt (Monomer) abgebildet. Für die

Einleitung

Visualisierung und Bearbeitung des entstandenen Bildes wurde das Programm UCSF Chimera 1.5.3 unter Windows 7 verwendet.

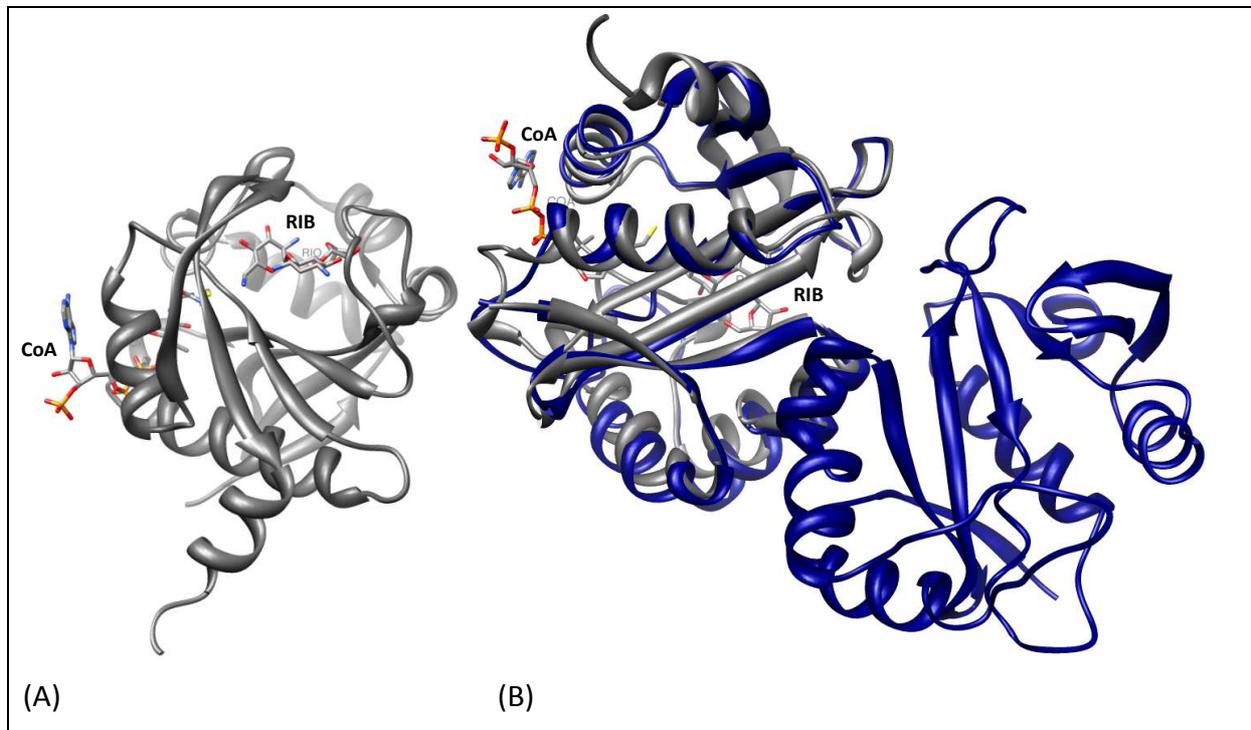


Abbildung 1-6 (A) Darstellung der Tertiärstruktur von AAC(6')-Ib (PDB Nr. 2bue), kristallisiert mit Ribostamycin (RIB) und Coenzym A (CoA). **(B)** Tertiärstruktur von AAC(6')-Ib11 (in Blau, PDB Nr. 2pr8) in Überlagerung mit AAC(6')-Ib-wt (in Grau, kristallisiert mit Coenzym A (CoA) und Ribostamycin (RIB), PDB Nr. 2bue).

Die Aminoglykosid-Bindestelle von AAC(6')-Ib-wt

AAC(6')-Ib-wt mit Kanamycin (in Rosa, PDB Nr. 1v0c) zeigt, dass Ring III des Aminoglykosids, direkt an der Schleife zwischen $\beta 3/\beta 4$ liegt (160). Die Seitenketten von L96 und S98 dieser Schleife, erlauben die Interaktion von D100 mit S98 (nicht dargestellt) (160). In der Kristallisation von AAC(6')-Ib-wt mit Ribostamycin (in Grau, PDB Nr. 2bue) und mit Paromomycin (in Grün, PDB Nr. 2vqy) sind die Aminoglykoside von der $\beta 3/\beta 4$ -Schleife weggerichtet und D100 weicht in eine andere Richtung (160) (siehe Abbildung 1-7 (A)). Die Aminosäure E73, welche an Ring III (und IV) liegt (160), zeigt je nach Aminoglykosid eine andere Konformation, vergleiche Abbildung 1-7 (B) mit Kanamycin und (C) mit Paromomycin. Für die Visualisierung und Bearbeitung des entstandenen Bildes wurde das Programm UCSF Chimera 1.5.3 unter Windows 7 verwendet.

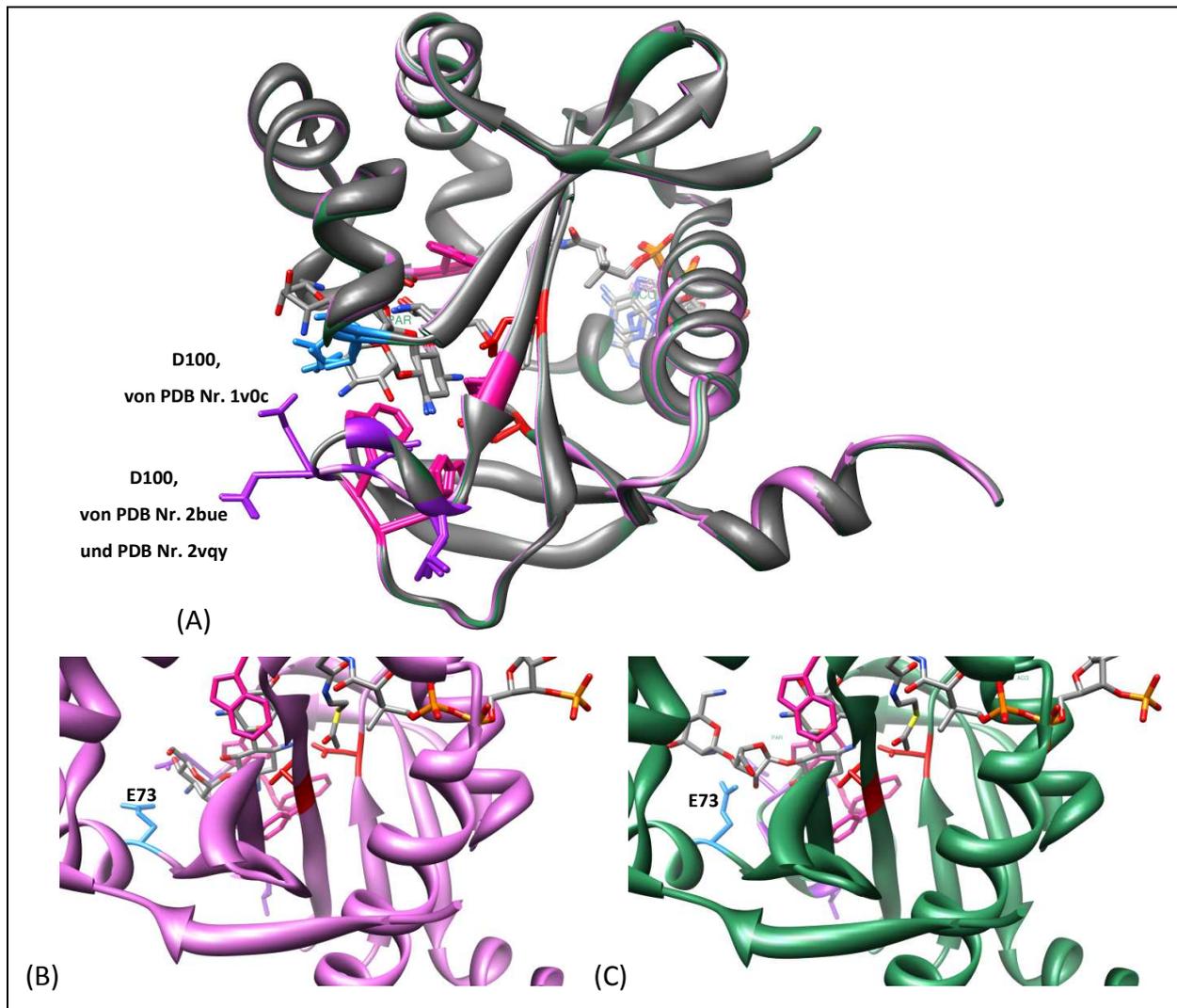


Abbildung 1-7 Darstellung der übereinandergelegten Tertiärstrukturen der ternären Komplexe von (A) AAC(6')-Ib, kristallisiert mit Ribostamycin (in Grau, PDB Nr. 2bue), Kanamycin (in Rosa, PDB Nr. 1v0c) und Paromomycin (in Grün, PDB Nr. 2vqy). Die Aminosäure D100 zeigt in der Kristallstruktur 2bue mit Ribostamycin und 2vqy mit Paromomycin in eine andere Richtung als dieselbe Aminosäure D100 in der Kristallisation mit Kanamycin 1v0c. Tertiärstrukturen von (B) AAC(6')-Ib (PDB Nr. 1v0c) in Rosa, kristallisiert mit Kanamycin (KAN) sowie Acetyl-Coenzym A (ACoA) und (C) AAC(6')-Ib (PDB Nr. 2vqr) in Grün, kristallisiert mit Paromomycin (PAR) sowie Acetyl-Coenzym A (ACoA). Auch die Aminosäure E73 nimmt, je nach Aminoglykosid, eine andere Konformation ein.

In der Aminoglykosid-Bindestelle (auch Akzeptor-Bindestelle genannt) von AAC(6')-Ib-wt befinden sich insgesamt acht Aminosäuren mit sauren Resten, die zu einer negativ geladenen Seite – ideal für die Anziehung und Interaktion von positiv geladenen Aminoglykosiden – führen (160). Die Aminosäuren D115 und D152 (siehe Abbildung 1-8, in Rot dargestellt) der aktiven Seite bilden mit den Ringen I und II Interaktionen, wobei D115 als Protonenakzeptor während der Reaktion funktioniert. D115 interagiert mit der polaren 6'OH-Gruppe des Aminoglykosids, liegt außerdem in idealer Geometrie zur Acetylgruppe

Einleitung

und unterstützt so den direkten Transfer der Acetylgruppe (katalytische Basis der Reaktion) (160). Auch die Aminosäurereste W49 ($\alpha 1'/\alpha 2$ -Schleife) und W102 ($\beta 3/\beta 4$ -Schleife) (siehe Abbildung 1-8, in Pink dargestellt) gehen Interaktionen mit den Ringen I bzw. II ein. Aminosäurerest W103 (siehe Abbildung 1-8, in Pink dargestellt) bildet Hydrogenbindungen mit dem 1-NH₃-Rest von Ring II (160). Die Akzeptor-Bindestelle besitzt eine hochaffine Bindestelle für die strukturellen Eigenschaften der allgemein verwendeten Aminoglykoside, dem 2-Desoxystreptamin-Ring (entspricht Ring II). Fluorchinolone hingegen interagieren nicht mit den gleichen Strukturmerkmalen der Aminoglykoside, Aminosäure W49 beispielsweise interagiert mit dem Piperazinyl-Substituenten (160).

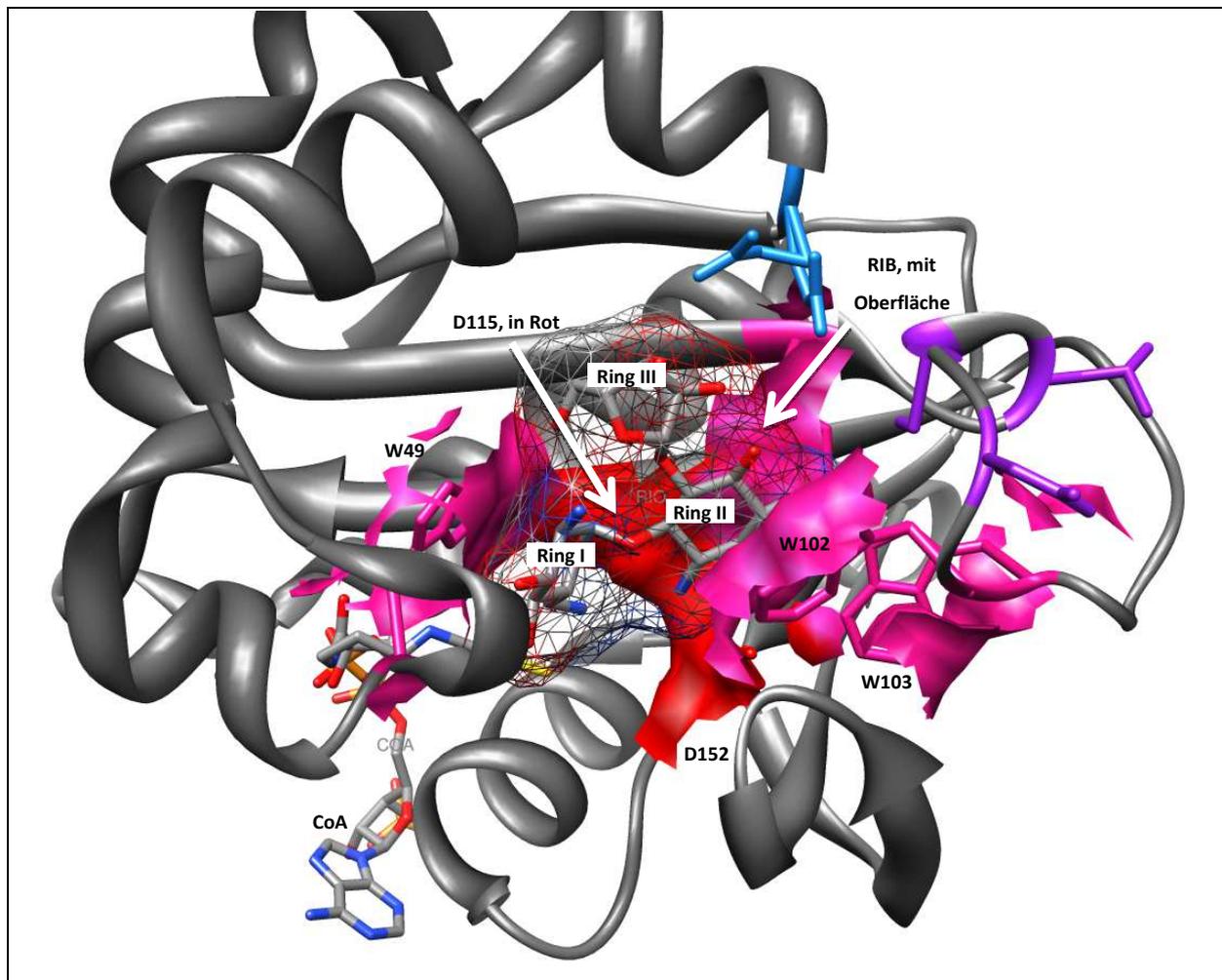


Abbildung 1-8 Darstellung der Tertiärstruktur von AAC(6')-Ib-wt in Kristallisation mit Ribostamycin, bestehend aus Ring I-III mit Oberflächenengitter (RIB) und Coenzym A (CoA). Die Aminosäuren D115 und D152 sind in Rot, die Aminosäuren W49, W102 und W103 sind in Pink, jeweils mit ihrer Oberfläche abgebildet. Für die Visualisierung und Bearbeitung des entstandenen Bildes wurde das Programm UCSF Chimera 1.5.3 unter Windows 7 verwendet.

Ein Unterschied der Enzyme AAC(6')-Ib-wt und AAC(6')-Ib11 ist die Position der Tryptophan-Seitenkette W49. In AAC(6')-Ib-wt wird durch die Interaktion von W49 (Abbildung 1-9 (A), in Pink dargestellt) mit Q116 und L117 (Abbildung 1-9 (A), in Gelb dargestellt) eine α -helikale Lasche geformt, diese fungiert als Deckel. In AAC(6')-Ib11 wird die Interaktion von W49 durch die mutierten Aminosäuren an Position 116/117 (L116/S117) verhindert, sodass die Lasche (α 1'/ α 2-Schleife) hier flexibel bleibt, siehe Abbildung 1-9 (B). Die Aminosäure D115, die auch als katalytische Basis bezeichnet wird, befindet sich direkt neben den mutierten Aminosäuren 116/117, was die duale Spezifität von AAC(6')-Ib-wt gegenüber Gentamicin und Amikacin erklärt (104, 160). Die Werte der minimalen Hemmkonzentration (MHK-Werte) für AAC(6')-Ib liegen bei 0,5 bzw. 16 μ g/ml, für AAC(6')-Ib7/8 bei 2-4 bzw. 1-2 μ g/ml und für AAC(6')-Ib11 bei 8 bzw. 16 μ g/ml, jeweils gegenüber Gentamicin bzw. Amikacin (23).

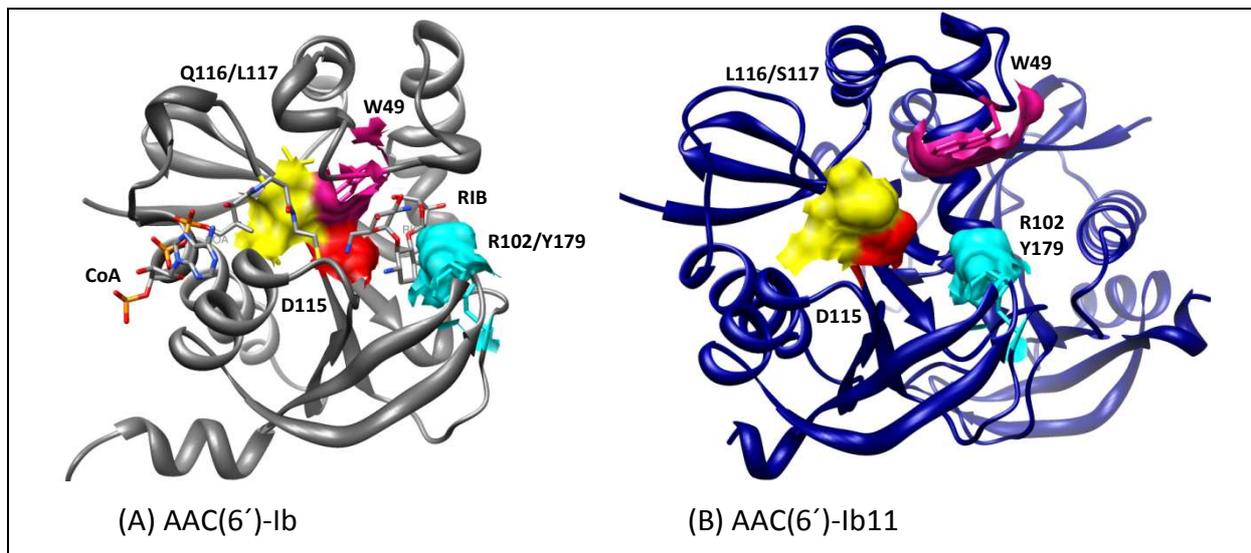


Abbildung 1-9 Vergleich der Tertiärstrukturen von (A) AAC(6')-Ib (PDB Nr. 2bue), kristallisiert mit Ribostamycin (RIB) sowie Coenzym A (CoA) und (B) AAC(6')-Ib11 (PDB Nr. 2pr8), hier als Monomer dargestellt. Die Aminosäuren Q116/L117 bzw. L116/S117 sind in Gelb dargestellt, die Aminosäure W49 in Pink, die Aminosäuren R102 und Y179 sind in Türkis und die Aminosäure D115 ist in Rot dargestellt.

Die Aminosäure Y164 (siehe Abbildung 1-10, in Blau dargestellt) ist in Enzymen der GNAT Superfamilie semikonserviert. Y164 protoniert hier die Sulfhydrylgruppe von Coenzym A (160). Für die Visualisierung und Bearbeitung des entstandenen Bildes wurde das Programm UCSF Chimera 1.5.3 unter Windows 7 verwendet.

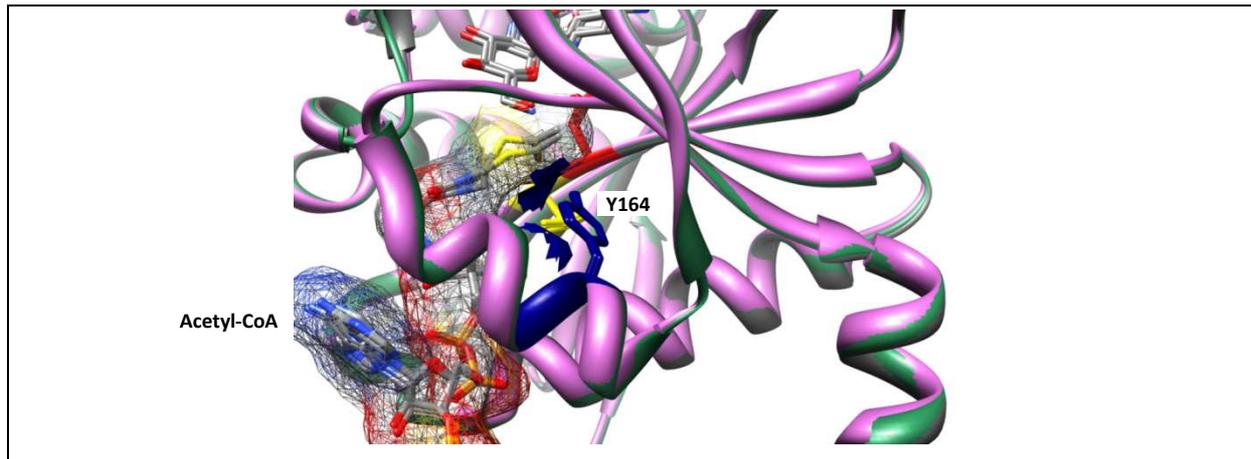


Abbildung 1-10 Darstellung der übereinandergelegten Tertiärstrukturen der ternären Komplexe von AAC(6')-Ib, kristallisiert mit Ribostamycin und Coenzym A (in Grau, PDB Nr. 2bue), Kanamycin und Acetyl-Coenzym A (in Rosa, PDB Nr. 1v0c) und Paromomycin und Acetyl-Coenzym A (in Grün, PDB Nr. 2vqy) mit der Aminosäure Y164, dargestellt in Blau.

In AAC(6')-Ib-wt ist Aminosäure D179 (Abbildung 1-11, Türkis) in der Schleife zwischen β_6 und β_7 lokalisiert. Die Seitenkette von D179 interagiert mit dem Aminoglykosid. Positive Interaktionen finden außerdem zwischen D179 mit Fluorchinolonen statt, jedoch findet eine signifikant bessere Interaktion (π -Stapelwechselwirkungen der p-Orbitale) zwischen der mutierten Aminosäure Y179, in AAC(6')-Ib-cr, mit den Fluorchinolonen statt (104, 160). Die Aminosäure W102 in AAC(6')-Ib-wt (siehe Abbildung 1-11, Türkis) liegt hingegen in der Schleife zwischen β_3 und β_4 , interagiert mit Ring II des Aminoglykosids und mit den Aminosäuren P178 (siehe Abbildung 1-11, Orange) und D179 (siehe Abbildung 1-11, Türkis) (160). Die mutierte Aminosäure R102 in AAC(6')-Ib-cr nimmt den gleichen Platz ein wie W102 und interagiert ebenfalls mit Ring II des Aminoglykosids (160). Die Guanidin-Gruppe von R102 interagiert mit der Ketogruppe ($-C=O$) bzw. dem Carboxylat ($-COO^-$) des Fluorchinolons (104) bzw. interagiert mit dem Tyrosin an Position 179 (160).

Die Mutation D179Y ist verantwortlich für die erhöhte Affinität von AAC(6')-Ib-cr zu Fluorchinolonen. Die Mutation W102R hingegen stabilisiert Konformation des Tyrosins und sorgt für die Aufrechterhaltung der Interaktion der Schleifen β_6/β_7 und β_3/β_4 (160). Die Aminosäureregion G50 bis A54 (siehe Abbildung 1-11, Blau) gehört zu einer hochflexiblen Region, hierbei existieren Van-der-Waals-Wechselwirkungen zwischen G50 und G51 mit dem Pyridin-Ring des Chinolons (160).

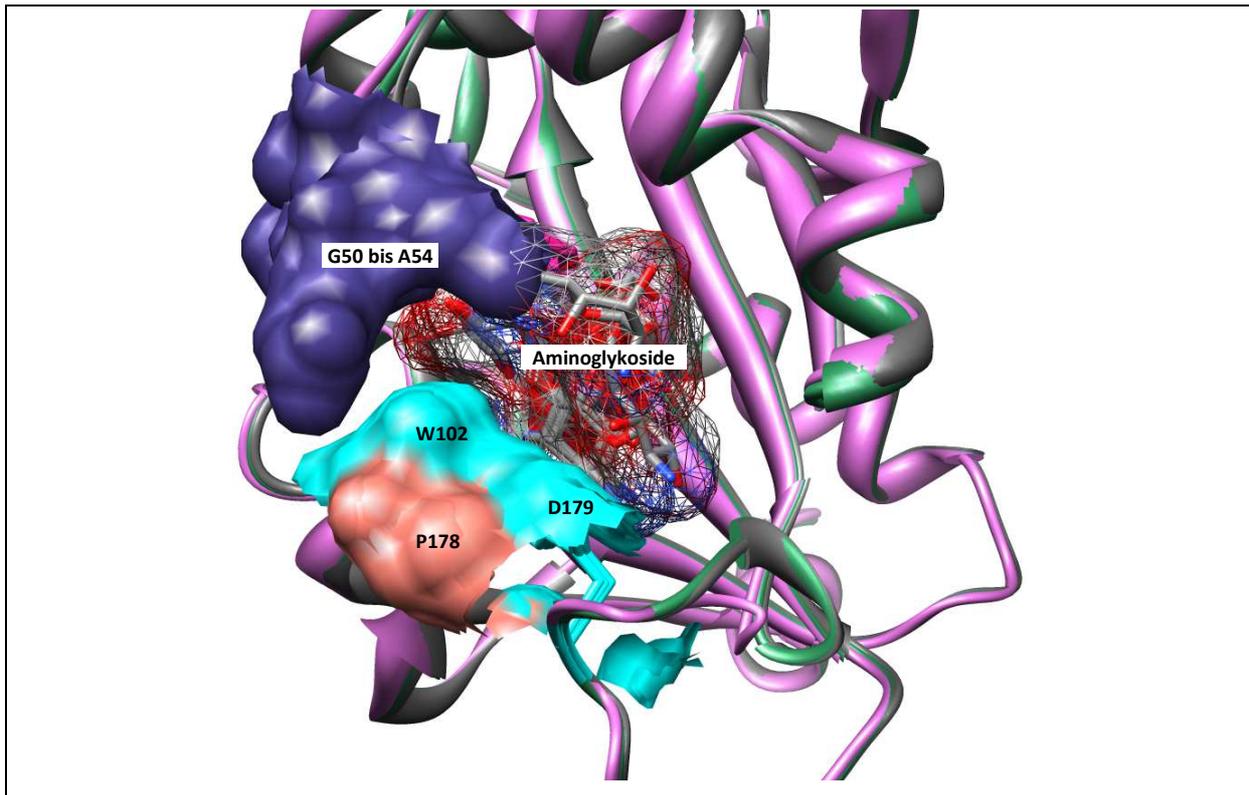


Abbildung 1-11 Darstellung der übereinandergelegten Tertiärstrukturen der ternären Komplexe von AAC(6')-Ib, kristallisiert mit Ribostamycin und Coenzym A (in Grau, PDB Nr. 2bue), Kanamycin und Acetyl-Coenzym A (in Rosa, PDB Nr. 1v0c) und Paromomycin und Acetyl-Coenzym A (in Grün, PDB Nr. 2vqy). Die Aminoglykoside sind mit ihrem Oberflächengitter dargestellt. Die Aminosäureregion G50 bis A51 ist in Blau, die Aminosäuren W102 und D179 sind in Türkis, Aminosäure P178 ist in Orange gezeigt. Die genannten Aminosäuren sind jeweils mit ihren Oberflächen abgebildet. Für die Visualisierung und Bearbeitung des entstandenen Bildes wurde das Programm UCSF Chimera 1.5.3 unter Windows 7 verwendet.

Trotz der funktionalen Vielfalt der Enzyme und der enormen Abweichungen innerhalb der Nukleotid- bzw. der Aminosäuresequenz, sind Sekundär- auch Tertiärstruktur verschiedener Aminoglykosid N-Acetyltransferasen nahezu identisch. Ein Vergleich der Kristallstrukturen von AAC(3)-Ia und AAC(6')-Ii beispielsweise zeigt, dass trotz begrenzter Sequenzhomologie (<15%) die Faltung bemerkenswert ähnlich ist (21). AAC(6')-Ib-wt liegt, wie bereits gezeigt, in monomeren Zustand vor, während sich bei AAC(6')-Ib11 ein Gleichgewicht von monomerer und dimerer Form einstellt, vergleiche Abschnitt 1.3.5.3, Seite 17 (104, 160). Die Kristallstrukturen der Enzyme AAC(3)-Ia (167), AAC(2')-Ic (157), AAC(6')-Ii (168), sowie AAC(6')-Iy (159) enthüllen eine Funktion als Dimer. Das eukaryontische Enzym Hpa2, eine Histon N-Acetyltransferase (HAT), zeigt zum Beispiel eine tetramere Struktur (7), dabei ist AAC(6')-Iy strukturell gesehen in höchsten Maße identisch mit der *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) HAT Hpa2 (159).

1.3.6 Die Aminoglykosid 6'-N-Acetyltransferasen Typ Iy

1.3.6.1 Bedeutende Merkmale der Tertiärstruktur von AAC(6')-Iy

AAC(6')-Iy aus *S. enterica* acetyliert regioselektiv 6'-Amin-Aminoglykoside (97, 159). Von AAC(6')-Iy ist bekannt, dass es außerdem die Acetyl-CoA abhängige selbst- α -N-Acetylierung katalysiert und eukaryontische Histon-Proteine sowie das 21 Aminosäure große, N-terminale Peptid des humanen H3 Histons acetyliert (159). Das Histon H3 wird in der Regel von Histon N-Acetyltransferasen (z. B. Hpa2) acetyliert (7).

In einem AAC(6')-Iy-Monomer sind neben den bekannten fünf konservierten Motiven A-D der GNAT Superfamilie, insgesamt drei weitere Motive E-G bekannt, siehe Abbildung 1-12 (97). Die in AAC(6')-I-konservierten Tryptophanreste W14, W22 und W103 sind hier ebenfalls vorhanden, wobei sich W103 in der prognostizierten Acetyl-KoA-Bindestelle befindet (63). Die Position C109 ist in 12 AAC(6')-I Enzymen konserviert, ebenso C70, welche in den gleichen 12 Enzymen entweder einem Cystein (C) oder einem Threonin (T) entspricht (97). Bei einer Untersuchung von AAC(6')-Iy mit Tobramycin beeinflusste die Mutation C109A allein jedoch nicht die Bindungsparameter, während eine Doppelmutation C109A/C70A die Bindung der Aminoglykoside deutlich stört (97). Die Bindung von Acetyl-CoA wird von den Mutationen nicht beeinflusst (63). Aminosäure D115 wird, wie in AAC(6')-Ib, als generelle Base der Reaktion beschrieben (97, 159).

			Motiv A				
1	MDIRQMNKTH	LEHWRGLRKQ	LWPGHPDDAH	LADGEEILQA	DHLASFIAMA		
		Motiv E	Motiv B		Motiv C		
51	DGVAIGFADA	SIRHDYVNGC	DSSPVVFLEG	IFVLPSFRQR	GVAKQLIAAV		
		Motiv F	Motiv D	Motiv G			
101	QRWGTNKGCR	EMASDTSPEN	TISQKVHQAL	GFEETERVIF	YRKRC*		

Abbildung 1-12 Aminosäuresequenz der Aminoglykoside 6'-N-Acetyltransferase Typ Iy (AAC(6')-Iy) des *Salmonella enterica* Stammes BM4362 (Protein-Accession Nr. AAF03532), 145 aa (*amino acid*).

Grau hinterlegt sind die Motive A, E, B, C, F, D und G. Das rote L signalisiert die Zugehörigkeit zu Motiv D bzw. E. In Türkis hinterlegt sind die Aminosäuren Y66, E79 und E136. H25 ist in Pink markiert. In Rot markiert ist die Aminosäure D115. Die Tryptophanreste W14, W22 und W103 sind in Gelb markiert. In Grün markiert sind die Aminosäuren C70 und C109. Unterstrichen ist die prognostizierte Acetyl-KoA-Bindestelle.

Die katalytisch aktive Form von AAC(6')-ly ist ein Dimer, das von zwei identischen Monomeren gebildet wird (siehe Abbildung 1-13, Kette A in Schwarz, Kette B ist in Grün dargestellt). Es entsteht ein kontinuierliches β -Faltblatt aus β 1-6 des einen Monomers und β 6'-1' des benachbarten Monomers, hierbei ragt β 6 des einen zwischen die β -Faltblätter β 5' und β 6' des anderen Monomers (159). Für die Visualisierung und Bearbeitung des entstandenen Bildes wurde das Programm UCSF Chimera 1.5.3 unter Windows 7 verwendet.

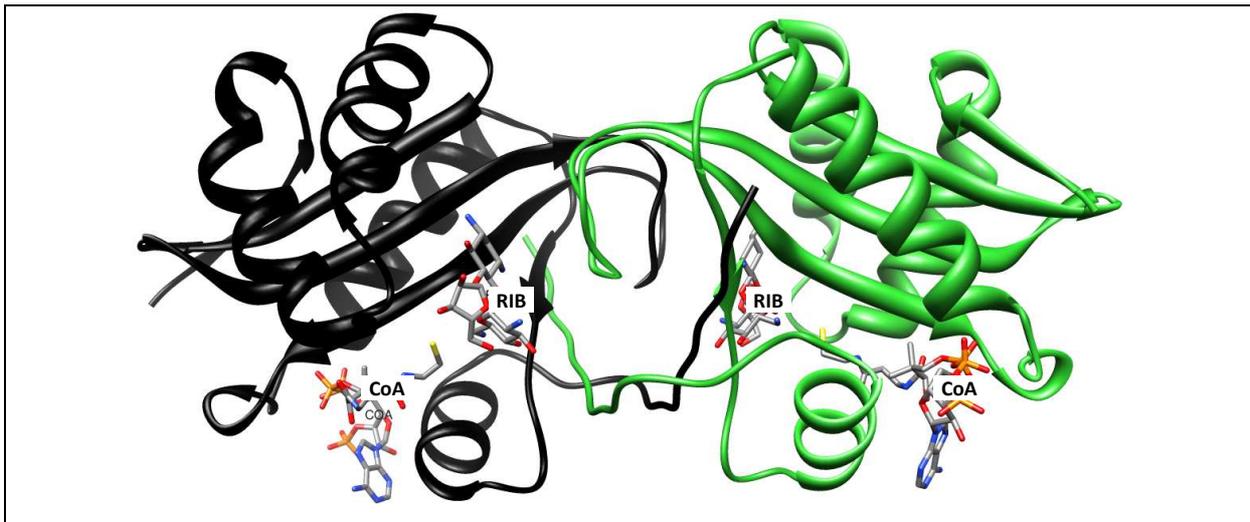


Abbildung 1-13 Tertiärstruktur von AAC(6')-ly (PDB Nr. 1s3z), kristallisiert mit Ribostamycin (RIB) und Coenzym A (KoA). Kette A ist in Schwarz dargestellt, Kette B ist in Grün dargestellt.

Betrachtet man die Bindung von Coenzym A und Ribostamycin in einem Monomer von AAC(6')-ly, so liegt das 6'-Amin nahe am Schwefelatom des KoAs, was zur Regioselektivität des Enzyms passt und die chemische Notwendigkeit für den Acetyltransfer darstellt (159). Bei der Acetylierungsreaktion greift das Amin direkt nukleophil das Thioester an (97).

Der Imidazolring von H25 (siehe Abbildung 1-14, in Lila markiert) ist mit dem Ribosering von Ribostamycin verbunden. Die aromatischen Ringe von W22 und Y66' (siehe Abbildung 1-14, in Türkis markiert) liegen ober- und unterhalb des gebundenen Aminoglykosids. Die Schleifen α 1/ α 2 (Kette A) und β 3'/ β 4' (Kette B) die die Aminosäuren W22 bzw. Y66' lokalisiert sind, sind flexibel und erlauben somit verschiedenen Aminoglykosiden die Bindung, was wiederum die breite Substratspezifität von AAC(6')-ly erklärt (159).

Die Amino- und Hydroxylgruppen des primären und zentralen Desoxystreptamin-Rings sind in direktem Kontakt mit den Carboxylseitenketten von E79 (siehe Abbildung 1-14, in Türkis dargestellt), D115 (siehe Abbildung 1-14, in Rot dargestellt) und E136' (siehe Abbildung 1-14, in Türkis dargestellt), was zur negativen Ladung des aktiven Zentrums führt (159). Im aktiven

Einleitung

Zentrum, das durch einen langen anionischen Kanal an der Schnittstelle des einen Monomers und des anderen Monomers` gebildet wird, können Aminoglykoside und Peptide binden (159). Das 6´Amin von Ribostamycin ist über eine Hydrogenbindung mit einem Wasser-Molekül verbunden. Das Wasser-Molekül ist über eine weitere Hydrogenbindung mit dem Carbonylrest des Rückgrates von D115 verbunden, was dafür spricht, dass D115 als zentrale Base interagiert (159). Vermutlich wird das Amin über das Wasser-Molekül deprotoniert, während des nukleophilen Angriff wird dann das Thiolatanion protoniert (159).

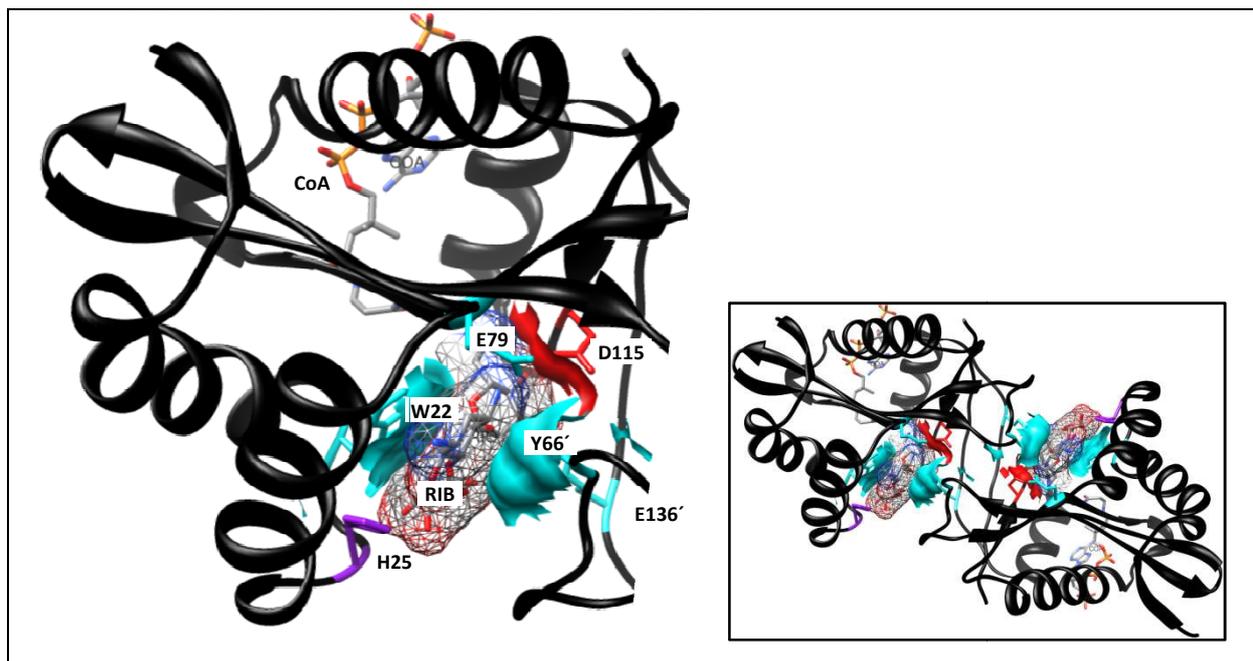


Abbildung 1-14 Fokussierung der Tertiärstruktur von AAC(6´)-ly (PDB Nr. 1s3z) Kette A, kristallisiert mit Ribostamycin (RIB) und Coenzym A (KoA). Ribostamycin ist mit seinem Oberflächengitter dargestellt. Die Aminosäuren W22 und Y66 sind in Türkis mit ihrer Oberfläche dargestellt, Aminosäure E79 und E136 sind in Türkis markiert. Die zentrale Aminosäure D115 ist in Rot markiert, in Lila ist die Aminosäure H25 dargestellt. Für die Visualisierung und Bearbeitung des entstandenen Bildes wurde das Programm UCSF Chimera 1.5.3 unter Windows 7 verwendet.

1.3.6.2 Vergleich der Tertiärstruktur von AAC(6´)-ly und der Histon N-Acetyltransferase Hpa2

Das aktive Dimer von AAC(6´)-ly ist strukturell ähnlich zur Histon N-Acetyltransferase Hpa2 (siehe Abbildung 1-15), trotz einer Sequenzidentität der primären Sequenz von 19,6 % (159). Hpa2 bildet ebenfalls ein stabiles Dimer in Lösung und ein Tetramer bei der Bindung mit Acetyl-Coenzym A (AKoA) (7). Für die Visualisierung und Bearbeitung des entstandenen Bildes wurde das Programm UCSF Chimera 1.5.3 unter Windows 7 verwendet.

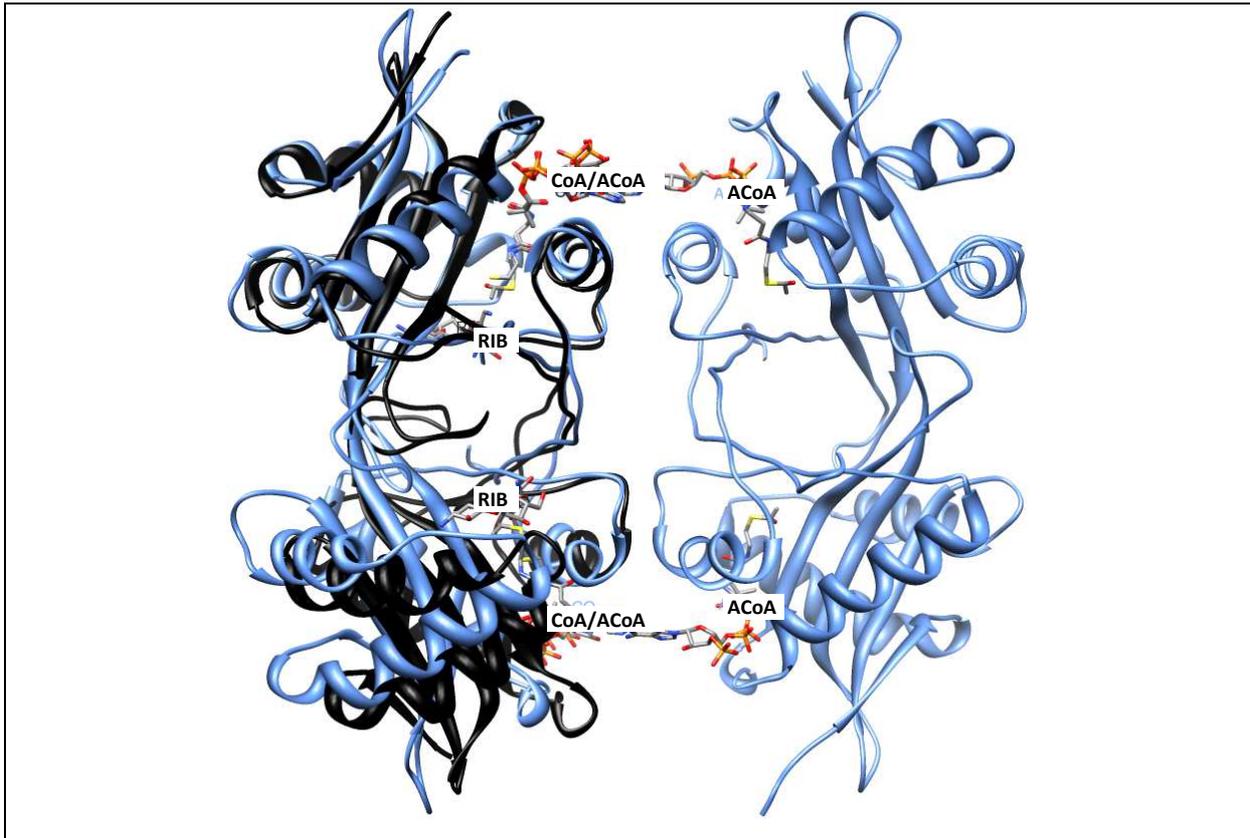


Abbildung 1-15 Darstellung der übereinandergelegten Tertiärstrukturen des ternären Komplexes von AAC(6')-ly, kristallisiert mit Ribostamycin (RIB) und Coenzym A (CoA) in Schwarz (PDB Nr. 1s3z) und Hpa2, kristallisiert mit Acetyl-CoA (ACoA) in Blau (PDB Nr. 1qsm).

Wie in AAC(6')-ly, wird das Hpa2 Dimer von zwei identischen Untereinheiten gebildet, inklusive des Austauschs des Faltblattes β_6 (159). Identisch sind auch die Bindung der Aminoglykoside bzw. Peptide und die negative Oberfläche der Dimer-Schnittstelle. Ein Hauptunterschied ist jedoch eine Deletion von drei Aminosäuren in Hpa2 in der Schleife zwischen β_3 und β_4 (159).

Wie bereits unter 1.3.6.1 beschrieben ist von AAC(6')-ly bekannt, dass es die Acetyl-CoA abhängige selbst- α -N-Acetylierung katalysiert und auch eukaryontische Histon-Proteine sowie humane H3 N-terminale Peptide acetyliert. Dadurch wird vermutet das die Aminoglykosid 6'-N-Acetyltransferase Typ ly der evolutionäre Vorgänger der eukaryontischen Histon N-Acetyltransferase ist (159). *In vitro* acetyliert Hpa2 aus Hefen spezifisch Lysinreste der Histone H3 und H4, mit einer Vorliebe für K14 von Histon H3 (7).

1.4 Zielstellung

Aus den zuvor dargelegten Fakten und in Anbetracht der enormen therapeutischen Bedeutung der (Fluor)chinolone sowie aufgrund der Zunahme von plasmidkodierten Resistenzmechanismen gegen Fluorchinolone in Kombination mit bereits vorhandenen chromosomalen Resistenzmechanismen, ergaben sich folgende Zielstellungen der Arbeit.

Zum einen sollte geklärt werden, wie wirksam Fluorchinolone der neuesten Generation, wie zum Beispiel Finafloxacin, gegenüber bekannten chromosomalen und plasmidkodierten Resistenzmechanismen im Vergleich zu älteren Fluorchinolonen wie Ciprofloxacin, Levofloxacin oder Moxifloxacin arbeitet und weiterhin, inwieweit der pH-Wert des umgebenden Milieus die Aktivität des „neuen“ im Vergleich mit den „alten“ (Fluor)chinolonen beeinflusst. Die nahezu perfekte Homologie von *aac(6′)-Ib* und *aac(6′)-Ib-cr* legt nahe, dass letztere aus der ursprünglichen Form durch zwei Punktmutationen, die jeweils zum Aminosäureaustausch führten, entstanden ist. Plausibel dafür anzunehmen ist außerdem, dass die Mutationen nacheinander erworben wurden. Die Variante AAC(6′)-Ib-cr wurde bisher nur mit beiden Veränderungen (W102R und D179Y) gefunden, obwohl Vorversuche gezeigt hatten, dass *in vitro* erzeugte Einzelmutanten bereits bei einer D179Y-Mutation einen um zwei Verdünnungsstufen erhöhten MHK-Wert von Ciprofloxacin besitzen (124). Aus diesem Grund sollte untersucht werden, in welcher Reihenfolge die Mutationen an den Positionen 102 bzw. 179 entstanden und wie der Selektionsdruck dafür ausgesehen haben könnte. Da von dem Enzym AAC(6′)-I über 30 natürlich vorkommende Varianten existieren, die sehr hohe Übereinstimmungen in Sekundär- und Tertiärstruktur untereinander zeigen, ergibt sich die Frage, ob sich aus einem anderen Subtyp einer Aminoglykosid N-Acetyltransferase (beispielsweise AAC(6′)-Iy) eine AAC(6′)-Ib-cr-analoge Modifikation entwickeln kann, die das Substratspektrum ebenso variiert. Da Acetyltransferasen auch eine wichtige Rolle bei der Regulation der Genaktivität in eukaryontischen Zellen spielen, indem zum Beispiel Histone modifiziert werden und da bereits vermutet wurde, dass AAC(6′)-Iy der evolutionäre Vorgänger der eukaryontischen Histon N-Acetyltransferase ist, dient die Entwicklung einer AAC(6′)-Ib-cr-analogen Modifikation darüber hinaus als Modell für andere Vertreter aus der Gruppe der GCN5-verwandten N′-Acetyltransferasen. Hieraus lässt sich nicht nur das Risiko für die Entwicklung von Breitspektrumresistenzen ableiten, sondern auch eine Prognose für die „Lebensdauer“ von neuen Fluorchinolonen in der klinischen Anwendung.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien

Tabelle 2-1 Geräte und Verbrauchsmaterialien, die in der vorliegenden Arbeit verwendet wurden.

Geräte / Verbrauchsmaterialien	Hersteller
Autoklav, Systec 3870 ELV	Systec GmbH, Wetttenberg
Autoklav, Systec Media prep [®]	Systec GmbH, Wetttenberg
Biometra, Multigel-Long [®] , Gelkammer für Proteinseparation	Analytik Jena AG (Biometra), Jena
Brutschrank, Heraeus Function line	Heraeus Holding GmbH, Hanau
Dosierschlauchpumpe, Dosierfix	Welatec Labortechnik GmbH, Marktheidenfeld
Einmal-Spritzen, Omnifix, 10 ml und 5 ml	Merck, Darmstadt; VWR
Gelelektrophoresekammer 100 ml, ComPhor Midi	Bioplastics BV, Landgraaf, Niederlande
Gelelektrophoresekammer 400 ml, ComPhor Mt Maxi	Bioplastics BV, Landgraaf, Niederlande
Gelelektrophoresekammer 50 ml, ComPhor Mini	Bioplastics BV, Landgraaf, Niederlande
Glasperlen	Bastelzubehör, farbecht
Glasstäbe (steril)	Glasbläser
heizbare Vakuumpumpe	Analytik Jena AG (Biometra), Jena
Impföse	VWR
LabMate, 0,5-10 µl Pipette	Abimed GmbH, Langenfeld
LabMate, 1000 µl Pipette	Abimed GmbH, Langenfeld
LabMate, 10-100 µl Pipette	Abimed GmbH, Langenfeld
Labopette elektronik 50-1000 µl, automatische Pipettierhilfe Multistep, 1-Kanal	Hirschmann, Eberstadt
Labopette elektronik 50-1200 µl, automatische Pipettierhilfe Multistep, 8-Kanal	Hirschmann, Eberstadt
Luminometer, Lucy 2	Anthos Labtec Instruments GmbH, Wals/Salzburg, Austria
Mikrotiterplatten, 96 well, U-Form	VWR
NucleoSpin [®] Extract II, Extraktion/Reinigung von PCR-Fragmenten	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren
Nytran [®] , SPC, 0.45 Nylonmembran	Whatman [®] , über Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim

Material und Methoden

Geräte / Verbrauchsmaterialien	Hersteller
PCR, Biometra T Gradient	Analytik Jena AG (Biometra), Jena
PCR, Biometra T personal	Analytik Jena AG (Biometra), Jena
PCR, Biometra T3	Analytik Jena AG (Biometra), Jena
Petrischalen mit Nocken	Sarstedt, Nümbrecht
pH-Meter	inolab Wissenschaftlich-Technische Werkstätten GmbH (WTW), Weilheim
Photometer, Varian Cary 50 Spectrophotometer	Varian, Australien
Probenröhrchen + Schraubverschlüsse, CryoPure Tubes	Sarstedt, Nümbrecht
Probenröhrchen 0,2 ml, Multiply® -Pro	Sarstedt, Nümbrecht
Probenröhrchen 0,5 ml, Multiply® -Pro	Sarstedt, Nümbrecht
Probenröhrchen 1,5 ml, SafeSeal Micro Tubes	Sarstedt, Nümbrecht
Probenröhrchen 15 ml,	Sarstedt, Nümbrecht
Probenröhrchen 2 ml SafeSeal Micro Tubes	Sarstedt, Nümbrecht
Probenröhrchen 50 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Rührer, MR3001	Heidolph, Schwabach
Rührer, RCT basic IKAMAG® safety control	IKA®-Werke GmbH & CO. KG, Staufen
Schüttelinkubator, Certomat® H	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Schüttelinkubator, New Brunswick Scientific, C25	Eppendorf Vertrieb Deutschland GmbH, New Brunswick Produkte, Wesseling-Berzdorf
Sequenzierung GenomeLab™ GeXP	Beckman & Coulter, Krefeld
Spannungsgeber, Consort E 143	Biozym Diagnostik GmbH, Hess. Oldendorf
Spectrophotometer, NanoDrop ND-1000	ThermoFisher Scientific, NanoDrop products, Wilmington, USA
Sterilfilter, Minisart 0,2 µm, 26 mm	Sartorius AG, Göttingen
Sterilisator	Heraeus Holding GmbH, Hanau
Transferpette®-8, 5-50µl, Pipettierhilfe, 8-Kanal	Brand GmbH + Co. KG, Wertheim
Ultraschallbad, Merck Eurolab N.V. USR 18	Merck, Darmstadt
Ultraschallstab mit Sonotrode, Sonopuls	BANDELIN electronic GmbH & Co. KG, Berlin
Vortexer, Vortex-Genie 2	Scientific Industries, Inc., New York, USA
Waage, Kern PLJ 2100-2M	Kern & Sohn GmbH Balingen-Frommern
Waage, Sartorius LA120S	Sartorius AG, Göttingen
Wasserbad, Julabo MWB	JULABO Labortechnik GmbH, Seelbach
Wasserbad, Julabo MWB	JULABO Labortechnik GmbH, Seelbach
Wasserbad, Julabo Shake Temp SW 22	JULABO Labortechnik GmbH, Seelbach
Werkbank, Heraguard®	Heraeus Holding GmbH, Hanau

Geräte / Verbrauchsmaterialien	Hersteller
Werkbank, Herasafe®	Heraeus Holding GmbH, Hanau
Whatman® Papier, Gel Blot Paper, GB003	Whatman®, über Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Zentrifuge, Biofuge stratos Thermo Electron corporation	Heraeus Holding GmbH, Hanau
Zentrifuge, Microfuge® 16	Beckman & Coulter, Krefeld
Zentrifuge, Pico 11 Centrifuge Thermo Electron	Heraeus Holding GmbH, Hanau

2.1.2 Software

Tabelle 2-2 In der vorliegenden Arbeit verwendete Software.

Anwendung	Hersteller
Lucy Soft (Version 1.6)	Anthos Labtec Instruments GmbH, Wals/Salzburg, Austria
NanoDrop ND-1000 V3.5.2	ThermoFisher Scientific, NanoDrop products, Wilmington, USA
UCSF Chimera Version 1.5.3	University of California, San Francisco
Varian Cary Series WinUV	Varian, Australien
Vector NTI Advance™ 11	Invitrogen™, Karlsruhe
VisionCapt	Vilber Lourmat Bio Version
EndNote X4	Thomson Reuters

2.1.3 Medien und Agar

Sowohl Medien als auch Agar (siehe Tabelle 2-3) wurden nach dem Lösen bei 121 °C, 1 bar Überdruck für 15 min autoklaviert. Zur Herstellung antibiotikahaltiger Agar-Platten wurde dem Agar nach dem Autoklavieren und Abkühlen auf etwa 50 °C die Antibiotikallösung in entsprechender Konzentration zugesetzt.

Tabelle 2-3 In der vorliegenden Arbeit verwendete Medien und Agar.

Medien / Agar	Hersteller	Herstellung
Chinablau-Agar	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe	nach Herstellerangaben
LB-Agar	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe	nach Herstellerangaben
Luria/Miller (LB-Medium)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe	nach Herstellerangaben
MH-Agar	Merck, Darmstadt	nach Herstellerangaben

Material und Methoden

Medien / Agar	Hersteller	Herstellung
Mueller-Hinton Bouillon (MH-Medium)	Difco™, Lawrence Kansas, USA / Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe	nach Herstellerangaben
SOB Medium	0,5 % Hefeextrakt. 2 % Trypton, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl ₂ , 10 mM MgSO ₄ , pH 6,8 – 7	Eigenherstellung
SOC Medium	0,5 % Hefeextrakt. 2 % Trypton, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl ₂ , 10 mM MgSO ₄ , 20 mM Glucose	Eigenherstellung
Standard I-Nährbouillon (NI-Medium)	Merck, Darmstadt	nach Herstellerangaben
Standard Nähragar I (NI-Agar)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe	nach Herstellerangaben

2.1.4 Enzyme

Tabelle 2-4 In der vorliegenden Arbeit verwendete Enzyme und Puffer.

Enzym	Puffer / Beschreibung	Hersteller
Thermosensitive Alkaline Phosphatase, FastAP™	10 x FastAP™ Buffer	Fermentas GmbH, St. Leon-Roth
Antarktische Phosphatase	10 x Antarctic Phosphatase Reaction Buffer	New England Biolabs (NEB), Frankfurt am Main
<i>DpnI</i>	FastDigest®, 10 x FastDigest® Buffer	Fermentas GmbH, St. Leon-Roth
DreamTaq™ DNA Polymerase	10 x DreamTaq™ Buffer	Fermentas GmbH, St. Leon-Roth
<i>EcoR1</i>	FastDigest®, 10 x FastDigest® Buffer	Fermentas GmbH, St. Leon-Roth
Exonuklease I	<i>E. coli</i> , 10 x reaction Buffer for Exonuklease I	Fermentas GmbH, St. Leon-Roth
<i>FokI</i>	FastDigest®, 10 x FastDigest® Buffer	Fermentas GmbH, St. Leon-Roth
<i>HindIII</i>	10 x NE Buffer 2	New England Biolabs (NEB), Frankfurt am Main
<i>HinfI</i>	FastDigest®, 10 x Buffer R	Fermentas GmbH, St. Leon-Roth
Lysozym	-	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
<i>NdeI</i>	FastDigest®, 10 x FastDigest® Buffer	Fermentas GmbH, St. Leon-Roth
Phusion™ High-Fidelity DNA Polymerase	5 x HF Buffer, 5 x GC-Buffer	Finnzymes, Espoo, Finnland
Quick Start Mix aus GenomeLab™ DTCS Quick Start Kit	Sequencing Reaction Buffer aus GenomeLab™ DTCS Quick Start Kit	Beckman & Coulter, Krefeld
RNase A	-	Qiagen GmbH, Hilden

Enzym	Puffer / Beschreibung	Hersteller
T4 DNA Ligase	10 x T4 DNA Ligase Buffer	Fermentas GmbH, St. Leon-Roth, New England Biolabs (NEB), Frankfurt am Main
Taq DNA Polymerase	10 x ThermoPol Buffer	New England Biolabs (NEB), Frankfurt am Main

2.1.5 Chemikalien, Lösungsmittel, fertige Puffer und Reagenzien

Tabelle 2-5 In der vorliegenden Arbeit verwendete Chemikalien, Lösungsmittel, fertige Puffer und Reagenzien.

Chemikalien	Hersteller
β-Mercaptoethanol	Merck, Darmstadt
1-Butanol	Merck, Darmstadt
6-Aminocapronsäure	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Agar-Agar	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
BCIP/Puffer Lösung (10 x) (5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl Phosphat)	Invitrogen™, Karlsruhe
Bovine Serum Albumin (BSA)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Bromphenolblau	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Calciumchlorid-Dihydrat	Merck, Darmstadt
Cell Culture Lysis Reagent (CCLR) aus Luciferase Assay System	Promega GmbH, Mannheim
Comassie Brilliant R-250	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg
D(+)-Glukose-Monohydrat	Merck, Darmstadt
dATP (100 mM/l)	Invitrogen™, Karlsruhe
dCTP (100 mM/l)	Invitrogen™, Karlsruhe
dGTP (100 mM/l)	Invitrogen™, Karlsruhe
Di-Kaliumhydrogenphosphat (K ₂ HPO ₄)	Merck, Darmstadt
Di-Methylsulfoxid (DMSO)	Merck, Darmstadt
dTTP (100 mM/l)	Invitrogen™, Karlsruhe
EB-Puffer (Elution Buffer)	Qiagen GmbH, Hilden
EDTA (Titriplex III®)	Merck, Darmstadt
ELU-Buffer aus NucleoBond® Xtra Midi Kit	MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG, Düren
Elution-Buffer aus Hi Yield® Plasmid Mini DNA-Kit	SÜD-LABORBEDARF GMBH, Gauting

Material und Methoden

Chemikalien	Hersteller
EQU-Buffer aus NucleoBond® Xtra Midi Kit	MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG, Düren
Essigsäure 100 % p.a. (Eisessig)	Merck, Darmstadt
Ethanol (96 %)	Merck, Darmstadt
Ethanol abs. (98 %)	Merck, Darmstadt
Glucose Monohydrat	Merck, Darmstadt
Glycin	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Glykogen	Fermentas GmbH, St. Leon-Roth
Glykogen aus GenomeLab™ DTCS Quick Start Kit	Beckman & Coulter, Krefeld
Glycerin (87 %)	Merck, Darmstadt
Glycerin (99 %)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Hefeextrakt, granuliert	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
IPTG (Isopropyl-1-Thio-β-D-Galactopyranosid)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Kaliumacetat	Merck, Darmstadt
Laktose-Monohydrat	Merck, Darmstadt
Luciferase Assay Reagent (LAR) (Luciferase Assay Buffer und Luciferase Assay Substrat) aus Luciferase Assay System Kit	Promega GmbH, Mannheim
LYS-Buffer aus NucleoBond® Xtra Midi Kit	MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG, Düren
Magermilchpulver (Bio)	Heirler Cenovis GmbH, Radolfzell
Magnesiumchlorid Hexahydrat	Merck, Darmstadt
Methanol	Hausabfüllung
Natriumacetat	Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid-Plättchen	Grüssing GmbH, Filsum
NBT Lösung (10 x) (Nitroblue tetrazolium salt)	Invitrogen TM, Karlsruhe
NE-Buffer (Elutionspuffer) aus NucleoSpin® Extract II	MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG, Düren
NEU-Buffer aus NucleoBond® Xtra Midi Kit	MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG, Düren
N-N Dimethylformamid (DMF)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
NT3-Buffer aus NucleoSpin® Extract II	MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG, Düren
NT-Buffer aus NucleoSpin® Extract II	MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG, Düren

Chemikalien	Hersteller
ortho-Phosphorsäure 85%	Merck, Darmstadt
PD1-Buffer aus Hi Yield® Plasmid Mini DNA-Kit	SÜD-LABORBEDARF GMBH, Gauting
PD2-Buffer aus Hi Yield® Plasmid Mini DNA-Kit	SÜD-LABORBEDARF GMBH, Gauting
PD3-Buffer aus Hi Yield® Plasmid Mini DNA-Kit	SÜD-LABORBEDARF GMBH, Gauting
Phe-Arg β -Naphthyl-amid Dihydrochlorid, Effluxpumpeninhibitor (EPI)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Phenol/Chloroform/IAA (25:24:1)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Polysucrose	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
RES-Buffer aus NucleoBond® Xtra Midi Kit	MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG, Düren
Salzsäure 35-38 % z. A.	Th. Geyer GmbH & Co. KG, Renningen
SLS (Formamid)	GenomeLab™ DTCS Quick Start Kit, Beckman & Coulter, Krefeld
SLS aus GenomeLab™ DTCS Quick Start Kit	Beckman & Coulter, Krefeld
Sodium Dodecyl Sulfat (SDS), 10 %	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Tris-Base	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
W1-Buffer aus Hi Yield® Plasmid Mini DNA-Kit	SÜD-LABORBEDARF GMBH, Gauting
Wash-Buffer aus Hi Yield® Plasmid Mini DNA-Kit	SÜD-LABORBEDARF GMBH, Gauting
WASH-Buffer aus NucleoBond® Xtra Midi Kit	MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG, Düren
X-Gal	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Xylencyanol	Merck KGaA, Darmstadt

2.1.6 Antikörper

Tabelle 2-6 In der vorliegenden Arbeit verwendete Antikörper.

Name	Hersteller
Anti-His (Cterm)/AP Ab	Invitrogen™, Karlsruhe

Material und Methoden

2.1.7 Antibiotika

Tabelle 2-7 In der vorliegenden Arbeit verwendete Antibiotika mit Lösemittel und Herstellerangaben.

Name	Lösemittel / Bemerkung	Hersteller
Amikacin Base	A. dest	Bristol-Myers Squibb GmbH & Co. KGaA, München
Ampicillin	A. dest	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Chloramphenicol	50 % Ethanol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Ciprofloxacin HCl	A. dest	Bayer Business Services GmbH, Leverkusen
Finafloxacin-HCl	A. dest	MerLion Pharmaceuticals GmbH, Berlin
Gentamicin Sulfid Salz	A. dest	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Kanamycin	A. dest	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Levofloxacin	A. dest, dunkel aufbewahren	Sanofi-Aventis Deutschland GmbH, Frankfurt
Moxifloxacin	A. dest	Bayer Business Services GmbH, Leverkusen
Nalidixinsäure-Na	A. dest, wenig NaOH	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Norfloxacin	A. dest, wenig NaOH	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Rifampicin	100 % DMSO	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Tetrazyklin	50 % Ethanol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim

2.1.8 Oligonukleotide

Die in Tabelle 2-8 bis Tabelle 2-16 verwendeten Oligonukleotide wurden ausschließlich von Invitrogen™, Karlsruhe bezogen.

Tabelle 2-8 Oligonukleotide zum Nachweis und zur Klonierung von *qnrA*.

Verwendung	Name	Sequenz 5'-3'	Referenz
Nachweis	qnrA_fw_5`_+24	TCAGCAAGAGGATTTCTCA	(164)
Nachweis	qnrA_rv_3`_+650	GGCAGCACTATGACTCCCA	(164)
Klonierung	HindIII_Martinez for 8722	ATACAAGCTTCGGCAGTTAAAATTGGGGCT	(128), modifiziert
Klonierung	HindIII_Martinez rev 9627	ATACAAGCTTGACCAGACTGCATAAGCAACAC	(128), modifiziert
SSM-PCR	pUC19-qnrA1-del-lacZ- for_+1382	CTTTATCAATAATATCCATAGCTGTTTCCTGTGTGAAATTG	diese Arbeit
SSM-PCR	pUC19-qnrA1-del- LacZ-rev_+1159	ATGGATATTATTGATAAAGTTTTTCAGCAAGAGGATTTCTCA	diese Arbeit

Tabelle 2-9 Oligonukleotide zum Nachweis und zur Klonierung von *qnrS*.

Verwendung	Name	Sequenz 5'-3'	Referenz
Nachweis	qnrS1-3_NE_for (30)	ATGGAAACCTACMRTCAYACA	diese Arbeit
Nachweis	qnrS1-3_NE_rev (30)	YTAGTCAGGAWAAACAACAAT	diese Arbeit
Klonierung	qnrS_NE_HindIII_for	ATACAAGCTTGATGGAAACCTACAATCATACA	diese Arbeit
Klonierung	qnrS_NE_HindIII_rev	ATACAAGCTTTTAGTCAGGATAAACAACAAT	diese Arbeit
SSM-PCR	pUC19-qnrS-del-LacZ- for_+1134	GTATGATTGTAGGTTCCATAGCTGTTTCCTGTGTGAAATTG	diese Arbeit
SSM-PCR	pUC19-qnrS-del-LacZ- rev_+1110	ATGGAAACCTACAATCATACATATCGGCACCACAACCTTTTC	diese Arbeit

Tabelle 2-10 Oligonukleotide zur Klonierung und zum Nachweis von *qnrB*.

Verwendung	Name	Sequenz 5'-3'	Referenz
Nachweis	qnrB1-20_NE_for (30)	ATGWYGYCATTACTGTAT	diese Arbeit
Nachweis	qnrB1-20_NE_rev (30)	YTARCCMATVAYMGGGATRCC	diese Arbeit
Klonierung	qnrB_NE_EcoR1_for	ACGAATTCGATGACGCCATTACTGTAT	diese Arbeit
Klonierung	qnrB_NE_EcoR1_rev	ACGAATTCCTAACCAATCACCGCGATGCC	diese Arbeit
SSM-PCR	pUC19-qnrB1-del-LacZ- for_+1157	CAGTAATGGCGTCATAGCTGTTTCCTGTGTGAAATTG	diese Arbeit
SSM-PCR	pUC19-qnrB1-del-lacZ- rev_+1137	ATGACGCCATTACTGTATAAAAAAACAGGTACAAATATG	diese Arbeit

Tabelle 2-11 Oligonukleotide zum Nachweis von *qepA*.

Name	Sequenz 5'-3'	Referenz
qepA-R +584 fw	CTTCCTGCCCCGAGTATCGTG	(170)
qepA-F +801 rev	GCAGGTCCAGCAGCGGGTAG	(170)

Material und Methoden

Tabelle 2-12 Oligonukleotide zum Nachweis und zur Klonierung von *aac(6')*lb.

Verwendung	Name	Sequenz 5'-3'	Referenz
Nachweis	AAC6 +I for	ATGACTGAGCATGACCTTGC	diese Arbeit
Nachweis	AAC6 +519 rev	TTAGGCATCACTGCGTGTC	diese Arbeit
Nachweis	<i>aac(6')</i> -lb 5'-66 for	ACAAAGTTAGGCATCACAAAGT	diese Arbeit
Nachweis	<i>aac(6')</i> -lb 5'-36WOB for	GTGACCAACWGCAACGATTCCG	diese Arbeit
Klonierung	HindIII <i>aac(6')</i> -66 for No.2	ATACAAGCTTGACAAAGTTAGGCATCACAAAGT	diese Arbeit
Klonierung	HindIII <i>aac(6')</i> +519 rev	ACTATAAGCTTTTAGGCATCACTGCGTGTC	diese Arbeit

Tabelle 2-13 Oligonukleotide zur Deletion bzw. Insertion von Basen vor *aac(6')*lb in pHPNE19-01, pHPNE19-05, pHPNE19-06 und pHPNE19-07 durch SSM-PCR.

Verwendung	Name	Sequenz 5'-3'	Referenz
Deletion von 24 bp von LacZ in pHPNE19-01	pUC19:: <i>aac(6')</i> -lb-cr-66-45-	CTTTGTGATGCCTAACTTTGTAGCTGTTTCC	diese Arbeit
	LacZΔ+1+24for	TGTGTGAAATTG	Arbeit
	pUC19:: <i>aac(6')</i> -lb-cr-66-24rev	ACAAAGTTAGGCATCACAAAGTACAGCATC GTGACCAACAGC	diese Arbeit
Deletion von 24 bp von LacZ, 66 bp von <i>AAC(6')</i> lb in pHPNE19-01	pUC19:: <i>aac(6')</i> -lb-cr+1+20-	GCAAGGTCATGCTCAGTCATAGCTGTTTCC	diese Arbeit
	LacZdel+1+24for	TGTGTGAAATTG	Arbeit
	pUC19:: <i>aac(6')</i> -lb-cr+1-+42rev	ATGACTGAGCATGACCTTGCGATGCTCTAT GAGTGGCTAAAT	diese Arbeit
Deletion von 24 bp von LacZ, Insertion von M bzw. MSNAK in pHPNE19-01, -05, -06, -07, je mit pUC19:: <i>aac(6')</i> -lb-cr-66-24rev	pUC19:: <i>aacLacZ(+M)</i> for	CTTTGTGATGCCTAACTTTGTCATAGCTGTT TCCTGTGTGAAATTG	diese Arbeit
	pUC19:: <i>aacLacZ(+MSNAK)</i> for	CTTTGTGATGCCTAACTTTGTTTTGCGTTG	diese Arbeit
	pUC19:: <i>aac(6')</i> -lb-cr-66-24rev	CTCATAGCTGTTTCTGTGTGAAATTG	Arbeit

Tabelle 2-14 Oligonukleotide zur Einführung der Mutationen an Position 102 und 179 in *AAC(6')*lb in pHPNE19-05.1, pHPNE19-06.1 und pHPNE19-07.1 durch SSM-PCR.

Name	Sequenz 5'-3'	Referenz
<i>aac(6)</i> -lb_D179Y_for	CCATGTACACGGCTGGACCATATGGGGTGGTTACGGTACCTTGC	diese Arbeit
<i>aac(6)</i> -lb_D179Y_rev	ATGGTCCAGCCGTGTACATGGTTCAAACACGCCAGGCATTCTGA	diese Arbeit
<i>aac(6)</i> -lb_W102R_for	CGGTTTCTTCTCCACCGTCCGTCCCCGCTTCCAAGAGC	diese Arbeit
<i>aac(6)</i> -lb_W102R_rev	GGTGGGAAGAAGAAACCGATCCAGGAGTACGCGGAATAG	diese Arbeit

Tabelle 2-15 Oligonukleotide zur Durchführung der ARMS-PCR.

Verwendung	Name	Sequenz 5'-3'	Referenz
Detektion d. Austauschs von GAT zu TAT an AS-Position 179 in Kombination mit pUC18_5-3	pHPNE19.05.1_ARMS_AS179_aac-wt_+517	GTACCGTAACCACCCAAG	diese Arbeit
	pHPNE19.01.1b_ARMS_AS179_aac-cr_+517	GTACCGTAACCACCCAAT	diese Arbeit
Detektion d. Austauschs von CGG zu TGG an AS-Position 102 in Kombination mit lacZ+3396rev	pHPNE19.01.1b_ARMS_AS102_aac-cr_+322	CGGTTTCTTCTCCCATCG	diese Arbeit
	pHPNE19.05.1_ARMS_AS102_aac-wt_+322	CGGTTTCTTCTCCCATCA	diese Arbeit

Tabelle 2-16 Oligonukleotide zum Nachweis und zur Klonierung von *aac(6')*ly, sowie zur Deletion der Aminosäuren von LacZ in pHPNE19-04 vor *aac(6')*ly durch SSM-PCR.

Verwendung	Name	Sequenz 5'-3'	Referenz
Nachweis	aac(6)-ly+1for	ATGGACATCAGGCAAATGAAC	diese Arbeit
Nachweis	aac(6)-ly+438rev	TCAACAACGCTTTTCGGTAG	diese Arbeit
Klonierung	aac(6)-ly+1for_HindIII	ATACAAGCTTATGGACATCAGGCAAATGAAC	diese Arbeit
Klonierung	aac(6)-ly+438rev_HindII	ACTATAAGCTTTCAACAACGCTTTTCGGTAG	diese Arbeit
SSM-PCR	Del_LacZ_ly_for	GTTTCATTTGCCTGATGTCCATAGCTGTTTCTGTGTGAAATT GTTATCC	diese Arbeit
SSM-PCR	Del_LacZ_ly_rev	ATGGACATCAGGCAAATGAACAAAACCCATCTGGAGCACT GGCGCG	diese Arbeit

Material und Methoden

Tabelle 2-17 Oligonukleotide zur Einführung verschiedener Mutationen in pHPNE19-04, pHPNE19-08 und pET-23::aac(6')-ly.

Verwendung	Name	Sequenz 5'-3'	Referenz
Mutation in AS- Position 136	aac(6')ly_ Glu136Arg_for	GCTTTCGGTAGAAAAATGACGCGCCTTGTTTCCTCAAATCC	diese Arbeit
	aac(6')ly_ Glu136Tyr_for	GCTTTCGGTAGAAAAATGACGCGATATGTTTCCTCAAATCC	diese Arbeit
speziell für pUC19	aac(6')ly_ pUC19_rev	CGCGTCATTTTCTACCGAAAGCGTTGTTGAAAGCTTGCATGC	diese Arbeit
	aac(6')ly- pET23rev+458	CGCGTCATTTTCTACCGAAAGCGTTGTCACCATCACCATCACCAT	diese Arbeit
Mutation an AS- Position 66	aac(6')ly_ Tyr66Arg_for	GCGAACTGTCACAGCCATTGACACGATCGTGGCGGATTGAGG	diese Arbeit
	aac(6')ly_ rev_Mut	GTCAATGGCTGTGACAGTTCGCCCGTGGTTTTCTTGAAGG	diese Arbeit
Mutation an AS- Position 22	aac(6)ly_ W22R_for_+803	GGGCGTCATCCGGGTGACCAGGCCGGAGCTGTTTTCGCAATC	diese Arbeit
	aac(6)ly_ W22R_rev_+825	CCTGGTCACCCGGATGACGCCATCTGGCGGACGGCGAAG	diese Arbeit
Mutation an AS- Position 79	aac(6)ly_ E79Y_for_+634	GAGGGGAGAACAAAAATACCATAAAGGAAAACCACGGGCG	diese Arbeit
	aac(6)ly_ E79Y_rev_+654	GGTATTTTTGTTCTCCCCTCATTCCGTC AACGCGGCGTAGCG	diese Arbeit

Tabelle 2-18 Oligonukleotide zum Nachweis von pPHB331 sowie pPHB331.1 und zur Einführung der Mutation in pPHB331 durch SSM-PCR-

Verwendung	Name	Sequenz 5'-3'	Referenz
Nachweis	lucB_5'	CATTTCGAAGTATTCCGCGTACG	(2)
Nachweis	acrR_3_+126_EcoK12	GCCAGCTGCTTTTGCAATCT	(12)
SSM-PCR	pPHB331_+4578_T-G_for	TACATACATTTGTGAATGGATGTACCATAGCAC	diese Arbeit
SSM-PCR	pPHB331_+4596_rev	CATTCACAAATGTATGTAAATCTAACGCTGTAAA	diese Arbeit

Tabelle 2-19 Oligonukleotide für pUC18 und pUC19, sowie für die Detektion und Sequenzierung des *mar*-Operons, von *gyrA*, *acr* und *parC*.

Verwendung	Name	Sequenz 5'-3'	Referenz
Nachweis von pUC18/19 und Derivaten von pHPNE19	lacZ+3396rev	GGCGCCAATACGCAAACC	(10)
	Primer1_pUC18_5-3	GCATCAGGCGCCATTCCG	Yassin Farag, unveröffentlicht
	-21 M13	TGTAAAACGACGGCCAGT	Applied Biosystems TM , Darmstadt
Nachweis und Sequenzierung von <i>marCRAB</i>	marR_3R4	ACTCGAAGCCATATCGTTCT	Antje Schnasse, unveröffentlicht
	marR_5R4	CGGCACTGTTCATGTTGCCT	Antje Schnasse, unveröffentlicht
	marC_mar1	AGTGACACTCGAAGAACAGACGC	(141)
	marB_M61	CCCCGAGATGTCGGGGCCAG	Antje Schnasse, unveröffentlicht
	marCRAB 3'	GGTGCGGTGCTCATTATGAC	(10)
Nachweis und Sequenzierung von <i>gyrA</i>	gyrA 3-1	GGAATTTTGGTTGGCATGACGTCCGGA	Antje Schnasse, unveröffentlicht
	gyrA 5-1	CCGAATTCGGGATACAGTAGAGGGATAGC	Antje Schnasse, unveröffentlicht
Nachweis und Sequenzierung von <i>acrR</i>	acrR IS antisense	CCTGAGAGCATCAGAACG	Jing Yuan, unveröffentlicht
	acrR IS Sense	CGACGCAGTGAACCAGAA	Jing Yuan, unveröffentlicht
Nachweis und Sequenzierung von <i>parC</i>	parC S	GTATGCGATGTCTGAACTGGGCTG	(64)
	parC U	ACCGGATTCGGTGTAACGCATTGC	(64)

Tabelle 2-20 Oligonukleotide zum Nachweis verschiedener Typen von *aac(6')*.

Verwendung	Name	Sequenz 5'-3'	Referenz
Nachweis von <i>aac(6')</i> Ic	<i>aac(6')</i> -Ic for +1	ATGATCGTCATCTGCGACCAC	diese Arbeit
	<i>aac(6')</i> -Ic rev +438	GCCACGCTTTTGC GG TAAAAC	diese Arbeit
Nachweis von <i>aac(6')</i> If	<i>aac(6')</i> -If for +1	ATGGATGAAGCTTCTTTGAGC	diese Arbeit
	<i>aac(6')</i> -If rev +432	ACCAGCTATTCTTTTCTG	diese Arbeit
Nachweis von <i>aac(6')</i> IL	<i>aac(6')</i> -IL for +1	ATGGATAGTTCGCCGCTCGTC	diese Arbeit
	<i>aac(6')</i> -IL rev +456	CAACGGTTTCCGGAAGCAGCG	diese Arbeit

Material und Methoden

Nachweis von <i>aac(6')I</i> m	aac(6')-Im for +1	ATGTTGGAAAAAAGCGAGT	diese Arbeit
	aac(6')-Im rev +534	CACTCTCCATTCCATCAGC	diese Arbeit
Nachweis von <i>aac(6')I</i> q	aac(6')-Iq for +202 WOB	GGMTTAAGGCCRATGTAC	diese Arbeit
	aac(6')-Iq rev +537 WOB	CCACATCCAWATATCTGG	diese Arbeit
Nachweis von <i>aac(6')II</i>	aac(6')-II for +1	ATGTCCGCGAGCACCCCCCCC	diese Arbeit
	aac(6')-II rev +552	GGCAACACCGCGCTTTCTCTCG	diese Arbeit

2.1.9 Degeneration der Primer

Die degenerierten Primer in Abschnitt 2.1.8 sind mit dem Kürzel WOB gekennzeichnet. Folgende Tabelle 2-21 zeigt die Übersetzung der in diesen Primern benutzten Buchstaben für die Variation von Basen an einer bestimmten Position.

Tabelle 2-21 In der Arbeit verwendeter Code aus <http://www.invitrogen.com> zur Degeneration der Primer.

Wobble-Code	Basen	Wobble-Code	Basen
V	A+C+G	K	T+G
D	A+T+G	M	A+C
B	T+C+G	Y	C+T
H	A+T+C	R	A+G
W	A+T	N	A+G+C+T
S	C+G	-	-

2.1.10 Bakterienstämme

Tabelle 2-22 In der vorliegenden Arbeit verwendete Bakterienstämme.

Stamm	GK	Beschreibung / Genotyp	Referenz
<i>E. coli</i> JM109	3154	<i>endA1, recA1, gyrA96, thi, hsdR17 (rk-, mk+), relA1, supE44, Δ(lac-proAB), [F' traD36, proAB, laqIqZΔM15]</i>	Promega GmbH, Mannheim
<i>E. coli</i>	2951	klinisches Isolat aus England, <i>aac(6')-Ib-cr</i> positiv, Lac ⁺	R. Hope, London
<i>E. coli</i>	2850	klinisches Isolat aus England, <i>aac(6')-Ib</i> positiv, <i>qnrA</i> -positiv, Lac ⁻	R. Hope, London
<i>E. coli</i>	2851	klinisches Isolat aus England, <i>aac(6')-Ib11</i> positiv, Lac ⁻	R. Hope, London
<i>E. coli</i>	2894	klinisches Isolat aus England, <i>aac(6')-Ib7</i> positiv, <i>qnrA</i> -positiv, Lac ⁺	R. Hope, London
<i>E. coli</i>	2895	klinisches Isolat aus England, <i>aac(6')-Ib-cr</i> positiv, Lac ⁺	R. Hope, London
<i>K. pneumoniae</i>	3109	mit pMG252, <i>qnrA1</i> positiv	(100)
UAB 1			

Stamm	GK	Beschreibung / Genotyp	Referenz
<i>K. pneumoniae</i>	3110	<i>qnrB1</i> positiv	(76)
<i>E. coli</i> JM109	3124	mit <i>qnrS1</i> aus pINF5 von aus <i>S. enterica</i> serovar infantis	(82)
<i>E. coli</i> JM109	3184	mit pSTV28:: <i>qepA</i> , <i>qepA</i> aus pHPA von <i>E. coli</i> C316	(171)
<i>E. coli</i> WT	571	Stuhlisolat einer gesunden Person ohne Kontakt mit Fluorchinolonen	(65)
<i>E. coli</i> MI	572	WT mit <i>gyrAS83L</i> , <i>in vitro</i> selektiert	(65)
<i>E. coli</i> MII	573	WT mit <i>gyrAS83L</i> , <i>marRΔ175bp</i> , <i>in vitro</i> selektiert	(65)
<i>E. coli</i> WT 3.2	643	WT mit <i>gyrAD87G</i> , <i>in vitro</i> selektiert	(11)
<i>E. coli</i> WT-3	644	WT mit <i>gyrAS83L</i> , <i>gyrAD87G</i> , <i>in vitro</i> selektiert	(11)
<i>E. coli</i> WT-4-M35	895	WT mit <i>gyrAD87G</i> , <i>parCS80I</i> , <i>in vitro</i> selektiert	(37)
<i>E. coli</i> WT-III	3009	WT mit <i>marRΔ74bp</i> , <i>in vitro</i> selektiert	(37)
<i>E. coli</i> K12 CSH116	3106	F-, <i>ara-600</i> , <i>yafC502::Tn10</i> , <i>dnaQ905</i> , <i>Δ(gpt-lac)5</i> , λ-, <i>relA1?</i> , <i>spoT1?</i> , <i>thi-1</i>	(106)
<i>E. coli</i> K12 CSH116 64-8	-	1. Schritt Mutante aus <i>E. coli</i> K12 CSH116	diese Arbeit
<i>E. coli</i> K12 CSH116 64-8-33	-	2. Schritt Mutante aus <i>E. coli</i> K12 CSH116 64-8	diese Arbeit
<i>E. coli</i> DH5α K12 pPHB331	3001	pPHB331	(103)
<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	3302	F-, <i>ompT gal dcm lon hsdSB(rB- mB-)</i> λ(DE3 [<i>lacI lacUV5-T7 gene 1 ind1 sam7 nin5</i>])	Mobarak AbuMraheil, Uni Gießen
<i>E. coli</i> K12 W3110R	93	Rezipient, Lac ⁺	-
<i>E. coli</i> JM109 (GK 3154) pUC19	3291	pUC19 aus <i>E. coli</i> JM83 (GK 326)	diese Arbeit
<i>E. coli</i> JM109 (GK 3154) pUC18	-	pUC18 von Invitrogen™, Karlsruhe	diese Arbeit
<i>E. coli</i> JM109 (GK 3154) pHPNE18-01	3486	pHPNE18-01	diese Arbeit

ara-600 = Arabinose kann nicht metabolisiert werden; *dcm* = zur Cytosinmethylierung; *dnaQ905* = Mutation in der ε-Untereinheit des DNA Polymerase III Holoenzym; *endA1* = Endonuklease I; F' = F-Plasmide vorhanden, enthält chromosomale Gene; *gal* = zur Galaktoseverwertung; *gyrA96* = Mutation in der DNA-Gyrase, vermittelt Nalidixinsäure Resistenz; *hsdR17* = *hsd* kodiert für ein Typ I Restriktionsenzym, Funktion der Mutation unbekannt; *hsdSB(rB- mB-)* = *hsd* kodiert für ein Typ I Restriktionsenzym, Funktion der Mutation unbekannt; *lacI* = kodiert für den Lac-Repressor; *laqZΔM15* = partielle Deletion des *lacZ*-Gens, diese erlaubt α-

Material und Methoden

Komplementation des β -Galaktosidasegens, welche für Blau/Weiß Selektion relevant ist; *lon* = kodiert für eine Ionenprotease; *ompT* = kodiert für die Proteinprotease VII (Quter Membrane Protein); *proAB* = erfordert Prolin; *recA1* = Reduziert das Vorkommen von Rekombination bei der Klonierung bzw. Transformation von DNA, die Zellen sind UV-Empfindlich und besitzen ein mangelhaftes DNA-Reparatursystem; *relA1* = erlaubt keine RNA Synthese bei Nichtvorhandensein von Protein Synthese; *supE44* = oder *glnV*, kodiert für tRNA-Gln(CUG), suppression des Amberstopcodons (UAG); *thi* = erfordert Thiamin; *traD36* = Eliminierung des Transferfaktor; *yafC* = HTH-Typ Transkriptionsregulator; aus http://openwetware.org/wiki/E._coli_genotypes.

2.1.11 Plasmide

pHPNExx-yy (p = Plasmid, HP = Hamburg, Pharmazeutische Biologie, NE = Konstruiert von Nadine Emrich, xx = interne Nummer für Ausgangsvektoren (z.B. 19 für pUC19, 23 für pET23), yy = Projekt und laufende Nummer).

Tabelle 2-23 In der vorliegenden Arbeit verwendete Plasmide.

Name	Plasmid	Beschreibung	Referenz
pET23::aac(6')ly	pET23::aac(6')ly-His6	Plasmid von Dr. M. Vetting, New York	(159)
pHPNE18-01	pUC18::qnrB	<i>qnrB1</i> aus GK 3110	diese Arbeit
pHPNE18-01.1	pUC18::qnrB Δ LacZ	LacZ deletiert	diese Arbeit
pHPNE19-01	pUC19::aac(6')lb-cr	<i>aac(6')lb-cr</i> aus GK 2951, <i>in frame</i> mit LacZ	diese Arbeit
pHPNE19-01.1	pUC19::aac(6')lb-cr Δ LacZ	LacZ deletiert	diese Arbeit
pHPNE19-01.1a	pUC19::aac(6')lb-cr Δ LacZ	LacZ deletiert, M vorgeschaltet	diese Arbeit
pHPNE19-01.1b	pUC19::aac(6')lb-cr Δ LacZ	LacZ deletiert, MSNAK vorgeschaltet	diese Arbeit
pHPNE19-01.2	pUC19::aac(6')lb-cr Δ LacZ	LacZ und 66bp von <i>aac(6')lb-cr</i> deletiert	diese Arbeit
pHPNE19-02	pUC19::qnrA1	<i>qnrA1</i> aus pMG252, mit eigenem Promotor kloniert	diese Arbeit
pHPNE19-02.1	pUC19::qnrA1 Δ LacZ	LacZ deletiert	diese Arbeit
pHPNE19-03	pUC19::qnrS1	<i>qnrS1</i> aus pINF5, <i>in frame</i> mit LacZ	diese Arbeit
pHPNE19-03.1	pUC19::qnrS1 Δ LacZ	LacZ deletiert	diese Arbeit
pHPNE19-04	pUC19::aac(6')ly	<i>aac(6')ly</i> aus pET23::aac(6')ly, <i>in frame</i> mit LacZ	diese Arbeit
pHPNE19-04.1	pUC19::aac(6')ly-E136R	<i>in frame</i> mit LacZ	diese Arbeit
pHPNE19-04.2	pUC19::aac(6')ly-E136Y	<i>in frame</i> mit LacZ	diese Arbeit
pHPNE19-04.2a	pUC19::aac(6')ly-E136Y/Y66R	<i>in frame</i> mit LacZ	diese Arbeit

Material und Methoden

Name	Plasmid	Beschreibung	Referenz
pHPNE19-05	pUC19::aac(6')lb	<i>aac(6')</i> lb aus GK 2850, <i>in frame</i> mit LacZ	diese Arbeit
pHPNE19-05.1	pUC19::aac(6')lbΔLacZ	LacZ deletiert, MSNAK vorgeschaltet	diese Arbeit
pHPNE19-05.1a	pUC19::aac(6')lbΔLacZ-W102R	pHPNE19-05.1 mit W102R	diese Arbeit
pHPNE19-05.1b	pUC19::aac(6')lbΔLacZ-D179Y	pHPNE19-05.1 mit D179Y	diese Arbeit
pHPNE19-06	pUC19::aac(6')lb7	<i>aac(6')</i> lb7 aus GK 2894, <i>in frame</i> mit LacZ	diese Arbeit
pHPNE19-06.1	pUC19::aac(6')lb7ΔLacZ	LacZ deletiert, MSNAK vorgeschaltet	diese Arbeit
pHPNE19-06.1a	pUC19::aac(6')lb7ΔLacZ-W102R	pHPNE19-06.1 mit W102R	diese Arbeit
pHPNE19-06.1b	pUC19::aac(6')lb7ΔLacZ-D179Y	pHPNE19-06.1 mit D179Y	diese Arbeit
pHPNE19-06.1c	pUC19::aac(6')lb7ΔLacZ-cr	pHPNE19-06.1 mit W102R und D179Y	diese Arbeit
pHPNE19-07	pUC19::aac(6')lb11	<i>aac(6')</i> lb11 aus GK 2851, <i>in frame</i> mit LacZ	diese Arbeit
pHPNE19-07.1	pUC19::aac(6')lb11ΔLacZ	LacZ deletiert, MSNAK vorgeschaltet	diese Arbeit
pHPNE19-07.1a	pUC19::aac(6')lb11ΔLacZ-W102R	pHPNE19-07.1 mit W102R	diese Arbeit
pHPNE19-07.1b	pUC19::aac(6')lb11ΔLacZ-D179Y	pHPNE19-07.1 mit D179Y	diese Arbeit
pHPNE19-07.1c	pUC19::aac(6')lb11ΔLacZ-cr	pHPNE19-07.1 mit W102R und D179Y	diese Arbeit
pHPNE19-08	pUC19::aac(6')lyΔLacZ	pHPNE19-04, LacZ deletiert	diese Arbeit
pHPNE19-08.02	pUC19::aac(6')-lyΔLacZ-Y66R-II	pHPNE19-08 mit Y66R	diese Arbeit
pHPNE19-08.03	pUC19::aac(6')-lyΔLacZ-E79Y-III	pHPNE19-08 mit E79Y	diese Arbeit
pHPNE19-08.04	pUC19::aac(6')-lyΔLacZ-E136R-IV	pHPNE19-04.1, LacZ deletiert	diese Arbeit
pHPNE19-08.05	pUC19::aac(6')-lyΔLacZ-E136Y-V	pHPNE19-04.2, LacZ deletiert	diese Arbeit
pHPNE19-08.06	pUC19::aac(6')-lyΔLacZ-E79Y/E136R-VI	pHPNE19-08.04 mit E79Y	diese Arbeit
pHPNE19-08.07	pUC19::aac(6')-lyΔLacZ-W22R-E79Y-VII	pHPNE19-08.03 mit W22R	diese Arbeit
pHPNE19-08.08	pUC19::aac(6')-lyΔLacZ-Y66R/E79Y-VIII	pHPNE19-08.03 mit Y66R	diese Arbeit
pHPNE19-08.09	pUC19::aac(6')-lyΔLacZ-Y66R/E136Y-IX	pHPNE19-04.2a, LacZ deletiert	diese Arbeit
pHPNE19-08.10	pUC19::aac(6')-lyΔLacZ-W22R-E136Y-X	pHPNE19-08.05 mit W22R	diese Arbeit

Material und Methoden

Name	Plasmid	Beschreibung	Referenz
pHPNE19-08-01	pUC19::aac(6')-IyΔLacZ-W22R-I	pHPNE19-08 mit W22R	diese Arbeit
pHPNE23-1	pET23::aac(6')Iy-His6-W22R	pET23::aac(6')Iy mit W22R	diese Arbeit
pHPNE23-1a	pET23::aac(6')Iy-His6-W22R/E136Y	pHPNE23-1 mit E136Y	diese Arbeit
pHPNE23-2	pET23::aac(6')Iy-His6-Y66R	pET23::aac(6')Iy mit Y66R	diese Arbeit
pHPNE23-2a	pET23::aac(6')Iy-His6-Y66R/E79Y	pHPNE23-2 mit E79Y	diese Arbeit
pHPNE23-2b	pET23::aac(6')Iy-His6-Y66R/E136Y	pHPNE23-2 mit E136Y	diese Arbeit
pHPNE23-3	pET23::aac(6')Iy-His6-E79Y	pET23::aac(6')Iy mit E79Y	diese Arbeit
pHPNE23-3a	pET23::aac(6')Iy-His6-E79Y/E136R	pHPNE23-3 mit E136R	diese Arbeit
pHPNE23-3b	pET23::aac(6')Iy-His6-E79Y/W22R	pHPNE23-3 mit W22R	diese Arbeit
pHPNE23-4	pET23::aac(6')Iy-His6-E136R	pET23::aac(6')Iy mit E136R	diese Arbeit
pHPNE23-5	pET23::aac(6')Iy-His6-E136Y	pET23::aac(6')Iy mit E136Y	diese Arbeit
pPHB331	pBR322::pacrAB-luc	bla-Gen ging bei der Konstruktion verloren	(103)
pPHB331.1	pBR322::pacrABΔ-luc	pPHB331 mit <i>PacrAB</i> T→G	diese Arbeit
pUC18	pUC18	-	Invitrogen™, Karlsruhe
pUC19	pUC19	-	Invitrogen™, Karlsruhe

2.1.12 Größenstandards für DNA- und Proteingele

Tabelle 2-24 In der vorliegenden Arbeit verwendete Größenstandards für DNA- und Proteingele.

