

**Charakterisierung von Carbapenem-Resistenzmechanismen bei  
klinischen Isolaten aus der Familie der *Enterobacteriaceae***

DISSERTATION

zur Erlangung des naturwissenschaftlichen Doktorgrades

am Fachbereich Chemie der Universität Hamburg

Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften

vorgelegt von

Jens Weinberg

aus Delbrück

2012

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von November 2007 bis März 2011 unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Peter Heisig am Institut für Biochemie und Molekularbiologie (Abteilung Pharmazeutische Biologie und Mikrobiologie) der Universität Hamburg angefertigt.

Gutachter: Prof. Dr. Peter Heisig  
Prof. Dr. Markus Fischer

Datum der Disputation: 07.12.2012

### **Eidesstattliche Versicherung**

Gemäß der Promotionsordnung der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften der Universität Hamburg versichere ich hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbst und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Quellen und Hilfsmittel angefertigt habe.

Die wörtlich oder inhaltlich anderen Arbeiten entnommenen Stellen sind als Zitat bzw. Paraphrase unter genauer Quellenangabe kenntlich gemacht.

Delbrück, 30.07.2012

Jens Weinberg

### **Erklärung über frühere Promotionsversuche**

Ich versichere, dass von mir, Jens Weinberg, keine früheren Promotionsversuche mit dieser oder einer anderen Dissertation erfolgt sind. Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Delbrück, 30.07.2012

Jens Weinberg



*für Verena und meine Eltern*

## Danksagung

Mein Dank gilt Herrn Professor Dr. Heisig für die Möglichkeit, in seinem Arbeitskreis meine Dissertation anfertigen zu dürfen. Ich danke ihm insbesondere für seine Betreuung, bei der er mir stets die richtige Richtung aufzeigte.

Herrn Professor Dr. Markus Fischer danke ich für die Übernahme des Koreferates.

Ich möchte Frau Dr. Heisig danken, die immer bereit war, mir taktische Ratschläge für meine Versuche zu geben. Außerdem danke ich Ihr für die Sequenzierungen und insbesondere für die Einarbeitung in die grundlegenden, molekularbiologischen Methoden zu Beginn meiner Promotion.

Antje Schnasse möchte ich für die Sequenzierungen und für die Einführung in die Pulsfeld-Gelelektrophorese danken.

Tatjana Claußen möchte dafür danken, dass Sie bei den *E. cloacae* die Speziesidentifizierung mit dem Micronaut-E System sowie die Sequenzanalyse der QRDR von *gyrA* mittels PyroSequencing<sup>®</sup> durchgeführt hat.

Ich möchte diesen wie auch den übrigen Mitgliedern des AK Heisig - insbesondere auch Sabine Badziong - danken, die stets hilfsbereit und kollegial waren und dafür sorgten, dass ich die Zeit in Hamburg in bester Erinnerung bewahren werde.

Einige Wissenschaftler aus dem In- und Ausland haben mir Bakterienstämme und dazugehörige Informationen zur Verfügung gestellt, ohne die meine Arbeit in dieser Form nicht möglich gewesen wäre. Dies sind im Einzelnen Frau Dr. Yvonne Pfeiffer (Wernigerode), Frau Dr. Renata C. Picão (São Paulo), Frau Marit G. Tellevik (Bergen), Frau Dr. Gaëlle Cuzon und Herr Dr. Thierry Naas (Bicêtre), Herr Dr. Frank Kipp und Herr Evgeny Idelevich (Münster), Herr Dr. George A. Jacoby (Boston) und Herr Dr. Luis Martínez-Martínez (Santander).

Ich bedanke mich bei Alexander und Eva Retzlaff für das Lektorat dieser Arbeit.

Zuletzt möchte ich meinen Eltern danken. Sie haben mich stets unterstützt, und ohne ihr Zutun wären mir mein bisheriger Weg und diese Arbeit so sicherlich nicht möglich gewesen.

# Inhaltsverzeichnis

Eidesstattliche Versicherung .....	III
Erklärung über frühere Promotionsversuche .....	III
Danksagung .....	VI
Inhaltsverzeichnis .....	VII
Abbildungsverzeichnis .....	XI
Tabellenverzeichnis .....	XIV
Abkürzungsverzeichnis .....	XVII
<b>1 Einleitung .....</b>	<b>22</b>
1.1 <i>β-Lactam-Antibiotika</i> .....	22
1.1.1 Untergruppen der $\beta$ -Lactam-Antibiotika .....	22
1.1.2 Wirkmechanismus der $\beta$ -Lactam-Antibiotika .....	31
1.1.3 Resistenzmechanismen .....	42
1.2 <i>Enterobakterien als Krankheitserreger</i> .....	57
1.2.1 Der <i>Enterobacter cloacae</i> Komplex .....	58
1.2.2 <i>Klebsiella pneumoniae</i> .....	63
1.3 <i>Zielsetzung</i> .....	66
<b>2 Material.....</b>	<b>67</b>
2.1 <i>Verwendete Bakterienstämme</i> .....	67
2.1.1 Klinische Isolate .....	67
2.1.2 Laborstämme.....	68
2.1.3 Referenzstämme .....	69
2.2 <i>Plasmide</i> .....	71
2.3 <i>Antibiotika</i> .....	72
2.4 <i>Laborchemikalien und andere Chemikalien</i> .....	73
2.5 <i>Gefahrstoffverzeichnis</i> .....	76
2.6 <i>Puffer und Lösungen</i> .....	80

2.7	<i>Enzyme</i> .....	82
2.8	<i>Nährmedien, Nährböden</i> .....	83
2.9	<i>Oligonukleotide</i> .....	84
2.10	<i>Größenmarker</i> .....	92
2.11	<i>Laborgeräte und Verbrauchsmaterialien</i> .....	93
2.11.1	Laborgeräte .....	93
2.11.2	Verbrauchsmaterialien .....	94
2.11.3	Kits .....	95
2.12	<i>Software</i> .....	95
<b>3</b>	<b>Methoden</b> .....	<b>97</b>
3.1	<i>Methoden der Mikrobiologie</i> .....	97
3.1.1	Picken von Kolonien, Überimpfen, Dreiösausschich .....	97
3.1.2	Herstellung und Verwendung von Dauerkulturen (Glycerinkulturen) .....	97
3.1.3	Herstellung von Übernachtskulturen .....	98
3.1.4	Bestimmung von MHK-Werten .....	98
3.1.5	Etest <sup>®</sup> MBL .....	100
3.2	<i>Methoden der Molekularbiologie</i> .....	101
3.2.1	Isolation von genetischem Material .....	101
3.2.2	Aufreinigung von genetischem Material .....	109
3.2.3	Enzymatische Modifikation von DNA .....	110
3.2.4	Polymerase-Kettenreaktion .....	116
3.2.5	Sequenzierung von DNA .....	134
3.2.6	Auftrennung von genetischem Material .....	141
3.2.7	Übertragung von genetischem Material .....	149
3.3	<i>Methoden der Proteinbiochemie</i> .....	155
3.3.1	Isolation äußerer Membranproteine nach Carlone et al. (mod.) .....	155
3.3.2	SDS-PAGE .....	156
3.3.3	Isolation von $\beta$ -Lactamasen mittels Chloroform-Methode .....	159
3.3.4	Isoelektrische Fokussierung .....	160
<b>4</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	<b>165</b>
4.1	<i>Enterobacter cloacae aus Münster</i> .....	165
4.1.1	Charakterisierung der Isolate .....	165
4.1.2	PCR-Screening auf $\beta$ -Lactamase-Gene .....	173

4.1.3	PCR-Screening auf Resistenzgene gegen andere Antibiotikaklassen .....	175
4.1.4	Phänotypischer Nachweis von MBL mittels Etest® .....	176
4.1.5	Untersuchung der epidemiologischen Verwandtschaft der Isolate .....	179
4.1.6	Übertragung von Carbapenem-Resistenzeigenschaften durch Konjugation .....	186
4.1.7	Untersuchung des <i>ampC</i> -Induktionssystems .....	194
4.2	<i>Klebsiella pneumoniae</i> Va22038 aus Hamburg.....	211
4.2.1	Charakterisierung des Isolates.....	211
4.2.2	Phänotypischer Nachweis von MBL mittels Etest® .....	213
4.2.3	PCR-Screening auf $\beta$ -Lactamase-Gene .....	214
4.2.4	PCR-Screening auf mit MDR-Phänotyp oder bestimmten Resistenzgenen assoziierte Gene .....	217
4.2.5	Untersuchung von <i>bla</i> <sub>OXA-48</sub> .....	217
4.2.6	Bestimmung des Profils der äußeren Membranproteine (OMP-Profil) .....	220
4.2.7	Sequenzierung von OMP-Genen .....	220
4.2.8	Komplementation defizienter Porin-Gene .....	221
4.2.9	Plasmidprofil.....	231
4.2.10	Übertragung von Carbapenem-Resistenz durch Konjugation .....	234
4.2.11	Untersuchungen zur Verwandtschaft mit <i>K. pneumoniae</i> 11978 .....	237
4.2.12	Rolle von Porinen für eine Carbapenem-Resistenz von <i>bla</i> <sub>OXA-48</sub> -tragenden Zellen .....	246
<b>5</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>250</b>
5.1	<i>Diskussion der Ergebnisse bzgl. der E. cloacae</i> -Isolate.....	250
5.1.1	Phänotypische Eigenschaften mit Hinweis auf das Vorkommen von MBL .....	250
5.1.2	PCR-Nachweise von Resistenzgenen, Identifizierung einer MBL, Aufklärung der Integron-Struktur.....	254
5.1.3	Verwandtschaft innerhalb des <i>E. cloacae</i> -Kollektivs .....	255
5.1.4	Identifizierung des <i>bla</i> <sub>VIM</sub> -codierenden Plasmids .....	257
5.1.5	Vollständige Aufklärung der Ursache für die $\beta$ -Lactam-Resistenz.....	257
5.2	<i>Diskussion der Ergebnisse bzgl. K. pneumoniae</i> Va22038.....	265
5.2.1	Nachweis der OXA-48- $\beta$ -Lactamase und assoziierte Untersuchungen .....	265
5.2.2	Identifikation des <i>bla</i> <sub>OXA-48</sub> -codierenden Plasmids .....	266
5.2.3	Verwandtschaft von <i>K. pneumoniae</i> Va22038 mit <i>K. pneumoniae</i> 11978 .....	266
5.2.4	OMP-Profil .....	270
5.2.5	Zusammenspiel zwischen Carbapenemresistenz und Porindefizienz .....	272
5.3	<i>Ausblick</i> .....	276
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>279</b>

<b>7</b>	<b>Summary .....</b>	<b>281</b>
<b>8</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>283</b>
<b>9</b>	<b>Anhänge .....</b>	<b>305</b>
9.1	<i>Anhang I: Integron-Sequenz von pVIM(Ec19968).....</i>	305
9.2	<i>Anhang II: ampD-Alignment .....</i>	306
9.3	<i>Anhang III: Sequenz von bla<sub>OXA-48</sub> in K. pneumoniae Va22038.....</i>	325
9.4	<i>Anhang IV: ompK-Sequenzen .....</i>	325
<b>10</b>	<b>Rechtliche Hinweise .....</b>	<b>329</b>
	<b>Lebenslauf .....</b>	<b>331</b>

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1–1: Azetidinon, Penam-Grundgerüst, 6-Aminopenicillansäure (6-APS).....	22
Abbildung 1–2: Benzylpenicillin und Methoxyphenylpenicillin.....	23
Abbildung 1–3: Ampicillin, Amoxicillin. ....	23
Abbildung 1–4: Piperacillin und Mezlocillin.....	24
Abbildung 1–5: 2-Cephem und Cephalosporin C.....	25
Abbildung 1–6: Verschiedene Cephalosporine. ....	27
Abbildung 1–7: 3-Aminomonobactamsäure, Aztreonam.....	28
Abbildung 1–8: Thienamycin.....	28
Abbildung 1–9: Imipenem und Cilastatin.....	29
Abbildung 1–10: Meropenem, Ertapenem und Doripenem.....	30
Abbildung 1–11: Oxapenam und Clavulansäure.....	31
Abbildung 1–12: Sulbactam und Tazobactam.....	31
Abbildung 1–13: Vergleich des Zellwandaufbaus bei Gram-positiven und -negativen Bakterien.....	32
Abbildung 1–14: Aminozuckerkomponenten des Mureins.....	32
Abbildung 1–15: Murein-Ausschnitt.....	33
Abbildung 1–16: Polysaccharid-Helix aus GlcNAc und MurNAc.....	34
Abbildung 1–17: Netzwerk-Struktur des Peptidoglycans.....	34
Abbildung 1–18: Struktur von Lipopolysacchariden.....	35
Abbildung 1–19: Erste Stufe der Mureinsynthese: Bildung der Vorläufermoleküle.....	37
Abbildung 1–20: Transglycosylase- und Transpeptidase-Reaktion.....	38
Abbildung 1–21: Mureinrecycling.....	39
Abbildung 1–22: Anhydro-MurNAc.....	39
Abbildung 1–23: Transpeptidase-Reaktionsmechanismus.....	41
Abbildung 1–24: Reaktionsmechanismus von $\beta$ -Lactam-Antibiotika.....	42
Abbildung 1–25: AcrAB-TolC-Effluxpumpe.....	44
Abbildung 1–26: OmpC und OmpF.....	47
Abbildung 1–27: „Familienporträt“ der $\beta$ -Lactamasen.....	52
Abbildung 1–28: Tn1999 und Derivate.....	55
Abbildung 1–29: Putative Promotoren in Tn1999 bzw. Tn1999.2.....	56
Abbildung 1–30: Grundstruktur eines Integrons.....	57
Abbildung 1–31: Modell der <i>ampC</i> -Induktion in <i>Enterobacteriaceae</i> .....	60
Abbildung 1–32: Nachgewiesene Carbapenemase-Gene in <i>E. cloacae</i> in Deutschland 2010 (NRZ).....	63
Abbildung 1–33: Weltweites Auftreten von KPC- $\beta$ -Lactamasen.....	65
Abbildung 1–34: Nachgewiesene Carbapenemase-Gene in <i>K. pneumoniae</i> in Deutschland 2010 (NRZ).....	66
Abbildung 3–1: Dreiösenausstrich.....	97
Abbildung 3–2: Konfiguration des Etest <sup>®</sup> MBL.....	101

Abbildung 3–3: Schema der CHEF-Konfiguration (PFGE).....	143
Abbildung 3–4: Nitrocefin-Farbreaktion.....	163
Abbildung 4–1: PCR auf <i>bla</i> <sub>VIM</sub> .....	174
Abbildung 4–2: PCR auf <i>aac(6′)</i> -Ib.....	175
Abbildung 4–3: PCR auf <i>qnrS</i> .....	176
Abbildung 4–4: Ergebnisse der MBL-Etests bei <i>E. cloacae</i> K19968, K20606 und K20608.....	177
Abbildung 4–5: Ergebnisse der MBL-Etests bei <i>E. cloacae</i> K21198, K21373 und A17244/1.....	178
Abbildung 4–6: Ergebnis des MBL-Etests bei <i>E. cloacae</i> A17244/2.....	179
Abbildung 4–7: PFGE ( <i>Xba</i> I). .....	180
Abbildung 4–8: PFGE ( <i>Mss</i> I). .....	181
Abbildung 4–9: Alkalische Lyse beim <i>E. cloacae</i> -Kollektiv. ....	182
Abbildung 4–10: Versuche zur EPS-Minimierung bei <i>E. cloacae</i> K21373.....	183
Abbildung 4–11: Plasmid-DNA Präparation nach Crosa für Isolate von <i>E. cloacae</i> . ....	185
Abbildung 4–12: S1-PFGE für Stämme des <i>E. cloacae</i> -Kollektivs. ....	186
Abbildung 4–13: Alkalische Lyse eines Transkonjuganden. ....	188
Abbildung 4–14: Plasmid-DNA eines Transformanden nach alkalischer Lyse. ....	189
Abbildung 4–15: <i>Kpn</i> I-Restriktionsspaltung der Plasmid-DNA nach alkalischer Lyse.....	190
Abbildung 4–16: S1-PFGE von Stämmen mit pVIM(EclK19968). ....	191
Abbildung 4–17: Ergebnisse von PCRs mit Kombinationen von Primern für <i>aac(6′)</i> -Ib- und <i>bla</i> <sub>VIM</sub> .....	192
Abbildung 4–18: Ergebnisse von Integron-PCRs. ....	193
Abbildung 4–19: Anordnung der Resistenzkassetten im gefundenen Integron. ....	193
Abbildung 4–20: Plasmidkarte von pBR329.....	195
Abbildung 4–21: <i>Aat</i> II/ <i>Pvu</i> I-Doppelverdau von pBR329.....	196
Abbildung 4–22: pBR329-Doppelverdau, aufgereinigt. ....	196
Abbildung 4–23: Plasmidkarte von pBR329ΔAmp <sup>R</sup> .....	197
Abbildung 4–24: Alkalische Lyse möglicher <i>E. coli</i> JM109/pBR329ΔAmp <sup>R</sup> .....	198
Abbildung 4–25: <i>Sal</i> I-Restriktionsspaltung von pBR329ΔAmp <sup>R</sup> .....	198
Abbildung 4–26: <i>Sal</i> I-Restriktionsspaltung und Dephosphorylierung von pBR329ΔAmp <sup>R</sup> .....	199
Abbildung 4–27: Präparationen vermeintlich positiver Konstrukte.....	200
Abbildung 4–28: <i>ampD</i> -Region von <i>E. cloacae</i> ATCC 13047.....	201
Abbildung 4–29: Plasmide der pHPJW12-11.#-Serie.....	202
Abbildung 4–30: <i>Bam</i> HI-Restriktionsspaltungen.....	203
Abbildung 4–31: <i>Eco</i> RV-Restriktionsspaltungen.....	204
Abbildung 4–32: Plasmidkarte von pACYC184.....	205
Abbildung 4–33: Sequenz-Alignments von <i>ampD</i> /AmpD aus <i>E. cloacae</i> 14 und pHPJW12-11.4.....	208
Abbildung 4–34: Ergebnis des MBL-Etests bei <i>K. pneumoniae</i> Va22038.....	213
Abbildung 4–35: Ergebnis des MBL-Etests bei <i>E. coli</i> ATCC 25922. ....	214
Abbildung 4–36: SHV-/TEM-Duplex-PCR. ....	215