Name	Hersteller	Verwendet für
GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder, ready-to-use	Fermentas GmbH, St. Leon	DNA- Agarosegele
GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder, ready-to-use	Fermentas GmbH, St. Leon	DNA- Agarosegele
SmartLadder, 200 bp – 10000 bp	Eurogentec S.A., Seraing	DNA- Agarosegele
λ DNA-HindIII Digest	New England Biolabs (NEB), Frankfurt am Main	DNA- Agarosegele
PageRuler™ Unstained Protein Ladder	Fermentas GmbH, St. Leon	PAG-Gele

Abbildung 2-1 zeigt jeweils das Bandenmuster und die dazugehörigen Größe der verwendeten Größenmarker.

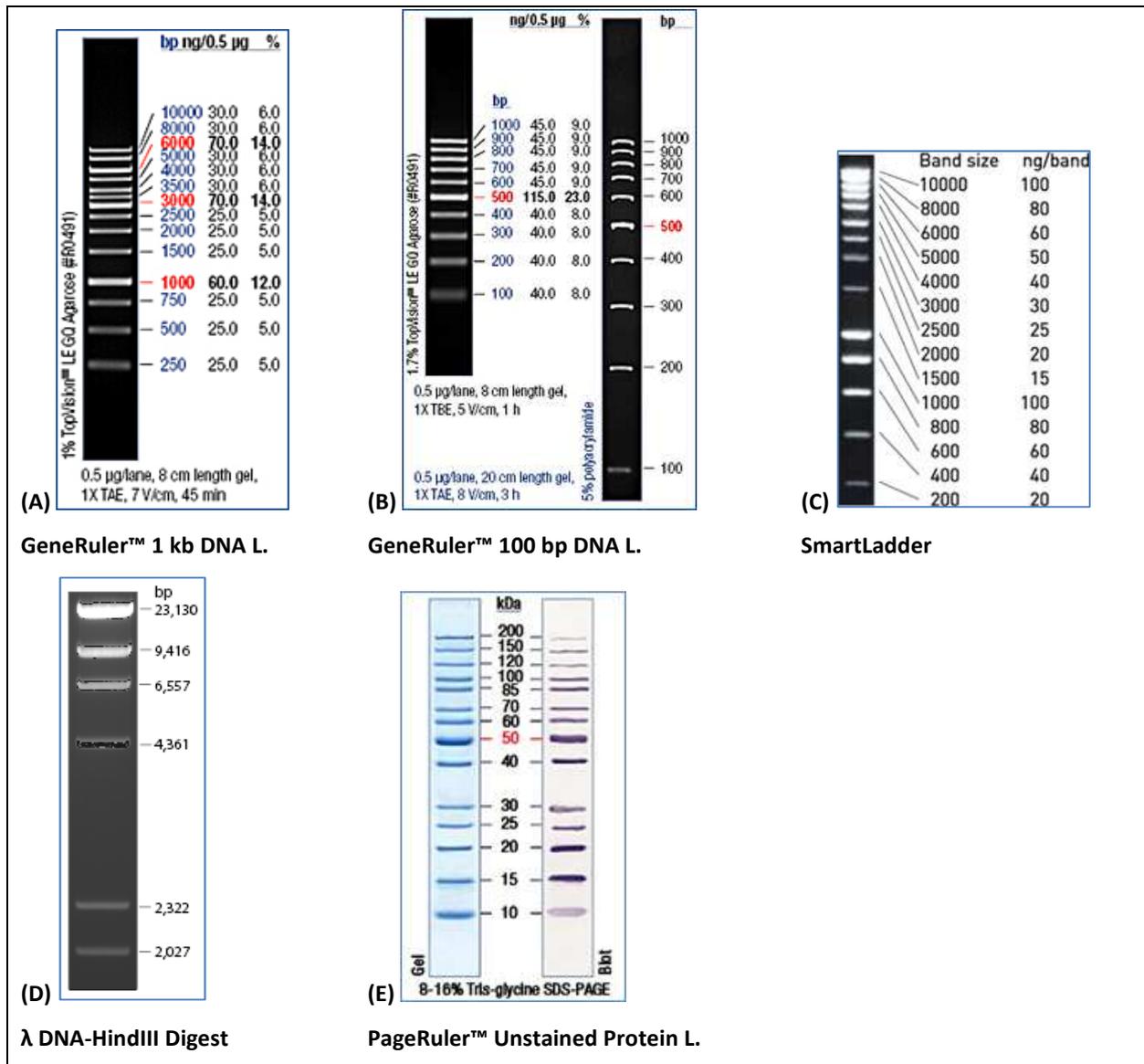


Abbildung 2-1 Bilder der Größenstandards mit Angaben der Größen. (A) GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder, ready-to-use, (B) GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder, ready-to-use, (C) SmartLadder, (D) λ DNA-HindIII Digest, (E) PageRuler™ Unstained Protein Ladder.

2.2 Methoden

2.2.1 Arbeiten mit Bakterien

2.2.1.1 Glycerinkulturen

Zur langfristigen Aufbewahrung von Bakterienzellen wurden Glycerinkulturen hergestellt und diese bei -80 °C gelagert. Dazu wurden zunächst 0,5 ml NI-Medium mit 0,25 ml 87 % Glycerin gemischt und in ein 2 ml SafeSeal Micro Tube Probenröhrchen mit ca. 10 Glasperlen pipettiert. Nach dem Autoklavieren konnten die Röhrchen benutzt werden. Von einer frisch bewachsenen Platte wurden zwei bis drei Kolonien mit einem sterilen Glasstab gepickt, in die Glasperlen untergerührt und bei Raumtemperatur für ca. 30 min unter der sterilen Werkbank inkubiert. Anschließend wurde die Flüssigkeit abgenommen und die Röhrchen bei -80 °C aufbewahrt.

Zur Aufbewahrung der Zellpopulationen, die bei der Selektion in Flüssigkultur entstanden waren, wurde 1 ml der Bakterienkultur mit 87% Glycerin gemischt (Endkonzentration von 30 %) und bei -80°C gelagert.

2.2.1.2 Stammhaltung

Eine Perle der Glycerinkulturen wurde mit einer abgeflamten Impföse auf eine sterile Agarplatte ohne Selektionsmedium gegeben, fraktioniert ausgestrichen und bei entsprechender Temperatur im Brutschrank über Nacht angezogen. Am folgenden Tag wurde bei Bedarf eine Einzelkolonie auf eine Selektionsagarplatte ausgestrichen und erneut inkubiert. Die Platten wurden bei 4 °C aufbewahrt und für maximal 6 Wochen verwendet.

2.2.1.3 Agarplatten und Medienherstellung

Zur Herstellung von Agarplatten sowie Medien wurden die jeweiligen Herstellerbedingungen beachtet.

2.2.1.4 IPTG/X-Gal Platten für das Blau-Weiß-Screening

Ein einfacher und sicherer Weg zur positiven Selektion einer Ligation wurde die Methode der Alpha-Komplementation (89, 155) herangezogen. Die Plasmide pUC18 als auch pUC19 (173), die in dieser Arbeit zur Klonierung verschiedener Gene herangezogen wurden, besitzen einen durch Laktose/IPTG induzierbaren Promotor *P_{lac}*, 5' zur Sequenz, die das N-terminale Ende der β -Galaktosidase (*lacZ*), bezeichnet als Alpha-(α)-Peptid, kodiert. IPTG, ein Laktose-

Analoge, oder Laktose selbst inhibieren den *lac*-Repressor (kodiert durch *lacI*), was zur Expression des α -Peptids der β -Galaktosidase und des Omega-(ω)-Fragment, dem C-Terminus der β -Galaktosidase, führt. Das ω -Fragment ist meist auf einem F'-Plasmid kodiert, welches sich beispielsweise in *E. coli* JM109-Zellen befindet. Das α -Peptid bildet mit dem ω -Fragment eine funktionsfähige β -Galaktosidase. Wurde das α -Peptid durch das Einfügen eines Inserts unterbrochen und der Leserahmen verschoben, entsteht keine funktionsfähige β -Galaktosidase, somit bleiben rekombinante Kolonien, auf einer Selektivagarplatte mit X-Gal (und IPTG) weiß. Nicht-rekombinante Kolonien exprimieren eine funktionsfähige β -Galaktosidase, die wiederum das Galaktosid X-Gal spaltet, dadurch sind die Kolonien blau eingefärbt (121).

Der Ansatz der Transformation von *E. coli* JM109-Zellen mit pUC18/pUC19-Vektoren wurde auf einer Selektivagarplatte mit dem entsprechenden Antibiotikum, in diesem Fall Ampicillin in einer Konzentration von 50-100 $\mu\text{g/l}$, sowie IPTG und X-Gal ausplattiert.

Zur Herstellung von IPTG/X-Gal-Platten wurden auf eine fertige Selektivagarplatte 7 μl einer 20 %igen IPTG-Lösung, 40 μl einer 2 %igen X-Gal-Lösung sowie 53 μl steriles LB-Medium verteilt. Das entsprach einer Endkonzentration von 14 μg IPTG und 8 μg X-Gal pro Platte (ca. 20 ml).

2 % X- Gal Stocklösung

20 mg X-Gal wurden in 1000 μl N-N Dimethylformamid (DMF) gelöst (Lichtempfindlich).

20 % IPTG Stocklösung

200 mg IPTG wurden in 1000 μl H₂O gelöst und anschließend steril filtriert.

2.2.1.5 Herstellung von Medium und Agarplatten mit einem pH-Wert von 5,8 bzw. 7,2

Zur Durchführung der MHK-Bestimmung mit Finafloxacin, sowie zur Selektion von Stämmen mit Finafloxacin wurde Medium bzw. Agarplatten mit einem pH-Wert von 5,8 bzw. 7,2 benötigt.

Dazu wurde das nach Herstellerangaben gelöste Medium mit konzentrierter Salzsäure auf einen pH-Wert von 5,6 bzw. 7,0 eingestellt und autoklaviert. Zur Herstellung von Agarplatten wurde ebenfalls Medium gelöst und entsprechend mit konzentrierter Salzsäure eingestellt. Anschließend wurde 1,5 % Agar-Agar hinzugegeben und autoklaviert.

2.2.1.6 Herstellung von Calciumchlorid-kompetenten *E. coli* Zellen für Transformation

Um *E. coli* Zellen für die Aufnahme von DNA vorzubereiten, wurden die Zellen mit einer Calciumchlorid-Lösung (CaCl₂-Lösung) behandelt. Ein Überschuss an Calcium-Kationen (Ca²⁺), die sich in negativ geladene Membran einlagern, verändert die Durchlässigkeit der Membran und steigert die Aufnahmefähigkeit der Zellen. Die von Morrison 1977 beschriebene Methode wurde hier wie folgt durchgeführt (110).

In einen 100 ml Erlenmeyerkolben wurden zunächst 49 ml LB-Medium gefüllt und mit 1 ml einer Übernachtskultur angeimpft. Die Zellen wurden nun bei 37 °C und 130 rpm bis zu einer OD_{600nm} von 0,52-0,69 herangezogen, anschließend je 25 ml der Bakteriensuspension in 50 ml Röhrchen gegeben und 10 min bei 4 °C und 6000 rpm abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Die Zellpellets wurden jeweils in 12,5 ml eiskalter, steriler 0,1 M CaCl₂-Lösung resuspendiert und erneut 10 min bei 4 °C und 6000 rpm abzentrifugiert. Der Überstand wurde erneut verworfen. Die Pellets wurden nun in je 1,25 ml eiskalter steriler 0,1 M CaCl₂-Lösung resuspendiert, vereinigt und ca. 1 Stunde auf Eis inkubiert. Zuletzt wurden 520 µl steriles Glycerin (86 %) hinzu pipettiert, gut mit den Zellen vermischt, zügig 200 µl der kompetenten Zellen in 1,5 ml Reagiergefäße (ca. 15) aliquotiert und bei -80 °C tiefgefroren. In einem Ansatz von 200 µl Zellsuspension waren durchschnittlich 20 x 10⁸-30 x 10⁸ Zellen enthalten.

2.2.1.7 Transformation von Plasmid-DNA in Calciumchlorid-kompetente *E. coli* Zellen

Auch die Transformation richtet sich nach der von Morrison beschriebenen Methode von 1977 (110). Die Methode dient der Übertragung von nicht-viraler DNA in kompetente Bakterienzellen. Sie ist neben Transduktion und Konjugation (2.2.1.9) eine von drei Mechanismen des Gentransfers bei Prokaryoten allgemein.

Zur Transformation von Plasmid-DNA, oder linearem SSM-PCR-Produkt (siehe 2.2.2.8.4) wurden 200 µl der Calciumchlorid-kompetenten Zellen (siehe 2.2.1.5) in einem 1,5 ml Reagiergefäß auf Eis aufgetaut. In einem Volumen von max. 10-20 µl wurde die zuvor durch alkalische Lyse (2.2.2.2) oder mit dem HiYield® Plasmid Mini Kit (2.2.2.5) isolierte Plasmid-DNA (50-100 ng), zu dem aufgetauten kompetenten Bakterienzellen hinzupipettiert und der Ansatz für 30-60 min auf Eis inkubiert. In diesem Schritt konnte sich die negativ geladene DNA mit Hilfe der Calcium-Kationen in die Membran, die ebenfalls negativ geladen ist, anlagern. Anschließend folgte ein Hitzeschock bei 42 °C für 2 min und sofortiges Abkühlen

aus Eis. In diesem Schritt konnte die DNA von den Zellen aufgenommen werden. Danach wurde 1 ml LB-Medium hinzugegeben, der gesamte Ansatz in ein steriles RG umgefüllt und 45 min bei 37 °C und 130 rpm inkubiert. Dieser Schritt diente der Regeneration der Zellen. Zuletzt wurde der komplette Ansatz in 50 µl, 100 µl und 300 µl Aliquots auf entsprechenden Selektivagarplatten ausplattiert und ÜN im Brutschrank bei 37 °C inkubiert.

Verwendet wurde diese Methode zur Transformation aller pUC18/19-, pET23-, und pSTV28-Plasmide sowie aller hergestellten Derivate dieser Plasmide (siehe Tabelle 2-23), sowie zur Transformation des linearen PCR-Produktes bei der SSM-PCR (siehe 2.2.2.8.4).

2.2.1.8 Transformation von Plasmid-DNA (≥ 65 kb) in Calciumchlorid-kompetente *E. coli* Zellen

Zur Transformation der Plasmide der *E. coli* Stämme GK 2850, GK 2851, GK 2894, GK 2895, GK 2951 mit Plasmiden in einer Größe von 65 kb oder größer, wurde wie zuvor unter 2.2.1.7 beschrieben vorgegangen, es wurde lediglich der Inkubationsschritt auf Eis von 30-60 min auf eine Dauer von 3 h verlängert. Die Plasmide wurden zuvor mit der Methode nach Kado & Liu, modifiziert nach Toranzo (151) (siehe 2.2.2.7) oder mit Hilfe des NucleoBond Xtra® Midi Kits (2.2.2.5) isoliert.

2.2.1.9 Konjugation

Die Konjugation ermöglicht den DNA-Transfer von einer Bakterienzelle (Donor) zu einer anderen Zelle (Rezipient) über spezifischen Kontakt (90), einem F- oder Sexpilus.

In der vorliegenden Arbeit wurde diese Methode angewandt, um den Transfer der Megaplasamide der fünf Stämme *E. coli* GK 2850, GK 2851, GK 2894, GK 2895 und GK 2951 zu ermöglichen. Der Stamm *E. coli* K12 W3110R GK 93 diente als Rezipient, die fünf genannten *E. coli* Stämme als Donoren.

Voraussetzung zur Anwendung dieser Methode ist die Möglichkeit, Donor und Rezipient mit und ohne Plasmid zu unterscheiden. Hierbei wurde die Tatsache genutzt, dass *E. coli* K12 W3110R GK 93 für Rifampicin einen MHK-Wert von ≥ 512 µg/ml und für Kanamycin einen MHK-Wert von 0,5 µg/ml besitzt, während die fünf *E. coli* Stämme GK 2850, GK 2851, GK 2894, GK 2895 und GK 2951 für Rifampicin einen MHK-Wert von 4-8 µg/ml und für Kanamycin einen MHK-Wert von 32-256 µg/ml besitzen.

Für die Durchführung wurden Übernachtskulturen des Rezipienten und der Donoren in 3 ml LB Medium ohne Antibiotikum hergestellt und am folgenden Tag je 500 µl eines Donors und

Material und Methoden

des Rezipienten mit 500 µl frischem SOC-Medium in einem sterilem Reagenzglas gemischt und 8 h (alternativ 27 h) inkubiert. Zur Selektion der Transkonjuganden und zur Trennung von Donor, Rezipient und Transkonjugand wurden Aliquots auf geeignete Selektionsplatten und Kontrollplatten ausplattiert. In diesem Fall wurden 50 µl des unverdünnten, jeweils 100 und 200 µl eines 1:10 bzw. 1:100 verdünnten Ansatzes auf Selektionsagarplatten mit einer Konzentration von 25 µg/ml Kanamycin oder 50 µg/ml Rifampicin sowie Kanamycin und Rifampicin aufgetragen und inkubiert. Die Ansätze mit den Stämmen *E. coli* GK 2850 bzw. GK 2851 wurden auf Chinablau-Selektivagar ausplattiert, da diese Laktose negativ sind, während der Rezipient Laktose negativ ist.

2.2.1.10 Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration

Die Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration (MHK) ist definiert als die niedrigste Konzentration eines Antibiotikums, die gerade noch unter festgelegten Bedingungen ein sichtbares Bakterienwachstum verhindert. Die Durchführung wurde gemäß den Vorgaben des „National Committee for Clinical Laboratory Standards“ (NCCLS) durchgeführt (48).

Die Empfindlichkeitsbestimmung kann durch die Methode der Agardilution (2.2.1.10.2) oder der Mikrodilution (2.2.1.10.1) durchgeführt werden.

2.2.1.10.1 Mikrodilutionsverfahren (Bouillondilutionsverfahren)

Die Bestimmung der MHK erfolgte in Mikrotiterplatten mit 96 Vertiefungen. In Reihe 12 wurde 50 µl Müller-Hinton Bouillon (MH-Medium) vorgelegt, dies diente der Wachstumskontrolle eines jeden Stammes. Die geometrische Antibiotika-Verdünnungsreihe wurde separat in MH-Medium mit einem Verdünnungsfaktor von 2 hergestellt, um sicher zu stellen, dass sich in jeder Platte einer Testreihe dieselben Ansätze befanden. Anschließend wurde in die Kavitäten der Reihen 1-11 jeweils 50 µl einer Antibiotika-Verdünnungsstufe vorgelegt. In die Kavitäten der Reihen A-H wurden die Bakterienlösungen hinzugesetzt. Zur Herstellung der Bakterienlösung wurden die zu testenden Stämme entweder in Flüssigkultur oder auf einer Agarplatte über Nacht frisch herangezogen. Am folgenden Tag wurde in einer NaCl-Lösung ein McFarland von 0,5 eingestellt (ca. 10^8 KBE/ml). Dieser konnte am Photometer kontrolliert und gegebenenfalls korrigiert werden, ein McFarland von 0,5 entspricht ca. einer OD_{550nm} von $0,125 \pm 0,02$. 50 µl dieser Lösung wurden in 4950 µl sterilem MH-Medium verdünnt und jeweils 50 µl davon in die Vertiefungen pipettiert. Die Platten wurden mit einer Folie abgeklebt und 16-20 Stunden bei 37 °C im Brutschrank inkubiert.

In der vorliegenden Arbeit wurden die MHK-Werte bei Bedarf in Anwesenheit des Effluxpumpeninhibitors (EPI) Phe-Arg β -Naphthyl-amid Dihydrochlorid bestimmt. Die Anwesenheit von EPI sollte einen Hinweis auf die Beteiligung von Effluxpumpen an der Resistenz zu geben. Dazu wurden zunächst MHK-Werte für die Stämme mit EPI anstelle des Antibiotikums bestimmt, anschließend wurde EPI in einer subinhibitorischen Konzentration in die fertigen Antibiotikaverdünnungen hinzugegeben.

2.2.1.10.2 Agardilutionsverfahren

Die Agardilution ist eine weitere Methode zur Bestimmung der Empfindlichkeit von verschiedenen Stämmen, die es ermöglicht, diese in hohem Durchsatz zu testen. Hier wurde die Methode zur Charakterisierung der mit Agarplatten selektierten Stämme *E. coli* CSH116 64-8-33 pHPNE19-05.1 (*aac(6')**lb-wt*), *E. coli* CSH116 64-8-33 pHPNE19-05.1a (*aac(6')**lb102*), *E. coli* CSH116 64-8-33 pHPNE19-05.1b (*aac(6')**lb179*) und *E. coli* CSH116 64-8-33 pHPNE19-08 (*aac(6')**ly*) verwendet.

Zu Beginn wurden LB-Agarplatten hergestellt, die verschiedene Konzentration des zu testenden Antibiotikums enthielten. Danach wurde in 48 Vertiefungen einer Mikrotiterplatte mit 96 Kavitäten je 100 μ l LB-Medium vorgelegt. Mit einem Glasstab wurde je eine Kolonie der zu untersuchenden Stämme gepickt und das Medium in der Vertiefung angeimpft. Die Platte wurde verschlossen und über Nacht bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. In die andere Hälfte der Vertiefungen wurde am folgenden Tag 100 μ l 0,9 %ige NaCl-Lösung zur Herstellung einer Verdünnung der ÜN-Kultur vorgelegt. Anschließend wurde ein steriler Replikator kurz in die bewachsenen Kavitäten hineingetaucht und der jeweils mitgeschleppte Tropfen direkt in der NaCl-Lösung verdünnt. Der Replikator wurde ausgeglüht, in die Kavitäten mit den verdünnten Bakterienlösungen eingetaucht und auf LB-Agarplatten mit verschiedenen Konzentrationen an Antibiotikum gestempelt. Die Platten wurden über Nacht bei 37 °C inkubiert und am folgenden Tag ausgewertet.

2.2.1.11 ***In vitro* Selektion resistenter Keime mit Hilfe von selektiven Agarplatten**

Bei diesem Selektionsversuch werden die verwendeten Bakterienstämme sprunghaft erhöhten Antibiotikakonzentrationen auf einer Agarplatte ausgesetzt mit dem Ziel, Mutanten zu generieren.

Dazu wurden nach Bestimmung der Empfindlichkeit (siehe 2.2.1.10) pro zu untersuchenden Stamm zehn LB-Agarplatten mit der zweifachen bzw. der vierfachen MHK des Stammes

Material und Methoden

gegossen. Anschließend wurden 100 ml autoklaviertes SOC-Medium steril in einen 250 ml Kolben gefüllt und bei Bedarf mit entsprechenden Antibiotika versetzt. Die Kolben wurden mit 1-3 Bakterienkolonien angeimpft und ÜN bei 37 °C und 130 rpm geschüttelt. Am folgenden Tag wurde die Kultur am Photometer bei 600 nm vermessen und die Suspension auf eine Konzentration von 1×10^{11} Zellen pro ml eingestellt, wobei 2,5 ml Zellsuspension mindestens benötigt wurden.

Von der eingestellten Zellsuspension wurden 500 µl zur Bestimmung der Zellzahl (0) verwendet und je 1000 µl zu je 100 µl auf die entsprechenden LB-Platten mit einem Glasstab ausplattiert und über Nacht bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Am folgenden Tag wurden alle Platten ausgezählt, die Mutationsfrequenz (siehe 2.2.1.14) bestimmt und einzelne Kolonien auf entsprechenden Agarplatten verwahrt. Nach einer Vorauswahl der verwahrten Stämme durch Bestimmung der MHK (Agardilution) von Norfloxacin und Kanamycin wurden die Stämme mittels RFLP (2.2.2.12) überprüft. Von *aac(6')Iy*-positiven Stämmen wurde Plasmid isoliert (2.2.2.2), durch Transformation (2.2.1.7) in *E. coli* JM109 vereinzelt und mittels MHK-Bestimmung (Agardilution) analysiert. In der vorliegenden Arbeit wurde die Methode genutzt, um die Stämme *E. coli* CSH116 64-8-33 pHPNE19-05.1 (*aac(6')Ib-wt*), *E. coli* CSH116 64-8-33 pHPNE19-05.1a (*aac(6')Ib102*), *E. coli* CSH116 64-8-33 pHPNE19-05.1b (*aac(6')Ib179*) und *E. coli* CSH116 64-8-33 pHPNE19-08 (*aac(6')Iy*), sowie die Stämme *E. coli* WT (GK 571) pSTV28::qepA, *E. coli* WT (GK 571) pHPNE19-03.1 (*qnrS1*) und *E. coli* WT (GK 571) pHPNE19-01.1b (*aac(6')Ib-cr*) zu selektieren.

2.2.1.12 *In vitro* Selektion resistenter Keime durch Anzucht in Flüssigkulturen

Die Methode wurde zur Mutagenese der Stämme *E. coli* CSH116 64-8-33 pHPNE19-05.1 (*aac(6')Ib-wt*), *E. coli* CSH116 64-8-33 pHPNE19-05.1a (*aac(6')Ib102*), *E. coli* CSH116 64-8-33 pHPNE19-05.1b (*aac(6')Ib179*) und *E. coli* CSH116 64-8-33 pHPNE19-08 (*aac(6')Iy*) verwendet, um schrittweise Mutanten auf ansteigenden Antibiotikumkonzentrationen im Medium zu selektieren, deren Empfindlichkeit gegenüber dem eingesetzten Antibiotikum (hier Norfloxacin) herabgesetzt wird.

Für die Mutagenese wurden jeweils 100 µl Zellsuspension einer ÜN-Kultur in fünf mit 10 ml LB-Medium (50 µg/ml Ampicillin) gefüllten Kolben geimpft. Die Kolben wurden entsprechend des MHK-Wertes von Norfloxacin für einen Stamm mit Norfloxacin in einer Konzentration von 0,5 x MHK, 1 x MHK, 2 x MHK, 3 x MHK, 4 x MHK versetzt und 24 h bei 70 rpm und 37 °C inkubiert. Am folgenden Tag wurde aus dem bewachsenen Kolben mit der

höchsten Konzentration von Norfloxacin eine neue Passage angeimpft, die höchste bewachsene Konzentration wurde dann als 1 x MHK bezeichnet, daran orientierten sich dann die anderen Konzentrationen. Teilweise wurde Norfloxacin in einer Konzentration von 0,5 x MHK, 1 x MHK, 1,25 x MHK, 1,5 x MHK, 1,75 x MHK verwendet, da die Stämme nicht im Kolben 2 x MHK anwuchsen. Die Selektion erfolgte über insgesamt 11 Tage, hierbei wurden die Stämme zehnmal in ansteigenden Antibiotikakonzentrationen passagiert. Abbildung 2-2 zeigt schematisch das Vorgehen bei der Selektion (jeweils für einen Stamm).

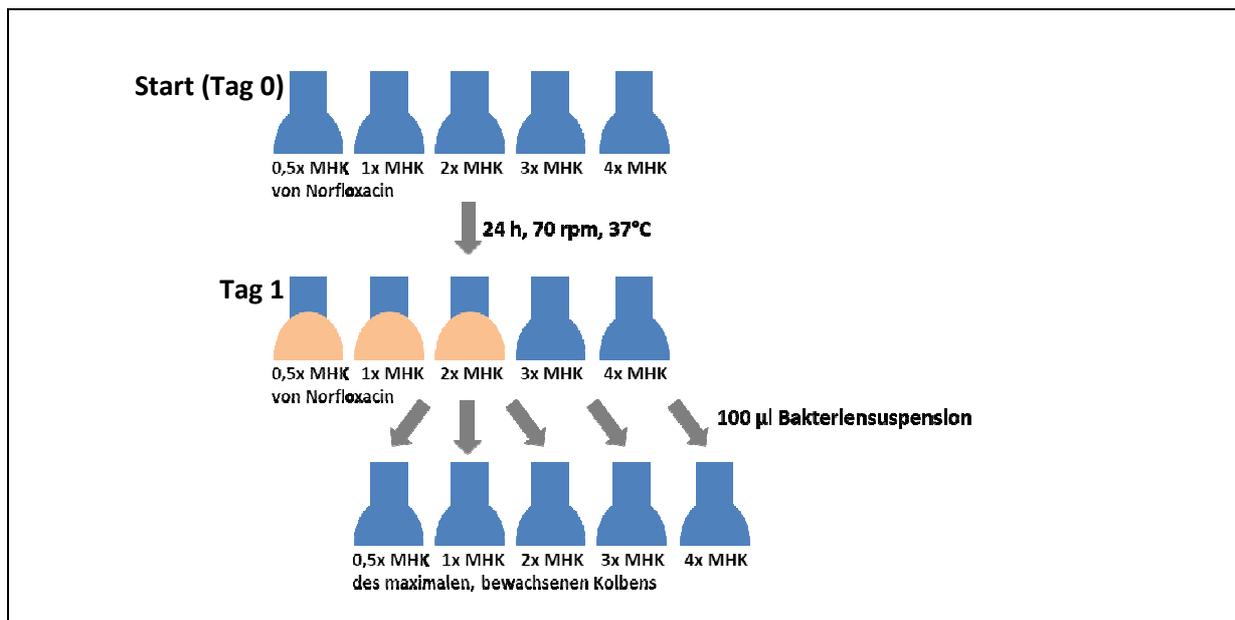


Abbildung 2-2 Schematische Darstellung des Vorgehens bei der Selektion in Flüssigkultur.

Bei jeder Passage wurde eine Probe der Bakteriensuspension, mit der ein neuer Zyklus angeimpft wurde, auf einer LB-Agarplatte gestrichen, dadurch vereinzelt und nach Inkubation von ca. 15 h bei 37 °C ca. 12 Kolonien verwahrt. Die vereinzelt Kolonien wurden zunächst mittels PCR (2.2.2.8) auf die Anwesenheit von *aac(6')Ib* bzw. *aac(6')Iy* überprüft. Danach wurden *aac(6')Ib*-positive Stämme mittels RFLP (2.2.2.12) und ARMS-PCR (2.2.2.8.6) kontrolliert und von *aac(6')Iy*-positiven Stämmen wurde Plasmid isoliert, durch Transformation in *E. coli* JM109 vereinzelt und mittels MHK-Bestimmung (Mikrodilution) analysiert.

2.2.1.13 Bestimmung der Lebendkeimzahl (KBE, Kolonie bildenden Einheiten)

Die Bestimmung der KBE diene der Erfassung aller lebenden Zellen in einer Bakteriensuspension. Dazu wurde von einer Bakterienkultur eine Verdünnungsreihe

Material und Methoden

(stufenweise, 1:10) bis zu einer Verdünnung von 10^{-9} angefertigt. Im Anschluss wurden zwei LB-Platten geviertelt und je 50 μl der Verdünnungen 10^{-2} - 10^{-9} mit einem sterilen Glasstab ausplattiert. Die Platten wurden über Nacht bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Am folgenden Tag wurden die Kolonien gezählt. Zur Auswertung diente die Verdünnungsstufe, bei der zwischen 15 und 150 Kolonien gezählt wurden. Die KBE berechnete sich nach folgender Formel:

$$\text{KBE/ml} = \frac{\text{Anzahl der Kolonien}}{\text{Verdünnungsstufe} \times \text{aufgetragenes Volumen (ml)}}$$

Formel 1 Berechnung der KBE.

2.2.1.14 Bestimmung der Mutationsfrequenz

Die Methode wurde ähnlich durchgeführt, wie die *in vitro* Selektion von Mutanten durch Anzucht in Flüssigkultur, vergleiche Abschnitt 2.2.1.12.

Zur Bestimmung der Mutationsfrequenz wurden 40 ml einer Zellsuspension 1:20 aufkonzentriert und je 100 μl auf insgesamt 10 Antibiotikumhaltigen-Agarplatten ausgestrichen. Die Antibiotikumkonzentration richtete sich nach dem 2 x bzw. 4 x MHK-Wert des zu untersuchenden Stammes. Nach Inkubation bei 37 °C über Nacht wurden die Zellen ausgezählt und die Mutationsrate nach folgender Formel berechnet.

$$\text{Mutationsfrequenz} = \frac{\text{Mutanten (ml)}}{\text{KBE(ml)}}$$

Formel 2 Berechnung der Mutationsrate.

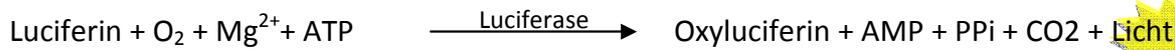
Zur Bestimmung der Lebendkeimzahl (KBE) siehe Absatz 2.2.1.13.

2.2.1.15 Messung der Luciferaseaktivität am Luminometer Lucy 2

Um den Effekt des in *E. coli* CSH116 64-8-33 durch Selektion zufällig entstandenen Basenaustausches der palindromischen AcrR-(AcrS) Bindestelle auf die Promotoraktivität von *acrAB* zu untersuchen, wurde das von Nina Matthiessen entwickelte Luciferase-System mit Plasmid pPHB331 verwendet (103).

Dieses System nutzt das Gen *luc* aus dem nordamerikanischen Feuerschwanz *Photinus pyralis* als Reporter gen. *Luc* kodiert für die Luciferase, die in der Lage ist, in Gegenwart von Sauerstoff, Magnesiumkationen und ATP ihr Substrat Luciferin zu Oxyluciferin abzubauen.

Bei der Reaktion entsteht Licht, dessen Intensität bei 560 nm als Biolumineszenz in Relative Light Units (RLU) im Luminometer messbar ist.



Auf Plasmid pPHB331 ist der Luciferase-Promotor durch den *acrAB*-Promotor inklusive der AcrR-(AcrS) Bindestelle ersetzt. Die gemessene Biolumineszenz, die sich durch die Luciferase-Aktivität ergibt, ist somit direkt abhängig von der Aktivität des *acrAB*-Promotors.

Der in *E. coli* CSH116 64-8-33 gefundene Basenaustausch in der palindromischen Bindestelle von AcrR-(AcrS) wurde mittels SSM-PCR (siehe 2.2.2.8.4) in das Plasmid pPHB331 eingeführt. Das erhaltene Plasmid pPHB331.1, mit dem Basenaustausch, und Plasmid pPHB331 wurden in *E. coli* JM109 transformiert. Von den Stämmen *E. coli* JM109 pPHB331 und *E. coli* JM109 pPHB331.1 wurde jeweils eine Kultur unter Zusatz von Tetrazyklin als Selektionsantibiotikum angezogen. *E. coli* JM109 pPHB331 diene als Referenz.

10 ml NI Medium wurden 1:100 mit der entsprechenden Übernachtskultur angeimpft und bei 37 °C und 130 rpm bis zu einer $OD_{550} = 0,5-0,8$ inkubiert. Anschließend wurden 2 x 90 µl der Kultur in ein 1,5 ml Reagiergefäß gegeben, mit 10 µl Stabilisierungspuffer versetzt und für mindestens 10 min bei -80 °C eingefroren, um die Integrität der Zellmembranen zu stören. Zur Zelllyse wurden 300 µl Lysispuffer pro Probe zu den aufgetauten Proben gegeben und 10-30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Zur Messung wurden aus dem lysierten Ansatz zweimal 2,5 µl entnommen und in den Kavitäten einer weißen, für luminometrische Messungen geeigneten Mikrotiterplatte vorgelegt. Zu jeder dieser Proben wurden 25 µL Luciferase Assay Reagent (LAR) hinzugefügt. Da der Abbau des Luciferins durch die Luciferase sofort stattfand und das entstehende Lichtsignal nicht lange stabil war, musste die Mikrotiterplatte unverzüglich im Luminometer Lucy 2 der Firma Anthos positioniert und die Messung gestartet werden.

Mit der Software Lucysoft (Version 1.6) wurde die Lichtintensität in *relative light units* (RLU) gemessen. Um daraus die spezifische Promotoraktivität zu berechnen, wurde der Mittelwert aus den zwei Messwerten einer Doppelbestimmung auf die OD_{550} zum Zeitpunkt der Probenentnahme bezogen.

Material und Methoden

Stabilisierungspuffer (KPE-Puffer)

1 M Dikaliumhydrogenphosphat (K_2HPO_4 , $M=174,18g/mol$) und 20 mM EDTA ($M=174,18g/mol$) werden mit Aqua dest. auf einen pH von 7,8 mit Phosphorsäure eingestellt. Der Puffer wurde bei Raumtemperatur gelagert.

Lysis-Puffer

Der Lysis-Puffer wurde vor gebrauch frisch hergestellt. Dazu wurden für einen Ansatz 15 μL Lysozym (100 mg/ ml) mit 10 μL BSA (100 mg/ ml), 80 μL 5 x CCLR und 195 μL H₂O gemischt.

2.2.2 Arbeiten mit DNA

2.2.2.1 Isolierung von Gesamt-DNA durch „Aufkochen“

Diese Methode wurde zur schnellen Isolierung von DNA herangezogen. Drei bis fünf Kolonien wurden in 100 μL dH₂O resuspendiert und 15 min bei 100 °C inkubiert. Nach 5 minütigem zentrifugieren bei 13.000 rpm kann der klare Überstand in ein frisches 1,5 ml Reagiergefäß pipettiert werden. Die Proben lagerten bei -20 °C.

2.2.2.2 Isolierung von Plasmid-DNA durch alkalische Lyse

Zur Isolierung von Plasmid-DNA wurde die Methode der alkalischen Lyse, die auf dem Prinzip der spezifischen alkalischen Denaturierung von chromosomaler DNA beruht, angewandt. Die von Birnboim und Doly, 1979 ursprünglich beschriebene Methode wurde in dieser Arbeit wie folgt durchgeführt (17).

Zur Plasmidisolierung wurden am Abend zuvor 3 ml LB-Medium im Reagenzglas mit einer Kolonie des entsprechenden Stammes angeimpft und über Nacht bei 37 °C und 130 rpm inkubiert. Am folgenden Tag wurden 1,5-3 ml der ÜNK 3 min bei 5.000 rpm abzentrifugiert, der Überstand verworfen und das verbleibende Zellpellet mit 100 μL kaltem GTE-Puffer vollständig resuspendiert. 200 μL des zuvor frisch zubereiteten Lysepuffers wurden hinzugegeben, der Ansatz wurde sofort geschüttelt und auf Eis gestellt. In diesem Schritt werden die Zellen durch die stark alkalische Lösung und Detergenz aufgebrochen. Die DNA, aber auch doppelsträngige Bereiche von RNA werden so denaturiert. Die RNA wurde durch die im GTE-Puffer enthaltene RNase hydrolysiert. Hier sollte zügig weitergearbeitet werden. Nach anschließender Zugabe von 150 μL kaltem Neutralisationspuffer, wurde sofort gevortext und ca. 3-5 min auf Eis inkubiert. Im Gegensatz zu chromosomaler DNA renaturiert

Plasmid-DNA unter diesen Bedingungen. Um Zelltrümmer und chromosomale DNA zu präzipitieren, wurde 5 min bei 15.000 rpm zentrifugiert und der Überstand (ca. 400 µl) in ein frisches 1,5 ml Reagierröhrchen gegeben, wobei das Präzipitat nicht mitgeschleppt werden durfte. Gegebenenfalls konnte an dieser Stelle mit Phenol-Chloroform extrahiert werden (siehe 2.2.2.3) um noch vorhandene Zellbestandteile zu entfernen, bevor zuletzt die Ethanolfällung (siehe 2.2.2.4) folgte.

GTE-Puffer

Zur Herstellung von 1 ml GTE-Puffer wurden 50 µl 1 M sterile Glukose (50 mM), 25 µl 1 M Tris/HCL pH 8,0 (25 mM), 20 µl 0,5 M EDTA pH 8,0 (10 mM), 20 µl RNase 200µg/ml und 885 µl dH₂O gemischt und bei 4 °C gelagert.

Lysepuffer

Zur Herstellung von 1 ml Lysepuffer wurden 200 µl 1 M NaOH (0,2 M), 100 µl 10 % SDS (1 %) und 700 µl dH₂O gemischt. Der Lysepuffer wurde immer frisch angesetzt.

Neutralisationspuffer (pH 4,8)

Zur Herstellung von Neutralisationspuffer wurden 60 ml 5 M Kaliumacetatlösung mit 11,5 ml Eisessig und 28,5 ml dH₂O vermischt. Der Neutralisationspuffer wurde bei RT gelagert.

2.2.2.3 Phenol-Chloroform-Extraktion

Um eine DNA-Lösung von Verunreinigungen durch Proteine, Polysaccharide oder SDS zu befreien, wurde eine Extraktion der DNA mit Phenol-Chloroform durchgeführt.

Die DNA-Lösung wurde mit einem Volumen Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1, v/v) versetzt und gründlich ausgeschüttelt. Durch Phenol werden die Proteine denaturiert und sammeln sich in der unteren, organischen Phase an. Die obere, wässrige Phase, in der sich die DNA befindet, konnte nach 5 minütiger Zentrifugation bei 13.000 rpm in ein frisches Reagiergefäß überführt werden, bei Bedarf wurde die Probe ein zweites Mal ausgeschüttelt bevor sich die Ethanolfällung anschloss.

2.2.2.4 Ethanolfällung

Die Methode wurde zur Präzipitation von DNA durchgeführt. Gegebenenfalls wurde zum Ansatz 3M Natriumacetatlösung pH 4,6 für eine Endkonzentration von 0,3 M hinzu

Material und Methoden

pipettiert. Anschließend wurden zwei Volumen absolutes Ethanol hinzugegeben und ca. 2 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde die DNA durch 25 min Zentrifugation bei 20.000 rpm pelletiert, der Überstand sollte vorsichtig abgenommen werden. Das DNA-Pellet wurde mit 1 ml 70 % Ethanol versetzt und erneut bei 20.000 rpm für 5 min zentrifugiert. Der Überstand konnte verworfen werden, das Pellet wurde bei 37 °C im Brutschrank getrocknet. Das Pellet wurde zuletzt in 30 µl 1:10 verdünntem EB-Puffer resuspendiert. Lagerung bei -20 °C.

3M Natrium-Acetat-Lösung pH 4,6

Für 100 ml Lösung wurden 40,82 g Natrium-Acetat Trihydrat in 50 ml H₂O gelöst und mit Eisessig auf pH 4,6 eingestellt und autoklaviert. (MW = 136,08 g/mol)

2.2.2.5 Isolierung von Plasmid-DNA durch das HiYield® Plasmid Mini Kit

Die Isolierung von reiner Plasmid-DNA, ohne Zellbestandteile, erfolgte im Fall von Stämmen, die Nukleasen besitzen, mit Hilfe des HiYield® Plasmid Mini Kit nach den Angaben des Herstellers. Die Plasmide wurden in 30 µl 1:10 verdünnten Elutionspuffer eluiert.

2.2.2.6 Isolierung von Plasmid-DNA durch das NucleoBond Xtra® Midi Kit

Die Isolierung von Plasmid-DNA in größeren Mengen (≥ 250 ng) oder von Plasmiden die größer sind als 65 kb erfolgte mit dem NucleoBond Xtra® Midi Kit nach den Angaben des Herstellers MACHERY-NAGEL GmbH & Co. KG. Die getrockneten Plasmide wurden nach der ebenfalls vom Hersteller beschriebenen Fällung mit Isopropanol in 30 µl 1:10 verdünnten TE-Puffer (im Kit enthalten) aufgenommen.

2.2.2.7 Isolierung von Plasmid-DNA nach Toranzo (modifiziert)

Zur Isolierung von großen Plasmiden wurde die Methode von Toranzo, die auf der Methode von Kado & Liu basiert, angewendet (80, 151). Dazu wurde eine über Nacht Kultur mit 3-4 ml LB-Medium angezogen (späte exponentielle Phase), danach 1,5 ml der Zellsuspension in ein frisches 1,5 ml Reagierröhrchen gegeben und 3 min bei 12000 x g zentrifugiert. Nachdem der Überstand verworfen wurde, wurde das Pellet in 50-75 µl Lysing Solution resuspendiert und für 45 min bei 55-60 °C im Wasserbad inkubiert. Anschließend wurde das gleiche Volumen (v:v, 1:1) Phenol/Chloroform/IAA (25:24:1) hinzugegeben, 10 min bei 12000 x g zentrifugiert und zuletzt die wässrige Phase in ein frisches 1,5 ml Probenröhrchen überführt. Der Ansatz

konnte direkt zur Gelelektrophorese genutzt werden, oder wurde zur weiteren Verwendung (z. Bsp. zur Transformation) mit Ethanol gefällt werden, dazu siehe 2.2.2.4.

Lysing Solution

3 % SDS

50 mM Tris-Acetat

auf pH 12,4 einstellen

2.2.2.8 Polymerase Ketten Reaktion

Zur *in vitro* Amplifizierung eines definierten DNA-Abschnitts wurde die Polymerase Kettenreaktion (Polymerase Chain Reaction, PCR) durchgeführt (132, 133). Nachdem die Stränge der Template-DNA (Ausgangs-DNA) im Denaturierungsschritt getrennt werden, hybridisieren beim Absenken der Temperatur die Oligonukleotid-Primer an die einzelsträngige Template-DNA (Annealing). Dabei sind Primer sequenzspezifisch und binden im Randbereich des zu amplifizierenden DNA-Abschnitts. Ein Primer bindet komplementär zum 5'-Ende des kodierenden, ein Primer komplementär zum 5'-Ende des nichtkodierenden Stranges, sodass die freien 3'-OH Enden der Primer als Startpunkte für die DNA-Polymerase zur Synthese eines jeweils komplementären DNA-Stranges dienen, der wiederum in der fortlaufenden Reaktion selbst als Template fungiert. Die Synthese erfolgt in 5'-3'-Richtung bei einer Temperatur von 72 °C (Elongationsphase). Die PCR wurde mit hitzestabiler *Taq*-DNA-Polymerase aus *Thermus aquaticus* oder mit *Pfu*-DNA-Polymerase aus *Pyrococcus furiosus* durchgeführt (vergleiche 2.2.2.8.3).

Material und Methoden

2.2.2.8.1 Standard-PCR-Ansatz

In Tabelle 2-25 ist der Standard-PCR-Ansatz zusammengefasst. Die PCR mit 25 µl bzw. 50 µl wurde in 0,2 ml Probenröhrchen durchgeführt. Bei einem Ansatz von 100 µl wurde ein 0,5 ml Probenröhrchen verwendet.

Tabelle 2-25 Zusammensetzung des Standard-PCR-Ansatzes.

Lösung / DNA	50 µl Ansatz (Menge in µl)	25 µl Ansatz (Menge in µl)
10 x DreamTaq™ Buffer	5	2,5
2 mM dNTPs	1,25	0,625
Primer for (10 pmol/µl)	1	0,5
Primer rev (10 pmol/µl)	1	0,5
DreamTaq™ DNA Polymerase, Taq DNA Polymerase	0,25	0,125
Template DNA (ca. 50 – 100 ng/µl), DNA aus der Kochmethode	X 1	x
A. dest. (LiChrosolv®)	ad 50 µl	ad 25 µl

Die PCR wurde mit folgendem Standard-Programm (Tabelle 2-26) durchgeführt.

Tabelle 2-26 Beschreibung der Schritte des Standard-PCR-Programms.

Schritt	Temperatur	Dauer	Anzahl der Zyklen
Initiale Denaturierung	95 °C	5 min	1 x
Denaturierung	95 °C	30 s	30 x
Primer-Annealing	T _a °C	30 s	
Elongation	72 °C	30 s – 3,5 min	
Finale Elongation	72 °C	5 – 10 min	1 x

Die Annealingtemperatur (T_a) wurde durch die jeweilige Schmelztemperatur (T_m) des Primers abzüglich fünf Grad Celsius ermittelt. (T_m = (Anzahl der Basen A + T) x 2 + (Anzahl der Basen C + G) x 4) Die Dauer der Elongation richtete sich nach der zu erwarteten Länge des PCR-Fragments (1000 bp / Minute).

2.2.2.8.2 Gradienten-PCR

Die Gradienten-PCR wurde mit neuen Primerpaaren zur Bestimmung der optimalen Annealingtemperatur durchgeführt. Dazu wurde ein 50 µl PCR-Ansatz hergestellt und zu je

10 µl auf insgesamt fünf 0,2 ml Probenröhrchen verteilt. Die PCR wurde mit dem bereits beschriebenen Programm (Tabelle 2-26) mit dem Biometra T Gradient durchgeführt, der entsprechend programmiert wurde.

2.2.2.8.3 Amplifizierung von Fragmenten zur Klonierung

Die Amplifizierung von Fragmenten zur Klonierung wurde mit Phusion™ High-Fidelity DNA Polymerase (*Pfu*-DNA-Polymerase aus *Pyrococcus furiosus*) durchgeführt, die 3'-5'-Exonukleaseaktivität besitzt und fünfzigmal weniger Fehler generiert, als die *Taq*-DNA-Polymerase aus *Thermus aquaticus*. Hierfür wurde folgender Ansatz (Tabelle 2-27) gewählt.

Tabelle 2-27 Zusammensetzung des Phusion-PCR-Ansatzes.

Lösung / DNA	50 µl Ansatz (Menge in µl)
5 x Phusion-HF Buffer	10
2 mM dNTPs	5
Primer for (10 pmol/µl)	1
Primer rev (10 pmol/µl)	1
Phusion™ High-Fidelity DNA Polymerase	0,5
Template DNA (50 – 100 ng/µl), DNA aus der Kochmethode	x 1
A. dest. (LiChrosolv®)	ad 50 µl

Die PCR wurde mit folgendem Programm (Tabelle 2-28) durchgeführt.

Tabelle 2-28 Beschreibung der Schritte des Phusion-PCR-Programms.

Schritt	Temperatur	Dauer	Anzahl der Zyklen
Initiale Denaturierung	98 °C	5 min	1 x
Denaturierung	98 °C	30 s	30 x
Primer-Annealing	T _a °C + 3 °C	30 s	
Elongation	72 °C	30 s – 3,5 min	1 x
Finale Elongation	72 °C	5 – 10 min	

Grundsätzlich wurden 5 µl eines Standard-PCR Ansatzes und des Phusion-PCR Ansatzes, sowie der komplette Ansatz der Gradienten-PCR durch Gelelektrophorese aufgetrennt.

Material und Methoden

dNTP-Mix

Die verschiedenen dNTPs wurden mit einer jeweiligen Endkonzentration von 2 mM mit H₂O gemischt und aliquotiert. Die Aliquots wurden bei -20 °C aufbewahrt.

2.2.2.8.4 PCR zur Rekombination und ortsspezifischen Mutagenese (*site-specific mutagenesis*, SSM-PCR) durch Totalreplikation von Plasmiden mit überlappenden Primern

Zur Einführung und Deletion von Mutationen in Plasmid-DNA wurde die auf der von Jones *et al.* basierende Methode angewendet (78). Hierfür wurden die Primerpaare so konstruiert, dass das lineare PCR-Produkt von identischen Sequenzen (ca. 20 bp) flankiert ist, dazu dienten Primer mit überlappenden Enden, wobei nur ein Primer die Mutation aufweist. Folgende Abbildung 2-3 zeigt beispielhaft ein Schema zur Konstruktion eines Primerpaares.

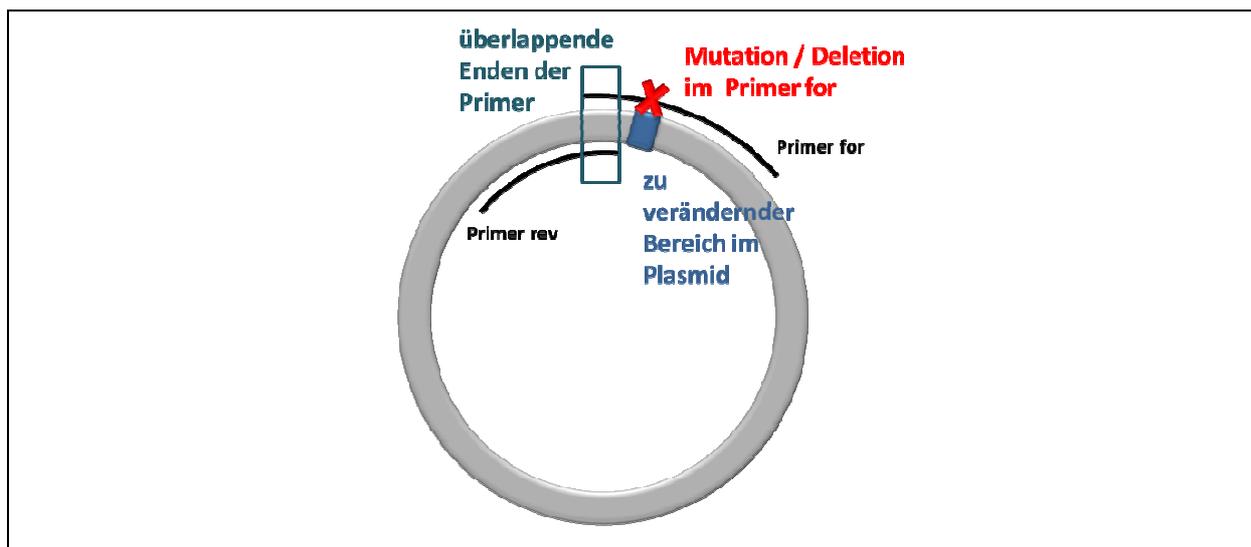


Abbildung 2-3 Schema zur Konstruktion der Primer für die SSM-PCR.

Die SSM-PCR wurde in dieser Arbeit genutzt um in die Plasmide pHNE18/19/23 und deren Derivate Deletionen und Insertionen sowie verschiedene Mutationen einzuführen. Hierfür wurde mit Plasmid-DNA isoliert aus alkalischer Lyse folgender Ansatz hergestellt, siehe Tabelle 2-29. Die PCR wurde mit Phusion™ High-Fidelity DNA Polymerase durchgeführt.

Tabelle 2-29 Zusammensetzung des SSM-PCR-Ansatzes.

Lösung / DNA	50 µl Ansatz (Menge in µl)
5 x Phusion-HF Buffer	10
2 mM dNTPs	6,25
Primer for (10 pmol/µl)	1
Primer rev (10 pmol/µl)	1
Phusion™ High-Fidelity DNA Polymerase	0,5
Plasmid-DNA aus alkalischer Lyse	0,5
A. dest. (LiChrosolv®)	30,75

Die SSM-PCR wurde mit folgendem Programm (Tabelle 2-30) durchgeführt.

Tabelle 2-30 Beschreibung der Schritte des SSM-PCR-Programms.

Schritt	Temperatur	Dauer	Anzahl der Zyklen
Initiale Denaturierung	98 °C	5 min	1 x
Denaturierung	98 °C	45 s	30 x
Primer-Annealing	70 °C	45 s	
Elongation	72 °C	3 min	
Finale Elongation	72 °C	10 min	1 x

5 µl des PCR-Ansatzes wurden schließlich durch Gelelektrophorese in einem 1 %igen Agarosegel in 0,5 % TAE mit Ethidiumbromid aufgetrennt. Nach erfolgreicher PCR wurden die restlichen 45 µl mit dem NucleoSpin® Extract II Kit (siehe 2.2.2.11) aufgereinigt, in 30 µl 1:10 verdünntem NE-Puffer eluiert und 3 µl erneut im Agarosegel aufgetrennt.

Um das Ausgangsplasmid zu entfernen, wurden 17 µl des aufgereinigten linearen PCR-Produktes mit dem Enzym *DpnI* gespalten. *DpnI* erkennt methylierte DNA und spaltet diese spezifisch. Um den Erfolg zu kontrollieren, wurde hier eine Kontrolle gebraucht, dazu wurden 0,5 µl des Ausgangsplasmid der PCR in 29,5 µl 1:10 verdünntem NE-Puffer verdünnt und ebenfalls 17 µl mit *DpnI* verdaut. Der Ansatz setzte sich wie folgt zusammen (Tabelle 2-31).

Material und Methoden

Tabelle 2-31 Zusammensetzung der *DpnI*-Spaltung der Probe und der mitgeführten Kontrolle.

Lösung / DNA	20 µl Ansatz (Menge in µl)
FD-Buffer	2
Enzym <i>DpnI</i> von Fermentas	1
aufgereinigtes PCR-Produkt	17

Die Ansätze wurden 1 h bei 37 °C in der programmierten PCR-Maschine inkubiert, 20 min bei 80 °C inaktiviert und direkt transformiert (siehe 2.2.1.7). Die Zellen wurden zu 100 µl und 300 µl Aliquots auf vorbereitete Selektivagarplatten ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Auf den Platten mit dem Kontrollansatz sollten keine Kolonien wachsen.

2.2.2.8.5 Error-prone PCR zur zufälligen Mutagenese

Die Error-prone PCR (von engl. *error-prone*, fehleranfällig, EP-PCR) wurde zur zufälligen Mutagenese eines definierten Genabschnitts verwendet. Bei Amplifizierung eines Genabschnitts, sollten zufällig Fehler im Kopiervorgang des Gens entstehen, um so eine Vielzahl unterschiedlicher Genprodukte zu generieren. Mangan (Mn^{2+}) sorgte dafür, dass die Polymerase ungenau arbeitete und so vermehrt Fehler in den amplifizierten Fragmenten entstanden. Um das Spektrum der entstandenen Fragmente zu erfassen, wurden die Fragmente durch Ligation in das Plasmid pUC19 kloniert und mittels Transformation in *E. coli* JM109 vereinzelt. Die Eigenschaften der Transformanden wurden durch Empfindlichkeitsbestimmung (Mikrodilution) analysiert.

In der vorliegenden Arbeit wurde zunächst als Template für die EP-PCR DNA des Stammes *E. coli* GK 2850 (*aac(6')Ib*) verwendet. Die EP-PCR erfolgte mit den Primern HindIII-aac(6') -66 for No.2 und HindIII-aac(6') +519 rev, deren Produkt von *HindIII*-sites flankiert ist. Zum Standard-Ansatz der PCR wurden je sieben differierende Konzentrationen Manganchlorid, von 0,01 mM bis 0,5 mM, hinzugegeben, zusätzlich eine Positivkontrolle ohne Manganchlorid, und folgendes EP-PCR-Programm mit 30 Zyklen gewählt, siehe Tabelle 2-32.

Tabelle 2-32 Beschreibung der Schritte des EP-PCR-Programms.

Schritt	Temperatur	Dauer	Anzahl der Zyklen
Initiale Denaturierung	95 °C	3 min	1 x
Denaturierung	95 °C	45 s	30 x
Primer-Annealing	58 °C	45 s	
Elongation	72 °C	3 min	
Finale Elongation	72 °C	10 min	1 x

Anschließend wurden die Ansätze mit 0,05 mM und 0,1 mM Manganchlorid ausgewählt, die PCR-Fragmente aufgereinigt (2.2.2.11) und durch Ligation (2.2.2.13) in *Hind*III gespaltenes Plasmid pUC19 (aus alkalischer Lyse, 2.2.2.2) mit anschließender Transformation (2.2.1.7) in kompetente *E. coli* JM109-Zellen vereinzelt. Im Folgenden wurden diese Transformanden mittels PCR (2.2.2.8) mit den Primern lacZ+3396rev und AAC6 +519 rev auf die Anwesenheit und Orientierung von *aac(6')Ib* untersucht und nach Bestimmung der Empfindlichkeit (Mikrodilution) von Kanamycin und Norfloxacin in Gruppen eingeteilt. Anschließend wurden von ausgewählten Stämmen das Gen *aac(6')Ib* sequenziert (2.2.2.14).

Ferner wurde als Template für die EP-PCR DNA des Stammes mit Plasmid pHPNE19-08 (*aac(6')Iy*) verwendet. Die EP PCR erfolgte hier mit den Primern *aac(6)-Iy+1for_Hind*III und *aac(6)-Iy+438rev_Hind*III. Zum Standard-Ansatz der PCR wurden jedoch nur drei differierende Konzentrationen Manganchlorid, von 0,01 mM bis 0,1 mM, hinzugegeben, zusätzlich eine Positivkontrolle ohne Manganchlorid, und das gleiche EP-PCR-Programm wie bei GK 2850 verwendet, siehe Tabelle 2-32. Wie zuvor wurden auch hier die Ansätze mit 0,05 mM und 0,1 mM Manganchlorid ausgewählt, die erhaltenen PCR-Fragmente aufgereinigt, mit *Hind*III gespalten und durch Ligation in *Hind*III gespaltenes Plasmid pUC19 und Transformation in *E. coli* JM109 vereinzelt. Hier wurden Transformanden mittels PCR auf die Anwesenheit und Orientierung von *aac(6')Iy* mit den Primern lacZ+3396rev und *aac(6)-Iy+438rev* untersucht. Nach Bestimmung der Empfindlichkeit durch Mikrodilution gegenüber Kanamycin und Norfloxacin, wurden diese in Gruppen eingeteilt und gegebenenfalls analysiert.

2.2.2.8.6 ARMS-PCR zur Detektion von spezifischen Mutationen

Die ARMS-PCR (Amplification Refractory Mutation System) wurde 1989 von C. R. Newton *et al.* als schnelle und genaue Analyse zur Detektion von bekannten chromosomalen

Material und Methoden

Mutationen beschrieben (113). In der vorliegenden Arbeit wurde die ARMS-PCR verwendet um den Basenaustausch von *aac(6')Ib* zu *aac(6')Ib-cr* an den Codon 102 bzw. 179, bei den Stämmen *E. coli* CSH116 64-8-33 pHPNE19-05.1 (*aac(6')Ib-wt*), *E. coli* CSH116 64-8-33 pHPNE19-05.1a (*aac(6')Ib102*) und *E. coli* CSH116 64-8-33 pHPNE19-05.1b (*aac(6')Ib179*), nach der Selektion zu detektieren. Dabei wurden insgesamt vier Primer konstruiert, zwei, die an Codon 102 *aac(6')Ib-wt* und *aac(6')Ib-cr* binden können sowie zwei, die an Codon 179 sowohl *aac(6')Ib-wt* als auch *aac(6')Ib-cr* binden können (siehe Tabelle 2-15). Bei allen ARMS-Primern war die drittletzte Position des 3'-Endes verändert. Die Primerkombinationen und Annealingtemperaturen (T_a) sind Tabelle 2-33 zusammengefasst.

Tabelle 2-33 Primerkombination und Annealingtemperaturen zur Durchführung der ARMS-PCR.

Zur Detektion von	Primer	T_a
Position 179 in AAC(6')Ib-wt	pHPNE19.05.1_ARMS_AS179_aac-wt_+517	54 °C
	pUC18_5-3	
Position 179 in AAC(6')Ib-cr	pHPNE19.01.1b_ARMS_AS179_aac-cr_+517	54 °C
	pUC18_5-3	
Position 102 in AAC(6')Ib-cr	pHPNE19.01.1b_ARMS_AS102_aac-cr_+322	62 °C
	lacZ+3396rev	
Position 102 in AAC(6')Ib-wt	pHPNE19.05.1_ARMS_AS102_aac-wt_+322	54 °C
	lacZ+3396rev	

Die PCR wurde mit dem unter 2.2.2.8 beschriebenen Ansatz und Programm durchgeführt. Als Kontrolle diente jeweils DNA der Stämme *E. coli* CSH116 64-8-33 mit Plasmid pHPNE19-05.1 für *aac(6')Ib-wt*, *E. coli* CSH116 64-8-33 mit Plasmid pHPNE19-05.1a für *aac(6')Ib102* und *E. coli* CSH116 64-8-33 mit Plasmid pHPNE19-05.1b für *aac(6')Ib179*. Zuletzt wurden je 5 μ l der PCR-Ansätze in einem 1 %igen Agarosegel mit 0,5 % TAE-Puffer mit Ethidiumbromid aufgetrennt und ausgewertet.

2.2.2.9 Auftrennung von DNA im Agarosegel

Nukleinsäuren wandern, aufgrund ihrer negativ geladenen Phosphatgruppen, im elektrischen Feld Richtung Anode. Diese Eigenschaft wird bei der Gelelektrophorese zur Trennung, Identifizierung und Größenbestimmung von DNA-Fragmenten genutzt.

Als Trennmatrice dient hier Agarose, ein Polysaccharid aus α -(1-3) und β -(1-4) glykosidisch verknüpften Galaktose Untereinheiten. Nach Erhitzen der Agarose in Wasser und Erkalten,

bildet sich eine 3D-Struktur aus den Fasern der Agaroseketten mit einem Porendurchmesser von 50 bis >200 nm (134). Je höher die Konzentration der Agarose, desto langsamer wandert die DNA. Bei konstanten Bedingungen hängt die Wanderungsgeschwindigkeit von der Länge der DNA (bp) ab, wobei kleinere Fragmente schneller wandern. Die Geschwindigkeit ist umgekehrt proportional zum dekadischen Logarithmus der Anzahl der Basenpaare (67).

Die Auftrennung von DNA erfolgte in einem Gel aus 0,8 % – 2 % Agarose 0,5 % TAE-Puffer in 0,5 % TAE-Puffer. Nach dem Schmelzen der Agarose in der Mikrowelle wurde auf 100 ml geschmolzenes, abgekühltes Gel 1 µl Ethidiumbromid direkt hinzugegeben und vermischt. Das Gel wurde vorsichtig und luftblasenfrei in eine vorbereitete Gelelektrophoresekammer gegossen. Grundsätzlich wurden 5 µl PCR-Produkt und 3 µl isolierte Plasmid-DNA mit ca. 2 µl Bromphenolblaulösung gemischt und bei einer Spannung von 8 V pro Zentimeter aufgetrennt.

Bromphenolblaulösung zum Beschweren

Bromphenolblau und Xylencyanol wurden mit 15 % Polysucroselösung auf eine jeweilige Endkonzentration von 0,25 % gebracht und aliquotiert. Die Aliquots wurden bei 4 °C aufbewahrt.

50 x TAE-Puffer für die Gelelektrophorese

Für einen Liter 50 x TAE-Puffer wurden Tris-Base mit einer Endkonzentration von 2 M (242,3 g) und EDTA (18,6 g) mit einer Endkonzentration von 50 mM mit 700 ml H₂O gemischt und mit Eisessig auf pH 8,0 eingestellt. Anschließend wurde die Lösung mit H₂O auf einen Liter aufgefüllt. Für eine Konzentration von 0,5 % TAE wurde der 50 x TAE Puffer entsprechend verdünnt.

2.2.2.10 Auftrennung von sehr großen Plasmiden

Die Gelelektrophorese erfolgte wie unter 2.2.2.9 beschrieben horizontal mit einer Konzentration von 0,5 – 0,7 % Agarose in E- Puffer. Die Elektrophorese wurde über Nacht bei 40 V durchgeführt. Zuletzt wurde das Gel in einem Wasserbad (ca. 500 ml) mit 5 µl Ethidiumbromid für ca. 20 min gefärbt, anschließend in einem Wasserbad entfärbt und dokumentiert.

Material und Methoden

1 x E-Puffer

40 mM Tris-Acetat,

2 mM Na₂ EDTA

mit Eisessig auf pH 7,9 einstellen

2.2.2.11 Extraktion und Aufreinigung von PCR-Produkten

Die Reinigung von PCR-Produkten wurde mit dem NucleoSpin® Extract II Kit nach dem Protokoll des Herstellers durchgeführt. Dies galt ebenfalls für die Extraktion von DNA-Fragmenten aus einem Agarosegel.

2.2.2.12 RFLP und Spaltung von DNA mittels Restriktionsenzymen

Als Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus (RFLP) bezeichnet man Unterschiede von DNA-Sequenzen, die nach der Spaltung mit einem oder mehreren Enzymen als verschiedene Restriktionsfragmentmuster bei der Gelelektrophorese sichtbar werden.

Mit Hilfe dieser Methode wurden in der vorliegenden Arbeit die Mutationen in *aac(6')Ib-wt* bzw. *aac(6')Ib-cr* an Position 102 und 179 unterschieden. Hierbei wurde ausgenutzt, dass das Enzym *FokI* in Position 102 bei *aac(6')Ib-wt*, das Enzym *NdeI* an Position 179 bei *aac(6')Ib-cr* schneidet. Zunächst wurde ein PCR-Fragment mit den Primern AAC6 +I for und AAC6 +519 rev hergestellt. Zur Restriktion wurde folgender Ansatz gewählt: 0,5 µl *FokI*, 0,5 µl *NdeI*, 2 µl FD-Buffer, 5 – 10 µl PCR-Produkt und entsprechend 7 µl bzw. 12 µl Merck-Wasser. Der Ansatz wurde 1 h bei 37 °C inkubiert und 20 min bei 65 °C inaktiviert. Durch Gelelektrophorese wurden die entstandenen Fragmente aufgetrennt und konnten anhand des entstandenen Muster unterschieden werden. Die Spaltung von PCR-Produkten sowie von Plasmid-DNA wurde nach den Angaben des Herstellers durchgeführt.

2.2.2.13 Klonierung von PCR-Fragmenten und Ligation

In der vorliegenden Arbeit wurde zur Klonierung der verschiedenen Gene eine Methode verwendet, die auf dem von Scharf *et al.* beschriebenen Prinzip beruht (138).

Dazu wurde ein PCR-Produkt mit Primern amplifiziert, an deren 5'-Enden eine Restriktionsschnittstelle vorhanden war. Die PCR wurde mit Phusion™ High-Fidelity DNA Polymerase (siehe Tabelle 2-27 und Tabelle 2-28) durchgeführt, die erhaltenen DNA-Fragmente wurden anschließend mit dem NucleoSpin® Extract II Kit (siehe 2.2.2.11) aufgereinigt und mit dem entsprechenden Enzym gespalten (Tabelle 2-34). Das Plasmid

wurde ebenfalls mit dem gleichen Enzym linearisiert und vor dem Ligationsschritt mit Alkalischer Phosphatase dephosphoriert (Tabelle 2-34), um die Religation des Vector und Vector-Vector Ligationen zu vermeiden. Anschließend wurde die Ligation in einem Verhältnis von 1:3 (Plasmid:Insert) mit T4 Ligase (1 µl, 440 U) und passendem Puffer (Tabelle 2-4) in einem 20 µl-Ansatz mit einer Gesamt-DNA-Konzentration von 1-10 ng/µl, für 16 h bei 16 °C durchgeführt (10 min, 65 °C zur Inaktivierung). Zuletzt wurde der Ansatz in *E. coli* JM109 transformiert und auf Agarplatten mit einem entsprechenden Selektionsantibiotikum ausplattiert (2.2.1.7). Da hier die Klonierung ungerichteten erfolgte wurden die Plasmide anschließend mittels PCR auf die korrekte Orientierung des Inserts überprüft. Tabelle 2-34 zeigt die einzelnen Zusammensetzungen der vorgenommenen Restriktionen.

Tabelle 2-34 Zusammensetzung der Ansätze zum Verdau der PCR-Fragmente, der Plasmid-DNA und zur Behandlung von Plasmid-DNA mit Alkalischer Phosphatase, sowie die Angaben der Temperatur und Dauer der Restriktion.

Lösung/DNA	Verdau PCR-Fragment (in µl)	Verdau Plasmid (in µl)	Alkalische Phosphatase-Verdau des linearisierten Plasmid (in µl)
Puffer	3	2	5
Enzym	1	1	2,5
DNA	x	x	x
A. dest. (LiChrosolv®)	ad 30	ad 20	ad 50
Verdau	1 h, 37 °C, entsprechende Inaktivierung	1 h, 37 °C, entsprechende Inaktivierung	1 h, 37 °C, 20 min 65°C zur Inaktivierung

2.2.2.14 Sequenzierung von PCR-Fragmenten

Zur Sequenzierung wurde der GenomeLab™ GeXP Genetic Analysis System DNA-Sequencer der Firma Beckmann Coulter verwendet. Das System nutzt das Cycle Sequencing, das auf dem von Sanger *et al.* basierten Kettenabbruchverfahren (136) basiert.

Zur Sequenzierung von PCR-Fragmenten wurde das PCR-Produkt zunächst durch Exonuklease I und Alkalische Phosphatase (Fast AP) enzymatisch aufgereinigt. Dazu wurden 5 µl PCR-Produkt mit 0,5 µl (10 U) Exonuklease I und 1 µl (1 U) Alkalische Phosphatase versetzt, anschließend 15 min bei 37 °C und 15 min bei 85 °C inkubiert. Für die Sequenzierung von PCR-Fragmenten bis zu einer Größe von 400 bp wurden 5-40 ng DNA, für PCR-Fragmente bis zu einer Größe von 1000 bp wurden 30 – 100 ng DNA eingesetzt. Zur

Material und Methoden

DNA wurde 1 µl Primer in einer Konzentration von 10 pmol/µl hinzugegeben sowie 1 µl Quick Start Mix und 3 µl Sequencing Reaction Buffer bei einer Größe bis 450 bp, 2 µl Quick Start Mix und 2 µl Sequencing Reaction Buffer bei einer Größe über 450 bp und 3 µl Quick Start Mix und 1 µl Sequencing Reaction Buffer bei einer Größe von 1000 bp. Der Ansatz wurde mit LiChrosolv® Wasser auf ein Volumen von 20 µl gebracht und bei folgendem Programm inkubiert (siehe Tabelle 2-35).

Tabelle 2-35 Beschreibung des Programms der Sequenzier-PCR.

Schritt	Temperatur	Dauer	Anzahl der Zyklen
Denaturierung	96 °C	20 s	
Primer-Annealing	T _a °C (max. 60 °C)	20 s	30x
Elongation	60 °C	4 min	

Nach dem Cycle erfolgte die EtOH-Fällung nach Beckman-Coulter. Dazu wurde der 20 µl Ansatz mit 5 µl Fällungslösung vermischt, 60 µl Ethanol abs. hinzugegeben und bei 13.000 rpm 12 min (RT) zentrifugiert. Nach zweimaligem waschen mit jeweils 200 µl 70 % Ethanol (13.000 rpm, 1 min, RT) wurde der Überstand sorgfältig abgenommen und das Pellet bei RT getrocknet. Zuletzt wurde das Pellet in 30 µl SLS gelöst.

3M Natrium-Acetat-Lösung pH 5,2 für die Fällung von DNA

Für 100 ml Lösung wurden 40,82 g Natrium-Acetat Trihydrat in 50 ml H₂O gelöst und mit Eisessig auf pH 5,2 eingestellt und autoklaviert. (MW = 136,08 g/mol)

Fällungslösung

2 µl 3 M Natrium-Acetat-Lösung pH 5,2 werden mit 2 µl 100 mM EDTA pH 8,0 und 1 µl Glykogen

Die Sequenzierungen wurde mit dem GenomeLab™ GeXP Sequenzer durchgeführt. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe von Vector NTI Advance™ 11.

2.2.3 Arbeiten mit Protein

2.2.3.1 Isolierung von Proteinen

Die Isolierung von Proteinen erfolgte mittels SDS, sowie nativ, mit Hilfe von Ultraschallwellen. In der vorliegenden Arbeit wurden diese beiden Methoden angewendet, um die Proteine AAC(6')Ib und AAC(6)Iy (pUC19) von *E. coli* JM109, sowie AAC(6)Iy-His₆ und deren Derivate (pET23) von *E. coli* BL21 DE3 zu isolieren. Die Proteine des pET23-Vektors wurden mit einem His₆-Tag, einer Folge von sechs Histidinresten am C-Terminus des Proteins, markiert und konnten so nach Durchführung des Western Blots mit einem Anti-His (Cterm)/AP Antikörper detektiert werden.

Zur Isolierung von Gesamt-Protein aus *E. coli* Bakterienzellen wurde aus einer 3 ml LB ÜNK ein Kolben mit 150 ml LB 1:50 angeimpft. Gegebenenfalls wurde die entsprechende Menge an Antibiotika hinzugegeben. Die Zellen wurden bei 170 rpm und 37 °C bis zu einer Optischen Dichte bei 600 nm (OD₆₀₀) von 0,5 herangezogen. Anschließend wurden 75 ml der Lösung in einen zweiten sterilen Kolben überführt und mit einer Endkonzentration von 1 mM IPTG versetzt. Beide Kolben wurden für 4 Stunden bei 130 rpm und 37 °C inkubiert. Um die Menge an Zellsuspension zu ermitteln die anschließend 5 min bei 5000 rpm abzentrifugiert werden sollte, wurde die die Optische Dichte bei 450 nm (OD₄₅₀) bestimmt. Anschließend wurde der OD₄₅₀-Wert durch 33 dividiert. Das Ergebnis entspricht der Menge an Probenpuffer die zu 1 ml abzentrifugierter Zellsuspension hinzugegeben werden musste. Hier wurde jedoch 1 ml Probenpuffer verwendet, daher musste entsprechend mehr Zellsuspension eingesetzt werden.

für die SDS-PAGE

Nach Zentrifugation der entsprechenden Menge an Zellsuspension wurde der Überstand verworfen und das Pellet in SDS-Probenpuffer resuspendiert. Zur Lyse der Zellen wurde die Probe 5 min bei 60 °C und anschließend 5 min bei 100 °C inkubiert. Die lysierte Probe wurde für 20 min bei 13.000 rpm abzentrifugiert, zuletzt wurde der Überstand in ein frisches 1,5 ml Probenröhrchen überführt. 30 µl der Probe wurden mit 3 µl Bromphenolblau-Lösung gemischt und in die Tasche des Gels aufgetragen. Die Proben wurden bei -20 °C gelagert.

für Native-PAGE

Nach Zentrifugation der entsprechenden Menge an Zellsuspension wurde der Überstand verworfen und das Pellet in nativem Probenpuffer resuspendiert. Um die Zellen zu zerstören, nicht aber die Proteine zu schädigen, wurde 1 ml der Zellsuspension dreimal 10 s bei einer Amplitude von 100 % mit einem Ultraschallstab beschallt. Nach jeden 10-sekündigen Beschallungen wurde 10 s pausiert. Die Sonotrode sollte nicht mehr als 2 mm in die Lösung tauchen und die Gefäßwand nicht berührt werden. Die lysierte Probe wurde für 20 min bei 13.000 rpm abzentrifugiert, zuletzt wurde der Überstand in ein frisches 1,5 ml Probenröhrchen überführt. 30 µl der Probe wurden mit 3 µl Bromphenolblau-Lösung gemischt und in die Tasche des Gels aufgetragen. Die Proben wurden bei -20 °C gelagert.

1 M IPTG Stocklösung für die Induktion der Translation

238 mg IPTG wurden in 1000 µl H₂O gelöst und anschließend steril filtriert.

(MW = 238,302 g/mol)

Probenpuffer – SDS

12,4 % Glycin, 5,7 % SDS, 7,1 % β-Mercaptoethanol und 90 mM Tris-HCl pH 6,8 wurden in A. dest gelöst. Der Puffer wurde bei 4 °C aufbewahrt.

Probenpuffer – nativ

12,4 % Glycin und 90 mM Tris-HCl pH 6,8 wurden in A. dest gelöst. Der Puffer wurde bei 4 °C aufbewahrt.

Bromphenolblau-Lösung

0,2 % Bromphenolblau, 0,5 % Essigsäure und 5 % Ethanol wurden in A. dest gelöst. Der Puffer wurde aliquotiert und bei RT aufbewahrt.

2.2.3.2 Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die gelelektrophoretische Auftrennung von Proteinen erfolgte nach Lämmli im SDS-Polyacrylamidgel. Hierbei wurden die isolierten Proteine zum einen vollständig denaturiert und mit einer negativen Ladung versehen nach ihrem Molekulargewicht im SDS-Gel aufgetrennt. Hierbei werden die negativ geladenen SDS-Polypeptidkomplexe in einem niedrigprozentigen Sammelgel konzentriert und dann im Trenngel aufgetrennt. Die Wahl des

Puffersystems bei der nativen Gelelektrophorese hing dabei vom isoelektrischen Punkt (IP) des Proteins ab.

Das Polyacrylamidgel wurde 24 h vor Verwendung gegossen, während des gesamten Vorgangs wurden Handschuhe getragen und unter dem Abzug gearbeitet. Zunächst wurden die Ohrenplatte und die Rückenplatte mit Geschirrspülmittel gesäubert, anschließend mit 96 %igen Ethanol abgespült und mit fussel freiem Papier getrocknet. Nachdem Ohrenplatte und Rückenplatte zusammengelegt, abgedichtet und fixiert wurden, wurde der Kamm kurz eingesetzt und ca. 1 cm unterhalb des Kamms eine Linie zur Markierung gezogen. Der Kamm wurde entfernt, die Vorrichtung vertikal aufgestellt und folgende Zusammensetzung der Trenngelle verwendet, siehe Tabelle 2-36.

Tabelle 2-36 Zusammensetzung des Trenngels der SDS- bzw. Nativen-PAGE Gele.

Lösung	18 %, 20ml, SDS	18 %, 20ml, nativ
30 % Acrylamid-Lösung	12.000 µl	12.000 µl
2 % Bisacrylamid-Lösung	900 µl	900 µl
1,5 M Tris-HCl pH 8,8	5.000 µl	5.000 µl
H ₂ O reinst	1.700 µl	1.900 µl
10 % SDS	200 µl	-
10 % Ammoniumpersulfat-Lösung	200 µl	200 µl
TEMED	8 µl	8 µl

Das native-Trenngel wurde vorsichtig in die Lücke zwischen die Glasplatten gegossen, da zur nativen-PAGE kein Sammelgel benötigt wurde, konnte der Kamm direkt eingesetzt werden.

Das SDS-Trenngel wurde vorsichtig bis zur Markierung (ca. 1 cm unterhalb des Kamms) gegossen und sofort mit Butanol überschichtet. Das Butanol wurde nach der Polymerisation wieder abgesaugt und das Gel mehrmals mit A. dest gespült. Nachdem das Gel mit einem Filterpapier gut getrocknet wurde, konnte das SDS-Sammelgel gemischt werden. Folgende Zusammensetzung des Sammelgels wurde verwendet, siehe Tabelle 2-37.

Material und Methoden

Tabelle 2-37 Zusammensetzung des Sammelgels der SDS-PAGE Gele.

Lösung	5 ml, SDS
30 % Polyacrylamid/0,8 % Bis-Acrylamid	950 µl
0,5 M Tris-HCl pH 6,8	1.250 µl
H ₂ O reinst	2.700 µl
10 % SDS	50 µl
10 % Ammoniumpersulfat-Lösung	50 µl
TEMED	5 µl

Die Lösung wurde vorsichtig auf das Trenngel gegossen und der Kamm sofort luftblasenfrei eingesetzt. Zur Gelelektrophorese für die SDS-PAGE, sowie zur Trennung der nativen Proteine wurde der entsprechende Laufpuffer verwendet. Für die SDS-PAGE wurde eine Spannung von 40 V bei variablem Stromfluss für ca. 15 h, zur nativen Gelelektrophorese wurde eine Spannung von 60 V variablem Stromfluss für ca. 24 h gewählt.

Anschließend wurden die Gele in Comassie-Färbelösung für eine Stunde gefärbt, mit Entfärbelösung bis zum gewünschten Ergebnis entfärbt und dokumentiert. Die fotografierten Gele wurden nun für 24 h in Konservierungslösung gelegt und am folgenden Tag mit einer beheizbaren Vakuumplatte auf einem Whatmanpapier der gleichen Größe konserviert. Die Gele für den Western Blot wurden nicht gefärbt, sondern wurden direkt weiterverwendet, siehe 2.2.3.3.

1,5 M Tris-HCl pH 8,8

1,5 M Tris-Base wurde mit 6 N HCl auf pH 8,8 eingestellt und mit A. dest entsprechend aufgefüllt. Der Puffer wurde bei 4 °C gelagert.

0,5 M Tris-HCl pH 6,8

0,5 M Tris-Base wurde mit 6 N HCl auf pH 6,8 eingestellt und mit A. dest entsprechend aufgefüllt. Der Puffer wurde bei 4 °C gelagert.

10 %iges APS

100 mg Ammoniumpersulfat wurden in 1 ml A. dest gelöst und bei -20 °C eingefroren.

10 %iges SDS

1 g SDS wurde mit 10 ml A. dest gemischt und bei RT aufbewahrt.

Butanol-Wasser Lösung

Für das Überschichten des Trenngels wurde n-Butanol und LiChrosolv® im Verhältnis 1:1 gemischt und bei RT aufbewahrt.

5 x Laufpuffer – SDS

0,96 M Glycin, 0,124 M Tris-Base und 0,5 % SDS wurden in A. dest gelöst und auf einen pH von 8,3 eingestellt. Die Lösung wurde bei RT aufbewahrt. Vor Gebrauch wurde der Puffer 1:5 verdünnt.

5 x Laufpuffer – nativ

0,96 M Glycin, 0,124 M Tris-Base und 0,5 % SDS wurden in A. dest gelöst und auf einen pH von 8,3 eingestellt. Die Lösung wurde bei RT aufbewahrt. Vor Gebrauch wurde der Puffer 1:5 verdünnt.

Comassie-Färbelösung

0,25 % Comassie Brilliant Blue R-250, 50 % Methanol und 9,2 % Eisessig wurden mit A. dest gemischt. Die Lösung wurde mehrmals zum Färben der PAGE-Gele verwendet. Sie wurde bei RT aufbewahrt.

Entfärbelösung

20 % Methanol und 7 % Eisessig wurden mit A. dest gemischt. Die Lösung wurde bei RT aufbewahrt.

Konservierungslösung

7 % Essigsäure und 4 % Glycerin wurden mit A. dest gemischt. Die Lösung wurde bei RT aufbewahrt.

2.2.3.3 Western Blot (Semi Dry)

2.2.3.3.1 Übertragung der Proteine auf die Membran (Blotting)

Insgesamt 12 Whatmanpapiere (Whatman® Papier, GB003) sowie die Nylonmembran (0,45) wurden passend zur Gelgröße zugeschnitten. Auf die angefeuchtete Anodenplatte wurden 6 Lagen in Anodenpuffer I getränktem Whatmanpapier gelegt, darauf 3 Lagen in Anodenpuffer II getränktem Whatmanpapier, anschließend die mit Anodenpuffer II 30 min äquilibrierte Nylonmembran. Darauf wurde vorsichtig das Proteingel gelegt und mit 3 Lagen in Kathodenpuffer getränktem Whatmanpapier abgedeckt. Alle Schichten wurden mit einer Glaspipette glatt gerollt und darauf geachtet, dass sich keine Luftblasen zwischen den Schichten befinden. Zuletzt wurde die angefeuchtete Kathodenplatte darübergelegt und 88 mA Strom bei maximalem Volt für 60 min angelegt. Die Kathodenplatte wurde mit ca. 2 kg Gewicht beschwert.

Anodenpuffer I

0,3 M Tris-HCl-pH 7,5

20 % MetOH

A. dest

Anodenpuffer II

25 mM Tris-HCl pH 7,5

20 % MetOH

A. dest

Kathodenpuffer

25 mM Tris-HCl pH7,5

40 mM Aminocaprinsäure

20 % MetOH

A. dest

2.2.3.3.2 Fixierung der Proteine auf der Membran

Zur Fixierung der Proteine wurde die Membran mit der Proteinseite nach oben auf ein Whatmanpapier gelegt und für 30 min bei 120 °C im Ofen gebacken.

2.2.3.3.3 Hybridisierung

Nach der Fixierung wurde die Membran für 1 – 2 h in 20 ml Blotto I bei RT langsam geschüttelt/geschwenkt und 2 x 5 min mit 20 ml TBST bei RT gewaschen. Ein mit Alkalischer Phosphatase (AP) markierter Antikörper (Anti-His (Cterm)/AP Antikörper), der spezifisch sechs C-terminale Histidinreste des Enzyms erkennt, wurde 1:2000 in 10 – 20 ml Blotto II verdünnt und die Membran darin für 2 h bei RT vorsichtig geschwenkt. Es erfolgte ein dreimaliger Waschschrift in 20 ml TBST bei RT, wobei nichtgebundener Antikörper entfernt werden sollte. Zuletzt wurde die Membran für 5 min in TBS gelegt um das Detergenz zu entfernen.

1 x TBS

20 mM Tris-HCl pH 7,5

15 mM NaCl

TBST

TBS + 0,05 % Tween 20

Blotto I

TBS + 5 % Magermilchpulver

Blotto II

TBST + 1 % Magermilchpulver

2.2.3.3.4 Detektion des Anti-His (Cterm)/AP Antikörpers

Die Detektion des gebundenen Anti-His (Cterm)/AP Antikörper erfolgte chromogen durch die Lösungen BCIP (5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl-Phosphat) und NBT (Nitro Tetrazolium Blue Chloride). Hierbei wird BCIP durch Abspaltung der Phosphatgruppe in das entsprechende Indoxyl überführt, das zu einem Keton tautomerisiert. Das Keton dimerisiert zu blauem Indigo, wobei H^+ freigesetzt wird. Das H^+ reduziert NBT zum purpurnen Diformazan. Beide Farbstoffe fallen dabei in unmittelbarer Nähe des Antikörpers aus und färben die Umgebung dunkelviolett.

Zur Detektion wurde 1 ml der BCIP sowie der NBT Lösung in 8 ml A. dest gemischt und sofort auf die Membran gegeben. Die Membran wurde bei RT inkubiert bis sich das gewünschte Signal zeigte (nach ca. 5 min). Um zu viele Hintergrundsignale zu vermeiden und um die Reaktion zu stoppen wurde die Membran mit A. dest für 10 min gespült. Die Membran wurde an der Luft bei RT getrocknet und fotografiert.

3 Ergebnisse

3.1 Molekulare Grundlagen der Entstehung der Variante AAC(6')-Ib-cr aus AAC(6')-Ib und in vitro Untersuchungen zur Herstellung einer AAC(6')-Ib-cr-analogen Mutation in einem anderen Typ AAC(6')-I

3.1.1 Untersuchungen zu AAC(6')-I, AAC(6')-Ib und AAC(6')-Ib-cr

3.1.1.1 Kontrolle von klinischen Isolaten auf die Anwesenheit von AAC(6')-Ib

Zu Beginn der vorliegenden Arbeit wurden 25 aus einem Kollektiv von insgesamt 183 klinischen *Enterobacteriaceae*-Isolaten ausgewählt, da sie positiv auf die Anwesenheit des Gens *aac(6')-Ib* mittels PCR untersucht wurden und reduzierte Fluorchinolonempfindlichkeit zeigten (A. Heisig, A. Schnasse, T. Claußen, unveröffentlicht). Das gesamte Kollektiv war in den Jahren 2001 bis 2004 in britischen Krankenhäusern isoliert worden (Dr. Rosy Reynolds, London) und wurde außerdem bereits auf Mutationen in den Genen *gyrA/B* bzw. *parC/E* untersucht (A. Heisig, A. Schnasse, T. Claußen, unveröffentlicht).

Das Vorhandensein des Gens *aac(6')-Ib* in den 25 ausgewählten Isolaten wurde mittels PCR mit den Primern AAC6 +I for und AAC6 +519 rev noch einmal bestätigt. Zur weiteren Charakterisierung der Genvarianten wurden die hieraus erhaltenen PCR-Fragmente mit zwei Restriktionsenzymen, *FokI* und *NdeI*, gespalten (zur Vorgehensweise siehe 2.2.2.12).