Abbildung 4–37: PCR auf <i>bla</i> <sub>OXA-47</sub> .....	215
Abbildung 4–38: PCR auf <i>bla</i> <sub>OXA-48</sub> .....	216
Abbildung 4–39: PCR auf <i>bla</i> <sub>OXA-9</sub> .....	216
Abbildung 4–40: Mögliche Amplikons einer Tri-Primer-PCR auf IS1999.....	217
Abbildung 4–41: IS1999-Tri-Primer-PCR. ....	218
Abbildung 4–42: PCR mit <i>bla</i> <sub>OXA-48</sub> <sup>-</sup> und IS1999-Primer.....	219
Abbildung 4–43: OMP-Profile verschiedener <i>K. pneumoniae</i> .....	220
Abbildung 4–44: <i>ompK35</i> und <i>ompK36</i> von <i>K. pneumoniae</i> Va22038.....	221
Abbildung 4–45: Plasmidkarte von pBP507.....	223
Abbildung 4–46: Amplifikation der Aminoglycosid-Resistenzgene von pBP507.....	224
Abbildung 4–47: Reisolation möglicher Konstrukte.....	225
Abbildung 4–48: <i>EcoRI</i> - und <i>SphI</i> -Restriktionsspaltung möglicher Konstrukte.....	226
Abbildung 4–49: <i>SacI</i> -Restriktionsspaltung der Konstrukte.....	227
Abbildung 4–50: <i>SacI</i> -Restriktionsspaltung von Plasmiden aus transformierten Klebsiellen. ....	229
Abbildung 4–51: Isolierung von großen Plasmiden nach Kado & Liu. ....	232
Abbildung 4–52: Isolierung von großen Plasmiden durch Präparation nach Crosa. ....	233
Abbildung 4–53: S1-PFGE von <i>K. pneumoniae</i> Va22038. ....	234
Abbildung 4–54: <i>bla</i> <sub>OXA-48</sub> <sup>-</sup> u. TEM-/SHV-Duplex-PCR f. Transkonjuganden.....	235
Abbildung 4–55: <i>aac(6')</i> -Ib-PCR mit Transkonjuganden. ....	235
Abbildung 4–56: S1-PFGE; <i>K. pneumoniae</i> Va22038 und Transkonjuganden. ....	236
Abbildung 4–57: IEF, Nitrocefin-Detektion. ....	238
Abbildung 4–58: IEF, Detektion mittels Bioassay.....	239
Abbildung 4–59: <i>XbaI</i> -PFGE.....	240
Abbildung 4–60: <i>MssI</i> -PFGE.....	241
Abbildung 4–61: S1-PFGE; <i>K. pneumoniae</i> Va22038 und 11978.....	242
Abbildung 4–62: <i>BspHI</i> -Restriktionsspaltung von Plasmid-DNA-Präparaten (QIAGEN-Kit). ....	243
Abbildung 4–63: S1-Mapping - Größe des konjugierbaren Plasmids. ....	244
Abbildung 4–64: PCRs auf <i>bla</i> <sub>OXA-47</sub> und <i>bla</i> <sub>OXA-48</sub> bei potenziellen Transkonjuganden. ....	245
Abbildung 4–65: Spaltungsmuster der vereinzelt, <i>bla</i> <sub>OXA-48</sub> <sup>-</sup> -codierenden Plasmide mit <i>SapI</i> bzw. <i>BspHI</i> .....	245
Abbildung 4–66: <i>bla</i> <sub>TEM</sub> <sup>-</sup> und <i>bla</i> <sub>OXA-48</sub> <sup>-</sup> -PCRs bei möglichen Transkonjuganden. ....	247
Abbildung 4–67: OMP-Profil von Transkonjuganden.....	248
Abbildung 5–1: Interpretation des Etest <sup>®</sup> MBL. ....	252
Abbildung 5–2: Falsch-negativer Etest <sup>®</sup> MBL auf Isosensitest-Agar.....	253
Abbildung 5–3: Aufbau einer publizierten, homologen Integron-Struktur.....	255
Abbildung 5–4: Kristallstruktur von AmpD ( <i>C. freundii</i> ).....	263
Abbildung 5–5: Hydrophober Bereich in AmpD mit Leucin-30.....	264

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1–1:	Einteilung der verwendeten Cephalosporine nach WHO .....	26
Tabelle 1–2:	Einteilung der $\beta$ -Lactamasen .....	51
Tabelle 1–3:	Vorkommen von <i>ampC</i> -Genen bei <i>Enterobacteriaceae</i> .....	59
Tabelle 2–1:	klinische Isolate.....	67
Tabelle 2–2:	verwendete Laborstämme .....	68
Tabelle 2–3:	verwendete Referenzstämme .....	69
Tabelle 2–4:	Plasmide in <i>E. coli</i> V517.....	70
Tabelle 2–5:	verwendete Plasmide.....	71
Tabelle 2–6:	verwendete Antibiotika .....	72
Tabelle 2–7:	verwendete (Labor-)Chemikalien .....	73
Tabelle 2–8:	verwendete KMR-Stoffe der Kategorien 1A, 1B und 2.....	76
Tabelle 2–9:	verwendete Gefahrstoffe mit Gefahrstoffkennzeichnungen sowie H- und P-Sätzen.....	77
Tabelle 2–10:	verwendete Puffer und Lösungen.....	80
Tabelle 2–11:	verwendete Enzyme.....	82
Tabelle 2–12:	verwendete Nährmedien bzw. Nährböden .....	83
Tabelle 2–13:	verwendete Oligonukleotide.....	85
Tabelle 2–15:	verwendete Größenmarker.....	92
Tabelle 2–16:	verwendete Laborgeräte.....	93
Tabelle 2–17:	verwendete Verbrauchsmaterialien .....	94
Tabelle 2–18:	verwendete, kommerzielle Kits.....	95
Tabelle 2–19:	verwendete Software.....	95
Tabelle 3–1:	Zusammensetzung des S1 Nuclease-Ansatzes .....	108
Tabelle 3–2:	S1-PFGE-Parameter .....	108
Tabelle 3–3:	allgemeiner Restriktionsansatz mit FastDigest <sup>®</sup> -Enzymen.....	111
Tabelle 3–4:	Ansatz für Doppelverdau mit <i>AatII</i> und <i>PvuI</i> .....	112
Tabelle 3–5:	Reaktionsbedingungen für Behandlung mit Klenow Fragment .....	113
Tabelle 3–6:	Restriktionsspaltung in Kombination mit Dephosphorylierung durch FastAP <sup>™</sup> .....	114
Tabelle 3–7:	Dephosphorylierung glatter Enden aus Klenow-Ansatz mit FastAP <sup>™</sup> .....	114
Tabelle 3–8:	Religation von linearisiertem Vektor .....	115
Tabelle 3–9:	Ligation von linearisiertem, dephosphoryliertem Vektor mit einem DNA-Fragment .....	115
Tabelle 3–10:	Ligation von dephosphoryliertem Vektor (geglättete Enden) mit einem DNA-Fragment.....	116
Tabelle 3–11:	PCR mit <i>Taq</i> -Polymerase - Grundansatz .....	118
Tabelle 3–12:	PCRs mit <i>Taq</i> -Polymerase.....	119
Tabelle 3–13:	Zusammensetzungen und Bedingungen weiterer PCRs mit <i>Taq</i> -Polymerase.....	130
Tabelle 3–14:	Primer der durchgeführten SHV/TEM-Duplex- sowie der MBL-Multiplex-PCR.....	131

Tabelle 3–15:	Primer der durchgeführten pmAmpC-Multiplex-PCR.....	131
Tabelle 3–16:	Zusammensetzungen und Bedingungen von PCRs mit LongAmp <sup>®</sup> -Taq-Polymerase .....	132
Tabelle 3–17:	Primer in durchgeführten LongAmp <sup>®</sup> -Taq-PCRs .....	133
Tabelle 3–18:	Zusammensetzungen und Bedingungen von PCRs mit Pfu-Polymerase .....	133
Tabelle 3–19:	Primer in durchgeführten Pfu-PCRs .....	134
Tabelle 3–20:	Aufreinigung von PCR-Produkten für Sequenzierungen.....	136
Tabelle 3–21:	Cycle-Sequencing.....	137
Tabelle 3–22:	Sequenzier-Primer .....	138
Tabelle 3–23:	Fällungslösung für Sequenzierungen .....	139
Tabelle 3–24:	Zusammensetzung des Restriktionsansatzes für PFGE .....	147
Tabelle 3–25:	Rezeptur für PAGE-Trenngel .....	159
Tabelle 3–26:	Rezept für PAGE-Sammelgel .....	159
Tabelle 3–27:	Zuordnung der Elektroden und Kammern bei der IEF .....	161
Tabelle 3–28:	Elektrophoresebedingungen bei der IEF .....	162
Tabelle 4–1:	Antibiogramm des UKM .....	166
Tabelle 4–2:	Micronaut-E-Befunde beim <i>E. cloacae</i> -Kollektiv .....	167
Tabelle 4–3:	MHK-Werte für das <i>E. cloacae</i> -Kollektiv .....	169
Tabelle 4–4:	MHK-Werte von Imipenem unter EDTA-Einfluss bei Kontrollstämmen.....	172
Tabelle 4–5:	MHK-Werte von Imipenem unter EDTA-Einfluss.....	173
Tabelle 4–6:	Einfluss v. Zink-Supplementierung auf Imipenem MHK .....	173
Tabelle 4–7:	PCR-Screening auf $\beta$ -Lactamase-Gene beim <i>E. cloacae</i> -Kollektiv .....	174
Tabelle 4–8:	PCR-Screening auf weitere Gene .....	175
Tabelle 4–9:	Beschickung der Agarose-Gele aus Abbildung 4–10.....	184
Tabelle 4–10:	Einfluss von pVIM(EclK19968) auf MHK-Werte .....	194
Tabelle 4–11:	Charakterisierung durch BamHI / EcoRV-Restriktionsspaltung .....	202
Tabelle 4–12:	Basis-MHKs des <i>ampD</i> -Komplementationssystems .....	206
Tabelle 4–13:	Stämme und Plasmide im <i>ampD</i> -Komplementationsassay .....	207
Tabelle 4–14:	MHK-Werte im <i>ampD</i> -Komplementationsassay .....	207
Tabelle 4–15:	identifizierte Punktmutationen bei Selektion von <i>ampD</i> -Mutanten.....	209
Tabelle 4–16:	MHK-Werte für <i>K. pneumoniae</i> Va22038 u.a. ....	212
Tabelle 4–17:	PCR-Screening auf <i>bla</i> -Gene bei <i>K. pneumoniae</i> Va22038 .....	214
Tabelle 4–18:	PCR-Screening auf weitere Gene bei <i>K. pneumoniae</i> Va22038.....	217
Tabelle 4–19:	mögliche Amplikons der Tri-Primer-PCR auf IS1999.....	218
Tabelle 4–20:	Eigenschaften der pSHA-Plasmide .....	222
Tabelle 4–21:	Fragmentgrößen in Abhängigkeit der Fragment-Orientierung nach SacI- Restriktionsspaltung.....	227
Tabelle 4–22:	Übersicht der Modifikation der pSHA-Plasmide.....	228
Tabelle 4–23:	MHK-Bestimmung nach <i>ompK</i> -Komplementation .....	230