Das Enzym *FokI* spaltet das *aac(6')-Ib-wt*-Gen im Bereich des Codons 102, wohingegen *NdeI* spezifisch die *cr*-Variante im Bereich des Codons 179 spaltet (79). Genauer gesagt erkennt das Enzym *FokI* die Nukleotidsequenz 5'-GGA**TG**-3' (Nukleotidpositionen 301 bis 305) und schneidet um $n = 9$ bzw. $n = 13$ bp versetzt den *sense* bzw. *antisense* Strang der DNA von *aac(6')-Ib-wt*. Die Erkennungssequenz des Enzyms *FokI* liegt im Bereich der Aminosäuren 101 und 102. Im *aac(6')-Ib-cr*-Gen ist die erste Base in Codon 102 verändert (T**G**G→C**G**G), wodurch *aac(6')-Ib-cr* nicht von *FokI* gespalten werden kann. Das Restriktionsenzym *NdeI* erkennt und schneidet die Nukleotidsequenz 5'-CATAT**G**-3' (Nukleotidpositionen 533 bis 538) der Variante *aac(6')-Ib-cr*. Die Erkennungssequenz des Enzyms *NdeI* liegt im Bereich der

Ergebnisse

Aminosäuren 178, 179 bzw. 180. *NdeI* spaltet nur die *aac(6′)-Ib-cr*-Variante, da hier die Punktmutation in Codon 179 (GAT→IAT) und somit die Erkennungssequenz des Enzyms vorhanden ist.

Nach der Auftrennung des gespaltenen PCR-Ansatzes durch Gelelektrophorese, gab das entstandene Restriktionsfragmentmuster Aufschluss über die jeweils vorliegende Variante des Gens. Zur Verifizierung der jeweiligen identifizierten Variante und zur weiteren Analyse der Sequenz wurden die erhaltenen PCR-Fragmente anschließend sequenziert. In Tabelle 3-1 sind die Ergebnisse der Analyse zusammengefasst.

Tabelle 3-1 Ergebnisse des RFLP und der Sequenzierung der 25 *aac(6′)-Ib* positiv getesteten Stämme tabellarisch zusammengefasst.

Spezies	GK	Isolation	Mutationen in GyrA ^{*1}	Mutationen in ParC ^{*1}	Genvariante	Bemerkung ^{*2}	Referenz
<i>E. coli</i>	2791	2001	Ser83Leu, Asp87Asn	Ser80Arg	<i>aac(6′)-Ib-cr</i>		R. Reynolds, London
<i>E. cloacae</i>	2792	2001	Ser83XXX, Asp87Gly	Keine Mutation vorhanden	<i>aac(6′)-Ib- wt</i>	qnrA-positiv	R. Reynolds, London
<i>E. coli</i>	2801	2001	Ser83Leu, Asp87Asn	Ser80Ile	<i>aac(6′)-Ib-cr</i>		R. Reynolds, London
<i>E. coli</i>	2815	2001	Ser83Leu	nicht bestimmt	<i>aac(6′)-Ib-cr</i>		R. Reynolds, London
<i>E. coli</i>	2829	2002	Ser83Leu, Asp87Asn	Ser80Arg	<i>aac(6′)-Ib-cr</i>		R. Reynolds, London
<i>E. coli</i>	2841	2002	Ser83Leu, Asp87Asn	Glu84Lys	<i>aac(6′)-Ib-cr</i>		R. Reynolds, London
<i>E. coli</i>	2844	2002	Ser83Leu, Asp87Asn	Ser80Ile, Glu84Gly	<i>aac(6′)-Ib-cr</i>		R. Reynolds, London
<i>E. coli</i>	2847	2002	Ser83Leu, Asp87Asn	Glu84Lys	<i>aac(6′)-Ib-cr</i>		R. Reynolds, London
<i>E. coli</i>	2850	2002	Keine Mutation vorhanden	Keine Mutation vorhanden	<i>aac(6′)-Ib- wt</i>	qnrA-positiv	R. Reynolds, London
<i>E. coli</i>	2851	2002	Ser83Leu	Keine Mutation vorhanden	<i>aac(6′)-Ib11</i>		R. Reynolds, London
<i>E. coli</i>	2870	2003	Ser83Leu, Asp87Asn	Ser80Ile, Glu84Val	<i>aac(6′)-Ib-cr</i>		R. Reynolds, London

Spezies	GK	Isolation	Mutationen in GyrA ^{*1}	Mutationen in ParC ^{*1}	Genvariante	Bemerkung ^{*2}	Referenz
<i>E. coli</i>	2880	2003	Ser83Leu, Asp87Asn	Ser80Ile	<i>aac(6')-Ib-cr</i>		R. Reynolds, London
<i>E. coli</i>	2894	2003	Keine Mutation vorhanden	nicht getestet	<i>aac(6')-Ib7</i>	qnrA-positiv	R. Reynolds, London
<i>E. coli</i>	2895	2003	Ser83Leu, Asp87Asn	Ser80Ile	<i>aac(6')-Ib-cr</i>		R. Reynolds, London
<i>E. coli</i>	2909	2004	Ser83Leu, Asp87Asn	Ser80Ile, Glu84Val	<i>aac(6')-Ib-cr</i>		R. Reynolds, London
<i>E. coli</i>	2914	2004	Ser83Leu, Asp87Asn	Ser80Ile, Glu84Val	<i>aac(6')-Ib-cr</i>		R. Reynolds, London
<i>E. coli</i>	2919	2004	Ser83Leu, Asp87Asn	Ser80Arg	<i>aac(6')-Ib-cr</i>		R. Reynolds, London
<i>E. coli</i>	2929	2004	Ser83Leu, Asp87Asn	Ser80Ile, Glu84Val	<i>aac(6')-Ib-cr</i>		R. Reynolds, London
<i>E. coli</i>	2937	2004	Ser83Leu, Asp87Asn	Ser80Ile, Glu84Val	<i>aac(6')-Ib-cr</i>		R. Reynolds, London
<i>E. coli</i>	2944	2004	Ser83Leu, Asp87Asn	Ser80Ile, Glu84Val	<i>aac(6')-Ib-cr</i>		R. Reynolds, London
<i>E. coli</i>	2945	2004	Ser83Leu, Asp87Asn	Ser80Ile, Glu84Val	nicht bestimmt		R. Reynolds, London
<i>E. coli</i>	2946	2004	Ser83Leu, Asp87Asn	Ser80Ile, Glu84Val	<i>aac(6')-Ib-cr</i>		R. Reynolds, London
<i>E. coli</i>	2947	2004	Ser83Leu, Asp87Asn	Ser80Ile, Glu84Val	<i>aac(6')-Ib-cr</i>		R. Reynolds, London
<i>E. coli</i>	2951	2004	Ser83Leu, Asp87Asn	Ser80Ile, Glu84Val	<i>aac(6')-Ib-cr</i>		R. Reynolds, London
<i>E. coli</i>	2959	2004	Ser83Leu, Asp87Asn	Ser80Ile, Glu84Val	<i>aac(6')-Ib-cr</i>		R. Reynolds, London

^{*1} Bestimmung durch A. Heisig und A. Schnasse, unveröffentlicht; ^{*2} Bestimmung durch T. Claußen, unveröffentlicht.

Insgesamt 20 der 25 Stämme zeigten die Genvariante *aac(6')-Ib-cr* mit den Punktmutationen in Codon 102 (IGG→CGG) bzw. in Codon 179 (GAT→IAT), die jeweils zu einem Basenaustausch der Aminosäurepositionen 102 (W102R) bzw. 179 (D179Y) führten. Vier Stämme zeigten das *aac(6')-Ib-wt*-Gen. Die Variante des Stammes *E. coli* GK 2945 konnte

Ergebnisse

nicht eindeutig zugeordnet werden, da sowohl die Spaltung, als auch die Sequenzierung nicht eindeutig auswertbar waren. Ein Grund hierfür könnten schlecht bindende Primer sein, die zu einem qualitativ schlechten PCR-Produkt führten und die korrekte Auswertung der Ergebnisse unmöglich machten. Da mit den Primern in den übrigen Untersuchungen ein eindeutiges Ergebnis erzielt werden konnte, war davon auszugehen, dass hier eine veränderte Variante von *aac(6′)-Ib* vorlag und die Primer somit schlecht banden. Dies wurde jedoch nicht weiter untersucht. Die Sequenzierung ergab, dass sich unter den vier gefundenen *aac(6′)-Ib-wt*-Genen die Varianten *aac(6′)-Ib7* (GK 2894) sowie *aac(6′)-Ib11* (GK 2951) befanden. Die Varianten AAC(6′)-Ib-wt7 und AAC(6′)-Ib-wt11 unterscheiden sich von AAC(6′)-Ib-wt durch die Variation von einer bzw. zwei Aminosäuren an den Positionen 116/117, welche, je nach Kombination, ein unterschiedliches Substratspektrum von Gentamicin und Amikacin zur Folge haben (23). Der Wildtyp (AAC(6′)-Ib-wt) besitzt die Kombination Q116/L117, die Variante AAC(6′)-Ib7 weist die Kombination Q116/S117 auf und die Variante AAC(6′)-Ib11 die Kombination L116/S117 (23). Die Variante *aac(6′)-Ib7* in GK 2894 besaß in Triplet 117 einen Austausch von TTA zu TCA und somit den Aminosäureaustausch L117S. Die Variante *aac(6′)-Ib11* in GK 2951 besaß zusätzlich in Triplet 116 einen Basenaustausch von CAG zu CTG, was zum Aminosäureaustausch Q116L führte.

Es war zu beobachten, dass in den Stämmen, welche die mutierte Aminoglykosid-Acetyltransferase AAC(6′)-Ib-cr exprimierten, mindestens drei chromosomale Mutationen in *gyrA* bzw. *parC* vorlagen, mit Ausnahme von Stamm GK 2815, hier wurde lediglich eine Mutation in *gyrA* gefunden, allerdings wurde *parC* auch nicht untersucht. Auffällig war außerdem, dass die Aminosäuremutationen an Position 102 und 179 nur gemeinsam gefunden wurden. Bislang wurde kein Gen gefunden, indem nur eine der beiden Positionen mutiert war. *QnrA* wurde insgesamt dreimal gefunden, jedoch nur in Stämmen, die das Enzym AAC(6′)-Ib-wt besaßen.

Die Stämme *E. coli* GK 2850, GK 2851, GK 2894, GK 2895 und GK 2951 (Grau hinterlegt) wurden im Folgenden weiter untersucht, da jeder dieser Stämme eine andere Variante des *aac(6′)-Ib*-Gens besitzt. Es wurden zwei *aac(6′)-Ib-cr*-positive Stämme ausgewählt, da im Verlauf der Arbeit in jedem Fall mit *aac(6′)-Ib-cr* weitergearbeitet werden sollte.

3.1.1.2 Charakterisierung der Stämme GK 2850, GK 2851, GK 2894, GK 2895, GK 2951

3.1.1.2.1 Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration

Aus dem untersuchten Kollektiv wurden die fünf Stämme (*E. coli* GK 2850, *E. coli* GK 2851, *E. coli* GK 2894, *E. coli* GK 2895 und *E. coli* GK 2951) ausgewählt und zunächst durch MHK-Bestimmung und Plasmidisolierung näher charakterisiert. Die MHK-Werte der Stämme *E. coli* GK 2850, GK 2851, GK 2894, GK 2895 und GK 2951 sind in Tabelle 3-2 zusammengefasst.

Tabelle 3-2 Werte der Empfindlichkeitsbestimmung (in µg/ml) der Stämme *E. coli* GK 2850, GK 2851, GK 2894, GK 2895 und GK 2951. ^{*1} Bestimmung durch T. Claußen, unveröffentlicht.

Stamm	Kanamycin ^{*1}	Gentamicin ^{*1}	Amikacin ^{*1}	Ciprofloxacin
<i>E. coli</i> GK 2850 (<i>aac(6')-Ib-wt</i>)	>64	32	4	0,25
<i>E. coli</i> GK 2851 (<i>aac(6')-Ib11</i>)	>64	4	16	0,25
<i>E. coli</i> GK 2894 (<i>aac(6')-Ib7</i>)	>64	16	16	0,5
<i>E. coli</i> GK 2895 (<i>aac(6')-Ib-cr</i>)	32/64	64	4	256
<i>E. coli</i> GK 2951 (<i>aac(6')-Ib-cr</i>)	>64	1	8	256

Die MHK-Werte von Kanamycin lagen für die Stämme *E. coli* GK 2850, GK 2851, GK 2894 und GK 2951 bei über 64 µg/ml, für GK 2895 zwischen 32 und 64 µg/ml, von Gentamicin für die untersuchten Stämme zwischen 1 und 64 µg/ml und für Amikacin zwischen 4 und 16 µg/ml. Für die Stämme *E. coli* GK 2850, GK 2851, GK 2894 lagen die MHK-Werte von Ciprofloxacin zwischen 0,25 und 0,5 µg/ml, während die MHK-Werte für *E. coli* GK 2895 und GK 2951 bei 256 µg/ml lagen.

Die MHK-Werte konnten jedoch, aufgrund der vorhandenen unterschiedlichen chromosomalen Mutationen, nicht direkt auf *aac(6')-Ib*-Gene zurückgeführt werden. Außerdem war nicht bekannt, welche weiteren Resistenzgene in den Zellen vorhanden waren.

3.1.1.2.2 Erstellung von Plasmidprofilen

Zur weiteren Charakterisierung der ausgewählten Stämme wurde zu Beginn mit unterschiedlichen Plasmidpräparationen Plasmidprofile erstellt, anschließend geprüft, ob sich diese Plasmide mittels Transformation und Konjugation übertragen ließen. Ziel der Vereinzelung durch Transformation bzw. Konjugation der Plasmide die ein bekanntes *aac(6')-Ib*-Gen tragen war zum einen die Charakterisierung der Mobilitätseigenschaften der Plasmide, zum anderen die Lokalisation des Aminoglykosid-Acetyltransferase Gens. Durch Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration (MHK) sollte anschließend die Erhöhung der Resistenz bezüglich ausgewählter Aminoglykoside und Fluorchinolone durch die Anwesenheit von AAC(6')-Ib beziehungsweise AAC(6')-Ib-cr festgestellt werden.

Zur Plasmidisolierung wurde die Methode nach Toranzo *et al.* (151), die auf der Methode von Kado & Liu basiert (80), mit und ohne Ethanolfällung ausgewählt sowie das NucleoBond® Xtra Midi Kit von Macherey und Nagel getestet. Ziel war es hier, natürlich vorkommende Plasmide ab einer Größe von 10 kb bis zu einer Größe von ca. 100 kb erfolgreich zu isolieren, da sich die Gene *aac(6')-Ib-wt*, *aac(6')-Ib7*, *aac(6')-Ib11* und *aac(6')-Ib-cr* auf entsprechend großen Plasmiden (Megaplasmiden) befinden können. Die isolierten Plasmide wurden in einem 0,8 % igen Agarose 1 x E-Puffer Gel aufgetrennt. Das Ergebnis ist in Abbildung 3-1 dargestellt.

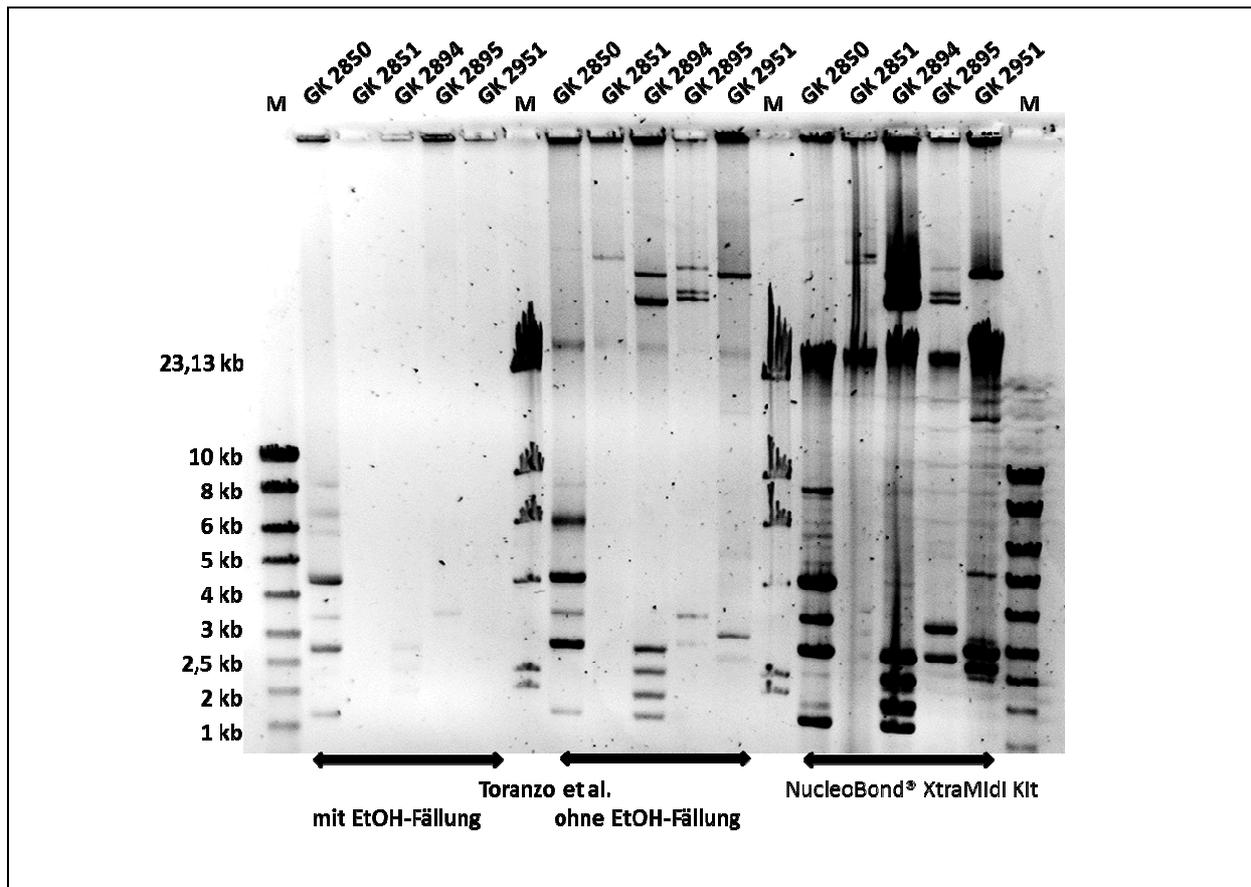


Abbildung 3-1 Vergleich der Plasmidprofile der Stämme GK 2850, GK 2851, GK 2894, GK 2895 und GK 2951 und der drei Methoden der Isolierung. 0,8 % ige Agarose, 1 x E-Puffer.

Die Plasmide, die mit der Methode nach Toranzo *et al.* (2.2.2.7), ohne EtOH-Fällung isoliert wurden, lieferten stringente Banden, wohingegen die Plasmide nach der EtOH-Fällung nicht mehr bzw. nur sehr schwach zu detektieren waren. Die Isolierung mit dem NucleoBond® Xtra Midi Kit lieferte DNA-Banden hoher Intensität. Die chromosomale DNA, die auf einer Höhe von ca. 23 kb läuft, war nur in der Isolierung mit der Methode nach Toranzo *et al.* ohne EtOH-Fällung sowie in der Isolierung mit dem NucleoBond® Xtra Midi Kit zu detektieren. In den Stämmen *E. coli* GK 2850, GK 2894, GK 2895 und GK 2951 konnten mehrere Plasmide unterschiedlicher Größe detektiert werden. Die Auftrennung der Plasmide der Isolierung mit dem NucleoBond® Xtra Midi Kit zeigte zusätzliche Banden, die teilweise dem Muster des Markers ähnelten. Vermutlich wurden die Proben während des Auftragens mit Marker verunreinigt. Somit wurde zur Auswertung die Auftrennung der Plasmide, die mit der Methode nach Toranzo *et al.* ohne EtOH-Fällung isoliert wurden, verwendet. In *E. coli* GK 2850 wurden, neben der Bande der chromosomalen DNA (ca. 23 kb), sechs Banden in einer Größe von ca. 1 kb bis 8 kb detektiert. Eine sehr schwache Bande war im Bereich über 23 kb zu sehen. In *E. coli* GK 2851 konnte, neben der Bande der chromosomalen DNA, lediglich

Ergebnisse

eine weitere Bande im Bereich über 23 kb detektiert werden. In *E. coli* GK 2894 wurden vier Banden in einer Größe von ca. 1 kb bis 3 kb, sowie zwei Banden im Bereich über 23 kb detektiert. In *E. coli* GK 2895 konnten insgesamt fünf Banden detektiert werden, drei Banden davon über der Bande der chromosomalen DNA, zwei Banden in einer Größe von ca. 2,5 kb bis 4 kb. In *E. coli* GK 2951 wurden fünf Banden detektiert, davon eine Bande über der Bande der chromosomalen DNA und vier Banden in einer Größe von 2,5 kb bis über 10 kb. Über die genaue Größe der einzelnen Plasmide konnte hier keine Aussage getroffen werden, da die Plasmide nicht linearisiert wurden und auch keine Plasmide mit definierter Größe mit aufgetrennt wurden. Ebenso war eine Aussage über die genaue Anzahl der Plasmide fragwürdig, da durch unterschiedliche Plasmidformen (superspiralisiert, entspannt-zirkulär, linearisiert) mehrere Banden eines Plasmids entstehen könnten.

Aufgrund der hohen Intensität der Banden der Plasmidisolierung mit dem NucleoBond® Xtra Midi Kit, wurden diese Ansätze zur Transformation von CaCl₂-kompetenten *E. coli* JM109-Zellen (GK 3154) verwendet. Gleichzeitig wurden die Stämme *E. coli* GK 2850, GK 2851, GK 2894, GK 2895 und GK 2951 zur Konjugation mit *E. coli* K12 W3110R (GK 93) verwendet.

3.1.1.2.3 Transformation und Konjugation der Plasmide der Stämme *E. coli* GK 2850, GK 2851, GK 2894, GK 2895 und GK 2951

Die Transformanden wurden mit einer Kanamycin Konzentration von 25 µg/ml selektiert, bei der Konjugation wurde mit einer Kanamycin Konzentration von 25 µg/ml bzw. mit einer Rifampicin Konzentration von 50 µg/ml selektiert. Da die Kanamycinresistenz nicht nur von einer Aminoglykosid Acetyltransferase (AAC), sondern auch durch Aminoglykosid Phosphotransferasen (APH) oder Aminoglykosid Nukleotidyltransferasen (ANT) vermittelt werden kann (18) und auch mehrere Plasmide während Transformation und Konjugation in eine Bakterienzelle aufgenommen werden können, wurden die Transformanden bzw. Konjuganden zunächst durch PCR mit den *aac(6′)-Ib*-spezifischen Primern AAC6 +I for und AAC6 +519 rev untersucht. *Aac(6′)-Ib*-positiv getestete Stämme wurden anschließend durch erneute Plasmidisolierung begutachtet.

Erfolgreich wurde das entsprechende Plasmid mit *aac(6′)-Ib-cr* (pAAC(6′)-Ib-cr) aus GK 2951 in *E. coli* JM109 transformiert. Abbildung 3-2 zeigt das Ergebnis der Auftrennung der

Plasmidisolierung des Transformanden *E. coli* JM109 pAAC(6')-Ib-cr (Methode nach Toranzo *et al.*) im Vergleich mit *E. coli* GK 2951.

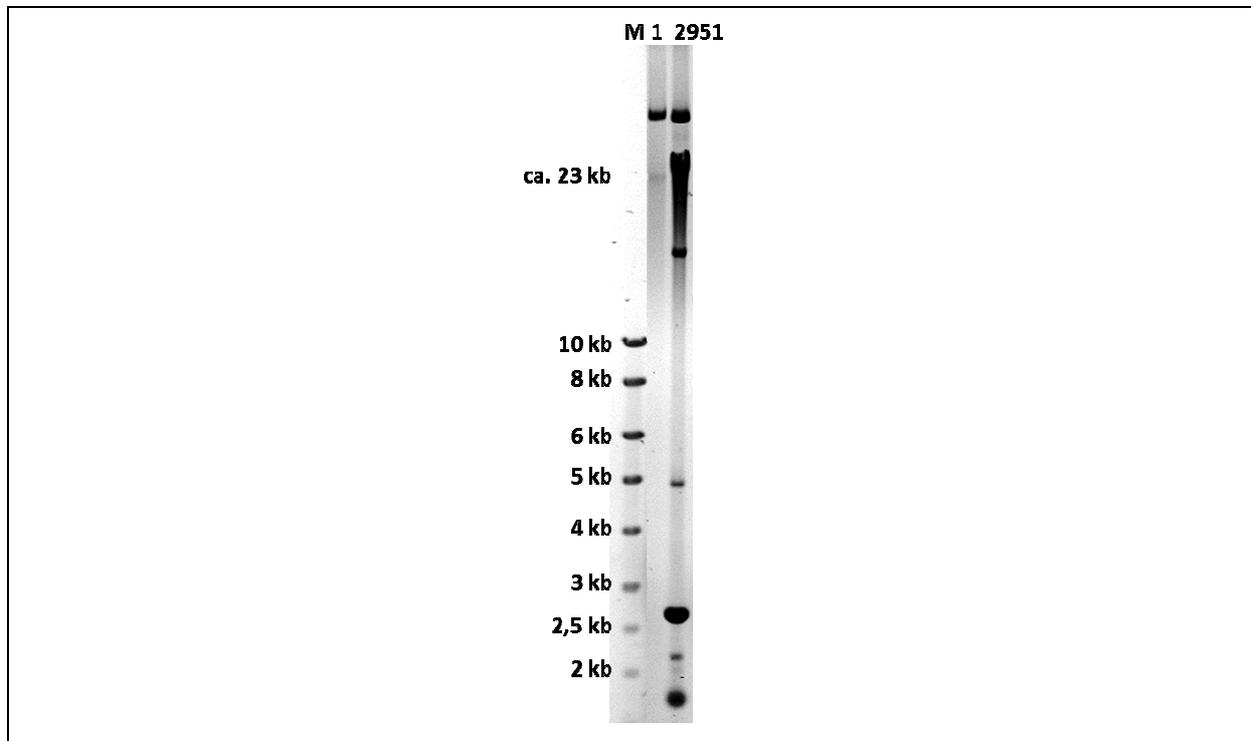


Abbildung 3-2 Plasmidisolierung von Transformand *E. coli* JM109 pAAC(6')-Ib-cr im Vergleich mit Stamm *E. coli* GK 2951. 0,8 % ige Agarose, 1 x E-Puffer.

Die Auftrennung zeigte, dass Transformand *E. coli* JM109 pAAC(6')-Ib-cr lediglich ein Plasmid mit einer Größe über 23 kb besaß.

Erfolgreich wurden auch die Plasmide von *E. coli* GK 2894 in *E. coli* JM109 transformiert. Abbildung 3-3 zeigt das Ergebnis der Auftrennung der Plasmide nach Präparation aus 22 Transformanden *E. coli* JM109 pAAC(6')-Ib7 (Methode nach Toranzo *et al.*) im Vergleich mit *E. coli* GK 2894.

Ergebnisse

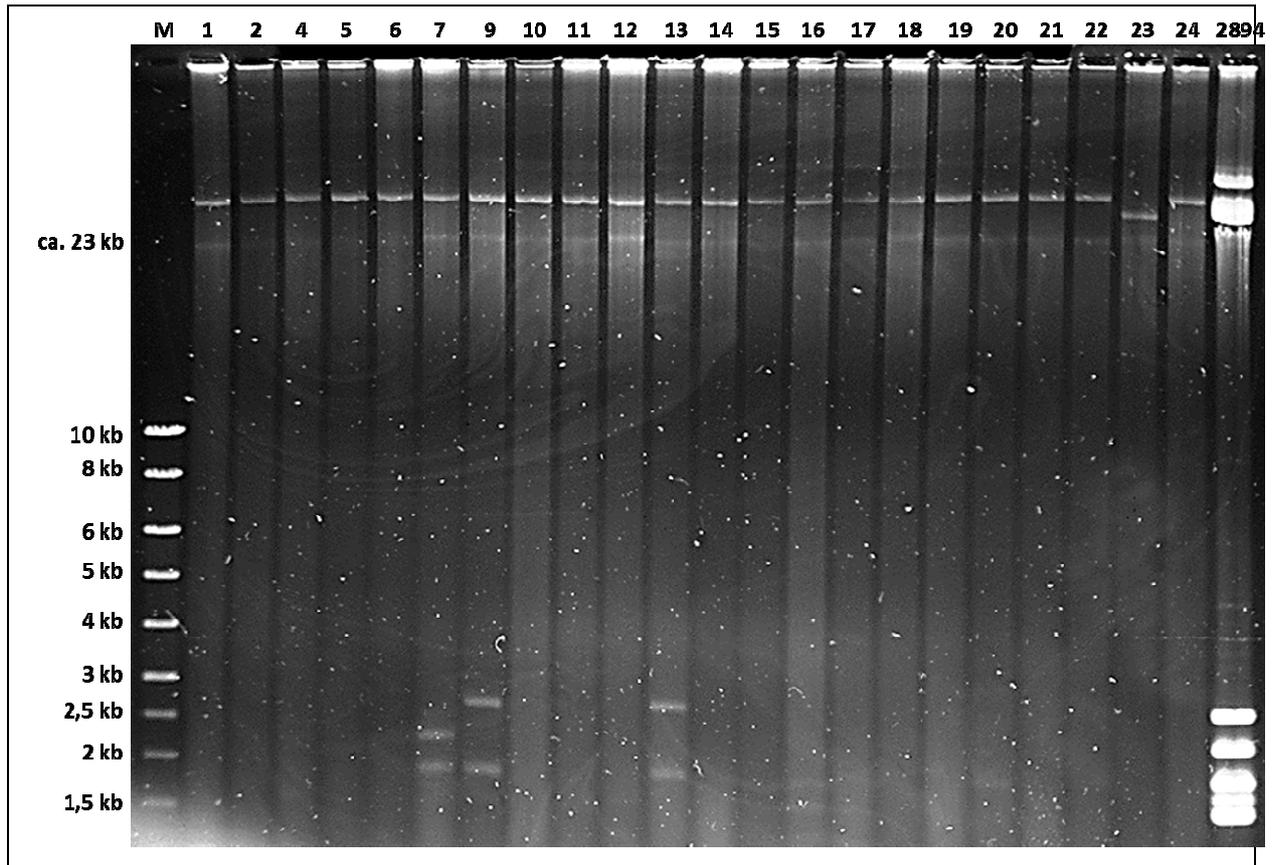


Abbildung 3-3 Vergleich der Plasmidprofile 22 zufällig ausgewählter Transformanten der Plasmide von Stamm GK 2894 im Vergleich mit dem Profil von GK 2894. 0,8 % ige Agarose, 1 x E-Puffer.

Alle 22 Transformanten *E. coli* JM109 pAAC(6')-Ib7 besaßen ein Plasmid in einer Größe über 23 kb. Die Transformanten *E. coli* JM109 pAAC(6')-Ib7 Nr. 7, Nr. 9 und Nr. 13 hatten neben dem Plasmid in einer Größe über 23 kb weitere Plasmide in einer Größe von ca. 1,5 kb bis 3 kb aufgenommen. Aufgrund der zusätzlichen Plasmide wurden diese Stämme nicht zur Empfindlichkeitsbestimmung herangezogen. Die Auftrennung der Plasmide zeigte außerdem einen Unterschied in der Laufweite des Plasmids aus Transformand Nr. 23, verglichen mit den anderen 21 Transformanten *E. coli* JM109 pAAC(6')-Ib7. Es erschien kleiner als die Plasmide der 21 anderen Transformanten und wurde daher als pAAC(6')-Ib7 Δ bezeichnet. Die Plasmide der Stämme *E. coli* GK 2850 (*aac*(6')-Ib-wt), GK 2851 (*aac*(6')-Ib11) und GK 2895 (*aac*(6')-Ib-cr) konnten durch Transformation nicht vereinzelt werden.

Erfolgreich konjugiert werden konnte lediglich das Plasmid mit *aac*(6')-Ib-cr (pAAC(6')-Ib-cr) aus GK 2951 in *E. coli* K12 W3110R. Die Plasmide der Stämme *E. coli* GK 2850 (*aac*(6')-Ib-wt), GK 2851 (*aac*(6')-Ib11), GK 2894 (*aac*(6')-Ib7) und GK 2895 (*aac*(6')-Ib-cr) konnten durch Konjugation nicht vereinzelt werden. Mit Konjugand *E. coli* K12 W3110R pAAC(6')-Ib-cr

wurde jedoch keine weiteren Untersuchungen durchgeführt, da hierzu keine Vergleichsstämme vorhanden waren und zur Charakterisierung von Plasmid pAAC(6')-Ib-cr dieses bereits vereinzelt in *E. coli* JM109 vorlag.

3.1.1.2.4 Bestimmung der Empfindlichkeit der Transformanden *E. coli* JM109 pAAC(6')-Ib7, *E. coli* JM109 pAAC(6')-Ib7Δ und *E. coli* JM109 pAAC(6')-Ib-cr

Zur Empfindlichkeitsbestimmung durch Mikrodilution wurden die Transformanden *E. coli* JM109 pAAC(6')-Ib-cr und *E. coli* JM109 pAAC(6')-Ib7 ausgewählt, da diese jeweils nur ein Plasmid besitzen. Transformand *E. coli* JM109 pAAC(6')-Ib7Δ mit dem etwas kleineren Plasmid, wurde aufgrund dessen ebenfalls zum Vergleich herangezogen. Das Ergebnis der Empfindlichkeitsbestimmung ist in Tabelle 3-3 zusammengefasst.

Tabelle 3-3 Ergebnis der Empfindlichkeitsbestimmung (in µg/ml) der transformierten Plasmide der Stämme GK 2894 und GK 2951.

Stamm	Kanamycin	Gentamicin	Amikacin	Ciprofloxacin	Norfloxacin	Moxifloxacin
<i>E. coli</i> JM109	0,5	0,125	0,25	0,08	0,32	0,16
<i>E. coli</i> JM109 pAAC(6')-Ib7	64	4	1	0,32	1,28	0,64
<i>E. coli</i> JM109 pAAC(6')-Ib7Δ	64	2	1	0,08	0,32	0,16
<i>E. coli</i> JM109 pAAC(6')-Ib-cr	32	0,25	4	0,32	1,28	0,16

Die MHK-Werte von Kanamycin, Gentamicin und Amikacin stiegen um sechs bis sieben, um eine bis fünf bzw. um zwei bis vier serielle Verdünnungsstufen für die Stämme *E. coli* JM109 pAAC(6')-Ib7, *E. coli* JM109 pAAC(6')-Ib7Δ und *E. coli* JM109 pAAC(6')-Ib-cr im Vergleich zu *E. coli* JM109 an. In Stamm *E. coli* JM109 pAAC(6')-Ib7Δ änderten sich die MHK-Werte von den Fluorchinolone nicht. Für *E. coli* JM109 pAAC(6')-Ib-cr stiegen die Werte von Ciprofloxacin und Norfloxacin im Vergleich zu *E. coli* JM109 um zwei Stufen an, während die MHK-Werte von Moxifloxacin konstant blieben. Die MHK-Werte von den Fluorchinolonen für *E. coli* JM109 pAAC(6')-Ib7 waren höher als die von *E. coli* JM109 pAAC(6')-Ib7Δ. Da Stamm *E. coli* GK 2894 *qnrA*-positiv getestet wurde, konnte vermutet werden, dass *qnrA* und *aac(6')-Ib7* auf einem Plasmid lokalisiert waren (pAAC(6')-Ib7) und dass *qnrA* bei Stamm *E. coli* JM109 pAAC(6')-Ib7Δ nach der Transformation verloren gegangen sein könnte. Dies wurde mittels

Ergebnisse

PCR mit den *qnrA*-spezifischen Primern *qnrA_fw_5`_+24* und *qnrA_rv_3`_+650* überprüft. *QnrA* konnte in Transformand *E. coli* JM109 pAAC(6′)-Ib7 nachgewiesen, jedoch in Transformand *E. coli* JM109 pAAC(6′)-Ib7Δ nicht detektiert werden.

Die Ergebnisse ermöglichen eine erste Abschätzung des Einflusses von *aac(6′)-Ib-cr* auf die Empfindlichkeit gegenüber Fluorchinolonen. Die Plasmide mit den Genen *aac(6′)-Ib-wt* (*E. coli* GK 2850) und *aac(6′)-Ib11* (*E. coli* GK 2851) konnten nicht transformiert oder konjugiert werden. Daher wurde im Folgenden das *aac(6′)-Ib-wt*-Gen und die Varianten *aac(6′)-Ib7*, *aac(6′)-Ib11* und *aac(6′)-Ib-cr* unter definierten Bedingungen in den gleichen Vektor inseriert weiter charakterisiert.

3.1.1.3 Klonierung von *aac(6′)-Ib-cr*

Zunächst sollten die Gene *aac(6′)-Ib-cr*, *aac(6′)-Ib-wt*, *aac(6′)-Ib7* sowie *aac(6′)-Ib11* mit ihrem eigenen Promotor in einen Vektor kloniert werden, um die ursprüngliche Regulation des Promotors, die natürliche Expressionsstärke der Gene und um die native Vermittlung der Resistenz beizubehalten.

Da es von den Promotorsequenzen der Gene *aac(6′)-Ib-cr*, *aac(6′)-Ib-wt*, *aac(6′)-Ib7* sowie *aac(6′)-Ib11* keine veröffentlichten Sequenzen gibt, wurde zunächst versucht, durch direkte Sequenzierung des Bereichs stromaufwärts von *aac(6′)-Ib*, die Promotorsequenz zu bestimmen. Hierfür wurden ca. 50 ng bzw. 100 ng Plasmid-DNA der Transformanden *E. coli* JM109 pAAC(6′)-Ib7 und *E. coli* JM109 pAAC(6′)-Ib-cr aus einer Isolierung mit dem NucleoBond® Xtra Midi Kit jeweils mit 30 pmol des Primers *aac(6′)_rev_+201_SEQ* (5′-AACGTACGACTGGGCATACCCAATCGGCT-3′) und 6 µl Quick Start Mix in einem 20 µl Ansatz gemischt. Das Programm der Sequenzier-PCR sowie das weitere Vorgehen wurden wie unter 2.2.2.14 beschrieben durchgeführt. Hieraus ließen sich keine auswertbaren Chromatogramme generieren. Mögliche Ursache könnte die Anwesenheit einer zu großen Menge an chromosomaler DNA im Ansatz sein, die bei der Isolierung von Plasmid-DNA mit dem NucleoBond® Xtra Midi Kit stets mit isoliert wurde, jedoch bei den übrigen Versuchen nicht störte. Mehrere Versuche die chromosomale DNA aus den Ansätzen zu entfernen, wie die Extraktion der Plasmid-DNA aus einem Agarose-Gel, führten nicht zu einem auswertbaren Ergebnis. Da die Gene *aac(6′)-Ib-cr*, *aac(6′)-Ib-wt*, *aac(6′)-Ib7* sowie *aac(6′)-Ib11* außerdem häufig in Integrons lokalisiert sind (58), daher jeweils von einem zentralen

Promotor reguliert werden und möglicherweise weitere Genkassetten zwischen dem zentralen Promotor und dem *aac(6′)-Ib*-Gen liegen können, wurde schließlich von einer Klonierung der Gene mit ihrem eigenen Promotor und von der Sequenzierung des Bereichs stromaufwärts abgesehen. Die Gene *aac(6′)-Ib-cr*, *aac(6′)-Ib-wt*, *aac(6′)-Ib7* sowie *aac(6′)-Ib11* sollten nun ohne ihren eigenen Promotor, hinter einen durch Isopropyl-1-thio-β-D-Galaktopyranosid (IPTG) induzierbaren Promotor in das Plasmid pUC19 kloniert werden. Die Klonierung der Gene *aac(6′)-Ib-cr*, *aac(6′)-Ib-wt*, *aac(6′)-Ib7* sowie *aac(6′)-Ib11* ohne ihren eigenen Promotor erbrachte einen weiteren Vorteil, denn so wurden alle Gene identisch reguliert und exprimiert, sodass die vermittelte Resistenz lediglich auf das Gen zurückzuführen war, nicht auf die Aktivität der Promotoren der verschiedenen *aac(6′)-Ib*-Gene.

Zu Beginn der Klonierung wurden mehrere Varianten des *aac(6′)-Ib*-Gens verschiedener *Enterobacteriaceae* verglichen um anschließend passende Primer zu konstruieren. Tabelle 3-4 zeigt einen Vergleich mehrerer Proteinsequenzen von AAC(6′)-Ib-cr, AAC(6′)-Ib-wt und AAC(6′)-Ib7.

Tabelle 3-4 Tabellarische Übersicht der N-terminalen Aminosäuresequenzen von AAC(6′)-Ib-cr, AAC(6′)-Ib-wt und AAC(6′)-Ib7 aus verschiedenen *Enterobacteriaceae*-Stämmen.

Accession-Nr.	Stamm	Typ	N-Terminus
EF375620	<i>E. cloacae</i>	AAC(6′)-Ib-cr	MTEHDLA...
EU675686	<i>E. coli</i>	AAC(6′)-Ib-cr	MSNAKTKLGITKYSI VTNCNDSVTLRLMTEHDLA...
AY259086	<i>E. coli</i>	AAC(6′)-Ib-cr	MTEHDLA...
M55547	<i>K. pneumoniae</i>	AAC(6′)-Ib-wt	MSIQHFQTKLGITKYSI VTNSNDSVTLRLMTEHDLA...
EU819087	<i>P. aeruginosa</i>	AAC(6′)-Ib7	MTNSNDSVTLRLMTEHDLA...

Bei einem Vergleich mehrerer veröffentlichter Aminosäuresequenzen der AAC(6′)-Ib-Varianten fällt auf, dass sich die N-terminalen Aminosäuren zu Beginn der Sequenz unterscheiden.

Tabelle 3-5 zeigt den Vergleich der Basensequenz am 5′-Ende von *E. coli* mit *aac(6′)-Ib-cr* (Accession-Nr. EU675686) und *K. pneumoniae* mit *aac(6′)-Ib-wt* (Accession-Nr. M55547).

Ergebnisse

Tabelle 3-5 Tabellarische Übersicht der 5'-Enden der Basensequenzen von *E. coli* mit *aac(6')-Ib-cr* (Accession-Nr. EU675686) und *K. pneumoniae* mit *aac(6')-Ib-wt* (Accession-Nr. M55547).

Accession-Nr.	Stamm	Typ	5'-Ende
EU675686	<i>E. coli</i>	<i>aac(6')-Ib-cr</i>	ATGAGCAACGC AAAAACA AAAGTTAGGCATCACAAAGTAC...
M55547	<i>K. pneumoniae</i>	<i>aac(6')-Ib-wt</i>	ATGAGTATTCAACATTTCCAA ACA AAAGTTAGGCATCACAAAGTAC...

Zunächst wurde Primer *aac(6')-Ib* 5'-66 for konstruiert. Dieser bindet die unterstrichene Sequenz zu Beginn der grau hinterlegten Basen in Tabelle 3-5. In Kombination mit Primer AAC6 +519 rev wurde durch PCR überprüft, ob bei den Stämmen GK 2850, GK 2851, GK 2894, GK 2895, GK 2951 ein spezifisches Produkt entsteht.

Anschließend wurde mit den Primern HindIII-*aac(6')* -66 for No.2 und HindIII-*aac(6')* +519 rev ein spezifisches PCR-Fragment amplifiziert, welches von HindIII Schnittstellen flankiert war (siehe 2.2.2.8.3).

Als Template für die PCR zur Generierung des Inserts für die Klonierung diente zunächst *E. coli* GK 2951, als Vektor wurde Plasmid pUC19 ausgewählt und *aac(6')-Ib-cr* über die HindIII-Schnittstelle der Multiple Cloning Site (MCS) *in frame* mit den ersten acht Aminosäuren des N-Terminus von LacZ (MTMITPSL) kloniert. Das rekombinante Plasmid pHPNE19-01 ist in Abbildung 3-4 dargestellt.

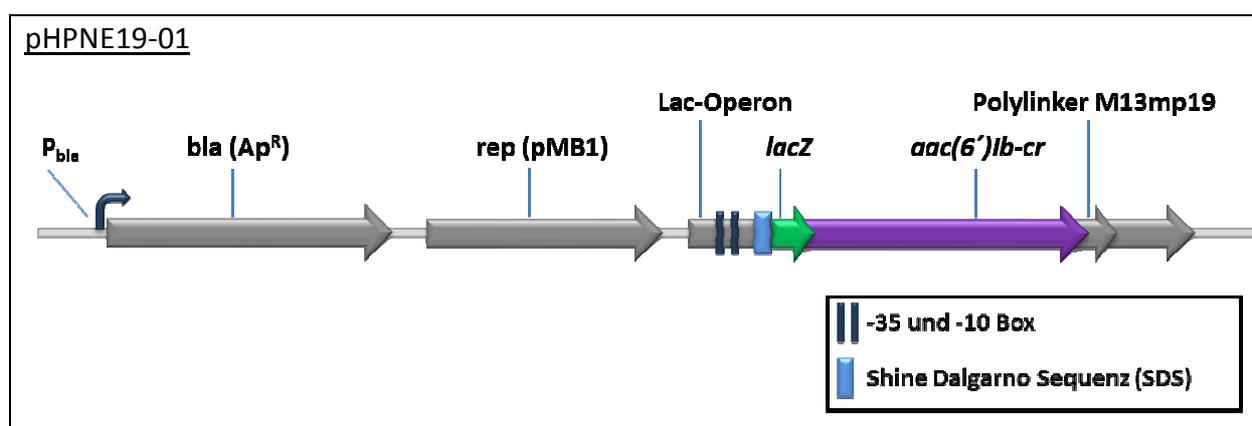


Abbildung 3-4 Lineare Darstellung des rekombinanten Plasmids pHPNE19-01. *P_{bla}* bezeichnet den Promotor des *bla*-Gens, das *bla*-Gen kodiert für eine Beta(β)-Lactamase, Ap^R steht für Ampicillin-Resistenz, rep ist die Abkürzung für Replikationsursprung, pMB1 gibt die Herkunft des Replikationsursprungs an, Lac-Operon steht für Laktose-Operon, das *lacZ*-Gen kodiert für das Enzym Beta(β)-Galaktosidase, das *aac(6')-Ib-cr*-Gen kodiert für die Aminoglykosid 6'-N-Acetyltransferase Typ Ib-cr.

Zur Kontrolle wurde das hergestellte Plasmid sequenziert. Zur Überprüfung der Funktion des Konstruktes pHPNE19-01 wurden MHK-Werte durch Mikrodilution bestimmt und mit dem Transformanden *E. coli* JM 109 pAAC(6´)-Ib-cr verglichen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3-6 zusammengefasst.

Tabelle 3-6 Ergebnis der MHK-Bestimmung zur Kontrolle des Konstruktes pHPNE19-01 im Vergleich mit *E. coli* JM109 pAAC(6´)-Ib-cr. Als Referenz dient *E. coli* JM109.

Stamm	Kanamycin	Gentamicin	Amikacin	Ciprofloxacin	Norfloxacin	Moxifloxacin
<i>E. coli</i> JM109	0,5	0,125	0,25	0,08	0,32	0,16
<i>E. coli</i> JM109 pAAC(6´)-Ib-cr	32	0,25	4	0,32	1,28	0,16
<i>E. coli</i> JM109 pHPNE19-01	16	0,125	2	0,16	1,28	nb

MHK-Werte in µg/ml. (nb = nicht bestimmt)

Die MHK-Werte für *E. coli* JM109 pHPNE19-01 im Vergleich zu *E. coli* JM109 steigen für Kanamycin um fünf Verdünnungsstufen, für Gentamicin und Amikacin um max. drei Verdünnungsstufen, für Ciprofloxacin um eine Verdünnungsstufe, für Norfloxacin um zwei Verdünnungsstufen an. Die Werte für Moxifloxacin ändern sich hingegen nicht. Die MHK-Werte für *E. coli* JM109 pAAC(6´)-Ib-cr und *E. coli* JM109 pHPNE19-01 weichen um maximal eine Verdünnungsstufe voneinander ab, was innerhalb des Fehlers dieser Methode lag.

Nach der erfolgreichen Klonierung von *aac(6´)-Ib-cr* in pUC19 wurde der Stamm *E. coli* JM109 pHPNE19-01 zunächst für die weiteren Versuche ausgewählt.

3.1.1.4 Herstellung von Deletionsmutanten von pHPNE19-01 und Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration

Wie unter 1.3.2 bereits beschrieben, besitzen Enzyme der GNAT Superfamilie vier hochkonservierte Motive A bis D (120). Ein Vergleich verschiedener N-Termini von AAC(6´)-Ib-Varianten zeigte, dass die Aminosäuren des N-Terminus von AAC(6´)-Ib möglicherweise keine essentielle Funktion haben (vergleiche Tabelle 3-4, Seite 93).

Im folgenden Schritt wurden mit den Primern pUC19::*aac(6´)-Ib-cr-66-45-LacZΔ+1+24*for und pUC19::*aac(6´)-Ib-cr-66-24*rev in der SSM-PCR (siehe 2.2.2.8.4) die Nukleotide, welche für die

Ergebnisse

acht Aminosäuren von LacZ (MTMITPSL) kodieren, in Plasmid pHPNE19-01 deletiert. Es entstand Plasmid pHPNE19-01.1 (siehe Abbildung 3-5).

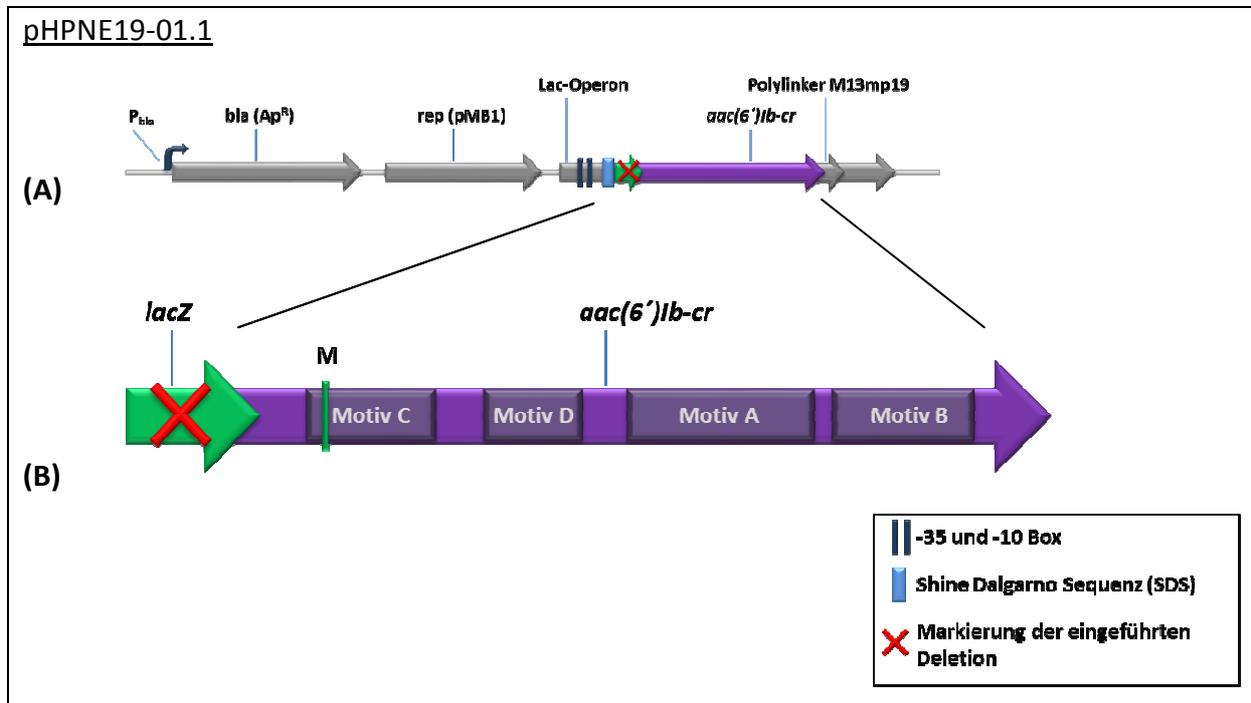


Abbildung 3-5 Lineare Darstellung des Plasmids pHPNE19-01.1 (A) und der Motive A – D von *aac(6')Ib-cr* (B) mit Markierung der eingeführten Deletion. *P_{bla}* bezeichnet den Promotor des *bla*-Gens, das *bla*-Gen kodiert für eine Beta(β)-Lactamase, *Ap^R* steht für Ampicillin-Resistenz, *rep* ist die Abkürzung für Replikationsursprung, *pMB1* gibt die Herkunft des Replikationsursprungs an, Lac-Operon steht für Laktose-Operon, das *lacZ*-Gen kodiert für das Enzym Beta(β)-Galaktosidase, das *aac(6')Ib-cr*-Gen kodiert für die Aminoglykosid 6'-N-Acetyltransferase Typ Ib-cr. M steht für die Aminosäure Methionin.

Anschließend wurden mit den Primern pUC19::*aac(6')Ib-cr*+1+20-LacZdel+1+24for und pUC19::*aac(6')Ib-cr*+1+42rev weitere 66 bp des 5'-Endes von *aac(6')Ib-cr* in Plasmid pHPNE19-01, bis zum nächsten Startcodon ATG, welches für die Aminosäure Methionin (M) kodiert und in Motiv C liegt, deletiert. Es entstand Plasmid pHPNE19-01.2 (siehe Abbildung 3-6).

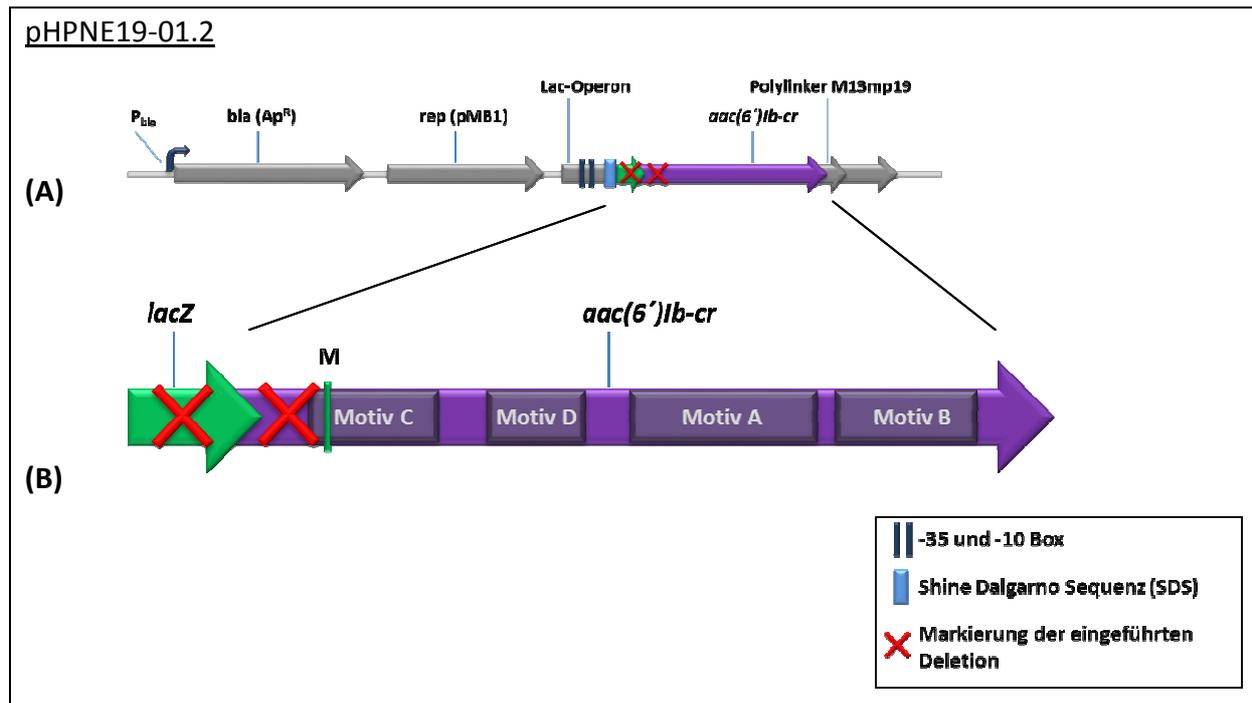


Abbildung 3-6 Lineare Darstellung des Plasmids pHPNE19-01.2 (A) und der Motive A – D von *aac(6')-Ib-cr* (B) mit Markierung der eingeführten Deletionen. *P_{bla}* bezeichnet den Promotor des *bla*-Gens, das *bla*-Gen kodiert für eine Beta(β)-Lactamase, *Ap^R* steht für Ampicillin-Resistenz, *rep* ist die Abkürzung für Replikationsursprung, *pMB1* gibt die Herkunft des Replikationsursprungs an, Lac-Operon steht für Laktose-Operon, das *lacZ*-Gen kodiert für das Enzym Beta(β)-Galaktosidase, das *aac(6')-Ib-cr*-Gen kodiert für die Aminoglykosid 6'-N-Acetyltransferase Typ Ib-cr. M steht für die Aminosäure Methionin.

Außerdem wurden mit den Primern pUC19::*aacLacZ*(+M)for und pUC19::*aac(6')-Ib-cr*-66-24rev die Nukleotide, welche für die acht Aminosäuren MTMITPSL kodieren, zum einen durch ein ATG (kodiert für ein Methionin (M)) in Plasmid pHPNE19-01.1a, sowie zum anderen mit den Primern pUC19::*aacLacZ*(+MSNAK)for und pUC19::*aac(6')-Ib-cr*-66-24rev durch die Nukleotide, welche für die Aminosäuresequenz MSNAK kodiert, die in *E. coli* mit der Accession Nummer EU675686 zu finden waren, in Plasmid pHPNE19-01.1b, ersetzt.

Als Template der PCR zur Herstellung der Plasmide pHPNE19-01.1, pHPNE19-01.2, pHPNE19-01.1a und pHPNE19-01.1b diente die durch alkalische Lyse isolierte Plasmid-DNA von pHPNE19-01. Die korrekte Einführung der Deletionen bzw. Insertionen oder Mutation in das jeweilige Plasmid wurde mittels Sequenzierung kontrolliert. Ob die rekombinanten Plasmide pHPNE19-01.1, pHPNE19-01.2, pHPNE19-01.1a und pHPNE19-01.1b ein funktionsfähiges Enzym exprimieren, wurde durch die Bestimmung der Empfindlichkeit von Ciprofloxacin mittels Mikrodilutionsmethode kontrolliert.

Ergebnisse

Die grafische Darstellung der Plasmide sowie die Ergebnisse der MHK-Bestimmung sind in Tabelle 3-7 zusammengefasst.

Tabelle 3-7 Grafische Darstellung der Plasmide und Ergebnisse der MHK-Bestimmung.

Stamm	Plasmid	Lineare Darstellung der Plasmide	Ciprofloxacin
m			n
<i>E. coli</i> JM109	-	-	0,08
<i>E. coli</i> JM109	pUC19		0,08
<i>E. coli</i> JM109	pHPNE19-01		0,16
<i>E. coli</i> JM109	pHPNE19-01.1		0,08
<i>E. coli</i> JM109	pHPNE19-01.2		0,08
<i>E. coli</i> JM109	pHPNE19-01.1a		0,16
<i>E. coli</i> JM109	pHPNE19-01.1b		0,16

MHK-Wert in $\mu\text{g/ml}$. *P_{bla}* bezeichnet den Promotor des *bla*-Gens, das *bla*-Gen kodiert für eine Beta(β)-Lactamase, Ap^R steht für Ampicillin-Resistenz, *rep* ist die Abkürzung für Replikationsursprung, *pMB1* gibt die Herkunft des Replikationsursprungs an, Lac-Operon steht für Laktose-Operon, das *lacZ*-Gen kodiert für das Enzym Beta(β)-Galaktosidase, das *aac(6')Ib-cr*-Gen kodiert für die Aminoglykosid 6'-N-Acetyltransferase Typ Ib-cr. M steht für die Aminosäure Methionin, MSNAK für die Aminosäuren Methionin, Serin, Asparagin, Alanin und Lysin.

Die Plasmide pHPNE19-01, pHPNE19-01.1a und pHPNE19-01.1b zeigten eine Erhöhung des MHK-Wertes um eine Verdünnungsstufe im Vergleich zu *E. coli* JM109 mit pUC19, die

Varianten pHPNE19-01.1 und pHPNE19-01.2 hingegen nicht. Motiv C sollte daher intakt bleiben, vergleiche pHPNE19-01.2 in Abbildung 3-6.

Da die Resistenz, die durch das in pUC19 klonierte *aac(6')-Ib-cr* vermittelt wird, möglichst mit der natürlich vermittelten Resistenz von AAC(6')-Ib-cr vergleichbar sein sollte, wurden die MHK-Werte der Stämme *E. coli* JM109 pHPNE19-01.1a und *E. coli* JM109 pHPNE19-01.1b ebenfalls mit den MHK-Werten von Transformand *E. coli* JM109 pAAC(6')-Ib-cr verglichen. In Abbildung 3-7 sind die MHK-Werte grafisch dargestellt.

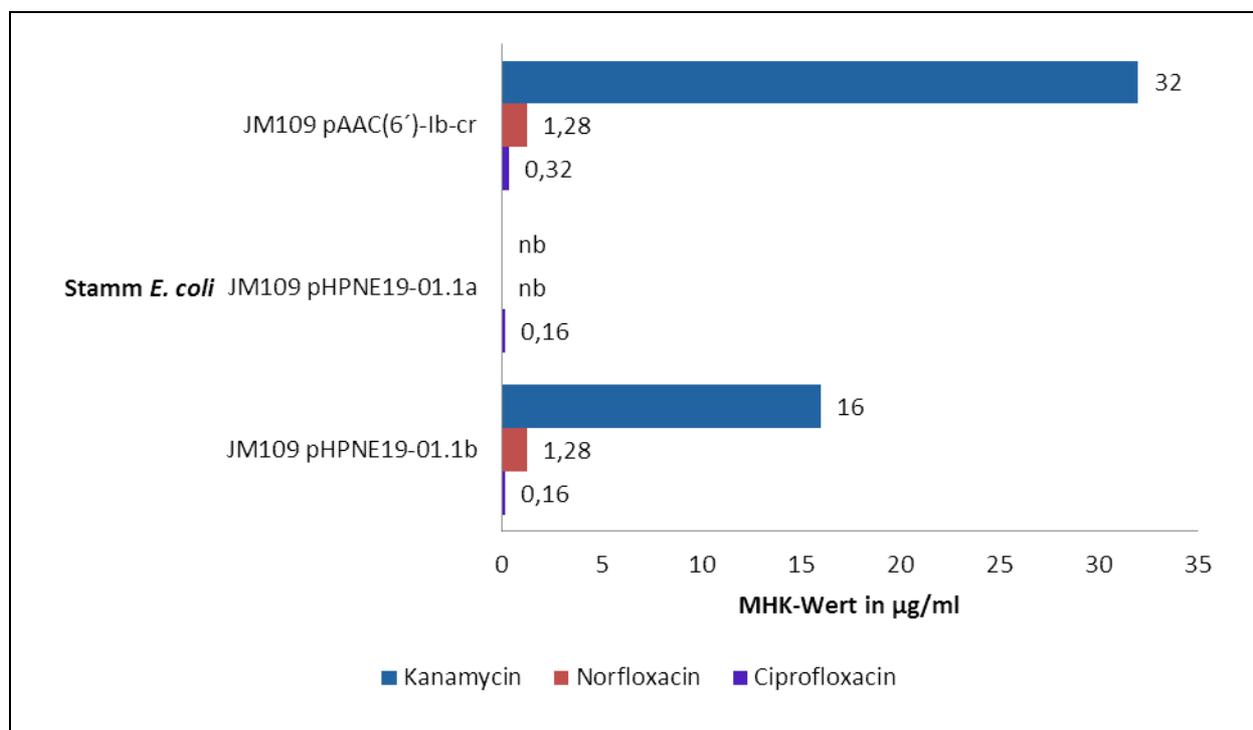


Abbildung 3-7 Grafische Darstellung der MHK-Werte von Kanamycin, Norfloxacin und Ciprofloxacin für *E. coli* JM109 mit Plasmid pHPNE19-01.1a und pHPNE19-01.1b im Vergleich mit *E. coli* JM109 pAAC(6')-Ib-cr.

Die MHK-Werte für Ciprofloxacin divergieren lediglich um eine Verdünnungsstufe bei einem Vergleich von *E. coli* JM109 pAAC(6')-Ib-cr mit *E. coli* JM109 pHPNE19-01.1a und *E. coli* JM109 pHPNE19-01.1b. Die MHK-Werte von Kanamycin für *E. coli* JM109 pHPNE19-01 (vergleiche Tabelle 3-6, Seite 95) und *E. coli* JM109 pHPNE19-01.1b sind identisch, sie weichen um lediglich eine Verdünnungsstufe von *E. coli* JM109 pAAC(6')-Ib-cr ab. Für die folgenden Versuche wurde Plasmid pHPNE19-01.1b ausgewählt.

3.1.1.5 Klonierung der Varianten *aac(6′)-Ib-wt*, *aac(6′)-Ib7* und *aac(6′)-Ib11* in Plasmid pUC19

Nach dem gleichen Prinzip und mit den gleichen Primern wie zuvor (HindIII *aac(6′)* -66 for No.2 und HindIII *aac(6′)* +519 rev) wurden auch die Gene der Varianten *aac(6′)-Ib-wt* (pHPNE19-05.1), *aac(6′)-Ib7* (pHPNE19-06.1) und *aac(6′)-Ib11* (pHPNE19-07.1) in pUC19 kloniert. Anschließend wurden auch hier die Nukleotide, die für die acht Aminosäuren MTMITPSL kodieren, deletiert und durch die Nukleotide, die für die Aminosäuren MSNAK kodieren, durch SSM-PCR ersetzt (siehe 2.2.2.8.4, verwendete Primer: pUC19::*aacLacZ*(+MSNAK)for und pUC19::*aac(6′)-Ib-cr-66-24rev*).

Als Template der PCR zur Konstruktion der Plasmide pHPNE19-05.1 diente *E. coli* GK 2850, für pHPNE19-06.1 diente *E. coli* GK 2894 und für pHPNE19-07.1 diente *E. coli* GK 2851. Die fertigen Konstrukte sind in Abbildung 3-8 dargestellt.

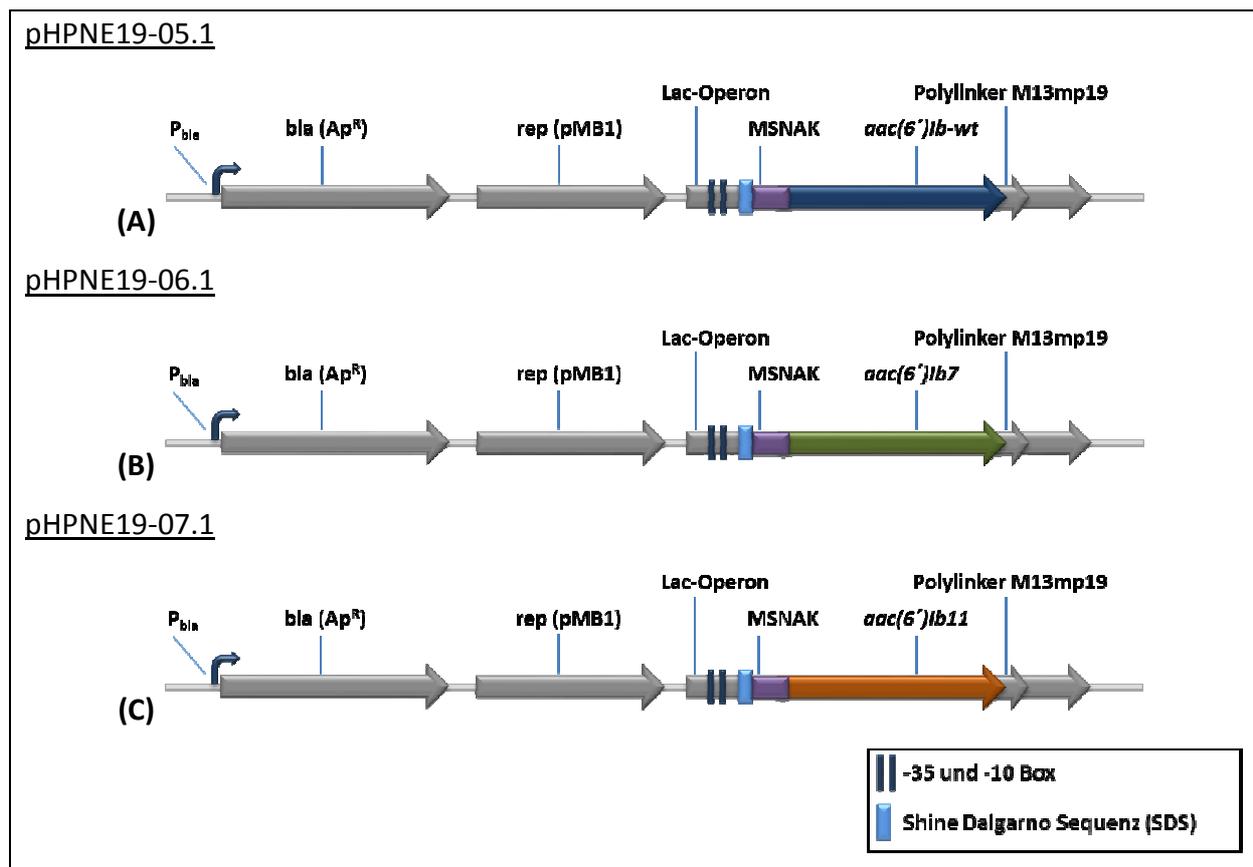


Abbildung 3-8 Lineare Darstellung der Plasmide pHPNE19-05.1 (A), pHPNE19-06.1 (B) und pHPNE19-07.1 (C). *P_{bla}* bezeichnet den Promotor des *bla*-Gens, das *bla*-Gen kodiert für eine Beta(β)-Lactamase, Ap^R steht für Ampicillin-Resistenz, rep ist die Abkürzung für Replikationsursprung, pMB1 gibt die Herkunft des Replikationsursprungs an, Lac-Operon steht für Laktose-Operon, das *lacZ*-Gen kodiert für das Enzym Beta(β)-Galaktosidase, das *aac(6′)-Ib-wt*-Gen kodiert für die Aminoglykosid 6′-N-Acetyltransferase Typ Ib-wt, *aac(6′)-Ib7* kodiert für die Aminoglykosid 6′-N-Acetyltransferase Typ

Ib7, *aac(6')-Ib11* kodiert für die Aminoglykosid 6'-N-Acetyltransferase Typ Ib11. MSNAK steht für die Aminosäuren Methionin, Serin, Asparagin, Alanin und Lysin.

Die erfolgreiche Klonierung wurde durch Sequenzierung der Übergänge des Konstruktes von Plasmid-Insert-Plasmid kontrolliert. Zur Kontrolle der Expression eines funktionsfähigen Enzyms von den Plasmiden pHPNE19-05.1, pHPNE19-06.1 und pHPNE19-07.1, wurde die Empfindlichkeit von Kanamycin, Gentamicin, Amikacin, Ciprofloxacin und Norfloxacin für die entsprechenden Stämme mit den rekombinanten Plasmiden bestimmt (Mikrodilution). Die MHK-Werte sind in Tabelle 3-8 zusammengefasst.

Tabelle 3-8 Werte der Empfindlichkeitsbestimmung in µg/ml der Stämme *E. coli* JM109 pHPNE19-05.1, *E. coli* JM109 pHPNE19-06.1 und *E. coli* JM109 pHPNE19-07.1 zur Kontrolle der Funktion, im Vergleich mit den als Referenz eingesetzten Stämmen *E. coli* JM109, *E. coli* JM109 pUC19 und *E. coli* JM109 pHPNE19-01.1b.

Stamm	Kanamycin	Gentamicin	Amikacin	Ciprofloxacin	Norfloxacin
<i>E. coli</i> JM109	0,5	0,125	0,25	0,08	0,32
<i>E. coli</i> JM109 pUC19	0,5	0,125	0,25	0,08	0,32
<i>E. coli</i> JM109 pHPNE19-01.1b	16	0,125	2	0,16	1,28
<i>E. coli</i> JM109 pHPNE19-05.1	32	0,25	4	0,08	0,32
<i>E. coli</i> JM109 pHPNE19-06.1	32	2	2	0,08	0,32
<i>E. coli</i> JM109 pHPNE19-07.1	32	2	4	0,08	0,32

Der MHK-Wert von Kanamycin stieg für *E. coli* JM109 pHPNE19-05.1 (*aac(6')-Ib-wt*), *E. coli* JM109 pHPNE19-06.1 (*aac(6')-Ib7*) und für *E. coli* JM109 pHPNE19-07.1 (*aac(6')-Ib11*) im Vergleich zu *E. coli* JM109 um fünf bis sechs Verdünnungsstufen an, der MHK-Wert von Gentamicin stieg um eine bis vier Stufen und der von Amikacin um drei bis vier Stufen. Die MHK-Werte von Ciprofloxacin und Norfloxacin stiegen nicht an.

Auch hier sollte die Vermittlung der Resistenz durch AAC(6')-Ib7 von pUC19 möglichst der natürlich vermittelten Resistenz von AAC(6')-Ib7 entsprechen. Für die Enzyme AAC(6')-Ib-wt und AAC(6')-Ib11 konnten diese Vergleiche nicht angestellt werden, da in diesen Fällen das Plasmid zuvor nicht transformiert werden konnte (siehe Abschnitt 3.1.1.2, Seite 85ff) und es somit keinen Vergleichsstamm gab. Die MHK-Werte für Stamm *E. coli* JM109 pHPNE19-06.1 und für Transformand *E. coli* JM109 pAAC(6')-Ib7Δ sind in Abbildung 3-9 grafisch dargestellt.

Ergebnisse

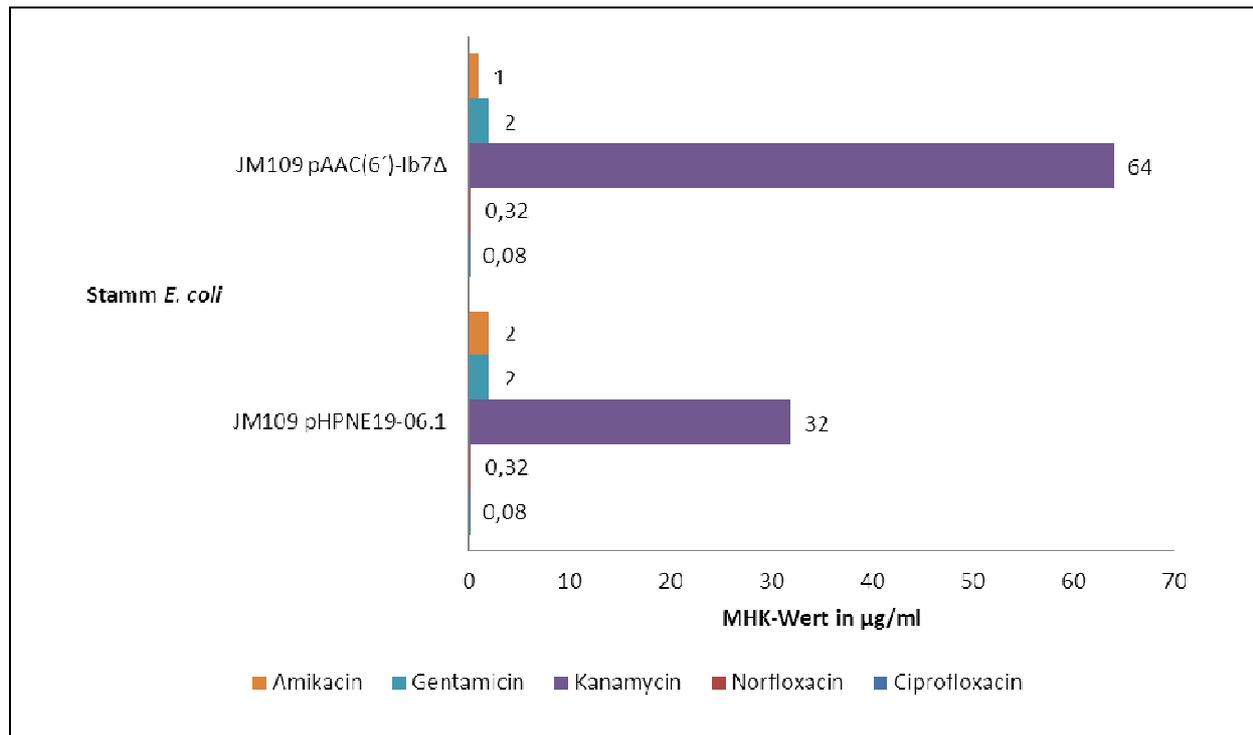


Abbildung 3-9 Grafische Darstellung der MHK-Werte von Kanamycin, Norfloxacin und Ciprofloxacin für *E. coli* JM109 mit Plasmid pHPNE19-06.1 im Vergleich mit *E. coli* JM109 pAAC(6')-Ib7Δ.

Die MHK-Werte von Amikacin und Kanamycin für Transformand *E. coli* JM109 pAAC(6')-Ib7 und von *E. coli* JM109 pHPNE19-06.1 mit dem in pUC19 klonierten *aac(6')-Ib7* weichen lediglich um eine Verdünnungsstufe voneinander ab, die MHK-Werte von Gentamicin sind identisch.

3.1.1.6 Zusammenfassung der Ergebnisse von Abschnitt 3.1.1

- * Bei 20 von 25 Stämmen des untersuchten Kollektivs aus den Jahren 2001 bis 2004 wurde ein *aac(6')-Ib-cr*-Gen nachgewiesen.
- * In diesen 20 Stämmen waren mindestens drei chromosomale Mutationen in *gyrA* bzw. *parC* vorhanden (Ausnahme GK 2815).
- * Die Mutationen in den Codons 102 und 179 von *aac(6')-Ib-cr* wurden nur gemeinsam gefunden.

- * Aus fünf ausgewählten Stämmen (GK 2850, GK 2851, GK 2894, GK 2895, GK 2951) wurden erfolgreich Plasmide isoliert.

- * In *E. coli* GK 2850 wurden sechs Banden in einer Größe von ca. 1 kb bis 8 kb detektiert und eine weitere Bande im Bereich über 23 kb.
- * In *E. coli* GK 2851 konnte lediglich eine Bande im Bereich über 23 kb detektiert werden.
- * In *E. coli* GK 2894 wurden vier Banden in einer Größe von ca. 1 kb bis 3 kb, sowie zwei Banden im Bereich über 23 kb detektiert.
- * In *E. coli* GK 2895 konnten drei Banden über der Bande der chromosomalen DNA und zwei Banden in einer Größe von ca. 2,5 kb bis 4 kb detektiert werden.
- * In *E. coli* GK 2951 wurde eine Bande über der Bande der chromosomalen DNA und vier Banden in einer Größe von 2,5 kb bis über 10 kb detektiert.

- * Die Plasmide von *E. coli* GK 2894 (AAC(6')-Ib7) und GK 2951 (AAC(6')-Ib-cr) wurden erfolgreich transformiert, konjugiert wurde nur das Plasmid von Stamm GK 2951.
- * Transformanden *E. coli* JM109 pAAC(6')-Ib-cr besitzt nur ein Plasmid in einer Größe über 23 kb, hier steigen die MHK-Werte von Ciprofloxacin und Norfloxacin für *E. coli* JM109 um zwei Verdünnungsstufen an, während die MHK-Werte von Moxifloxacin konstant bleiben.
- * Die Transformanden *E. coli* JM109 pAAC(6')-Ib7 (Nr. 24) und *E. coli* JM109 pAAC(6')-Ib7Δ (Nr. 23) besitzen jeweils nur ein Plasmid in einer Größe über 23 kb.
- * QnrA und AAC(6')-Ib7 in *E. coli* GK 2894 waren auf einem Plasmid kolokalisiert.

- * Die MHK-Werte für *E. coli* JM109 pHPNE19-01 (*lacZ-aac(6')-Ib-cr*) steigen von Kanamycin um fünf Verdünnungsstufen, von Ciprofloxacin um eine Verdünnungsstufe, von Norfloxacin um zwei Verdünnungsstufen im Vergleich zu *E. coli* JM109 an, die Werte von Moxifloxacin ändern sich hingegen nicht.
- * Nach einführen in *E. coli* JM109 zeigten die Plasmide pHPNE19-01.1a und pHPNE19-01.1b eine Erhöhung des MHK-Wertes von Ciprofloxacin um eine Verdünnungsstufe im Vergleich zu *E. coli* JM109 pUC19, die Varianten pHPNE19-01.1 und pHPNE19-01.2 hingegen nicht.

- ➔ Die Anzahl und die Art der Aminosäuren des N-Terminus war nicht ausschlaggebend für die Funktionsfähigkeit von AAC(6′)-Ib-cr. Sowohl die Aminosäuren MTMITPSL, als auch MSNAK oder M gewährleisteten die Funktion.
- ➔ Motiv C scheint für die Funktion essentiell zu sein, da bei Deletionen in Motiv C kein funktionsfähiges AAC(6′)-Ib-cr-Enzym gebildet wurde.
- ➔ Die Mutationen 102 und 179 liegen in keinem der Motive A-D.

* Die Empfindlichkeit für *E. coli* JM109 pHPNE19-05.1 (*aac(6′)-Ib-wt*), *E. coli* JM109 pHPNE19-06.1 (*aac(6′)-Ib11*) und *E. coli* JM109 pHPNE19-07.1 (*aac(6′)-Ib11*) von Kanamycin stieg im Vergleich zu *E. coli* JM109 um fünf bis sechs Verdünnungsstufen an, während die MHK-Werte von Ciprofloxacin und Norfloxacin nicht ansteigen.

Im Folgenden sollte kontrolliert werden, ob auch in den Varianten AAC(6′)-Ib7 in *E. coli* JM109 pHPNE19-06.1 und AAC(6′)-Ib11 *E. coli* JM109 pHPNE19-07.1 eine cr Variante, bei gezieltem Einbringen analoger Mutationen an Position 102 und 179, entstehen kann (3.1.2).

3.1.2 Ortsgerichtete Mutagenese von AAC(6)-Ib-wt und Varianten

3.1.2.1 Gezielte Einführung der Mutation W102R und/oder D179Y in *aac(6′)-Ib-wt*, *aac(6′)-Ib7* und *aac(6′)-Ib11* sowie Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration

Die bis auf zwei Mutationen perfekte Homologie zwischen *aac(6′)-Ib* und *aac(6′)-Ib-cr* legte nahe, dass *aac(6′)-Ib-cr* aus *aac(6′)-Ib* durch zwei Punktmutationen, die jeweils zum Aminosäureaustausch (D179Y, W102R), führten, entstanden sein könnte. Dafür war plausibel anzunehmen, dass die Mutationen nacheinander erworben wurden. Es stellte sich daher die Frage, in welcher Reihenfolge dies geschehen war und wie der Selektionsdruck dafür ausgesehen haben könnte. *In vitro* erzeugte Einzelmutanten weisen nur im Falle der D179Y-Mutation, nicht aber bei einer W102R-Mutation, eine um zwei Verdünnungsstufen erhöhte MHK für Ciprofloxacin auf (124), was einem geringeren Effekt entspricht, als bei der Kombination der beiden Mutationen, denn hier steigt der MHK-Wert um drei bis vier Verdünnungsstufen an. Da es über die Entstehung der Variante AAC(6′)-Ib-cr keine Erkenntnisse gibt, diese Variante bisher nur mit beiden Veränderungen (D179Y, W102R) gefunden wurde und es über die Existenz der AAC(6′)-Ib-Subtypen AAC(6′)-Ib7 und AAC(6′)-

Ib11 als cr-Varianten keine Angaben gibt, wurde zunächst je eine der beiden Mutationen, anschließend beide Mutationen in die Plasmide pHPNE19-05.1 (*aac(6')-Ib-wt*), pHPNE19-06.1 (*aac(6')-Ib7*) und pHPNE19-07.1 (*aac(6')-Ib11*) eingeführt. Hier stellte sich die Frage, ob der Effekt von AAC(6')-Ib-cr durch analoge Mutation auf die AAC(6')-Ib-Subtypen AAC(6')-Ib7 und AAC(6')-Ib11 übertragen werden kann und ob auch hier die Einzelmutation D179Y oder W102R zu einer Erhöhung des MHK-Wertes führen.

Mit Hilfe der SSM-PCR (2.2.2.8.4) mit den Primern *aac(6)-Ib_W102R_for* und *aac(6)-Ib_W102R_rev* wurde die Mutation an Position 102, mit den Primern *aac(6)-Ib_D179Y_for* und *aac(6)-Ib_D179Y_rev* die Mutation an Position 179 in die Plasmide pHPNE19-05.1, pHPNE19-06.1 und pHPNE19-07.1 eingeführt.

Die korrekte Einführung der Mutation in das jeweilige Plasmid wurde mittels Sequenzierung kontrolliert. Zur Funktionskontrolle der jeweiligen plasmidkodierten Genvariante wurden die MHK-Werte von Kanamycin, Amikacin und Gentamicin für die rekombinanten *E. coli* JM109-Zellen mit einem der entsprechenden Plasmide bestimmt. Des Weiteren diente die Bestimmung des MHK-Wertes von Norfloxacin und Ciprofloxacin der Kontrolle, ob eine der beiden Mutationen ausreichend war für eine Erhöhung der Resistenz und, ob der AAC(6')-Ib-cr-analoge Effekt durch die Mutationen (D179Y und W102R) auf die Varianten übertragen werden konnte. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3-9 zusammengefasst.

Tabelle 3-9 Werte der Empfindlichkeitsbestimmung der Stämme *E. coli* JM109 pHPNE19-05.1, *E. coli* JM109 pHPNE19-06.1 und *E. coli* JM109 pHPNE19-07.1 zur Kontrolle der Funktion, im Vergleich mit den Referenzstämmen.

Stamm	Kanamycin	Gentamicin	Amikacin	Ciprofloxacin	Norfloxacin
<i>E. coli</i> JM109	0,5	0,125	0,25	0,08	0,32
<i>E. coli</i> JM109 pUC19	0,5	0,125	0,25	0,08	0,32
<i>E. coli</i> JM109 pHPNE19-01.1b	16	0,125	2	0,16	1,28
<i>E. coli</i> JM109 pHPNE19-05.1	32	0,25	4	0,08	0,32
<i>E. coli</i> JM109 pHPNE19-05.1a	32	0,125	2	0,08	0,32
<i>E. coli</i> JM109 pHPNE19-05.1b	32	0,125	8	0,16	0,32
<i>E. coli</i> JM109 pHPNE19-06.1	32	2	2	0,08	0,32
<i>E. coli</i> JM109 pHPNE19-06.1a	8	0,125	0,5	0,08	0,32
<i>E. coli</i> JM109 pHPNE19-06.1b	32	0,25	1	0,08	0,32

Ergebnisse

Stamm	Kanamycin	Gentamicin	Amikacin	Ciprofloxacin	Norfloxacin
<i>E. coli</i> JM109 pHPNE19-06.1c	2	0,06	0,5	0,16	0,64
<i>E. coli</i> JM109 pHPNE19-07.1	32	2	4	0,08	0,32
<i>E. coli</i> JM109 pHPNE19-07.1a	16	0,25	2	0,16	0,64
<i>E. coli</i> JM109 pHPNE19-07.1b	32	0,5	4	0,08	0,32
<i>E. coli</i> JM109 pHPNE19-07.1c	16	0,06	1	0,16	0,64

MHK-Werte in µg/ml.

Für die Stämme *E. coli* JM109 pHPNE19-05.1a (*aac(6')-Ib-wt-102*), pHPNE19-05.1b (*aac(6')-Ib-wt-179*), pHPNE19-06.1b (*aac(6')-Ib7-179*) und pHPNE19-07.1b (*aac(6')-Ib11-179*) stiegen die MHK-Werte von Kanamycin um sechs Verdünnungsstufen, im Vergleich zur Referenz *E. coli* JM109 mit und ohne pUC19. Im Fall von *E. coli* JM109 pHPNE19-07.1a (*aac(6')-Ib11-102*) und *E. coli* JM109 pHPNE19-07.1c (*aac(6')-Ib11-cr*) stiegen die MHK-Werte um fünf Verdünnungsstufen, für *E. coli* JM109 pHPNE19-06.1a (*aac(6')-Ib7-102*) um vier und für *E. coli* JM109 pHPNE19-06.1c (*aac(6')-Ib7-cr*) um zwei Verdünnungsstufen. Im Fall von Gentamicin stiegen die MHK-Werte für *E. coli* JM109 pHPNE19-05.1a (*aac(6')-Ib-wt-102*), *E. coli* JM109 pHPNE19-05.1b (*aac(6')-Ib-wt-179*) sowie für *E. coli* JM109 pHPNE19-06.1a (*aac(6')-Ib7-102*), *E. coli* JM109 pHPNE19-06.1c (*aac(6')-Ib7-cr*) und *E. coli* JM109 pHPNE19-07.1c (*aac(6')-Ib11-cr*) nicht an, bei *E. coli* JM109 pHPNE19-06.1b (*aac(6')-Ib7-179*) und *E. coli* JM109 pHPNE19-07.1a (*aac(6')-Ib11-102*) zeigte sich eine Erhöhung des MHK-Wertes um eine Verdünnungsstufe, für *E. coli* JM109 pHPNE19-07.1b (*aac(6')-Ib11-179*) um zwei Verdünnungsstufen. Von Amikacin zeigten alle Stämme eine Erhöhung der MHK-Werte von 1-5 Verdünnungsstufen. Lediglich die Varianten *E. coli* JM109 pHPNE19-06.1c (*aac(6')-Ib7-cr*), *E. coli* JM109 pHPNE19-07.1a (*aac(6')-Ib11-102*) und *E. coli* JM109 pHPNE19-07.1c (*aac(6')-Ib11-cr*) zeigten eine Erhöhung des MHK-Wertes von Ciprofloxacin und Norfloxacin um jeweils eine Verdünnungsstufe, *E. coli* JM109 pHPNE19-05.1b (*aac(6')-Ib-wt-179*) zeigte eine Erhöhung um eine Verdünnungsstufe von Ciprofloxacin. Der MHK-Wert von Ciprofloxacin für den Referenzstamm *E. coli* JM109 pHPNE19-01.1b (*aac(6')-Ib-cr*) war um eine Verdünnungsstufe und von Norfloxacin um zwei Verdünnungsstufen erhöht.

3.1.2.2 Zusammenfassung der Ergebnisse von Abschnitt 3.1.2

- * Die Proteinvarianten AAC(6′)-Ib7-cr und AAC(6′)-Ib11-cr wurden bisher noch nicht beschrieben, sind aber funktionsfähig.
- * Die Varianten AAC(6′)-Ib7-cr, AAC(6′)-Ib11-cr und AAC(6′)-Ib11-102 verursachen in *E. coli* JM109 eine Erhöhung der MHK-Werte von Ciprofloxacin und Norfloxacin.
- * *E. coli* JM109 mit AAC(6′)-Ib-wt-179 zeigte eine Erhöhung von Ciprofloxacin.

Ein Ziel der Arbeit war die Klärung der Frage, ob aus einem anderen Typ AAC(6′)-I ein AAC(6′)-Ib-cr-analoger Subtyp hergestellt bzw. entstehen kann. Mit den Varianten von AAC(6′)-Ib-wt, AAC(6′)-Ib7 und AAC(6′)-Ib11, war dies bereits gelungen (siehe Abschnitt 3.1.2). Um nun einen anderen AAC(6′)-I-Subtyp zu finden, wurden im Folgenden weitere klinische Isolate nach einem anderen Subtyp *aac(6′)-I* mittels PCR untersucht.

3.1.3 Untersuchung von weiteren klinischen Isolaten auf die Anwesenheit eines anderen Typ AAC(6′)-I

3.1.3.1 Kontrolle von klinischen *Enterobacteriaceae*-Isolaten auf AAC(6′)-I

Auf der Suche nach einem anderen Typ AAC(6′)-I konnte auf ein Kollektiv klinischer *Enterobacteriaceae*-Isolate der Stammsammlung des AK Heisig zurückgegriffen werden, die eine erhöhte Fluorchinolonresistenz aufweisen. Darunter befanden sich Vertreter der Spezies *Citrobacter freundii*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter*-Arten, *Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia marcescens* sowie *Escherichia coli* Arten.

Die Stämme wurden durch PCR mit spezifischen Primern für ***aac(6′)-Ib/Ib7*** (AAC6 +I for und AAC6 +519 rev), ***aac(6′)-Iq*** (*aac(6′)-Iq* for +202 WOB und *aac(6′)-Iq* rev +537 WOB), ***aac(6′)-If*** (*aac(6′)-If* for +1 und *aac(6′)-If* rev +432), ***aac(6′)-IL*** (*aac(6′)-IL* for +1 und *aac(6′)-IL* rev +456), ***aac(6′)-Ic*** (*aac(6′)-Ic* for +1 und *aac(6′)-Ic* rev +438), ***aac(6′)-Im*** (*aac(6′)-Im* for +1 und *aac(6′)-Im* rev +534) und zur Kontrolle auch für den Typ ***aac(6′)-II*** (*aac(6′)-II* for +1 und *aac(6′)-II* rev +552) auf die Anwesenheit der jeweiligen Typen *aac(6′)-I* untersucht. Dabei war zu beachten, dass nicht jeder Subtyp von *aac(6′)-I* in jeder Bakterienart vorkommt. Tabelle 3-10 zeigt, welche Typen von *aac(6′)* in welchen *Enterobacteriaceae*-Spezies zu finden sind.

Ergebnisse

Tabelle 3-10 Tabellarische Übersicht über Vorkommen der verschiedenen *aac(6)*-Typen innerhalb der Familie der *Enterobacteriaceae*.

Spezies	-Ib	-Ib7	-Iq	-If	-IL	-Ic	-Im	-II
<i>Citrobacter freundii</i>	-	+	+	-	-	-	-	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	+	+	+	-	-	-	-	+
<i>Enterobacter spec.</i>	+	+	-	+	+	-	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	+	-	-	+	-	-	+
<i>Serratia marcescens</i>	-	+	-	-	-	+	-	-
<i>Escherichia coli</i>	+	+	-	-	-	-	+	-

Nach erfolgreicher PCR, wurden *aac(6')*-Ib-positive Stämme mittels RFLP mit den Enzymen *FokI* und *NdeI* (2.2.2.12), sowie durch Sequenzierung näher charakterisiert (2.2.2.14).

Das Ergebnis der Untersuchung ist in Tabelle 3-11 zusammengefasst.

Tabelle 3-11 Ergebnisse des RFLP und der Sequenzierung der *Enterobacteriaceae*-Stämme tabellarisch zusammengefasst. Dargestellt ist die Spezies und die gefundene Variante *aac(6')*.

Spezies	GK	Isolation	Variante	Referenz
<i>C. freundii</i>	20	10.4.1989	negativ	Dr. G. Miller, SP
<i>C. freundii</i>	28	10.4.1989	<i>aac(6')</i> -Ib-wt	Dr. G. Miller, SP
<i>E. aerogenes</i>	16	2.4.1989	nicht bestimmt	Dr. G. Miller, SP
<i>E. aerogenes</i>	17	2.4.1989	<i>aac(6')</i> -Ib-wt	Dr. G. Miller, SP
<i>E. aerogenes</i>	15	2.4.1989	<i>aac(6')</i> -Ib7	Dr. G. Miller, SP
<i>E. aerogenes</i>	18	2.4.1989	negativ	Dr. G. Miller, SP
<i>E. cloacae</i>	30	2.4.1989	negativ	Dr. G. Miller, SP
<i>E. cloacae</i>	44	2.4.1989	negativ	Dr. G. Miller, SP
<i>E. cloacae</i>	6	2.4.1989	<i>aac(6')</i> -Ib-wt	Dr. G. Miller, SP
<i>E. coli</i>	31	2.4.1989	<i>aac(6')</i> -Ib-wt	Dr. G. Miller, SP
<i>K. pneumoniae</i>	27	2.4.1989	<i>aac(6')</i> -Ib-wt	Dr. G. Miller, SP
<i>K. pneumoniae</i>	19	2.4.1989	nicht bestimmt	Dr. G. Miller, SP
<i>K. pneumoniae</i>	3	2.4.1989	<i>aac(6')</i> -Ib-wt	Dr. G. Miller, SP
<i>K. pneumoniae</i>	47	2.4.1989	negativ	Dr. G. Miller, SP
<i>K. pneumoniae</i>	43	2.4.1989	nicht bestimmt	Dr. G. Miller, SP
<i>K. pneumoniae</i>	48	2.4.1989	negativ	Dr. G. Miller, SP
<i>K. pneumoniae</i>	41	2.4.1989	negativ	Dr. G. Miller, SP
<i>P. aeruginosa</i>	70	20.5.1988	negativ	Labstock

Spezies	GK	Isolation	Variante	Referenz
<i>P. aeruginosa</i>	46	10.4.1989	<i>aac(6')-Ib7</i>	Dr. G. Miller, SP
<i>P. aeruginosa</i>	34	10.4.1989	<i>aac(6')-Ib7</i>	Dr. G. Miller, SP
<i>P. aeruginosa</i>	4	10.4.1989	nicht bestimmt	Dr. G. Miller, SP
<i>P. aeruginosa</i>	71	20.5.1988	<i>aac(6')-Ib7</i>	Labstock
<i>S. marcescens</i>	26	2.4.1989	<i>aac(6')-Ic</i>	Dr. G. Miller, SP
<i>S. marcescens</i>	23	2.4.1989	<i>aac(6')-Ic</i>	Dr. G. Miller, SP
<i>S. marcescens</i>	21	2.4.1989	<i>aac(6')-Ic</i>	Dr. G. Miller, SP
<i>S. marcescens</i>	1	2.4.1989	<i>aac(6')-Ic, aac(6')-Ib-wt</i>	Dr. G. Miller, SP
<i>S. marcescens</i>	42	2.4.1989	<i>aac(6')-Ic, aac(6')-Ib-wt</i>	Dr. G. Miller, SP
<i>S. marcescens</i>	73	20.5.1988	<i>aac(6')-Ic</i>	Wiedemann, Meyer <i>et al.</i> 1985

Es wurde neben *aac(6')-Ib-wt* und *aac(6')-Ib7* in *C. freundii*, *E. aerogenes*, *E. cloacae*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* und *S. marcescens*, Typ *aac(6')-Ic* in *S. marcescens* gefunden. In keinem der klinischen Isolate von 1988 – 1989 wurde die Variante *aac(6')-Ib-cr* gefunden.

3.1.3.2 Zusammenfassung der Ergebnisse von Abschnitt 3.1.3

- * Typ *aac(6')-Ic* wurde in *Serratia marcescens* detektiert.
- * In keinem der klinischen Isolate von 1988 – 1989 wurde die Variante *aac(6')-Ib-cr* gefunden.

Da hier *aac(6')-Ic* in *Serratia marcescens* vermutlich chromosomal kodiert vorlag (28, 143), was nicht weiter untersucht wurde und da außerdem zum Protein AAC(6')-Ic keine Kristallstruktur veröffentlicht war, wurde AAC(6')-Iy zunächst zum Vergleich mit AAC(6')-Ib herangezogen. *Aac(6')-Iy* konnte von M. Vetting, New York, zur Verfügung gestellt werden, außerdem lagen von AAC(6')-Iy Kristallstrukturen, zum Beispiel unter PBP-Nr. 2vbq oder 1s3z (94, 159), vor.

3.1.4 Untersuchungen zu AAC(6')-Iy

3.1.4.1 *In silico* Analyse von AAC(6')-Ib-wt und AAC(6')-Iy

Um zunächst jedoch eine räumliche Vorstellung der Struktur des Enzyms AAC(6')-Ib zu bekommen, wurde eine veröffentlichte 3D-Kristallstruktur des Enzyms untersucht (PDB-Nr. 2bue (160)) und die Variante AAC(6')-Ib-cr nachgestellt (siehe Abbildung 3-10).

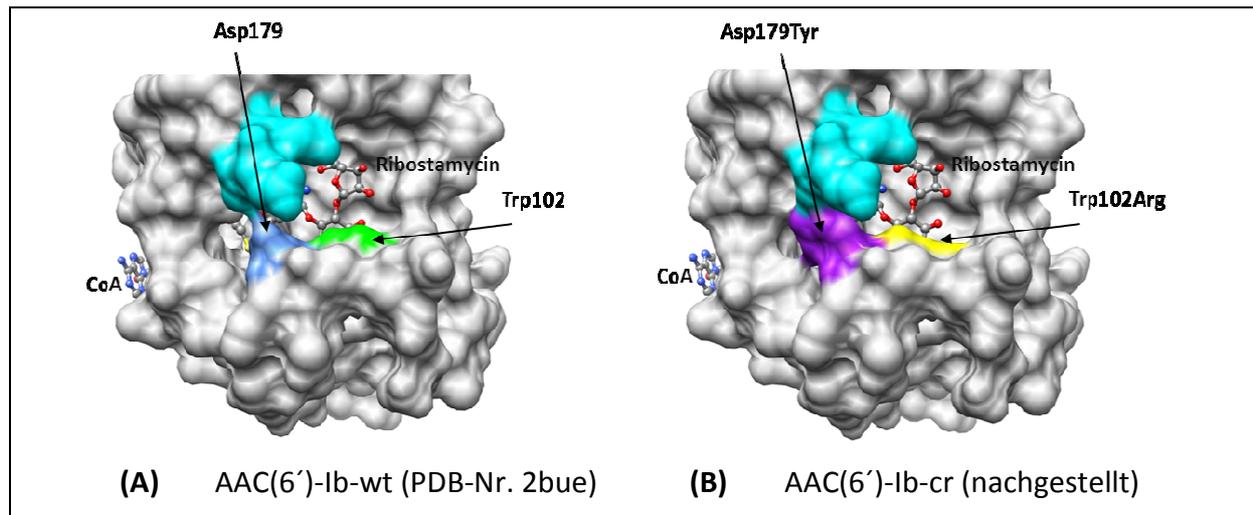


Abbildung 3-10 Quartärstrukturen der Enzyme (A) AAC(6')-Ib und (B) AAC(6')-Ib-cr mit Darstellung der Oberfläche. CoA = Coenzym A. Für die Visualisierung und Bearbeitung des entstandenen Bildes wurde das Programm UCSF Chimera 1.5.3 unter Windows 7 verwendet.

Da ein Ziel der Arbeit die Klärung der Frage war, ob aus einem anderen Typ AAC(6')-I ein AAC(6')-Ib-cr-analoger Subtyp entstehen kann, wurde die 3D-Struktur von AAC(6')-Ib-cr mit der bereits als Kristallstruktur vorhandenen Struktur von AAC(6')-Iy verglichen, um potentielle Aminosäuren für eine gezielte Veränderung zu identifizieren, wodurch der AAC(6')-Ib-cr-analoge Effekt nachgestellt werden kann.

Durch strukturellen Vergleich, nach Überlagerung der Tertiärstrukturen von AAC(6')-Iy und AAC(6')-Ib-cr mit Hilfe des Programms UCSF Chimera, wurden insgesamt vier Aminosäuren in AAC(6')-Iy ausgewählt, die gezielt verändert werden sollten. Die Aminosäuren Tyr66 und Glu136 wurden aufgrund der räumlichen Überlagerung mit den Positionen Trp102 und Asp179 in AAC(6')-Ib-wt ausgewählt. Die Aminosäuren Trp22 und Glu79 wurden aufgrund der räumlichen Anordnung relativ zu Asp115 ausgewählt, denn die Aminosäure Asp115 gilt sowohl in AAC(6')-Ib als auch in AAC(6')-Iy als essentiell für die enzymatische Aktivität des Enzyms (120, 159). Abbildung 3-11 zeigt die Enzyme AAC(6')-Ib-wt und AAC(6')-Iy im

Alignment, die Aminosäuren Trp102 und Asp179 von AAC(6')-Ib, sowie die vier ausgewählten Aminosäuren Trp22, Tyr66, Glu79 und Glu136 in AAC(6')-Iy die nun gezielt verändert werden sollen.

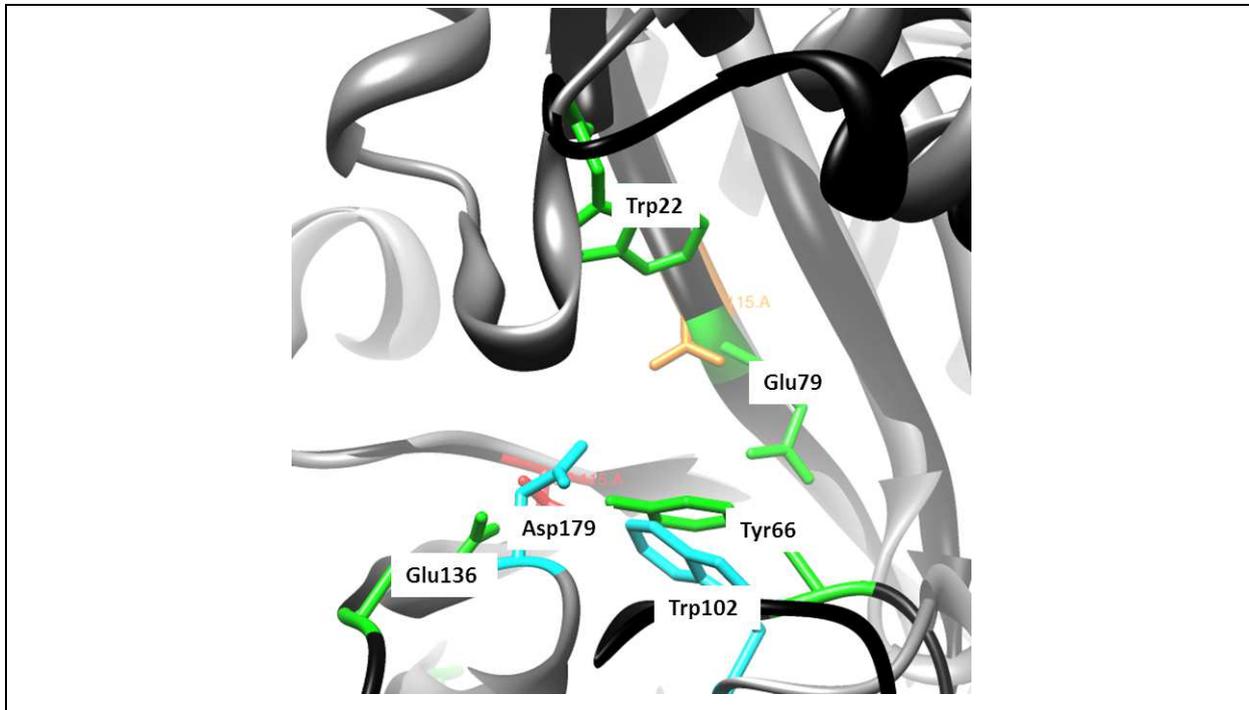


Abbildung 3-11 Dargestellt ist das Strukturalignment der Enzyme AAC(6')-Ib-wt und AAC(6')-Iy, die Aminosäuren 102 und 179 von AAC(6')-Ib-wt, sowie die vier ausgewählten Aminosäuren in AAC(6')-Iy. Schwarz = AAC(6')-Iy, Grau = AAC(6')-Ib-wt. Rot bzw. Orange markierte Aminosäuren = Asp115. Für die Visualisierung und Bearbeitung des entstandenen Bildes wurde das Programm UCSF Chimera 1.5.3 unter Windows 7 verwendet.

3.1.4.2 Zusammenfassung der Ergebnisse von Abschnitt 3.1.4

- * Nach *in silico* Analyse von AAC(6')-Ib und AAC(6')-Iy wurden aufgrund der räumlichen Überlagerung mit den Positionen Trp102 und Asp179 in AAC(6')-Ib-wt die Aminosäuren Tyr66 und Glu136 in AAC(6')-Iy ausgewählt. Die Aminosäuren Trp22 und Glu79 wurden aufgrund der räumlichen Anordnung relativ zu Asp115 ausgewählt.

Zunächst wurde jedoch das Gen *aac(6')-Iy*, wie *aac(6')-Ib-wt* und dessen Varianten zuvor, in pUC19 kloniert (siehe folgenden Abschnitt 3.1.5.1).

3.1.5 Ortsgerichtete Mutagenese von AAC(6')-Iy

3.1.5.1 Klonierung von AAC(6')-Iy

Aac(6')-Iy wurde mit den Primern *aac(6)-Iy+1for_HindIII* und *aac(6)-Iy+438rev_HindIII* von dem von M. Vetting (New York) zur Verfügung gestellten Plasmid pET23::*aac(6')*-Iy amplifiziert. Das lineare, mit *HindIII*-Schnittstellen flankierte PCR-Fragment wurde in die *HindIII*-Schnittstelle des Plasmids pUC19 ligiert (2.2.2.13), es entstand Plasmid pHPNE19-04 (nicht gezeigt). Anschließend wurden die acht Aminosäuren von LacZ mit den überlappenden Primern *Del_LacZ_Iy_for* und *Del_LacZ_Iy_rev* in der SSM-PCR deletiert (2.2.2.8.4). Das rekombinante Plasmid pHPNE19-08 ist in Abbildung 3-12 dargestellt.

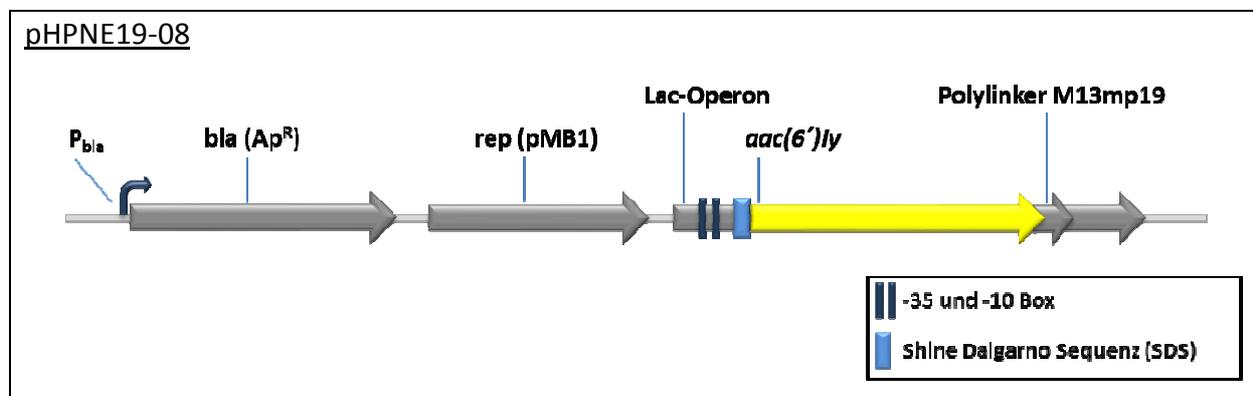


Abbildung 3-12 Lineare Darstellung des Plasmids pHPNE19-08 mit Legende. *P_{bla}* bezeichnet den Promotor des *bla*-Gens, das *bla*-Gen kodiert für eine Beta(β)-Lactamase, Ap^R steht für Ampicillin-Resistenz, *rep* ist die Abkürzung für Replikationsursprung, *pMB1* gibt die Herkunft des Replikationsursprungs an, **Lac-Operon** steht für Laktose-Operon, das *lacZ*-Gen kodiert für das Enzym Beta(β)-Galaktosidase, das *aac(6')*-Iy-Gen kodiert für die Aminoglykosid 6'-N-Acetyltransferase Typ Iy.

Um die korrekte Einführung der Deletion zu kontrollieren, wurde der Bereich vor und nach der Deletion von Plasmid pHPNE19-08 sequenziert (2.2.2.14). Die Funktionsfähigkeit des Enzyms AAC(6')-Iy in *E. coli* JM109 pHPNE19-08 wurde mittels MHK-Bestimmung kontrolliert. Die MHK-Werte sind in Tabelle 3-12 zusammengefasst.

Tabelle 3-12 MHK-Werte des rekombinanten Plasmids pHPNE19-08 im Vergleich mit *E. coli* JM109. MHK-Werte in µg/ml.

Stamm	Kanamycin	+ IPTG	Ciprofloxacin	+ IPTG	Norfloxacin	+ IPTG
<i>E. coli</i> JM109	0,25 (0,5)	0,25	0,064	0,064	0,256	0,256
<i>E. coli</i> JM109 pHPNE19-08	4	4	0,064	0,064	0,256	0,256

E. coli JM109 pHPNE19-08 zeigte eine Erhöhung um drei bis vier Verdünnungsstufen im Vergleich zu *E. coli* JM109 und *E. coli* JM109 pUC19 in An- und Abwesenheit von IPTG. In Bezug auf Ciprofloxacin und Norfloxacin in An- und Abwesenheit von IPTG zeigte sich keine Erhöhung der MHK.

Nach der erfolgreichen Klonierung von *aac(6')-Iy* in pUC19 wurde der Stamm *E. coli* JM109 pHPNE19-08 für die weiteren Versuche ausgewählt.

3.1.5.2 Gezielte Einführung der analogen Mutation von AAC(6')-Ib-cr in pHPNE19-08 und Bestimmung der Antibiotikaempfindlichkeit als minimale Hemmkonzentration

Der Austausch der Aminosäuren (Trp)W22, (Tyr)Y66, (Glu)E79 und (Glu)E136 wurde mit den spezifisch bindenden Primern, *aac(6)-Iy_W22R_for_+803* und *aac(6)-Iy_W22R_rev_+825* für Aminosäureposition 22, *aac(6')-Iy_Tyr66Arg_for* und *aac(6')-Iy_rev_Mut* für Aminosäureposition 66, *aac(6)-Iy_E79Y_for_+634* und *aac(6)-Iy_E79Y_rev_+654* für Aminosäureposition 79, sowie *aac(6')-Iy_Glu136Arg_for* bzw. *aac(6')-Iy_Glu136Tyr_for* in Kombination mit *aac(6')-Iy_pUC19_rev* für Aminosäureposition 136, mit Hilfe der SSM-PCR eingeführt (2.2.2.8.4). Als Template für die PCR diente Plasmid pHPNE19-08. Zur Kontrolle der eingeführten Mutation/en wurden diese Bereiche in den erhaltenen rekombinanten Plasmiden sequenziert und die Empfindlichkeit der rekombinanten Plasmide in Stamm *E. coli* JM109 von Kanamycin, Ciprofloxacin und Norfloxacin in An- und Abwesenheit von IPTG (1 mM) bestimmt. Die Ergebnisse der MHK-Bestimmung sind in Tabelle 3-13 zusammengefasst.

Ergebnisse

Tabelle 3-13 Tabellarische Zusammenfassung der jeweils eingeführten Mutation/en und der MHK-Werte in µg/ml von *E. coli* JM109 mit den rekombinanten Plasmiden pHPNE19-08.01 bis pHPNE19-08.10.

Stamm	Mutation/en*	Kanamycin	+IPTG	Ciprofloxacin	+IPTG	Norfloxacin	+IPTG
<i>E. coli</i> JM109	-	0,25 (0,5)	0,25	0,064	0,064	0,256	0,256
<i>E. coli</i> JM109 pHPNE19-08	-	4	4	0,064	0,064	0,256	0,256
<i>E. coli</i> JM109 pHPNE19-08.01	Trp22Arg	0,5	0,5	0,064	0,064	0,256	0,256
<i>E. coli</i> JM109 pHPNE19-08.02	Tyr66Arg	0,5	1	0,064	0,064	0,256	0,256
<i>E. coli</i> JM109 pHPNE19-08.03	Glu79Tyr	0,25	0,25	0,064	0,064	0,256	0,256
<i>E. coli</i> JM109 pHPNE19-08.04	Glu136Arg	0,5	0,5	0,064	0,064	0,256	0,256
<i>E. coli</i> JM109 pHPNE19-08.05	Glu136Tyr	1	0,5	0,064	0,064	0,256	0,256
<i>E. coli</i> JM109 pHPNE19-08.06	Glu79Tyr Glu136Arg	0,25	0,25	0,064	0,064	0,256	0,256
<i>E. coli</i> JM109 pHPNE19-08.07	Trp22Arg Glu79Tyr	0,25	0,25	0,064	0,064	0,256	0,256
<i>E. coli</i> JM109 pHPNE19-08.08	Tyr66Arg Glu79Tyr	0,25	0,25	0,064	0,064	0,256	0,256
<i>E. coli</i> JM109 pHPNE19-08.09	Tyr66Arg Glu136Tyr	0,25	0,25	0,064	0,064	0,256	0,256
<i>E. coli</i> JM109 pHPNE19-08.10	Trp22Arg Glu136Tyr	0,25	0,25	0,064	0,064	0,256	0,256

* bezogen auf das Ausgangsgen *aac(6')-Iy-wt*.

E. coli JM109 pHPNE19-08.05 mit einer Glu136Ty Mutation zeigte eine Erhöhung der MHK von Kanamycin um zwei Verdünnungsstufen in Anwesenheit von IPTG. In Abwesenheit von IPTG sank der MHK-Wert um eine Verdünnungsstufe im Vergleich zum nicht-induzierten Stamm.

Die Stämme *E. coli* JM109 mit den Plasmiden pHPNE19-08.01 (Trp22Arg), pHPNE19-08.02 (Tyr66Arg) bzw. pHPNE19-08.04 (Glu136Arg) zeigten eine Erhöhung der MHK von Kanamycin um eine Verdünnungsstufe im Vergleich zu *E. coli* JM109 in An- und Abwesenheit von IPTG, mit Ausnahme von *E. coli* JM109 pHPNE19-08.02 (Tyr66Arg), dieser Stamm zeigte bei

Induktion mit IPTG eine Erhöhung um eine Verdünnungsstufe im Vergleich zum nicht induzierten Stamm. Die Stämme *E. coli* JM109 mit dem Plasmid pHPNE19-08.03 (Glu79Tyr), pHPNE19-08.06 (Glu79Tyr, Glu136Arg), pHPNE19-08.07 (Trp22Arg, Glu79Tyr), pHPNE19-08.08 (Tyr66Arg, Glu79Tyr), pHPNE19-08.09 (Tyr66Arg, Glu136Tyr) bzw. pHPNE19-08.10 (Trp22Arg, Glu136Tyr) zeigten keine Erhöhung der MHK. Keiner der hergestellten Stämme zeigte eine Erhöhung der MHK von Ciprofloxacin und Norfloxacin in An- und Abwesenheit von IPTG.

Da lediglich für Stamm *E. coli* JM109 pHPNE19-08.05 (Glu136Tyr) eine Erhöhung der MHK von Kanamycin um zwei Verdünnungsstufen gezeigt werden konnte, wurde zur Bestätigung der Expression der rekombinanten Gene im folgenden Abschnitt 3.1.5.3 Gesamtprotein isoliert und im Polyacrylamidgel aufgetrennt.

3.1.5.3 Überprüfung der Expression der rekombinanten Enzyme AAC(6')-Iy der Plasmide pHPNE19-08.01 bis pHPNE19-08.10

Nach Isolierung von Gesamtprotein der jeweiligen Stämme *E. coli* JM109, mit Plasmid pHPNE19-08 und den davon abgeleiteten Varianten pHPNE19-08.01 bis pHPNE19-08.10 wurden die Proben in einem 18 % igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt (2.2.3.2 und Abbildung 3-13 (A) und (B)). *E. coli* JM109 pHPNE19-08 (mit IPTG induziert) wurde hier als Referenzstamm mitgeführt.

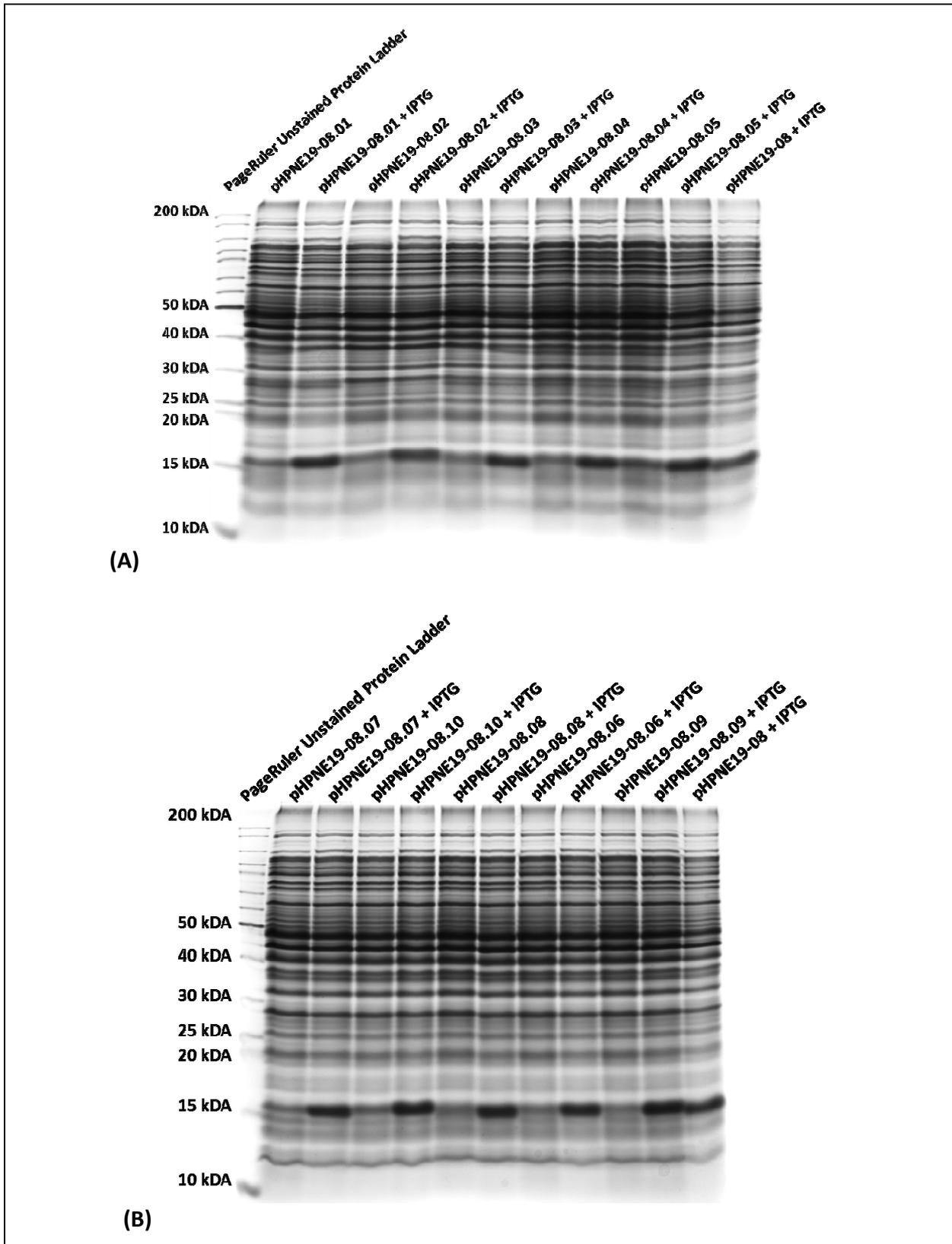


Abbildung 3-13 SDS-Polyacrylamidgel von (A) *E. coli* JM109 mit dem Plasmiden pHPNE19-08.01 bis pHPNE19-08.05 und von (B) *E. coli* JM109 mit dem Plasmiden pHPNE19-08.06 bis pHPNE19-08.10.

Bei allen untersuchten Stämmen war eine Bande bei ca. 16 kDa zu detektieren. Im Fall der mit 1 mM IPTG induzierten Stämme war die Bande stärker. Im Hintergrund zeigte sich ein gleichmäßiges, identisches Bandenmuster der getesteten Stämme.

Um die Proteine eindeutig zuzuordnen und in ihrer nativen Form identifizieren zu können, wurde im Folgenden das von M. Vetting (New York) zur Verfügung gestellte Plasmid pET23::aac(6')-ly, wodurch das Enzym mit einem C-terminalen His₆-Ende synthetisiert wird, verwendet. Auch in dieses Protein wurden die identischen Mutationen wie zuvor unter 3.1.5.2 beschrieben eingeführt, um anschließend AAC(6')-ly-His₆ und dessen Varianten mit einem Anti-His (Cterm)/AP Antikörper zu detektieren.

3.1.5.4 Gezielte Einführung der analogen Mutation von AAC(6')-Ib-cr in pET23::aac(6')-ly und Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration

Um einen direkten Nachweis der Enzyme AAC(6')-ly und der Varianten im Western Blot erbringen zu können, wurden die unter 3.1.5.2 bereits beschriebenen Mutationen in pET23::aac(6')-ly eingeführt. Hierfür wurde lediglich Primer aac(6')-ly_pUC19_rev durch aac(6')-ly-pET23rev+458 ersetzt. Die Amplifizierung erfolgte mit Phusion™ High-Fidelity DNA Polymerase zur Reduktion des Missreadings während des Elongationsprozesses.

Zur Kontrolle der eingeführten Mutationen, wurden die erhaltenen rekombinanten Plasmide sequenziert. Anschließend wurden die MHK-Werte von Kanamycin, Ciprofloxacin und Norfloxacin mit und ohne Induktion durch 1 mM IPTG für *E. coli* BL21 (DE3)-Zellen mit den rekombinanten Plasmiden bestimmt.

Ergebnisse

Tabelle 3-14 Tabellarische Zusammenfassung der MHK-Werte in $\mu\text{g/ml}$ von *E. coli* JM109 mit den rekombinanten Plasmiden pHPNE23-1 bis pHPNE23-5 im Vergleich mit dem Ausgangsplasmid pET23::aac(6')-Iy.

Stamm	Mutation/en	Kanamycin	+IPTG	Ciprofloxacin	+IPTG	Norfloxacin	+IPTG
<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	-	1	1	0,002	$\leq 0,001$	0,004	0,004
<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	-	32	32	$\leq 0,001$	$\leq 0,001$	0,004	0,004
pET23::aac(6')-Iy							
<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	Trp22Arg	2	1	$\leq 0,001$	$\leq 0,001$	0,004	nb
pHPNE23-1							
<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	Tyr66Arg	2	1	$\leq 0,001$	$\leq 0,001$	0,004	0,004
pHPNE23-2							
<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	Glu79Tyr	1	1	$\leq 0,001$	$\leq 0,001$	0,004	0,004
pHPNE23-3							
<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	Glu136Arg	4	8	$\leq 0,001$	$\leq 0,001$	0,004	0,004
pHPNE23-4							
<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	Glu136Tyr	2	4	$\leq 0,001$	$\leq 0,001$	0,004	0,004
pHPNE23-5							
<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	Glu79Tyr	1	1	$\leq 0,001$	$\leq 0,001$	0,004	0,004
pHPNE23-3a							
<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	Trp22Arg	1	1	$\leq 0,001$	$\leq 0,001$	0,004	0,004
pHPNE23-3b							
<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	Tyr66Arg	1	0,5	$\leq 0,001$	nb	0,004	0,002
pHPNE23-2a							
<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	Tyr66Arg	1	1	$\leq 0,001$	$\leq 0,001$	0,004	0,004
pHPNE23-2b							
<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	Trp22Arg	1	1	$\leq 0,001$	$\leq 0,001$	0,004	0,004
pHPNE23-1a							

(nb = nicht bestimmt)

Für Kanamycin zeigte *E. coli* BL21 (DE3) mit dem Plasmid pET23::aac(6')-Iy eine Erhöhung der MHK um fünf Verdünnungsstufen, sowohl mit, als auch ohne IPTG. *E. coli* BL21 (DE3) mit Plasmid pHPNE23-4 (Glu136Arg) zeigte nicht-induziert einen MHK-Wert von 4 $\mu\text{g/ml}$, nach Induktion lag der MHK-Wert bei 8 $\mu\text{g/ml}$, dies entsprach einer Erhöhung von zwei bzw. drei Verdünnungsstufen im Vergleich zum Referenzstamm *E. coli* BL21 (DE3), der einen MHK-Wert von Kanamycin von 1 $\mu\text{g/ml}$ besaß. Eine Erhöhung von einer Verdünnungsstufe zeigte sich bei *E. coli* BL21 (DE3) mit den Plasmiden pHPNE23-1 (Trp22Arg), pHPNE23-2 (Tyr66Arg) bzw. pHPNE23-5 (Glu136Tyr) ohne Induktion durch IPTG. Mit IPTG blieb bei pHPNE23-1,

pHPNE23-2 der MHK-Wert auf der Höhe des Referenzstammes, während bei pHPNE23-5 der MHK-Wert von 2 µg/ml auf 4 µg/ml stieg. Bei *E. coli* BL21 (DE3) zeigte sich mit den Plasmiden pHPNE23-3 (Glu79Tyr), pHPNE23-3a (Glu79Tyr, Glu136Arg), pHPNE23-3b (Trp22Arg, Glu79Tyr), pHPNE23-2a (Tyr66Arg, Glu79Tyr), pHPNE23-2b (Tyr66Arg, Glu136Tyr) bzw. pHPNE23-1a (Trp22Arg, Glu136Tyr) mit und ohne Induktion durch IPTG keine Erhöhung des MHK-Wertes im Vergleich zu *E. coli* BL21 (DE3), mit Ausnahme von pHPNE23-2a mit Zugabe von IPTG, hier sank der MHK-Wert um eine Verdünnungsstufe auf 0,5 µg/ml. Auch hier zeigte sich bei allen getesteten Stämmen keine Erhöhung der MHK von Ciprofloxacin und Norfloxacin.

3.1.5.5 Überprüfung der Expression der rekombinanten Enzyme AAC(6')-Iy-His₆ der Plasmide pHPNE23-1 bis pHPNE23-5 im Polyacrylamidgel

Um die Expression der Proteine mit und ohne Induktion des T7-Polymerase Systems von pET23 in *E. coli* BL21 (DE3) durch IPTG der unter 3.1.5.4 bereits erwähnten Plasmide zu prüfen, wurde auch hier Gesamtprotein isoliert und in einem SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt.

Das Ergebnis ist in Abbildung 3-14 (A) und (B) dargestellt.

Ergebnisse

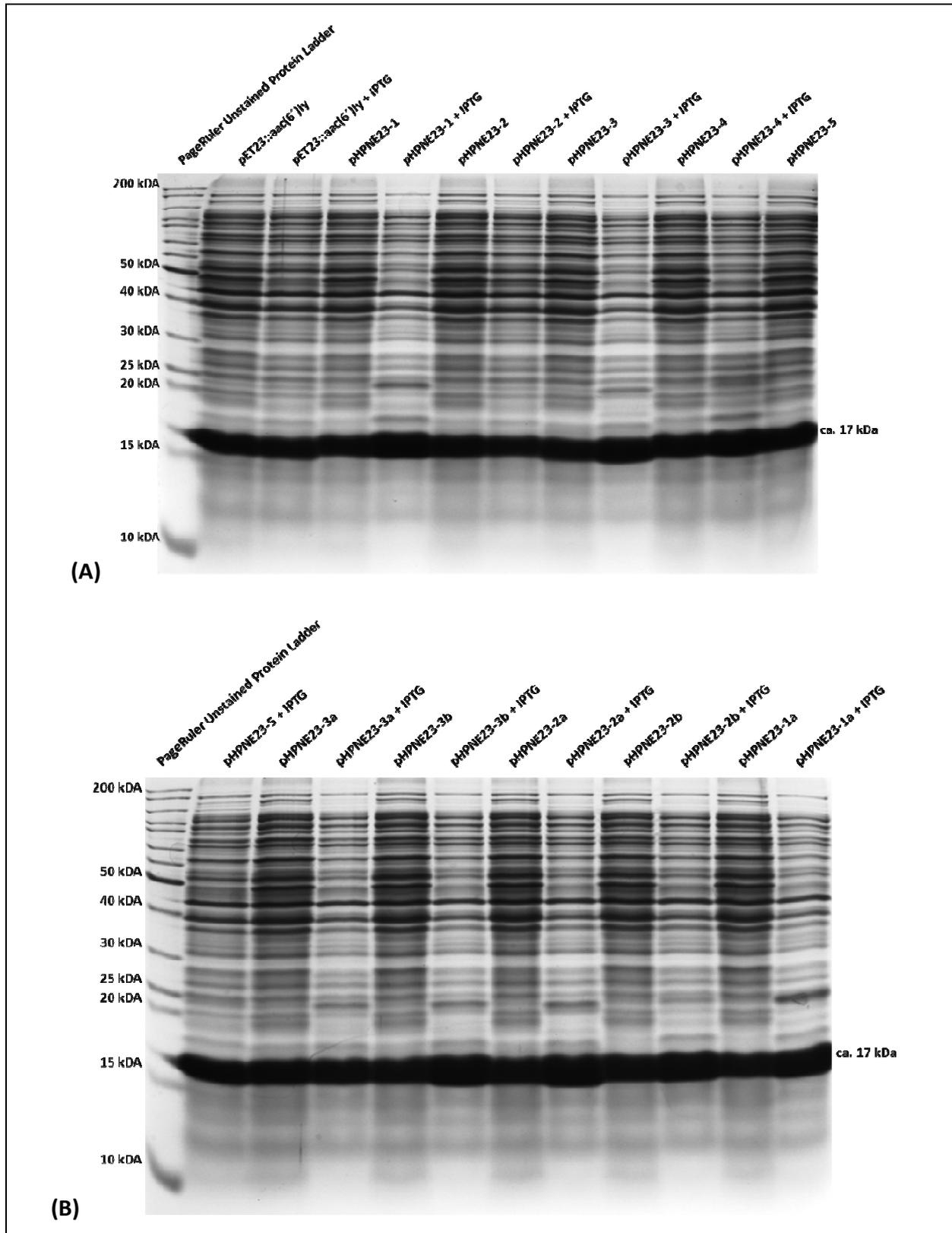


Abbildung 3-14 (A) und (B) SDS-Polyacrylamidgele von *E. coli* BL21 (DE3) mit den Plasmiden (A) pET23::aac(6')-ly bis PHPNE23-4 und (B) PHPNE23-5 bis PHPNE23-1a.

Bei den Stämmen *E. coli* BL21 (DE3) mit den Plasmiden (A) pET23::aac(6')-ly bis PHPNE23-4, sowie mit den Plasmiden (B) PHPNE23-5 bis PHPNE23-1a war eine Bande bei ca. 17 kDa zu

sehen. Die Bandenstärke war bei den Stämmen deren Plasmide mit 1 mM IPTG induziert wurden und bei denen die nicht induziert wurden gleich.

3.1.5.6 Western Blot der rekombinanten Enzyme AAC(6')-Iy-His₆ der Plasmide pHPNE23-1 bis pHPNE23-5

Anschließend wurde ein zweites Polyacrylamid-Gel mit den gleichen Proben wie zuvor angefertigt. Nach Übertragung der Proteine auf eine Nylonmembran wurden die Proteine AAC(6')-Iy-His₆ und deren Varianten mit einem monoklonalen Anti-His (Cterm)/AP Antikörper detektiert. Das Ergebnis ist in Abbildung 3-15 (A) und (B) dargestellt.

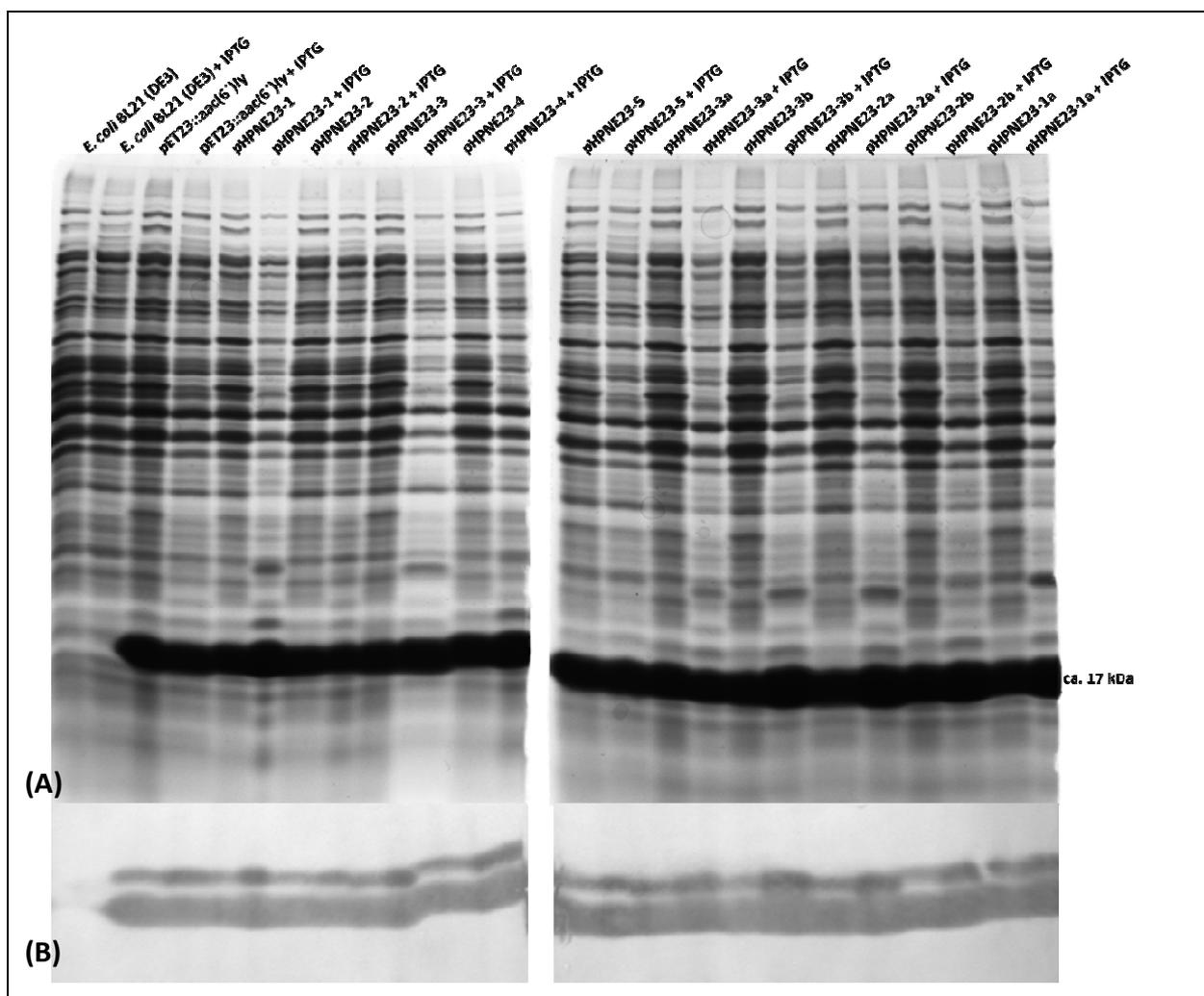


Abbildung 3-15 (A) SDS-Polyacrylamidgel der Stämme *E. coli* BL21 (DE3) mit Plasmid pET23::aac(6')-Iy und den Varianten pHPNE23-1 bis pHPNE23-5, sowie der (B) Western Blot des Gels, Detektion mittels Anti-His (Cterm)/AP Antikörper.

Bei allen Stämmen mit und ohne IPTG, außer bei Stamm *E. coli* BL21 (DE3) mit und ohne IPTG war im SDS-Polyacrylamidgel eine starke Bande bei ca. 17 kDa zu sehen, hierbei war

Ergebnisse

kein Unterschied in der Stärke der Banden zwischen induzierten und nicht induzierten Stämmen festzustellen. Auf der Nylonmembran wurden bei allen Stämmen (außer *E. coli* BL21 (DE3)) Banden in der gleichen Größe mit einem Anti-His (Cterm)/AP Antikörper detektiert, hier war jeweils eine breite und eine schmale Bande zu sehen. Im Fall der schmalen Bande war zwischen induzierten und nicht induzierten Stämmen ein Unterschied in der Stärke der Banden zu beobachten. Um die Proteine in ihrer nativen Faltung, ihrer natürlichen Tertiärstruktur bzw. Quartärstruktur darstellen zu können, wurde ein natives Polyacrylamid-Gel angefertigt, die Proteine ebenfalls auf eine Nylonmembran übertragen und mit einem spezifischen Anti-His (Cterm)/AP Antikörper detektiert. Das Ergebnis ist in Abbildung 3-16 (A) und (B) dargestellt.

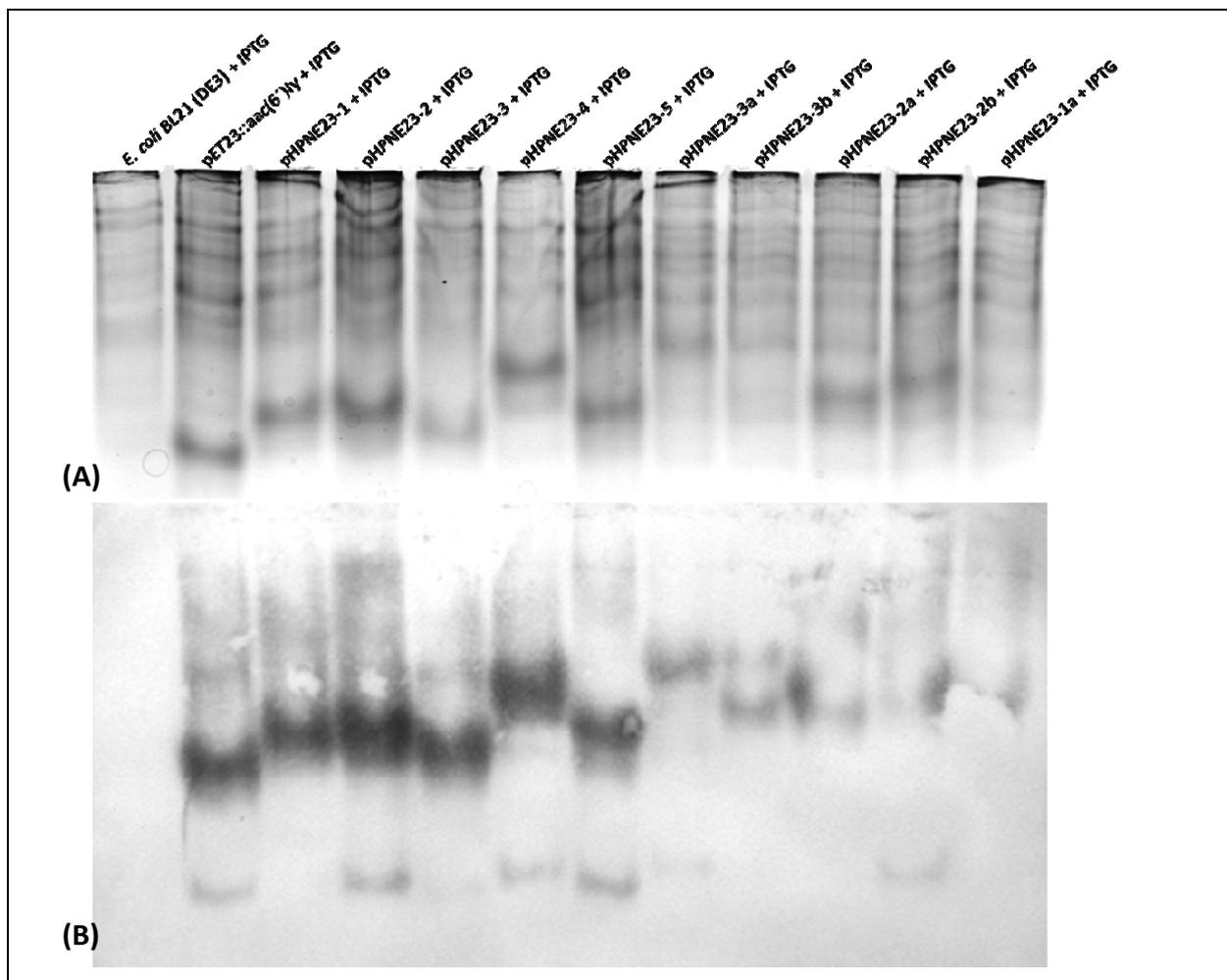


Abbildung 3-16 Natives-Polyacrylamidgel der Stämme *E. coli* BL21 (DE3) ohne, mit Plasmid pET23::aac(6')-ly und den Varianten pHPNE23-1 bis pHPNE23-5, sowie der Western Blot des nativen Gels, Detektion mittels Anti-His (Cterm)/AP Antikörper.

Im nativen-Polyacrylamidgel waren starke Banden in unterschiedlicher Höhe zu sehen, außer bei Stamm *E. coli* BL21 (DE3) mit IPTG. Außerdem konnte auf der Nylonmembran bei den gleichen Stämmen in identischer Höhe eine Bande mit einem Anti-His (Cterm)/AP Antikörper detektiert werden. Überdies war bei allen Stämmen pHPNE23-XX, mit Ausnahmen derer mit den Plasmiden pHPNE23-3b, pHPNE23-2a bzw. pHPNE23-1a, eine weitere Bande weiter unten auf der Membran zu detektieren.

3.1.5.7 Zusammenfassung der Ergebnisse von Abschnitt 3.1.5

- * *E. coli* JM109 pHPNE19-08 (*aac(6')*-ly) zeigte eine Erhöhung von Kanamycin um drei bis vier Verdünnungsstufen im Vergleich zu *E. coli* JM109 und *E. coli* JM109 pUC19, von Ciprofloxacin und Norfloxacin mit und ohne IPTG, zeigte sich keine Erhöhung der MHK.
- * *E. coli* JM109 pHPNE19-08.05 (Glu136Tyr) zeigte eine Erhöhung der MHK um zwei Verdünnungsstufen für Kanamycin ohne Zugabe von 1 mM IPTG.
- * *E. coli* JM109 mit Plasmid pHPNE19-08.01 (Trp22Arg), pHPNE19-08.02 (Tyr66Arg) und pHPNE19-08.04 (Glu136Arg) zeigten eine Erhöhung der MHK um eine Verdünnungsstufe für Kanamycin.
- * Stämme, deren Plasmide pHPNE19-08.XX eine Doppelmutation in *aac(6')*-ly besitzen, sowie Plasmid pHPNE19-08.03 (Glu79Tyr), zeigten keine Erhöhung der MHK für Kanamycin.
- * Keiner der hergestellten Stämme pHPNE19-08.XX zeigte eine Erhöhung der MHK für Ciprofloxacin und Norfloxacin.
- * Im SDS-Polyacrylamidgel der Stämme *E. coli* JM109 mit dem Plasmiden pHPNE19-08.XX war eine Bande bei ca. 16 kDa zu detektieren, diese war bei den Stämmen, die mit 1 mM IPTG induziert wurden, stärker.
- * *E. coli* BL21 (DE3) mit dem Plasmid pET23::*aac(6')*-ly zeigte eine Erhöhung der MHK von Kanamycin um fünf Verdünnungsstufen im Vergleich zu *E. coli* BL21 (DE3).
- * *E. coli* BL21 (DE3) pHPNE23-4 (Glu136Arg) zeigte eine Erhöhung der MHK von Kanamycin um zwei bis drei Verdünnungsstufen im Vergleich zum Referenzstamm *E. coli* BL21 (DE3).

Ergebnisse

- * *E. coli* BL21 (DE3) pHPNE23-5 (Glu136Tyr) zeigte eine Erhöhung der MHK von Kanamycin um eine bis zwei Verdünnungsstufen im Vergleich zum Referenzstamm *E. coli* BL21 (DE3).
- * *E. coli* BL21 (DE3) mit den Plasmiden pHPNE23-1 (Trp22Arg) und pHPNE23-2 (Tyr66Arg) zeigten eine Erhöhung um eine Verdünnungsstufe nach Induktion mit 1mM IPTG.
- * Bei *E. coli* BL21 (DE3) zeigte sich mit den Plasmiden pHPNE23-3 (Glu79Tyr) und mit den Plasmiden pHPNE23-XX, die eine Doppelmutation besitzen, keine Erhöhung des MHK-Wertes im Vergleich zu *E. coli* BL21 (DE3).
- * Keiner der hergestellten Stämme pHPNE23-XX zeigte eine Erhöhung der MHK von Ciprofloxacin und Norfloxacin.
- * Im SDS-Polyacrylamidgel war bei allen Stämmen *E. coli* BL21 (DE3) pHPNE23-XX, außer bei Stamm *E. coli* BL21 (DE3), eine starke Bande bei ca. 17 kDa zu sehen, wobei kein Unterschied in der Stärke der Banden zu beobachten war.
- * Im Western Blot wurde auf der Höhe der zuvor detektierten Banden mit dem Anti-His (Cterm)/AP Antikörper ein Signal erzeugt, wobei hier pro Stamm eine breite und eine schmale Bande detektiert wurden.
- * Im Fall der schmalen Bande war zwischen induzierten und nicht induzierten Stämmen ein Unterschied in der Stärke der Banden zu sehen.
- * Im nativen-Polyacrylamidgel waren bei den Stämmen *E. coli* BL21 (DE3) pHPNE23-XX starke Banden in unterschiedlicher Höhe zu sehen.
- ➔ Die hergestellten Plasmide pHPNE19-08.XX und pHPNE23-XX exprimieren die Enzyme AAC(6')-Iy bzw. AAC(6')-Iy-His₆.
- ➔ Alle hergestellten Doppelmutanten, sowie die Einzelmutante Glu79Tyr vermittelten keine Erhöhung der MHK von Kanamycin.
- ➔ Keines der konstruierten Plasmide vermittelte eine Erhöhung der MHK von Ciprofloxacin oder Norfloxacin.
- ➔ Die Position 22, 66, 79 und 136 spielen eine entscheidende Rolle in der Funktion von AAC(6')-Iy bzw. AAC(6')-Iy-His₆ für die Aminoglykosidresistenz.

Da mittels gezielter Einführung von Mutationen in *aac(6')-Iy* keine Variante entstand, die eine Erhöhung der Resistenz von Norfloxacin und Ciprofloxacin vermittelte, obwohl die

Proteine exprimiert wurden, wurde nun mittels zufälliger Mutagenese in der Error-prone PCR erneut versucht, eine analoge Variante zu erzeugen.

3.1.6 Zufallsmutagenese mittels Error-prone PCR

3.1.6.1 Error-prone PCR (EP-PCR) von *aac(6')-Ib-wt* und *aac(6')-Iy*

Die einfachste Methode der *in vitro* Mutagenese eines Gens ist die Error-prone PCR (EP-PCR).

Hierbei werden Mutationen an zufälligen Positionen im Gen generiert. Dabei gibt es verschiedene Möglichkeiten die Fehlerrate in der PCR-Reaktion zu erhöhen. Eine Möglichkeit ist die Verwendung einer Polymerase ohne Korrekturlese-Funktion sowie Mn^{2+} -Salze und eine Mischung aus unterschiedlichen Konzentrationen der einzelnen dNTPs (22). Ziel der Error-prone PCR (EP-PCR) war es hier, eine *aac(6')-Ib-cr*-analoge Variante zu erzeugen, die eine Erhöhung der MHK von Norfloxacin und Ciprofloxacin vermittelte.

3.1.6.1.1 EP-PCR von *E. coli* GK 2850 (*aac(6')-Ib-wt*)

Zu Beginn wurde als Template für die EP-PCR DNA des Stammes *E. coli* GK 2850 verwendet, um zu untersuchen, ob durch beliebigen Einbau von Mutationen in *aac(6')-Ib-wt*, zufällig eine *aac(6')-Ib-cr*-analoge Variante entstehen könnte, die ebenfalls zu einer Erhöhung der MHK von Ciprofloxacin und Norfloxacin führen würde. Da durch eine erhöhte Mutationsrate jedoch auch die Frequenz von *nonsense*-Mutationen steigen würde, wurde hier zunächst nur die Menge der Mn^{2+} -Salze im EP-PCR-Ansatz variiert. Dazu wurden zum Standard-Ansatz der PCR (2.2.2.8.1) je sieben differierende Konzentrationen Manganchlorid, von 0,01 mM bis 0,5 mM, hinzugegeben (plus eine Positivkontrolle ohne Manganchlorid, verwendete Primer: HindIII *aac(6')* -66 for No.2 und HindIII *aac(6')* +519 rev, erwartete Produktgröße: 607 bp). Das Ergebnis der PCR ist in Abbildung 3-17 dargestellt.

Ergebnisse

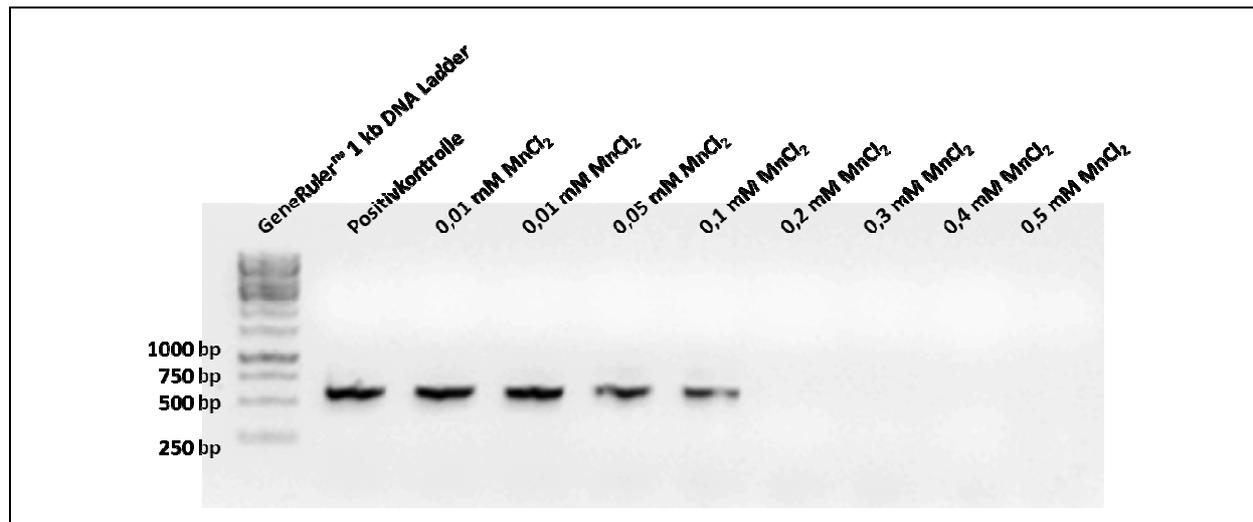


Abbildung 3-17 Gelelektrophorese der Error-prone PCR von *E. coli* GK 2850.

Anschließend wurden die Ansätze mit 0,05 mM und 0,1 mM Manganchlorid ausgewählt, die erhaltenen PCR-Fragmente aufgereinigt, mit *Hind*III gespalten und durch Ligation in pUC19 und Transformation in *E. coli* JM109 vereinzelt. Ca. 100 Transformanden wurden auf LB-Ampicillin-Agarplatten (100 µg/ml) gesichert und anschließend für eine Vorauswahl auf LB-Kanamycin-Agarplatten (10µg/ml) und LB-Norfloxacin-Agarplatten (1,28 µg/ml) getroffen. Insgesamt 31 Transformanden wurden ausgewählt. Nach Bestimmung der Empfindlichkeit (Mikrodilution) von Kanamycin und Norfloxacin für die 31 Stämme, sowie nach PCR mit den Primern lacZ+3396rev und AAC6 +519 rev zur Überprüfung der Anwesenheit und der Orientierung von *aac(6')-Ib* (erwartete Größe des Produktes: 825 bp), wurden die Stämme in elf Gruppen eingeteilt. Die Ergebnisse der PCR und der MHK-Bestimmung der 31 Stämme sind in Tabelle 3-15 zusammengefasst.

Tabelle 3-15 Zusammenfassung der Ergebnisse der Error-prone PCR von *aac(6')-Ib-wt* mit Angaben zu den MHK-Werten (µg/ml) und der PCR.

Gruppen	Stamm	PCR-Produkt vorhanden	KAN*	NOR**
Referenzen	<i>E. coli</i> JM109	-	0,5	(0,32) 0,64
	+ pUC19	-	0,5	0,64
	+ pHPNE19-05.1 (<i>aac(6')-Ib-wt</i>)	+	32-64	0,32
	+ pHPNE19-01.1b (<i>aac(6')-Ib-cr</i>)	+	16-32	1,28
Gruppe 1	<i>E. coli</i> JM109 EP-2-19	-	0,5	0,64
	<i>E. coli</i> JM109 EP-2-46	-	0,5	0,64
	<i>E. coli</i> JM109 EP-3-45	-	0,5	0,64
Gruppe 2	<i>E. coli</i> JM109 EP-2-3	+	0,5	0,64

Gruppen	Stamm	PCR-Produkt vorhanden	KAN*	NOR**
Gruppe 3	<i>E. coli</i> JM109 EP-2-51	-	1	0,64
	<i>E. coli</i> JM109 EP-3-50	-	1	0,64
Gruppe 4	<i>E. coli</i> JM109 EP-2-5	+	1	0,64
	<i>E. coli</i> JM109 EP-3-49	+	1	0,64
Gruppe 5	<i>E. coli</i> JM109 EP-2-1	-	2	0,64
	<i>E. coli</i> JM109 EP-2-2	-	2	0,64
	<i>E. coli</i> JM109 EP-2-9	-	2	0,64
	<i>E. coli</i> JM109 EP-2-10	-	2	0,64
	<i>E. coli</i> JM109 EP-3-2	-	2	0,64
	<i>E. coli</i> JM109 EP-3-26	-	2	0,64
	<i>E. coli</i> JM109 EP-3-31	-	2	0,64
	<i>E. coli</i> JM109 EP-3-31	-	2	0,64
Gruppe 6	<i>E. coli</i> JM109 EP-2-20	+	2	0,64
	<i>E. coli</i> JM109 EP-2-31	+	2	0,64
	<i>E. coli</i> JM109 EP-2-33	+	2	0,64
	<i>E. coli</i> JM109 EP-3-42	+	2	0,64
Gruppe 7	<i>E. coli</i> JM109 EP-2-4	-	4	0,64
	<i>E. coli</i> JM109 EP-2-45	-	4	0,64
	<i>E. coli</i> JM109 EP-2-47	-	4	0,64
	<i>E. coli</i> JM109 EP-2-50	-	4	0,64
Gruppe 8	<i>E. coli</i> JM109 EP-3-46	+	8	0,64
Gruppe 9	<i>E. coli</i> JM109 EP-3-52	+	16	0,64
	<i>E. coli</i> JM109 EP-3-54	+	16	0,64
Gruppe 10	<i>E. coli</i> JM109 EP-2-26	(+)	32	0,64
	<i>E. coli</i> JM109 EP-2-29	+	32	0,64
	<i>E. coli</i> JM109 EP-2-30	+	32	0,64
	<i>E. coli</i> JM109 EP-3-53	+	32	0,64
Gruppe 11	<i>E. coli</i> JM109 EP-2-28	(+)	64	0,64

Ein + bedeutet PCR-Produkt vorhanden, ein - kein PCR-Produkt vorhanden, (+) schwaches PCR-Produkt vorhanden. (nb = nicht bestimmt, KAN* = Kanamycin, NOR** = Norfloxacin).

Unter den 31 getesteten Stämmen befanden sich keine Varianten, die eine erhöhte MHK von Norfloxacin aufwiesen. Die MHK-Werte von Kanamycin für die untersuchten Stämme der Gruppen 1 und 2 stiegen im Vergleich zum Referenzstamm *E. coli* JM109 nicht an. Für die Stämme der Gruppen 3 und 4 wurde von Kanamycin ein MHK-Wert von 1 µg/ml bestimmt, für die Stämme der Gruppen 5 und 6 wurde ein MHK-Wert von 2 µg/ml und für die Stämme

Ergebnisse

der Gruppe 7 wurde ein MHK-Wert von 4 µg/ml bestimmt. Für die Stämme der Gruppe 8 bzw. 9 lagen die MHK-Werte von Kanamycin bei 8 bzw. 16 µg/ml. Die Stämme der Gruppen 10 und 11 besaßen mit einem MHK-Wert von 32 bzw. 64 µg/ml für Kanamycin mit den Referenzstämmen *E. coli* JM109 pHPNE19-05.1 und *E. coli* JM109 pHPNE19-01.1b vergleichbare MHK-Werte. Im Fall der Gruppen 3, 5 und 7 konnte mit den verwendeten Primern kein PCR-Fragment in einer Größe von 825 bp generiert werden, wie es bei korrekter Klonierung zu erwarten gewesen wäre, der MHK-Wert von Kanamycin war hier jedoch um maximal drei Verdünnungsstufen erhöht. Für Gruppe 1 konnte weder ein PCR-Produkt, noch eine Erhöhung der MHK detektiert werden.

Obwohl keiner der Stämme eine Erhöhung der MHK von Norfloxacin zeigte, wurden insgesamt vier Stämme mit unterschiedlichen MHK-Werten von Kanamycin zufällig ausgewählt und sequenziert, um zu prüfen, wie viele und an welchen Positionen die Mutationen entstanden. Das Ergebnis der Sequenzierung der Stämme *E. coli* JM109 EP-2-28, EP-3-53, EP-3-54 und EP-2-33 ist in Abbildung 3-18 dargestellt.

Ergebnisse

		Positionen: 37 42/43 62 70				Section 1
pHPNE19-05 rc	(1)	1	10	20	86	
EP-2-28	(1)	MTMITPSLT	TKLGITKYSIVTNSNDSVTLRLMTEHDLAMI	Y	WLN	RS
EP-3-53	(1)	MTMITPSLT	TKLGITKYSIVTNSNDSVTLRLMTEHDLAMI	Y	WLN	RS
EP-3-54	(1)	MTMITPSLT	TKLGITKYSIVTNSNDSVTLRLMTEHDLAMI	Y	WLN	RS
EP-2-33	(1)	MTMITPSLT	TKLGITKYSIVTNSNDSVTLRLMTEHDLAMI	-	WLN	RS
Consensus	(1)	MTMITPSLT	TKLGITKYSIVTNSNDSVTLRLMTEHDLAMI	Y	WLN	RS
		Positionen: 126/127 140 150 160				Section 2
pHPNE19-05 rc	(87)	87	100	110	172	
EP-2-28	(87)	GEP	IGYAQSYVALGSGDGWWEETDPGV	R	G	I
EP-3-53	(87)	GEP	IGYAQSYVALGSGDGWWEETDPGV	R	G	I
EP-3-54	(87)	GEP	IGYAQSYVALGSGDGWWEETDPGV	R	G	I
EP-2-33	(85)	GEP	IGYAQSYVALGSGDGWWEETDPGV	R	G	I
Consensus	(87)	GEP	IGYAQSYVALGSGDGWWEETDPGV	R	G	I
		Positionen: 186 190 203				Section 3
pHPNE19-05 rc	(173)	173	186	190	203	
EP-2-28	(173)	ERQGT	V	T	P	D
EP-3-53	(173)	ERQGT	V	T	P	D
EP-3-54	(173)	ERQGT	V	T	P	D
EP-2-33	(171)	ERQGT	V	T	P	D
Consensus	(173)	ERQGT	V	T	P	D

Abbildung 3-19 Darstellung der Aminosäuresequenzen, abgeleitet aus der ermittelten DNA Sequenzen der von *E. coli* GK 2850 mittels Error-prone PCR erhaltenen Stämme. Die Aminosäuren von LacZ (MTMITPSL) befanden sich hier noch vor AAC(6')-Ib, anstelle von MSNAK, daher beginnt die Sequenz hier mit Position -2.

Stamm *E. coli* JM109 EP-2-33 (Gruppe 6) besaß eine Mutation an Position 37, die zu einem Stopcodon (TAT→TAG) führte, die nachfolgenden im Leserahmen festgestellten Mutationen W49STOP (TGG→TAG), L58H (CTT→CAT), G125G (GGC→GGT) und F192F (TTC→TTT) waren somit bedeutungslos. Die Insertion von 8 Nukleotiden *ataagctt* bei Stamm *E. coli* EP-2-33 befand sich hinter dem 3'-Ende des Leserahmens von *aac(6')-Ib-wt* (vergleiche Abbildung 3-18). Stamm *E. coli* JM109 EP-3-54 (Gruppe 9) besaß vier Mutationen, die zu einem Aminosäureaustausch führten: R42Q, Q62R, G127D und V186A. In Stamm *E. coli* JM109 EP-3-53 (Gruppe 10) wurden keine Mutationen gefunden, die zu einem Aminosäureaustausch führten, lediglich folgende stille Mutationen: A95A (GCT→GCC) und F169F (TTT→TTC). Stamm *E. coli* JM109 EP-2-28 (Gruppe 11) besaß drei Mutationen (S43A, K126R, Q190R).

Um eine räumliche Vorstellung davon zu bekommen, wo sich die veränderten Aminosäuren im Enzym AAC(6')-Ib-wt befinden, zeigt Abbildung 3-20 die Tertiärstruktur des Enzyms AAC(6')-Ib-wt (PDB Nr. 2bue), kristallisiert mit Ribostamycin (RIB) und Coenzym A (KoA). Die mutierten Aminosäuren der Stämme *E. coli* EP-3-54 sind blau markiert, die von Stamm *E. coli* EP-2-28 grün. Die Aminosäuren W102 und D179 sind in Rot dargestellt. Für die Visualisierung und Bearbeitung des entstandenen Bildes wurde das Programm UCSF Chimera 1.5.3 unter Windows 7 verwendet.

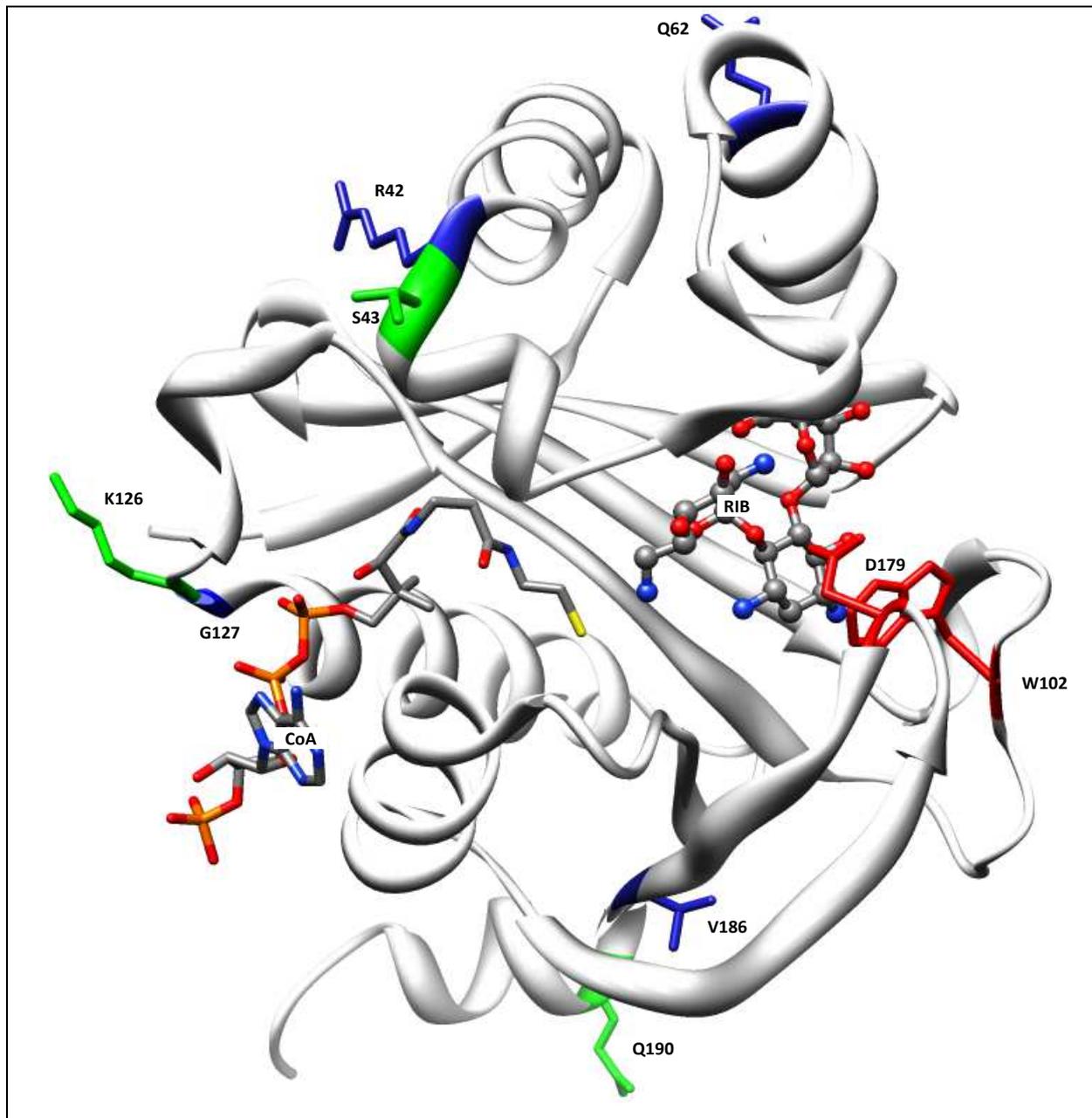


Abbildung 3-20 Darstellung der Tertiärstruktur von AAC(6')-Ib-wt in grau (PDB Nr. 2bue), kristallisiert mit Ribostamycin (RIB) und Coenzym A (CoA), mit Markierung der mutierten Aminosäuren der Stämme *E. coli* EP-3-54 in blau und *E. coli* EP-2-28 in grün, die Aminosäuren 102 und 179 wurden rot markiert.

Keine der Seitenketten der ausgetauschten Aminosäuren befindet sich in räumlicher Nähe von Ribostamycin oder Coenzym A, mit Ausnahme der kleinsten Aminosäure Glycin (G) an Position 127.

3.1.6.1.2 EP-PCR von *E. coli* JM109 pHPNE19-08 (*aac(6')*-Iy)

Anschließend wurde als Template für die EP-PCR DNA des Stammes mit Plasmid pHPNE19-08 (*aac(6')*-Iy) verwendet, um zu untersuchen, ob hier durch spontane Mutation zufällig eine

Ergebnisse

Variante entstehen könnte, die eine Erhöhung der MHK von Norfloxacin und Ciprofloxacin vermitteln würde. Zum Standard-Ansatz der PCR wurden hier nur drei differierende Konzentrationen Manganchlorid, von 0,01 mM bis 0,1 mM, hinzugegeben (plus eine Positivkontrolle ohne Manganchlorid) und das gleiche EP-PCR-Programm wie zuvor bei GK 2850 verwendet, jedoch mit den Primern *aac(6)-ly+1for_HindIII* und *aac(6)-ly+438rev_HindIII* (erwartete Produktgröße: 459 bp). Das Ergebnis der PCR ist in Abbildung 3-21 dargestellt.

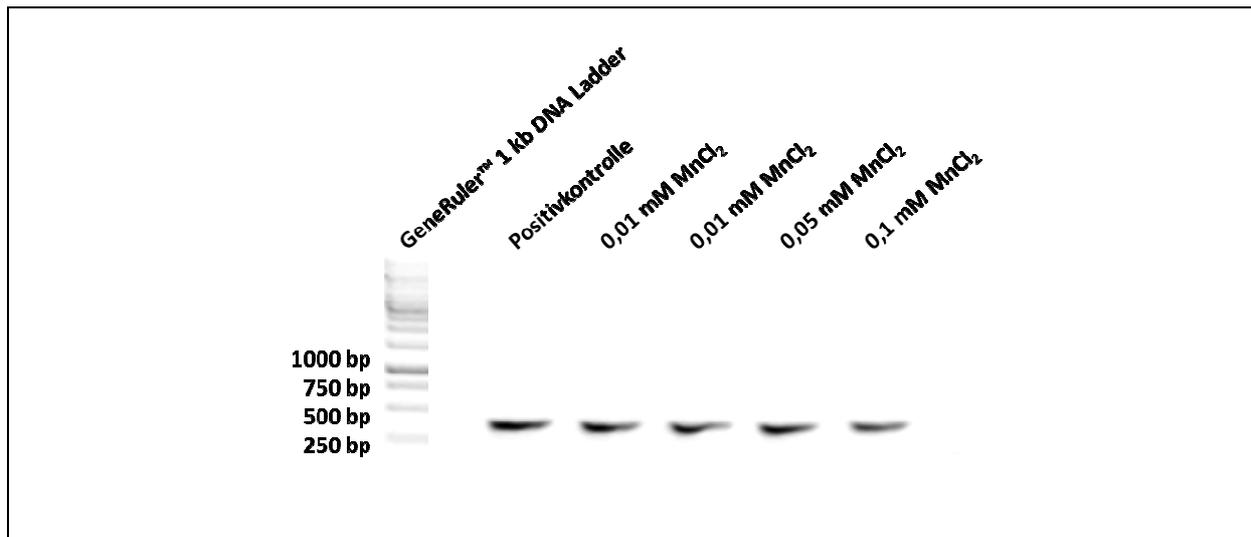


Abbildung 3-21 Gelelektrophorese der Error-prone PCR von *aac(6')-ly*.

Wie zuvor wurden auch hier die Ansätze mit 0,05 mM und 0,1 mM Manganchlorid ausgewählt und die PCR-Fragmente aufgereinigt. Anschließend wurden die Fragmente in Plasmid pUC19 ligiert und die erhaltenen Plasmide durch Transformation in *E. coli* JM109 vereinzelt. Ca. 167 Transformanten wurden gesichert und mittels PCR mit den Primern *lacZ+3396rev* und *aac(6)-ly+438rev* auf die Anwesenheit und Orientierung von *aac(6')-ly* untersucht (erwartete Größe des Produktes: 677 bp). Sieben Stämme wurden mit der korrekten Orientierung gefunden, bei vier Stämmen wurden Banden in einer Höhe von nur ca. 250 bp detektiert. Es erfolgte die Bestimmung der Empfindlichkeit von Kanamycin und Norfloxacin (Mikrodilution) für die elf Stämme, anschließend wurden diese in sechs Gruppen eingeteilt und ausgewertet. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3-22 zusammengefasst.

Abbildung 3-22 Ergebnisse der Error-prone PCR von *aac(6')*-Iy, mit Angaben zu den MHK-Werten (in µg/ml) für die elf ausgewählten Stämme.

Gruppen	Stamm	PCR-Produkt vorhanden	Kanamycin	Norfloxacin
Referenzen	<i>E. coli</i> JM109	-	0,25-0,5	0,32
	<i>E. coli</i> JM109 pUC19	-	0,25	0,32-0,64
	<i>E. coli</i> JM109 pHPNE19-04	+	1,5	0,32-0,64
Gruppe 1	<i>E. coli</i> JM109 EP-4-33	+, 250 bp	0,25	0,32
Gruppe 2	<i>E. coli</i> JM109 EP-4-10	+	0,25-0,5	0,32
Gruppe 3	<i>E. coli</i> JM109 EP-4-19	+, 250 bp	0,5	0,32
	<i>E. coli</i> JM109 EP-4-21	+, 250 bp	0,5	0,32
	<i>E. coli</i> JM109 EP-4-30	+, 250 bp	0,5	0,32
Gruppe 4	<i>E. coli</i> JM109 EP-4-6	+	0,5	0,32
	<i>E. coli</i> JM109 EP-4-20	+	0,5	0,32
	<i>E. coli</i> JM109 EP-4-46	+	0,5	0,32
Gruppe 5	<i>E. coli</i> JM109 EP-3-83	+	1	0,64
Gruppe 6	<i>E. coli</i> JM109 EP-4-4	+	1,5	0,32
	<i>E. coli</i> JM109 EP-3-35	+	1,5	0,32-0,64

Ein + bedeutet PCR-Produkt vorhanden, ein - bedeutet kein PCR-Produkt vorhanden.

Unter den 11 getesteten Stämmen befanden sich keine Varianten, die eine erhöhte MHK von Norfloxacin aufwiesen. Die Stämme der Gruppen 1 bis 4 besaßen keine Erhöhung der MHK von Kanamycin. Die PCR-Produkte der Gruppen 1 und 3 fielen mit ca. 250 bp kleiner aus als die zu erwartenden Produkte in einer Größe von 677 bp. Die Stämme der Gruppen 5 und 6 zeigten eine Erhöhung der MHK-Werte von Kanamycin von 0,25-0,5 µg/ml für *E. coli* JM109/*E. coli* JM109 pUC19 auf 1-1,5 µg/ml. Da hier kein Stamm eine Erhöhung der MHK von Norfloxacin besaß, wurde auch kein Stamm zur Sequenzierung ausgewählt.

3.1.6.2 Zusammenfassung der Ergebnisse von Abschnitt 3.1.6

- * Unter den 31 getesteten Stämmen der EP-PCR von *aac(6')*-Ib-wt, sowie unter den 11 getesteten Stämmen der EP-PCR von *aac(6')*-Iy befanden sich keine Varianten, die eine erhöhte MHK für Norfloxacin aufwiesen.
- * Es wurden keine Veränderung in den für die Ausprägung einer *aac(6')*-Ib-cr-Variante relevanten Positionen 102 und 179 gefunden.

Durch EP-PCR entstand weder mit *aac(6')-Ib-wt* noch mit *aac(6')y* als Template eine Variante, die von Norfloxacin einen erhöhten MHK-Wert zeigte. Daher wurde im Folgenden versucht, durch Selektion der Gene *aac(6')-Ib-wt*, *aac(6')-Ib102* sowie *aac(6')-Ib179* eine cr-Variante zu generieren und durch Selektion von *aac(6')-Iy* ein cr-analoge Modifikation zu erhalten.

3.1.7 In vitro Evolution von AAC(6')-Ib-wt, den Varianten AAC(6')-Ib102 und AAC(6')-Ib179, sowie AAC(6')-Iy

3.1.7.1 Mutagenese von *E. coli* CSH116 mit Nalidixinsäure und Levofloxacin

Für die Mutagenese der Gene *aac(6')-Ib-wt*, *aac(6')-Ib102*, *aac(6')-Ib179* und *aac(6')-Iy* wurde *E. coli* CSH116 ausgewählt, dieser Stamm besitzt einen Defekt im *dnaQ*-Gen. *DnaQ* kodiert für die ϵ -Untereinheit der DNA Polymerase III (139), die 3'-5'-Korrekturlese-Aktivität besitzt (140) und bei der DNA-Synthese während der Replikation eine Rolle spielt. Ein Defekt im *dnaQ*-Gen erhöht die Mutationsrate. Ein Stamm mit einer Mutation im *dnaQ*-Gen wird daher als Mutator-Stamm bezeichnet (44).

Zunächst wurde dieser Stamm ohne die zusätzlichen Gene *aac(6')-Ib-wt*, *aac(6')-Ib102*, *aac(6')-Ib179* und *aac(6')-Iy* selektiert. Dies geschah aus folgenden Gründen. Zum einen sollten die chromosomalen Mutationen in jedem der zu selektierenden Stämme identisch sein. Des Weiteren wurde in den unter 3.1.1.1 untersuchten Stämmen, die Variante *aac(6')-Ib-cr* lediglich in den Stämmen gefunden, in denen bereits mindestens zwei bis drei chromosomale Mutationen vorhanden waren. Außerdem würden bei der Selektion mit Fluorchinolonen leicht Mutanten mit einer Veränderung in *gyrA* oder *marR* entstehen, diese hätten eine höhere Resistenz, wodurch die Resistenz einer Mutation in *aac(6')-Ib* überdeckt werden würde.

3.1.7.1.1 Selektionsschritt Nr. I

Für den ersten Selektionsschritt wurde Nalidixinsäure verwendet. Dazu wurde zunächst die Empfindlichkeit für *E. coli* CSH116 von Nalidixinsäure bestimmt, diese lag bei 4 $\mu\text{g/ml}$. Zur Selektion wurde die 8-fache (= 32 $\mu\text{g/ml}$) bzw. die 16-fache (= 64 $\mu\text{g/ml}$) Konzentration des MHK-Wertes von Nalidixinsäure für Stamm *E. coli* CSH116 verwendet und sowohl die

Zellzahl, als auch die Mutationsrate, dem Quotienten von Mutanten/ml und KBE/ml bestimmt. Die Mutationsraten sind in folgender Tabelle zusammengefasst.

Tabelle 3-16 Mutationsrate für *E. coli* CSH116 für Nalidixinsäure, 8 x und 16 x der MHK.

8 x MHK (= 32 µg/ml) Nalidixinsäure	16 x MHK (= 64 µg/ml) Nalidixinsäure
2×10^{-8}	$1,1 \times 10^{-8}$

Mittels PCR mit den Primern *gyrA* 3-1 und *gyrA* 5-1 und RFLP mit dem Enzym *Hinfl*, wurden insgesamt 12 Stämme nach der Selektion mit 64 µg/ml Nalidixinsäure untersucht. Sequenziert wurden anschließend die Bereiche von *gyrA* von Stamm *E. coli* CSH116 als Referenz, sowie von den selektierten Stämmen *E. coli* CSH116 Nr. 64-7 und Nr. 64-8. Abbildung 3-23 zeigt einen Ausschnitt der DNA-Sequenzen.

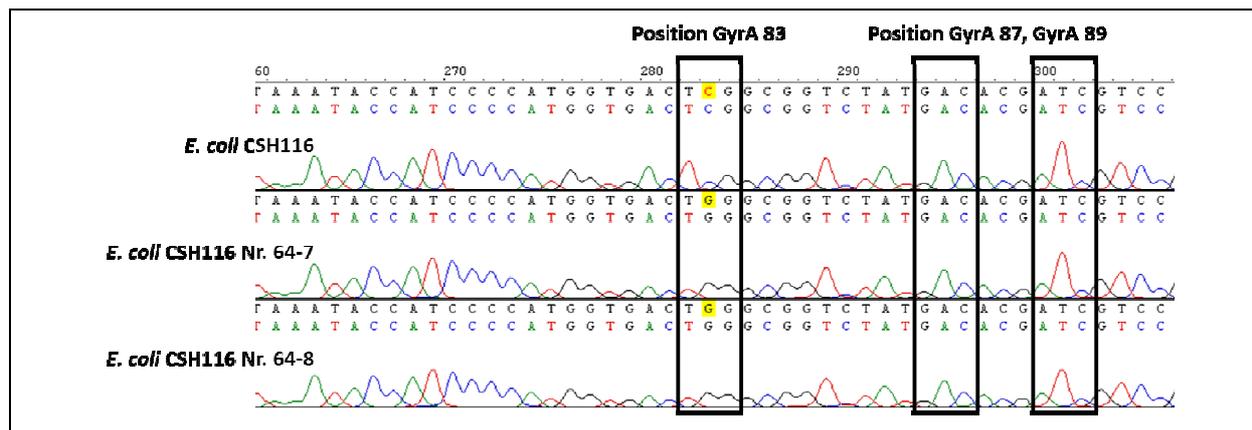


Abbildung 3-23 Ausschnitt der sequenzierten Bereiche von *gyrA*. Position 83 ist mit einem schwarzen Rechteck markiert. Unterschiedliche Basen sind **gelb** hinterlegt. Position 87 und 89 ist ebenfalls mit einem schwarzen Rechteck markiert, hier haben keine Veränderungen stattgefunden.

In den Stämmen *E. coli* CSH116 Nr. 64-7 und Nr. 64-8 ereignete sich in Triplet 83 ein Austausch von Cytosin in Guanin. Dies hat einen Austausch von Serin (16) in Tryptophan (UGG) in *GyrA* an Position 83 zur Folge. Mit *E. coli* CSH116 Nr. 64-8 wurde im Folgenden weitergearbeitet.

3.1.7.1.2 Selektionsschritt Nr. II

Im zweiten Selektionsschritt sollten eine Punktmutation oder eine Deletion in einem Gen selektiert werden, welche eine Erhöhung der Effluxaktivität zur Folge haben würden. Daher wurde für die Selektion von *E. coli* CSH116 Nr. 64-8 hier Levofloxacin gewählt. Zu Beginn der

Ergebnisse

zweiten Selektion wurde die Empfindlichkeit von Levofloxacin für die Stämme *E. coli* CSH116 und *E. coli* CSH116 Nr. 64-8 bestimmt. Die Werte sind in Tabelle 3-17 zusammengefasst.

Tabelle 3-17 Zusammenfassung der MHK von Levofloxacin in µg/ml der Stämme *E. coli* CSH116 und *E. coli* CSH116 Nr. 64-8.

Stamm	Levofloxacin
<i>E. coli</i> CSH116	0,015
<i>E. coli</i> CSH116 Nr. 64-8	0,125-0,25

Selektiert wurde mit der 4-fachen Konzentration des MHK-Wertes von *E. coli* CSH116 Nr. 64-8, 1 µg/ml Levofloxacin. Die Mutationsrate lag hier bei $2,98 \times 10^{-7}$. Elf zufällig ausgewählte Stämme wurden durch MHK-Bestimmung, in An- und Abwesenheit des Effluxpumpeninhibitors (EPI) Phe-Arg β-Naphthyl-amid Dihydrochlorid, untersucht. Die MHK-Werte sind in Tabelle 3-18 zusammengefasst. Die MHK-Werte von *E. coli* GK 571, *E. coli* GK 573 und *E. coli* GK 3009 dienten als Referenzwerte, ebenso wie die der Ausgangsstämme *E. coli* CSH116 und *E. coli* CSH116 Nr. 64-8.

Tabelle 3-18 Zusammenfassung der Ergebnisse der MHK-Bestimmung der Stämme *E. coli* CSH116, *E. coli* CSH116 Nr. 64-8 und der elf zufällig ausgewählten Stämme.

Stamm	Chloramphenicol	+EPI	Differenz der MHK mit und ohne EPI	Levofloxacin	+EPI	Differenz der MHK mit und ohne EPI
CSH116	2	1	1 Verdünnungsstufe	0,015	≤0,0039	min. 2 Verdünnungsstufen
CSH116 64-8	2	1	1 Verdünnungsstufe	0,125	0,06	1 Verdünnungsstufe
GK 571	8	2-4	1-2 Verdünnungsstufen	0,03	0,0078	2 Verdünnungsstufen
GK 573	32	4	3 Verdünnungsstufen	2	0,25	3 Verdünnungsstufen
GK 3009	32	4	3 Verdünnungsstufen	0,125	0,015	3 Verdünnungsstufen
64-8-1	4	1	2 Verdünnungsstufen	1-2	0,5	2 Verdünnungsstufen
64-8-3	4	1	2 Verdünnungsstufen	1-2	0,5	2 Verdünnungsstufen
64-8-5	4	0,5	3 Verdünnungsstufen	2-4	0,5	3 Verdünnungsstufen
64-8-7	2-4	1	1-2 Verdünnungsstufen	1	0,5	1 Verdünnungsstufe
64-8-9	4	1	2 Verdünnungsstufen	2	0,25	3 Verdünnungsstufen

Stamm	Chloramphenicol	+EPI	Differenz der MHK mit und ohne EPI	Levofloxacin	+EPI	Differenz der MHK mit und ohne EPI
64-8-10	4	1	2 Verdünnungsstufen	1	0,25- 0,5	1-2 Verdünnungsstufen
64-8-21	4	0,5	3 Verdünnungsstufen	1-2	0,25	2-3 Verdünnungsstufen
64-8-25	4	1	2 Verdünnungsstufen	1	0,25- 0,5	1-2 Verdünnungsstufen
64-8-27	4	1	2 Verdünnungsstufen	0,5	0,25	1 Verdünnungsstufe
64-8-31	4	1	2 Verdünnungsstufen	1	0,25	2 Verdünnungsstufen
64-8-33	8-16	1-2	3 Verdünnungsstufen	1	0,125	3 Verdünnungsstufen

MHK-Werte in µg/ml

Die Stämme *E. coli* GK 571 und GK 3009, die eine nachgewiesene Deletion in *marR* besitzen und folglich eine erhöhte Expression der Effluxpumpen zeigen (10, 37), zeigten einen Unterschied von drei Verdünnungsstufen von Chloramphenicol bzw. Levofloxacin, jeweils in An- und Abwesenheit von EPI. Daher wurde für die weiteren Untersuchungen ein Stamm gewählt, der einen ähnlichen Unterschied der Verdünnungsstufen zeigte.