Tabelle 4–24:	Einfluss von pOXA-48(KpnVa22038) auf MHK-Werte .....	236
Tabelle 4–25:	Selektionssystem bei konjugativer Übertragung von pOXA-48 in <i>K. pneumoniae</i> .....	247
Tabelle 4–26:	Ergebnis der MHK-Bestimmung für <i>Klebsiella</i> -Isolate mit pOXA-48(KpnVa22038) .....	249
Tabelle 5–1:	Einordnung des <i>E. cloacae</i> -Kollektivs anhand von PFGE-Bandenmustern .....	256
Tabelle 5–2:	Einordnung der MHK-Werte bei <i>E. coli</i> SN0302/pBP131-3/pHPJW12-11.1-3 nach <i>ampD</i> -Komplementationstest .....	259
Tabelle 5–3:	Inducer-Aktivitäten der verwendeten $\beta$ -Lactam-Antibiotika .....	260
Tabelle 5–4:	Auswertung des PFGE-Vergleichs der <i>Klebsiella</i> -Isolate .....	268
Tabelle 5–5:	Empfindlichkeitszunahme gg. Carbapeneme durch <i>ompK</i> -Komplementation .....	273
Tabelle 5–6:	Empfindlichkeitsabnahme gg. Carbapeneme durch <i>bla</i> <sub>OXA-48</sub> .....	273
Tabelle 5–7:	Einfluss der Porine auf Empfindlichkeitsabnahme für Carbapeneme durch <i>bla</i> <sub>OXA-48</sub> .....	274
Tabelle 5–8:	Carbapenem-MHK-Werte von Rezipienten mit intakten Porinen mit / ohne <i>bla</i> <sub>OXA-48</sub> .....	275
Tabelle 9–1:	Farbcodierung in DNA- und Protein-Alignments .....	305
Tabelle 9–2:	für das <i>ampD</i> -Alignment verwendete Sequenzen aus der GenBank .....	306

## Abkürzungsverzeichnis

©.....	Copyright	CSB.....	cell suspension buffer
®.....	eingetragene Warenmarke	d.....	Tag/e/en
°.....	Grad	d.h. ....	das heißt
µF.....	Microfarad	dATP.....	Desoxyadenosintriphosphat
µl.....	Microliter	dCTP.....	Desoxycytidintriphosphat
µM.....	Micromolar	ddATP.....	Didesoxyadenosintriphosphat
A.....	Adenin	ddCTP.....	Didesoxycytidintriphosphat
<i>A.</i> .....	<i>Acinetobacter</i>	ddGTP.....	Didesoxyguanosintriphosphat
<i>Aat</i> .....	<i>Acetobacter aceti</i>	ddNTP.....	Didesoxyribonucleosidtriphosphat
ADH.....	Arginindihydrolase	ddNTPs.....	Didesoxyribonucleosidtriphosphate
ADOF.....	Adonit-Fermentation	ddTTP.....	Didesoxythymidintriphosphat
Amp.....	Ampicillin	DECO/GLUF..	Decarboxylase-Kontrolle / Glucose-Fermentation
APS.....	Ammoniumpersulfat; Aminopenicillansäure	Den., Denat. ....	Denaturierung
ATCC.....	American Type Culture Collection	dGTP.....	Desoxyguanosintriphosphat
ATP.....	Adenosintriphosphat	DMSO.....	Dimethylsulfoxid
<i>Bam</i> .....	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	DNA.....	Desoxyribonucleinsäure
Bez. ....	Bezeichnung	dNTPs.....	Desoxyribonucleosidtriphosphate
bp.....	Basenpaar/e/en	DOI.....	Digital Object Identifier
<i>Bsp</i> .....	<i>Bacillus species</i>	DR.....	direct repeat
bspw. ....	beispielsweise	Dr. ....	Doktor
bzgl.....	bezüglich	DSMZ.....	Leibniz Institut DSMZ - Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH
bzw.....	beziehungsweise	dTTP.....	Desoxythymidintriphosphat
c.....	Konzentration	E.....	elektrische Feldstärke
C.....	Cytosin; Celsius	<i>E.</i> .....	<i>Enterobacter; Escherichia</i>
CA.....	Clavulansäure	EB.....	Elution Buffer
ca.....	circa	<i>Eco</i> .....	<i>Escherichia coli</i>
CAS.....	Chemical Abstracts Service	EDQM.....	Europäisches Direktorat für die Qualität von Arzneimitteln
CAT.....	Chloramphenicol-Acetyltransferase	EDTA.....	Ethylendiamintetraessigsäure
CDS.....	codierende Sequenz	engl.....	englisch
CHDL.....	carbapenem-hydrolyzierend class D β-lactamase/s	EPI.....	Effluxpumpen-Inhibitor
CHEF.....	Contour-Clamped Homogeneous Electric Fields	EPS.....	Exopolysaccharid/e
Chl.....	Chloramphenicol	ESAC/s.....	extended spectrum AmpC β-lactamase/s
CIT.....	Citrat	ESBL.....	extended spectrum β-lactamase/s
<i>cl.</i> .....	<i>cloacae</i>	ESC.....	Äsculin
CLSI..	Clinical Laboratory Standardization Institute		
cm.....	Centimeter		

ES-Cephalosporine .....	Cephalosporine mit erweitertem Spektrum	INOF .....	Inosit-Fermentation
et al. ....	et alia (und andere)	IP .....	Imipenem
Etest® .....	Epsilometertest	IPI .....	Imipenem und Inhibitor
evtl. ....	eventuell	IRL .....	left inverted repeat
f. ....	für	IRR .....	right inverted repeat
Fe .....	Eisen	IS .....	Insertionssequenz
ff .....	folgende	IUB .....	International Union of Biochemistry
fin. ....	finale	IUPAC .....	International Union of Pure and Applied Chemistry
fkt. ....	funktionale	<i>K.</i> .....	<i>Klebsiella</i>
fmol .....	Femtomol	k.A. ....	keine Angabe/n
FUO .....	Fieber unbekannter Ursache	Kan .....	Kanamycin
fw .....	forward	kb .....	Kilobasenpaare
g .....	Gramm; Newtonsche Gravitationskonstante	KbE .....	koloniebildende Einheit/en
G .....	Guanin	$k_{cat}$ .....	Geschwindigkeitskonstante
genet. ....	genetisch/e	kDa .....	Kilodalton
Gent .....	Gentamicin	KDO .....	2-Keto-3-desoxy-octonat
ggf. ....	gegebenenfalls	$K_i$ .....	Dissoziationskonstante
GHS .....	Globally Harmonized System of Classification, Labeling and Packaging of Chemicals	$K_m$ .....	Michaeliskonstante
GlcNAc .....	N-Acetylglucosamin	KMR....	kanzerogen, mutagen, reproduktionstoxisch
Gr .....	Gruppe	Koeff. ....	Koeffizient
GTE .....	Glucose-Tris-EDTA	konz. ....	konzentrierter
H <sub>2</sub> S .....	Schwefelwasserstoff	<i>Kpn</i> .....	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
HCl .....	Hydrochlorid	kV .....	Kilovolt
HEPES .....	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)- ethansulfonsäure	LB .....	lysogeny broth
<i>Hin</i> .....	<i>Haemophilus influenzae</i>	LDC .....	Lysindecaboxylase
H-Sätze .....	Hazard Statements	LPS .....	Lipopolysaccharid/e
I .....	intermediär	lt. ....	laut
i.d.R. ....	in der Regel	m .....	Masse
i.w.S. ....	im weitesten Sinne	M .....	Molar
ID .....	Identifikations-Nummer	mA .....	Milliampere
IEF .....	isoelektrische Fokussierung	MAL .....	Malonat
IHF .....	integration host factor	max. ....	maximal
Inc .....	Inkompatibilitätsgruppe	Mb .....	Megabasenpaare
IND .....	Indol	MBL .....	Metallo-β-Lactamase/n
init .....	initiale	MDa .....	Megadalton
inkl. ....	inklusive	mg .....	Milligramm
		MH .....	Mueller-Hinton
		MHK .....	minimale Hemmkonzentration/en
		min .....	Minute/n

ml .....	Milliliter	PFGE.....	Pulsfeld-Gelelektrophorese
mm .....	Millimeter	<i>Pfu</i> .....	<i>Pyrococcus furiosus</i>
mM.....	Millimolar	pg .....	Picogramm
mod. ....	modifiziert	PGUR.....	β-Glukuronidase
mol .....	molekulare	pmAmpC.....	plasmid-mediated AmpC
mol. ....	molekulare	ppb .....	parts per billion
MOPS.....	3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure	PP <sub>i</sub> .....	Pyrophosphat
<i>Mss</i> .....	<i>Methylobacterium species</i>	Prim. An.....	Primer Annealing
MurNAc .....	N-Acetylmuraminsäure	Prof.....	Professor
n.....	Anzahl der Merkmalsausprägungen	PS .....	Polystyrol
<i>N</i> .....	<i>Neisseria</i>	P-Sätze .....	Precautionary Statements
NCCLS.....	National Committee on Clinical Laboratory Standardization	<i>Psi</i> .....	<i>Pseudomonas species</i>
ND.....	not determined	put. ....	putativer
NEB.....	New England BioLabs Inc.	<i>Pvu</i> .....	<i>Proteus vulgaris</i>
ng.....	Nanogramm	QRDR .....	quinolone resistance-determining regions
nm .....	Nanometer	<sup>R</sup> .....	resistent, Resistenz
NMR .....	nuclear magnetic resonance	RE .....	Restriktionsenzym/e
NRZ.....	Nationales Referenzzentrum für Gram-negative Krankenhauserreger	rel. WS .....	relative Wahrscheinlichkeit
NW .....	Nachweis	rev .....	reverse
Ø.....	Durchmesser	RHAF.....	Rhamnose-Fermentation
o.....	oder	RKI.....	Robert Koch-Institut
OD.....	optische Dichte	RND .....	resistance nodulation devision
ODC .....	Ornithindecaboxylase	s.....	Sekunde/n
OMF.....	outer membrane factor	S .....	Sequenzierung; sensibel
OMP/s .....	outer membrane protein/s	<i>S</i> .....	<i>Salmonella</i> ; <i>Staphylococcus</i> ; Seite
ONPG.....	o-Nitrophenylgalaktopyranosid	s.u. ....	siehe unten
ONPX.....	β-Xylosidase	<i>Sac</i> .....	<i>Streptomyces achromogenes</i>
ori .....	origin of replication	<i>Sal</i> .....	<i>Streptomyces albus</i>
<i>p-</i> .....	para-	<i>Sap</i> .....	<i>Saccharopolyspora species</i>
<i>P</i> .....	<i>Pseudomonas</i>	S <sub>D</sub> .....	Dice-Koeffizient
<i>p.a.</i> .....	pro analysi	SDS .....	Natriumdodecylsulfat
PAGE .....	Polyacrylamid-Gelelektrophorese	SLG .....	Süd-Laborbedarf GmbH
PAP .....	periplasmatic adaptor protein	SLS.....	Sample Loading Solution
PAβN.....	L-Phenylalanyl-L-arginyl-β-naphthylamid	<i>Sma</i> .....	<i>Serratia marcescens</i>
PBPs.....	Penicillin-bindende Proteine	SOC. ....	super optimal broth with catabolite repression
PBRT.....	PCR-based replicon typing	sog. ....	sogenannte/s/n
PCR/s .....	Polymerase-Kettenreaktion/en	SORF.....	Sorbitol-Fermentation
PEG .....	Polyethylenglycol	<i>Sph</i> .....	<i>Streptomyces phaeochromogenes</i>
		spp. ....	species pluralis
		ssp. ....	subspecies

str.....	strain	UKM.....	Universitätsklinikum Münster
SUCF.....	Saccharaose-Fermentation	ÜNK.....	Übernachtkultur(en)
Syn., Synth.....	Synthese	URE.....	Urease
t.....	Zeit	ursprüngl.....	ursprünglich
T.....	Thymin; Temperatur	UV.....	ultraviolett (Lichtspektrum)
TAE.....	Tris-Acetat-EDTA	V.....	Volumen; Volt
<i>Taq</i> .....	<i>Thermophilus aquaticus</i>	vgl.....	vergleiche
TBE.....	Tris-Borat-EDTA	Vis.....	visible (Lichtspektrum)
TDA.....	Tryptophan-Deaminase	VP.....	Voges-Proskauer-Test
TE.....	Tris-EDTA	WHO.....	World Health Organization
TEMED.....	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin	<i>Xba</i> .....	<i>Xanthomonas badrii</i>
Tet.....	Tetracyclin	<i>Xho</i> .....	<i>Xanthomonas holcicola</i>
TFB.....	transformation buffer	XYLF.....	Xylose-Fermentation
Tn.....	Transposon	<i>Y</i> .....	<i>Yersinia</i>
Tris.....	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan	z.B.....	zum Beispiel
TZB.....	Tazobactam	z.T.....	zum Teil
™.....	Unregistered Trademark	Zn.....	Zink
U.....	Umdrehungen; Unit	Zuverlässigk.....	Zuverlässigkeit
u.....	und	λ.....	Wellenlänge; Bakteriophage Lambda o. dessen DNA
u.a.....	und andere/s	Σ.....	Summe
u.U.....	unter Umständen	Ω.....	Ohm
UDP.....	Uridindiphosphat		
UKE.....	Universitätsklinikum Eppendorf		

Aminosäuren:

gemischte Basen:

Bezeichnung	Dreibuchstabencode	Einbuchstabencode	IUB-Code	Basen
Alanin	Ala	A	R	A, G
Arginin	Arg	R	Y	C, T
Asparagin	Asn	N	M	A, C
Asparaginsäure	Asp	D	K	G, T
Cystein	Cys	C	S	C, G
Glutamin	Gln	Q	W	A, T
Glutaminsäure	Glu	E	H	A, C, T
Glycin	Gly	G	B	C, G, T
Histidin	His	H	V	A, C, G
Isoleucin	Ile	I	D	A, G, T
Leucin	Leu	L	N	A, C, G, T
Lysin	Lys	K		
meso-Diaminopimelinsäure	m-Dpm	-		
Methionin	Met	M		
Phenylalanin	Phe	F		
Prolin	Pro	P		
Serin	Ser	S		
Threonin	Thr	T		
Tryptophan	Trp	W		
Tyrosin	Tyr	Y		
Valin	Val	V		

# 1 Einleitung

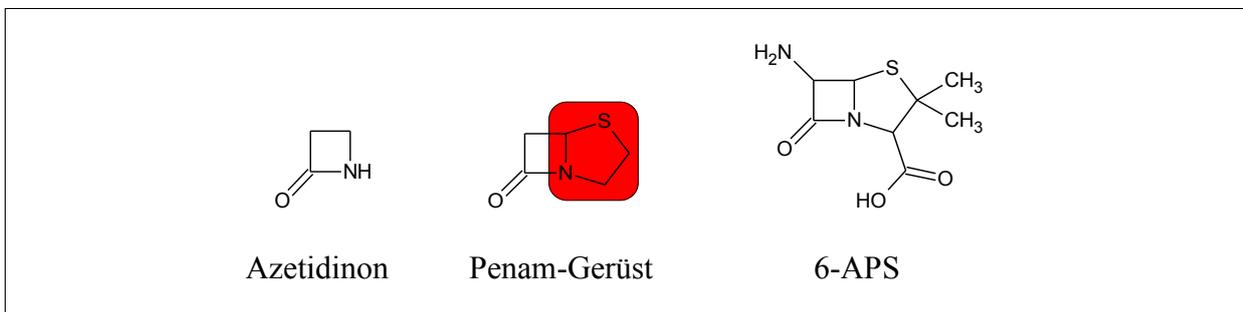
## 1.1 $\beta$ -Lactam-Antibiotika

Antibiotika im engeren Sinne sind Arzneistoffe, welche gegen Bakterieninfektionen bei Tier und Mensch, seltener auch bei Pflanzen eingesetzt werden. Die Untergruppe der  $\beta$ -Lactam-Antibiotika stellt nach wie vor die wichtigste Antibiotika-Gruppe dar. Sie wurde nicht nur chemisch am häufigsten variiert, sondern findet auch die weiteste Anwendung [1].

### 1.1.1 Untergruppen der $\beta$ -Lactam-Antibiotika

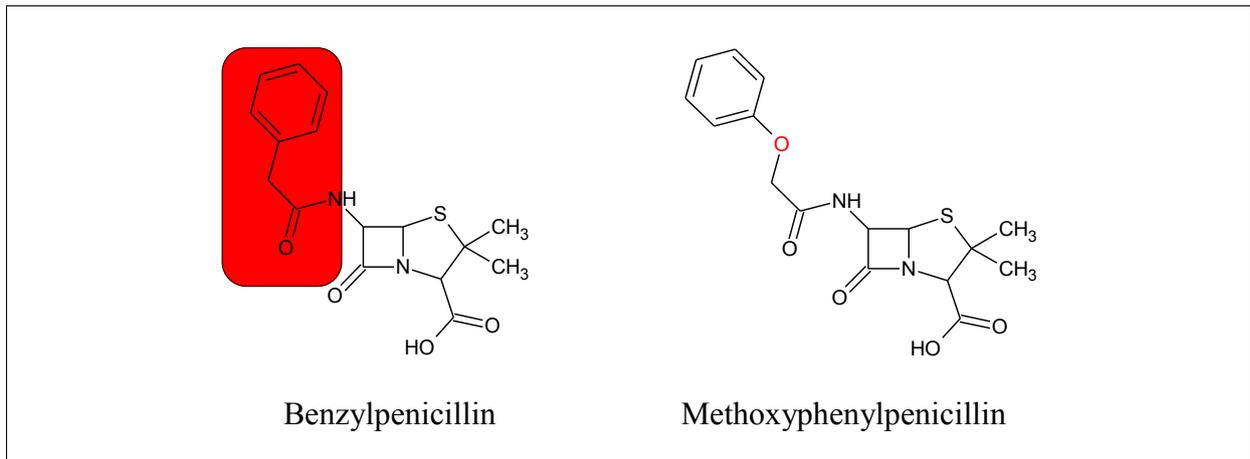
#### 1.1.1.1 Penicilline

Penicilline basieren strukturell auf dem Penam-Grundgerüst, einem Bicyklus aus Azetidinon ( $\beta$ -Propiolactam; seinerseits namensgebend für die Substanzklasse der  $\beta$ -Lactam-Antibiotika) und Thiazolidin, bzw. auf der 6-Aminopenicillansäure (Abbildung 1–1).



**Abbildung 1–1: Azetidinon, Penam-Grundgerüst, 6-Aminopenicillansäure (6-APS).** Vom Azetidinon stammt die zyklische Amidbindung, das Lactam, welches der Substanzklasse der  $\beta$ -Lactam-Antibiotika ihren Namen gibt. Beim Penam-Grundgerüst ist der Thiazolidin-Zyklus farbig hervorgehoben.

Das Penicillin gilt als eine der Schlüsselarzneistoffe in der Medizingeschichte. Eher zufällig von Alexander Fleming 1928 entdeckt und 1929 erstmals beschrieben [2], war es zunächst noch nicht möglich, die Substanz in größerem Maßstab zu gewinnen. Fortschritte in Fermentationsprozessen und nicht zuletzt in der modernen Gentechnik erlaubten eine zunehmend größere Herstellungsmenge. Im ursprünglichen Substanzgemisch wurden 5 verschiedene Penicillin-Derivate gefunden, von denen heute nur noch das ausschließlich parenteral verfügbare Benzylpenicillin (Penicillin G) sowie das oral verfügbare Methoxyphenylpenicillin (Penicillin V) von Bedeutung sind (Abbildung 1–2).