Aufgrund des Unterschieds von ebenfalls drei Verdünnungsstufen von Chloramphenicol und Levofloxacin mit und ohne Zugabe von EPI, wurde die Mutante *E. coli* CSH116 Nr. 64-8-33 ausgewählt, da dieser, im Gegensatz zu den Stämmen *E. coli* CSH116 Nr. 64-8-5 und *E. coli* CSH116 Nr. 64-8-21 einen höheren MHK-Wert von Chloramphenicol zeigte. Stamm *E. coli* CSH116 Nr. 64-8-33 wurde durch Sequenzierung näher charakterisiert.

Die Gene *marR* (siehe Abbildung 3-24, Abbildung 3-25) und *gyrA* (siehe Abbildung 3-28) sowie die Gene *parC* (siehe Abbildung 3-26) und *acrR* (siehe Abbildung 3-27) wurden sequenziert.

Ergebnisse

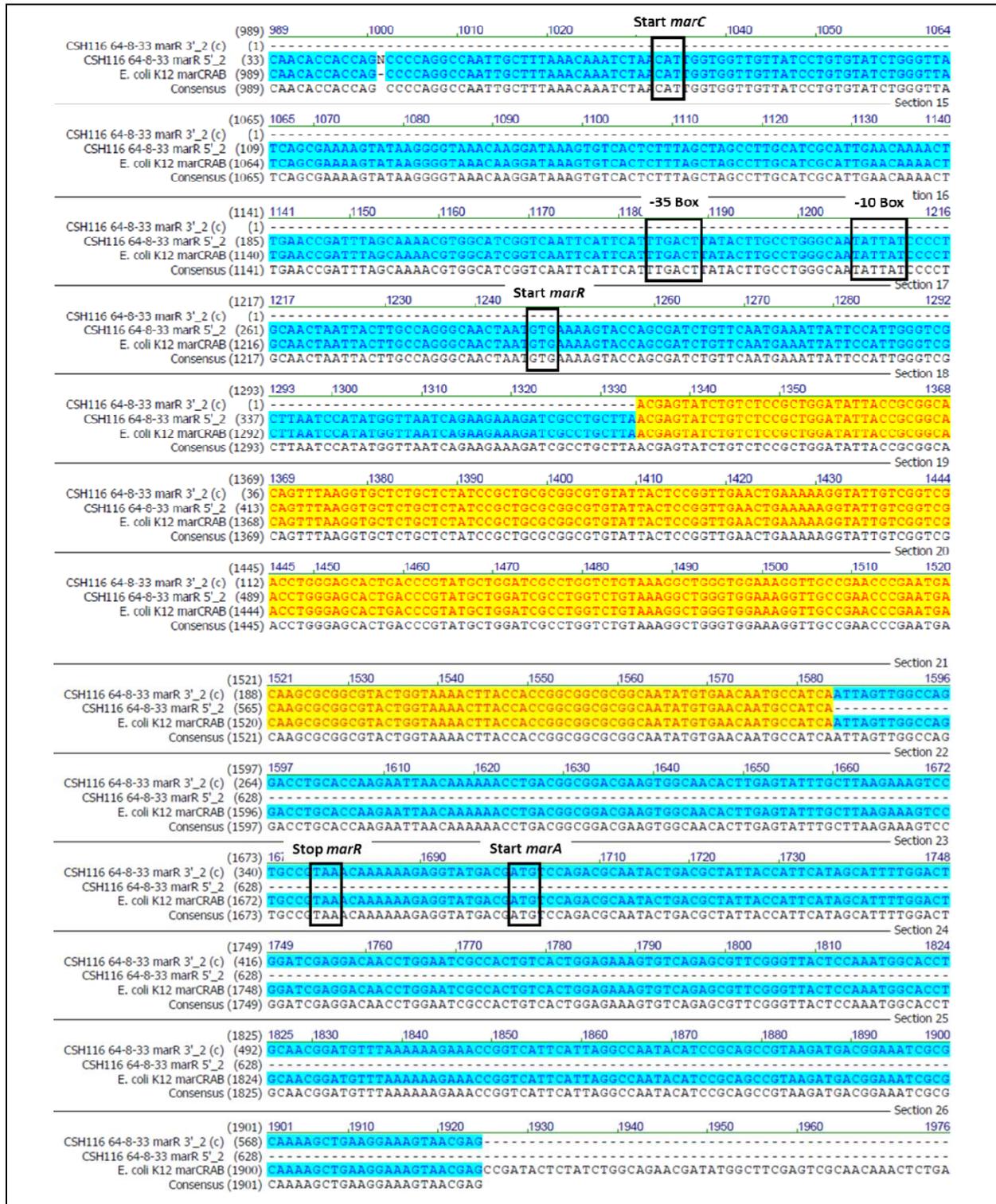


Abbildung 3-24 Darstellung der Nukleotidsequenz des sequenzierten Bereichs von *marCRA* für *E. coli* CSH116 64-8-33 im Vergleich mit *E. coli* K12, Accession Nr. NC 000913.

Im folgenden Bild (Abbildung 3-25) ist die unklare Base N im Chromatogramm dargestellt.

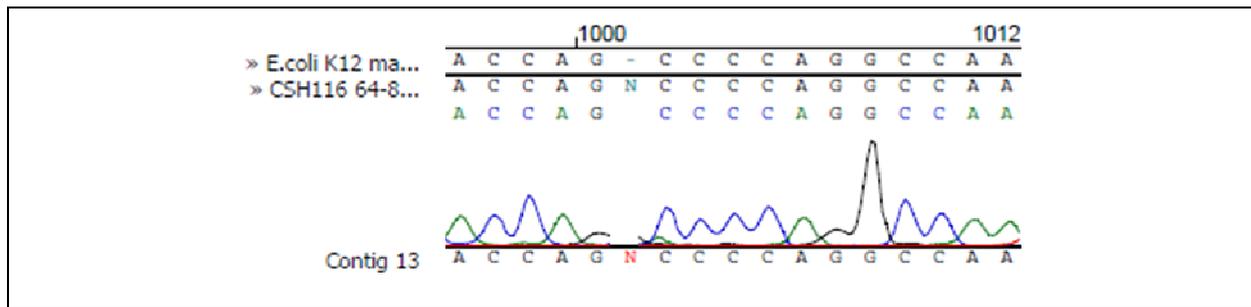


Abbildung 3-25 Ausschnitt des Chromatogramms von *E. coli* CSH116 64-8-33 der Sequenzierung von *marC* bis *marA* (siehe Abbildung 3-24).



Abbildung 3-26 Darstellung der Nukleotidsequenz des sequenzierten Bereichs von *gyrA*, mit Markierung der Aminosäurepositionen 83, 87 und 89, für *E. coli* CSH116 64-8-33, im Vergleich mit *E. coli* K12, Accession Nr. X 06373.

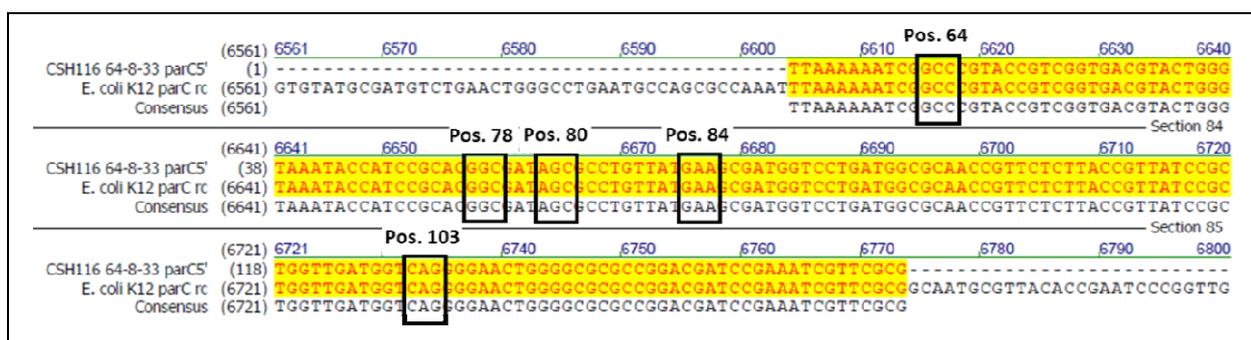


Abbildung 3-27 Darstellung der Nukleotidsequenz des sequenzierten Bereichs von *parC*, mit Markierung der Aminosäurepositionen 64, 78, 80, 84 und 89, für *E. coli* CSH116 64-8-33, im Vergleich mit *E. coli* K12, Accession Nr. AE 000384.

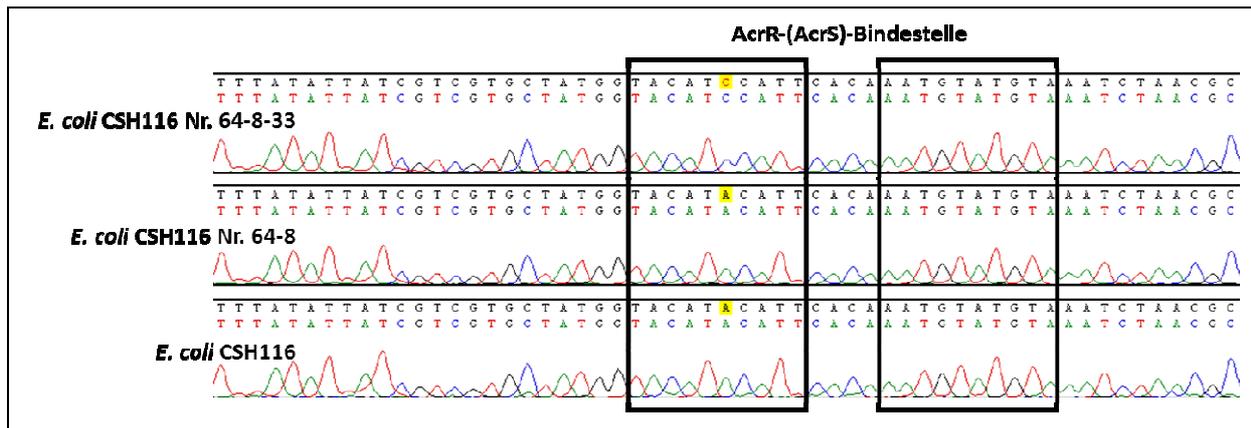


Abbildung 3-28 Ausschnitt der sequenzierten Bereiche von *acrO*. Die palindromische AcrR-(AcrS)-Bindestelle ist mit zwei schwarzen Rechtecken markiert. Unterschiedliche Basen sind **gelb** hinterlegt.

Im Bereich *marC* über *marR* bis *marA* befand sich keine Abweichung zum Vergleichsstamm *E. coli* K12. Die Sequenzierung von *gyrA* zeigte den bereits beschriebenen Austausch an Position 83 von Serin nach Tryptophan. Die Veränderung in Codon 89, von ATT (Isoleucin) nach ATC (Isoleucin), hatte keinen Aminosäureaustausch zur Folge, sie stellte eine Variation zwischen den beiden Stämmen *E. coli* K12 und *E. coli* CSH116 dar, vergleiche Abbildung 3-23. In Bereich *parC* fand sich kein Unterschied zum Vergleichsstamm. Im Bereich zwischen *acrR* und *acrAB* befindet sich die palindromische Bindestelle für AcrR-(AcrS) (70). Hier wurde in Stamm *E. coli* CSH116 64-8-33 ein Austausch von Adenin in Cytosin identifiziert. Um zu klären, ob dieser Basenaustausch für Erhöhung der Effluxaktivität verantwortlich war, wurde anschließend ein Luciferase Assay (3.1.7.1.3) durchgeführt.

3.1.7.1.3 Analyse des Einflusses der *in vitro* generierten Mutation in der AcrR-(AcrS) Bindestelle von *E. coli* CSH116 64-8-33 durch das Luciferase Assay System

Zur Klärung, ob der Basenaustausch in der AcrR-(AcrS)-Bindestelle, Grund für eine Veränderung in der Effluxaktivität von *E. coli* CSH116 64-8-33 war, wurde die Mutation in Plasmid pPHB331 eingeführt.

Plasmid pPHB331 war von Nina Matthiessen im Rahmen ihrer Dissertation konstruiert worden (103). In pPHB331 befindet sich der Promotorbereich mit der AcrR-(AcrS)-Bindestelle 5' zum Firefly-Luciferase Gen *luc* aus *Photinus pyralis*. In dieses Plasmid wurde mittels SSM-PCR (2.2.2.8.4) mit den Primern pPHB331_+4578_T-G_for und pPHB331_+4596_rev die in *E. coli* CSH116 64-8-33 zufällig erhaltene Mutation eingeführt. Das daraus erhaltene Plasmid pPHB331.1 ist in Abbildung 3-29 dargestellt.

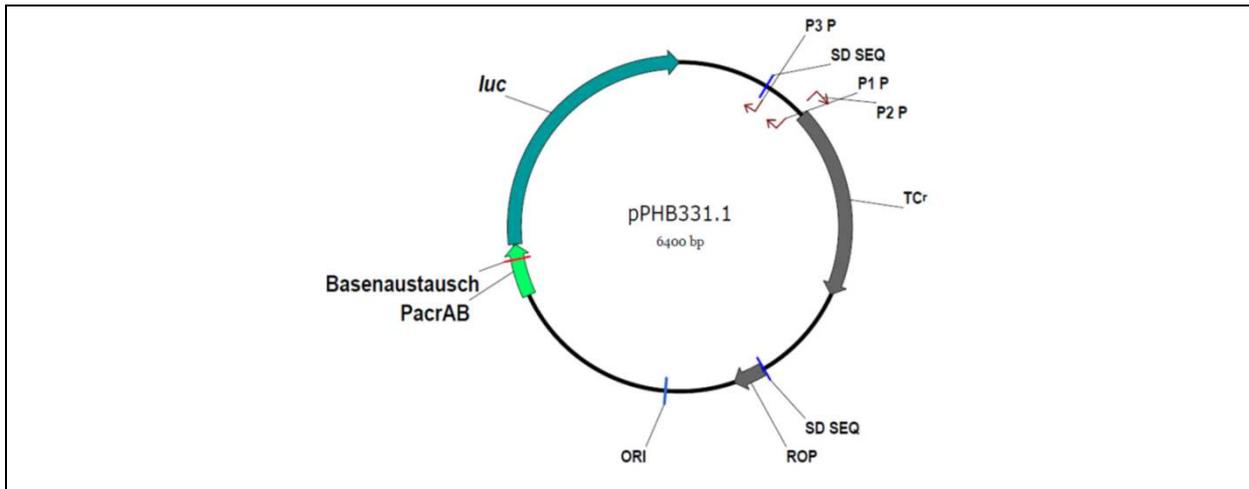


Abbildung 3-29 Grafische Darstellung des Plasmids pPHB331.1 mit Markierung des eingeführten Basenaustauschs in die Bindestelle von AcrR-(AcrS) der Promotorregion *PacrAB*. *PacrAB* bezeichnet den Promotor des *acrAB*-Gens, hier durch *luc* ersetzt. Das *luc*-Gen kodiert für die Firefly-Luciferase. TCr^R steht für Tetrazyklin-Resistenz und besteht aus dem Gen *tetA*, welches für eine Tetrazyklin-spezifische Effluxpumpe kodiert. ORI ist die Abkürzung für *origin of replication* (Replikationsursprung). P3P, P1P, P2P sind weitere Promotoren.

Zur Kontrolle wurde der Bereich der eingeführten Punktmutation von Plasmid pPHB331.1 sequenziert. Ein Ausschnitt der Sequenzierung ist in Abbildung 3-30 dargestellt.

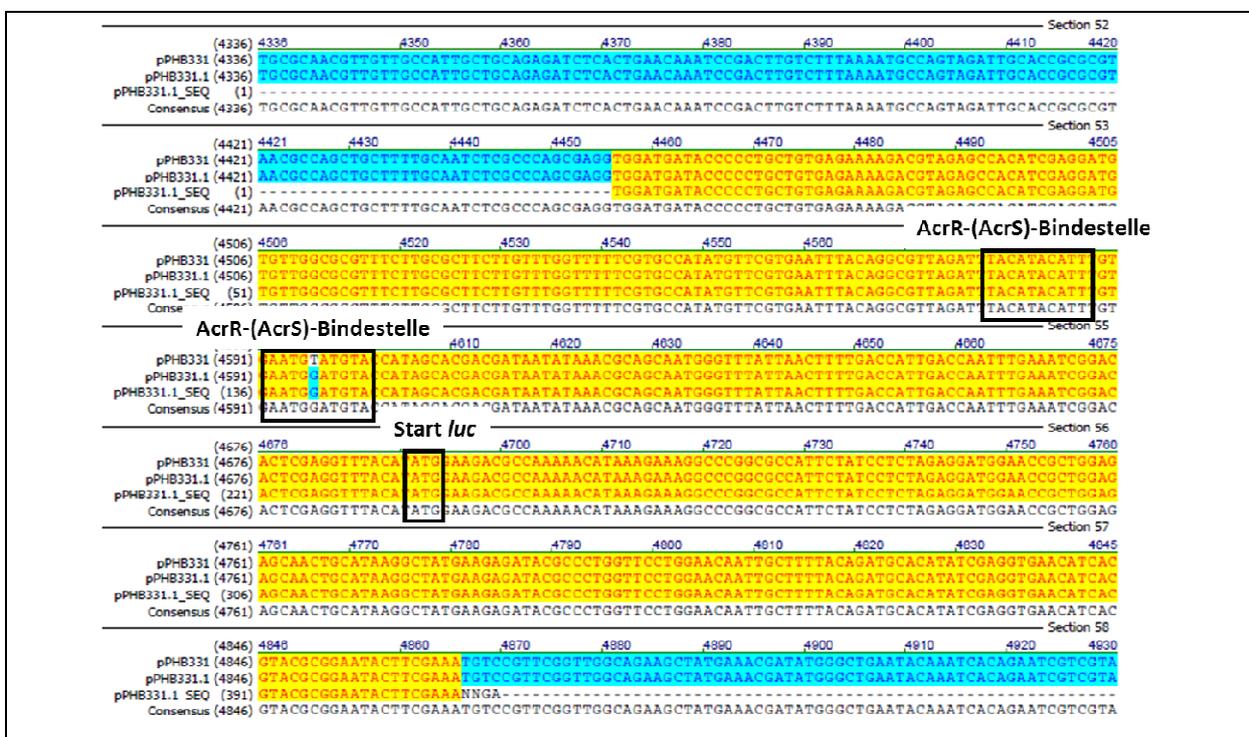


Abbildung 3-30 Darstellung der Nukleotidsequenz des sequenzierten Bereichs von Plasmid pPHB331.1 (pPHB331.1_SEQ) im Vergleich mit den *in silico* hergestellten Referenzplasmiden pPHB331 und pPHB331.1.

Ergebnisse

Für *E. coli* JM109 mit Plasmid pPHB331 bzw. pPHB331.1, wurden jeweils Luciferase-Aktivitäten als RLU-Werte (*Relative Light Units*) mit dem Luminometer gemäß Vorschrift (2.2.1.15) gemessen. Das Ergebnis ist in Tabelle 3-19 zusammengefasst.

Tabelle 3-19 Ergebnis der Messung im Luminometer.

E. coli	RLU-1	RLU-2	OD₅₅₀	RLU-1 / OD₅₅₀	RLU-2 / OD₅₅₀	RLU / OD₅₅₀	Expression
JM109							
pPHB331	1650031	1553946	0,5058	3262220,25	3072253,86	3256468,96	100 %
	1695061	1689450	0,5058	3351247,53	3340154,21		
pPHB331.1	3132182	2963258	0,5358	5845804,4	5530530,05	5858411,25	179,9 %
	3192733	3267574	0,5358	5958814,86	6098495,71		

Der RLU-Wert gibt die gemessene Lichtintensität wieder, diese ist abhängig von der im Stamm exprimierten Luciferase, die in der Lage ist, in Gegenwart von Sauerstoff, Magnesiumkationen und ATP, ihr Substrat Luciferin zu Oxyluciferin abzubauen. Das bei der Reaktion gebildete Licht wird im Luminometer bei 560 nm als Biolumineszenz in RLU gemessen. Die über die Zellzahl, bestimmt als Optische Dichte (OD), normierten Werte, RLU/OD₅₅₀, können als Maß für die Promotoraktivität verwendet werden.

Die RLU-Werte von *E. coli* JM109 pPHB331.1 waren etwa doppelt so hoch, wie die Werte von *E. coli* JM109 pPHB331. Aus den normierten Werten (RLU/OD) ergab sich ein Faktor von 1,79900724 aus dem Quotient der beiden Werte von pPHB331 und pPHB331.1. Wurde der Wert von *E. coli* JM109 pPHB331 auf 100 % gesetzt, ergab sich daraus eine zu 79,9 % erhöhte Promotoraktivität für *E. coli* JM109 pPHB331.1. Daher wurde Stamm *E. coli* CSH116 64-8-33 nun für die Selektion der Gene *aac(6')-Ib-wt*, *aac(6')-Ib102*, *aac(6')-Ib179* und *aac(6')-Iy* verwendet.

3.1.7.2 Mutagenese von AAC(6')-Ib-wt, AAC(6')-Ib102, AAC(6')-Ib179 und AAC(6')-Iy in *E. coli* CSH116 64-8-33

Für die Mutagenese der Gene *aac(6')-Ib-wt*, *aac(6')-Ib102*, *aac(6')-Ib179* und *aac(6')-Iy* wurde *E. coli* CSH116 64-8-33 verwendet. Dieser Stamm wurde zuvor selbst selektiert, um bereits zwei chromosomale Fluorchinolonresistenz vermittelnde Mutationen vorauszusetzen, um dann die Gene *aac(6')-Ib-wt*, *aac(6')-Ib102*, *aac(6')-Ib179* und *aac(6')-Iy* zu selektieren (vergleiche Abschnitt 3.1.7.1).

Die Plasmide pHPNE19-05.1 (*aac(6')-Ib-wt*) und pHPNE19-05.1a (*aac(6')-Ib102*), pHPNE19-05.1b (*aac(6')-Ib179*) und pHPNE19-08 (*aac(6')-Iy*), sowie die Plasmide pUC19 und pHPNE19-01.1b (*aac(6')-Ib-cr*) als Referenzen für die MHK, wurden in CaCl₂-kompetente *E. coli* CSH116 64-8-33 Zellen transformiert und die Empfindlichkeit von Kanamycin und Norfloxacin bestimmt. Die MHK-Werte sind in Tabelle 3-20 zusammengefasst.

Tabelle 3-20 Ergebnis der MHK-Bestimmung von Norfloxacin und Kanamycin für die Stämme, die zur Selektion verwendet werden sollen (grau hinterlegt), im Vergleich zu den Referenzstämmen. MHK-Werte in µg/ml.

Stamm	Norfloxacin	Kanamycin
<i>E. coli</i> CSH116 64-8	0,5	4
<i>E. coli</i> CSH116 64-8-33	1	4
<i>E. coli</i> CSH116 64-8-33 pUC19	1	4
<i>E. coli</i> CSH116 64-8-33 pHPNE19-01.1b (<i>aac(6')-Ib-cr</i>)	4	512
<i>E. coli</i> CSH116 64-8-33 pHPNE19-05.1 (<i>aac(6')-Ib-wt</i>)	1	2048
<i>E. coli</i> CSH116 64-8-33 pHPNE19-05.1a (<i>aac(6')-Ib102</i>)	1	512
<i>E. coli</i> CSH116 64-8-33 pHPNE19-05.1b (<i>aac(6')-Ib179</i>)	2	1024
<i>E. coli</i> CSH116 64-8-33 pHPNE19-08 (<i>aac(6')-Iy</i>)	1	512

Die Mutagenese erfolgte durch zwei unterschiedliche Methoden. Zum einen wurde eine Bakterienkultur herangezogen, die Zellen durch Zentrifugation und Resuspendieren in einem geringeren Volumen von Medium aufkonzentriert und anschließend auf Agarplatten ausplattiert, die eine zweifache bzw. vierfache Konzentration des MHK-Wertes des jeweiligen Stammes besaßen (2.2.1.11). Zum anderen wurden die Stämme in Flüssigkulturen über 11 Tage mit steigenden Antibiotikakonzentrationen passagiert (2.2.1.12).

Zunächst wurden die Mutationsraten der Stämme *E. coli* CSH116 64-8-33 pHPNE19-05.1, *E. coli* CSH116 64-8-33 pHPNE19-05.1a, *E. coli* CSH116 64-8-33 pHPNE19-05.1b und *E. coli* CSH116 64-8-33 pHPNE19-08 bestimmt. Das Ergebnis ist in Tabelle 3-21 dargestellt.

Tabelle 3-21 Mutationsraten für *E. coli* CSH116 64-8-33 mit Plasmid pHPNE19-05.1, pHPNE19-05.1a, pHPNE19-05.1b und pHPNE19-08 für 4 µg/ml Norfloxacin.

Stamm	2 x MHK Norfloxacin	4 x MHK Norfloxacin
<i>E. coli</i> CSH116 64-8	3,80 x 10 ⁻⁹	1,38 x 10 ⁻⁹
<i>E. coli</i> CSH116 64-8-33	1,70 x 10 ⁻⁹	7,74 x 10 ⁻¹⁰
<i>E. coli</i> CSH116 64-8-33 pUC19	7,25 x 10 ⁻⁹	7,14 x 10 ⁻¹⁰

Ergebnisse

Stamm	2 x MHK Norfloxacin	4 x MHK Norfloxacin
<i>E. coli</i> CSH116 64-8-33 pHPNE19-01.1b (<i>aac(6')-Ib-cr</i>)	nb	$7,50 \times 10^{-9}$
<i>E. coli</i> CSH116 64-8-33 pHPNE19-05.1 (<i>aac(6')-Ib-wt</i>)	$2,79 \times 10^{-8}$	$9,71 \times 10^{-8}$
<i>E. coli</i> CSH116 64-8-33 pHPNE19-05.1a (<i>aac(6')-Ib102</i>)	$2,53 \times 10^{-8}$	$9,34 \times 10^{-9}$
<i>E. coli</i> CSH116 64-8-33 pHPNE19-05.1b (<i>aac(6')-Ib179</i>)	nb	$8,48 \times 10^{-9}$
<i>E. coli</i> CSH116 64-8-33 pHPNE19-08 (<i>aac(6')-Iy</i>)	nb	$1,40 \times 10^{-9}$

3.1.7.2.1 In vitro Selektion mit Agarplatten

Selektiert wurde hier mit der zweifachen und der vierfachen Konzentration des MHK-Wertes von Norfloxacin mit Hilfe von selektiven LB-Agarplatten (2.2.1.11). Tabelle 3-22 zeigt die Anzahl der erhaltenen Stämme und der Konzentrationen mit denen selektiert wurde.

Tabelle 3-22 Übersicht der Anzahl der gesicherten Stämme und der Konzentrationen mit denen zuvor selektiert wurde.

Stamm	2 x MHK Norfloxacin	4 x MHK Norfloxacin
<i>E. coli</i> CSH116 64-8-33 pHPNE19-05.1	21	28
<i>E. coli</i> CSH116 64-8-33 pHPNE19-05.1a	3	1
<i>E. coli</i> CSH116 64-8-33 pHPNE19-05.1b	-	55
<i>E. coli</i> CSH116 64-8-33 pHPNE19-08	17	5

Im nächsten Schritt wurde mittels Agardilutionsmethode (2.2.1.10.2) die Empfindlichkeit für Norfloxacin und Kanamycin im Vergleich zum jeweiligen Ausgangsstamm bestimmt (siehe Tabelle 3-23). Die Bestimmung der Empfindlichkeit durch die Methode der Agardilution ermöglichte eine große Anzahl von verschiedenen Stämmen in einem Schritt zu testen. Dies diente dazu, eine Vorauswahl der Stämme zu treffen, die in der Resistenzeigenschaft vergleichbar mit der Eigenschaft der *aac(6')-Ib-cr*-Variante waren.

Die Auswahl der Stämme mit den Plasmiden die eine *aac(6')-Ib*-Variante besaßen, wurden anschließend durch PCR (2.2.2.8.1) mit den Primern lacZ+3396rev und AAC6 +519 rev und RFLP mit den Restriktionsenzymen *NdeI* und *FokI* (2.2.2.12) näher untersucht.

Die Ergebnisse der Analyse sind in Tabelle 3-23 (pHPNE19-05.1), Tabelle 3-24 (pHPNE19-05.1a) und Tabelle 3-25 (pHPNE19-05.1b) zusammengefasst.

Tabelle 3-23 Ergebnis der Analyse der selektierten Stämme von *E. coli* CSH116 64-8-33 mit Plasmid pHPNE19-05.1.

Ausgangstamm <i>E. coli</i> CSH116 64-8-33	Konzentration der Selektion	Stamm	MHK (µg/ml) Norfloxacin	MHK (µg/ml) Kanamycin	Ergebnis RFLP*
pHPNE19-05.1	4x MHK	1	> 12	> 288	<i>aac(6')</i> - <i>lb</i> - <i>wt</i>
pHPNE19-05.1	4x MHK	2	> 12	> 288	<i>aac(6')</i> - <i>lb</i> - <i>wt</i>
pHPNE19-05.1	4x MHK	3	> 12	> 288	<i>aac(6')</i> - <i>lb</i> - <i>wt</i>
pHPNE19-05.1	4x MHK	7	> 12	> 288	<i>aac(6')</i> - <i>lb</i> - <i>wt</i>
pHPNE19-05.1	4x MHK	8	> 12	> 288	<i>aac(6')</i> - <i>lb</i> - <i>wt</i>
pHPNE19-05.1	4x MHK	9	> 12	> 288	<i>aac(6')</i> - <i>lb</i> - <i>wt</i>
pHPNE19-05.1	4x MHK	12	> 12	> 288	<i>aac(6')</i> - <i>lb</i> - <i>wt</i>
pHPNE19-05.1	4x MHK	13	> 12	> 288	<i>aac(6')</i> - <i>lb</i> - <i>wt</i>
pHPNE19-05.1	4x MHK	14	> 12	> 288	<i>aac(6')</i> - <i>lb</i> - <i>wt</i>
pHPNE19-05.1	4x MHK	18	> 12	> 288	<i>aac(6')</i> - <i>lb</i> - <i>wt</i>
pHPNE19-05.1	4x MHK	20	> 12	> 288	<i>aac(6')</i> - <i>lb</i> - <i>wt</i>
pHPNE19-05.1	4x MHK	22	> 12	> 288	<i>aac(6')</i> - <i>lb</i> - <i>wt</i>
pHPNE19-05.1	4x MHK	23	> 12	> 288	<i>aac(6')</i> - <i>lb</i> - <i>wt</i>
pHPNE19-05.1	4x MHK	25	> 12	> 288	<i>aac(6')</i> - <i>lb</i> - <i>wt</i>
pHPNE19-05.1	4x MHK	26	> 12	> 288	<i>aac(6')</i> - <i>lb</i> - <i>wt</i>
pHPNE19-05.1	4x MHK	27	> 12	> 288	<i>aac(6')</i> - <i>lb</i> - <i>wt</i>
pHPNE19-05.1	4x MHK	28	> 12	> 288	<i>aac(6')</i> - <i>lb</i> - <i>wt</i>

Ergebnisse

Ausgangstamm <i>E. coli</i> CSH116 64-8-33	Konzentration der Selektion	Stamm	MHK (µg/ml) Norfloxacin	MHK (µg/ml) Kanamycin	Ergebnis RFLP*
pHPNE19-05.1	4x MHK	29	> 12	> 288	<i>aac(6')</i> - <i>lb</i> - <i>wt</i>
pHPNE19-05.1	4x MHK	30	> 12	> 288	<i>aac(6')</i> - <i>lb</i> - <i>wt</i>
pHPNE19-05.1	4x MHK	31	> 12	> 288	<i>aac(6')</i> - <i>lb</i> - <i>wt</i>
pHPNE19-05.1	4x MHK	32	> 12	> 288	<i>aac(6')</i> - <i>lb</i> - <i>wt</i>
pHPNE19-05.1	4x MHK	34	> 12	> 288	<i>aac(6')</i> - <i>lb</i> - <i>wt</i>
pHPNE19-05.1	4x MHK	38	> 12	96	nb
pHPNE19-05.1	4x MHK	40	> 12	> 288	<i>aac(6')</i> - <i>lb</i> - <i>wt</i>
pHPNE19-05.1	4x MHK	45	> 12	> 288	<i>aac(6')</i> - <i>lb</i> - <i>wt</i>
pHPNE19-05.1	4x MHK	46	6	> 288	<i>aac(6')</i> - <i>lb</i> - <i>wt</i>
pHPNE19-05.1	4x MHK	49	> 12	> 288	<i>aac(6')</i> - <i>lb</i> - <i>wt</i>
pHPNE19-05.1	4x MHK	50	> 12	> 288	<i>aac(6')</i> - <i>lb</i> - <i>wt</i>
pHPNE19-05.1	2x MHK	1	> 12	< 96	nb
pHPNE19-05.1	2x MHK	2	> 12	< 96	nb
pHPNE19-05.1	2x MHK	17	> 12	< 96	nb
pHPNE19-05.1	2x MHK	26	> 12	< 96	nb
pHPNE19-05.1	2x MHK	30	10	> 288	<i>aac(6')</i> - <i>lb</i> - <i>wt</i>
pHPNE19-05.1	2x MHK	33	nb	nb	nb
pHPNE19-05.1	2x MHK	34	6	128-224	<i>aac(6')</i> - <i>lb</i> - <i>wt</i>
pHPNE19-05.1	2x MHK	35	> 12	> 288	<i>aac(6')</i> - <i>lb</i> - <i>wt</i>
pHPNE19-05.1	2x MHK	36	5	> 288	<i>aac(6')</i> - <i>lb</i> - <i>wt</i>

Ausgangstamm <i>E. coli</i> CSH116 64-8-33	Konzentration der Selektion	Stamm	MHK (µg/ml) Norfloxacin	MHK (µg/ml) Kanamycin	Ergebnis RFLP*
pHPNE19-05.1	2x MHK	37	5	> 288	<i>aac(6')</i> - <i>lb</i> - <i>wt</i>
pHPNE19-05.1	2x MHK	38	nb	nb	nb
pHPNE19-05.1	2x MHK	39	6	96	<i>aac(6')</i> - <i>lb</i> - <i>wt</i>
pHPNE19-05.1	2x MHK	40	5	< 96	nb
pHPNE19-05.1	2x MHK	41	8	96	<i>aac(6')</i> - <i>lb</i> - <i>wt</i>
pHPNE19-05.1	2x MHK	42	6	> 288	<i>aac(6')</i> - <i>lb</i> - <i>wt</i>
pHPNE19-05.1	2x MHK	43	10	128	<i>aac(6')</i> - <i>lb</i> - <i>wt</i>
pHPNE19-05.1	2x MHK	44	6	> 288	<i>aac(6')</i> - <i>lb</i> - <i>wt</i>
pHPNE19-05.1	2x MHK	45	5	> 288	<i>aac(6')</i> - <i>lb</i> - <i>wt</i>
pHPNE19-05.1	2x MHK	46	6	288	<i>aac(6')</i> - <i>lb</i> - <i>wt</i>
pHPNE19-05.1	2x MHK	47	8	> 288	<i>aac(6')</i> - <i>lb</i> - <i>wt</i>
pHPNE19-05.1	2x MHK	48	6	> 288	<i>aac(6')</i> - <i>lb</i> - <i>wt</i>

*RFLP = Restriktionsfragmentlängenanalyse

Tabelle 3-24 Ergebnis der Analyse der selektierten Stämme von *E. coli* CSH116 64-8-33 mit Plasmid pHPNE19-05.1a.

Ausgangstamm <i>E. coli</i> CSH116 64-8-33	Konzentration der Selektion	Stamm	MHK (µg/ml) Norfloxacin	MHK (µg/ml) Kanamycin	Ergebnis RFLP*
pHPNE19-05.1a	4x MHK	11	> 12	244	nb
pHPNE19-05.1a	2x MHK	37	> 12	128	<i>aac(6')</i> - <i>lb</i> - <i>wt102</i>
pHPNE19-05.1a	2x MHK	41	6	> 288	<i>aac(6')</i> - <i>lb</i> - <i>wt102</i>
pHPNE19-05.1a	2x MHK	44	6	96	nb

*RFLP = Restriktionsfragmentlängenanalyse

Ergebnisse

Tabelle 3-25 Ergebnis der Analyse der selektierten Stämme von *E. coli* CSH116 64-8-33 mit Plasmid pHPNE19-05.1b.

Ausgangstamm <i>E. coli</i> CSH116 64-8-33	Konzentration der Selektion	Stamm	MHK (µg/ml) Norfloxacine	MHK (µg/ml) Kanamycin	Ergebnis RFLP*
pHPNE19-05.1b	4x MHK	1	> 12	> 288	nb
pHPNE19-05.1b	4x MHK	2	10	> 288	<i>aac(6')</i> - <i>lb</i> - <i>wt</i>
pHPNE19-05.1b	4x MHK	3	> 12	> 288	nb
pHPNE19-05.1b	4x MHK	4	> 12	> 288	nb
pHPNE19-05.1b	4x MHK	5	> 12	> 288	nb
pHPNE19-05.1b	4x MHK	6	8	> 288	<i>aac(6')</i> - <i>lb</i> - <i>wt</i>
pHPNE19-05.1b	4x MHK	7	> 12	> 288	nb
pHPNE19-05.1b	4x MHK	8	> 12	> 288	nb
pHPNE19-05.1b	4x MHK	9	> 12	> 288	nb
pHPNE19-05.1b	4x MHK	10	> 12	> 288	nb
pHPNE19-05.1b	4x MHK	11	> 12	> 288	nb
pHPNE19-05.1b	4x MHK	12	> 12	> 288	nb
pHPNE19-05.1b	4x MHK	14	> 12	> 288	nb
pHPNE19-05.1b	4x MHK	18	> 12	> 288	nb
pHPNE19-05.1b	4x MHK	19	> 12	> 288	nb
pHPNE19-05.1b	4x MHK	21	> 12	> 288	nb
pHPNE19-05.1b	4x MHK	25	> 12	> 288	<i>aac(6')</i> - <i>lb</i> - <i>wt</i>
pHPNE19-05.1b	4x MHK	26	10-12	> 288	<i>aac(6')</i> - <i>lb</i> - <i>wt</i>
pHPNE19-05.1b	4x MHK	28	6	> 288	<i>aac(6')</i> - <i>lb</i> - <i>wt</i>
pHPNE19-05.1b	4x MHK	30	8	> 288	<i>aac(6')</i> - <i>lb</i> - <i>wt</i>
pHPNE19-05.1b	4x MHK	32	> 12	> 288	nb
pHPNE19-05.1b	4x MHK	33	> 12	> 288	nb
pHPNE19-05.1b	4x MHK	34	> 12	> 288	nb
pHPNE19-05.1b	4x MHK	36	> 12	> 288	nb
pHPNE19-05.1b	4x MHK	38	> 12	> 288	nb
pHPNE19-05.1b	4x MHK	39	> 12	> 288	nb
pHPNE19-05.1b	4x MHK	40	> 12	> 288	nb

Ausgangstamm <i>E. coli</i> CSH116 64-8-33	Konzentration der Selektion	Stamm	MHK (µg/ml) Norfloxacin	MHK (µg/ml) Kanamycin	Ergebnis RFLP*
pHPNE19-05.1b	4x MHK	41	> 12	> 288	nb
pHPNE19-05.1b	4x MHK	42	8	> 288	<i>aac(6')-lb-wt</i>
pHPNE19-05.1b	4x MHK	43	> 12	> 288	nb
pHPNE19-05.1b	4x MHK	44	> 12	> 288	nb
pHPNE19-05.1b	4x MHK	45	> 12	> 288	nb
pHPNE19-05.1b	4x MHK	47	> 12	> 288	nb
pHPNE19-05.1b	4x MHK	49	> 12	> 288	nb
pHPNE19-05.1b	4x MHK	51	> 12	> 288	nb
pHPNE19-05.1b	4x MHK	52	> 12	> 288	nb
pHPNE19-05.1b	4x MHK	53	> 12	> 288	nb
pHPNE19-05.1b	4x MHK	55	> 12	> 288	nb
pHPNE19-05.1b	4x MHK	56	> 12	> 288	nb
pHPNE19-05.1b	4x MHK	59	> 12	> 288	nb
pHPNE19-05.1b	4x MHK	60	> 12	> 288	nb
pHPNE19-05.1b	4x MHK	61	> 12	> 288	nb
pHPNE19-05.1b	4x MHK	62	5	> 288	<i>aac(6')-lb-wt</i>
pHPNE19-05.1b	4x MHK	64	> 12	> 288	nb
pHPNE19-05.1b	4x MHK	67	> 12	> 288	nb
pHPNE19-05.1b	4x MHK	68	> 12	> 288	nb
pHPNE19-05.1b	4x MHK	70	> 12	> 288	nb
pHPNE19-05.1b	4x MHK	71	> 12	> 288	nb
pHPNE19-05.1b	4x MHK	72	> 12	> 288	nb
pHPNE19-05.1b	4x MHK	74	> 12	> 288	nb
pHPNE19-05.1b	4x MHK	75	> 12	> 288	nb
pHPNE19-05.1b	4x MHK	78	> 12	> 288	nb
pHPNE19-05.1b	4x MHK	81	> 12	> 288	nb
pHPNE19-05.1b	4x MHK	82	> 12	> 288	nb
pHPNE19-05.1b	4x MHK	88	> 12	> 288	nb

*RFLP = Restriktionsfragmentlängenanalyse

Unter allen getesteten Stämmen mit *aac(6')-lb-wt* sowie den Varianten *aac(6')-lb102* und *aac(6')-lb179* befand sich kein Stamm, der an den entscheidenden Positionen 102 und/oder 179 mutiert war.

Ergebnisse

Tabelle 3-26 zeigt die Ergebnisse der MHK-Untersuchung sowie der *E. coli* CSH116 64-8-33 pHPNE19-08 (*aac(6')*-ly) Stämme, die zur Retransformation ausgewählt wurden, da hier die Möglichkeit der Anwendung des RFLPs nicht bestand.

Tabelle 3-26 Ergebnis der Analyse der selektierten Stämme von *E. coli* CSH116 64-8-33 mit Plasmid pHPNE19-08.

Ausgangstamm <i>E. coli</i> CSH116 64-8-33	Konzentration der Selektion	Stamm	MHK (µg/ml) Norfloxacin	MHK (µg/ml) Kanamycin	AL* und Retransformation
pHPNE19-08	4x MHK	1	> 12	> 288	nein
pHPNE19-08	4x MHK	2	> 12	> 288	nein
pHPNE19-08	4x MHK	3	> 12	> 288	nein
pHPNE19-08	4x MHK	4	> 12	192	nein
pHPNE19-08	4x MHK	5	> 12	128	nein
pHPNE19-08	2x MHK	33	6	> 288	ja
pHPNE19-08	2x MHK	34	6	160	ja
pHPNE19-08	2x MHK	35	5	> 288	ja
pHPNE19-08	2x MHK	36	10	> 288	ja
pHPNE19-08	2x MHK	37	8	> 288	ja
pHPNE19-08	2x MHK	38	4	192	ja
pHPNE19-08	2x MHK	39	5	> 288	ja
pHPNE19-08	2x MHK	40	10	288	ja
pHPNE19-08	2x MHK	41	8	256	ja
pHPNE19-08	2x MHK	42	8	256	ja
pHPNE19-08	2x MHK	43	6	> 288	ja
pHPNE19-08	2x MHK	44	4	256	ja
pHPNE19-08	2x MHK	45	4	> 288	ja
pHPNE19-08	2x MHK	46	5	> 288	ja
pHPNE19-08	2x MHK	47	8	256	ja
pHPNE19-08	2x MHK	48	5	256	ja
pHPNE19-08	2x MHK	49	5	> 288	ja

* alkalische Lyse

Von den 17 ausgewählten Stämmen der Variante AAC(6')-ly wurde durch alkalische Lyse Plasmid isoliert und durch Retransformation in *E. coli* JM109 vereinzelt. Je Ausgangsplasmid wurde von zehn Transformanten (insgesamt 170 Stämme) erneut die Empfindlichkeit mittels Agardilution bestimmt.

Von den untersuchten 170 Stämmen mit den selektierten Plasmiden von *aac(6')*-Iy entsprach nur ein Stamm (*E. coli* JM109 pHPNE19-08 Nr. 41/4) den erwarteten Eigenschaften der cr-Variante. Abbildung 3-31 zeigt diesen Stamm auf einer Agarplatte mit 0,64 µg/ml Norfloxacin als Beispiel für die Methode der Agardilution.

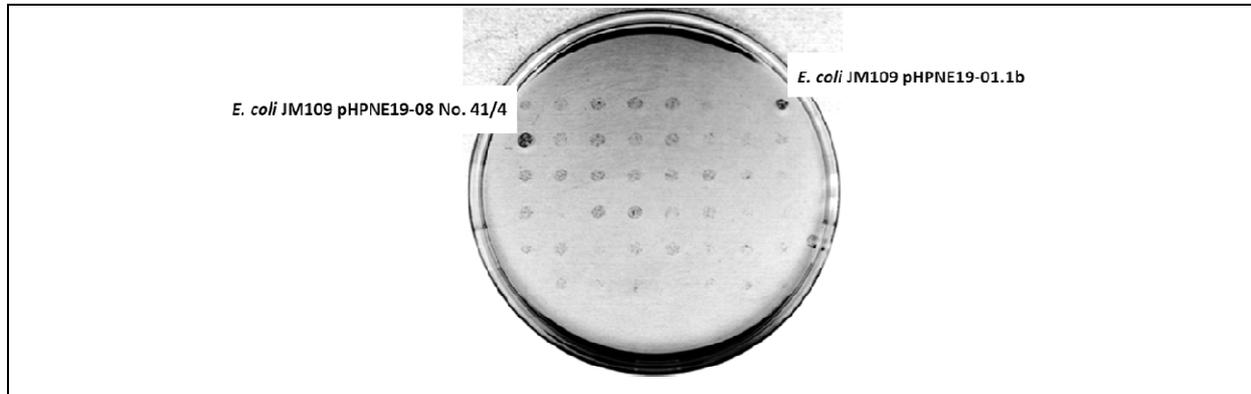


Abbildung 3-31 Darstellung der LB-Agarplatte mit einer Konzentration von 0,64 µg/ml Norfloxacin des Agardilutionstests mit Stamm *E. coli* JM109 pHPNE19-08 Nr. 41/4 und Stamm *E. coli* JM109 pHPNE19-01.1b als Referenzstamm.

Während alle anderen Stämme kein Wachstum mehr zeigten, war deutlich eine Kolonie bei *E. coli* JM109 pHPNE19-08 Nr. 41/4 und bei dem Referenzstamm *E. coli* JM109 pHPNE19-01.1b (*aac(6')*-Ib-cr) zu erkennen. Daher wurde *aac(6')*-Iy aus diesem Stamm durch Sequenzierung analysiert. Abbildung 3-32 zeigt einen Ausschnitt der Sequenzierung von *aac(6')*-Iy aus *E. coli* JM109 pHPNE19-08 Nr. 41/4.

Ergebnisse

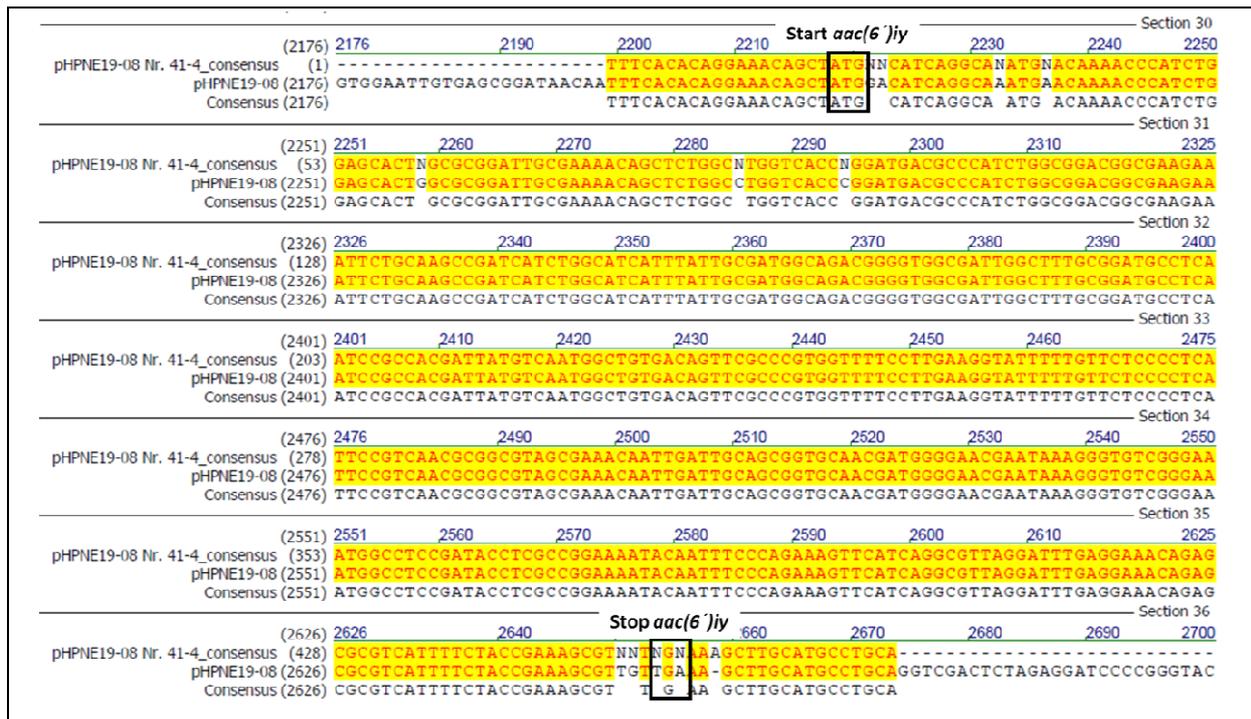


Abbildung 3-32 Darstellung der Sequenzierung von *aac(6')*-ly von *E. coli* JM109 pHPNE19-08 Nr. 41/4 im Vergleich mit der Sequenz des Ausgangsplasmid pHPNE19-08.

Die Chromatogramme der 11 Positionen „N“ der Sequenzanalyse von *aac(6')*-ly von *E. coli* JM109 pHPNE19-08 Nr. 41/4 (siehe Abbildung 3-32) sind in Abbildung 3-33 dargestellt.

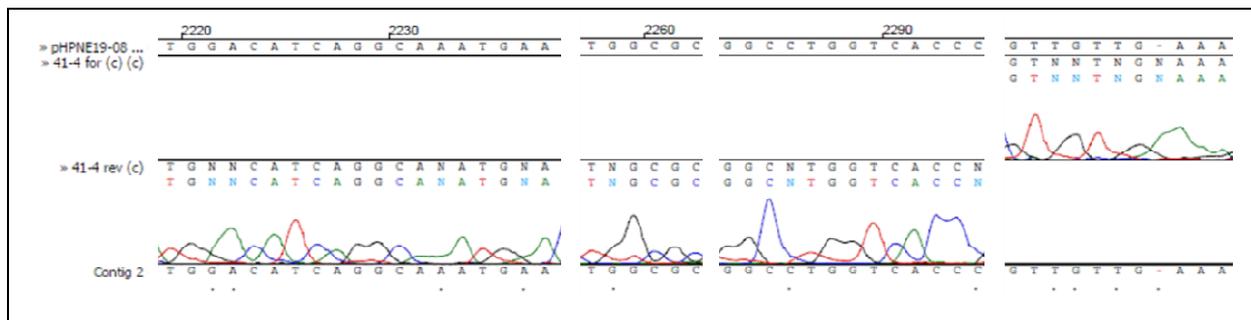


Abbildung 3-33 Dargestellt ist das Chromatogramm der 11 Positionen „N“ der Sequenzanalyse von *aac(6')*-ly von *E. coli* JM109 pHPNE19-08 Nr. 41/4 (siehe Abbildung 3-32).

Die Sequenzierung von *aac(6')*-ly von Stamm *E. coli* JM109 pHPNE19-08 Nr. 41/4 zeigte keine Veränderung im Vergleich zum Ausgangsstamm *E. coli* JM109 pHPNE19-08.

3.1.7.2.2 In vitro Selektion in Flüssigkultur

Selektiert wurden die Stämme *E. coli* CSH116 64-8-33 pHPNE19-05.1 (*aac(6')*-*lb*-wt), *E. coli* CSH116 64-8-33 pHPNE19-05.1a (*aac(6')*-*lb102*), *E. coli* CSH116 64-8-33 pHPNE19-05.1b (*aac(6')*-*lb179*) und *E. coli* CSH116 64-8-33 pHPNE19-08 (*aac(6')*-*ly*) über insgesamt 11 Tage,

hierbei wurden die Stämme zehnmal passagiert. Abbildung 3-34 zeigt grafisch den Verlauf der verwendeten Konzentration an Norfloxacin über den Zeitraum der Selektion.

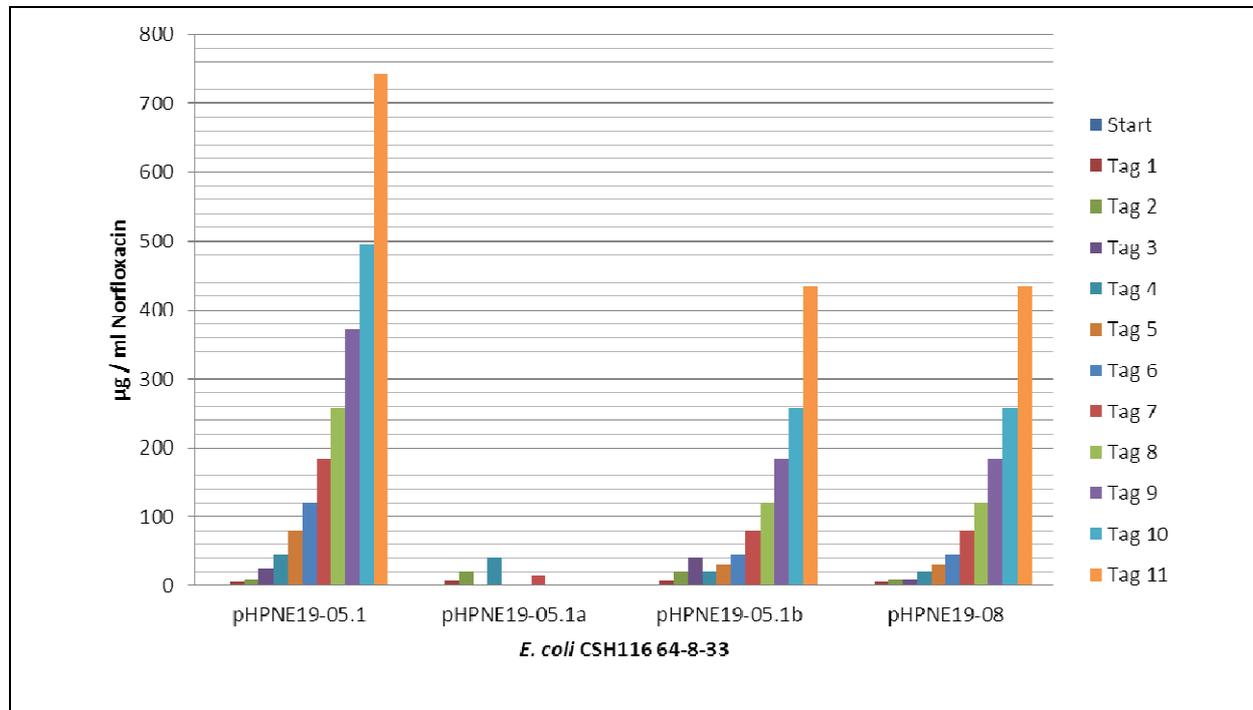


Abbildung 3-34 Grafische Darstellung des Anstiegs der verwendeten Konzentration an Norfloxacin über den Zeitraum der Selektion.

Bei jeder Passage wurde eine Probe der Bakteriensuspension auf eine LB-Agarplatte gestrichen, über Nacht inkubiert und ca. 12 Kolonien für weitere Analysen aufbewahrt. Die vereinzelt Kolonien wurden zunächst mittels PCR auf die Anwesenheit von *aac(6')-Ib* (Primer lacZ+3396rev und AAC6 +519 rev) bzw. *aac(6')-Iy* (Primer lacZ+3396rev und *aac(6)-Iy+438rev*) untersucht, anschließend wurden *aac(6')-Ib*-positive durch RFLP mit den Restriktionsenzymen *NdeI* und *FokI* (2.2.2.12) und ARMS-PCR (2.2.2.8.6) überprüft. Von den *aac(6')-Iy*-positiven Stämmen wurde Plasmid isoliert (2.2.2.2), durch Transformation in *E. coli* JM109 vereinzelt und mittels MHK-Bestimmung (Mikrodilution) analysiert.

Folgende Grafiken (Abbildung 3-35 A-C) der Stämme CSH116 64-8-33 mit den Plasmiden pHPNE19-05.1, pHPNE19-05.1a und pHPNE19-05.1b zeigen jeweils die Anzahl der insgesamt gesicherten Stämme (rot) sowie die Anzahl derer, die AAC-positiv getestet wurden (blau).

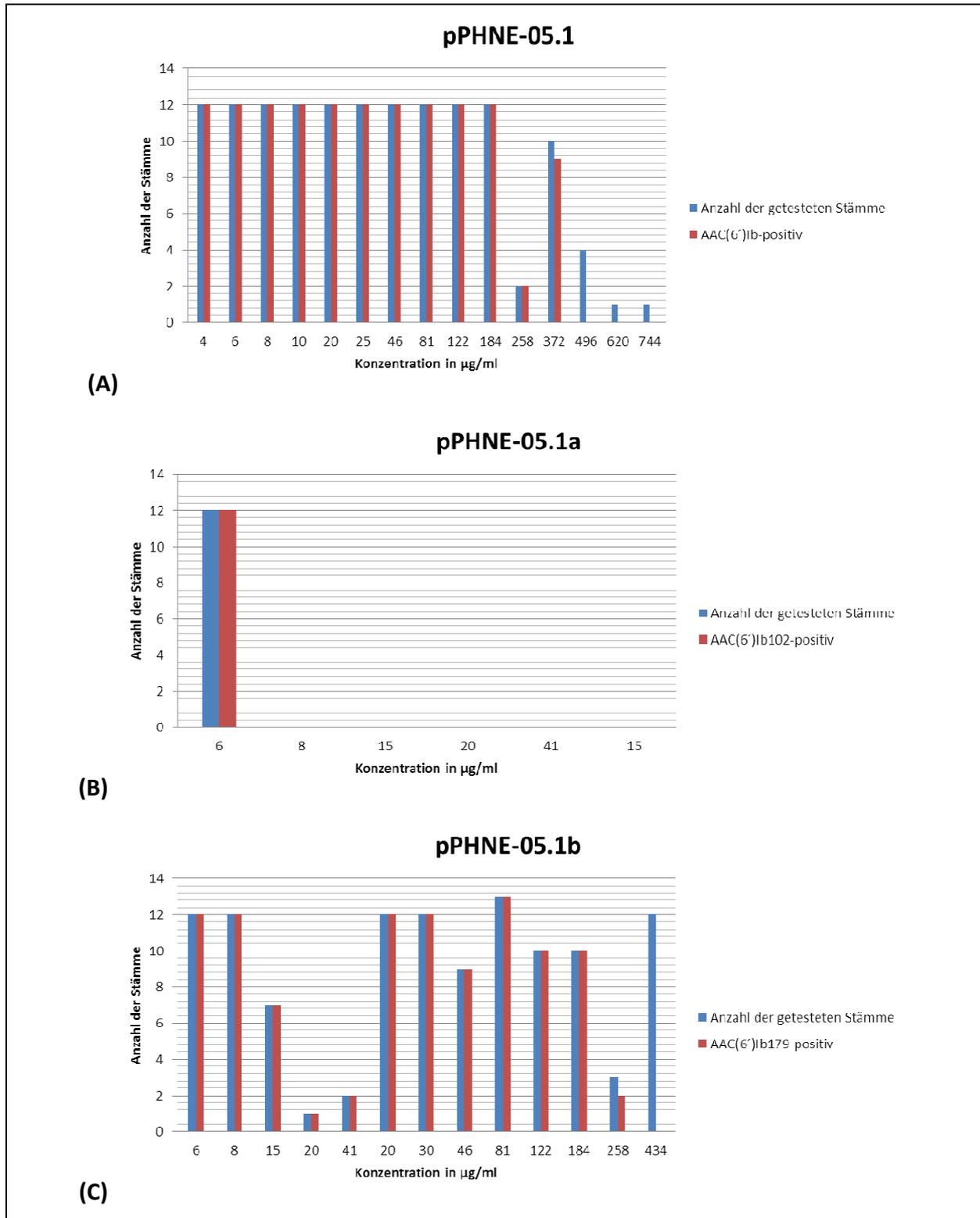


Abbildung 3-35 Grafiken (A) bis (C) zeigen die Anzahl der insgesamt gesicherten Stämme *E. coli* CSH116 64-8-33 (blau), sowie die Anzahl derer, die AAC-positiv getestet wurden (rot). (A) Plasmid pPHNE19-05.1, (B) pPHNE19-05.1a, sowie (C) pPHNE19-05.1b.

Von Stamm *E. coli* CSH116 64-8-33 mit Plasmid pPHNE19-05.1 wurden insgesamt 138 selektierte Varianten untersucht, 131 wurden *aac(6')-Ib*-positiv getestet. Von *E. coli* CSH116

64-8-33 mit Plasmid pHPNE19-05.1b wurden insgesamt 115 selektierte Varianten untersucht, 102 wurden *aac(6')-Ib179*-positiv getestet. Von Stamm *E. coli* CSH116 64-8-33 mit Plasmid pHPNE19-05.1a konnten insgesamt nur 12 Varianten gesichert werden. Diese 12 Varianten wurden *aac(6')-Ib102*-positiv getestet. In allen untersuchten selektierten Stämmen *E. coli* CSH116 64-8-33 mit Plasmid pHPNE19-05.1, pHPNE19-05.1a und pHPNE19-05.1b wurde keine Veränderung an den Positionen 102 bzw. 179 gefunden. Zwei Stämme der Selektion von *E. coli* CSH116 64-8-33 mit Plasmid pHPNE19-05.1 vielen jedoch auf. Die Stämme *E. coli* CSH116 64-8-33 pHPNE19-05.1 sel 620 bzw. *E. coli* CSH116 64-8-33 pHPNE19-05.1 sel 744 wurden mit einer Konzentration von 620 µg/ml bzw. 744 µg/ml Norfloxacin mit jeweils 50 µg/ml Ampicillin selektiert und wuchsen auf Ampicillin, obwohl sie durch PCR negativ auf die Anwesenheit von *aac(6')-Ib* getestet wurden. Aufgrund dieser Tatsachen wurden diese Stämme in Abschnitt 3.1.7.2.2.1 näher untersucht.

Auch die gesicherten, selektierten Varianten von *aac(6')-Iy* (Plasmid pHPNE19-08) wurden auf die Anwesenheit von *aac(6')-Iy* kontrolliert. Folgende Grafik in Abbildung 3-36 zeigt die Anzahl der gesicherten Varianten (blau), die Konzentration bei der sie gesichert wurden, und die Anzahl der Stämme in denen *aac(6')-Iy* vorhanden war (rot).

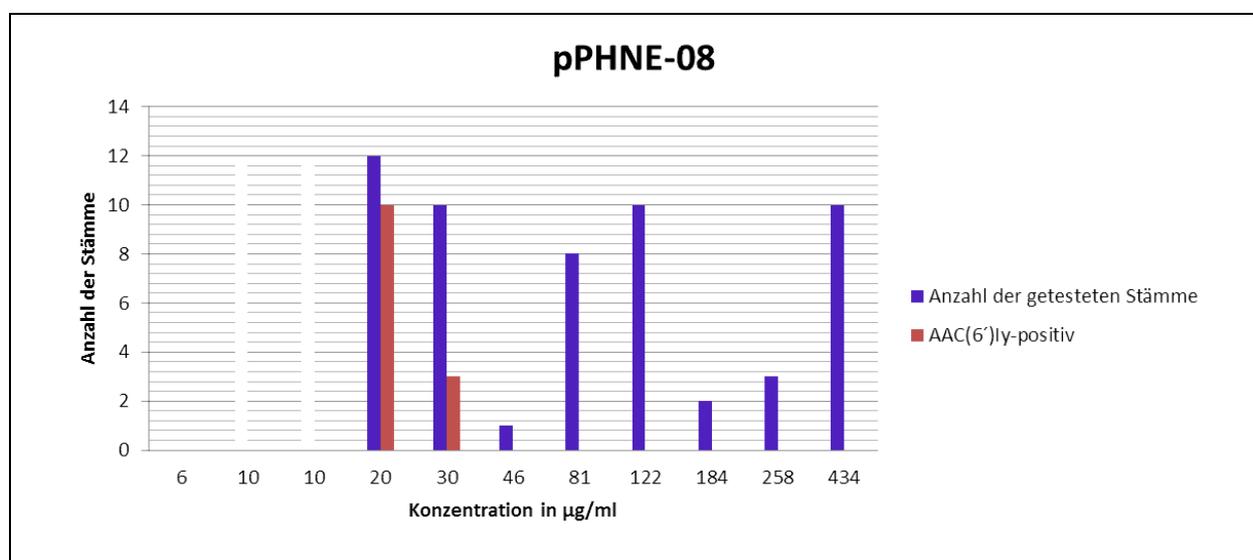


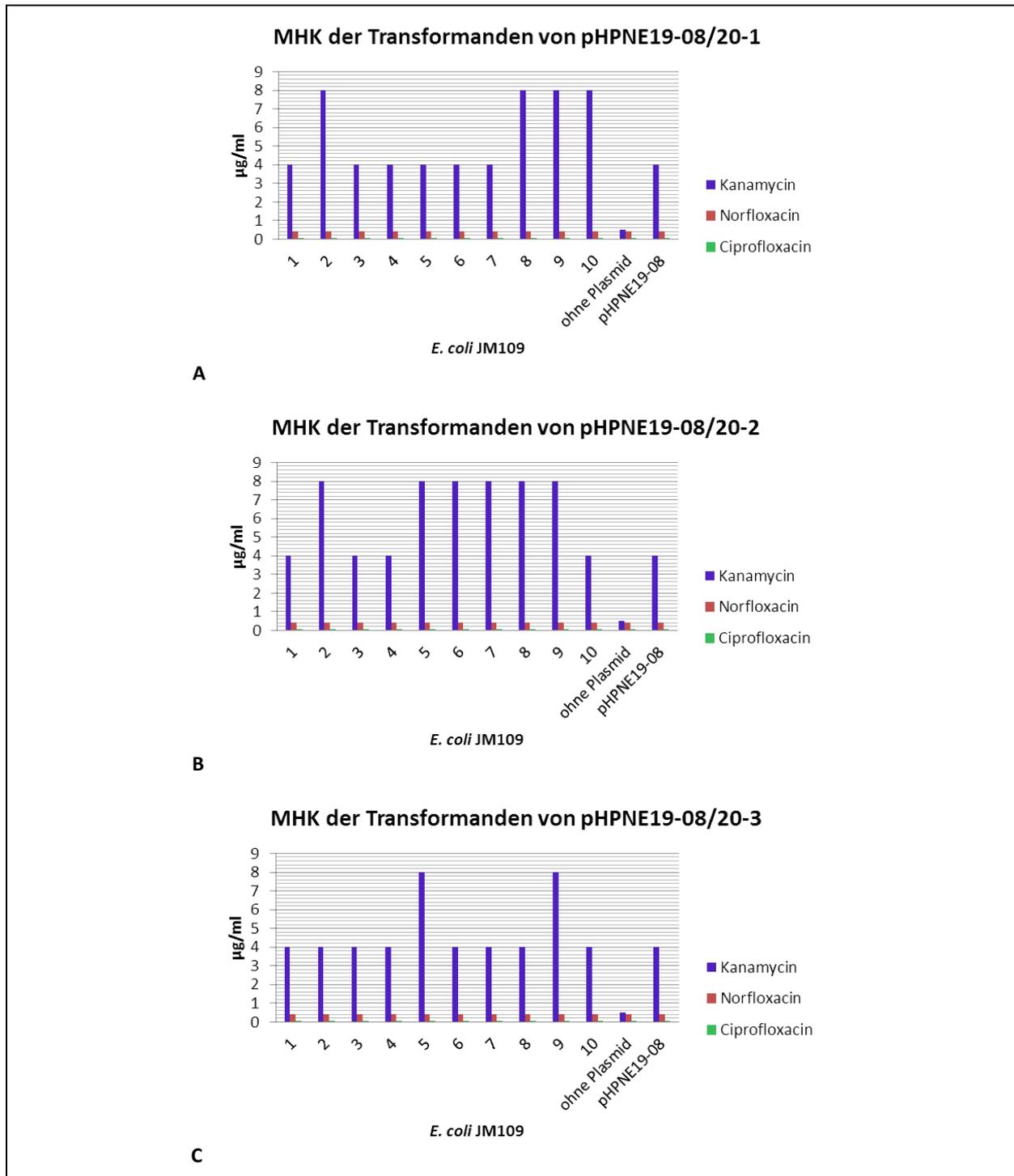
Abbildung 3-36 Grafik zeigt die Anzahl der insgesamt gesicherten Stämme *E. coli* CSH116 64-8-33 sowie die Anzahl derer, die AAC-positiv getestet wurden. weiße Balken: nicht getestet.

Von 10 Stämmen *E. coli* CSH116 64-8-33 mit Plasmid pHPNE19-08, die mit einer Konzentration von 20 mg/ml selektiert wurden (pHPNE19-08/20-1, -20-2, -20-3, -20-5, -20-6, -20-7, -20-8, -20-9, -20-11, -20-12), und von 3 Stämmen, die mit einer Konzentration von 30

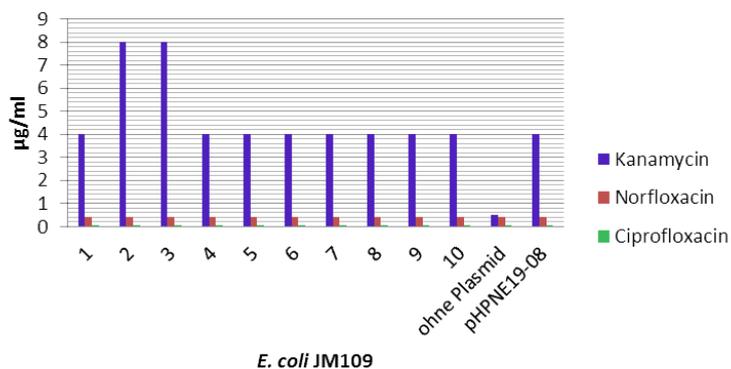
Ergebnisse

$\mu\text{g/ml}$ selektiert wurden (pHPNE19-08/30-5, -30-7, -30-8), wurde Plasmid isoliert, in *E. coli* JM109 retransformiert und jeweils zehn Retransformanten (insgesamt 130 Retransformanten) durch Bestimmung der MHK analysiert.

Die Ergebnisse der MHK-Bestimmung sind in den folgenden Grafiken, in Abbildung 3-37 bis Abbildung 3-39 dargestellt.

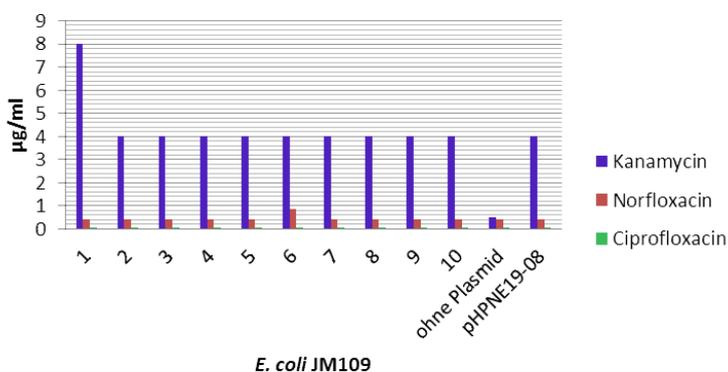


MHK der Transformanden von pHPNE19-08/20-7



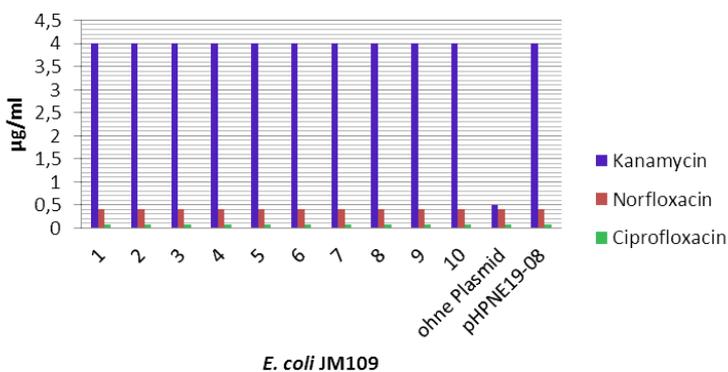
D

MHK der Transformanden von pHPNE19-08/20-8



E

MHK der Transformanden von pHPNE19-08/20-9



F

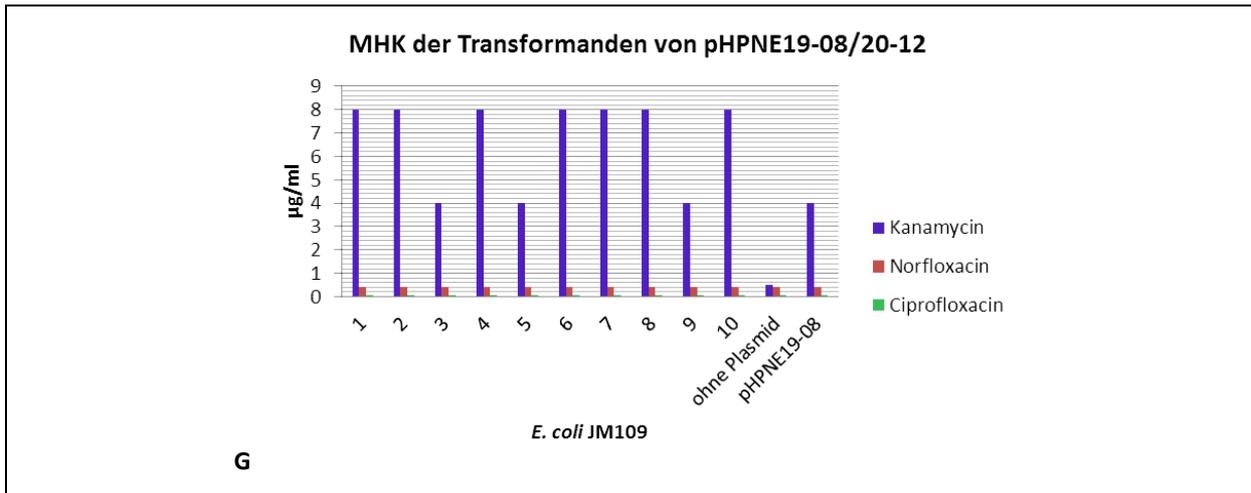
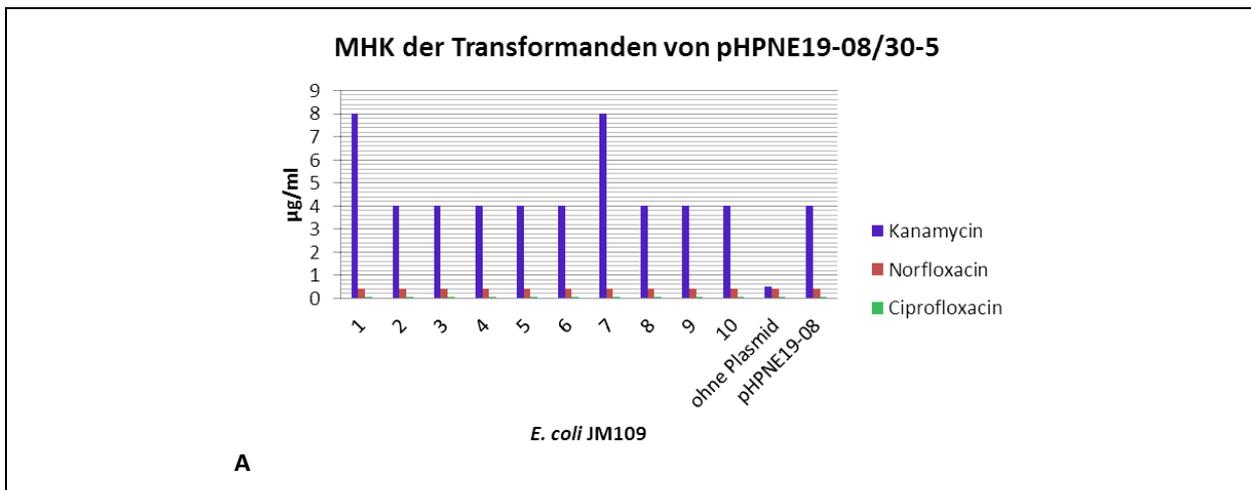


Abbildung 3-37 Grafische Darstellung der MHK-Werte für die jeweils zehn Transformanden Nr. 1 bis 10 von (A) *E. coli* JM109 mit Plasmid pHPNE19-08/20-1, (B) *E. coli* JM109 mit Plasmid pHPNE19-08/20-2, (C) *E. coli* JM109 mit Plasmid pHPNE19-08/20-3, (D) *E. coli* JM109 mit Plasmid pHPNE19-08/20-7, (E) *E. coli* JM109 mit Plasmid pHPNE19-08/20-8, (F) *E. coli* JM109 mit Plasmid pHPNE19-08/20-9 und (G) *E. coli* JM109 mit Plasmid pHPNE19-08/20-12.

Die jeweils zehn kontrollierten Transformanden von *E. coli* JM109 mit den Plasmiden pHPNE19-08/20-1, pHPNE19-08/20-2, pHPNE19-08/20-3, pHPNE19-08/20-7, pHPNE19-08/20-8, pHPNE19-08/20-9 bzw. pHPNE19-08/20-12 zeigten einen MHK-Wert von 4-8 µg/ml von Kanamycin, vergleichbar (± eine Verdünnungsstufe) mit der Positivkontrolle *E. coli* JM109 pHPNE19-08 und erhöht im Vergleich zur Negativkontrolle *E. coli* JM109 ohne Plasmid. Die Werte für Norfloxacin und Ciprofloxacin änderten sich, im Vergleich mit den Kontrollen, nicht.



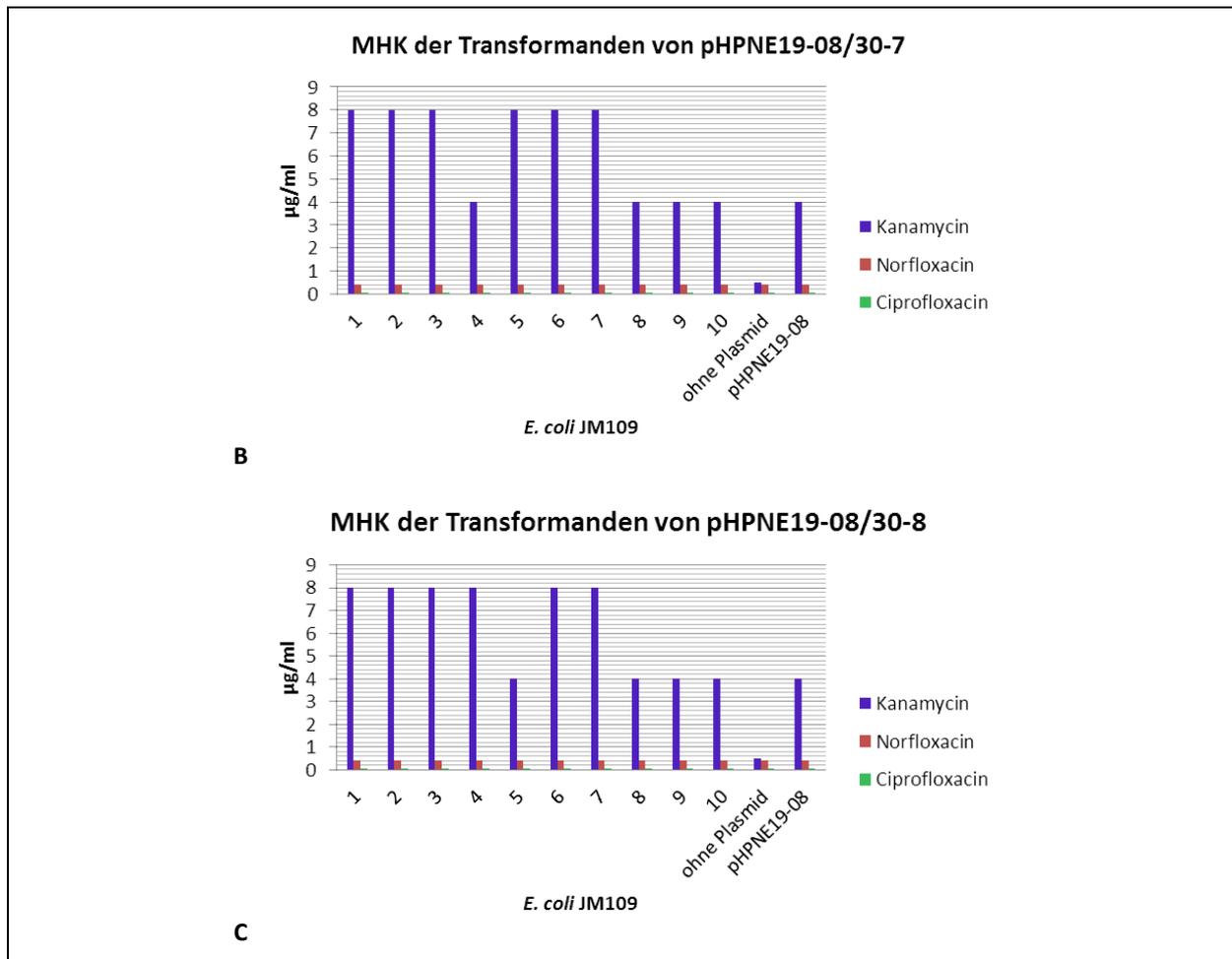


Abbildung 3-38 Grafische Darstellung der MHK-Werte für die jeweils zehn Transformanden Nr. 1 bis 10 von (A) *E. coli* JM109 mit Plasmid pHPNE19-08/30-5, (B) *E. coli* JM109 mit Plasmid pHPNE19-08/30-7, (C) *E. coli* JM109 mit Plasmid pHPNE19-08/30-8.

Auch die jeweils zehn kontrollierten Transformanden von *E. coli* JM109 mit den Plasmiden pHPNE19-08/30-5, pHPNE19-08/30-7 und pHPNE19-08/30-8 zeigten einen Kanamycin-MHK-Wert von 4-8 µg/ml, während die Werte von Norfloxacin und Ciprofloxacin sich, im Vergleich mit den Kontrollen, nicht änderten.

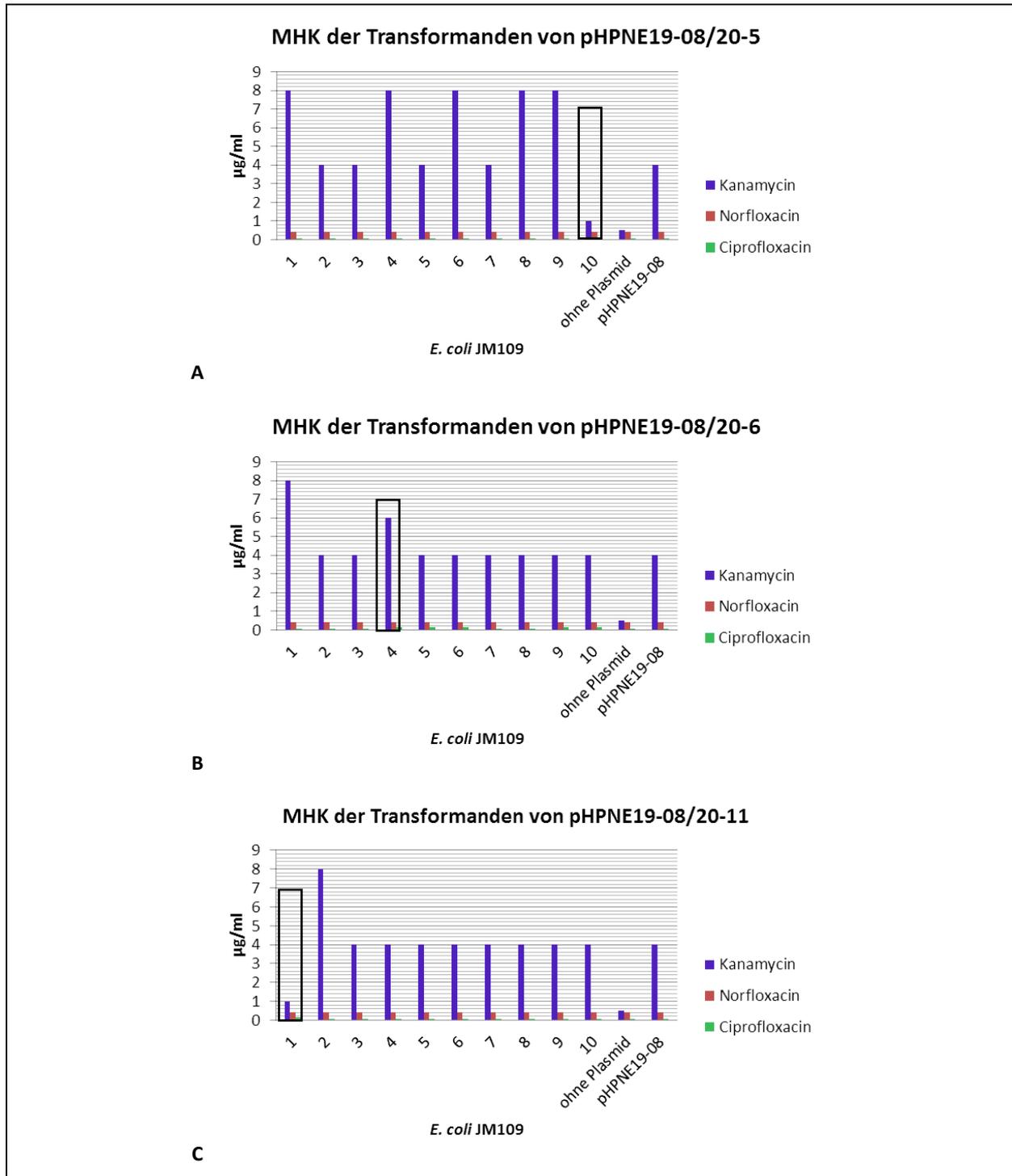


Abbildung 3-39 Grafische Darstellung der MHK-Werte für die jeweils zehn Transformanden Nr. 1 bis 10 von (A) *E. coli* JM109 mit Plasmid pHPNE19-08/20-5, (B) *E. coli* JM109 mit Plasmid pHPNE19-08/20-6 und (C) *E. coli* JM109 mit Plasmid pHPNE19-08/20-11. Die mit einem schwarzen Rechteck markierten Stämme wurden sequenziert.

Jeweils neun der zehn Transformanden von *E. coli* JM109 mit den Plasmiden pHPNE19-08/20-5, pHPNE19-08/20-6 und pHPNE19-08/20-11 zeigten einen MHK-Wert von 4-8 µg/ml

von Kanamycin, während die Werte von Norfloxacin und Ciprofloxacin sich, im Vergleich mit den Kontrollen, nicht änderten.

Aac(6')-Iy von den mit einem schwarzen Rechteck markierten Stämmen in Abbildung 3-39 (*E. coli* JM109 pHPNE19-08/20-5-10, pHPNE19-08/20-6-4 und pHPNE19-08/20-11-1), deren MHK-Werte auch in einer zweiten MHK-Bestimmung abwichen, wurden sequenziert. Das Ergebnis der Sequenzierung ist in Abbildung 3-40 dargestellt.

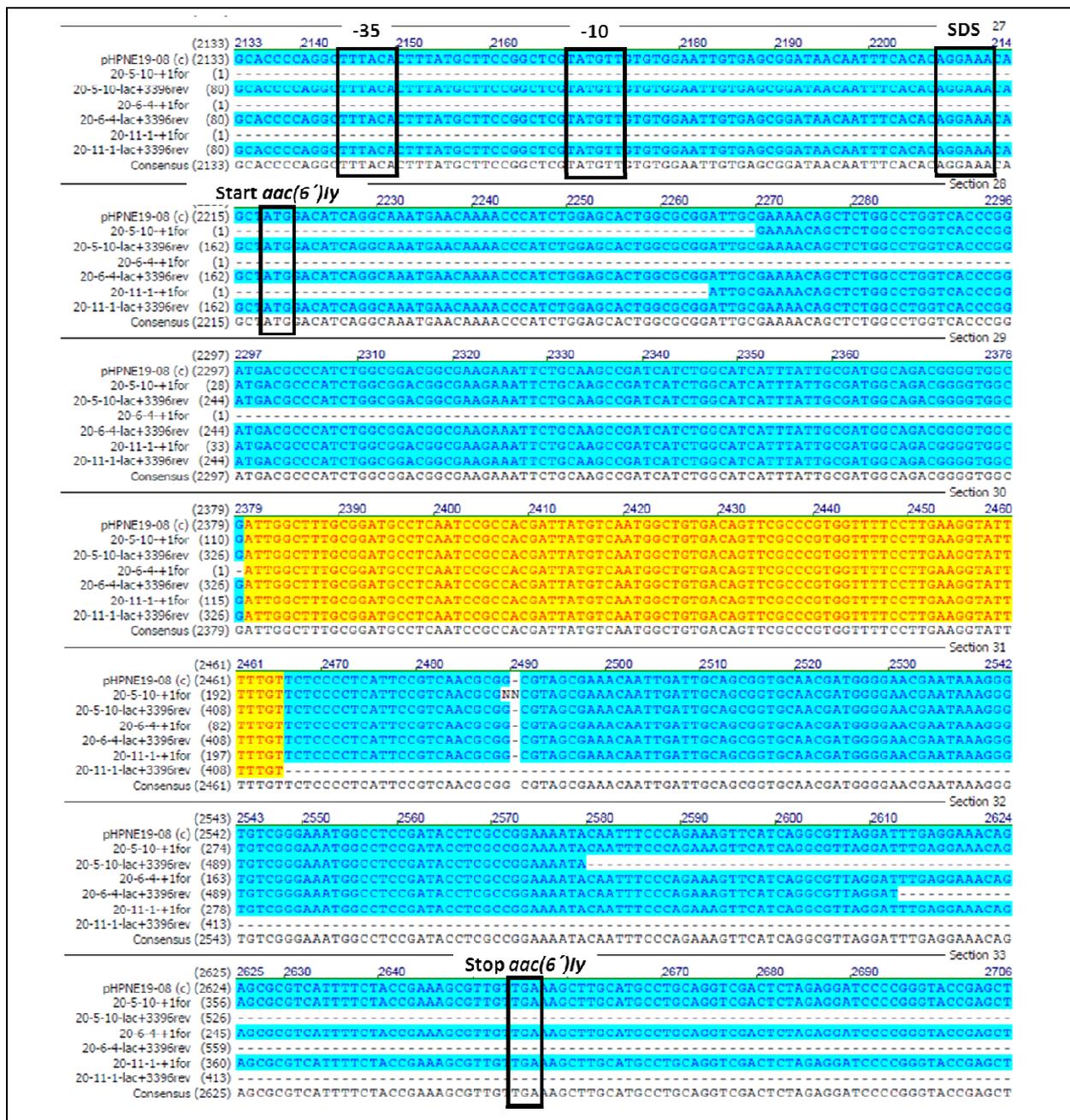


Abbildung 3-40 Darstellung der Sequenzierung von *aac(6')-Iy* der Stämme *E. coli* JM109 mit Plasmid pHPNE19-08/20-5-10, pHPNE19-08/20-6-4 und pHPNE19-08/20-11-1.

Ergebnisse

Folgende Abbildung 3-41 zeigt das Chromatogramm der unklaren Position NN der Sequenzierung von Stamm *E. coli* JM109 mit Plasmid pHPNE19-08/20-5-10.

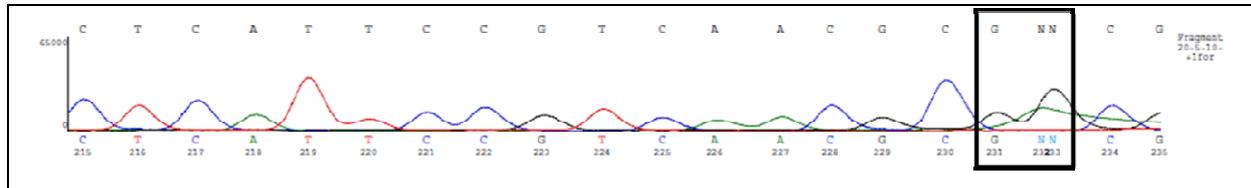


Abbildung 3-41 Darstellung des Chromatogramms der unklaren Position NN der Sequenzierung von Stamm *E. coli* JM109 mit Plasmid pHPNE19-08/20-5-10.

Die Sequenzierten Stämme *E. coli* JM109 mit Plasmid pHPNE19-08/20-5-10, pHPNE19-08/20-6-4 und pHPNE19-08/20-11-1 zeigten keinen Unterschied zum Ausgangsplasmid pHPNE19-08.

3.1.7.2.2.1 Untersuchung der Varianten *E. coli* CSH116 64-8-33 pHPNE19-05.1 sel 620 und pHPNE19-05.1 sel 744

Die Varianten von *E. coli* CSH116 64-8-33 mit Plasmid pHPNE19-05.1, die mit einer Konzentration von 620 µg/ml (bezeichnet als *E. coli* CSH116 64-8-33 pHPNE19-05.1 sel 620) bzw. 744 µg/ml (bezeichnet als *E. coli* CSH116 64-8-33 pHPNE19-05.1 sel 744) Norfloxacin und in Anwesenheit einer Konzentration von 50 µg/ml Ampicillin (um den Verlust des Plasmids pHPNE19-05.1 vorzubeugen) selektiert wurden, sollten aufgrund des Wachstums bei den sehr hohen Konzentrationen von Norfloxacin durch Sequenzierung der chromosomalen Gene *marR*, *acrR*, *gyrA* und *parC* näher untersucht werden. Die Stämme wurden bereits mittels PCR negativ auf *aac(6')-Ib* getestet, wodurch vermutet wurde, dass das Plasmid pHPNE19-05.1, welches eine Kopie des *bla*-Gens besitzt und dadurch die Ampicillin-Resistenz vermittelte, während der Selektion verloren gegangen sein könnte.

Zunächst wurden jedoch die MHK-Werte von Norfloxacin und Kanamycin für die Stämme *E. coli* CSH116 64-8-33 pHPNE19-05.1 sel 620 und *E. coli* CSH116 64-8-33 pHPNE19-05.1 sel 744 bestimmt. Die Ergebnisse der MHK-Bestimmung von Norfloxacin und Ampicillin sind in Tabelle 3-27 zusammengefasst.

Tabelle 3-27 Ergebnis der MHK-Bestimmung in µg/ml von Norfloxacin und Kanamycin für die zu selektierenden Stämme mit Referenzstämmen.

Stamm	Norfloxacin	Ampicillin
<i>E. coli</i> CSH116 64-8-33	1 (0,625)	7,8
<i>E. coli</i> CSH116 64-8-33 (pHPNE19-05.1) sel 620	640	125
<i>E. coli</i> CSH116 64-8-33 (pHPNE19-05.1) sel 744	1280	62,5

Der MHK-Wert von Norfloxacin stieg für *E. coli* CSH116 64-8-33 (pHPNE19-05.1) sel 620 um 10 Verdünnungsstufen, für *E. coli* CSH116 64-8-33 (pHPNE19-05.1) sel 744 um 11 Verdünnungsstufen, im Vergleich zu *E. coli* CSH116 64-8-33, an, die Ampicillin-MHK-Werte stiegen für die Stämme um vier bzw. drei Verdünnungsstufen an.

Neben der Bestimmung der MHK wurde außerdem die Sequenzierung der Gene *marR*, *acrR*, *gyrA* und *parC* vorgenommen. Die Ergebnisse der Sequenzierung sind in Abbildung 3-42 bis Abbildung 3-45 gezeigt.

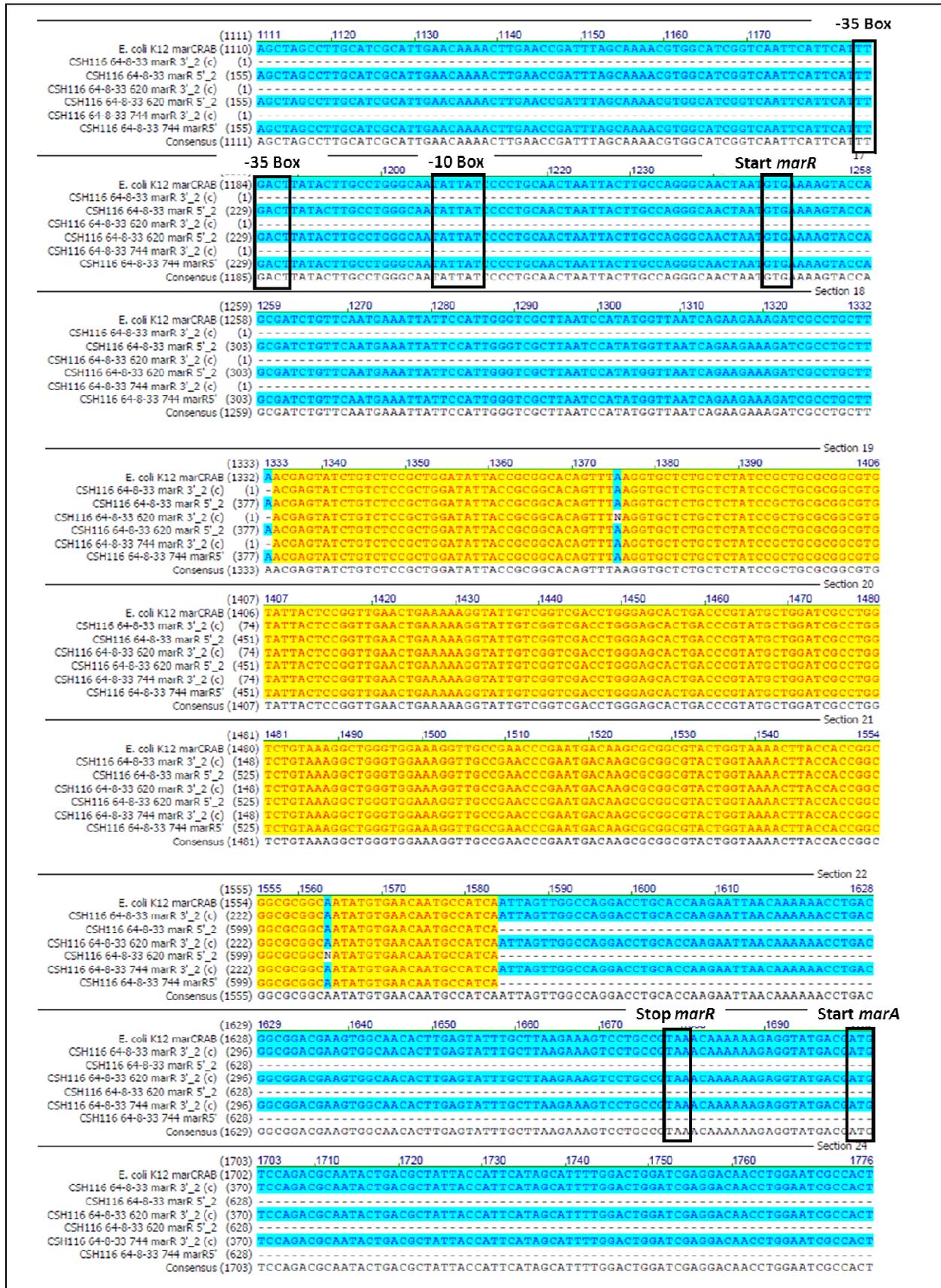


Abbildung 3-42 Darstellung eines Ausschnitts der Sequenzierung von *marR* von *E. coli* CSH116 64-8-33 (pHPNE19-05.1) sel 620 und sel 744 im Vergleich mit *E. coli* CSH116 64-8-33 und *E. coli* K12, Accession Nr. NC 000913.

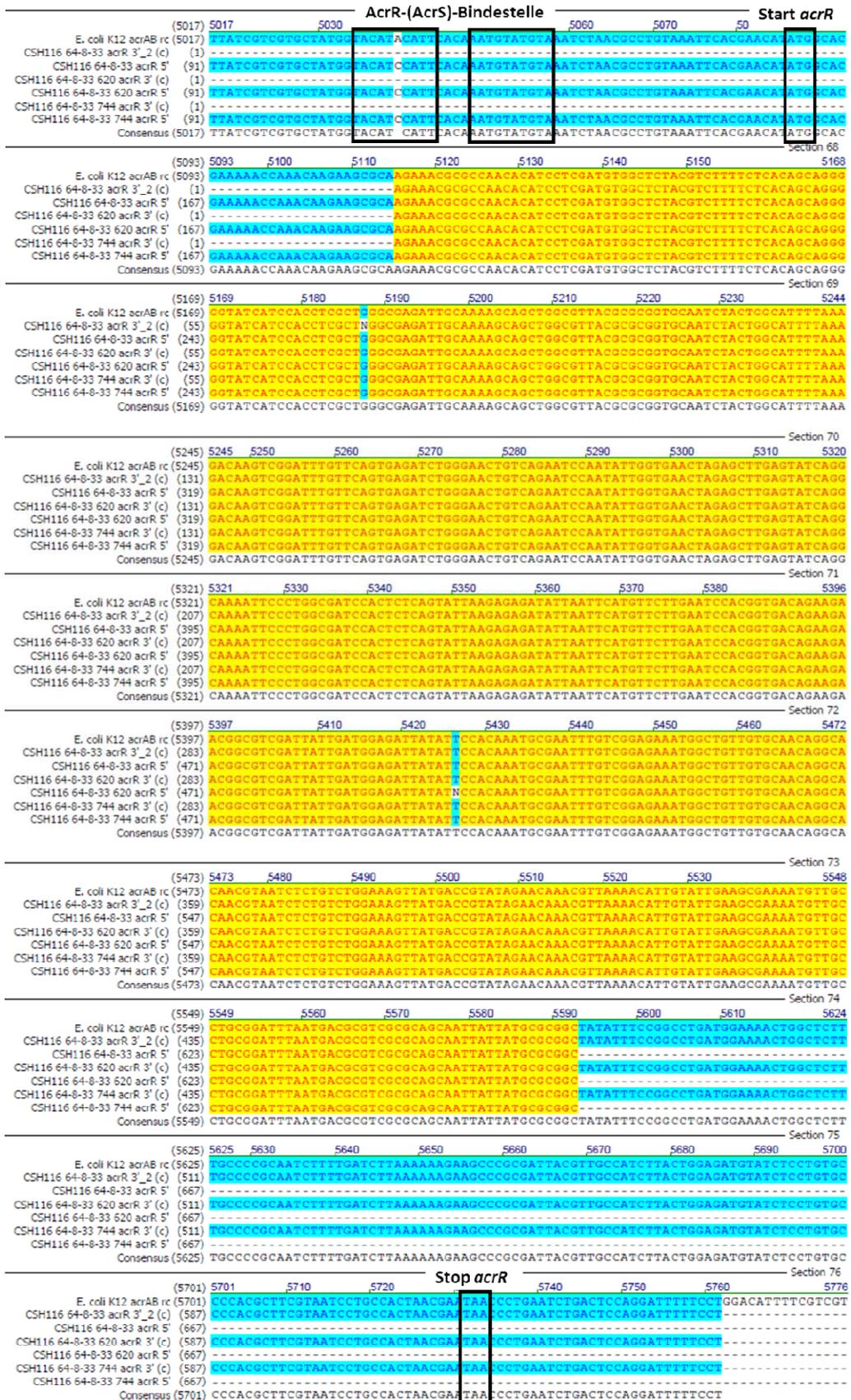


Abbildung 3-43 Darstellung eines Ausschnitts der Sequenzierung von *acrR* von *E. coli* CSH116 64-8-33 (pHPNE19-05.1) sel 620 und sel 744 im Vergleich mit *E. coli* CSH116 64-8-33 und *E. coli* K12, Accession Nr. U 00734.

Ergebnisse

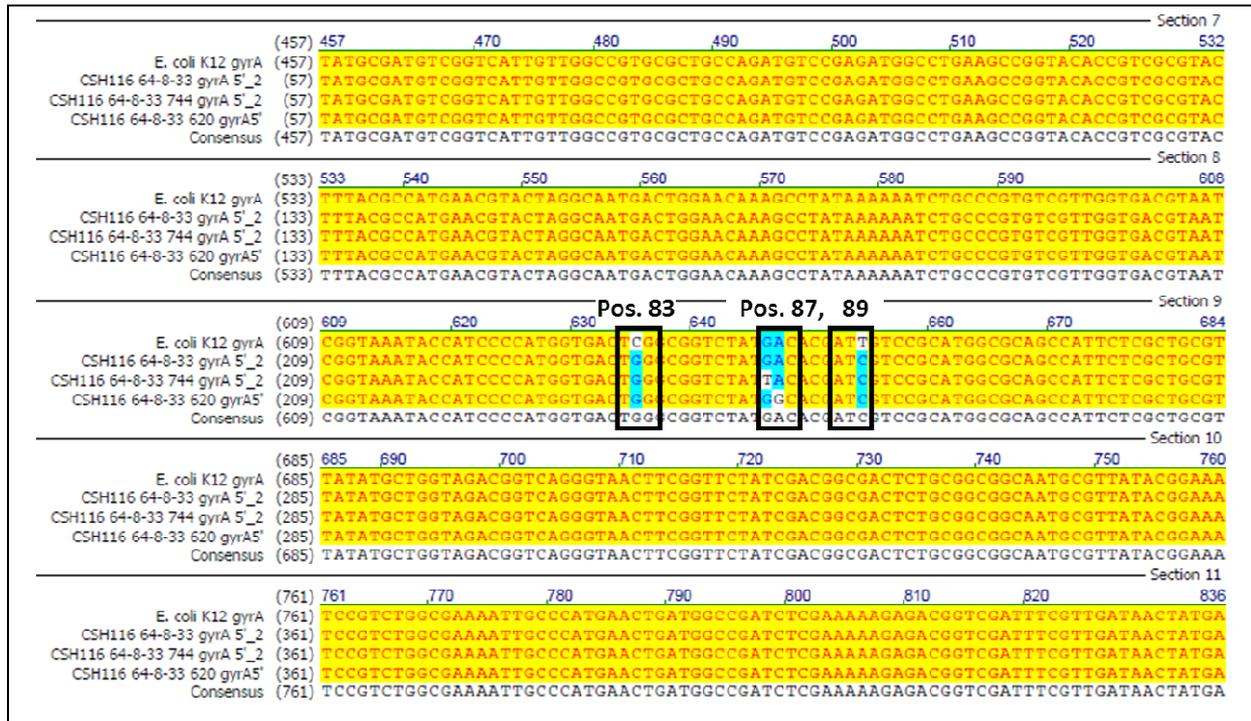


Abbildung 3-44 Darstellung eines Ausschnitts der Sequenzierung von *gyrA* von *E. coli* CSH116 64-8-33 (pHPNE19-05.1) sel 620 und sel 744, mit Markierung der Aminosäurepositionen 83, 87, 89 im Vergleich mit *E. coli* CSH116 64-8-33 und *E. coli* K12, Accession Nr. X 06373.

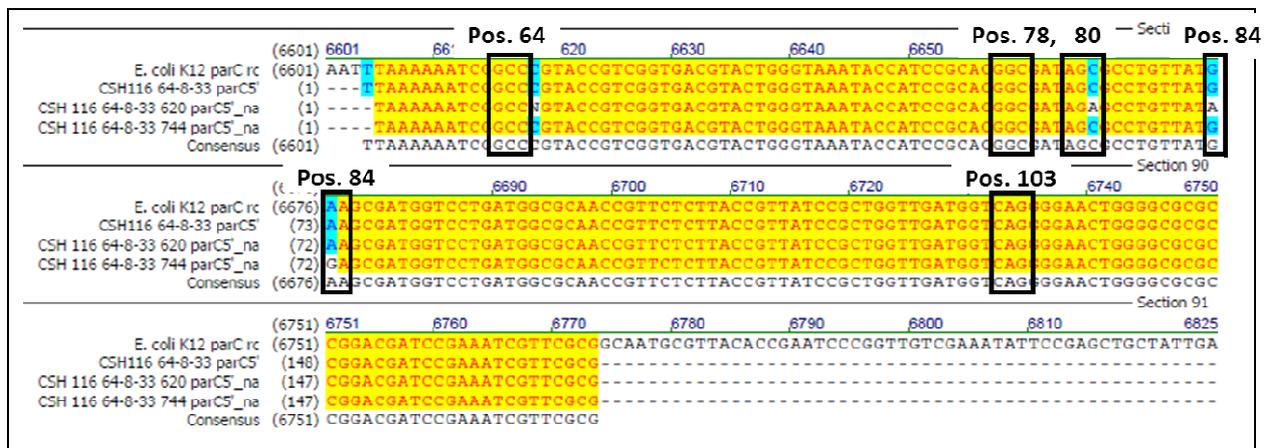


Abbildung 3-45 Darstellung eines Ausschnitts der Sequenzierung von *parC* von *E. coli* CSH116 64-8-33 (pHPNE19-05.1) sel 620 und sel 744 im Vergleich mit *E. coli* CSH116 64-8-33 und *E. coli* K12, Accession Nr. AE 000384.

Folgende Abbildung 3-46 zeigt die unklare Base N der Sequenzierung von *parC* (siehe Abbildung 3-45) im Chromatogramm.

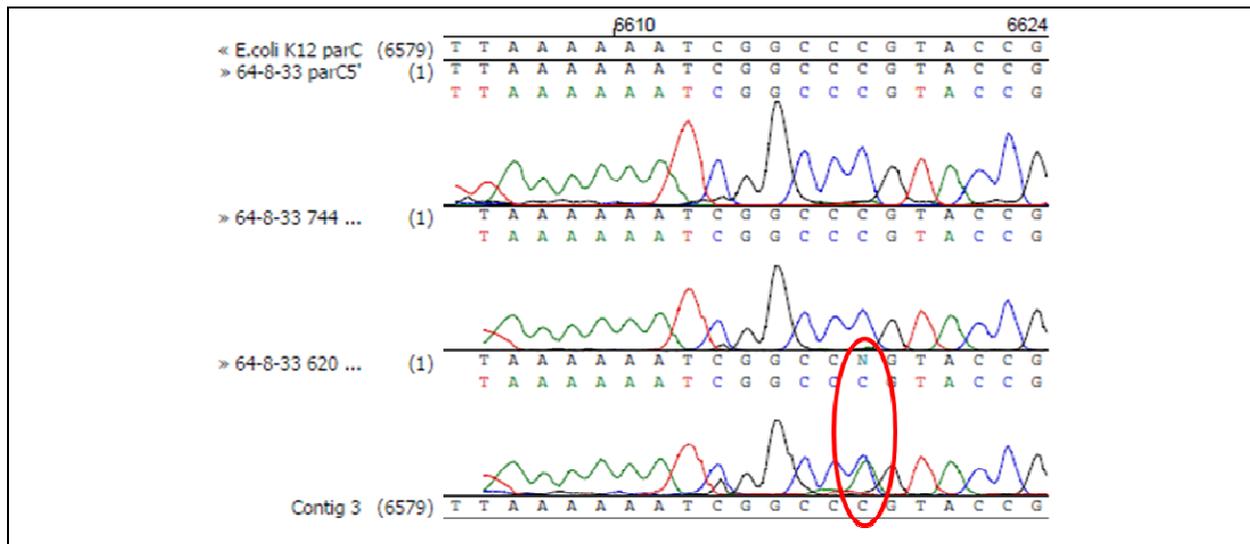


Abbildung 3-46 Darstellung des Ausschnitts des Chromatogramms der Sequenzierung von *parC* von *E. coli* CSH116 64-8-33 (pHPNE19-05.1) sel 620 und sel 744 im Vergleich mit *E. coli* CSH116 64-8-33 und *E. coli* K12.

Im sequenzierten Bereich von *marC* bis *marA* konnte keine Veränderung festgestellt werden. Im sequenzierten Bereich von *acrR* wurde ebenfalls keine neue Veränderung festgestellt. Die Sequenzierung von *gyrA* erbrachte folgendes Ergebnis: In Codon 83 befand sich die bereits beschriebene Mutation von Serin zu Tryptophan. Bei Stamm *E. coli* CSH116 64-8-33 pHPNE19-05.1 sel 744 befand sich in Codon 87 ein Austausch von Asparaginsäure (GAC) zu Tyrosin (TAC) und bei *E. coli* CSH116 64-8-33 pHPNE19-05.1 sel 620 ein Austausch zu Glycin (GGC). In Codon 89 befand sich lediglich die bereits beschriebene stille Mutation von ATT zu ATC (beides Isoleucin). Die Sequenzierung von *parC* lieferte folgendes Ergebnis: In den untersuchten Stämmen befand sich in den Codons 64, 78 und 103 keine Veränderung. Bei Stamm *E. coli* CSH116 64-8-33 pHPNE19-05.1 sel 744 befand sich in Codon 84 ein Austausch von Glutaminsäure (GAA) zu Glycin (GGA) und bei *E. coli* CSH116 64-8-33 pHPNE19-05.1 sel 620 ein Austausch zu Lysin (AAA). In Codon 80 befand sich lediglich bei Stamm *E. coli* CSH116 64-8-33 pHPNE19-05.1 sel 620 ein Austausch von Serin (54) zu Arginin (AGA). Folgende Übersicht zeigt eine Zusammenfassung der Mutationen in *gyrA* und *parC* der Stämme *E. coli* CSH116 64-8-33 pHPNE19-05.1 sel 620 und sel 744 im Vergleich mit *E. coli* CSH116 64-8-33.

Ergebnisse

Tabelle 3-28 Tabellarische Zusammenfassung der Ergebnisse der Sequenzierung von *E. coli* CSH116 64-8-33 pHPNE19-05.1 sel 620 und sel 744 im Vergleich mit den Ausgangsstämmen *E. coli* CSH116, *E. coli* CSH116 64-8 und *E. coli* CSH116 64-8-33.

Stamm	<i>gyrA83</i>	<i>gyrA87</i>	<i>gyrA89</i>	<i>parC64</i>	<i>parC78</i>	<i>parC80</i>	<i>parC84</i>	<i>parC103</i>
<i>E. coli</i> CSH116	TCG Ser	GAC Asp	ATC Ile	nb	nb	nb	nb	nb
<i>E. coli</i> CSH116 64-8	TGG Trp	GAC Asp	ATC Ile	nb	nb	nb	nb	nb
<i>E. coli</i> CSH116 64-8-33	TGG Trp	GAC Asp	ATC Ile	GCC Ala	GGC Gly	AGC Ser	GAA Glu	CAG Glu
<i>E. coli</i> CSH116 64-8-33 pHPNE19-05.1 sel 620	TGG Trp	GGC Gly	ATC Ile	GCC Ala	GGC Gly	AGA Arg	AAA Lys	CAG Glu
<i>E. coli</i> CSH116 64-8-33 pHPNE19-05.1 sel 744	TGG Trp	TAC Tyr	ATC Ile	GCC Ala	GGC Gly	AGC Ser	GGA Gly	CAG Glu

3.1.7.3 Zusammenfassung der Ergebnisse von Abschnitt 3.1.7

- * *E. coli* CSH116 64-8 besitzt eine *gyrA83W* Mutation (erster Selektionsschritt).
- * *E. coli* CSH116 64-8-33 besitzt einen Basenaustausch von A→C in der Bindestelle von AcrR-(AcrS) (zweiter Selektionsschritt).
- * Stamm *E. coli* JM109 pPHB331.1, der den beschriebenen Basenaustausch im Bereich der palindromischen Bindestelle für AcrR-(AcrS) besitzt, zeigte eine zu 79,9 % höhere Promotoraktivität P_{acrAB} im Vergleich zu *E. coli* JM109 pPHB331.
- * Unter den selektierten, gesicherten Stämmen von *E. coli* CSH116 64-8-33 pHPNE19-05.1 (*aac(6')-Ib-wt*), *E. coli* CSH116 64-8-33 pHPNE19-05.1a (*aac(6')-Ib102*) und *E. coli* CSH116 64-8-33 pHPNE19-05.1b (*aac(6')-Ib179*) befand sich kein Stamm, der an den entscheidenden Positionen 102 und/oder 179 verändert war.
- * Unter den selektierten, gesicherten und retransformierten Stämmen von *E. coli* CSH116 64-8-33 pHPNE19-08 (*aac(6')-Iy*) besaß kein Stamm eine Veränderung in *aac(6')-Iy*.
- * Im selektierten Stamm *E. coli* CSH116 64-8-33 pHPNE19-05.1 sel 744 ereignete sich eine zusätzliche *gyrAD87Y* und eine *parCE84G* Mutation.

* In selektierten Stamm *E. coli* CSH116 64-8-33 pHPNE19-05.1 sel 620 ereignete sich eine zusätzliche *gyrAD87G* Mutation, sowie eine *parCS80R* und eine *parCE84K* Mutation.

Um nun die Bedeutung von AAC(6′)-Ib-cr für die Aktivität von Fluorchinolonen im Vergleich zu anderen plasmidkodierten und chromosomalen Fluorchinolon-Resistenzmechanismen zu untersuchen, wurden für den Stamm *E. coli* WT und davon erhaltene chromosomale Mutanten, in An- und Abwesenheit der unterschiedlichen plasmidkodierten Resistenzgene *qnrA1*, *qnrB1*, *qnrS1*, *qepA1* und *aac(6′)-Ib-cr* MHK-Werte der Antibiotika Finafloxacin, Ciprofloxacin, Levofloxacin und Moxifloxacin bestimmt.

3.2 Einfluss von plasmidkodierten und chromosomalen Resistenzmechanismen auf die Aktivität verschiedener Fluorchinolone in isogenen *Escherichia coli* Isolaten

3.2.1 Klonierung von PMFR (*plasmid mediated fluorquinolone resistance genes*)

Um die Auswirkung der Kombination von vorhandenen chromosomalen und plasmidkodierten Fluorchinolonresistenzmechanismen in Gegenwart von ausgewählten Antibiotika zu bestimmen, wurden folgende plasmidkodierte Resistenzgene zunächst in den gleichen Vektor kloniert.

Nachdem bereits *aac(6′)Ib-cr* in pUC19 kloniert wurde, wurden zur besseren Vergleichbarkeit der Resistenzeigenschaften, auch die Gene *qnrA1* von Plasmid pMG252 aus *Klebsiella pneumoniae* (GK 3109), *qnrB1* aus *E. coli* (GK 3110) und *qnrS1* von *Salmonella enterica* serovar Infantis (*S. Infantis*) 5 TF 1a aus *E. coli* JM109 (GK 3124) in Plasmid pUC19 (*qnrA1* und *qnrS1*) bzw. pUC18 (*qnrB1*) kloniert. Dazu wurden die Primer HindIII_Martinez for 8722 und HindIII_Martinez rev 9627 zur Amplifizierung von *qnrA1*, das Primerpaar qnrB_NE_EcoR1_for und qnrB_NE_EcoR1_rev für *qnrB1* sowie qnrS_NE_HindIII_for und qnrS_NE_HindIII_rev zur Amplifizierung von *qnrS1* verwendet. Die jeweils erhaltenen PCR-Fragmente, flankiert von HindIII- bzw. EcoR1-Restriktionsschnittstellen, wurden mit dem NucleoSpin® Extract II Kit gereinigt (2.2.2.11), anschließend wurde durch Gelelektrophorese

Ergebnisse

die Konzentration abgeschätzt und die Fragmente mit dem geeigneten Enzym (*Hind*III für *qnrA1* und *qnrS1*, *Eco*R1 für *qnrB1*) gespalten. Die Plasmide pUC19 bzw. pUC18 wurden mittels alkalischer Lyse (2.2.2.2) isoliert, mit dem entsprechenden Enzym linearisiert, ebenfalls die Konzentration durch Gelelektrophorese abgeschätzt und die 5'-Phosphatenden mit Antarktische Phosphatase entfernt. Die Edukte wurden in einem Verhältnis von 1:3 (Plasmid:Insert) zur Ligation mit T4 Ligase eingesetzt (2.2.2.13).

Mit dem Ligationsprodukt wurden *E. coli* JM109-Zellen transformiert und auf IPTG/X-Gal-Platten mit 50 µg/ml Ampicillin ausplattiert. Nach ca. 16-20 h wurden Transformanten auf die Anwesenheit des entsprechenden Gens geprüft und bei positivem Nachweis durch DNA-Sequenzanalyse kontrolliert wurden. Abbildung 3-47 zeigt die hergestellten Konstrukte in linearer Form.

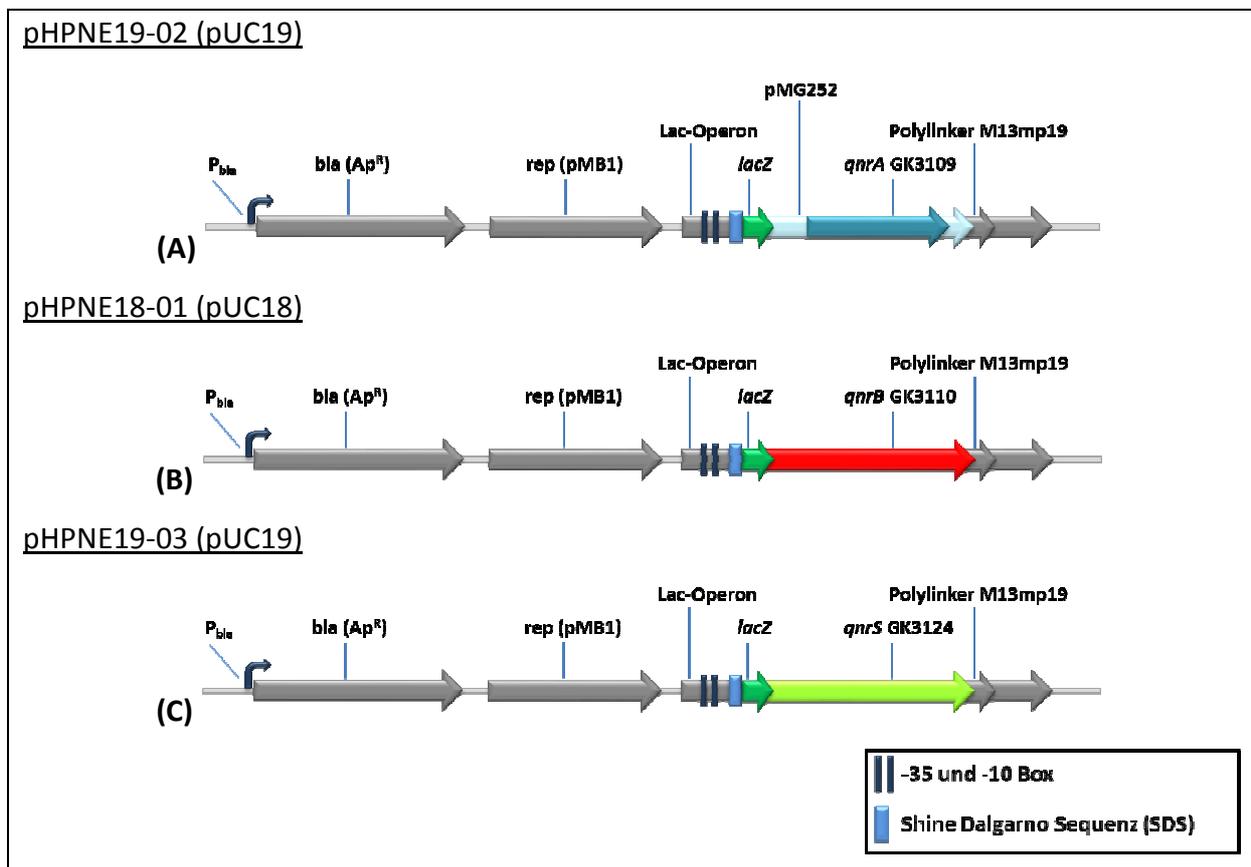


Abbildung 3-47 Darstellung der Konstrukte (A) pHPNE19-02 (*qnrA1*), (B) pHPNE18-01 (*qnrB1*) und (C) pHPNE19-03 (*qnrS1*) mit Legende. *P_{bla}* bezeichnet den Promotor des *bla*-Gens, das *bla*-Gen kodiert für eine Beta(β)-Lactamase, *Ap^R* steht für Ampicillin-Resistenz, *rep* ist die Abkürzung für Replikationsursprung, *pMB1* gibt die Herkunft des Replikationsursprungs an, Lac-Operon steht für Laktose-Operon, das *lacZ*-Gen kodiert für das Enzym Beta(β)-Galaktosidase.

Nach erfolgreicher Klonierung der Gene *qnrA1*, *qnrB1* und *qnrS1* wurden die Konstrukte pHPNE19-02, pHPNE18-01 und pHPNE19-03 für weitere Untersuchungen verwendet.

3.2.2 Charakterisierung von fluorchinolonresistenten Mutanten mit einer Kombination von chromosomalen Mutationen und PMFR-Genen durch Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration von Finafloxacin, Ciprofloxacin, Moxifloxacin und Levofloxacin

Um den Einfluss der verschiedenen Resistenzmechanismen auf die Aktivität verschiedener Fluorchinolone zu ermitteln, wurden für den Ausgangsstamm WT und davon erhaltene chromosomale Mutanten, in An- und Abwesenheit der unterschiedlichen plasmidkodierten Resistenzgene *qnrA1*, *qnrB1*, *qnrS1*, *qepA1* und *aac(6′)-Ib-cr* (siehe Abschnitt 3.2.1) MHK-Werte der Antibiotika Finafloxacin, Ciprofloxacin, Levofloxacin und Moxifloxacin bestimmt.

Mit den Konstrukten pHPNE19-02 (*qnrA1*), pHPNE18-01 (*qnrB1*) und pHPNE19-03 (*qnrS1*), sowie pST28::*qepA* (*qepA1*) und dem zuvor hergestellten Plasmid pHPNE19-01.1b (*aac(6′)-Ib-cr*) wurden jeweils isogene CaCl₂-kompetente Stämme (*E. coli* WT GK 571, *E. coli* MI GK 572, *E. coli* MII GK 573, *E. coli* WT 3.2 GK 643, *E. coli* WT-3 GK 644, *E. coli* WT-4-M35 GK 895 und *E. coli* WT-III GK 3009, vergleiche Tabelle 2-22, Seite 42) transformiert und die Empfindlichkeit von Ciprofloxacin, Finafloxacin, Levofloxacin und Moxifloxacin bei einem pH-Wert von 5,8 und 7,2 bestimmt. Hier wurden zwei verschiedene pH-Werte gewählt, da Finafloxacin in saurem Milieu die höchste Aktivität zeigt, während beispielsweise Ciprofloxacin bei eher neutralem pH-Wert wirkt (88).

Die Ergebnisse der MHK-Bestimmung der Stämme ohne Plasmide und der transformierten isogenen Stämme sind in folgender Tabelle 3-29 zusammengefasst.

Tabelle 3-29 Zusammenfassung der MHK-Werte in µg/ml.

Stamm	FIN*		CIP* ¹		LEV* ²		MOX* ³		KAN* ⁴	
	pH 5,8	pH 7,2	pH 5,8	pH 7,2	pH 5,8	pH 7,2	pH 5,8	pH 7,2	pH 5,8	pH 7,2
WT (GK 571)	0,015	0,06	0,125	0,015	0,25	0,03	0,25	0,03	4	2
WT + QepA	0,015	0,06	2	0,125	0,5	0,06	1	0,06	nb	nb
WT + QnrA1	0,125	1	1	0,06	2	0,125	2	0,5	nb	nb
WT + QnrB1	0,5	2	2	0,25	2	0,25	4	0,5	nb	nb
WT + QnrS1	0,25	0,5	2	0,06	2	0,125	2	0,125	nb	nb

Ergebnisse

Stamm	FIN*		CIP* ¹		LEV* ²		MOX* ³		KAN* ⁴	
	pH 5,8	pH 7,2	pH 5,8	pH 7,2	pH 5,8	pH 7,2	pH 5,8	pH 7,2	pH 5,8	pH 7,2
WT + AAC(6')-Ib-cr	≤0,00	0,03	0,5	0,015	0,125	0,015	0,125	0,015	16	64
MI (GK 572)	0,25	1	2	0,25	4	0,5	4	0,25	8	4
MI + QepA	0,25	1	64	4	8	1	8	1	nb	nb
MI + QnrA1	2	4	16	1	8	1	16	2	nb	nb
MI + QnrB1	2	8	8	1	8	1	16	2	nb	nb
MI + QnrS1	8	16	32	4	32	4	64	4	nb	nb
MI + AAC(6')-Ib-cr	0,25	1	4	0,5	4	0,25	4	0,25	16	≥128
MII (GK 573)	1	4	16	1	16	2	16	2	8	4
MII + QepA	1	4	≥256	64	64	4	32	8	nb	nb
MII + QnrA1	8	32	128	4	64	4	64	8	nb	nb
MII + QnrB1	8	32	32	4	32	4	64	4	nb	nb
MII + QnrS1	32	64	256	16	128	32	256	32	nb	nb
MII + AAC(6')-Ib-cr	1	4	≥16	4	8	1	8	2	32	≥128
WT-3.2 (GK 643)	0,25	1	4	0,25	4	0,5	4	0,5	4	4
WT-3.2 + QepA	0,25	2	128	8	8	2	16	4	nb	nb
WT-3.2 + QnrA1	2	16	32	2	32	4	64	4	nb	nb
WT-3.2 + QnrB1	1	8	8	0,5	8	1	8	1	nb	nb
WT-3.2 + QnrS1	2	8	16	0,5	16	1	32	1	nb	nb
WT-3.2 + AAC(6')-Ib-cr	0,25	1	8	0,5	4	0,5	4	0,5	16	32
WT-3 (GK 644)	2	4	8	0,5	8	1	8	1	2	2
WT-3 + QepA	1	4	≥256	16	64	4	32	4	nb	nb
WT-3 + QnrA1	2	8	32	1	16	2	32	2	nb	nb
WT-3 + QnrB1	4	16	16	2	16	2	16	2	nb	nb
WT-3 + QnrS1	8	32	64	4	64	4	64	8	nb	nb
WT-3 + AAC(6')-Ib-cr	1	2	≥16	1	nb	0,5	nb	1	8	64
WT-4-M35 (GK 895)	0,125	0,5	1	0,06	1	0,125	2	0,5	4	2
WT-4-M35 + QepA	0,125	0,5	32	1	4	0,25	8	1	nb	nb
WT-4-M35 + QnrA1	4	16	64	2	32	2	64	8	nb	nb
WT-4-M35 + QnrB1	2	8	4	0,5	8	1	16	2	nb	nb
WT-4-M35 + QnrS1	4	16	32	2	16	2	64	4	nb	nb

Stamm	FIN*		CIP* ¹		LEV* ²		MOX* ³		KAN* ⁴	
	pH 5,8	pH 7,2	pH 5,8	pH 7,2	pH 5,8	pH 7,2	pH 5,8	pH 7,2	pH 5,8	pH 7,2
WT-4-M35 + AAC(6')-Ib-cr	0,125	0,25	4	0,125	1	0,125	2	0,25	8	64
WT-III (GK 3009)	0,06	0,25	0,5	0,06	1	0,125	1	0,25	4	2
WT-III + QepA	0,03	0,25	8	1	2	0,25	2	0,5	nb	nb
WT-III + QnrA1	1	4	8	1	8	1	16	2	nb	nb
WT-III + QnrB1	2	8	4	0,5	8	1	16	2	nb	nb
WT-III + QnrS1	2	16	32	2	16	2	32	2	nb	nb
WT-III + AAC(6')-Ib-cr	0,03	0,125	2	0,06	1	0,06	1	0,06	8	64

(nb = nicht bestimmt, *FIN = Finafloxacin, *¹CIP = Ciprofloxacin, *²LEV = Levofloxacin, *³MOX = Moxifloxacin, *⁴KAN = Kanamycin)

Ergebnis der Wirkung des pH-Wertes auf die Aktivität der Fluorchinolone

Finafloxacin zeigte für die getesteten Stämme um den Faktor 2-8 bei pH 5,8 niedrigere Werte als bei pH 7,2. Ciprofloxacin zeigte bei pH 7,2 um den Faktor 4-32 erniedrigte Werte, Levofloxacin um den Faktor 4-16 und Moxifloxacin um den Faktor 4-32 im Vergleich zu pH 5,8.

Bei einem pH-Wert von 5,8 waren die MHK-Werte von Finafloxacin um den Faktor 2-512 niedriger als die MHK-Werte von Ciprofloxacin und um den Faktor 4-64 niedriger als die von Levo- und Moxifloxacin ebenfalls bei pH 5,8. Die Werte von Finafloxacin bei pH 7,2 waren um den Faktor 1-16 höher als bei Cipro-, Levo- und Moxifloxacin mit Ausnahme der QepA-Stämme, hier waren die Werte um den Faktor 0,5-16 erniedrigt.

Ergebnis der Wirkung der verschiedenen Resistenzmechanismen auf die Aktivität der Fluorchinolone

Chromosomale Resistenzmechanismen:

Für Stamm *E. coli* MI (*gyrAS83L*) stieg der MHK-Wert von die getesteten Antibiotika bei pH 5,8 bzw. 7,2 um einen Faktor von 8-16, für *E. coli* WT-3 (*gyrAS83L, gyrAD87G*) um einem Faktor von 32-128, für *E. coli* MII (*gyrAS83L, marRΔ175bp*) um einem Faktor von 64-128, für Stamm *E. coli* WT-3.2 (*gyrAD87G*) um einen Faktor von 16-32, für *E. coli* WT-4-M35 (*gyrAD87G, parCS80I*) um einen Faktor von 4-16 und für Stamm *E. coli* WT-III (*marRΔ74bp*) stieg der MHK-Wert von die getesteten Antibiotika bei pH 5,8 bzw. 7,2 um einen Faktor von

Ergebnisse

4-8. Tabelle 3-30 fasst die ermittelten Faktoren der Erhöhung der MHK-Werte für die getesteten Antibiotika Finafloxacin, Ciprofloxacin, Levofloxacin und Moxifloxacin bei pH 5,8 und 7,2 noch einmal zusammen.

Tabelle 3-30 Tabellarische Zusammenfassung der Faktoren die mit den chromosomalen Resistenzen einhergehen.

Ausgangsstamm	hinzugekommene Mutation	Erhöhung der MHK für die getesteten FQs	Stamm
<i>E. coli</i> WT(GK 571)	+ <i>gyrAS83L</i>	→ Faktor 8-16	<i>E. coli</i> MI
	+ <i>gyrAS83L</i> + <i>gyrAD87G</i>	→ Faktor 32-128	<i>E. coli</i> WT-3
	+ <i>gyrAS83L</i> + <i>marRΔ175bp</i>	→ Faktor 64-128	<i>E. coli</i> MII
	+ <i>gyrAD87G</i>	→ Faktor 16-32	<i>E. coli</i> WT-3.2
	+ <i>gyrAD87G</i> + <i>parCS80I</i>	→ Faktor 4-16	<i>E. coli</i> WT-4-M35
	+ <i>marRΔ74bp</i>	→ Faktor 4-8	<i>E. coli</i> WT-III

Plasmidkodierte Resistenzmechanismen:

Folgende Tabelle zeigt die Zusammenfassung der ermittelten Faktoren der MHK-Werte des jeweiligen Stammes mit Resistenzmechanismus in Bezug zum jeweiligen Ausgangsstamm.

Tabelle 3-31 Tabellarische Zusammenfassung der ermittelten Faktoren der MHK-Werte (in µg/ml) des jeweiligen Stammes mit Resistenzmechanismus in Bezug zum jeweiligen Ausgangsstamm.

Resistenz-mechanismus	FIN		CIP		LEV		MOX		KAN	
	pH 5,8	pH 7,2								
QepA	0,5-1	1-2	16-32	8-64	2-8	2-4	2-4	2-8	nb	nb
QnrA1	1-32	2-32	4-64	2-32	2-32	2-16	4-32	2-16	nb	nb
QnrB1	2-32	4-32	2-16	2-16	2-8	2-8	2-16	2-16	nb	nb
QnrS1	4-32	8-64	4-64	2-32	4-16	2-16	4-32	2-16	nb	nb
AAC(6')-Ib-cr	0,5-1	0,5-1	1-4	1-4	0,5-1	0,5-1	0,5-1	0,5-1	2-4	8-32

QepA

Die MHK-Werte von Finafloxacin für die Stämme mit QepA zeigten im Vergleich zu ihrem jeweiligen Ausgangsstamm eine Erhöhung um den Faktor 0,5-1 bei pH 5,8 und um den Faktor 1-2 bei pH 7,2. Von Ciprofloxacin erhöhten sich die MHK-Werte durch QepA um einen Faktor

von 16-32 bzw. 8-64 bei einem pH-Wert von 5,8 bzw. 7,2. Die Erhöhung durch QepA von Levofloxacin und Moxifloxacin lag bei einem Faktor von 2-8 für pH 5,8 und 7,2.

Qnr

In Anwesenheit der Topoisomerase Schutzproteine QnrA1, QnrB1 und QnrS1 stiegen die MHK-Werte von Fina-, Cipro-, Levo- und Moxifloxacin um den Faktor 1-64, bei einem pH-Wert von 5,8 bzw. 7,2 an. Im Vergleich der MHK-Werte von QnrS1 mit denjenigen von QnrA1 und QnrB1 zeigten sich höhere MHK-Werte für QnrS1 für die Stämme *E. coli* MI, MII, WT-3 und WT-III bei pH 7,2 und pH 5,8.

AAC(6')Ib-cr

Für die Stämme mit einer *gyrA* Mutation an Position 83 (*E. coli* MI) bzw. 87 (*E. coli* WT-3.2) allein, oder in Kombination (*E. coli* WT-3), sowie eine Mutation an Position 87 in Kombination mit einer *parC* Mutation (*E. coli* WT-4-M35), stiegen die MHK-Werte in Anwesenheit von AAC(6')Ib-cr um einen Faktor von 2 von Ciprofloxacin bei pH 7,2 und um einen Faktor von 2-4 bei pH 5,8. Für Stamm WT ohne chromosomale Mutation und für Stamm *E. coli* WT-III mit einer *marR* Deletion von 74 bp, stiegen die MHK-Werte von Ciprofloxacin bei pH 7,2 nicht an (Faktor 1), bei pH 5,8 dagegen um den Faktor 4. Für Stamm *E. coli* MII mit einer *gyrAS83L* Mutation und *marRΔ175bp* Deletion stieg der MHK-Wert um einen Faktor von 4 von Ciprofloxacin bei pH 7,2, lediglich um einen Faktor von mindestens 1 bei pH 5,8. Die Kanamycin MHK-Werte stiegen für alle getesteten Stämme um einen Faktor von 2-4 bei pH 5,8 und um einen Faktor von 32 bei pH 7,2. Tabelle 3-32 zeigt die Zusammenfassung der ermittelten Faktoren der Erhöhung der MHK durch die Anwesenheit von AAC(6)Ib-cr.

Ergebnisse

Tabelle 3-32 Tabellarische Zusammenfassung der Erhöhung der MHK durch AAC(6')Ib-cr im Vergleich zum jeweiligen Ausgangsstamm, ausgedrückt durch errechneten Faktor.

Antibiotika	<i>E. coli</i>							
	WT	MI	MII	WT-3.2	WT-3	WT-4-M35	WT-III	
CIP pH 5,8	4	2	min. 1	2	min. 2	4	4	Faktor der Erhöhung der MHK durch die Anwesenheit von AAC(6')Ib-cr
CIP pH 7,2	1	2	4	2	2	2	1	
KAN pH 5,8	4	2	4	4	4	2	2	
KAN pH 7,2	32	min. 32	min. 32	8	32	32	32	

Die getesteten Fluorchinolone Finafloxacin, Levofloxacin und Moxifloxacin bei pH 5,8 und pH 7,2 wiesen keine Erhöhung des MHK-Wertes in Anwesenheit von AAC(6')Ib-cr, im Vergleich zum jeweiligen Ausgangsstamm, auf. Die Werte blieben gleich, bzw. sanken um eine Verdünnungsstufe, mit Ausnahme für WT-III von Moxifloxacin bei pH 7,2, hier sank der MHK-Wert um 2 Verdünnungsstufen von 0,25 µg/ml für WT-III auf 0,06 µg/ml bei WT-III AAC(6')Ib-cr.

3.2.2.1 Deletion von LacZ in pHPNE18-01 (QnrB1), pHPNE19-03 (QnrS1) bzw. der Sequenz von pMG252 in pHPNE19-02 (QnrA1)

Da bei den Plasmiden pHPNE18-01 (QnrB1), pHPNE19-03 (QnrS1) die ersten fünf bzw. sieben Aminosäuren der Sequenz von LacZα vor der eigentlichen Sequenz des Schutzproteins Qnr vorgeschaltet waren, wurden diese durch SSM-PCR (2.2.2.8.4) mit den Primern pUC19-qnrB1-del-LacZ-for_+1157 und pUC19-qnrB1-del-lacZ-rev_+1137 bzw. pUC19-qnrS-del-LacZ-for_+1134 und pUC19-qnrS-del-LacZ-rev_+1110 deletiert. Ebenso wurde die Expression von QnrA1 in pHPNE19-02 unter den Promotor *P_{lac}* gestellt, indem mit den Primern pUC19-qnrA1-del-lacZ-for_+1382 und pUC19-qnrA1-del-LacZ-rev_+1159 die klonierten Teile der Sequenz von pMG252, die die originale Promotorsequenz enthielten, deletiert.

Die erhaltenen Plasmide pHPNE18-01.1, pHPNE19-02.1 und pHPNE19-03.1 wurden, nach Transformation in *E. coli* JM109, durch MHK-Bestimmung, mit den Stämmen *E. coli* JM109 pHPNE18-01 bzw. pHPNE19-02 bzw. pHPNE19-03 verglichen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3-33 zusammengefasst.

Tabelle 3-33 Zusammenfassung der MHK-Werte (in µg/ml) der Antibiotika Ciprofloxacin und Levofloxacin für die Stämme *E. coli* JM109 mit den Plasmiden pHPNE18-01 und pHPNE18-01.1, pHPNE19-02 und pHPNE19-02.1, sowie pHPNE19-03 und pHPNE19-03.1.

Stamm	Ciprofloxacin	Levofloxacin
<i>E. coli</i> JM109	0,08	0,32
+ pHPNE18-01	0,32	0,64
+ pHPNE18-01.1	0,32	0,64
+ pHPNE19-02	0,64	1,28
+ pHPNE19-02.1	0,64	1,28
+ pHPNE19-03	1,28	5,12
+ pHPNE19-03.1	1,28	5,12

Es ist kein Unterschied der MHK-Werte von Ciprofloxacin und Levofloxacin für die Stämme *E. coli* JM109 mit Plasmid pHPNE18-01 und pHPNE18-01.1, bzw. pHPNE19-02 und pHPNE19-02.1, sowie pHPNE19-03 und pHPNE19-03.1 festzustellen.

3.2.2.2 Überblick der Ergebnisse von Abschnitt 3.2.2

- * Finafloxacin zeigte bei den getesteten Stämmen um einen Faktor von 2-8 bei pH 5,8 niedrigere Werte als bei pH 7,2.
- * Bei einer *gyrAS83L* Mutation, stieg der MHK-Wert von den getesteten Antibiotika um einen Faktor von 8-16, bei einer *gyrAS83L* und einer *gyrAD87G* Mutation, stieg der MHK-Wert um einen Faktor von 32-128 und bei einer *gyrAS83L* und einer *marR* Deletion, stieg der MHK-Wert um einen Faktor von 64-128.
- * Eine *gyrAD87G* Mutation verursachte eine Erhöhung des MHK-Wertes um den Faktor 16-32, bei einer *gyrAD87G* Mutation und einer *parCS80I* Mutation stieg der MHK-Wert um einen Faktor von 4-16.
- * Eine *marR* Deletion allein hatte eine Erhöhung um den Faktor 4-8 zur Folge.
- * Finafloxacin zeigte eine exzellente Wirkung für die getesteten Stämme mit QepA im Vergleich zu Ciprofloxacin, Levofloxacin und Moxifloxacin bei pH 5,8 und 7,2.
- * Im Vergleich waren die MHK-Werte für die Stämme *E. coli* MI, MII, WT-3 und WT-III bei pH 7,2 und pH 5,8 mit QnrS1 höher als bei den gleichen Stämmen mit QnrA1 oder QnrB1.

Ergebnisse

- * Bei Stamm MII (*gyrAS83L*, *marRΔ175bp*) stieg der MHK-Wert von Ciprofloxacin bei pH 7,2 um einen Faktor von 4. Die Kanamycin MHK-Werte stiegen für alle getesteten Stämme um einen Faktor von 32 bei pH 7,2.
- * Die getesteten Fluorchinolone Finafloxacin, Levofloxacin und Moxifloxacin bei pH 5,8 und pH 7,2 wiesen keine Erhöhung des MHK-Wertes in Anwesenheit von AAC(6')Ib-cr auf.

Nachdem die Bedeutung der plasmidkodierten Resistenzgene *qnrA1*, *qnrB1*, *qnrS1*, *qepA1* und *aac(6')-Ib-cr* in Kombination mit chromosomalen Fluorchinolon-Resistenzmechanismen untersucht wurde, sollte nun untersucht werden, welche Fluorchinolon-Resistenzmutationen sich bei der Selektion von Stamm *E. coli* WT in Anwesenheit von QnrS1, QepA1 und AAC(6')-Ib-cr im Vergleich zu *E. coli* WT ohne die plasmidkodierten Resistenzmechanismen ereigneten.

3.2.3 *In vitro* Selektion von QepA1, QnrS1 und AAC(6')-Ib-cr in *E. coli* WT

Zur Selektion der plasmidkodierten Fluorchinolon-Resistenzmechanismen QepA1, QnrS1 und AAC(6')-Ib-cr wurden die Plasmide pSTV28::*qepA*, pHPNE19-03.1 (*qnrS1*) und pHPNE19-01.1b (*aac(6')Ib-cr*) in CaCl₂-kompetenten *E. coli* WT-Zellen (GK 571) transformiert. Anschließend wurden die MHK-Werte von Finafloxacin bei einem pH-Wert von 5,8 und von Ciprofloxacin bei einem pH-Wert von 7,2 bestimmt. Die Ergebnisse sind in folgender Tabelle zusammengefasst.

Tabelle 3-34 Gegenüberstellung der MHK-Werte in µg/ml von Finafloxacin und Ciprofloxacin für die Stämme WT (GK 571), WT + pSTV28::*qepA*, WT + pHPNE19-03.1 und WT + pHPNE19-01.1b.

Stamm	Finafloxacin pH 5,8	Ciprofloxacin pH 7,2
<i>E. coli</i> WT (GK 571)	0,015	0,015
+ pSTV28:: <i>qepA</i>	0,015	0,125
+ pHPNE19-03.1	0,25	0,5
+ pHPNE19-01.1b	0,015	0,03

Die Selektion erfolgte durch Aufkonzentrieren einer Übernacht-Nachtkultur und ausplattieren der eingengten Zellen auf Agarplatten mit der 4-fachen Konzentration des MHK-Wertes (2.2.1.11).

Nach Selektion der Stämme *E. coli* WT (GK 571), *E. coli* WT pSTV28::qepA, *E. coli* WT pHPNE19-03.1 und *E. coli* WT pHPNE19-01.1b mit der jeweils 4-fachen Konzentration des zuvor bestimmten MHK-Wertes von Finafloxacin (pH 5,8) und Ciprofloxacin (pH 7,2) wurden insgesamt 77 Stämme mittels PCR und RFLP untersucht. Hierbei wurden spezifische PCR-Produkte mit Primern für *gyrA* (*gyrA* 3-1 und *gyrA* 5-1) und *marR* (*marR*_3R4 und *marR*_5R4) amplifiziert. Die *gyrA*-spezifischen Produkte wurden mit *Hinfl*I gespalten. Die Ergebnisse sind in folgender Tabelle zusammengefasst.

Tabelle 3-35 Zusammenfassung der Ergebnisse der gesicherten selektierten Stämme.

Probennummer	Anzahl	Stamm	<i>gyrA</i> S83X-Mutationen	<i>marR</i> -Deletionen
1-10	10	<i>E. coli</i> WT mit Ciprofloxacin	8	-
11-20	10	<i>E. coli</i> WT mit Finafloxacin	7	-
21-30	10	+ pSTV28::qepA mit Ciprofloxacin	10	-
31-37	7	+ pSTV28::qepA mit Finafloxacin	-	-
51-60	10	+ pHPNE19-03.1 mit Ciprofloxacin	-	5
41-50	10	+ pHPNE19-03.1 mit Finafloxacin	-	-
71-80	10	+ pHPNE19-01.1b mit Ciprofloxacin	-	-
61-70	10	+ pHPNE19-01.1b mit Finafloxacin	8	-

Bei *E. coli* WT (GK 571) entstanden zu 80 % bzw. 70 % *gyrA*-Mutationen in Codon 83 bei der Selektion mit Cipro- bzw. Finafloxacin. Bei der Selektion von *E. coli* WT mit der spezifischen Effluxpumpe QepA mit Ciprofloxacin entstanden zu 100 % *gyrA*S83X Mutationen.

Bei der Selektion mit Finafloxacin konnten keine Mutationen in *gyrA* in Codon 83 oder eine größere Deletion (>75 bp) in *marR* festgestellt werden. Im Fall von *E. coli* WT mit Plasmid pHPNE19-03.1 entstanden bei der Selektion mit Ciprofloxacin zu 50 % *marR*-Deletionen, jedoch keine Mutationen in *gyrA* in Codon 83. Bei der Selektion mit Finafloxacin konnten auch hier keine Mutationen in *gyrA* in Codon 83 oder eine größere Deletion (>75 bp) in *marR* festgestellt werden. Bei *E. coli* WT mit der Aminoacyltransferase AAC(6')Ib-cr entstanden nur bei der Selektion mit Finafloxacin in 8 von 10 Stämmen Mutationen in *gyrA* in Codon 83, bei der Selektion mit Ciprofloxacin entstanden hier keine Mutationen in *gyrA* in Codon 83 bzw. Deletionen in *marR*. Die Mutationen bzw. Deletionen wurden nicht näher charakterisiert.

3.2.3.1 Überblick der Ergebnisse von Abschnitt 3.2.3

- * Bei der Selektion mit Cipro- bzw. Finafloxacin von *E. coli* WT (GK 571) entstanden zu 80 % bzw. 70 % *gyrA83*-Mutationen
- * Bei der Selektion von *E. coli* WT pSTV28::qepA mit Ciprofloxacin entstanden zu 100 % *gyrAS83X* Mutationen.
- * Bei *E. coli* WT mit Plasmid pHPNE19-03.1 (QnrS1) entstanden bei der Selektion mit Ciprofloxacin zu 50 % *marR*-Deletionen, jedoch keine Mutationen in *gyrA83*, bei der Selektion mit Finafloxacin entstanden keine Mutationen in *gyrA83* oder eine größere Deletion (>75 bp) in *marR*.
- * Bei *E. coli* WT mit AAC(6')Ib-cr entstanden nur bei der Selektion mit Finafloxacin Mutationen in *gyrA* an Position 83 in 8 von 10 Stämmen.

4 Diskussion

Im Jahr 2006 wurde, neben den bereits bekannten plasmidkodierten Fluorchinolon-Resistenzmechanismen, Qnr und QepA, ein weiterer Mechanismus näher beschrieben. Es handelte sich um die Aminoglykosid 6'-N-Acetyltransferase Typ Ib-cr (AAC(6')-Ib-cr, -cr für *ciprofloxacin resistance*), die in der Lage ist, neben Aminoglykosiden, auch die C7-piperazinyl-Fluorchinolone Ciprofloxacin und Norfloxacin zu acetylieren. AAC(6')-Ib-cr unterscheidet sich durch die Aminosäuremutationen W102R und D179Y vom Enzym AAC(6')-Ib-wt (124). Die fast perfekte Homologie von *aac(6')-Ib* und *aac(6')-Ib-cr* lässt vermuten, dass letztere aus der ursprünglichen Form durch zwei Punktmutationen, die jeweils zum Aminosäureaustausch führten, entstanden ist. Ferner ist dafür plausibel anzunehmen, dass die Mutationen nacheinander erworben wurden. Die Variante AAC(6')-Ib-cr wurde bisher nur mit beiden Veränderungen (W102R und D179Y) gefunden, obwohl Vorversuche gezeigt hatten, dass *in vitro* erzeugte Einzelmutanten bereits bei einer D179Y-Mutation einen um zwei Verdünnungsstufen erhöhten MHK-Wert von Ciprofloxacin besitzen (124). In diesem Zusammenhang war ein Ziel der vorliegenden Arbeit die Klärung der Frage, in welcher Reihenfolge die Mutationen an den Positionen 102 bzw. 179 entstanden und wie der Selektionsdruck dafür ausgesehen haben könnte. Die Enzyme AAC(6')-Ib und AAC(6')-Ib-cr gehören zur GNAT Superfamilie (160). Eine Enzymfamilie, deren Topologie, trotz ihrer funktionellen Variation, denn Acetyltransferasen spielen zum Beispiel auch eine wichtige Rolle bei der Regulation der Genaktivität in eukaryontischen Zellen (7), nahezu identisch ist (43). Ein weiteres Ziel der vorliegenden Arbeit war daher die Untersuchung, ob sich aus einem anderen AAC(6')-I-Subtyp eine AAC(6')-Ib-cr-analoge Modifikation entwickeln kann, die das Substratspektrum ebenso variiert. In Anbetracht der rasant ansteigenden Entwicklung von plasmidkodierten (Fluor)chinolon-Resistenzmechanismen war es außerdem das Ziel der vorliegenden Arbeit, die Bedeutung von AAC(6')-Ib-cr für die Aktivität von Fluorchinolonen im Vergleich zu anderen plasmidkodierten und chromosomalen Fluorchinolon-Resistenzmechanismen zu untersuchen und gleichzeitig die Effektivität von Finafloxacin, einem Fluorchinolon der neuesten Generation, gegenüber den bekannten plasmidkodierten und chromosomalen Resistenzmechanismen im Vergleich mit den älteren Fluorchinolonen Ciprofloxacin, Levofloxacin oder Moxifloxacin zu prüfen.

Im Vordergrund der Arbeit stand zunächst, nach Klonierung von *aac(6')-Ib* und weiteren Subtypen von *aac(6')-I* sowie nach *in silico* Analyse der Kristallstrukturen der ausgewählten Enzyme, die ortsspezifische und die zufällige Mutagenese der Gene durch Error-prone PCR sowie durch *in vitro* Selektion in einem Mutator-Stamm.

Anschließend wurden von isogenen chromosomalen Mutanten, in An- und Abwesenheit der unterschiedlichen plasmidkodierten Fluorchinolone-Resistenzgene *aac(6')-Ib-cr*, *qnrA1*, *qnrB1*, *qnrS1* und *qepA1*, MHK-Werte der ausgewählten Fluorchinolone bestimmt.

4.1 Molekulare Grundlagen der Entstehung der Variante AAC(6')-Ib-cr aus AAC(6')-Ib und *in vitro* Untersuchungen zur Herstellung einer AAC(6')-Ib-cr-analogen Mutation in einem anderen Typ AAC(6')-I

4.1.1 Verbreitung von *aac(6')-Ib-cr* und Auswahl von *aac(6')-Ib*-positiven klinischen Isolaten

Aus einem Kollektiv von 183 klinischen *Enterobacteriaceae*-Isolaten aus England, isoliert in den Jahren 2001 bis 2004, wurden insgesamt 25 Isolate positiv auf die Anwesenheit von *aac(6')-Ib* getestet. Um sich zunächst einen Überblick über die zur Verfügung stehenden Varianten von *aac(6')-Ib* zu verschaffen, wurden die 25 positiven Stämme durch Sequenzierung von *aac(6')-Ib* näher charakterisiert. Das Ergebnis ist in Tabelle 3-1, Seite 82 zusammengefasst. 80 % der *aac(6')-Ib*-positiven Stämme besaßen die mutierte Variante *aac(6')-Ib-cr*. Vergleicht man jedoch die Zahl der *cr*-Varianten (n = 20) mit den insgesamt untersuchten Stämmen (n = 183) dieses Kollektivs, so kommt man lediglich auf 10,93 % *aac(6')-Ib-cr*-Varianten. In den Stämmen, die die mutierte Aminoglykosid-Acetyltransferase AAC(6')-Ib-cr besaßen, waren hier mindestens drei chromosomale Mutationen in *gyrA* bzw. *parC* vorangegangen. Eine Ausnahme bildete *E. coli* GK 2815, hier wurde lediglich eine Mutation in *gyrA* gefunden. *ParC* wurde nicht sequenziert. Die Sequenzierung von *parC* wurde im Verlauf der Arbeit auch nicht nachgeholt, da das Ergebnis für Arbeit nicht entscheidend war. Die Mutationen an Position 102 und 179 in AAC(6')-Ib-cr wurden in dieser Untersuchung nur gemeinsam gefunden. Dies wird auch in einer Studie von Robicsek *et al.* beschrieben (124). In der Studie von Robicsek *et al.* wurde außerdem beschrieben, dass in 6

von 78 Stämmen QnrA in Kombination mit AAC(6')-Ib-cr vorlag, in 36 Stämmen wurde AAC(6')-Ib-cr ohne QnrA gefunden und in 7 Stämmen wurde AAC(6')-Ib ohne Mutation entdeckt (124). In der hier durchgeführten Studie wurde in keinem der 20 Stämme in denen AAC(6')-Ib-cr gefunden wurde, QnrA nachgewiesen. Unter den 25 Stämmen, die ausgewählt wurden, da sie positiv auf die Anwesenheit des Gens *aac(6')-Ib* untersucht wurden und reduzierte Fluorchinoloneempfindlichkeit zeigten (A. Heisig, A. Schnasse, T. Claußen, unveröffentlicht), wurde QnrA lediglich in den zwei AAC(6')-Ib-wt-Stämmen und im Stamm mit AAC(6')-Ib7 gefunden.

Für die Charakterisierung durch MHK-Bestimmung, Erstellung von Plasmidprofilen, sowie Untersuchung der Mobilität der Plasmide wurden die *E. coli* Stämme GK 2850, mit AAC(6')-Ib-wt, GK 2851, mit AAC(6')-Ib11, GK 2894, mit AAC(6')-Ib7 und die Stämme GK 2895 sowie GK 2951, jeweils mit AAC(6')-Ib-cr ausgewählt, da jeder dieser Stämme eine andere Variante des *aac(6')-Ib*-Gens besitzt. Es wurden zwei *aac(6')-Ib-cr*-positive Stämme (GK 2895, GK 2951) ausgewählt, da im Verlauf der Arbeit in jedem Fall mit *aac(6')-Ib-cr* weitergearbeitet werden sollte, außerdem schienen diese Stämme interessant, da sie sich durch die Anzahl der chromosomalen Mutationen in *gyrA/parC* unterschieden und zusätzlich unterschiedliche MHK-Werte für die Aminoglykoside Kanamycin, Gentamicin und Amikacin zeigten, siehe Tabelle 3-2, Seite 85.

4.1.2 Charakterisierung der ausgewählten klinischen Isolate

Von den ausgewählten Stämmen *E. coli* GK 2850, mit AAC(6')-Ib-wt, GK 2851, mit AAC(6')-Ib11, GK 2894, mit AAC(6')-Ib7, GK 2895 sowie GK 2951, jeweils mit AAC(6')-Ib-cr, konnte mit Hilfe verschiedener Methoden (Plasmidisolierung nach Toranzo *et al.* (151), mit und ohne Ethanol-fällung sowie mittels NucleoBond® Xtra Midi Kit) Plasmidprofile erstellt werden. Alle Stämme besaßen mehrere Plasmide, siehe Abbildung 3-1, Seite 87. Zur Vereinzelung der Plasmide und zur gleichzeitigen Lokalisation von *aac(6')-Ib* wurden die isolierten Plasmide anschließend transformiert bzw. konjugiert. Zum Erstellen eines Plasmidprofils in einem Agarosegel eignete sich zur Plasmidisolierung die Methode nach Toranzo *et al.* (151) ohne Ethanol-Fällung besonders gut, denn hier waren stringente Banden in einer Größe von ca. 1 kb bis zu 100 kb zu sehen. Dennoch wurden diese Ansätze nicht zur Transformation verwendet, da sie noch Phenolreste enthielten. Die Auftrennung der Plasmide aus der

Isolierung nach Toranzo *et al.* (151) mit erfolgter Ethanolfällung (Abbildung 3-1, Seite 87) zeigte, dass die Plasmide nicht mehr bzw. nur noch sehr schwach zu detektieren waren. Vermutlich gingen die Plasmide während der Ethanolfällung zum Teil verloren. Zur Transformation wurden daher die Plasmide aus der Isolierung mit dem NucleoBond® Xtra Midi Kit verwendet, da hier größere Mengen Plasmid isoliert werden konnten. Von den fünf ausgewählten und näher charakterisierten Stämmen von *E. coli* GK 2850, GK 2851, GK 2894, GK 2895, GK 2951 wurden die Plasmide der Stämme GK 2894 (pAAC(6′)-Ib7) und GK 2951 (pAAC(6′)-Ib-cr) erfolgreich in *E. coli* JM109 transformiert. Konjugiert werden konnte lediglich das Plasmid von Stamm GK 2951. Hier wurden keine weiteren Versuche zur Mobilisation der Plasmide der anderen Stämme vorgenommen und vom erhaltenen Transkonjuganden wurde keine weitere Charakterisierung vorgenommen, da zur Charakterisierung pAAC(6′)-Ib-cr bereits in Transformand *E. coli* pAAC(6′)-Ib-cr vorlag.

4.1.2.1 Eigenschaften der Transformanden *E. coli* JM109 pAAC(6′)-Ib7 und *E. coli* JM109 pAAC(6′)-Ib-cr

Durch die Anwesenheit von Plasmid pAAC(6′)-Ib-cr stiegen bei Transformand *E. coli* JM109 pAAC(6′)-Ib-cr die MHK-Werte von Ciprofloxacin und Norfloxacin für *E. coli* JM109 um zwei Stufen an, während die MHK-Werte von Moxifloxacin konstant blieben. Nach Plasmidisolierung und näherer Analyse verschiedener Transformanden *E. coli* JM109 pAAC(6′)-Ib7 (n = 22) fiel zunächst die unterschiedliche Größe der Plasmide im DNA-Gel auf (Abbildung 3-3), denn 21 Transformanden besaßen ein Plasmid der gleichen Größe (pAAC(6′)-Ib7), ein Transformand ein deutlich kleineres Plasmid (pAAC(6′)-Ib7Δ), anschließend die unterschiedlichen MHK-Werte der Transformanden *E. coli* JM109 mit pAAC(6′)-Ib7 bzw. pAAC(6′)-Ib7Δ (Tabelle 3-3). Eine *qnrA*-spezifische PCR ließ den Schluss zu, dass QnrA und AAC(6′)-Ib7 auf Plasmid pAAC(6′)-Ib7 zusammen vorlagen. In Stamm *E. coli* JM109 pAAC(6′)-Ib7Δ wurde *qnrA* nicht nachgewiesen, vermutlich ging *qnrA*, was als Teil eines Integrons vorgelegen haben könnte, durch genetische Umlagerungen, nach der Transformation in *E. coli* JM109 verloren. *E. coli* JM109 pAAC(6′)-Ib7 mit QnrA zeigte erhöhte MHK-Werte von Kanamycin, Gentamicin und Amikacin (aufgrund von AAC(6′)-Ib7) sowie Ciprofloxacin, Norfloxacin und Moxifloxacin (aufgrund von QnrA). Stamm *E. coli* JM109 pAAC(6′)-Ib7Δ ohne QnrA zeigte hingegen nur eine Erhöhung der MHK von den Aminoglykosiden Kanamycin, Gentamicin und Amikacin, da dieser nur AAC(6′)-Ib7 besaß, nicht QnrA, was die Resistenz gegenüber Fluorchinolonen vermitteln würde.

Da die Plasmide der Stämme mit den Varianten AAC(6′)-Ib (GK 2850) und AAC(6′)-Ib11 (GK 2851) nicht vereinzelt werden konnten und alle Varianten von AAC(6′)-Ib im gleichen chromosomalen Hintergrund vorliegen sollten, wurden alle Gene der Varianten in einen definierten Vektor gebracht und weiter charakterisiert. Begonnen wurde mit der Klonierung von *aac(6′)-Ib-cr*.

4.1.3 Einfluss des N-Terminus auf die Funktion von AAC(6′)-Ib und Vergleich der Deletionsmutanten

Da die Klonierung des *aac(6′)-Ib-cr*-Gens mit seiner eigenen Promotorstruktur, aufgrund der gescheiterten Sequenzierungsversuche (Direktsequenzierung, vergleiche Abschnitt 3.1.1.3, Seite 92) der Region stromaufwärts von *aac(6′)-Ib-cr* sowie der schließlich, aufgrund der Recherche, vermuteten Lokalisation des Gens im Integron, nicht möglich war, wurde *aac(6′)-Ib-cr* und später auch die anderen Varianten *aac(6′)-Ib-wt*, *aac(6′)-Ib7* sowie *aac(6′)-Ib11* ohne ihren eigenen Promotor, hinter einen durch Isopropyl-1-thio-β-D-Galaktopyranosid (IPTG) induzierbaren Promotor in das Plasmid pUC19 kloniert.

Ein Vergleich mehrerer veröffentlichter Sequenzen von *aac(6′)-Ib-cr/aac(6′)-Ib-wt* zeigte (Tabelle 3-5), dass die 5′-Enden von *aac(6′)-Ib* nicht identisch und daher vermutlich auch nicht funktionsrelevant sind. Da hier das 5′-Ende von *aac(6′)-Ib-cr* aus *E. coli* GK 2951 unbekannt war, wurde ein 5′-Primer mit einer *Hind*III-Schnittstelle konstruiert, der zu Beginn des „konservierten“ Bereichs der verglichenen Sequenzen bindet. Der 3′-Primer, ebenfalls mit einer *Hind*III-Schnittstelle versehen, bindet am 3′-Ende des Gens, sodass schließlich das gesamte *aac(6′)-Ib-cr*-Gen amplifiziert werden konnte. Da am amplifizierten 5′-Ende jedoch ein Startcodon fehlte und das 5′-Ende vermutlich irrelevant war, wurde *aac(6′)-Ib-cr* zunächst *in frame* mit dem *lacZ*-Gen in pUC19 kloniert und es entstand Plasmid pHPNE19-01 (Abbildung 3-4). Alle pUC19-Derivate wurden mit pHPNE19-XX bezeichnet.

Um zu zeigen, dass die Basen bis zu einem bestimmten Punkt am 5′-Ende tatsächlich für die Funktion irrelevant sind, wurden ausgehend von Plasmid pHPNE19-01 unterschiedliche Varianten des Plasmids hergestellt (vergleiche Abschnitt 3.1.1.4, Seite 95) und verglichen. Die unterschiedlichen Varianten von Plasmid pHPNE19-01 wurden durch ortsspezifische Mutagenese (*site-specific mutagenesis*, SSM-PCR) in einer PCR-Reaktion hergestellt.

Diskussion

Ausgehend von Plasmid pHPNE19-01 wurde zunächst der Beginn von LacZ (MTMITPSL) deletiert (pHPNE19-01.1), anschließend die folgenden 66 bp von *aac(6′)-Ib-cr* bis zum nächsten Startcodon ATG (pHPNE19-01.2). In den Plasmiden pHPNE19-01.1a und pHPNE19-01.1b wurde die Sequenz von *lacZ*, die sich vor *aac(6′)-Ib-cr* befand, ATG ACC ATG ATT ACG CCA AGC TTG (Aminosäuren: MTMITPSL) durch ein ATG (Aminosäure: M) bzw. durch ATG AGC AAC GCA AAA (Aminosäuren: MSNAK) ersetzt. Die Basen MSNAK wurden in mehreren Artikeln, unter anderem in einem Robicsek *et al.* (124), am 5′-Ende von AAC(6′)-Ib-cr beschrieben und daher ausgewählt. Die Stämme *E. coli* JM109 mit Plasmid pHPNE19-01, hier liegen die Aminosäuren MTMITPSL vor AAC(6′)-Ib-cr, mit Plasmid pHPNE19-01.1a, hier ist lediglich ein Methionin anstelle von MTMITPSL und mit Plasmid pHPNE19-01.1b, welches die Aminosäuren MSNAK anstelle von MTMITPSL besitzt, zeigen für Ciprofloxacin eine Erhöhung des MHK-Wertes. Ganz im Gegensatz zu den Stämmen *E. coli* JM109 mit Plasmid pHPNE19-01.1, welches identisch zu pHPNE19-01.1a ist, jedoch ohne ATG und mit Plasmid pHPNE19-01.2, denn hier steigen die MHK-Werte von Ciprofloxacin nicht an (Tabelle 3-7). In Plasmid pHPNE19-01.2 wurden die Basen des 5′-Endes bis zum nächsten ATG deletiert. Dieses ATG befindet sich in einen konservierten Bereich des Enzyms, Motiv C. In Plasmid pHPNE19-01.2 fehlen 21 bp des Motivs C und führen so zum Funktionsverlust des Enzyms. *E. coli* JM109 pHPNE19-01 und pHPNE19-01.1b zeigen außerdem von Norfloxacin und Kanamycin eine Erhöhung der MHK-Werte. Die MHK-Werte von Norfloxacin und Kanamycin für *E. coli* JM109 pHPNE19-01.1a, pHPNE19-01.1 und pHPNE19-01.2 wurden nicht bestimmt.

Die Resistenz, die durch das in pUC19 klonierte *aac(6′)-Ib-cr* vermittelt wurde, sollte möglichst mit der natürlich vermittelten Resistenz von AAC(6′)-Ib-cr vergleichbar sein. Der Vergleich der MHK-Werte für die Stämme *E. coli* JM109 pHPNE19-01, *E. coli* JM109 pHPNE19-01.1a und *E. coli* JM109 pHPNE19-01.1b mit den MHK-Werten für Transformand *E. coli* JM109 pAAC(6′)-Ib-cr zeigte, dass die die MHK-Werte von Ciprofloxacin lediglich um 1 Stufe abweichen. Die MHK-Werte von Kanamycin für *E. coli* JM109 pHPNE19-01 und *E. coli* JM109 pHPNE19-01.1b sind identisch, sie weichen jedoch um eine Verdünnungsstufe von *E. coli* JM109 pAAC(6′)-Ib-cr ab. Eine Abweichung um eine Verdünnungsstufe liegt normalerweise innerhalb des Fehlers der Methode der MHK-Bestimmung durch Mikrodilution. Eine weitere Möglichkeit als Grund für die Abweichungen wären die individuellen regulatorischen Regionen stromaufwärts von *aac(6′)-Ib-cr*. In pUC19 wird die

Expression von AAC(6')-Ib-cr durch den Promotor *Plac* reguliert (101, 173). In pAAC(6')-Ib-cr aus *E. coli* GK 2951 liegt das *aac*-Gen möglicherweise als Genkassette in einem Integron (Klasse I Integron) vor, so wurde es von Ruiz *et al.* bereits beschrieben (131). AAC(6')-Ib-cr wird dann über einen zentralen Genkassetten-Promotor P_C bzw. P_2 exprimiert wird. Dabei richtet sich das Transkriptionsniveau nach der Position der Genkassette innerhalb des Integrons (34, 77). Ein weiterer Unterschied der Plasmide ist die Anzahl der Kopien in einer Zelle. Denn während von pUC19, über 1000 Kopien pro Zelle vorliegen (47) (*high-copy*), liegen von natürlich vorkommenden Megaplasmiden nur 1-2 Kopien pro Zelle vor (*low-copy*). Die von Robicsek *et al.* veröffentlichten MHK-Werte eines Stammes mit AAC(6')-Ib-cr zeigen ebenfalls eine Erhöhung um zwei Verdünnungsstufen von Norfloxacin (124), wie auch bei den Plasmiden pAAC(6')-Ib-cr, pHPNE19-01, sowie pHPNE19-01.1b und eine Erhöhung um eine bzw. zwei Verdünnungsstufen von Ciprofloxacin (124), wie auch bei den Plasmiden pAAC(6')-Ib-cr, pHPNE19-01, pHPNE19-01.1b, sowie pHPNE19-01.1a.

Die Ergebnisse der MHK-Bestimmung der Stämme *E. coli* JM109 mit den Plasmiden JM109 pHPNE19-01 (N-terminal: MTMITPSL), pHPNE19-01.1 (ohne MTMITPSL), pHPNE19-01.1a (N-terminal: M statt MTMITPSL), pHPNE19-01.1b (N-terminal: MSNAK statt MTMITPSL) und pHPNE19-01.2 (N-terminal: ATG in Motiv C) bestätigen die These, die bei einem Vergleich der N-Termini (5'-Enden) verschiedener veröffentlichter Sequenzen von AAC(6')-Ib und Varianten nahe lag, dass der N-Terminus flexibel und daher nicht ausschlaggebend für die Funktion von AAC(6')-Ib ist. Das der N-Terminus von AAC(6')-Ib hochflexibel ist, wurde bereits von Bonomo *et al.* beschrieben (18). Solche Unterschiede können durch Umgestaltung innerhalb des Integrons entstehen (23). Lediglich ein ATG ist entscheidend sowie ein intaktes Motiv C, welches vom 5'- zum 3'-Ende gesehen, das erste der vier Motive ist (siehe 1.3, Seite 13).

Für einen Vergleich der Eigenschaften und für nachstehende Versuche, wurden die Gene *aac(6')-Ib-wt*, *aac(6')-Ib7* und *aac(6')-Ib11* nach dem gleichen Prinzip wie zur Herstellung von pHPNE19-01.1b (*aac(6')-Ib-cr*) kloniert und mittels SSM-PCR die Basen für die Aminosäuren MTMITPSL durch die Basen für die Aminosäuren MSNAK ersetzt. Die entstandenen Plasmide pHPNE19-05.1 (*aac(6')-Ib-wt*), pHPNE19-06.1 (*aac(6')-Ib7*) und pHPNE19-07.1 (*aac(6')-Ib11*)

Diskussion

sowie pHPNE19-01.1b (*aac(6')-Ib-cr*), waren daher bis auf die jeweils charakteristische/n Mutation/en identisch und standen ebenfalls unter Kontrolle des Promotors *Plac*.

4.1.4 Einfluss der Varianten *aac(6')-Ib-wt*, *aac(6')-Ib7* und *aac(6')-Ib11* auf die Empfindlichkeit

Die MHK-Werte von Kanamycin für die Stämme *E. coli* JM109 mit den Plasmiden pHPNE19-05.1 (*aac(6')-Ib-wt*), pHPNE19-06.1 (*aac(6')-Ib7*) und pHPNE19-07.1 (*aac(6')-Ib11*) stiegen deutlich an, während die MHK-Werte von Ciprofloxacin und Norfloxacin nicht anstiegen. Die MHK-Werte von Transformand *E. coli* JM109 pAAC(6')-Ib7 und von *E. coli* JM109 pHPNE19-06.1 mit dem in pUC19 klonierten *aac(6')-Ib7* waren bezüglich Amikacin, Gentamicin und Kanamycin vergleichbar, denn die MHK-Werte von Amikacin und Kanamycin wichen lediglich um eine Verdünnungsstufe voneinander ab, die Werte für Gentamicin waren identisch. Auch hier sollte die Vermittlung der Resistenz durch AAC(6')-Ib7 von pUC19 möglichst der natürlich vermittelten Resistenz von AAC(6')-Ib7 entsprechen. Für die Enzyme AAC(6')-Ib-wt und AAC(6')-Ib11 konnten diese Vergleiche nicht angestellt werden, da in diesen Fällen das Megaplasmid nicht übertragen werden konnte und es somit keinen Vergleichsstamm gab (3.1.1.2.3, Seite 88).

Die Varianten *aac(6')-Ib-wt*, *aac(6')-Ib7* und *aac(6')-Ib11* zeigen ein bestimmtes Substratprofil von Amikacin und Gentamicin, was bereits von Casin *et al.* näher dargestellt wurde (23). Der tabellarische Vergleich der MHK-Werte von Casin *et al.* und der MHK-Werte dieser Arbeit fasst die Unterschiede zusammen, siehe Tabelle 4-1.

Tabelle 4-1 Vergleich der MHK-Werte von Casin *et al.* (23) mit den gemessenen MHK-Werten dieser Arbeit von Gentamicin und Amikacin.

Typ	Aminosäureposition 116/117	Gentamicin MHK-Wert (µg/ml)		Amikacin MHK-Wert (µg/ml)	
		Casin <i>et al.</i>	diese Arbeit	Casin <i>et al.</i>	diese Arbeit
AAC(6')-Ib-wt	Q/L	0,5	0,25	16	4
AAC(6')-Ib7/(8)	Q/S	2/4	2	1/2/(4)	1-2
AAC(6')-Ib11	L/S	(4)/8/(16)	2	(8)/16/(32)	4

Während die MHK-Werte von Gentamicin und Amikacin für *E. coli* JM109 pHPNE19-06.1 bzw. pAAC(6')-Ib7Δ (AAC(6')-Ib7) und pHPNE-07.1 (AAC(6')-Ib11) und die MHK-Werte von

Gentamicin für *E. coli* JM109 pHPNE-05.1 (AAC(6′)-Ib-wt) mit den Werten von Casin *et al.* vergleichbar sind (\pm eine Verdünnungsstufe), weichen die MHK-Werte von Amikacin für *E. coli* JM109 pHPNE-05.1 um zwei Verdünnungsstufen ab.

Die Abweichungen der MHK-Werte können auch hier auf den unterschiedlichen Expressionsstärken der Promotoren beruhen. Während die Expression des *aac(6′)-Ib-cr*-Gens in den von pUC19 abstammenden Plasmiden vom *Plac*-Promotor reguliert wird, stehen die Gene in den von Casin *et al.* verwendeten Plasmiden unter der Kontrolle eines *Pant*-Promotors (*aac(6′)-Ib7/8*) bzw. unter der Kontrolle ihrer natürlichen regulierenden Region (23).

4.1.5 Ortsgerichtete Mutagenese von AAC(6)-Ib-wt und Varianten

Von AAC(6′)-Ib-wt existiert die Variante AAC(6′)-Ib-cr, bei der durch zwei Punktmutationen zwei Aminosäuren (W102R/D179Y) ausgetauscht sind, wodurch Fluorchinolone mit unsubstituiertem C7-Piperazinylrest, wie Ciprofloxacin und Norfloxacin neben Aminoglykosiden acetyliert werden. Im nachfolgenden sollte untersucht werden, ob es möglich ist von den Varianten AAC(6′)-Ib7 und AAC(6′)-Ib11, die im Vergleich zu AAC(6′)-Ib-wt sich durch eine Mutation bzw. Mutationen an den Positionen 117 bzw. 116/117 unterscheiden und ein verändertes Substratspektrum von Gentamicin und Amikacin zeigen, eine AAC(6′)-Ib-cr-analoge Variante zu erzeugen? Bewirkt bereits eine Veränderung in einer der beiden Positionen, 102 oder 179, eine Erhöhung der MHK von Ciprofloxacin oder Norfloxacin, oder kann dadurch die Funktion des Enzyms beeinträchtigt werden?

Um diese Frage zu klären, wurden in die Plasmide pHPNE19-05.1, pHPNE19-06.1 und pHPNE19-07.1 zunächst jeweils eine der beiden Mutationen, anschließend beide Mutationen eingeführt (3.1.2.1, Seite 104). Danach wurde die Empfindlichkeit von Kanamycin, Ciprofloxacin und Norfloxacin für *E. coli* JM109 mit den erhaltenen Plasmiden bestimmt.

Die Stämme mit den hergestellten Plasmiden pHPNE19-05.1a (AAC(6′)-Ib-102), pHPNE19-05.1b (AAC(6′)-Ib-179), pHPNE19-06.1a (AAC(6′)-Ib7-102), pHPNE19-06.1b (AAC(6′)-Ib7-179), pHPNE19-06.1c (AAC(6′)-Ib7-cr), pHPNE19-07.1a (AAC(6′)-Ib11-102), pHPNE19-07.1b (AAC(6′)-Ib11-179) und pHPNE19-07.1c (AAC(6′)-Ib11-cr) besaßen eine Erhöhung der MHK von Kanamycin im Vergleich zum Referenzstamm *E. coli* JM109 mit bzw. ohne pUC19, was

Diskussion

zeigte das die Enzyme funktionsfähig waren. Jedoch zeigten nicht alle Varianten eine Erhöhung der MHK von Ciprofloxacin und Norfloxacin. Abbildung 4-1 fasst die Erhöhung der Verdünnungsstufen von Ciprofloxacin und Norfloxacin der getesteten Stämme zusammen.

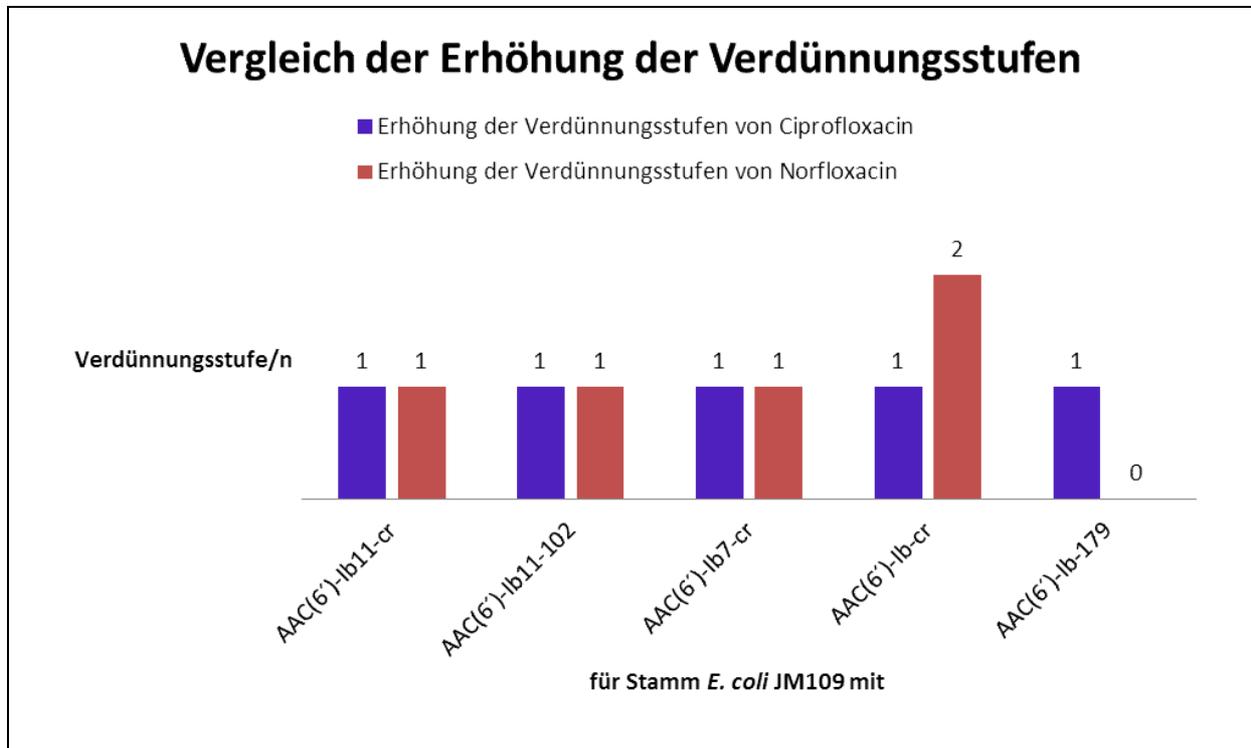


Abbildung 4-1 Darstellung der Erhöhung der Verdünnungsstufen der Stämme *E. coli* JM109 mit AAC(6')-Ib-wt-179, AAC(6')-Ib7-cr, AAC(6')-Ib11-102, AAC(6')-Ib11-cr und AAC(6')-Ib-cr gegenüber *E. coli* JM109 mit bzw. ohne pUC19.

Die Varianten AAC(6')-Ib7-cr, AAC(6')-Ib11-102 und AAC(6')-Ib11-cr zeigten eine Erhöhung der MHK-Werte von Ciprofloxacin und Norfloxacin um eine Verdünnungsstufe. AAC(6')-Ib-179 zeigte jedoch nur eine Erhöhung um eine Verdünnungsstufe von Ciprofloxacin und keine Erhöhung von Norfloxacin. Von Robicsek *et al.* wird hier eine Erhöhung der MHK von Ciprofloxacin von zwei Verdünnungsstufen beschrieben (124). Die Varianten AAC(6')-Ib-wt-102, AAC(6')-Ib7-102, AAC(6')-Ib7-179 und AAC(6')-Ib11-179 zeigten keine Erhöhung der MHK von Ciprofloxacin und Norfloxacin.

Obwohl in *E. coli* JM109 alle rekombinanten Plasmide Resistenz gegenüber Kanamycin vermittelten, wichen die Werte der mutierten Varianten teilweise von ihrem jeweiligen „Wildtyp“ ab. Abbildung 4-2 zeigt die Erhöhung der Verdünnungsstufen von Kanamycin für

die untersuchten Stämme, jeweils ermittelt im Vergleich zu *E. coli* JM109 mit bzw. ohne pUC19.

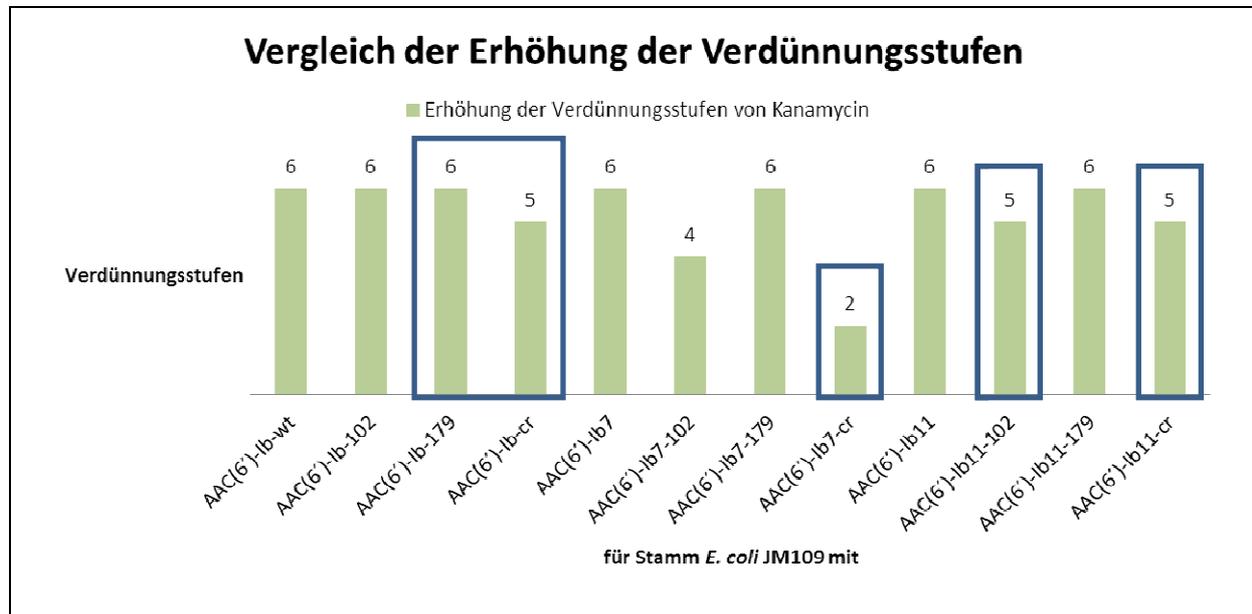


Abbildung 4-2 Darstellung der Erhöhung der Verdünnungsstufen der hergestellten Stämme *E. coli* JM109 mit AAC(6')-Ib-wt, AAC(6')-Ib-102, AAC(6')-Ib-179, AAC(6')-Ib-cr, AAC(6')-Ib7, AAC(6')-Ib7-102, AAC(6')-Ib7-179, AAC(6')-Ib7-cr, AAC(6')-Ib11, AAC(6')-Ib11-102, AAC(6')-Ib11-179 und AAC(6')-Ib11-cr gegenüber *E. coli* JM109 mit bzw. ohne pUC19. Die Markierung zeigt die Stämme, die eine Erhöhung der Resistenz gegenüber Ciprofloxacin und Norfloxacin zeigten.