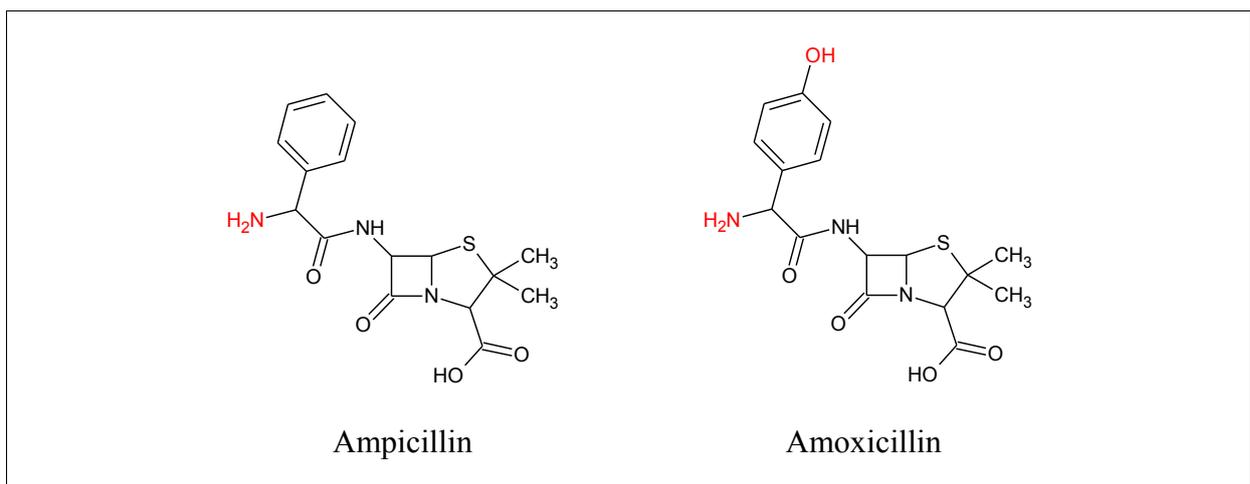


**Abbildung 1–2: Benzylpenicillin und Methoxyphenylpenicillin.**

Mit der Einführung der Penicilline stieß man auch auf das Problem der Resistenzentwicklung (s.u.). Die genannten Substanzen sind alle vergleichsweise instabil gegen die Einwirkung von  $\beta$ -Lactamasen, weshalb die synthetische Chemie nach weiteren, gegen enzymatische Spaltung widerstandsfähigeren Modifikationen suchte und sucht.

#### 1.1.1.1.1 $\alpha$ -Aminobenzylpenicilline (Aminopenicilline)

Durch eine Aminofunktion am  $\alpha$ -C-Atom der Benzylgruppe des Benzylpenicillins erhält man Ampicillin (Abbildung 1–3). Eine zusätzliche *p*-Hydroxygruppe am Benzylkern führt zu Amoxicillin (Abbildung 1–3).

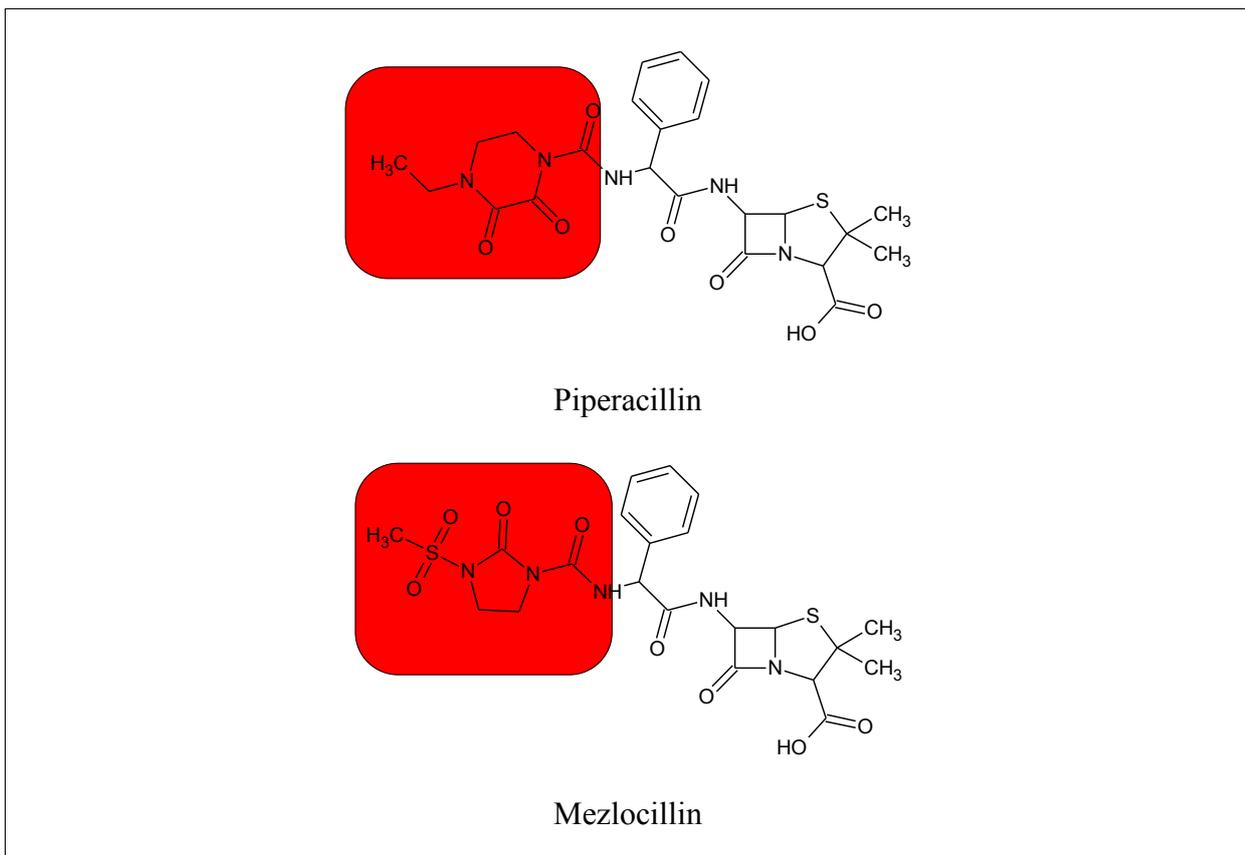


**Abbildung 1–3: Ampicillin, Amoxicillin.**

Ampicillin wird als fixe Kombination mit dem  $\beta$ -Lactamase-Inhibitor Sulbactam, Amoxicillin mit Clavulansäure angeboten (vgl. Kapitel 1.1.1.5, S. 30).

### 1.1.1.1.2 Acylaminopenicilline (Ureidopenicilline)

Durch weitere Substitution der  $\alpha$ -Aminogruppe erhält man die Untergruppe der Acylaminopenicilline, wie das Piperacillin (Abbildung 1–4), bei dem ein Piperacin-Derivat ankondensiert ist. Ein weiterer Vertreter dieser Gruppe ist das Mezlocillin (Abbildung 1–4), wo der Substituent ein Harnstoff- bzw. Ureido-Derivat ist (namensgebend für die synonyme Bezeichnung dieser Untergruppe als Ureidopenicilline).



**Abbildung 1–4: Piperacillin und Mezlocillin.**

Das Spektrum der Acylaminopenicilline ist im Vergleich zu der Gruppe der Aminopenicilline noch breiter und umfasst auch Pseudomonaden. Piperacillin hat von allen Penicillinen das breiteste Spektrum. Es wird als fixe Wirkstoffkombination mit dem  $\beta$ -Lactamase-Inhibitor Tazobactam angeboten (vgl. Kapitel 1.1.1.5, S. 30).

### 1.1.1.1.3 Carboxypenicilline

Zu den Carboxypenicillinen gehören die Wirkstoffe Ticarcillin, Temocillin und Carbenicillin. Sie besitzen eine namensgebende Carboxyl-Funktion in der variablen Seitenkette. Ihre

---

Bedeutung hat gegenüber den Acylaminopenicillinen, mit denen sie ein vergleichbares Spektrum gemeinsam haben, stark abgenommen.

#### 1.1.1.1.4 Isoxazolyl-Penicilline

Zu dieser Gruppe gehören beispielsweise Oxacillin und Flucloxacillin. Sie zeichnet sich durch eine erhöhte Penicillinase-Stabilität aus, was durch einen sterisch anspruchsvollen Substituenten in der variablen Seitenkette erreicht wird. Er enthält unter anderem einen namensgebenden Isoxazolyl-Ring, der den  $\beta$ -Lactam-Ring verhältnismäßig stark abschirmt. Dies führt im Vergleich zu Benzylpenicillin gleichzeitig zu einer reduzierten Wirksamkeit. Isoxazolyl-Penicilline sind nur gegen Gram-positive Keime wirksam.

#### 1.1.1.2 Cephalosporine

Die dem Penicillin recht nahe verwandten Cephalosporine wurden 1945 in einem Isolat des Pilzes *Acremonium chrysogenum* entdeckt [3], mit dem Cephalosporin C als ersten Vertreter. Ihr Stellenwert als Therapeutika ist insgesamt vergleichbar mit dem der Penicilline.

Chemisch betrachtet ist bei den Cephalosporinen der Thiazolidinring zum 6-Ring (für sich betrachtet zu einem 3,6-Dihydro-2H-1,3-thiazin) erweitert. Das resultierende Grundgerüst wird als Cephem bezeichnet.