Während sich im Fall von AAC(6')-Ib-102 und AAC(6')-Ib-179 und bei AAC(6')-Ib7-179 und AAC(6')-Ib11-179 keine Veränderung der Resistenz einstellte, vermindert sich bei AAC(6')-Ib7 und AAC(6')-Ib11 jeweils mit einem W102R-Austausch (AAC(6')-Ib7-102 und AAC(6')-Ib11-102) die Resistenz von Kanamycin im Vergleich zum Ausgangsenzym um zwei bzw. um nur eine Verdünnungsstufe. Die Variante von AAC(6')-Ib11-cr zeigte wie AAC(6')-Ib-cr, lediglich eine Verminderung um eine Verdünnungsstufe im Vergleich zu AAC(6')-Ib11 bzw. AAC(6')-Ib-wt. Das Enzym AAC(6')-Ib7-cr zeigte eine Verminderung der Resistenz gegenüber Kanamycin um vier Stufen im Vergleich zu AAC(6')-Ib7 und eine Erhöhung der MHK von Ciprofloxacin und Norfloxacin.

Es konnte gezeigt werden, dass es möglich ist in einem Subtyp von AAC(6')-Ib, eine AAC(6')-Ib-cr-analoge Variante zu erzeugen. Die Varianten AAC(6')-Ib11-cr, AAC(6')-Ib11-102 und AAC(6')-Ib-179 sind durchaus funktionell, da sie trotz des erhöhten MHK-Wertes von Ciprofloxacin, ihre Resistenz gegenüber Kanamycin nicht verloren haben (Minderung max.

um eine Verdünnungsstufe), wie dies auch bei AAC(6')-Ib-cr der Fall ist (124). Die Frage ist daher, kann eine AAC(6')-Ib-cr-analoge Mutation auch in einem anderen Typ AAC(6')-I entstehen?

4.1.6 Untersuchung von weiteren klinischen Isolaten auf die Anwesenheit eines anderen Typ AAC(6')-I

Zur Herstellung eines analogen Typs von AAC(6')-Ib-cr in einem anderen AAC(6')-I-Subtyp, wurden 28 klinische Isolate mittels PCR auf die Anwesenheit verschiedener AAC(6')-I-Subtypen untersucht. In keinem der 28 untersuchten klinischen Isolate von 1988-1989 wurde die Variante AAC(6')-Ib-cr gefunden (Tabelle 3-11). In den untersuchten Stämmen wurde lediglich AAC(6')-Ic als weiterer Subtyp von AAC(6')-I gefunden.

Durch *in silico* Analyse der Kristallstruktur eines AAC(6')-I-Subtypen mit dem Enzym AAC(6')-Ib, sollten im AAC(6')-I-Subtyp analoge Aminosäuren ausgewählt und durch ortsspezifische Mutagenese gezielt verändert werden, um eine cr-analoge Variante in einem AAC(6')-I-Subtyp zu generieren. Da es von AAC(6')-Ic keine kristallisierte Form für einen Vergleich der Tertiärstruktur mit der Tertiärstruktur von AAC(6')-Ib bzw. AAC(6')-Ib-cr gab, wurde der Vergleich mit AAC(6')-Iy vorgenommen, da hierzu Kristallstrukturen vorlagen. AAC(6')-Iy wurde freundlicherweise von Dr. M. Vetting, New York, zur Verfügung gestellt. AAC(6')-Iy lag kloniert in pET23 mit sechs C-terminalen Histidinresten vor.

4.1.7 *In silico* Analyse von AAC(6')-Ib-wt und AAC(6')-Iy

Die *in silico* Analyse wurde mit AAC(6')-Ib-wt als Referenzstruktur durchgeführt, da es keine Kristallstruktur von AAC(6')-Ib-cr gibt (160). Die Überlagerung von AAC(6')-Ib-wt und AAC(6')-Iy zeigte, dass sich die Position von W102 bzw. D179 in AAC(6')-Ib-wt mit den Positionen Y66 bzw. E136 in AAC(6')-Iy überlagern (siehe Abbildung 3-11, Seite 111), daher wurden die Aminosäuren Y66 und E136 zur gezielten Einführung der Mutation ausgewählt. Die Überlagerung der Tertiärstrukturen der beiden Enzyme zeigte außerdem, dass die Aminosäure D115 in AAC(6')-Ib-wt sich nicht an gleicher Position mit D115 in AAC(6')-Iy befindet. In AAC(6')-Ib-wt und AAC(6')-Iy ist die Aminosäure D115 wesentlich für die enzymatische Aktivität (120, 159). Folglich wurden aufgrund ihrer räumlichen Stellung zu

D115 in AAC(6')-Iy die Aminosäuren W22 und E79 zur gezielten Einführung einer AAC(6')-Ib-cr-analogen Mutation ausgewählt.

4.1.8 Ortsgerichtete Mutagenese von AAC(6')-Iy

Für einen Vergleich aller hergestellten Plasmide untereinander, wurde nun auch *aac(6')-Iy* in das Plasmid pUC19 kloniert (pHPNE19-08). *E. coli* JM109 mit Plasmid pHPNE19-08 zeigte eine Erhöhung der MHK von Kanamycin um 3-4 Verdünnungsstufen im Vergleich zu den Kontrollen *E. coli* JM109 mit und ohne pUC19. In *E. coli* JM83 mit Plasmid pAT711 (*aac(6')-Iy* aus *Salmonella enterica* subsp. *enterica* Serovar Enteritidis BM4362 kloniert in pUC19) zeigte sich im Vergleich zu *E. coli* JM83 eine Erhöhung des MHK-Wertes von Amikacin um 5 Verdünnungsstufen (96). Für *E. coli* JM109 mit Plasmid pHPNE19-08 wurden die MHK-Werte von Amikacin hier leider nicht bestimmt.

Wie bereits unter 3.1.4.1 beschrieben, wurden die Aminosäurepositionen W22, Y66, E79 und E136 zur gezielten Einführung einer AAC(6')-Ib-cr-analogen Mutation ausgewählt, anschließend in pHPNE19-08 eingeführt (3.1.5.2, Seite 113) und charakterisiert (3.1.5.3, Seite 115).

Plasmid pHPNE19-08.09 besitzt mit den Mutationen Y66R und E136Y von der räumlichen Lokalisation der Aminosäuren her betrachtet, die identischen Mutationen wie AAC(6')-Ib-cr mit W102R und D179Y. Der MHK-Wert sowohl von Kanamycin als auch von Ciprofloxacin und Norfloxacin für *E. coli* JM109 mit diesem Plasmid stiegen nicht an. Die Stämme *E. coli* JM109 mit den Plasmiden pHPNE19-08.02 (Y66R) und pHPNE19-08.05 (E136Y), deren *aac(6')-Iy*-Gen jeweils nur eine der beiden Mutationen besitzen, zeigten lediglich eine Erhöhung des MHK-Wertes von Kanamycin um eine bzw. um zwei Verdünnungsstufen im Vergleich zur Kontrolle *E. coli* JM109 und ebenfalls keine Erhöhung der MHK-Werte von Cipro- oder Norfloxacin. In Plasmid pHPNE19-08.04 (E136R), weist AAC(6')-Iy zwar nur eine Mutation auf, besitzt jedoch zusammen mit Y66 die gleichen Aminosäuren wie AAC(6')-Iy mit Y66R/E136Y in pHPNE19-08.09, jedoch mit vertauschten Positionen der Aminosäuren (statt R66/Y136 hier Y66/R136). Auch diese Variante zeigte eine Erhöhung des MHK-Wertes von Kanamycin um eine Verdünnungsstufe im Vergleich zu *E. coli* JM109, allerdings keine Erhöhung der MHK-Werte von Ciprofloxacin und Norfloxacin.

E. coli JM109 mit Plasmid pHPNE19-08.07, welches in AAC(6')-Iy die Mutationen W22R und E79Y besitzt, die in AAC(6')-Iy zu D115 analog lokalisiert sind wie W102R und D179Y zu D115 in AAC(6')-Ib-wt, zeigte keine Erhöhung der MHK-Werte von Kanamycin, Ciprofloxacin und Norfloxacin. *E. coli* JM109 mit Plasmid pHPNE19-08.01 (W22R), welches nur eine der beiden Mutationen besitzt, zeigt eine Erhöhung des MHK-Wertes von Kanamycin um eine Verdünnungsstufe, jedoch ebenfalls keine Erhöhung von Ciprofloxacin und Norfloxacin. Für *E. coli* JM109 mit Plasmid pHPNE19-08.03 (E79Y) wurde ebenfalls keine Erhöhung der MHK-Werte festgestellt. Drei weitere Plasmide, die ebenfalls die Aminosäuren Tyrosin (Y) und Arginin (R) an den entsprechenden Positionen besitzen, pHPNE19-08.10 (W22R und E136Y), pHPNE19-08.08 (Y66R und E79Y) und pHPNE19-08.06 (E79Y und E136R), zeigten keine Erhöhung der MHK der getesteten Antibiotika.

Zusammengefasst zeigten die Daten, dass bereits die Einführung einer einzelnen Mutation in AAC(6')-Iy lediglich zu einer Erhöhung der MHK-Werte von Kanamycin um eine bis zwei Verdünnungsstufen führte, während die Wildtypform von AAC(6')-Iy eine Erhöhung der MHK um drei bis vier Verdünnungsstufen zeigte (Tabelle 3-13). Alle hergestellten Doppelmutationen sowie die Mutation E79Y zeigten keine Erhöhung der MHK-Werte von Kanamycin. Um nachzuweisen, dass alle Enzyme exprimiert wurden und die Reduktion der MHK-Werte von Kanamycin eine Folge der Einführung der Mutationen war, sollte nun die Expression der Enzyme im SDS-Polyacrylamidgel nachgewiesen werden.

4.1.9 Einfluss der eingeführten Mutationen in *aac(6')*-Iy auf die Dimerisierung von AAC(6')-Iy

Aufgrund der Ergebnisse der MHK-Bestimmung für Kanamycin wurde die Expression der rekombinanten Enzyme in einem SDS-Polyacrylamidgel überprüft. Die Expression aller rekombinanten Enzyme konnte im SDS-Polyacrylamidgel nachgewiesen werden. Die Banden lagen in der mit dem Programm Vector NTI berechneten Größe von ca. 16 kDa. Hierbei war ein Unterschied in der Stärke der Banden zwischen den mit IPTG induzierten und nicht induzierten Stämmen zu sehen (Abbildung 3-13), während die Induktion mit IPTG bei der Bestimmung der MHK keine Auswirkung zeigte (Tabelle 3-13). Ein Grund hierfür könnte sein, dass ab einer bestimmten Anzahl von Enzymen limitierende Faktoren einwirken, die, auch wenn mehr Enzym gebildet wird, die Acetylierung einschränken und somit keine höhere

Resistenz, daher keinen höheren MHK-Wert vermitteln. Ein möglicher limitierender Faktor könnte die Menge des Kofaktors Acetyl-Coenzym A sein, welcher für die Zelle, nicht nur zur Acetylierung von Aminoglykosiden zur Verfügung steht. Sicher ist jedoch, dass auch in Abwesenheit von IPTG die Expression der Enzyme stattfand, mit IPTG konnte die Expression der Enzyme noch gesteigert werden, jedoch erhöhte sich dadurch nicht der MHK-Wert. Alle rekombinanten Enzyme werden exprimiert, obwohl die MHK-Werte von Kanamycin stark vermindert oder verlorengegangen waren. Im SDS-Polyacrylamidgel wurden die negativ geladenen, denaturierten Proteine nur nach ihrer monomeren Größe/Ladung aufgetrennt. Da AAC(6')-ly als Dimer funktionsfähig ist (159), entstand Hypothese I, dass die Expression der Monomere zwar stattfand, die Dimerisierung der Monomere jedoch durch die eingeführten Mutation gestört war. Hierbei ist vor allem von Bedeutung, dass das aktive Zentrum des Enzyms durch einen langen anionischen Kanal an der Schnittstelle des einen und des anderen Monomers gebildet wird (159). Fand keine Dimerisierung der AAC(6')-ly-Monomere statt, so bildete sich kein funktionsfähiges aktives Zentrum und somit fand keine Acetylierung statt. Eine zweite Hypothese (Hypothese II) zur geminderten bzw. verlorengegangenen Acetylierungsfähigkeit der mutierten Enzyme war, dass die eingeführten Mutationen selbst, die verschiedenen Wechselwirkungen und Bindungen die zur Bildung des ternären Komplexes aus Enzym, Substrat und Kofaktor führten, störten, was bereits die verminderte Resistenz der Einzelmutationen zeigte, sodass bei einer Doppelmutation keines der getesteten Antibiotika mehr gebunden und acetyliert werden konnte. Denn die aromatischen Ringe von W22 und Y66' liegen ober- und unterhalb des gebundenen Aminoglykosids und die Amino- und Hydroxylgruppen des primären und zentralen Desoxystreptamin-Rings sind in direktem Kontakt mit den Carboxylseitenketten von E79, D115 und E136' (vergleiche 1.3.6.1) (159). Um monomere und dimere Formen der rekombinanten AAC(6')-ly-Enzyme unterscheiden zu können, sollten in einer nativen Gelelektrophorese die Enzyme in ihrer Quartärstruktur aufgetrennt werden.

Die Darstellung und Identifizierung der rekombinanten Enzyme im SDS-Polyacrylamidgel beruhte lediglich auf der Größe der Enzyme und auf einem Vergleich zwischen induziertem und nicht induziertem Expressionszustand, was im nativen Polyacrylamidgel schwer funktionieren würde. Deshalb wurden die ausgewählten Mutationen in pET23::aac(6')-ly eingeführt (Abschnitt 3.1.5.4) und mit dem C-terminalen Ende aus sechs Histidinresten

Diskussion

fusioniert, so dass diese Proteine spezifisch mit Hilfe eines Anti-His (Cterm)/AP Antikörper im Western Blot nachgewiesen werden konnten. Abbildung 4-3 zeigt zunächst vergleichend die Erhöhung der MHK-Werte von Kanamycin in Verdünnungsstufen für die rekombinanten Enzyme der pUC19- und der pET23-Derivate in *E. coli* JM109 bzw. *E. coli* BL21 (DE3), jeweils im Vergleich zu *E. coli* JM109 bzw. *E. coli* BL21 (DE3) ohne Plasmid. Es sind lediglich die Varianten dargestellt, die eine Erhöhung der MHK zeigten. Alle pUC19-Derivate wurden hier als pHPNE19-XX bezeichnet, während die pET23-Derivate als pHPNE23-XX bezeichnet wurden.

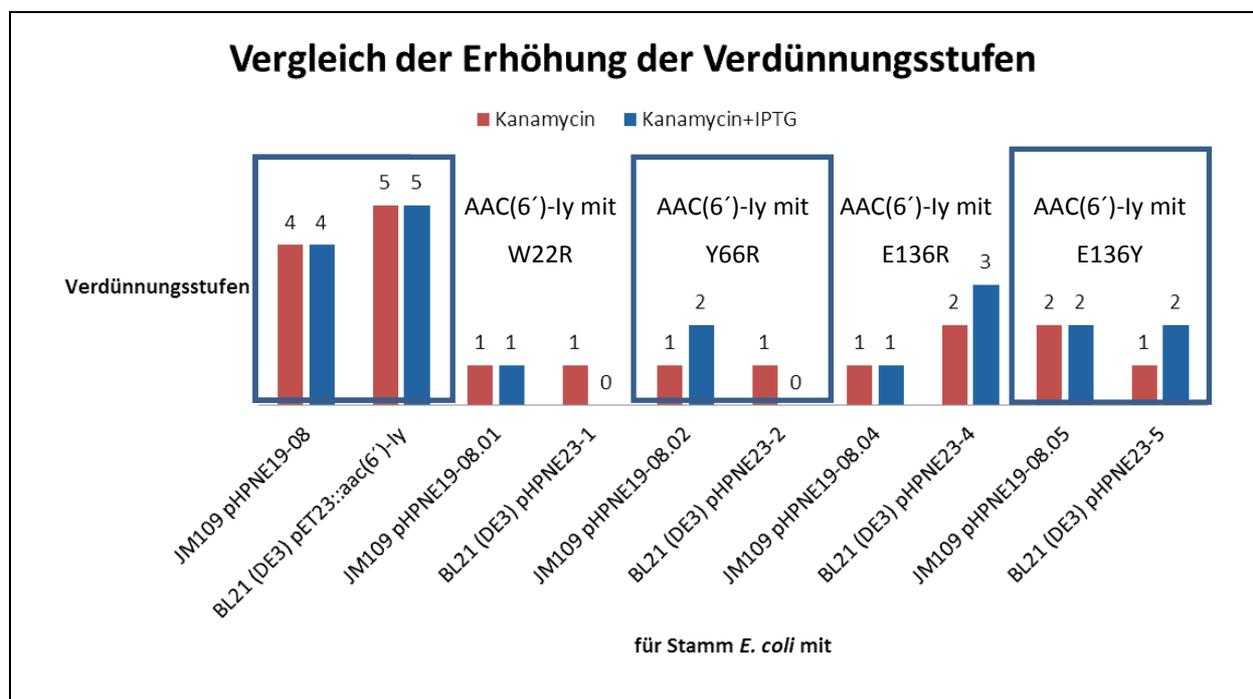


Abbildung 4-3 Die Grafik zeigt vergleichend die Erhöhung der MHK-Werte von Kanamycin in Verdünnungsstufen für die rekombinanten Enzyme der pUC19- und der pET23-Derivate in *E. coli* JM109 bzw. *E. coli* BL21 (DE3), jeweils im Vergleich zu *E. coli* JM109 bzw. *E. coli* BL21 (DE3) ohne Plasmid.

Wie auch in den pUC19-Derivaten, zeigten alle Doppelmutanten sowie pHPNE23-3 mit dem Austausch E79Y keine Erhöhung der MHK-Werte von Kanamycin. Für alle hergestellten rekombinanten Enzyme der pET23-Derivate kann ebenfalls keine Erhöhung der MHK-Werte von Ciprofloxacin und Norfloxacin ermittelt werden. *E. coli* BL21 (DE3) mit Plasmid pET23::aac(6')-ly (AAC(6')-ly-His₆) und *E. coli* JM109 pHPNE19-08 (AAC(6')-ly) zeigten im Vergleich mit *E. coli* BL21 (DE3) bzw. *E. coli* JM109 die gleiche Erhöhung der MHK von Kanamycin (\pm eine MHK-Stufe). Die sechs C-terminalen Histidinreste nahmen keinen Einfluss

auf die Aktivität von AAC(6')-ly. *E. coli* BL21 (DE3) pHPNE23-1 und *E. coli* JM109 pHPNE19-08.01, beide mit einem W22R Austausch in AAC(6')-ly, sowie *E. coli* BL21 (DE3) pHPNE23-5 und *E. coli* JM109 pHPNE19-08.05, beide mit einem E136Y Austausch in AAC(6')-ly, zeigten im Vergleich mit *E. coli* BL21 (DE3) bzw. *E. coli* JM109 die gleiche Erhöhung der MHK von Kanamycin (\pm eine MHK-Stufe). Für *E. coli* JM109 pHPNE19-08.02 im Vergleich mit *E. coli* BL21 (DE3) pHPNE23-2 und für *E. coli* JM109 pHPNE19-08.04 im Vergleich mit *E. coli* BL21 (DE3) pHPNE23-4 war ein Unterschied von ein bis zwei Verdünnungsstufen zu detektieren. Wobei der Unterschied von zwei Verdünnungsstufen lediglich bei den mit IPTG induzierten Stämmen zu sehen ist. Betrachtet man jedoch nur die MHK-Werte der induzierten und nicht induzierten Expression eines Stammes, so liegt der Unterschied bei maximal einer Verdünnungsstufe.

Die Gegenüberstellung der Erhöhung der MHK-Werte von Kanamycin für die jeweils gleichen rekombinanten Enzyme der pUC19 bzw. der pET23-Derivate wurde hier durchgeführt, um die Ergebnisse des nativen Polyacrylamidgels und des Western Blots für die pUC19-Derivate anwenden zu können. Die sechs Histidinreste der exprimierten Enzyme der pET23-Derivate konnten für die folgende Untersuchung nicht entfernt werden, da diese zur Detektion durch den Anti-His (Cterm)/AP Antikörper benötigt wurden.

Die Expression der rekombinanten Enzyme (induziert/nicht induziert) wurde zunächst im SDS-Polyacrylamidgel nachgewiesen, bevor die Proteine in einem nativen Gel aufgetrennt und im durch Western Blot lokalisiert wurden. Um einen Vergleich der Proben der beiden Gele zu schaffen, wurde vor Isolierung der denaturieren und der nativen Proben der entsprechende Stamm bis zu einer bestimmten optischen Dichte angezogen und geteilt, sodass eine Hälfte induziert werden konnte, die andere Hälfte uninduziert blieb. Anschließend wurden die induzierte und die nicht induzierte Probe nochmals geteilt um jeweils Proteine in nativer und in denaturierter Form isolieren zu können.

SDS-Gelelektrophorese und Western Blot

In SDS-Polyacrylamidgel konnten die rekombinanten Enzyme aller *E. coli* BL21 (DE3) Stämme mit den Plasmiden pHPNE23-1 bis pHPNE23-5 im SDS-Polyacrylamidgel nachgewiesen werden (Abbildung 3-14). Hier war jedoch im Gegensatz zu den pUC19-Derivaten kein Unterschied in der Stärke der Banden der induzierten und nicht induzierten Expression der

Diskussion

Proteine zu beobachten. Stamm *E. coli* BL21 (DE3) ohne Plasmid zeigt, wie erwartet, keine Bande bei der ermittelten Größe von ca. 17 kDa. Ebenso wie bei den pUC19-Derivaten wurden alle rekombinanten Proteine der pET23-Derivate exprimiert, obwohl die MHK-Werte im Vergleich zu *E. coli* BL21 (DE3) teilweise unverändert oder nur leicht erhöht waren (Tabelle 3-14).

Im Western Blot des SDS-Polyacrylamidgels wurde auf der gleichen Höhe der kräftigen Banden des SDS-Polyacrylamidgels mit dem Anti-His (Cterm)/AP Antikörper ein Signal detektiert, wobei hier pro Stamm eine breite und eine schmale Bande zu sehen war. Im Fall der schmalen Bande war zwischen induzierten und nicht induzierten Stämmen ein deutlicher Unterschied in der Stärke der Banden zu sehen, während bei der breiten Bande der Unterschied nur sehr gering war (Abbildung 3-15). Der verwendete Antikörper bindet spezifisch sechs C-terminale Histidinreste eines Proteins. Da hier neben den bereits erwähnten Signalen keine weiteren Signale auf der Membran detektiert wurden und auch der Stammhintergrund (*E. coli* BL21 (DE3), Negativkontrolle) kein Signal zeigte, war davon auszugehen, dass das detektierte Signal AAC(6')-ly-His₆-spezifisch sein musste. Plasmid pET23::aac(6')-ly wurde bereits erfolgreich in einer Studie von Vetting *et al.* hergestellt und verwendet (159). Alle hergestellten Derivate pHPNE23-XX entstammten diesem Plasmid sodass eine Positivkontrolle hier nicht verwendet wurde.

Native Gelelektrophorese und Western Blot

Das native Gel zeigte bei allen Stämmen kräftige Banden in unterschiedlicher Höhe. Alle Banden waren jedoch wenig definiert, eher diffus (Abbildung 3-16 (A)). Im Western Blot des nativen Polyacrylamidgels wurden Banden mit dem Anti-His (Cterm)/AP Antikörper detektiert, sie entsprachen der Höhe der kräftigen diffusen Banden im nativen Gel (Abbildung 3-16 (B)). Grundsätzlich befanden sich im Hintergrund des Western Blots des nativen Polyacrylamidgels unspezifische Signale, die im Western Blot des SDS-Gels nicht zu finden waren. Die weitere Betrachtung des Western Blot zeigte außerdem, dass vom Wildtyp-Protein (aus pET23::aac(6')-ly) sowie den Proteinen, die jeweils nur eine einzelne Mutation besaßen, deutlich stärkere Banden entstanden, als von den AAC(6')-ly-His₆-Proteinen mit einer Doppelmutation. Im Western Blot des nativen Polyacrylamidgels war ein weiteres Signal bei dem WT-Protein sowie bei den Proteinen mit den Einzelmutationen Y66R, E79Y, E136R oder E136Y zu sehen. Dieses Signal konnte ebenfalls bei den doppelt-

mutierten Proteinen E79Y/E136R und Y66R/E136Y detektiert werden. Die Banden waren jedoch nicht auf der gleichen Höhe. Es könnte sich hierbei um Abbauprodukte der Enzyme handeln, da kein Proteaseinhibitor zugesetzt wurde.

In einem nativen Polyacrylamidgel werden die Proteine nach ihrer bestehenden Ladung aufgetrennt (137). Dabei hängt das Laufverhalten vom isoelektrischen Punkt (IEP) des Proteins und der Wahl des pH-Wertes des Puffers ab. Hier wurde ein Puffer mit einem pH-Wert von 8,3 verwendet. Die mit Vector NTI ermittelten IEP der Enzyme sind in Tabelle 4-2 zusammengefasst.

Tabelle 4-2 Zusammenfassung der mit Vector NTI ermittelten isoelektrischen Punkte (IEP) der hergestellten Enzyme und der Wildtyp-Form von AAC(6')-ly-His₆, jeweils als Monomer und als Dimer.

Plasmid	Mutation/en	IEP-Monomer-His ₆	IEP-Dimer-His ₆
pET23::aac(6')-ly	-	6,7	6,72
pHPNE23-1	W22R	6,96	7,0
pHPNE23-2	Y66R	6,96	7,0
pHPNE23-3	E79Y	6,96	7,0
pHPNE23-4	E136R	7,38	7,52
pHPNE23-5	E136Y	6,96	7,0
pHPNE23-3a	E79Y/E136R	8,0	8,27
pHPNE23-3b	W22R/E79Y	7,38	7,52
pHPNE23-2a	Y66R/E79Y	7,38	7,52
pHPNE23-2b	Y66R/E136Y	7,38	7,52
pHPNE23-1a	W22R/E136Y	7,38	7,52

Ausgehend davon, dass die von den Plasmiden pET23::aac(6')-ly, pHPNE23-1, pHPNE23-2, pHPNE23-4 und pHPNE23-5 kodierten Enzyme AAC(6')-ly-wt-His₆, sowie AAC(6')-ly-His₆ mit der Mutation W22R, Y66R, E136R oder E136Y als funktionsfähige Dimere vorlagen, da diese in *E. coli* BL21 (DE3) einen erhöhten MHK-Wert von Kanamycin zeigten, so entsprachen die isoelektrischen Punkte den Werten 6,72, 7,0, 7,0, 7,52 bzw. 7,0 (vergleiche Tabelle 4-2, IEP-Dimer-His₆ sowie Abbildung 4-4, Spuren 1-3 sowie 5 und 6). AAC(6')-ly-His₆ mit der Mutation E79Y, welches als Dimer einen ermittelten IEP von 7,0 hätte, lief hier etwas weiter als AAC(6')-ly-His₆ mit der Mutation W22R, Y66R oder E136Y, die als Dimer ebenfalls einen IEP

Diskussion

von 7,0 hatten. AAC(6')-Iy-His₆ mit der Mutation E79Y lief jedoch nicht auf der gleichen Höhe wie die Wildtyp-Form von AAC(6')-Iy-His₆ mit einem IEP von 6,72. Da von AAC(6')-Iy-His₆ mit E79Y auch keine Erhöhung der MHK von Kanamycin festgestellt werden konnte, war davon auszugehen, dass der IEP bei 6,96 lag und AAC(6')-Iy-His₆ mit der Mutation E79Y als Monomer vorlag (vergleiche Abbildung 4-4, Spur 4). AAC(6')-Iy-His₆ mit der Doppelmutation E79Y/E136R hätte als Dimer einen IEP von 8,27, als Monomer einen IEP von 8,0. Die detektierte Bande lief etwas höher als die Bande von AAC(6')-Iy-His₆ mit der Mutation E136R (IEP = 7,52), sodass hier ebenfalls aufgrund der MHK-Werte von Kanamycin davon ausgegangen werden konnte, dass AAC(6')-Iy mit E79Y/E136R einen IEP von 8,0 besitzt und als Monomer vorlag (vergleiche Abbildung 4-4, Spur 7). AAC(6')-Iy-His₆ mit E136R hatte als funktionierendes Dimer einen IEP von 7,52, daher hätten die Doppelmutanten AAC(6')-Iy-His₆ mit den Mutationen W22R/E79Y, Y66R/E79Y, Y66R/E136Y oder W22R/E136Y keinen IEP von ebenfalls 7,52 haben können, da die Enzyme im nativen Gel etwas weiter liefen, als die von AAC(6')-Iy-His₆ mit E136R. Diese Enzyme liefen jedoch ebenfalls nicht auf der Höhe der Banden der Enzyme mit einem IEP von 7,0, sodass aufgrund der MHK-Werte von Kanamycin davon ausgegangen werden konnte, dass die Enzyme AAC(6')-Iy-His₆ mit den Mutationen W22R/E79Y, Y66R/E79Y, Y66R/E136Y oder W22R/E136Y mit einem IEP von 7,38 als Monomere vorlagen (vergleiche Abbildung 4-4, Spur 8-11). Von AAC(6')-Iy-His₆ mit den Mutationen W22R/E79Y wurde eine weitere Bande, oberhalb der zuvor beschriebenen Bande detektiert. Diese lief in ähnlicher Höhe, wie die detektierte Bande von AAC(6')-Iy-His₆ mit der Doppelmutation E79Y/E136R. Eine ähnliche Bande in vergleichbarer Höhe war auch bei den Enzymen AAC(6')-Iy-wt-His₆, sowie bei AAC(6')-Iy-His₆ mit der Mutation Y66R bzw. E79Y zu sehen. Worum es sich hierbei handelt war nicht bekannt.

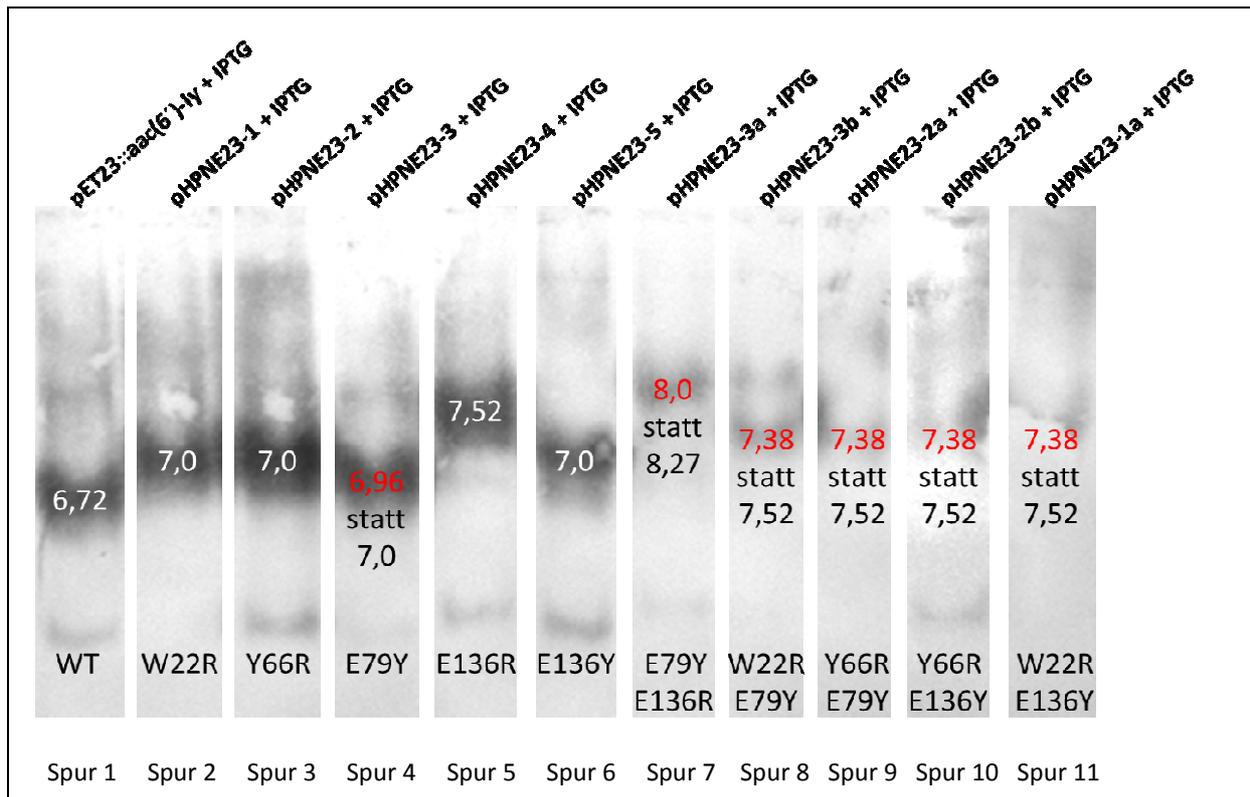


Abbildung 4-4 Darstellung des Western Blots des nativen Gels der Proteine von *E. coli* BL21 (DE3) pET23::aac(6')-ly, pHPNE23-1, pHPNE23-2, pHPNE23-3, pHPNE23-4, pHPNE23-5, pHPNE23-3a, pHPNE23-3b, pHPNE23-2a, pHPNE23-2b und pHPNE23-1a mit Angabe des isoelektrischen Punktes (IEP) und der eingeführten Mutation. IEP der Monomere in Rot, IEP der Dimere in Weiß bzw. Schwarz.

Es konnte gezeigt werden, dass die Position W22, Y66, E79 und E136 eine entscheidende Rolle in der Funktion von AAC(6')-ly bzw. AAC(6')-ly-His₆ sowie für die Dimerisierung spielen. Eine einzelne Mutation an Position W22, Y66 oder E136 in AAC(6')-ly-His₆ führte nicht zum völligen Funktionsverlust des Enzyms, sondern lediglich zu einer Minderung der Funktion, während eine einzelne Mutation an Position E79 in AAC(6')-ly-His₆ sowie die hergestellten Doppelmutationen zum kompletten Verlust der Funktion führte. Die aromatischen Aminosäuren W22 und Y66 befinden sich oberhalb bzw. unterhalb des Aminoglykosids (159). An Position 22 änderte sich die Aminosäure von einem aromatisch, unpolaren Tryptophan (W) zu einem basischen Arginin (R) mit einer Guanidinfunktion, die bei neutralem pH-Wert überwiegend protoniert vorliegen würde. An Position 66 änderte sich die Aminosäure von einem polaren, aromatischen und neutralen Tyrosin (Y) ebenfalls in ein basisches, überwiegend protoniert vorliegendes Arginin (R). Die Carboxylseitenketten der Aminosäuren E79 und E136 (saure Aminosäuren) bilden eine Ionenbindung mit den Aminogruppen oder eine polare Bindung mit den Hydroxylgruppen des primären und zentralen Desoxystreptamin-

Rings wodurch die negative Ladung des aktiven Zentrums entsteht (159). An Position 79 bzw. 136 ändern sich die Aminosäuren von einer sauren Glutaminsäure (E) in ein polares und aromatisches Tyrosin (Y) bzw. an Position 136 zusätzlich in ein basisches Arginin (R). Von keiner der Aminosäuren W22, Y66, E79 und E136 ist eine Funktion für die Dimerisierung bekannt.

Für diese Untersuchung sollte die theoretische Möglichkeit für die Entstehung der oben genannten Mutationen *in vivo* nicht außer Acht gelassen werden. Dazu wurden die Veränderungen der Triplets betrachtet. An Position 22 wurde aus einem Tryptophan ein Arginin (W22R), wie auch in AAC(6')-Ib-cr an Position 102 (W102R), dazu war hier nur eine Punktmutation im notwendig, TGG (Trp) W → CGG (Arg) R. Auch für den Austausch D179Y in AAC(6')-Ib-cr war nur eine Punktmutation nötig. An den Positionen 66, 79 und 136 waren mindestens zwei Punktmutationen im Triplett notwendig um die gewünschte Veränderung zu erzielen. Im Fall des Austauschs von E79Y und E136Y bestand sogar die Möglichkeit der Entstehung eines Stopcodons um die gewünschte Mutation zu erzielen. Dadurch sank theoretisch die Wahrscheinlichkeit für eine solche Mutation *in vivo*.

Da die gezielte Einführung einer AAC(6')-Ib-cr-analogen Mutation in AAC(6')-Iy hier nicht gelang, wurde aus diesem Grund zunächst versucht, durch Zufallsmutagenese Error-prone PCR, eine AAC(6')-Ib-cr-analoge Variante zu erzeugen.

4.1.10 Zufallsmutagenese mittels Fehler verursachender PCR

Begonnen wurde mit der Error-prone PCR von *aac(6')-Ib-wt* (vergleiche Abschnitt 3.1.6.1.1, Seite 125). Die EP-PCR von *aac(6')-Ib-wt* diente in erster Linie als Test für die EP-PCR von *aac(6')-Iy* und zur Etablierung der Bedingungen für den PCR-Ansatz, denn es sollten zwar Basenaustausche eingeführt werden, jedoch nicht zu viele. Die MHK-Werte von Kanamycin und Norfloxacin wurden für die Transformanden mit den Fragmenten aus der EP-PCR bestimmt. Norfloxacin wurde gewählt, da Norfloxacin im Vergleich zu Ciprofloxacin eine Erhöhung der MHK um mindestens ein bis zwei Verdünnungsstufen (bei AAC(6')-Ib-cr im Vergleich zu AAC(6')-Ib-wt) zeigte.

Unter den nach einer Vorauswahl anhand der MHK-Werte näher untersuchten 31 Transformanten mit den Fragmenten aus der EP-PCR von *aac(6')-Ib-wt* befand sich kein Stamm der eine Erhöhung der MHK von Norfloxacin aufwies. Dessen ungeachtet wurden die Transformanten aufgrund der MHK-Werte von Kanamycin und Norfloxacin in elf Gruppen eingeteilt und die Stämme *E. coli* JM109 EP-2-33, EP-2-28 sowie EP-3-54 und EP-3-53 beispielhaft sequenziert, um zu bestimmen, wie viele Mutationen sich durchschnittlich bei den gewählten unterschiedlichen EP-PCR-Ansätzen ereigneten. Die Stämme *E. coli* JM109 EP-2-33 und EP-2-28 entstammten der pUC19 Ligation mit den Insertionen des PCR-Ansatzes, dem 0,05 mM Manganchlorid ($MnCl_2$) hinzugeführt wurde, die Insertionen von *E. coli* JM109 EP-3-54 und EP-3-53 entstammen dem PCR-Ansatz mit 0,1 mM Manganchlorid.

E. coli JM109 EP-2-33 (Gruppe 6) dessen Kanamycin MHK-Wert bei 2 $\mu\text{g/ml}$ lag, besaß fünf Mutationen (Y37STOP, W49STOP, L58H, G125G, F192F), darunter *nonsense*- oder *silent*-Mutationen sowie eine Insertion (+ATAAGCTT). Da die erste Mutation bereits zu einem Stopcodon führte, waren die nachfolgenden im Leserahmen festgestellten Mutationen sowie die Insertion bedeutungslos. Ein MHK-Wert von Kanamycin von 2 $\mu\text{g/ml}$, was einer Erhöhung um zwei Verdünnungsstufen im Vergleich zu *E. coli* JM109 entsprach, ist hierbei nicht zu erklären. *E. coli* JM109 EP-2-28 (Gruppe 11), dessen Kanamycin MHK-Wert mit 64 $\mu\text{g/ml}$ identisch mit dem für *E. coli* JM109 pHPNE19-05.1 war (32-64 $\mu\text{g/ml}$), besaß drei Mutationen (S43A, K126R, Q190R), die jedoch keinen Einfluss auf die Acetylierung von Kanamycin nahmen. *E. coli* JM109 EP-3-54 (Gruppe 9) besaß einen MHK-Wert von Kanamycin von 16 $\mu\text{g/ml}$, was einer Erhöhung um fünf Verdünnungsstufen im Vergleich zu *E. coli* JM109 entsprach, trotz der insgesamt vier Mutationen (R42Q, Q62R, G127D, V186A). *E. coli* JM109 EP-3-53 (Gruppe 10) besaß einen MHK-Wert von Kanamycin von 32 $\mu\text{g/ml}$, (vergleichbar mit *E. coli* JM109 pHPNE19-05.1 (32-64 $\mu\text{g/ml}$)) und zwei *silent*-Mutationen (A95A, F169F), die keine Auswirkung auf die Aktivität des Enzyms hatten.

Die gefundenen Aminosäureaustausche in den sequenzierten Stämmen *E. coli* JM109 EP-2-28 (MHK-Kan 64 $\mu\text{g/ml}$) und EP-3-54 (MHK-Kan 16 $\mu\text{g/ml}$) der EP-PCR von *aac(6')-Ib-wt*, R42Q und S43A, lagen am Ende von Motiv C, K126R und G127D lagen in der Mitte von Motiv A, die Mutationen Q62R, V186A und Q190R lagen in keinem der bereits beschriebenen Motive A-D).

Diskussion

Interessant war hierbei, dass die Mutationen in den beiden Stämmen *E. coli* JM109 EP-2-28 und EP-3-54 in gleichen Bereichen entstanden waren, beispielsweise Position 42/43, 126/127 oder 186/190. Die Mutationen betrafen sowohl das konservierte Motiv C als auch das hochkonservierte Motiv A, jedoch war keine der Seitenketten der Aminosäuren an der Bindung der Substrate beteiligt, denn die Seitenketten sind räumlich nach außen gerichtet. Eine Ausnahme ist hierbei das Glycin an Position 127. Glycin war in *E. coli* JM109 EP-3-54 an Position 127 durch eine Asparaginsäure ausgetauscht. Die Seitenkette der Asparaginsäure tritt möglicherweise in Kontakt (z.B. durch elektrostatische Wechselwirkungen der Carboxygruppe) mit dem Coenzym A treten, vergleiche Abbildung 4-5 (A) mit AAC(6')-Ib-wt und (B) AAC(6')-Ib aus *E. coli* JM109 EP-3-54.

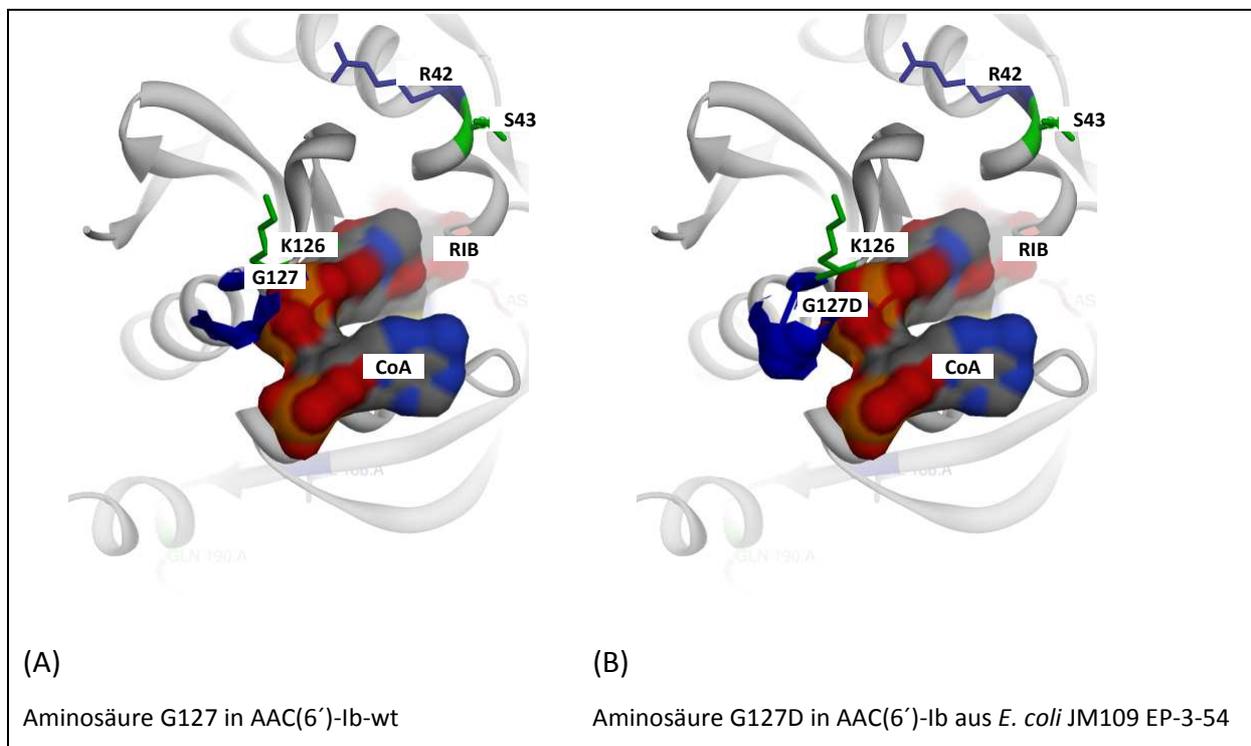


Abbildung 4-5 Darstellung der Tertiärstrukturen von AAC(6')-Ib (PDB Nr. 2bue) kristallisiert mit Ribostamycin (RIB) und Coenzym A (CoA), hier jeweils mit entsprechender Oberfläche dargestellt. (A) AAC(6')-Ib-wt, (B) Variante AAC(6')-Ib aus *E. coli* JM109 EP-3-54. Die Aminosäuren an Position 127 sind ebenfalls mit ihrer Oberfläche dargestellt.

Trotz der ähnlichen Bereiche, die in *E. coli* JM109 EP-2-28 (MHK-Kan 64 µg/ml) und EP-3-54 (MHK-Kan 16 µg/ml) von einer Mutation betroffen waren, wichen die MHK-Werte von Kanamycin um zwei Verdünnungsstufen voneinander ab. In *E. coli* JM109 EP-2-28 zeigten die Mutationen keine Auswirkung auf die Resistenz gegenüber Kanamycin. Der Kanamycin-MHK-Wert von 16 µg/ml der Enzym-Variante von *E. coli* JM109 EP-3-54, deutete in Kombination

mit den gefundenen Mutationen auf eine geminderte Funktion durch geringe Veränderungen in der Faltung des Enzyms oder in der Bindung von Coenzym A hin. Die Mutationen wurden jedoch nicht weiter untersucht.

Nach Untersuchung der vier ausgewählten Stämme, kann hierfür zusammengefasst werden, dass auf einer Gesamtlänge von 607 bp (amplifizierte Länge des Inserts inklusive Primern) 5 bzw. 3 Mutationen bei einer Zugabe von 0,05 mM Manganchlorid und 4 bzw. 2 Mutationen bei einer Zugabe von 0,1 mM Manganchlorid entstanden waren. Um eine statistische Aussage zu treffen hätten mehr als vier Stämme untersucht werden müssen, daher ist dies keine statistisch gesicherte Aussage. Es wurden keine Veränderung in den für die Ausprägung einer AAC(6')-Ib-cr-Variante relevanten Positionen 102 und 179 gefunden und keine andere Mutation entdeckt, die einen ähnlichen Phänotyp wie die AAC(6')-Ib-cr-Variante ausprägt.

Für die EP-PCR von *aac(6')-Iy* wurden die gleichen Bedingungen wie zuvor für die EP-PCR von *aac(6')-Ib* gewählt. Die Transformanten wurden nach PCR und MHK-Bestimmung von Kanamycin und Norfloxacin in insgesamt sechs Gruppen eingeteilt. Hier wurden elf Stämme von ca. 167 Transformanten näher untersucht. Unter den elf Stämmen befanden sich sieben Stämme mit einem PCR-Fragment in korrekter Größe und Orientierung, vier Stämme besaßen ein 250 bp kleines PCR-Fragment, diese wurden mit untersucht. Lediglich die Stämme von Gruppe 5 und 6 zeigten eine Erhöhung der MHK von Kanamycin, darunter befanden sich jedoch keine Stämme, die eine erhöhte MHK von Norfloxacin aufwiesen. Daher wurden keine Stämme zur Sequenzierung ausgewählt. Würde man in den Agar, der zur Selektion der EP-Transformanten mit Ampicillin versehen war, zusätzlich Norfloxacin in einer subinhibitorischen Konzentration hinzugeben, um nur die Transformanten zu erhalten, die eine Erhöhung von Norfloxacin durch zufällige Modifikationen im Gen durch die Error-prone PCR erworben hatten, könnten gleichzeitig Transformanten selektiert werden, die eine chromosomale Fluorchinolonresistenz besitzen, was zur Selektion falsch positiver Transformanten führen würde. Um jedoch die Anzahl der Transformanten zu erhöhen, die das PCR-Fragment in korrekter Orientierung zum Promotor besitzen, könnte Kanamycin in den Agar gegeben werden, da AAC(6')-Iy diese Resistenz in jedem Fall vermitteln würde.

Die zufällige Einführung von Mutationen via Error-prone PCR bietet sehr viele Möglichkeiten und Kombinationen von Mutationen um einen spezifischen Phänotyp eines Stammes zu erhalten, sodass für diese Methode die Bedingungen geändert werden sollten. Alternativ wurde hier jedoch durch Selektion versucht einen spezifischen Phänotyp zu isolieren.

4.1.11 *In vitro* Mutagenese von *E. coli* CSH116

Für die *in vitro* Selektion von *aac(6′)-Ib-wt* und den Varianten *aac(6′)-Ib-102* und *aac(6′)-Ib-179*, sowie *aac(6′)-Iy* wurde *E. coli* CSH116 gewählt, ein Mutator-Stamm mit einem Defekt im *dnaQ*-Gen (vergleiche Abschnitt 3.1.7.1, Seite 134), um die Wahrscheinlichkeit für die Entstehung einer Mutation in *aac(6′)-Ib-wt* und den Varianten *aac(6′)-Ib-102* und *aac(6′)-Ib-179*, sowie *aac(6′)-Iy* zu erhöhen.

Zunächst wurden *E. coli* CSH116-Zellen ohne die zusätzlichen Gene *aac(6′)-Ib-wt*, *aac(6′)-Ib102*, *aac(6′)-Ib179* und *aac(6′)-Iy* selektiert. Dies geschah aus folgenden Gründen. Zum einen sollten die chromosomalen Mutationen in jedem der zu selektierenden Stämme identisch sein. Des Weiteren wurde in den unter 3.1.1.1 untersuchten Stämmen, die Variante *aac(6′)-Ib-cr* lediglich in den Stämmen gefunden, in denen bereits mindestens zwei bis drei chromosomale Mutationen vorhanden waren. Außerdem würden bei der Selektion mit Fluorchinolonen leicht Mutanten mit einer Veränderung in *gyrA* oder *marR* entstehen, diese hätten eine höhere Resistenz, wodurch die Resistenz einer Mutation in *aac(6′)-Ib* überdeckt werden würde.

Für Stamm *E. coli* CSH116 wurde eine Mutationsrate von 2×10^{-8} bzw. $1,1 \times 10^{-8}$ bei der Selektion mit $32 \mu\text{g/ml}$ (= 8 x MHK) bzw. $62 \mu\text{g/ml}$ (= 16 x MHK) Nalidixinsäure bestimmt. Im Vergleich dazu zeigt *E. coli* CSH116 bei einer Bestimmung mit der 4-fachen MHK von Ciprofloxacin eine Mutationsrate von $8,47 \pm 1,3 \times 10^{-8}$ (107).

Stamm *E. coli* CSH116 64-8-33, der aus einem ersten Selektionsschritt mit Nalidixinsäure aus Stamm *E. coli* CSH116 64-8 in einem zweiten Selektionsschritt mit Levofloxacin entstand, besitzt eine *gyrAS83W* Mutation sowie einen Basenaustausch von A→C in der Bindestelle von AcrR-(AcrS). Ein Vergleich der Levofloxacin MHK-Werte für die drei Stämme (*E. coli* CSH116, *E. coli* CSH116 64-8 *E. coli*, CSH116 64-8-33) zeigte, dass der Wert von $0,015 \mu\text{g/ml}$

(*E. coli* CSH116) mit einer *gyrAS83W* Mutation um drei bis vier Verdünnungsstufen auf 0,125-0,25 stieg (*E. coli* CSH116 64-8) und bei einer hinzukommenden zweiten Mutation der Wert noch einmal um zwei bis drei Verdünnungsstufen auf 1 µg/ml anstieg (*E. coli* CSH116 64-8-33).

Bevor jedoch mit Stamm *E. coli* CSH116 64-8-33 weitergearbeitet wurde, wurde untersucht, ob die Mutation in der Bindestelle von AcrR-(AcrS) tatsächlich Einfluss auf die Effluxaktivität nahm.

4.1.12 Einfluss der Mutation in der AcrR-(AcrS) Bindestelle von *E. coli* CSH116 64-8-33 auf die Effluxpumpenexpression

Die Repressoren AcrS (putativ) und AcrR (TetR-Familie) binden den AcrAB-Promotor an der palindromischen (AcrR-(AcrS)-Bindestelle (70, 125). AcrR reprimiert die Expression von *acrAB*, AcrS funktioniert als Schalter für die alternative Expression von *acrAB* und *acrEF* (70). Kann AcrR in *E. coli* CSH116 64-8-33 nun aufgrund des Basenaustausches im Palindrom nicht an die AcrR-(AcrS)-Bindestelle binden, so würde die Expression von *acrAB* in *E. coli* CSH116 64-8-33 steigen. Im Luciferase Assay (3.1.7.1.3, Seite 140) wurde mit Hilfe der Plasmide pPHB331 (103) und pPHB331.1, in denen sich der Promotorbereich von *acrAB* (*PacrAB*) aus dem Ausgangsstamm bzw. aus der Mutante 5' zum Firefly-Luciferase Gen *luc* aus *Photinus pyralis* befand, der Unterschied der Expression der Luciferase durch die Aktivität der Luciferase bestimmt und folglich der Unterschied der Promotoraktivität der beiden Plasmide verglichen (Abschnitt 3.1.7.1.3).

Stamm *E. coli* JM109 mit Plasmid pPHB331.1, das den beschriebenen Basenaustausch im Bereich der palindromischen Bindestelle für AcrR-(AcrS) besaß, siehe Abbildung 4-6 in Rot markiert, zeigte eine zu 79,9 % höhere Expression der Luciferase, also eine zu 79,9 % höhere *PacrAB*-Promotoraktivität, im Vergleich zu *E. coli* JM109 mit Plasmid pPHB331, ohne diese Mutation.

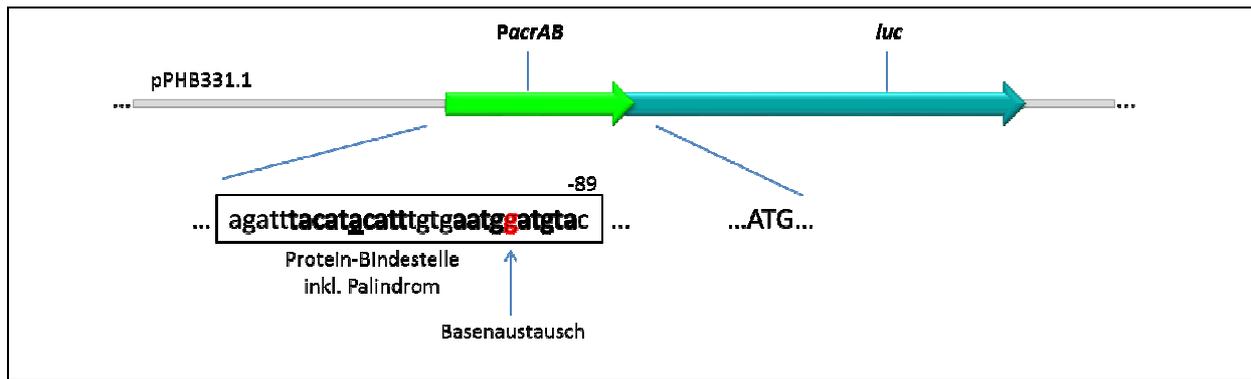


Abbildung 4-6 Darstellung des Ausschnitts der Promotorregion von Plasmid pPHB331.1, nach Hirakawa *et al.* (70), modifiziert. In Rot wurde der Basenaustausch markiert. *Luc* ist die Abkürzung für Luciferase-Gen, *PacrAB* bezeichnet den Promotor des *acrAB*-Gens.

Dieses Ergebnis legte die Vermutung nahe, dass AcrR aufgrund der Mutation in der Bindestelle von AcrR nicht binden kann und somit die Expression der Luciferase bzw. von *acrAB* erhöht ist.

Inwiefern die erhöhte Expression der Luciferase in *E. coli* JM109 pPHB331.1 genau auf die erhöhte Expression in *E. coli* CSH116 64-8-33 übertragen werden kann, ist noch offen. Sicher ist jedoch, dass *E. coli* CSH116 64-8-33 mit dem identifizierten Basenaustausch in der palindromischen Bindestelle AcrR-(AcrS) der Promotorregion *PacrAB* einen erhöhten Efflux besitzt, was durch das Ergebnis der Bestimmung der MHK-Werte von Chloramphenicol und Levofloxacin mit und ohne Zugabe des Effluxpumpeninhibitor Phe-Arg β -Naphthyl-amid Dihydrochlorid unterstützt wird (vergleiche Tabelle 3-18, Seite 136). Diese Mutation wurde hier jedoch nicht näher untersucht. Zur genaueren Analyse sollte hier jedoch noch einmal die Expression der Gene *acrRAB* in den Stämmen *E. coli* CSH116, *E. coli* CSH116 64-8 und *E. coli* CSH116 64-8-33 bestimmt werden.

4.1.13 In vitro Selektion von *aac(6')*-*lb*-wt, *aac(6')*-*lb*-102, *aac(6')*-*lb*-179 und *aac(6')*-*ly* in *E. coli* CSH116 64-8-33

Nach Einführung der zwei chromosomalen Mutationen in Stamm *E. coli* CSH116 64-8-33 wurden Zellen dieses Stammes mit den Plasmiden pHPNE19-05.1 (*aac(6')*-*lb*-wt), pHPNE19-05.1a (*aac(6')*-*lb*102), pHPNE19-05.1b (*aac(6')*-*lb*179) und pHPNE19-08 (*aac(6')*-*ly*), sowie mit den Plasmiden pUC19 und pHPNE19-01.1b (*aac(6')*-*lb*-cr) transformiert, anschließend wurden die MHK-Werte bestimmt (Tabelle 3-20). Die MHK-Werte für *E. coli* CSH116 64-8-33 mit Plasmid pHPNE19-01.1b (*aac(6')*-*lb*-cr) wurden bestimmt, da hier der MHK-Wert von Norfloxacin zur Orientierung für die Selektion diene. Die MHK-Werte für *E. coli* CSH116 64-

8-33 mit Plasmid pUC19 dienten als Referenzwerte. Ferner wurden die Stämme *E. coli* CSH116 64-8-33 mit Plasmid pHPNE19-05.1 (*aac(6')*-*lb-wt*), pHPNE19-05.1a (*aac(6')*-*lb102*), pHPNE19-05.1b (*aac(6')*-*lb179*) bzw. pHPNE19-08 (*aac(6')*-*ly*) mit der 2-fachen und der 4-fachen MHK selektiert und gleichzeitig die Mutationsraten der Stämme bestimmt.

Die Stämme *E. coli* CSH116 64-8-33 mit Plasmid pHPNE19-05.1 (*aac(6')*-*lb-wt*), pHPNE19-05.1a (*aac(6')*-*lb102*), pHPNE19-05.1b (*aac(6')*-*lb179*) bzw. pHPNE19-08 (*aac(6')*-*ly*) zeigten eine Erhöhung der MHK-Werte von Kanamycin, *E. coli* CSH116 64-8-33 pHPNE19-05.1b (*aac(6')*-*lb179*) zeigte ebenfalls eine Erhöhung der MHK von Norfloxacin um eine Verdünnungsstufe. Bei einer Konzentration von 2 µg/ml Norfloxacin konnte bei den Stämmen mit den Plasmiden pHPNE19-01.1b (*aac(6')*-*lb-cr*), pHPNE19-05.1b (*aac(6')*-*lb-179*) und pHPNE19-08 (*aac(6')*-*ly*) die Mutationsrate, aufgrund der zu stark bewachsenen Agarplatte, nicht bestimmt werden. Die Stämme *E. coli* CSH116 64-8-33 pHPNE19-01.1b (*aac(6')*-*lb-cr*) und *E. coli* CSH116 64-8-33 pHPNE19-05.1b (*aac(6')*-*lb-179*) besaßen bereits eine MHK von Norfloxacin von 4 bzw. 2 µg/ml, was das starke Wachstum erklären würde. *E. coli* CSH116 64-8-33 pHPNE19-08 (*aac(6')*-*ly*) besitzt eine MHK von 1 µg/ml für Norfloxacin, doch auch hier konnten die Platten nicht ausgewertet werden. Bei einer Konzentration von 4 µg/ml Norfloxacin konnten für alle Stämme Mutationsraten bestimmt und somit untereinander verglichen werden. Die Stämme *E. coli* CSH116 64-8-33 mit bzw. ohne pUC19 hatten mit ca. 7×10^{-10} die geringste Mutationsrate, gefolgt von *E. coli* CSH116 64-8-33 pHPNE19-08 (*aac(6')*-*ly*) und *E. coli* CSH116 64-8 mit ca. 1×10^{-9} . Im Vergleich mit den Stämmen, die eine Variante des *aac(6')*-*lb*-Gens besitzen, zeigte die wt-Variante ($9,71 \times 10^{-8}$) die höchste und die cr-Variante ($7,50 \times 10^{-9}$) die geringste Mutationsrate. Die Mutationsraten der Varianten mit jeweils einer der beiden Mutationen, entweder an Position 102 oder an Position 179, lagen mit $8-9 \times 10^{-9}$ dazwischen, daher wäre die theoretische Möglichkeit, dass in diesen Stämmen eine Mutation entsteht höher als bei der cr-Variante, jedoch niedriger als bei der wt-Variante.

Bei der *in vitro* Selektion mit selektiven Agarplatten wurden die Stämme *E. coli* CSH116 64-8-33 mit Plasmid pHPNE19-05.1 (*aac(6')*-*lb-wt*), pHPNE19-05.1a (*aac(6')*-*lb102*), pHPNE19-05.1b (*aac(6')*-*lb179*) bzw. pHPNE19-08 (*aac(6')*-*ly*) sprunghaft erhöhten Antibiotikumkonzentrationen ausgesetzt, um Mutanten zu generieren (Abschnitt 3.1.7.2.1,

Diskussion

Seite 144). Die erhaltenen Stämme wurden verwahrt und durch Bestimmung der MHK, sowie PCR und RFLP näher untersucht. Von *E. coli* CSH116 64-8-33 pHPNE19-05.1b konnten jedoch bei der Selektion mit 2 µg/ml Norfloxacin aufgrund des einheitlichen starken Wachstums keine Stämme gesichert werden. Bei *E. coli* CSH116 64-8-33 pHPNE19-08 wurden trotz des sehr starken Wachstums, einige deutliche gewachsene Kolonien isoliert. Folgende Abbildung 4-7 zeigt grafisch die Anzahl der insgesamt verwahrten Stämme der Selektion, außerdem die Anzahl der durch PCR und RFLP näher untersuchten Stämme und die Identifizierung der Variante von *aac(6')-Ib*.

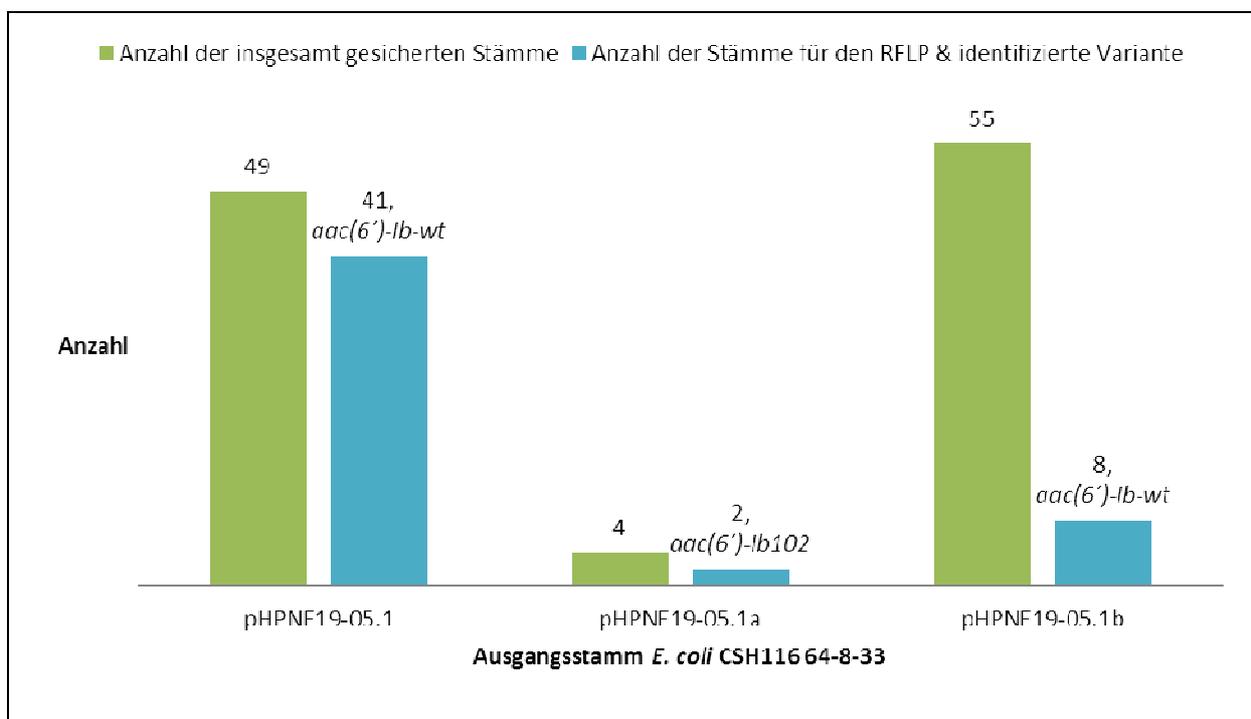


Abbildung 4-7 Darstellung des Ergebnisses der Selektion von Stamm *E. coli* CSH116 64-8-33 mit den Plasmiden pHPNE19-05.1, pHPNE19-05.1a und pHPNE19-05.1b. Die Stämme *E. coli* CSH116 64-8-33 pHPNE19-05.1, pHPNE19-05.1a, pHPNE19-05.1b wurden via RFLP untersucht.

Die untersuchten Stämme der Selektion von *E. coli* CSH116 64-8-33 pHPNE19-05.1 (*aac(6')-Ib-wt*) und *E. coli* CSH116 64-8-33 pHPNE19-05.1a (*aac(6')-Ib-102*) entsprachen an den Positionen 102 und 179 jeweils ihrem Ausgangsstamm. Bei den acht durch RFLP näher untersuchten Stämmen aus der Selektion von *E. coli* CSH116 64-8-33 pHPNE19-05.1b (*aac(6')-Ib-179*) wurden nur *aac(6')-Ib-wt*-Varianten gefunden. Jedoch war hier nicht von einer Rückmutation in Codon 179 in allen acht Stämmen auszugehen, sondern vermutlich von einer Verwechslung der Agarplatten mit den *E. coli* CSH116 64-8-33 pHPNE19-05.1b-Kolonien (*aac(6')-Ib-179*) mit den Agarplatten mit den *E. coli* CSH116 64-8-33 pHPNE19-05.1-

Kolonien (*aac(6')-Ib-wt*). Alle hier zum RFLP ausgewählten Stämme besaßen einen leicht erhöhten MHK-Wert von Norfloxacin, der vermutlich durch chromosomale Fluorchinolonresistenz-Mutationen vermittelt wurde.

Da die Möglichkeit eines RFLPs oder der ARMS-PCR für *aac(6')-Iy* nicht bestand, wurde von ausgewählten Stämmen Plasmid isoliert und in *E. coli* JM109 retransformiert. Die Retransformation der selektierten Plasmide diente dazu MHK-Werte in einen Stamm bestimmen zu können, in denen keine chromosomalen Mutationen vorlagen. Somit konnte eine durch die selektierten Plasmide vermittelte Resistenz besser von einer möglichen entstandenen chromosomalen Resistenz in *E. coli* CSH116 64-8-33 pHPNE19-08 unterschieden werden. Nach der Bestimmung der MHK-Werte von 170 *E. coli* JM109 Retransformanden durch die Agardilutionsmethode, entsprach lediglich Stamm *E. coli* JM109 pHPNE19-08 Nr. 41/4 dem Wachstumsverhalten von *E. coli* JM109 pHPNE19-01.1b (*aac(6')-Ib-cr*) (siehe Abbildung 3-31, Seite 151). Die Sequenzierung zeigte jedoch, dass in *aac(6')-Iy* von Stamm *E. coli* JM109 pHPNE19-08 Nr. 41/4 keine Veränderung vorhanden war. Grund für das gezeigte Wachstumsverhalten können spontane chromosomale Mutationen sein, die während des Wachstums in der Vertiefung der 96-Well Platte entstanden oder sich während des Wachstums auf der Agarplatte ereigneten. Auf eine Verwahrung des Stammes wurde hier jedoch verzichtet, daher wurde dieser auch nicht näher untersucht.

Da durch die *in vitro* Selektionsmethode mit Hilfe von selektiven Agarplatten keine gewünschte Mutation erzielt werden konnte, wurde im Folgenden versucht schrittweise Mutanten auf ansteigenden Antibiotikumkonzentrationen im Medium zu selektieren.

Bei der Selektion der Stämme *E. coli* CSH116 64-8-33 mit Plasmid pHPNE19-05.1 (*aac(6')-Ib-wt*), pHPNE19-05.1a (*aac(6')-Ib102*), pHPNE19-05.1b (*aac(6')-Ib179*) bzw. pHPNE19-08 (*aac(6')-Iy*) in Flüssigkultur wurde darauf geachtet, dass durch eine konstante Konzentration von Ampicillin, das Plasmid des jeweiligen Stammes nicht verloren ging. Die Konzentration von Norfloxacin wurde stetig angepasst bzw. erhöht.

Auch der stetige Anstieg der Konzentration von Norfloxacin und das Passagieren der Stämme zur Selektion einer Mutation an Position 102 und/oder 179 in *aac(6')-Ib* bzw. eine Mutation

Diskussion

von *aac(6')-Ib* die zu einem *aac(6')-Ib-cr*-analogen Phänotyp führt, gelang hier nicht. Ein Überblick der untersuchten Stämme und derer, die das zu selektierende Gen „noch“ besaßen, zeigt folgende Abbildung 4-8.

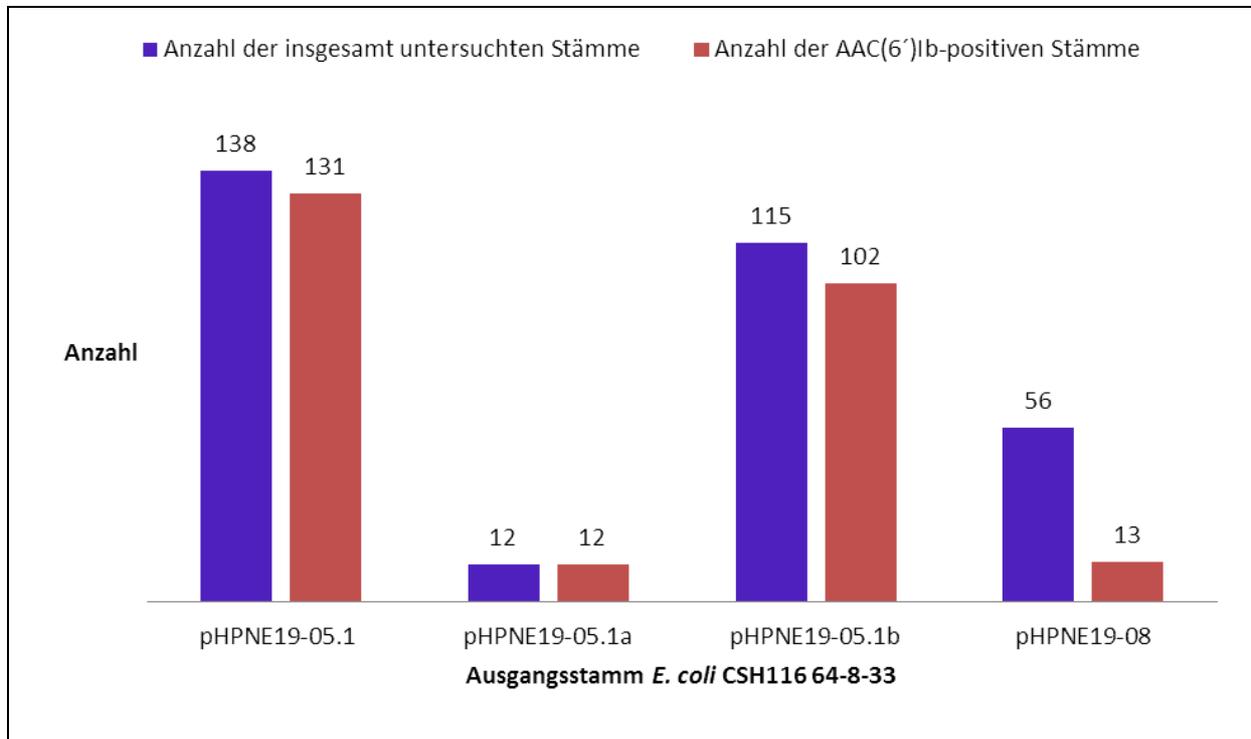


Abbildung 4-8 Darstellung der Anzahl der insgesamt untersuchten und der *aac(6')-Ib*-positiven Stämme der Selektion von *E. coli* CSH116 64-8-33 mit den Plasmiden pHPNE19-05.1, pHPNE19-05.1a und pHPNE19-05.1b in Flüssigkultur.

Stamm *E. coli* CSH116 64-8-33 pHPNE19-05.1a (*aac(6')-Ib-102*) ließ sich nur sehr schwer selektieren, denn im Vergleich zu den anderen drei Stämmen (*E. coli* CSH116 64-8-33 mit Plasmid pHPNE19-05.1, pHPNE19-05.1b und pHPNE19-08), die kontinuierlich in eine höhere Konzentration angeimpft werden konnten, wuchs *E. coli* CSH116 64-8-33 pHPNE19-05.1a nicht nach jeder Passage an, sodass hier auf die Dauerkultur zurückgegriffen werden musste. Da alle Stämme gleich behandelt wurden und bis auf die unterschiedlichen Mutationen der Gene *aac(6')-Ib* auf den jeweiligen Plasmiden alle identisch sind, muss dieses Problem an der Mutation des Plasmids (*aac(6')-Ib-102*) gelegen haben. Hier konnten auch nur Stämme gesichert werden, die bei einer Konzentration von 6 µg/ml selektiert wurden, alle Versuche, Stämme, die mit einer höheren Konzentration selektiert worden waren, auf einer Agarplatte mit der gleichen Konzentration weiter zu züchten, blieben erfolglos. Auffällig war, dass ab einer Konzentration von 372 µg/ml, 258 µg/ml bzw. ab 30 µg/ml die untersuchten

selektierten Stämme *E. coli* CSH116 64-8-33 pHPNE19-05.1, *E. coli* CSH116 64-8-33 pHPNE19-05.1b und *E. coli* CSH116 64-8-33 pHPNE19-08 ihr Plasmid verloren hatten, bzw. das entsprechende Gen durch PCR nicht mehr detektiert werden konnte. Interessant war hierbei, dass die Stämme trotz des Verlustes ihres jeweiligen Plasmids mit der Ampicillin-Resistenz bei einer Konzentration von 50 µg/ml Ampicillin anwuchsen. Möglicherweise entstanden hier chromosomale Mutationen die zu einem erhöhten MHK-Wert von Ampicillin führten. Eine andere Möglichkeit ist der Einbau des plasmidkodierten und Ampicillin-Resistenz vermittelnden *bla*-Gens ins Chromosom, bei gleichzeitigem Verlust des übrigen Plasmids oder des *aac(6')-Ib*-Gens. Dazu wurden beispielhaft zwei Stämme *E. coli* CSH116 64-8-33 pHPNE19-05.1 sel 620 und pHPNE19-05.1 sel 744 in Abschnitt 4.1.14, Seite 213 näher untersucht.

Von den *E. coli* JM109-Zellen, die mit Plasmiden der Selektion von *E. coli* CSH116 64-8-33 pHPNE19-08 (*aac(6')-Iy*) retransformiert worden waren, wurde von drei Stämmen das *aac(6')-Iy*-Gen aufgrund der unterschiedlichen MHK-Werte von Kanamycin sequenziert, auch wenn keiner dieser Stämme eine Erhöhung der MHK von Norfloxacin aufwies. Es zeigte sich, dass keiner der sequenzierten Stämme (*E. coli* JM109 mit Plasmid pHPNE19-08/20-5-10, pHPNE19-08/20-6-4 und pHPNE19-08/20-11-1, siehe Abbildung 3-39) einen Unterschied zum Ausgangsplasmid pHPNE19-08 in dem sequenzierten Bereich aufwies. Möglicherweise fanden Veränderungen in solchen Bereichen der Plasmide statt, die hier nicht sequenziert wurden, die jedoch Einfluss auf die Vermittlung der Resistenz gegenüber Kanamycin nahmen.

4.1.14 Charakterisierung der Stämme *E. coli* CSH116 64-8-33 pHPNE19-05.1 sel 620 und *E. coli* CSH116 64-8-33 pHPNE19-05.1 sel 744

Von den Stämmen *E. coli* CSH116 64-8-33 pHPNE19-05.1 sel 620 und *E. coli* CSH116 64-8-33 pHPNE19-05.1 sel 744 wurden die chromosomalen Gene *marR*, *acrR*, *gyrA* und *parC* sequenziert, da die Stämme sehr hohe MHK-Werte von Norfloxacin besaßen (640 bzw. 1280 µg/ml) und die MHK-Werte von Ampicillin ebenfalls bei 125 bzw. 62,5 µg/ml lagen, obwohl *aac(6')-Ib*, welches auf Plasmid pHPNE19-05.1 mit dem *bla*-Gen lokalisiert ist, nicht zu detektieren war.

Diskussion

In *E. coli* CSH116 64-8-33 pHPNE19-05.1 sel 620 ereigneten sich im Vergleich zu *E. coli* CSH116 64-8-33 drei zusätzliche Mutationen (+ *gyrAD87G*, *parCS80R*, *parCE84K*) in den Zielgenen der Fluorchinolone *gyrA* und *parC*. Diese führten zu einem geringeren Norfloxacin-MHK Wert im Vergleich zu *E. coli* CSH116 64-8-33 pHPNE19-05.1 sel 744 mit nur zwei weiteren chromosomalen Mutationen (+ *gyrAD87Y*, *parCE84G*) in *gyrA* und *parC*. Die Ampicillin-MHK Werte waren von *E. coli* CSH116 64-8-33 pHPNE19-05.1 sel 620 um eine Verdünnungsstufe höher als von *E. coli* CSH116 64-8-33 pHPNE19-05.1 sel 744. Möglicherweise entstanden während der Selektion der Stämme *E. coli* CSH116 64-8-33 mit den Plasmiden pHPNE19-05.1, pHPNE19-05.1a und pHPNE19-05.1b sowie *E. coli* CSH116 64-8-33 pHPNE19-08 bevorzugt chromosomale Mutationen in den Zielgenen der Fluorchinolone, jedoch nicht im jeweiligen Plasmid.

4.1.15 Fazit und Ausblick

Alle verwendeten Methoden zur Generierung einer *aac(6')-Ib-cr*-analogen Variante in *aac(6')-Iy*, von der gezielten Einführung von Mutationen in *aac(6')-Iy* nach *in situ* Analyse, über die Zufallsmutagenese durch EP-PCR und durch die *in vitro* Evolution von *aac(6')-Iy* mit Hilfe des DnaQ-defizienten Mutator-Stammes *E. coli* CSH116, die durch die Selektion der Stämme mit Hilfe von Agarplatten sowie durch die Selektion der Stämme in Flüssigkultur durchgeführt wurde, führten nicht zur Selektion einer *aac(6')-Ib-cr*-analogen Variante. Durch die verwendeten Methoden konnte außerdem die Entwicklung einer *aac(6')-Ib-cr*-Variante aus *aac(6')-Ib-wt*, *aac(6')-Ib-102* und *aac(6')-Ib-179* nicht nachgestellt werden. Daher ist noch unklar, wie die Mutation von *aac(6')-Ib-cr* aus *aac(6')-Ib-wt* entstehen konnte. Lediglich die gezielte Einführung der Mutation W102R und D179Y in AAC(6')-Ib7 und AAC(6')-Ib11 führte erfolgreich zu AAC(6')-Ib-cr-analogen Varianten.

Da AAC(6')-Iy nur als Dimer funktionsfähig ist und entscheidende Aminosäuren eine Funktion in der Dimerisierung übernehmen, stellt die gezielte Einführung einer *aac(6')-Ib-cr*-analogen Modifikation in AAC(6')-Iy eine große Herausforderung dar. Die Entstehung einer *aac(6')-Ib-cr*-analogen Modifikation in einem sehr komplexen Oligomer, wie beispielsweise Hpa2, welches aus zwei homologen Dimeren ein Tetramer bildet, ist daher sehr unwahrscheinlich. Gelingt jedoch eine *aac(6')-Ib-cr*-analoge Modifikation in AAC(6')-Iy, so ist die *aac(6')-Ib-cr*-analoge Modifikation in Hpa2 theoretisch, aufgrund der Ähnlichkeiten nicht auszuschließen. Hierzu sollten jedoch zuvor die Aminosäuren, die zur Dimerisierung nötig sind eindeutig

identifiziert werden. Diese Arbeit liefert dazu erste Anhaltspunkte. Die Modellierung eines Fluorchinolons in AAC(6')-Iy wäre als Basis für die Auswahl potenzieller Aminosäuren sehr hilfreich. Dazu wäre es wichtig die exakte Lage und die molekularen Interaktionen von Cipro- bzw. Norfloxacin mit AAC(6')-Ib-cr zu kennen, dazu liegen jedoch noch keine Daten aus einer Kristallisation vor. Die Methode der Error-prone-PCR zu Generierung der Modifikation erwies sich hier, aufgrund der großen Anzahl, der Variation und Kombination von möglichen Mutationen, als wenig geeignet um einen bestimmten Phänotyp zu erhalten.

4.2 Einfluss von plasmidkodierten und chromosomalen Resistenzmechanismen auf die Aktivität verschiedener Fluorchinolone in isogenen *Escherichia coli* Isolaten

In Anbetracht der therapeutischen Bedeutung der (Fluor)chinolone und aufgrund der ansteigenden Entwicklung von plasmidkodierten Resistenzmechanismen in Kombination mit bereits vorhandenen chromosomalen Resistenzmechanismen gegenüber (Fluor)chinolonen, sollte zum einen geklärt werden, wie effektiv Finafloxacin, ein Antibiotikum der neuesten Generation, gegenüber bekannten chromosomalen und plasmidkodierten Resistenzmechanismen im Vergleich zu den älteren Fluorchinolonen Ciprofloxacin, Levofloxacin oder Moxifloxacin arbeiten und außerdem inwieweit der pH-Wert des umgebenden Milieus die Wirksamkeit des „neuen“ im Vergleich mit den „alten“ (Fluor)chinolonen beeinflusst. Dazu wurden die MHK-Werte für verschiedene isogene Stämme in Kombination mit den plasmidkodierten Fluorchinolonresistenz vermittelnden Genen *qepA*, *qnrA1*, *qnrB1*, *qnrS1*, *aac(6')-Ib-cr* von Finafloxacin, Ciprofloxacin, Levofloxacin und Moxifloxacin bei einem pH-Wert von 5,8 bzw. 7,2 bestimmt.

Für die Kombination von chromosomalen und plasmidkodierten Resistenzmechanismen wurden die Gene *qnrS1* und *aac(6')-Ib-cr* in pUC19 und *qnrB1* in pUC18 *in frame* unter Kontrolle des *Plac* Promotors eingebracht. *QnrA1* (657 bp) wurde als 912 bp-großes Fragment von pMG252 mit seinem eigenen Promotor in pUC19 kloniert und *qepA* lag bereits kloniert in Plasmid pSTV28 vor.

4.2.1.1 Einfluss des pH-Wertes auf die Aktivität der Fluorchinolone

Finafloxacin zeigte bei einem pH-Wert 5,8 die niedrigsten MHK-Werte im Vergleich zu den getesteten Fluorchinolonen bei pH 5,8, während die MHK-Werte von Finafloxacin bei einem pH-Wert von 7,2 etwas höher (maximal Faktor 16) lagen als die der anderen getesteten Fluorchinolone bei pH 7,2. Finafloxacin zeigte bereits in verschiedenen Untersuchungen in saurem Milieu exzellente Wirkung gegenüber gramnegativen und grampositiven Erregern wie *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. mirabilis*, *M. morgani* und *H. pylori*, sowie *S. aureus*, *S. saprophyticus* und *S. agalactiae* (20, 88, 166).

4.2.1.2 Einfluss der chromosomalen Resistenzmechanismen auf die Aktivität der Fluorchinolone

Ein Überblick der Faktoren der Erhöhung der MHK-Werte von Fina-, Cipro-, Levo- und Moxifloxacin (pH 5,8 und pH 7,2) der isogenen Stämme zeigt Abbildung 4-9.

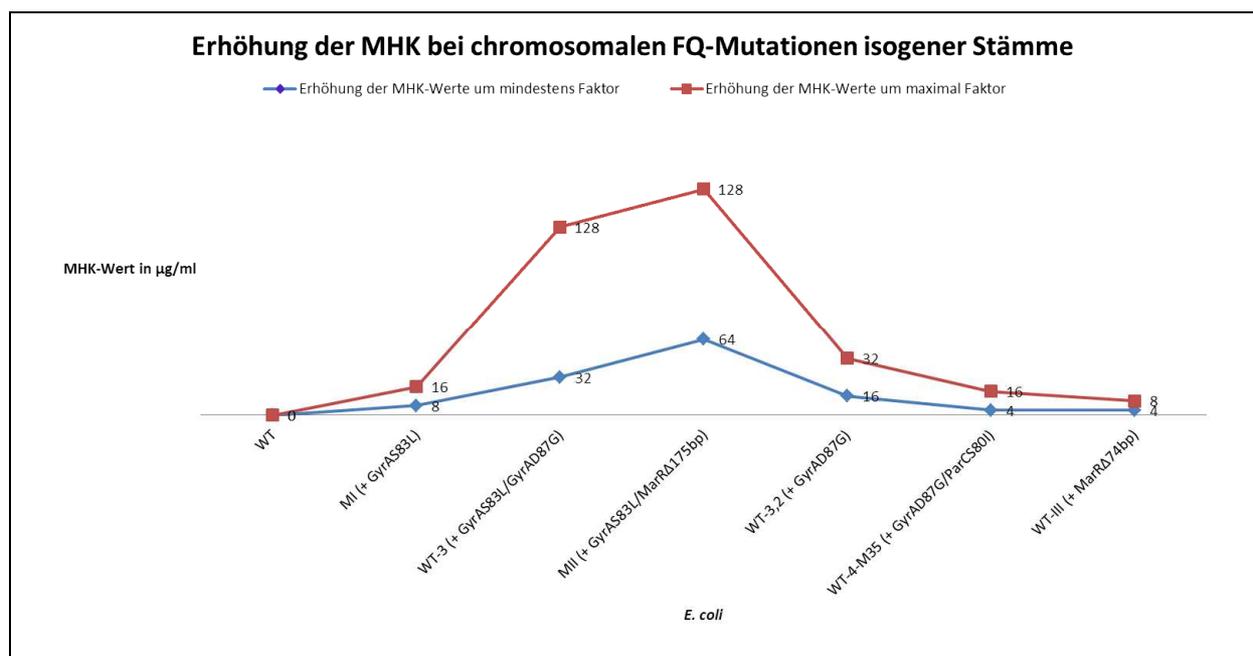


Abbildung 4-9 Die Grafik zeigt die minimale und die maximale Erhöhung der MHK-Werte für die isogenen Stämme von den untersuchten Antibiotika bei pH 5,8 und pH 7,2, ausgedrückt durch den ermittelten Faktor.

Stamm *E. coli* MII mit einer *gyrAS83L*-Mutation und einer *marRΔ175bp*-Deletion zeigte die maximalste Erhöhung der Faktoren bzw. der MHK-Werte, gefolgt von *E. coli* WT-3 mit ebenfalls einer *gyrAS83L*-Mutation in Kombination mit einer *gyrAD87G*-Mutation. *E. coli* MII (*gyrAS83L*) und *E. coli* WT-3.2 (*gyrAD87G*) vermittelte ähnlich hohe Resistenzen. Eine *marR-*

Deletion in *E. coli* WT-III (*marR*Δ74bp) vermittelte den geringsten MHK-Wert von den untersuchten Antibiotika, die Kombination der Mutationen *gyrAD87G* und *parCS80I* (*E. coli* WT-4-M35) zeigte hingegen einen etwas höheren MHK-Wert als *E. coli* WT-III.

Die Stämme *E. coli* WT, MI und MII, die mit einem MHK-Werte von Ciprofloxacin (pH 7,2) von 0,015 µg/ml, 0,25 µg/ml bzw. 1 µg/ml bestimmt wurden, besitzen mit einer Studie von Heisig *et al.* vergleichbare MHK-Werte (maximal ± eine Verdünnungsstufe) (65). In dieser Studie wurden die MHK-Werte mit 0,015 µg/ml, 0,5 µg/ml bzw. 2 µg/ml für die Stämme *E. coli* WT, MI und MII bestimmt (65). Die MHK-Werte von Ciprofloxacin für die Stämme *E. coli* WT-3.2 und WT-3 wurden von Bagel *et al.* mit 0,25 µg/ml bzw. 1 µg/ml bestimmt (11) und sind damit vergleichbar mit den hier bestimmten MHK-Werten von 0,25 µg/ml bzw. 0,5 µg/ml.

4.2.1.3 Einfluss der plamidkodierte Resistenzmechanismen auf die Aktivität der Fluorchinolone

Fluoroxacin ist das einzige Fluorchinolon (FQ), welches durch die Expression von QepA, sowohl bei einem pH-Wert von 5,8 als auch bei 7,2, nicht beeinflusst wurde, mit einer einzigen Ausnahme: *E. coli* WT-3.2 besaß bei einem pH-Wert von 7,2 einen MHK-Wert von 1 µg/ml und *E. coli* WT-3.2 mit QepA einen MHK-Wert von 2 µg/ml. Die MHK-Werte von Ciprofloxacin für die Stämme mit QepA stiegen bei einem pH-Wert von 7,2 um einen Faktor von 8-64 im Vergleich zu den jeweiligen Stämmen ohne QepA, vergleichbar mit den Werten einer Studie von Yamane *et al.*, denn hier wurde eine Erhöhung um einen Faktor von 32, von 0,004 auf 0,125, für pSTV28::*qepA* beschrieben (171). Möglicherweise besitzt Ciprofloxacin als ein hydrophiles Fluorchinolon (3) eine höhere Affinität zu QepA, als die eher hydrophoberen Fluorchinolone, wie zum Beispiel Levofloxacin (3) und Moxifloxacin. Die MHK-Werte von Levofloxacin und Moxifloxacin bei einem pH-Wert von 7,2 für die untersuchten Stämme mit QepA waren annähernd vergleichbar (± eine Verdünnungsstufe) mit den MHK-Werten von Fluoroxacin bei einem pH-Wert von 7,2. Der Vergleich der Faktoren von Levofloxacin und Moxifloxacin bei pH 7,2 bzw. 5,8 der Stämme mit QepA mit den Stämmen ohne QepA zeigte lediglich eine Abweichung um maximal eine Stufe, vergleiche 2-8 µg/ml und 2-4 µg/ml bzw. 2-4 µg/ml und 2-8 µg/ml. Die MHK-Werte von Ciprofloxacin bei einem pH-Wert von 5,8 waren um einen Faktor von 128-512 höher im Vergleich zu Fluoroxacin bei einem pH-Wert von 5,8.

Diskussion

Die MHK-Werte von Ciprofloxacin, Levofloxacin und Moxifloxacin bei einem pH-Wert von 7,2 und von Finafloxacin bei einem pH-Wert von 5,8 für die isogenen Stämme mit QnrA1 waren nahezu identisch (\pm eine Verdünnungsstufe), mit Ausnahme der Stämme *E. coli* WT und WT-4-M35 bei Moxifloxacin, hier wichen die MHK-Werte um zwei Verdünnungsstufen von den MHK-Werten der anderen Fluorchinolone ab, siehe folgende Abbildung.