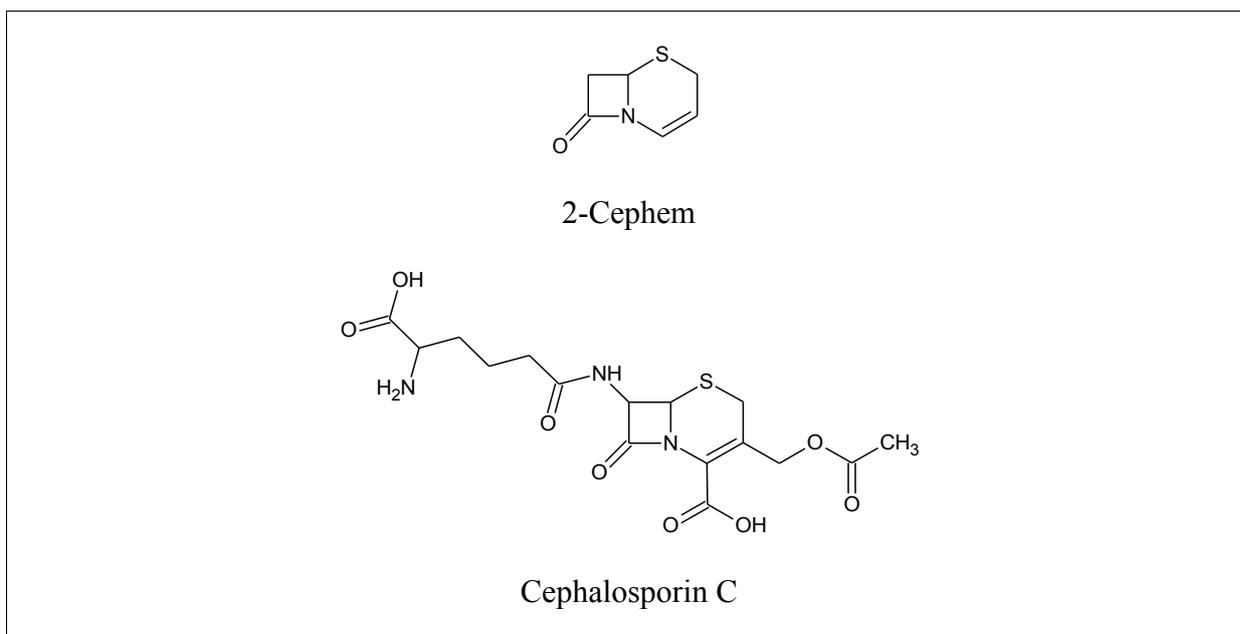


Abbildung 1–5: 2-Cephem und Cephalosporin C.

Es gibt verschiedene Einteilungssysteme für die zahlreichen Cephalosporine. Vergleichsweise oft, insbesondere international, wird das von der WHO praktizierte, chronologische Einteilungssystem in Generationen [4] angewendet, welches auf den Angaben in „Principles and practice of infectious diseases“ [5] basiert. In Deutschland wird bei den *parenteralen* Cephalosporinen beispielsweise auch auf ein 5-klassiges Einteilungssystem der Paul-Ehrlich-Gesellschaft [6] zurückgegriffen, das eine Gliederung mehr anhand des jeweiligen Wirkspektrums vornimmt, oder bei Cephalosporinen generell auch auf ein Einteilungssystem in 6 Gruppen, welches in aktueller Sekundärliteratur zu finden ist [7, 8]. Tabelle 1–1 stellt die Einteilungen nach WHO von den in dieser Arbeit verwendeten Cephalosporinen dar.

Tabelle 1–1: Einteilung der verwendeten Cephalosporine nach WHO

<b>Cephalosporin</b>	<b>Generation</b>
<b>Cefalexin</b>	1
<b>Cefazolin</b>	1
<b>Cefepim</b>	4
<b>Ceftazidim</b>	3
<b>Cefotaxim</b>	3
<b>Cefoxitin</b>	2
<b>Cefpirom</b>	4
<b>Cefpodoxim</b>	3
<b>Cefuroxim</b>	2

Chronologisch betrachtet hat sich das Spektrum der Cephalosporine ausgehend von einer primären Wirksamkeit gegen Gram-positive Keime mit der Einführung neuer Derivate über die Zeit verbreitert. Dabei nahm die Stabilität gegen vorherrschende  $\beta$ -Lactamasen tendenziell ebenfalls zu, wobei aber neue Resistenzentwicklungen seit jeher rasch nach der Einführung einer neuen Substanz folgten (vgl. Kapitel 1.1.3.3.1, ab S. 48).

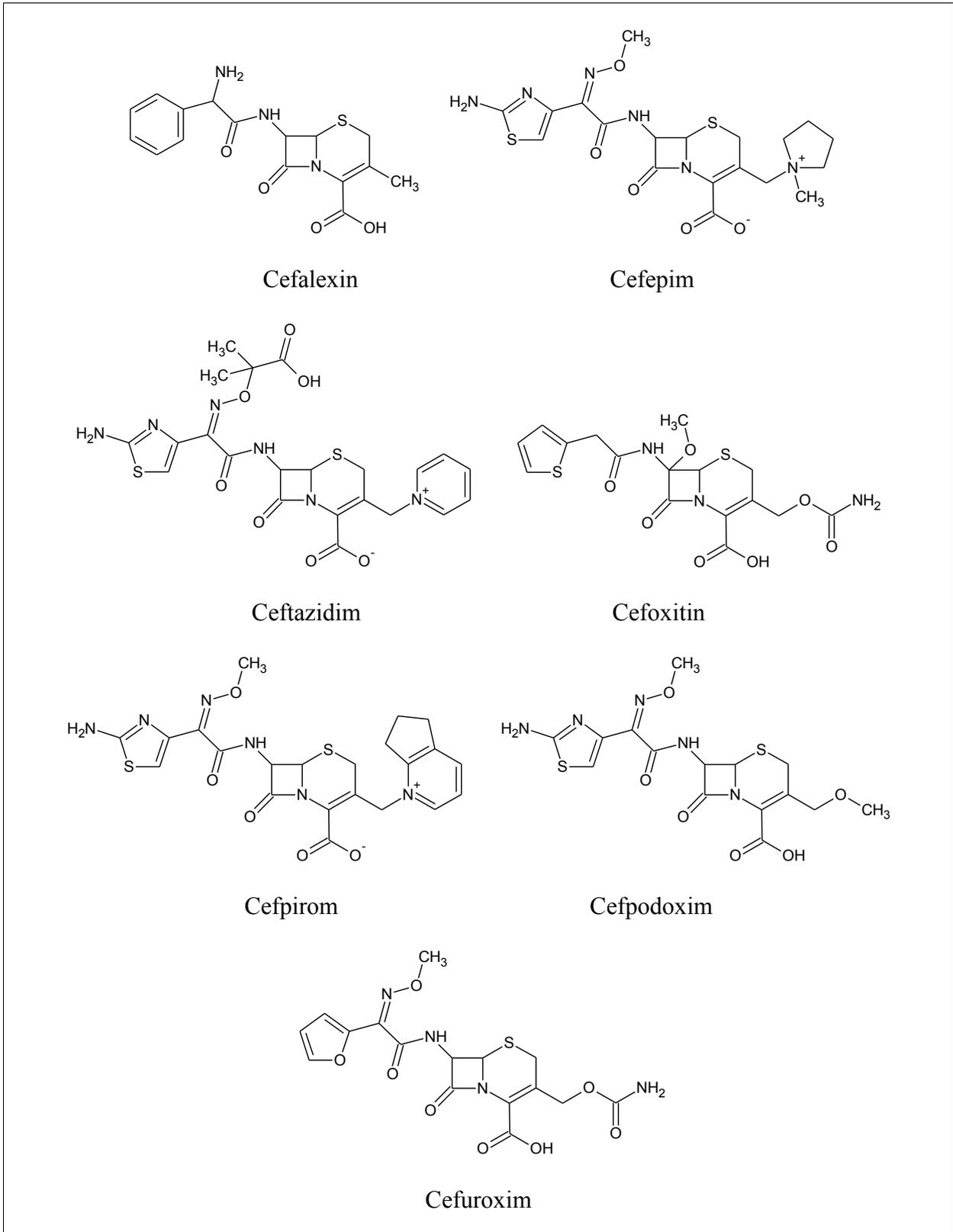


Abbildung 1–6: Verschiedene Cephalosporine.

### 1.1.1.3 Monobactame

Aztreonam ist in Deutschland der einzige im Handel befindliche Wirkstoff der Gruppe der Monobactame. Monobactame leiten sich von der 3-Aminomonobactamsäure ab. Chemisch betrachtet reduziert sich das Penicillansäure-Doppelringsystem auf das Propiolactam. Das Wirkungsspektrum ist auf Gram-negative Keime beschränkt, da die Ziel-PBPs nicht in Gram-positiven Erregern vorkommen.

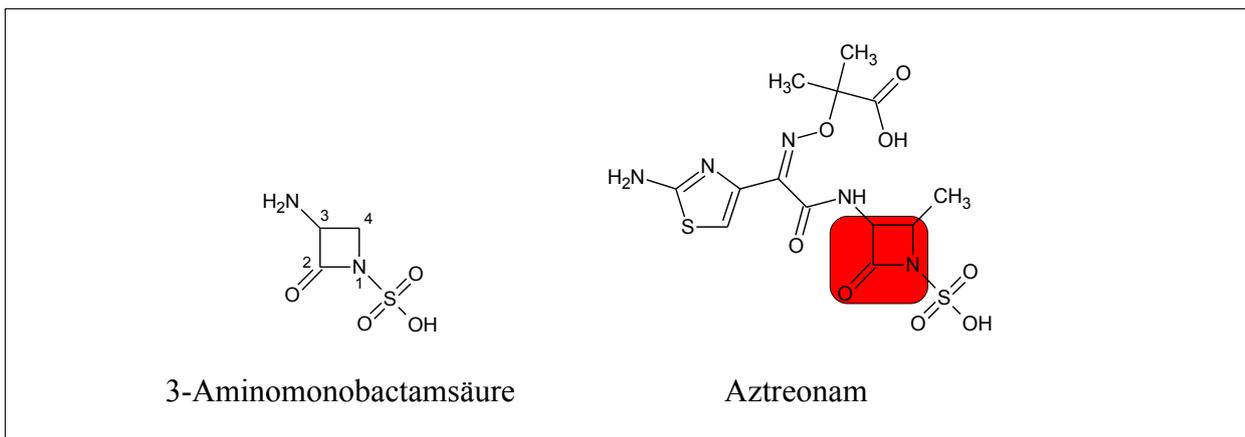


Abbildung 1–7: 3-Aminomonobactamsäure, Aztreonam.