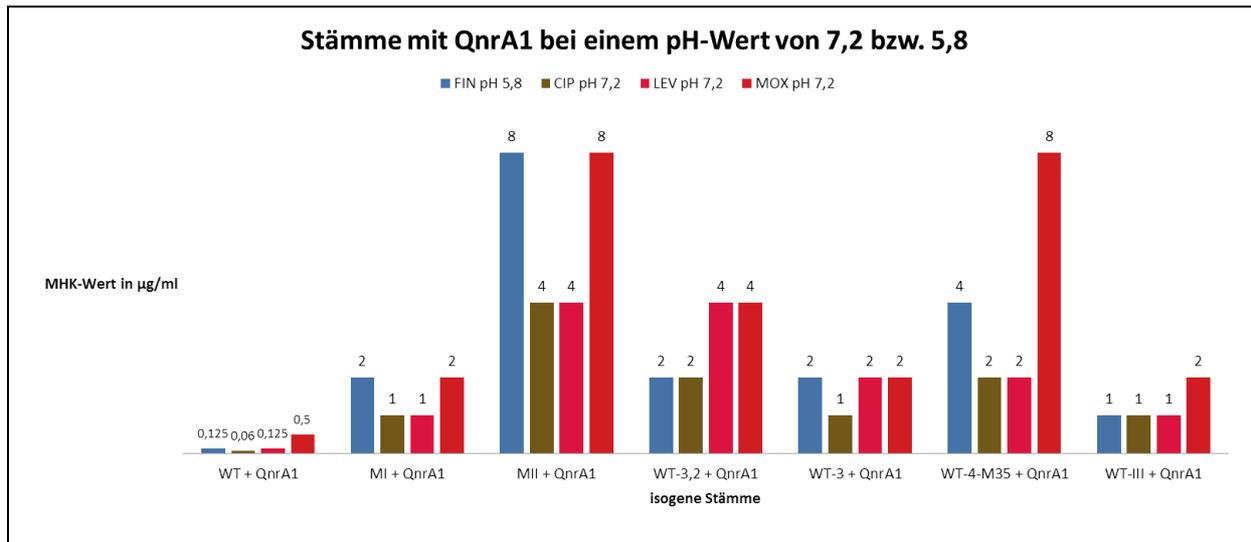


Abbildung 4-10 Grafische Darstellung der MHK-Werte der untersuchten isogenen Stämme mit QnrA1 gegenüber den Fluorchinolonen Ciprofloxacin (CIP), Levofloxacin (LEV) und Moxifloxacin (MOX) bei einem pH-Wert von 7,2 und Finafloxacin bei einem pH-Wert von 5,8.

Diese Untersuchung zeigte eine Erhöhung der MHK-Werte von Cipro- bzw. Levofloxacin bei einem pH-Wert von 7,2 um einen Faktor von 2-32 bzw. 2-16, vergleichbar mit den Ergebnissen von Martínez-Martínez *et al.* Hier wird bei einem Vergleich der Stämme *E. coli* J53 und *E. coli* J53 pMG252 eine Erhöhung der MHK-Werte von 0,008 auf einen Wert von 0,25 (Faktor 32) für Ciprofloxacin und eine Erhöhung von 0,03 auf einen Wert von 0,5 (Faktor 16) für Levofloxacin beschrieben (100).

Die MHK-Werte von Ciprofloxacin bei einem pH-Wert von 7,2 für die isogenen Stämme mit QnrB1 waren identisch mit den MHK-Werten von Levofloxacin, mit Ausnahme von *E. coli* WT-3.2, WT-4-M35 und WT-III, hier weichen die MHK-Werte jedoch auch nur um eine Verdünnungsstufe voneinander ab, vergleiche folgende Abbildung.

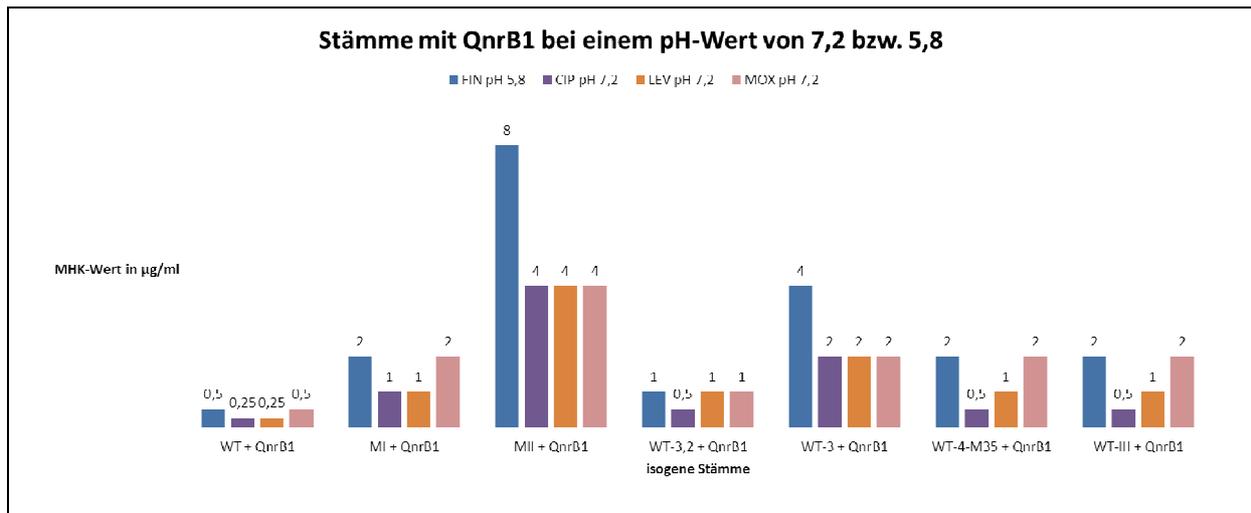


Abbildung 4-11 Grafische Darstellung der MHK-Werte der untersuchten isogenen Stämme mit QnrB1 gegenüber den Fluorchinolonen Ciprofloxacin (CIP), Levofloxacin (LEV) und Moxifloxacin (MOX) bei einem pH-Wert von 7,2 und Finafloxacin bei einem pH-Wert von 5,8.

Die MHK-Werte von Moxifloxacin bei einem pH-Wert von 7,2 und Finafloxacin bei einem pH-Wert von 5,8 waren um 1-2 Verdünnungsstufen höher als die MHK-Werte von Ciprofloxacin und Levofloxacin bei pH 7,2, mit Ausnahme von *E. coli* MII und WT-3, denn hier waren alle MHK-Werte von Moxifloxacin gleich und die von Finafloxacin um eine Verdünnungsstufe höher. Von Jakoby *et al.* ist bekannt, dass die MHK-Werte in Anwesenheit von *qnrB1* um einen Faktor von 16-64, 8-16 bzw. 16-32 für Cipro-, Levo- bzw. Moxifloxacin steigen (76), während in dieser Studie die MHK-Werte in Gegenwart von *qnrB1* um einen Faktor von 2-16, 2-8 bzw. 2-16 für Cipro-, Levo- bzw. Moxifloxacin stiegen.

Im Fall von QnrS1, beschreiben Hu F. P. *et al.* für die Stämme *E. coli* J53 und *E. coli* J53 pH58, der *qnrS1* besitzt, eine Erhöhung der MHK-Werte von Ciprofloxacin von 0,023 auf 0,38, was einem Faktor von 16 entspricht und von Levofloxacin von 4 auf 16, was einem Faktor von 4 entspricht (73). Vergleichbar mit der hier durchgeführten Untersuchung, denn hier stiegen die MHK-Werte von Ciprofloxacin bzw. Levofloxacin bei einem pH-Wert von 7,2 um einen Faktor von 2-32 bzw. 2-16. Für Plasmid pINF5, welches ebenfalls *qnrS1* besitzt, wurde ebenfalls eine Erhöhung der MHK von Ciprofloxacin um einen Faktor von 16 beschrieben (82). Die MHK-Werte von Ciprofloxacin, Moxifloxacin und Levofloxacin bei einem pH-Wert von 7,2 und von Finafloxacin bei einem pH-Wert von 5,8 waren identisch oder wichen um maximal eine Verdünnungsstufe voneinander ab, mit Ausnahme von *E. coli* WT-3.2 von Finafloxacin, vergleiche folgende Abbildung.

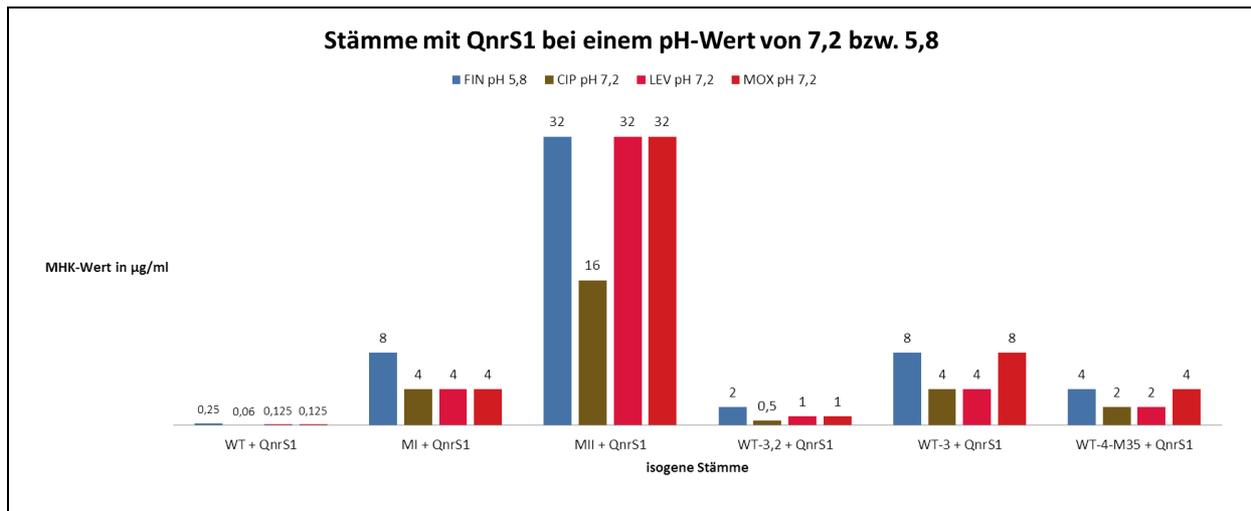


Abbildung 4-12 Grafische Darstellung der MHK-Werte von Ciprofloxacin (CIP), Levofloxacin (LEV) und Moxifloxacin (MOX) bei einem pH-Wert von 7,2 und von Finafloxacin bei einem pH-Wert von 5,8 für die untersuchten isogenen Stämme mit QnrS1.

Im Fall der Stämme mit QnrA1, QnrB1, QnrS1 zeigte Finafloxacin bei einem pH-Wert von 5,8 eine sehr gute Wirkung im Vergleich zu Cipro-, Levo- und Moxifloxacin bei einem pH-Wert von 5,8, während die MHK-Werte von Finafloxacin bei einem pH-Wert von 7,2 höher waren, als die MHK-Werte von Cipro-, Levo- und Moxifloxacin ebenfalls bei einem pH-Wert von 7,2. Wie jedoch die Abbildung 4-10, Abbildung 4-11 und Abbildung 4-12 zeigen, ist die Wirkung von Finafloxacin bei einem pH-Wert von 5,8 vergleichbar mit der Wirkung von Cipro-, Levo- und Moxifloxacin bei einem pH-Wert von 7,2.

Aufgrund des Fehlens der Piperazinyl-Substituenten, hatte AAC(6')-Ib-cr in keinen Effekt auf die Fluorchinolone Finafloxacin, Levofloxacin oder Moxifloxacin. Die Aktivität von Ciprofloxacin bei pH 7,2 war durch die Anwesenheit von AAC(6')-Ib-cr in den Stämmen *E. coli* MI, MII, WT-3.2, WT-3 und WT-4-M35 reduziert. In *E. coli* MII erhöhte sich der MHK-Wert um Faktor 4, somit war die Inaktivierung von Ciprofloxacin hier am höchsten. In *E. coli* WT und WT-III war hingegen keine Erhöhung der MHK und somit keine Inaktivierung von Ciprofloxacin durch AAC(6')-Ib-cr zu beobachten. Trotz der unterschiedlichen Erhöhung der MHK-Werte von Ciprofloxacin (pH 7,2) bei einem Vergleich der Stämme mit AAC(6')-Ib-cr und der Stämme ohne AAC(6')-Ib-cr, zeigte sich von Kanamycin ein deutliches Ergebnis: Die MHK-Werte von Kanamycin (pH 7,2) waren für die untersuchten isogenen Stämme um mindestens Faktor 32 erhöht, mit Ausnahme *E. coli* WT-3.2 (*gyrAD87G*), denn hier war lediglich eine Erhöhung um Faktor 8 zu detektieren. Die Ermittlung der MHK-Werte von

Kanamycin galt der Kontrolle der Expression von AAC(6')-Ib-cr durch die isogenen Stämme. Da alle Stämme eine Erhöhung der MHK von Kanamycin zeigten, war davon auszugehen, dass die Expression von AAC(6')-Ib-cr funktionierte. Bei einem Vergleich der MHK-Werte von Kanamycin bei pH 5,8 und 7,2 für die untersuchten Stämme mit bzw. ohne AAC(6')-Ib-cr und der daraus ermittelten Faktoren ist ein deutlicher Unterschied zu erkennen, denn in sechs von sieben Stämmen sank der Faktor von 32 bzw. mindestens 32 bei pH 7,2 auf einen Faktor von 2-4 bei pH 5,8, vergleiche Abbildung 4-13.

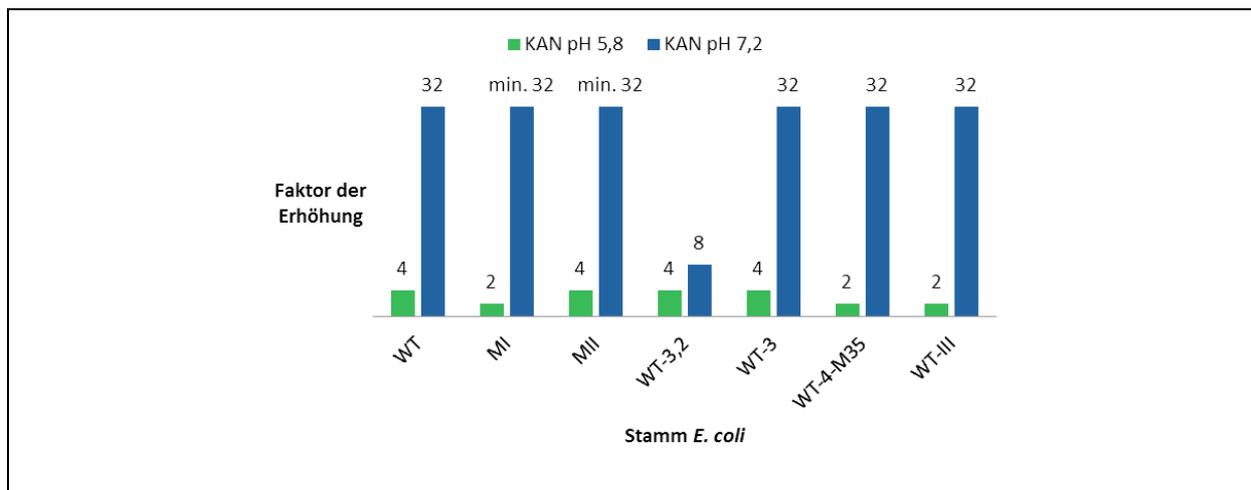


Abbildung 4-13 Grafische Darstellung der ermittelten Faktoren von Kanamycin jeweils bei pH 5,8 und pH 7,2 für die untersuchten Stämme mit und ohne AAC(6')-Ib-cr.

Bekannt ist, dass AAC(6')-Ib-cr sein pH-Optimum gegenüber Aminoglykosiden bei pH 6,1 besitzt (160). Dagegen liegt das pH-Optimum gegenüber Fluorchinolonen bei pH 7,7 (160). Im Fall der ermittelten Faktoren der untersuchten Stämme gegenüber Ciprofloxacin war der Unterschied zwischen pH 5,8 und pH 7,2 gering, vergleiche dazu Abbildung 4-14.

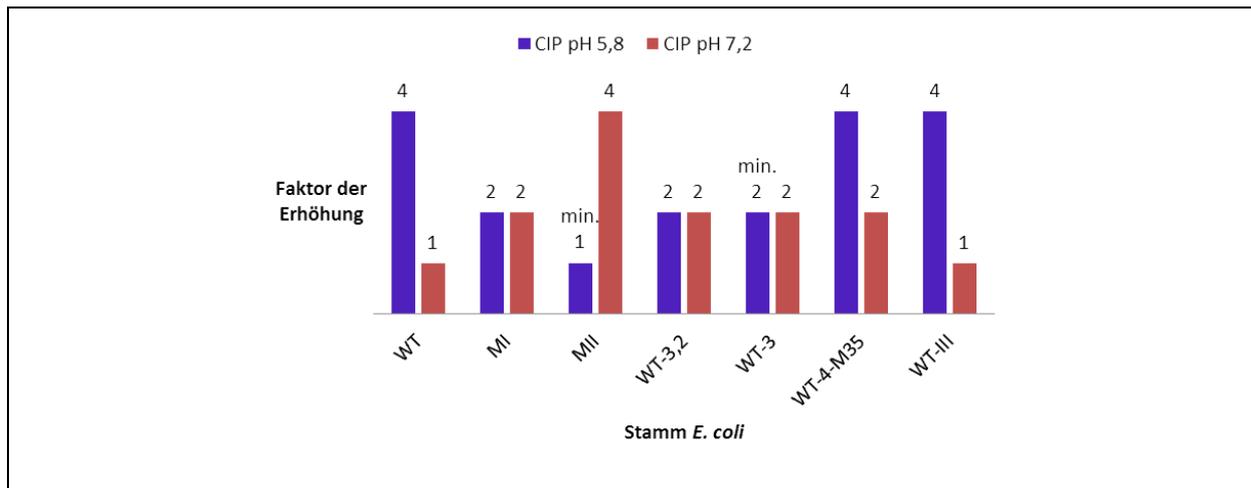


Abbildung 4-14 Grafische Darstellung der ermittelten Faktoren von Ciprofloxacin jeweils bei pH 5,8 und pH 7,2 für die untersuchten Stämme mit und ohne AAC(6')-Ib-cr.

Für *E. coli* MI und WT-3.2 wurde der gleiche Faktor der Erhöhung der MHK ermittelt, für die Stämme *E. coli* WT, WT-4-M35 und WT-III war der Faktor bei pH 5,8 höher als bei pH 7,2. Bei den Stämmen *E. coli* MII und WT-3, kann hier leider keine genaue Aussage getroffen werden, da hier die MHK-Werte gegenüber Ciprofloxacin bei pH 5,8 nicht exakt bestimmt wurden. *E. coli* WT-III zeigt jedoch mindestens den gleichen Faktor der Erhöhung bei pH 5,8 und pH 7,2.

4.2.1.4 Einfluss der Aminosäuren von LacZ vor QnrB1 und QnrS1 auf die Funktion der Proteine sowie Vergleich MHK-Werte von pHPNE19-02 und pHPNE19-02.1

Da in Plasmid pHPNE18-01 (QnrB1) die Aminosäuren MITNS (von LacZ) und in Plasmid pHPNE19-03 (QnrS1) die Aminosäuren MTMITPSL (von LacZ) vor dem eigentlichen Start des *qnr*-Gens waren und da in Plasmid pHPNE19-02 (QnrA1) *qnrA1* unter Kontrolle des eigenen Promotors exprimiert wurde, wurden diese Bereiche deletiert und die MHK erneut bestimmt. Für den Vergleich der vermittelnden Resistenz der unterschiedlichen Plasmide wurde die MHK in *E. coli* JM109 bestimmt. Die Auswertung zeigte, dass in *E. coli* JM109 kein Unterschied der Vermittlung der Resistenz durch die Plasmide pHPNE18-01 und pHPNE18-01.1, bzw. pHPNE19-02 und pHPNE19-02.1, sowie pHPNE19-03 und pHPNE19-03.1 zu erkennen war. Die Aminosäuren vor QnrB1 bzw. QnrS1 beeinträchtigen nicht die Funktion des Schutzproteins, außerdem ist die Expression von QnrA1 durch den eigenen Promotor vergleichbar mit der Expression und Aktivität des *P_{lac}* Promotors.

4.2.2 Entstehung von Fluorchinolonresistenz-Mutationen in *E. coli* WT in Anwesenheit von QnrS, QepA und AAC(6')-Ib-cr

Vorangegangene Studien zeigten, dass mit Fluorchinolonen häufig chromosomale Mutationen in den Zielgenen der Fluorchinolone, wie *gyrA*, oder in Genen wie *marR*, dessen Mutation zu einem erhöhten Efflux führt, selektiert werden (65). Doch wie sieht es aus, wenn in einem Stamm bereits plasmidkodierte Fluorchinolonresistenz-vermittelnde Gene vorhanden sind? Dazu wurde Stamm *E. coli* WT ohne und mit den PMFR-Genen QepA, QnrS1 und AAC(6')-Ib-cr in Gegenwart von Ciprofloxacin bei pH 7,2 und Finafloxacin bei pH 5,8 selektiert (3.2.3). Folgende Grafik zeigt eine Übersicht der entstanden Mutationen/Deletionen.

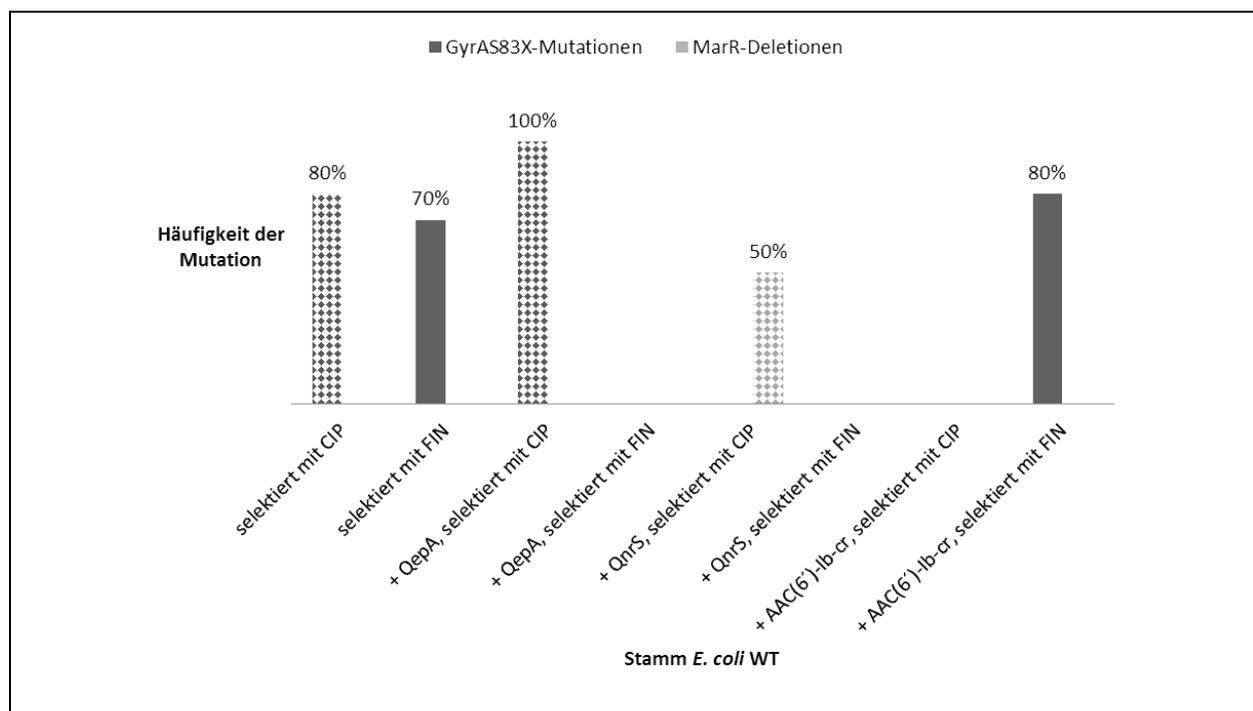


Abbildung 4-15 Übersicht über die entstandenen Mutationen bei der Selektion der Stämme *E. coli* WT mit den Fluorchinolonresistenz-vermittelnden-Mechanismen QepA, QnrS und AAC(6')-Ib-cr, jeweils mit Finafloxacin (FIN, ausgefüllt) und Ciprofloxacin (CIP, kariert).

Die Selektion von *E. coli* WT ohne plasmidkodierte Resistenzmechanismen diente als Kontrolle und zum Vergleich mit den anderen Stämmen. Hier entstanden vorwiegend Mutationen in *GyrA* an Position 83, sowohl bei Cipro- (zu 80 %) als auch bei Finafloxacin (zu 70 %). Vergleichbar mit den Ergebnissen von Cesaro *et al.*, denn hier entstanden bei der Selektion von *E. coli* mit Fluorchinolonen zu 79 % Mutationen im Gyrase-Gen. Im Fall dieser

Diskussion

Selektion wurde lediglich Position 83 durch RFLP untersucht, auch *marR* wurde nicht sequenziert, sondern Deletionen durch PCR und Gelelektrophorese im Vergleich mit dem nicht-selektierten WT-Stamm abgeschätzt. Mögliche Punktmutationen oder kleinere Deletionen im *marR*-Gen würden hierbei nicht auffallen. Punktmutationen in *gyrA*, die nicht an Position 83 stattfanden, konnten hier ebenfalls nicht detektiert werden. Bei der Selektion von *E. coli* WT pSTV28::*qepA* mit Ciprofloxacin entstanden zu 100 % *gyrA*S83X Mutationen, ähnlich wie bei Stamm *E. coli* WT. Allerdings konnte hier bei den sieben untersuchten Stämmen der Selektion mit Finafloxacin keine Mutation in *gyrA*83 oder eine größere *marR*-Deletion festgestellt werden. Hier sollte im Folgenden unbedingt untersucht werden, wo die Mutationen lokalisiert sind und vor allem, ob sich eine Mutation in *qepA* ereignete, die zur Erhöhung der Resistenz führte. Denn QepA hatte in den Untersuchungen zuvor keinen Einfluss auf Finafloxacin bei einem pH-Wert von 5,8, vergleiche Abschnitt 3.2.2. Bei der Selektion von *E. coli* WT mit Plasmid pHPNE19-03.1 (QnrS1) entstanden in 5 von 10 untersuchten Stämmen lediglich bei der Selektion mit Ciprofloxacin größere *marR*-Deletionen (>75 bp), eine Mutation in *gyrA* an Position 83 wurde weder hier noch bei der Selektion mit Finafloxacin gefunden. Die Vermutung liegt hier nahe, dass eine Mutation im *gyrA*-Gen den Schutz durch die Qnr-Proteine erschweren oder ganz verhindern würde und somit andere Mechanismen genutzt werden, um einen weiteren Schritt der Fluorchinolonresistenz zu erwerben. In dieser Studie wurden lediglich 10 Stämme der Selektion untersucht, was wenig repräsentativ war. Außerdem wurde hier nur Position 83 des Gyrase-Gens untersucht und eine größere Deletion in *marR* lediglich durch PCR nachgewiesen. Zur genauen Charakterisierung sollten die Gene *marR* und *gyrA* sequenziert werden und gegebenenfalls weitere Gene (*parC*, *acrAB*, etc.) untersucht werden. Die Ergebnisse liefern lediglich einen ersten Eindruck, jedoch wurde ein ähnliches Ergebnis von Cesaro *et al.* beschrieben. Hier wurden 329 Stämme einer Selektion in Anwesenheit von QnrA1, QnrA3, QnrB2 oder QnrS1 untersucht, lediglich 20 % besaßen eine Mutation im Gyrase-Gen, während unter 119 untersuchten Stämmen ohne Qnr-Schutzprotein 79% eine Gyrase-Mutation besaßen (27). Bei der Selektion von *E. coli* WT mit AAC(6′)-Ib-cr mit Finafloxacin entstanden zu 80% Mutationen an Position 83 des Gyrase-Gens. Bei der Selektion des Stammes mit Ciprofloxacin konnten keine Mutationen in *gyrA*83 oder Deletionen (>75 bp) in *marR* festgestellt werden. Vermutlich war hier die Anwesenheit und Aktivität von AAC(6′)-Ib-cr ausreichend, um die Zelle vor der erhöhten Menge an

Ciprofloxacin zu schützen, sodass der Erwerb einer weiteren Fluorchinolonresistenz nicht erforderlich war. Um diese These jedoch zu bestätigen, sollten die mit Ciprofloxacin selektierten Stämme auf die Entstehung von weiteren Fluorchinolonresistenz-vermittelnden Mutationen untersucht werden, um die Entstehung einer anderen chromosomalen Mutationen ausschließen zu können. Da AAC(6')-Ib-cr keinen Einfluss auf Finafloxacin besaß, entstanden hier chromosomale Fluorchinolonresistenz-Mutationen.

4.2.3 Fazit und Ausblick

Finafloxacin, ein Antibiotikum der neuen Generation mit einer Cyanogruppe am C8-Atom, zeigt bei einem pH-Wert von 5,8 bessere antibiotische Wirkung gegenüber den untersuchten chromosomalen und plasmidkodierten Resistenzmechanismen einzeln sowie in Kombination als Cipro-, Levo- und Moxifloxacin ebenfalls bei pH 5,8. Vor allem zeigt Finafloxacin exzellente Wirkung gegenüber QepA. Finafloxacin birgt aufgrund der sehr guten Wirkung in saurem Milieu großes Potential und öffnet somit neuen Möglichkeiten in der antibiotischen Therapie. Die weitere Untersuchung der mit Finafloxacin selektierten Stämme, vor allem der Stämme mit QepA, würde Aufschluss über das Risiko für die Entwicklung von neuen Breitspektrumresistenzen aufgrund der Therapie mit Finafloxacin und eine Prognose für die „Lebensdauer“ geben können.

5 a Zusammenfassung

Antimikrobiell wirksame Substanzen stellen eine Besonderheit dar, da sie sich durch regelmäßige Anwendung im klinischen Bereich „verbrauchen“. Dies beruht auf der Fähigkeit der Zielorganismen, Resistenzen gegenüber den antimikrobiellen Substanzen zu entwickeln. Gegenüber (Fluor)chinolonen existieren zahlreiche Resistenzmechanismen. Die zunächst nur chromosomal kodierten Resistenzen, konnten nur vertikal übertragen werden. Dieser Vorteil der (Fluor)chinolone ist jedoch seit einiger Zeit verloren, denn es fanden sich zunehmend plasmidkodierte und durch horizontalen Gentransfer übertragbare Resistenzmechanismen. Zu den plasmidkodierten Mechanismen zählen DNA-Gyrase/Topoisomerase IV-Schutzproteine, wie QnrA (*quinolone resistance*), QnrS, QnrB, QnrC, QnrD sowie ein Qnr-ähnlichen Protein aus *Vibrio cholerae*, QnrVC, außerdem wurden die (Fluor)chinolon-spezifischen Effluxpumpen QepA1 und QepA2, sowie eine MDR-Effluxpumpe OqxAB beschrieben. Als weiterer übertragbarer (Fluor)chinolon-Resistenzmechanismus wurde eine neue Variante der Aminoglykosid 6'-N-Acetyltransferase Typ Ib (AAC(6')-Ib) beschrieben. AAC(6')-Ib-cr besitzt zwei Aminosäure-Mutationen (W102R und D179Y) und ist dadurch in der Lage, neben den Aminoglykosiden Kanamycin, Tobramycin und Amikacin, auch die synthetisch hergestellten C7-piperazinyl-Fluorchinolone Ciprofloxacin und Norfloxacin zu acetylieren. Folglich eine Enzymvariante, die in der Lage ist, zwei Antibiotikaklassen zu inaktivieren. Die Acetyltransferasen AAC(6')-Ib und AAC(6')-Ib-cr gehören zur GNAT Superfamilie. Trotz der funktionalen Vielfalt der AAC(6')-Enzyme und der enormen Abweichungen innerhalb der Nukleotid- bzw. der Aminosäuresequenz, sind Sekundär- auch Tertiärstruktur verschiedener Aminoglykosid N-Acetyltransferasen nahezu identisch. Da vom Enzym AAC(6')-I über 30 natürlich vorkommende Varianten existieren, die sehr hohe Übereinstimmungen in Sekundär- und Tertiärstruktur zeigen, sollte in der vorliegenden Arbeit untersucht werden, ob sich aus einem anderen Typ AAC(6')-I eine AAC(6')-Ib-cr analoge Modifikation entwickeln kann, die das Substratspektrum ebenso variiert. Die Variante AAC(6')-Ib-cr wurde bisher nur mit beiden Veränderungen (W102R und D179Y) gefunden, daher stellt sich die Frage in welcher Reihenfolge und unter welchen Selektionsbedingungen die Mutationen entstanden sind. Aufgrund der rasant ansteigenden Entwicklung von plasmidkodierten Resistenzmechanismen in Kombination mit bereits vorhandenen chromosomalen Resistenzmechanismen gegenüber (Fluor)chinolonen, sollte

im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit geklärt werden, wie effektiv Fluorchinolone der neuesten Generation, gegenüber bekannten chromosomalen und plasmidkodierten Resistenzmechanismen arbeiten. Es konnte gezeigt werden, dass es möglich ist durch ortsspezifische Mutagenese in den Subtypen AAC(6′)-Ib7 und AAC(6′)-Ib11, eine AAC(6′)-Ib-cr analoge Variante zu erzeugen. Nach *in silico* Analyse von AAC(6′)-Ib-wt und AAC(6′)-Iy und gezielter Einführung von Mutationen in AAC(6′)-Iy (Dimer), konnte gezeigt werden, dass bereits die Einführung von einzelnen Mutationen in AAC(6′)-Iy zu signifikanten Veränderungen in der Resistenzvermittlung gegenüber Kanamycin führte. Es wurde dargestellt, dass die Aminosäure-Position W22, Y66, E79 und E136 in AAC(6′)-Iy, eine entscheidende Rolle in der Funktionsfähigkeit des Enzyms und vor allem in der Dimerisierung von AAC(6′)-Iy spielten. Eine einzelne Mutation an Aminosäure-Position W22, Y66 oder E136 führte zu einer verminderten Funktion des Enzyms, während eine Mutation an Position E79 sowie die eingeführten Doppelmutationen zum kompletten Funktionsverlust des Enzyms führten. Es entstand jedoch kein *aac(6′)-Ib-cr* analoger Phänotyp. Durch Zufallsmutagenese mittels Fehler verursachender Error Prone PCR (EP-PCR) konnte ebenfalls keine *aac(6′)-Ib-cr* analoge Mutation generiert werden. Nach *in vitro* Evolution durch Selektion von AAC(6′)-Ib-wt und den zuvor hergestellten Varianten AAC(6′)-Ib-102 und AAC(6′)-Ib-179 sowie AAC(6′)-Iy in einem Mutator-Stamm (*E. coli* CSH116 64-8-33) konnte nicht der gewünschte Phänotyp generiert werden. Daher bleibt die Frage nach der Entstehung von AAC(6′)-Ib-cr offen. Im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass Finafloxacin, ein Fluorchinolon der neuesten Generation mit einer Cyanogruppe am C8-Atom, gegenüber den untersuchten chromosomalen und plasmidkodierten Resistenzmechanismen bei einem pH-Wert von 5,8 bessere antibiotische Wirkung zeigt als Cipro-, Levo- und Moxifloxacin bei pH 5,8. Außerdem zeigte Finafloxacin exzellente Wirkung gegenüber QepA. Finafloxacin besitzt daher aufgrund der sehr guten Wirkung in saurem Milieu großes Potential und öffnet somit neuen Möglichkeiten in der antibiotischen Therapie.

5 b Summary

Antimicrobial agents are a special case, because they are "consumed" by regular clinical application. This is based on the capacity of the target organisms to develop resistance to these antimicrobial substances. Against (fluoro)quinolones there are numerous mechanisms of resistance. The initially just chromosomally encoded resistances could only be transmitted vertically. This advantage of the (fluoro)quinolones is now lost. Plasmid-mediated and by horizontal gene transfer transmitted mechanisms of resistance are growing in number. Among the plasmid-mediated mechanisms, DNA-Gyrase/Topoisomerase IV-protective proteins, such as QnrA (quinolone resistance), QnrS, QnrB, QnrC, QnrD and a Qnr-like protein from *Vibrio cholerae* QnrVC were described. Moreover the FQ-specific efflux pumps QepA1 and QepA2, as well as an MDR efflux pump OqxAB have been described. A new transferable mechanism of (fluoro)quinolone resistance has been described rapidly. AAC(6')-Ib-cr (a novel variant of the aminoglycoside 6'-N-acetyltransferase type Ib) has two amino acid mutations (W102R and D179Y) and is therefore able to acetylate, in addition to the aminoglycosides kanamycin, tobramycin and amikacin, the synthetically produced C7-piperazinyl-fluoroquinolones ciprofloxacin and norfloxacin. Thus, one enzyme that is able to inactivate two classes of antibiotics. The acetyltransferases AAC(6')-Ib and AAC(6')-Ib-cr belong to GNAT superfamily. Despite the functional diversity of the AAC(6') enzymes and the enormous variations within the nucleotide- or amino acid sequences, the secondary- and tertiary- structures of different aminoglycoside N-acetyltransferases are nearly identical. Because of the fact that 30 naturally occurring variants of the enzyme AAC(6')-I exist, which show very high similarities in secondary- and tertiary- structures, in the first part of present study should be examined, whether from a different type AAC(6')-I a AAC(6')-Ib-cr analog modification may develop, which varies the substrate spectrum as well. The variant AAC(6')-Ib-cr has been found only with two amino acid changes (W102R and D179Y), therefore should be examined in which order and among which conditions the mutations arose. In the second part of the present study should be clarified, due to the rapidly increasing development of plasmid-mediated resistance mechanisms in combination with existing chromosomal mechanisms of resistance to (fluoro) quinolones, how effective fluoroquinolones of the latest generation are, compared with known chromosomal and plasmid-encoded resistance mechanisms. It was shown that it is possible to produce an

AAC(6')-Ib-cr-analog variant in the subtypes AAC(6')-Ib7 and AAC(6')-Ib11 by site specific mutagenesis. After *in silico* analysis of AAC(6')-Ib-wt and AAC(6')-Iy and targeted introduction of mutations in AAC(6')-Iy (dimer), it could be shown that even the introduction of single mutations in AAC(6')-Iy leads to significant changes in the resistance to kanamycin. It was shown that the amino acid positions of W22, Y66, E79 and E136 in AAC(6')-Iy, played a crucial role in the functionality of the enzyme and a fundamental role in the dimerization of two monomers of the enzyme. A single mutation at position W22, Y66 and E136 decreased the function of the enzyme, while a mutation at position E79 and introduced double mutations resulted in loss of function of the enzyme. However, an *aac(6')-Ib-cr* analogous variant could not be generated. By random mutagenesis using error prone PCR (EP-PCR) an *aac(6')-Ib-cr* analogous mutation also could not be generated. Neither could *in vitro* evolution, by selection of AAC(6')-Ib-wt, the variants previously produced (AAC(6')-Ib-102, AAC(6')-Ib-179) and AAC(6')-Iy in a mutator-strain, generate the desired phenotype. Hence, the question of the origin of AAC(6')-Ib-cr remains unclear. In the second part of this study was demonstrated that Finafloxacin, a fluoroquinolone of the latest generation with a cyano group at the C8-atom, shows improved antibiotic activities at pH 5.8 against defined chromosomal and plasmid-mediated resistance mechanisms compared to Cipro, Levo- and Moxifloxacin at pH 5.8. Finafloxacin showed excellent activity against QepA. Finafloxacin therefore has, due to the activity in acidic environments, a very high potential and thus opens new possibilities in the antibiotic therapy.

6 Literatur

1. 1999. Resistance monitoring in Denmark, 1997--DANMAP. *Wkly Epidemiol Rec* **74**:125-7.
2. **Abu Mraheil, M.** Entwicklung eines molekularbiologischen Testsystems zum Nachweis von Inhibitoren bakterieller Topoisomerasen, deren Wirkung und des DNA-Superspiralisierungsgrades in vivo.
3. **Aeschlimann, J. R., G. W. Kaatz, and M. J. Rybak.** 1999. The effects of NorA inhibition on the activities of levofloxacin, ciprofloxacin and norfloxacin against two genetically related strains of *Staphylococcus aureus* in an in-vitro infection model. *J Antimicrob Chemother* **44**:343-9.
4. **Alekshun, M. N., and S. B. Levy.** 1997. Regulation of chromosomally mediated multiple antibiotic resistance: the mar regulon. *Antimicrob Agents Chemother* **41**:2067-75.
5. **Anderson, V. E., T. D. Gootz, and N. Osheroff.** 1998. Topoisomerase IV catalysis and the mechanism of quinolone action. *J Biol Chem* **273**:17879-85.
6. **Andersson, M. I., and A. P. MacGowan.** 2003. Development of the quinolones. *J Antimicrob Chemother* **51 Suppl 1**:1-11.
7. **Angus-Hill, M. L., R. N. Dutnall, S. T. Tafrov, R. Sternglanz, and V. Ramakrishnan.** 1999. Crystal structure of the histone acetyltransferase Hpa2: A tetrameric member of the Gcn5-related N-acetyltransferase superfamily. *J Mol Biol* **294**:1311-25.
8. **Aono, R., N. Tsukagoshi, and M. Yamamoto.** 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**:938-44.
9. **Appelbaum, P. C., and P. A. Hunter.** 2000. The fluoroquinolone antibacterials: past, present and future perspectives. *Int J Antimicrob Agents* **16**:5-15.
10. **Arntjen, B.** 2011. Der Einfluss von multiple antibiotic resistance (mar) Mutationen auf die Fitness fluorochinolonresistenter Mutanten von *Escherichia coli*, 1., Aufl. ed. Shaker, Herzogenrath.
11. **Bagel, S., V. Hullen, B. Wiedemann, and P. Heisig.** 1999. Impact of *gyrA* and *parC* mutations on quinolone resistance, doubling time, and supercoiling degree of *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother* **43**:868-75.
12. **Bahr, K.** 2011. In-vitro-Selektion und molekulare Charakterisierung Tigecyclin-resistenter Mutanten von *Escherichia coli*. Shaker, Aachen.
13. **Ball, P.** 2000. Moxifloxacin (Avelox): an 8-methoxyquinolone antibacterial with enhanced potency. *Int J Clin Pract* **54**:329-32.
14. **Barbosa, T. M., and S. B. Levy.** 2000. Differential expression of over 60 chromosomal genes in *Escherichia coli* by constitutive expression of MarA. *J Bacteriol* **182**:3467-74.
15. **Barnard, F. M., and A. Maxwell.** 2001. Interaction between DNA gyrase and quinolones: effects of alanine mutations at GyrA subunit residues Ser(83) and Asp(87). *Antimicrob Agents Chemother* **45**:1994-2000.
16. **Becnel Boyd, L., M. J. Maynard, S. K. Morgan-Linnell, L. B. Horton, R. Sucgang, R. J. Hamill, J. R. Jimenez, J. Versalovic, D. Steffen, and L. Zechiedrich.** 2009. Relationships among ciprofloxacin, gatifloxacin, levofloxacin, and norfloxacin MICs for fluoroquinolone-resistant *Escherichia coli* clinical isolates. *Antimicrob Agents Chemother* **53**:229-34.
17. **Birnboim, H. C., and J. Doly.** 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* **7**:1513-23.
18. **Bonomo, R. A.** 2007. Enzyme-mediated resistance to antibiotics : mechanisms, dissemination, and prospects for inhibition. ASM Press, Washington, DC.
19. **Brownell, J. E., J. Zhou, T. Ranalli, R. Kobayashi, D. G. Edmondson, S. Y. Roth, and C. D. Allis.** 1996. Tetrahymena histone acetyltransferase A: a homolog to yeast Gcn5p linking histone acetylation to gene activation. *Cell* **84**:843-51.

20. **Buissonnière, A., H.-O. Werling, B. Bergey, P. Lehours, W. Stubbings, H. Labischinski, and F. Megraud** 2008, posting date. Antimicrobial Activity of Finafloxacin (FIN) against *Helicobacter pylori* *In Vitro* and *In Vivo*. [Online.]
21. **Burk, D. L., N. Ghuman, L. E. Wybenga-Groot, and A. M. Berghuis.** 2003. X-ray structure of the AAC(6')-II antibiotic resistance enzyme at 1.8 Å resolution; examination of oligomeric arrangements in GNAT superfamily members. *Protein Sci* **12**:426-37.
22. **Cadwell, R. C., and G. F. Joyce.** 1992. Randomization of genes by PCR mutagenesis. *PCR Methods Appl* **2**:28-33.
23. **Casin, I., B. Hanau-Bercot, I. Podglajen, H. Vahaboglu, and E. Collatz.** 2003. Salmonella enterica serovar Typhimurium bla(PER-1)-carrying plasmid pST11 encodes an extended-spectrum aminoglycoside 6'-N-acetyltransferase of type Ib. *Antimicrob Agents Chemother* **47**:697-703.
24. **Cattoir, V., and P. Nordmann.** 2009. Plasmid-mediated quinolone resistance in gram-negative bacterial species: an update. *Curr Med Chem* **16**:1028-46.
25. **Cattoir, V., L. Poirel, and P. Nordmann.** 2008. Plasmid-mediated quinolone resistance pump QepA2 in an *Escherichia coli* isolate from France. *Antimicrob Agents Chemother* **52**:3801-4.
26. **Cavaco, L. M., H. Hasman, S. Xia, and F. M. Aarestrup.** 2009. *qnrD*, a novel gene conferring transferable quinolone resistance in *Salmonella enterica* serovar Kentucky and Bovismorbificans strains of human origin. *Antimicrob Agents Chemother* **53**:603-8.
27. **Cesaro, A., R. R. Bettoni, C. Lascols, A. Merens, C. J. Soussy, and E. Cambau.** 2008. Low selection of topoisomerase mutants from strains of *Escherichia coli* harbouring plasmid-borne *qnr* genes. *J Antimicrob Chemother* **61**:1007-15.
28. **Champion, H. M., P. M. Bennett, D. A. Lewis, and D. S. Reeves.** 1988. Cloning and characterization of an AAC(6') gene from *Serratia marcescens*. *J Antimicrob Chemother* **22**:587-96.
29. **Chavideh, R., S. Sholly, D. Panaite, and M. E. Tolmasky.** 1999. Effects of F171 mutations in the 6'-N-acetyltransferase type Ib [AAC(6')-Ib] enzyme on susceptibility to aminoglycosides. *Antimicrob Agents Chemother* **43**:2811-2.
30. **Chiou, R. K., B. D. Pomeroy, W. S. Chen, J. C. Anderson, R. K. Wobig, and R. J. Taylor.** 1998. Hemodynamic patterns of pharmacologically induced erection: evaluation by color Doppler sonography. *J Urol* **159**:109-12.
31. **Cirz, R. T., M. B. Jones, N. A. Gingles, T. D. Minogue, B. Jarrahi, S. N. Peterson, and F. E. Romesberg.** 2007. Complete and SOS-mediated response of *Staphylococcus aureus* to the antibiotic ciprofloxacin. *J Bacteriol* **189**:531-9.
32. **Cohen, S. P., H. Hachler, and S. B. Levy.** 1993. Genetic and functional analysis of the multiple antibiotic resistance (*mar*) locus in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **175**:1484-92.
33. **Cohen, S. P., L. M. McMurry, D. C. Hooper, J. S. Wolfson, and S. B. Levy.** 1989. Cross-resistance to fluoroquinolones in multiple-antibiotic-resistant (*Mar*) *Escherichia coli* selected by tetracycline or chloramphenicol: decreased drug accumulation associated with membrane changes in addition to *OmpF* reduction. *Antimicrob Agents Chemother* **33**:1318-25.
34. **Collis, C. M., and R. M. Hall.** 1995. Expression of antibiotic resistance genes in the integrated cassettes of integrons. *Antimicrob Agents Chemother* **39**:155-62.
35. **Courvalin, P.** 1990. Plasmid-mediated 4-quinolone resistance: a real or apparent absence? *Antimicrob Agents Chemother* **34**:681-4.
36. **Daigle, D. M., D. W. Hughes, and G. D. Wright.** 1999. Prodigious substrate specificity of AAC(6')-APH(2''), an aminoglycoside antibiotic resistance determinant in enterococci and staphylococci. *Chem Biol* **6**:99-110.
37. **Danschke, A.** Herstellung und Charakterisierung multipel antibiotikaresistenter (*mar*) Mutanten von *Escherichia coli* mittels in-vitro-Mutagenese.
38. **Davies, J. E.** 1997. Origins, acquisition and dissemination of antibiotic resistance determinants. *Ciba Found Symp* **207**:15-27; discussion 27-35.
39. **Delihias, N., and S. Forst.** 2001. *MicF*: an antisense RNA gene involved in response of *Escherichia coli* to global stress factors. *J Mol Biol* **313**:1-12.

40. **Drlica, K., M. Malik, R. J. Kerns, and X. Zhao.** 2008. Quinolone-mediated bacterial death. *Antimicrob Agents Chemother* **52**:385-92.
41. **Drlica, K., and X. Zhao.** 1997. DNA gyrase, topoisomerase IV, and the 4-quinolones. *Microbiol Mol Biol Rev* **61**:377-92.
42. **Dwyer, D. J., M. A. Kohanski, B. Hayete, and J. J. Collins.** 2007. Gyrase inhibitors induce an oxidative damage cellular death pathway in *Escherichia coli*. *Mol Syst Biol* **3**:91.
43. **Dyda, F., D. C. Klein, and A. B. Hickman.** 2000. GCN5-related N-acetyltransferases: a structural overview. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* **29**:81-103.
44. **Echols, H., C. Lu, and P. M. Burgers.** 1983. Mutator strains of *Escherichia coli*, mutD and dnaQ, with defective exonucleolytic editing by DNA polymerase III holoenzyme. *Proc Natl Acad Sci U S A* **80**:2189-92.
45. **Erlandsson, E., K. Andersson, A. Cavallin, A. Nilsson, U. Larsson-Lorek, U. Niss, A. Sjoberg, M. Wallen-Ohman, P. Antonsson, B. Walse, and G. Forsberg.** 2003. Identification of the antigenic epitopes in staphylococcal enterotoxins A and E and design of a superantigen for human cancer therapy. *J Mol Biol* **333**:893-905.
46. **Farr, S. B., and T. Kogoma.** 1991. Oxidative stress responses in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. *Microbiol Rev* **55**:561-85.
47. **Feinbaum, R.** 2001. Introduction to plasmid biology. *Curr Protoc Mol Biol* **Chapter 1**:Unit1 5.
48. **Ferraro, M. J., and National Committee for Clinical Laboratory Standards.** 2000. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically : approved standard, 5. ed ed. NCCLS, Wayne, PA.
49. **Ferrero, L., B. Cameron, B. Manse, D. Lagneaux, J. Crouzet, A. Famechon, and F. Blanche.** 1994. Cloning and primary structure of *Staphylococcus aureus* DNA topoisomerase IV: a primary target of fluoroquinolones. *Mol Microbiol* **13**:641-53.
50. **Fonseca, E. L., F. Dos Santos Freitas, V. V. Vieira, and A. C. Vicente.** 2008. New qnr gene cassettes associated with superintegron repeats in *Vibrio cholerae* O1. *Emerg Infect Dis* **14**:1129-31.
51. **Froelich-Ammon, S. J., and N. Osheroff.** 1995. Topoisomerase poisons: harnessing the dark side of enzyme mechanism. *J Biol Chem* **270**:21429-32.
52. **George, A. M., and S. B. Levy.** 1983. Amplifiable resistance to tetracycline, chloramphenicol, and other antibiotics in *Escherichia coli*: involvement of a non-plasmid-determined efflux of tetracycline. *J Bacteriol* **155**:531-40.
53. **George, A. M., and S. B. Levy.** 1983. Gene in the major cotransduction gap of the *Escherichia coli* K-12 linkage map required for the expression of chromosomal resistance to tetracycline and other antibiotics. *J Bacteriol* **155**:541-8.
54. **Ghosh, P., and M. C. Bagchi.** 2011. Anti-tubercular drug designing by structure based screening of combinatorial libraries. *J Mol Model* **17**:1607-20.
55. **Greenberg, J. T., J. H. Chou, P. A. Monach, and B. Demple.** 1991. Activation of oxidative stress genes by mutations at the soxQ/cfxB/marA locus of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **173**:4433-9.
56. **Grkovic, S., M. H. Brown, and R. A. Skurray.** 2002. Regulation of bacterial drug export systems. *Microbiol Mol Biol Rev* **66**:671-701, table of contents.
57. **Hagman, K. E., and W. M. Shafer.** 1995. Transcriptional control of the mtr efflux system of *Neisseria gonorrhoeae*. *J Bacteriol* **177**:4162-5.
58. **Hall, R. M., and C. M. Collis.** 1998. Antibiotic resistance in gram-negative bacteria: the role of gene cassettes and integrons. *Drug Resist Updat* **1**:109-19.
59. **Hall, R. M., and C. M. Collis.** 1995. Mobile gene cassettes and integrons: capture and spread of genes by site-specific recombination. *Mol Microbiol* **15**:593-600.
60. **Hansen, L. H., L. B. Jensen, H. I. Sorensen, and S. J. Sorensen.** 2007. Substrate specificity of the OqxAB multidrug resistance pump in *Escherichia coli* and selected enteric bacteria. *J Antimicrob Chemother* **60**:145-7.

61. **Hansen, L. H., E. Johannesen, M. Burmolle, A. H. Sorensen, and S. J. Sorensen.** 2004. Plasmid-encoded multidrug efflux pump conferring resistance to olaquinox in *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother* **48**:3332-7.
62. **Hansen, L. H., S. J. Sorensen, H. S. Jorgensen, and L. B. Jensen.** 2005. The prevalence of the OqxAB multidrug efflux pump amongst olaquinox-resistant *Escherichia coli* in pigs. *Microb Drug Resist* **11**:378-82.
63. **Hegde, S. S., T. K. Dam, C. F. Brewer, and J. S. Blanchard.** 2002. Thermodynamics of aminoglycoside and acyl-coenzyme A binding to the *Salmonella enterica* AAC(6')-Iy aminoglycoside N-acetyltransferase. *Biochemistry* **41**:7519-27.
64. **Heisig, P.** 1996. Genetic evidence for a role of *parC* mutations in development of high-level fluoroquinolone resistance in *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother* **40**:879-85.
65. **Heisig, P., and R. Tschorny.** 1994. Characterization of fluoroquinolone-resistant mutants of *Escherichia coli* selected in vitro. *Antimicrob Agents Chemother* **38**:1284-91.
66. **Heisig, P., and B. Wiedemann.** 2001. [Action and reaction. Actions and resistance mechanisms of quinolone]. *Pharm Unserer Zeit* **30**:382-93.
67. **Helling, R. B., H. M. Goodman, and H. W. Boyer.** 1974. Analysis of endonuclease R-EcoRI fragments of DNA from lambdaoid bacteriophages and other viruses by agarose-gel electrophoresis. *J Virol* **14**:1235-44.
68. **Higgins, P. G., W. Stubbings, H. Wisplinghoff, and H. Seifert.** 2010. Activity of the investigational fluoroquinolone finafloxacin against ciprofloxacin-sensitive and -resistant *Acinetobacter baumannii* isolates. *Antimicrob Agents Chemother* **54**:1613-5.
69. **Hill, T. M., B. Sharma, M. Valjavec-Gratian, and J. Smith.** 1997. *sfi*-independent filamentation in *Escherichia coli* is *lexA* dependent and requires DNA damage for induction. *J Bacteriol* **179**:1931-9.
70. **Hirakawa, H., A. Takumi-Kobayashi, U. Theisen, T. Hirata, K. Nishino, and A. Yamaguchi.** 2008. *AcrS/EnvR* represses expression of the *acrAB* multidrug efflux genes in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **190**:6276-9.
71. **Hooper, D. C.** 2001. Emerging mechanisms of fluoroquinolone resistance. *Emerg Infect Dis* **7**:337-41.
72. **Hooper, D. C.** 1999. Mechanisms of fluoroquinolone resistance. *Drug Resist Updat* **2**:38-55.
73. **Hu, F. P., X. G. Xu, D. M. Zhu, and M. G. Wang.** 2008. Coexistence of *qnrB4* and *qnrS1* in a clinical strain of *Klebsiella pneumoniae*. *Acta Pharmacol Sin* **29**:320-4.
74. **Imlay, J. A., S. M. Chin, and S. Linn.** 1988. Toxic DNA damage by hydrogen peroxide through the Fenton reaction in vivo and in vitro. *Science* **240**:640-2.
75. **Imlay, J. A., and S. Linn.** 1988. DNA damage and oxygen radical toxicity. *Science* **240**:1302-9.
76. **Jacoby, G. A., K. E. Walsh, D. M. Mills, V. J. Walker, H. Oh, A. Robicsek, and D. C. Hooper.** 2006. *qnrB*, another plasmid-mediated gene for quinolone resistance. *Antimicrob Agents Chemother* **50**:1178-82.
77. **Jacquier, H., C. Zaoui, M. J. Sanson-le Pors, D. Mazel, and B. Bercot.** 2009. Translation regulation of integrons gene cassette expression by the attC sites. *Mol Microbiol* **72**:1475-86.
78. **Jones, D. H., and B. H. Howard.** 1991. A rapid method for recombination and site-specific mutagenesis by placing homologous ends on DNA using polymerase chain reaction. *Biotechniques* **10**:62-6.
79. **Jones, G. L., R. E. Warren, S. J. Skidmore, V. A. Davies, T. Gibreel, and M. Upton.** 2008. Prevalence and distribution of plasmid-mediated quinolone resistance genes in clinical isolates of *Escherichia coli* lacking extended-spectrum beta-lactamases. *J Antimicrob Chemother* **62**:1245-51.
80. **Kado, C. I., and S. T. Liu.** 1981. Rapid procedure for detection and isolation of large and small plasmids. *J Bacteriol* **145**:1365-73.
81. **Kampranis, S. C., and A. Maxwell.** 1996. Conversion of DNA gyrase into a conventional type II topoisomerase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**:14416-21.

82. **Kehrenberg, C., S. Friederichs, A. de Jong, G. B. Michael, and S. Schwarz.** 2006. Identification of the plasmid-borne quinolone resistance gene *qnrS* in *Salmonella enterica* serovar Infantis. *J Antimicrob Chemother* **58**:18-22.
83. **Kim, C., D. Heseck, J. Zajicek, S. B. Vakulenko, and S. Mobashery.** 2006. Characterization of the bifunctional aminoglycoside-modifying enzyme ANT(3'')-II/AAC(6')-IId from *Serratia marcescens*. *Biochemistry* **45**:8368-77.
84. **Kim, C., A. Villegas-Estrada, D. Heseck, and S. Mobashery.** 2007. Mechanistic characterization of the bifunctional aminoglycoside-modifying enzyme AAC(3)-Ib/AAC(6')-Ib' from *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochemistry* **46**:5270-82.
85. **Klugman, K. P., and B. R. Levin.** 2006. One enzyme inactivates two antibiotics. *Nat Med* **12**:19-20.
86. **Kresken, M., and D. Hafner.** 1999. Drug resistance among clinical isolates of frequently encountered bacterial species in central Europe during 1975-1995. Study Group Bacterial Resistance of the Paul-Ehrlich-Society for Chemotherapy. *Infection* **27 Suppl 2**:S2-8.
87. **Kresken, M., D. Hafner, H. Mittermayer, L. Verbist, E. Bergogne-Berezin, H. Giamarellou, S. Esposito, B. van Klingeren, F. H. Kayser, D. S. Reeves, and et al.** 1994. Prevalence of fluoroquinolone resistance in Europe. Study Group 'Bacterial Resistance' of the Paul-Ehrlich-Society for Chemotherapy e. V. *Infection* **22 Suppl 2**:S90-8.
88. **Kresken, M., B. Körber-Irrgang, H. Labischinski, and W. Stubbings** 2008, posting date. Effect of pH on the *In Vitro* Activity of Fluroxacin against Gram-negative and Gram-positive Bacteria. [Online.]
89. **Langley, K. E., M. R. Villarejo, A. V. Fowler, P. J. Zamenhof, and I. Zabin.** 1975. Molecular basis of beta-galactosidase alpha-complementation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **72**:1254-7.
90. **Lanka, E., and B. M. Wilkins.** 1995. DNA processing reactions in bacterial conjugation. *Annu Rev Biochem* **64**:141-69.
91. **Leshner, G. Y., E. J. Froelich, M. D. Gruett, J. H. Bailey, and R. P. Brundage.** 1962. 1,8-Naphthyridine Derivatives. A New Class of Chemotherapeutic Agents. *J Med Pharm Chem* **91**:1063-5.
92. **Ma, D., M. Alberti, C. Lynch, H. Nikaido, and J. E. Hearst.** 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**:101-12.
93. **MacGowan, A. P., K. E. Bowker, M. Wootton, and H. A. Holt.** 1999. The in vitro activity of moxifloxacin against *Haemophilus influenzae* and *Moraxella catarrhalis* explored using a pharmacodynamic model. *Clin Microbiol Infect* **5**:195-200.
94. **Magalhaes, M. L., M. W. Vetting, F. Gao, L. Freiburger, K. Auclair, and J. S. Blanchard.** 2008. Kinetic and structural analysis of bisubstrate inhibition of the *Salmonella enterica* aminoglycoside 6'-N-acetyltransferase. *Biochemistry* **47**:579-84.
95. **Magnet, S., and J. S. Blanchard.** 2005. Molecular insights into aminoglycoside action and resistance. *Chem Rev* **105**:477-98.
96. **Magnet, S., P. Courvalin, and T. Lambert.** 1999. Activation of the cryptic *aac(6')-Iy* aminoglycoside resistance gene of *Salmonella* by a chromosomal deletion generating a transcriptional fusion. *J Bacteriol* **181**:6650-5.
97. **Magnet, S., T. Lambert, P. Courvalin, and J. S. Blanchard.** 2001. Kinetic and mutagenic characterization of the chromosomally encoded *Salmonella enterica* AAC(6')-Iy aminoglycoside N-acetyltransferase. *Biochemistry* **40**:3700-9.
98. **Martin, R. G., W. K. Gillette, S. Rhee, and J. L. Rosner.** 1999. Structural requirements for marbox function in transcriptional activation of *mar/sox/rob* regulon promoters in *Escherichia coli*: sequence, orientation and spatial relationship to the core promoter. *Mol Microbiol* **34**:431-41.
99. **Martin, R. G., P. S. Nyantakyi, and J. L. Rosner.** 1995. Regulation of the multiple antibiotic resistance (*mar*) regulon by *marORA* sequences in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **177**:4176-8.
100. **Martinez-Martinez, L., A. Pascual, and G. A. Jacoby.** 1998. Quinolone resistance from a transferable plasmid. *Lancet* **351**:797-9.

101. **Martinez, E., B. Bartolome, and F. de la Cruz.** 1988. pACYC184-derived cloning vectors containing the multiple cloning site and lacZ alpha reporter gene of pUC8/9 and pUC18/19 plasmids. *Gene* **68**:159-62.
102. **Mascellino, M. T., S. Farinelli, F. Iegri, and E. Iona.** 1998. The influence of the SOS response on the activity of 4-quinolones and zidovudine against some strains of Enterobacteria. *New Microbiol* **21**:31-40.
103. **Matthiessen, N.** 2007. Die Rolle der Expression und Regulation der AcrAB/- und AcrEF/TolC-Effluxpumpe bei der Entwicklung der Fluorchinolonresistenz in *Escherichia coli*. Staats- und Universitätsbibliothek Carl von Ossietzky, Hamburg.
104. **Maurice, F., I. Broutin, I. Podglajen, P. Benas, E. Collatz, and F. Dardel.** 2008. Enzyme structural plasticity and the emergence of broad-spectrum antibiotic resistance. *EMBO Rep* **9**:344-9.
105. **McBride, T. J., B. D. Preston, and L. A. Loeb.** 1991. Mutagenic spectrum resulting from DNA damage by oxygen radicals. *Biochemistry* **30**:207-13.
106. **Miller, J. H.** 1992. A short course in bacterial genetics : a laboratory manual and handbook for *Escherichia coli* and related bacteria. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, NY.
107. **Miller, K., A. J. O'Neill, and I. Chopra.** 2002. Response of *Escherichia coli* hypermutators to selection pressure with antimicrobial agents from different classes. *J Antimicrob Chemother* **49**:925-34.
108. **Montero, C., G. Mateu, R. Rodriguez, and H. Takiff.** 2001. Intrinsic resistance of *Mycobacterium smegmatis* to fluoroquinolones may be influenced by new pentapeptide protein MfpA. *Antimicrob Agents Chemother* **45**:3387-92.
109. **Moon, D. C., S. Y. Seol, M. Gurung, J. S. Jin, C. H. Choi, J. Kim, Y. C. Lee, D. T. Cho, and J. C. Lee.** 2010. Emergence of a new mutation and its accumulation in the topoisomerase IV gene confers high levels of resistance to fluoroquinolones in *Escherichia coli* isolates. *Int J Antimicrob Agents* **35**:76-9.
110. **Morrison, D. A.** 1977. Transformation in *Escherichia coli*: cryogenic preservation of competent cells. *J Bacteriol* **132**:349-51.
111. **Munshi, M. H., D. A. Sack, K. Haider, Z. U. Ahmed, M. M. Rahaman, and M. G. Morshed.** 1987. Plasmid-mediated resistance to nalidixic acid in *Shigella dysenteriae* type 1. *Lancet* **2**:419-21.
112. **Neuwald, A. F., and D. Landsman.** 1997. GCN5-related histone N-acetyltransferases belong to a diverse superfamily that includes the yeast SPT10 protein. *Trends Biochem Sci* **22**:154-5.
113. **Newton, C. R., A. Graham, L. E. Heptinstall, S. J. Powell, C. Summers, N. Kalsheker, J. C. Smith, and A. F. Markham.** 1989. Analysis of any point mutation in DNA. The amplification refractory mutation system (ARMS). *Nucleic Acids Res* **17**:2503-16.
114. **Ng, E. Y., M. Trucksis, and D. C. Hooper.** 1996. Quinolone resistance mutations in topoisomerase IV: relationship to the flqA locus and genetic evidence that topoisomerase IV is the primary target and DNA gyrase is the secondary target of fluoroquinolones in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* **40**:1881-8.
115. **Park, C. H., A. Robicsek, G. A. Jacoby, D. Sahm, and D. C. Hooper.** 2006. Prevalence in the United States of aac(6')-Ib-cr encoding a ciprofloxacin-modifying enzyme. *Antimicrob Agents Chemother* **50**:3953-5.
116. **Perichon, B., P. Courvalin, and M. Galimand.** 2007. Transferable resistance to aminoglycosides by methylation of G1405 in 16S rRNA and to hydrophilic fluoroquinolones by QepA-mediated efflux in *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother* **51**:2464-9.
117. **Poirel, L., A. Liard, J. M. Rodriguez-Martinez, and P. Nordmann.** 2005. Vibrionaceae as a possible source of Qnr-like quinolone resistance determinants. *J Antimicrob Chemother* **56**:1118-21.
118. **Poirel, L., M. Van De Loo, H. Mammeri, and P. Nordmann.** 2005. Association of plasmid-mediated quinolone resistance with extended-spectrum beta-lactamase VEB-1. *Antimicrob Agents Chemother* **49**:3091-4.

119. **Poole, K., K. Krebes, C. McNally, and S. Neshat.** 1993. Multiple antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: evidence for involvement of an efflux operon. *J Bacteriol* **175**:7363-72.
120. **Pourreza, A., M. Witherspoon, J. Fox, J. Newmark, D. Bui, and M. E. Tolmasky.** 2005. Mutagenesis analysis of a conserved region involved in acetyl coenzyme A binding in the aminoglycoside 6'-N-acetyltransferase type Ib encoded by plasmid pJHCMW1. *Antimicrob Agents Chemother* **49**:2979-82.
121. **Raleigh, E. A., K. Elbing, and R. Brent.** 2002. Selected topics from classical bacterial genetics. *Curr Protoc Mol Biol* **Chapter 1**:Unit 1 4.
122. **Richard, P., and L. Gutmann.** 1992. Sparfloxacin and other new fluoroquinolones. *J Antimicrob Chemother* **30**:739-44.
123. **Robicsek, A., G. A. Jacoby, and D. C. Hooper.** 2006. The worldwide emergence of plasmid-mediated quinolone resistance. *Lancet Infect Dis* **6**:629-40.
124. **Robicsek, A., J. Strahilevitz, G. A. Jacoby, M. Macielag, D. Abbanat, C. H. Park, K. Bush, and D. C. Hooper.** 2006. Fluoroquinolone-modifying enzyme: a new adaptation of a common aminoglycoside acetyltransferase. *Nat Med* **12**:83-8.
125. **Rodionov, D. A., M. S. Gelfand, A. A. Mironov, and A. B. Rakhmaninova.** 2001. Comparative approach to analysis of regulation in complete genomes: multidrug resistance systems in gamma-proteobacteria. *J Mol Microbiol Biotechnol* **3**:319-24.
126. **Rodriguez-Martinez, J. M., M. E. Cano, C. Velasco, L. Martinez-Martinez, and A. Pascual.** 2011. Plasmid-mediated quinolone resistance: an update. *J Infect Chemother* **17**:149-82.
127. **Rodriguez-Martinez, J. M., A. Pascual, I. Garcia, and L. Martinez-Martinez.** 2003. Detection of the plasmid-mediated quinolone resistance determinant qnr among clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* producing AmpC-type beta-lactamase. *J Antimicrob Chemother* **52**:703-6.
128. **Rodriguez-Martinez, J. M., C. Velasco, I. Garcia, M. E. Cano, L. Martinez-Martinez, and A. Pascual.** 2007. Mutant prevention concentrations of fluoroquinolones for *Enterobacteriaceae* expressing the plasmid-carried quinolone resistance determinant *qnrA1*. *Antimicrob Agents Chemother* **51**:2236-9.
129. **Rodriguez-Martinez, J. M., C. Velasco, A. Pascual, I. Garcia, and L. Martinez-Martinez.** 2006. Correlation of quinolone resistance levels and differences in basal and quinolone-induced expression from three qnrA-containing plasmids. *Clin Microbiol Infect* **12**:440-5.
130. **Ruiz, C., and S. B. Levy.** 2010. Many chromosomal genes modulate MarA-mediated multidrug resistance in *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother* **54**:2125-34.
131. **Ruiz, E., Y. Saenz, M. Zarazaga, R. Rocha-Gracia, L. Martinez-Martinez, G. Arlet, and C. Torres.** 2012. qnr, aac(6')-Ib-cr and qepA genes in *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp.: genetic environments and plasmid and chromosomal location. *J Antimicrob Chemother*.
132. **Saiki, R. K., D. H. Gelfand, S. Stoffel, S. J. Scharf, R. Higuchi, G. T. Horn, K. B. Mullis, and H. A. Erlich.** 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**:487-91.
133. **Saiki, R. K., S. Scharf, F. Faloona, K. B. Mullis, G. T. Horn, H. A. Erlich, and N. Arnheim.** 1985. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* **230**:1350-4.
134. **Sambrook, J., and D. W. Russell.** 2001. *Molecular cloning : a laboratory manual*, 3. ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
135. **Sanders, C. C.** 1988. Ciprofloxacin: in vitro activity, mechanism of action, and resistance. *Rev Infect Dis* **10**:516-27.
136. **Sanger, F., S. Nicklen, and A. R. Coulson.** 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**:5463-7.
137. **Schagger, H., W. A. Cramer, and G. von Jagow.** 1994. Analysis of molecular masses and oligomeric states of protein complexes by blue native electrophoresis and isolation of membrane protein complexes by two-dimensional native electrophoresis. *Anal Biochem* **217**:220-30.

138. **Scharf, S. J., G. T. Horn, and H. A. Erlich.** 1986. Direct cloning and sequence analysis of enzymatically amplified genomic sequences. *Science* **233**:1076-8.
139. **Scheuermann, R., S. Tam, P. M. Burgers, C. Lu, and H. Echols.** 1983. Identification of the epsilon-subunit of *Escherichia coli* DNA polymerase III holoenzyme as the *dnaQ* gene product: a fidelity subunit for DNA replication. *Proc Natl Acad Sci U S A* **80**:7085-9.
140. **Scheuermann, R. H., and H. Echols.** 1984. A separate editing exonuclease for DNA replication: the epsilon subunit of *Escherichia coli* DNA polymerase III holoenzyme. *Proc Natl Acad Sci U S A* **81**:7747-51.
141. **Schulte, A.** Stabilität hoher Fluorchinolone-resistenz bei Enterobakterien ohne Selektionsdruck.
142. **Shaw, K. J., P. N. Rather, R. S. Hare, and G. H. Miller.** 1993. Molecular genetics of aminoglycoside resistance genes and familial relationships of the aminoglycoside-modifying enzymes. *Microbiol Rev* **57**:138-63.
143. **Shaw, K. J., P. N. Rather, F. J. Sabatelli, P. Mann, H. Munayyer, R. Mierzwa, G. L. Petrikos, R. S. Hare, G. H. Miller, P. Bennett, and et al.** 1992. Characterization of the chromosomal *aac(6')*-Ic gene from *Serratia marcescens*. *Antimicrob Agents Chemother* **36**:1447-55.
144. **Shmara, A., N. Weinsattel, K. J. Dery, R. Chavideh, and M. E. Tolmasky.** 2001. Systematic analysis of a conserved region of the aminoglycoside 6'-N-acetyltransferase type Ib. *Antimicrob Agents Chemother* **45**:3287-92.
145. **Sorensen, A. H., L. H. Hansen, E. Johannesen, and S. J. Sorensen.** 2003. Conjugative plasmid conferring resistance to olaquinox. *Antimicrob Agents Chemother* **47**:798-9.
146. **Sternglanz, R., and H. Schindelin.** 1999. Structure and mechanism of action of the histone acetyltransferase Gcn5 and similarity to other N-acetyltransferases. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**:8807-8.
147. **Strahilevitz, J., G. A. Jacoby, D. C. Hooper, and A. Robicsek.** 2009. Plasmid-mediated quinolone resistance: a multifaceted threat. *Clin Microbiol Rev* **22**:664-89.
148. **Suter, W., A. Rosselet, and F. Knusel.** 1978. Mode of action of quinoxin and substituted quinoxaline-di-N-oxides on *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother* **13**:770-83.
149. **Tankovic, J., B. Perichon, J. Duval, and P. Courvalin.** 1996. Contribution of mutations in *gyrA* and *parC* genes to fluoroquinolone resistance of mutants of *Streptococcus pneumoniae* obtained in vivo and in vitro. *Antimicrob Agents Chemother* **40**:2505-10.
150. **Tillotson, G. S.** 1996. Quinolones: structure-activity relationships and future predictions. *J Med Microbiol* **44**:320-4.
151. **Toranzo, A. E., J. L. Barja, R. R. Colwell, and F. M. Hetrick.** 1983. Characterization of plasmids in bacterial fish pathogen. *Infect Immun* **39**:184-92.
152. **Tran, J. H., and G. A. Jacoby.** 2002. Mechanism of plasmid-mediated quinolone resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**:5638-42.
153. **Tran, J. H., G. A. Jacoby, and D. C. Hooper.** 2005. Interaction of the plasmid-encoded quinolone resistance protein Qnr with *Escherichia coli* DNA gyrase. *Antimicrob Agents Chemother* **49**:118-25.
154. **Tran, J. H., G. A. Jacoby, and D. C. Hooper.** 2005. Interaction of the plasmid-encoded quinolone resistance protein QnrA with *Escherichia coli* topoisomerase IV. *Antimicrob Agents Chemother* **49**:3050-2.
155. **Ullmann, A., F. Jacob, and J. Monod.** 1967. Characterization by in vitro complementation of a peptide corresponding to an operator-proximal segment of the beta-galactosidase structural gene of *Escherichia coli*. *J Mol Biol* **24**:339-43.
156. **Vetting, M. W., S. S. Hegde, J. E. Fajardo, A. Fiser, S. L. Roderick, H. E. Takiff, and J. S. Blanchard.** 2006. Pentapeptide repeat proteins. *Biochemistry* **45**:1-10.
157. **Vetting, M. W., S. S. Hegde, F. Javid-Majd, J. S. Blanchard, and S. L. Roderick.** 2002. Aminoglycoside 2'-N-acetyltransferase from *Mycobacterium tuberculosis* in complex with coenzyme A and aminoglycoside substrates. *Nat Struct Biol* **9**:653-8.
158. **Vetting, M. W., S. d. C. LP, M. Yu, S. S. Hegde, S. Magnet, S. L. Roderick, and J. S. Blanchard.** 2005. Structure and functions of the GNAT superfamily of acetyltransferases. *Arch Biochem Biophys* **433**:212-26.

159. **Vetting, M. W., S. Magnet, E. Nieves, S. L. Roderick, and J. S. Blanchard.** 2004. A bacterial acetyltransferase capable of regioselective N-acetylation of antibiotics and histones. *Chem Biol* **11**:565-73.
160. **Vetting, M. W., C. H. Park, S. S. Hegde, G. A. Jacoby, D. C. Hooper, and J. S. Blanchard.** 2008. Mechanistic and structural analysis of aminoglycoside N-acetyltransferase AAC(6')-Ib and its bifunctional, fluoroquinolone-active AAC(6')-Ib-cr variant. *Biochemistry* **47**:9825-35.
161. **Walker, G. C.** 1984. Mutagenesis and inducible responses to deoxyribonucleic acid damage in *Escherichia coli*. *Microbiol Rev* **48**:60-93.
162. **Wang, J. C.** 1996. DNA topoisomerases. *Annu Rev Biochem* **65**:635-92.
163. **Wang, M., Q. Guo, X. Xu, X. Wang, X. Ye, S. Wu, D. C. Hooper, and M. Wang.** 2009. New plasmid-mediated quinolone resistance gene, *qnrC*, found in a clinical isolate of *Proteus mirabilis*. *Antimicrob Agents Chemother* **53**:1892-7.
164. **Wang, M., D. F. Sahn, G. A. Jacoby, and D. C. Hooper.** 2004. Emerging plasmid-mediated quinolone resistance associated with the *qnr* gene in *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates in the United States. *Antimicrob Agents Chemother* **48**:1295-9.
165. **Wang, M., J. H. Tran, G. A. Jacoby, Y. Zhang, F. Wang, and D. C. Hooper.** 2003. Plasmid-mediated quinolone resistance in clinical isolates of *Escherichia coli* from Shanghai, China. *Antimicrob Agents Chemother* **47**:2242-8.
166. **Wohlert, S.-E., T. Jaetsch, B. Gallenkamp, H. J. Knops, N. Lui, M. Preiss, D. Haebich, and H. Labischinski** 2008, posting date. New Fluoroquinolone Finafloxacin HCl (FIN): Route of Synthesis, Physicochemical Characteristics and Activity under Neutral and Acid Conditions. [Online.]
167. **Wolf, E., A. Vassilev, Y. Makino, A. Sali, Y. Nakatani, and S. K. Burley.** 1998. Crystal structure of a GCN5-related N-acetyltransferase: *Serratia marcescens* aminoglycoside 3-N-acetyltransferase. *Cell* **94**:439-49.
168. **Wright, G. D., and P. Ladak.** 1997. Overexpression and characterization of the chromosomal aminoglycoside 6'-N-acetyltransferase from *Enterococcus faecium*. *Antimicrob Agents Chemother* **41**:956-60.
169. **Xu, X., S. Wu, X. Ye, Y. Liu, W. Shi, Y. Zhang, and M. Wang.** 2007. Prevalence and expression of the plasmid-mediated quinolone resistance determinant *qnrA1*. *Antimicrob Agents Chemother* **51**:4105-10.
170. **Yamane, K., J. Wachino, S. Suzuki, and Y. Arakawa.** 2008. Plasmid-mediated *qepA* gene among *Escherichia coli* clinical isolates from Japan. *Antimicrob Agents Chemother* **52**:1564-6.
171. **Yamane, K., J. Wachino, S. Suzuki, K. Kimura, N. Shibata, H. Kato, K. Shibayama, T. Konda, and Y. Arakawa.** 2007. New plasmid-mediated fluoroquinolone efflux pump, *QepA*, found in an *Escherichia coli* clinical isolate. *Antimicrob Agents Chemother* **51**:3354-60.
172. **Yang, X. J., V. V. Ogryzko, J. Nishikawa, B. H. Howard, and Y. Nakatani.** 1996. A p300/CBP-associated factor that competes with the adenoviral oncoprotein E1A. *Nature* **382**:319-24.
173. **Yanisch-Perron, C., J. Vieira, and J. Messing.** 1985. Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* **33**:103-19.
174. **Yoshida, H., M. Bogaki, M. Nakamura, and S. Nakamura.** 1990. Quinolone resistance-determining region in the DNA gyrase *gyrA* gene of *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother* **34**:1271-2.
175. **Yoshida, H., M. Bogaki, M. Nakamura, L. M. Yamanaka, and S. Nakamura.** 1991. Quinolone resistance-determining region in the DNA gyrase *gyrB* gene of *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother* **35**:1647-50.

7 Abkürzungsverzeichnis

Tabelle 7-1 Allgemeine Abkürzungen.

Abkürzung	Bedeutung
°C	Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
Ac	Acetat
ad	auf (lat.)
AK	Arbeitskreis
AMP	Adenosinmonophosphat
AmpR/Ap ^R	Ampicillinresistenz
APS	Ammoniumpersulfat
ARMS	sequenzspezifische-PCR (engl. <i>amplification refractory mutation system</i>)
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare (engl. <i>base pairs</i>)
BSA	Rinderserumalbumin (engl. <i>bovine serum albumin</i>)
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CCLR	engl. <i>cell culture lysis reagent</i>
Cip /CIP	Ciprofloxacin
Da	Dalton
dH ₂ O	Reinstwasser
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl. <i>desoxyribonucleic acid</i>)
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
EB	Elutionspuffer (engl. <i>elution buffer</i>)
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EP	Error-prone
EPI	Effluxpumpeninhibitor
<i>et al.</i>	und andere (lat. <i>et alii</i>)
EtBr	Ethidiumbromid
<i>for</i>	engl. <i>forward</i>
g	Gramm
<i>g</i>	Erdbeschleunigungskonstante
GK	Glycerinkulturnummer

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
GTE-Puffer	Glucose-Tris-EDTA-Puffer
h	Stunde/n
inkl.	inklusive/inklusive
k	kilo (1×10^3)
Kan	Kanamycin
kb	Kilobasenpaare
KBE	koloniebildende Einheiten
KPE-Puffer	Kaliumphosphat-EDTA-Puffer
l	Liter
LAR	engl. <i>luciferase assay reagent</i>
LB	Luria-Bertani
Lsg.	Lösung
m	milli (1×10^{-3})
M	Molar (mol/ L)
max.	Maximal
MDR	engl. <i>multiple drug resistance</i>
MFS	engl. <i>major facilitator superfamily</i>
MHK	minimale Hemmkonzentration
min	Minute/n
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mRNA	engl. <i>messenger-RNA</i>
MW	<i>molecular weight</i> , Molekulargewicht
n	nano (1×10^{-9})
Nal	Nalidixinsäure
ng	Nanogramm
OD	optische Dichte
OMP	engl. <i>outer membran protein</i>
ORF	offener Leserahmen (engl. <i>open reading frame</i>)
ori	Replikationsursprung (engl. <i>origin of replication</i>)
p.a.	analysenrein (lat. <i>pro analysi</i>)
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (engl. <i>polymerase chain reaction</i>)
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
QRDR	Chinolonresistenz determinierende Region (engl. <i>quinolone resistance determining region</i>)
rev	engl. <i>reverse</i>

Abkürzung	Bedeutung
RLU	Relative Lichteinheiten (engl. <i>relative light units</i>)
RNA	Ribonukleinsäure (engl. <i>ribonucleic acid</i>)
RNAse	Ribonuklease
RND	engl. <i>resistance nodulation cell division</i>
rpm	Umdrehungen pro Minute (engl. <i>rotations per minute</i>)
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde/n
SDS	Natriumdodecylsulfat (engl. <i>sodium dodecyl sulfate</i>)
SSM	<i>site-specific mutagenesis</i> (ortsspezifischen Mutagenese)
TAE-Puffer	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TBE-Puffer	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TEMED	Tetramethylethylendiamin
Tm	Schmelztemperatur
Tris	Tris-(hydroxymethyl-)aminomethan
U	Einheiten (engl. <i>units</i>)
ÜN	über Nacht
ÜNK	Übernachtkultur
US	Unterstand
ÜS	Überstand
UV	ultraviolett
V	Volt
WOB	für Wobble

Tabelle 7-2 Genbezeichnungen und Erklärungen.

Genbezeichnungen	Erklärungen
<i>aac(6')Ib</i>	kodiert für die Aminoglykosid-Acyltransferase AAC(6')Ib
<i>acrA</i>	kodiert für das periplasmatische Adapterprotein AcrA der AcrAB-TolC Effluxpumpe
<i>acrB</i>	kodiert für das Pumpenprotein AcrB der AcrAB-TolC Effluxpumpe
<i>acrE</i>	kodiert für das periplasmatische Adapterprotein AcrE der AcrEF-TolC Effluxpumpe
<i>acrF</i>	kodiert für das Pumpenprotein AcrF der AcrEF-TolC Effluxpumpe
<i>acrR</i>	kodiert für den lokalen Repressor AcrR von <i>acrAB</i>
<i>acrS</i>	kodiert für den Repressor AcrS von <i>acrAB</i> und <i>acrEF</i>
<i>aphA</i>	kodiert für eine Aminoglykosid-Phosphotransferase
<i>gyrA</i>	kodiert für die A-Untereinheit der Gyrase

Abkürzungsverzeichnis

Genbezeichnungen	Erklärungen
<i>gyrB</i>	kodiert für die B-Untereinheit der Gyrase
<i>luc</i>	kodiert für die Luciferase
<i>marA</i>	kodiert für den globalen Transkriptionsfaktor MarA
<i>marB</i>	kodiert für ein Protein unbekannter Funktion
<i>marC</i>	kodiert für ein putatives Membranprotein unbekannter Funktion
<i>marO</i>	Operatorregion des <i>mar</i> Operons
<i>marR</i>	kodiert für den Repressor des <i>mar</i> Operons MarR
<i>micF</i>	kodiert für die nicht translatierte <i>antisense</i> RNA <i>micF</i>
<i>ompF</i>	kodiert für das Porin OmpF in der äußeren Membran
<i>parC</i>	kodiert für die A-Untereinheit der Topoisomerase IV
<i>parE</i>	kodiert für die B-Untereinheit der Topoisomerase IV
<i>qepA</i>	kodiert für die Chinolon-spezifische Effluxpumpe QepA
<i>qnr</i>	kodiert für das Schutzprotein der Topoisomerasen Qnr
<i>soxR</i>	kodiert für den Regulator SoxR
<i>soxS</i>	kodiert für den globalen Transkriptionsfaktor SoxS
<i>tolC</i>	kodiert für das Porin TolC in der äußeren Membran
<i>topA</i>	kodiert für die A-Untereinheit der Topoisomerase I

Tabelle 7-3 Abkürzungen der DNA-Basen und deren Erklärung.

DNA-Basen	Erklärung
A	Adenin
T	Thymin
C	Cytosin
G	Guanin
U	Uracil

Tabelle 7-4 Aminosäuren und deren 3-Buchstaben- sowie 1-Buchstaben-Code.

Aminosäure	Abkürzung (3-Buchstaben-Code)	Abkürzung (1-Buchstaben-Code)
Alanin	Ala	A
Arginin	Arg	R
Asparagin	Asn	N
Asparaginsäure	Asp	D
Cystein	Cys	C
Glutamin	Gln	Q
Glutaminsäure	Glu	E
Glycin	Gly	G
Histidin	His	H
Isoleucin	Ile	I
Leucin	Leu	L
Lysin	Lys	K
Methionin	Met	M
Phenylalanin	Phe	F
Prolin	Pro	P
Serin	Ser	S
Threonin	Thr	T
Tryptophan	Trp	W
Tyrosin	Tyr	Y
Valin	Val	V

8 Anhang

8.1 Gefahrenstoffhinweise

Tabelle 8-1 Auflistung der in dieser Arbeit verwendeten KMR-Stoffen der Kategorien I und II.

CAS-Nummer	Stoffname (IUPAC)	Verfahren und eingesetzte Menge	Kategorie
79-06-1	Acrylamid (Propensäureamid)	Auftrennung von Proteinen mittels Polyacrylamid Gelelektrophorese, Menge: max. 7,8 ml einer 40 %-Lösung	K2, M2
67-66-3	Chloroform (Trichlormethan)	Aufreinigung von Nukleinsäurelösungen mittels Phenol / Chloroform-Extraktion, Menge: max. 480 µl	K2
1239-45-8	Ethidiumbromid (3,8-Diamino-5-ethyl-6-phenylphenanthridiniumbromid)	Anfärben von DNA in Agarose-Gelen, Menge: max. 4 µl einer 1 %-Lösung	M2
108-95-2	Phenol (Benzenol)	Aufreinigung von Nukleinsäurelösungen mittels Phenol / Chloroform-Extraktion, Menge: max. 500 µl	M2

Tabelle 8-2 Auflistung der verwendeten Gefahrstoffe mit Gefahrensymbol, GHS Gefahren und GHS Maßnahmen.

Substanz	Gefahrensymbol	GHS Gefahren (Hazard)	GHS Maßnahmen (Precaution)
Acrylamid	 	H301, H312, H315, H317, H319, H332, H340, H350, H361f, H372	P201, P202, P260, P264, P280, P281, P301+P310, P302+P352, P304+P340, P305+P351+P338, P308+P313, P321, P330, P333+P313, P337+P313, P362, P405, P501
Aminocapronsäure		H315, H319, H335	P261, P264, P280, P302+P352, P304+P340, P305+P351+P338, P312, P321, P332+P313, P337+P313, P362, P403+P233, P405, P501
Ammoniumpersulfat	 	H272, H302, H315, H317, H319, H334, H335	P210, P220, P221, P261, P264, P280, P285, P301+P312, P302+P352, P304+P340, P305+P351+P338, P321, P330, P333+P313, P337+P313, P342+P311, P362, P370+P378, P403+P233, P405, P501

Substanz	Gefahrensymbol	GHS Gefahren (Hazard)	GHS Maßnahmen (Precaution)
Butanol	 Three red diamond-shaped hazard symbols: an exclamation mark, a flame, and a pair of scales.	H226, H302, H315, H318, H335, H336	P210, P240, P241, P242, P243, P261, P264, P280, P301+P312, P302+P352, P303+P361+P353, P304+P340, P305+P351+P338, P310, P321, P330, P332+P313, P370+P378, P403+P233, P403+P235, P405, P501
Calciumchlorid-Dihydrat	 One red diamond-shaped hazard symbol: an exclamation mark.	H319	P264, P280, P305+P351+P338, P337+P313
Chloroform	 Two red diamond-shaped hazard symbols: an exclamation mark and a silhouette of a person with a star on their chest.	H302, H315, H350, H373 **	P201, P202, P260, P264, P280, P281, P301+P312, P302+P352, P308+P313, P321, P330, P332+P313, P362, P405, P501
Essigsäure (100 %)	 Two red diamond-shaped hazard symbols: a flame and a pair of scales.	H226, H314	P210, P233, P240, P241, P242, P243, P260, P264, P280, P301+P330+P331, P303+P361+P353, P304+P340, P305+P351+P338, P310, P321, P370+P378, P403+P235, P405, P501
Ethanol	 One red diamond-shaped hazard symbol: a flame.	H225	P210, P233, P240, P241, P242, P243, P280, P303+P361+P353, P370+P378, P403+P235, P501
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	 One red diamond-shaped hazard symbol: a pair of scales.	H318	P280, P305+P351+P338, P310
Isoamylalkohol	 Two red diamond-shaped hazard symbols: an exclamation mark and a flame.	EUH066, H226, H332, H335	P210, P240, P241, P242, P243, P261, P280, P303+P361+P353, P304+P340, P312, P370+P378, P403+P233, P403+P235, P405, P501
Kaliumhydroxid	 Two red diamond-shaped hazard symbols: an exclamation mark and a pair of scales.	H302, H314	P260, P264, P280, P301+P312, P301+P330+P331, P303+P361+P353, P304+P340, P305+P351+P338, P310, P321, P405, P501

Anhang

Substanz	Gefahrensymbol	GHS Gefahren (Hazard)	GHS Maßnahmen (Precaution)
Natriumdodecylsulfat (SDS)	 	H302, H312, H315, H319, H335	P261, P264, P280, P301+P312, P302+P352, P304+P340, P305+P351+P338, P321, P330, P332+P313, P337+P313, P362, P403+P233, P405, P501
Natriumhydroxid		H314	P260, P264, P280, P301+P330+P331, P303+P361+P353, P304+P340, P305+P351+P338, P310, P321, P405, P501
Phenol	  	H301, H311, H314, H331, H341, H373 **	P201, P202, P260, P264, P280, P281, P301+P310, P301+P330+P331, P302+P352, P303+P361+P353, P304+P340, P305+P351+P338, P308+P313, P321, P403+P233, P405, P501
Salzsäure (37 %)	 	H314, H335	P260, P264, P280, P301+P330+P331, P303+P361+P353, P304+P340, P305+P351+P338, P310, P321, P403+P233, P405, P501
β-Mercaptoethanol	  	H302, H311, H314, H332, H411	P260, P264, P273, P280, P301+P312, P301+P330+P331, P302+P352, P303+P361+P353, P304+P340, P305+P351+P338, P310, P321, P391, P405, P501
TEMED	  	H225, H302, H314, H332	P210, P233, P240, P241, P242, P243, P260, P264, P280, P301+P312, P301+P330+P331, P303+P361+P353, P304+P340, P305+P351+P338, P310, P321, P370+P378, P403+P235, P405, P501
Triton X-100	  	H302, H318, H411	P264, P273, P280, P301+P312, P305+P351+P338, P310, P330, P391, P501

Substanz	Gefahrensymbol	GHS Gefahren (Hazard)	GHS Maßnahmen (Precaution)
Xylencyanol		H315, H319, H335	P261, P264, P280, P302+P352, P304+P340, P305+P351+P338, P312, P321, P332+P313, P337+P313, P362, P403+P233, P405, P501

8.2 Poster und Veröffentlichungen

Antibacterial activity of finafloxacin against isogenic Escherichia coli isolates expressing combinations of defined mechanisms of fluoroquinolone resistance.

Emrich, N., Heisig, A., Stubbings, W., Labischinski, H., Heisig, P., 49th ICAAC, San Francisco 2009, Poster Nr. C1 – 1389

Antibacterial activity of finafloxacin under different pH conditions against isogenic strains of Escherichia coli expressing combinations of defined mechanisms of fluoroquinolone resistance.

Emrich, N. C., Heisig, A., Stubbings, W., Labischinski, H., Heisig, P., Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2010. 65(12): p. 2530-3.