### 1.1.1.4 Carbapeneme

Carbapeneme leiten sich von Thienamycin ab, welches seinerseits in den 70er Jahren aus *Streptomyces cattleya* isoliert werden konnte [9].

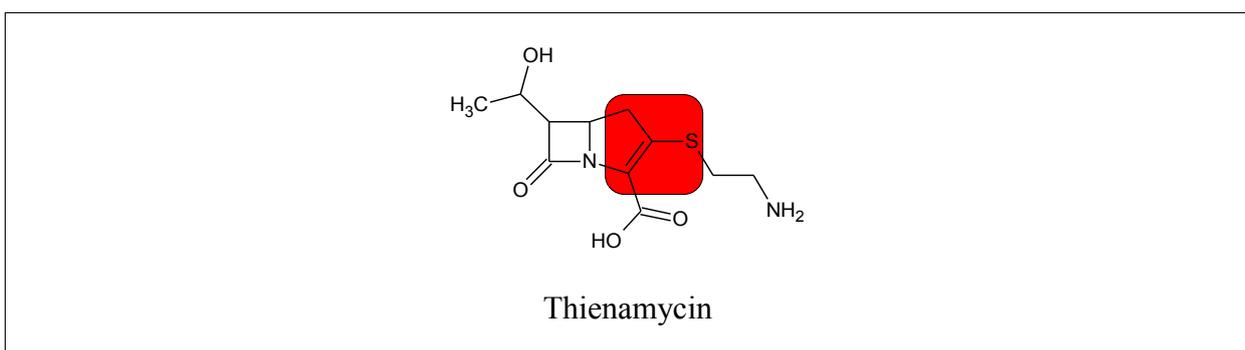


Abbildung 1–8: Thienamycin.

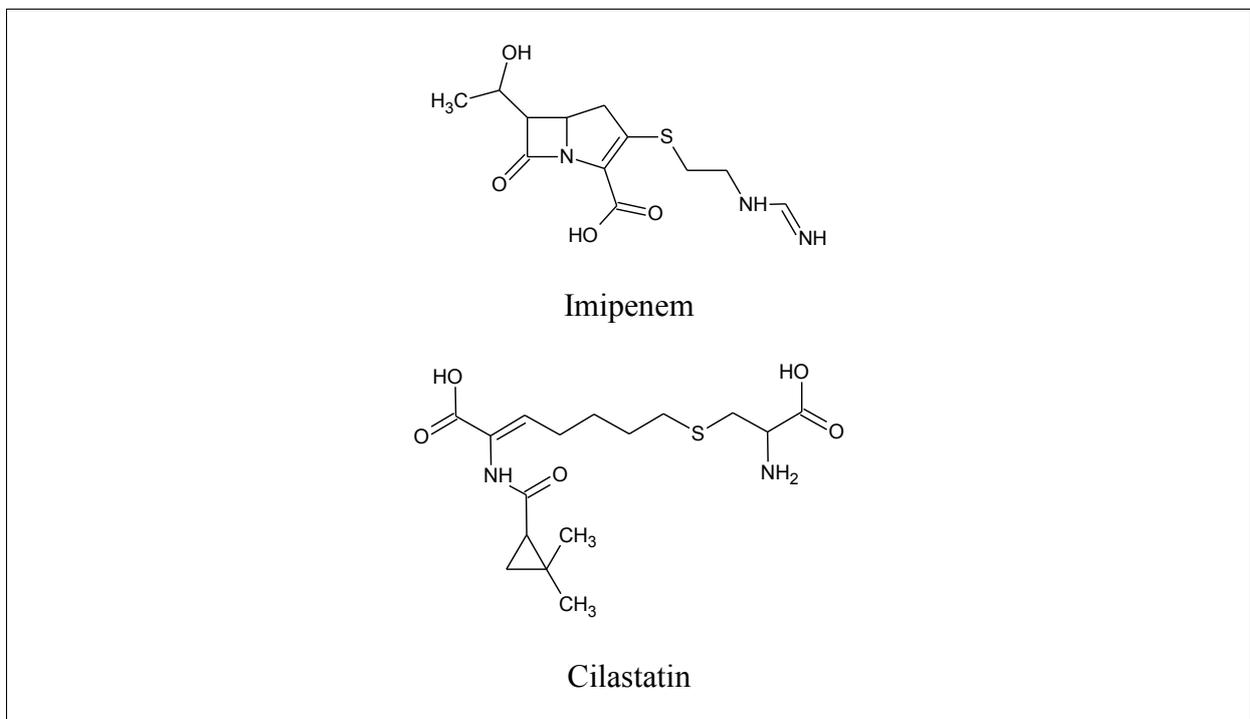
Carbapeneme zeichnen sich durch eine hohe Stabilität gegen  $\beta$ -Lactamasen aus, was in dem Carbapenem-Ringsystem begründet ist. Im Vergleich zum Penam-Ringsystem ist dort der Schwefel an Position 1 durch Kohlenstoff und die  $\sigma$ -Bindung zwischen den Atomen C2 und C3 durch eine  $\pi$ -Bindung ersetzt (das Azetidinon ist hier an 2,3-Dihydro-1H-pyrrol

---

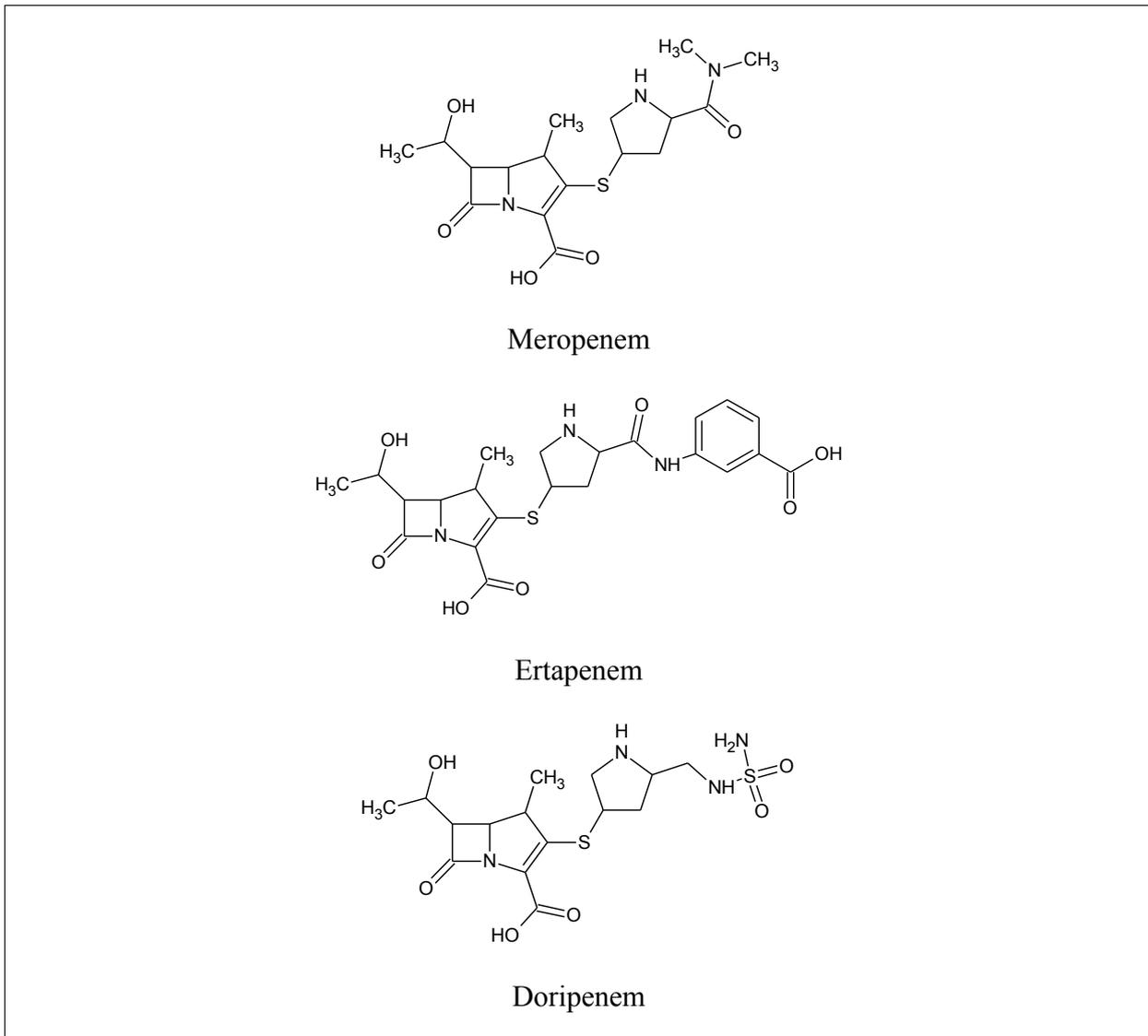
kondensiert). Ferner ist stets eine Hydroxyethylgruppe an C6 lokalisiert.

Carbapeneme erfassen ein breites Erregerspektrum und werden als Reserveantibiotika eingesetzt. In Deutschland erhältlich sind Meropenem, Imipenem (in Kombination mit dem Dehydropeptidase-Hemmer Cilastin, da Imipenem durch dieses Enzym vergleichsweise leicht hydrolysiert werden kann), Ertapenem sowie Doripenem. Es befinden sich weitere Substanzen in der Entwicklung. Allen ist gemein, dass sie ausschließlich parenteral applizierbar sind. Der erwähnten, hohen  $\beta$ -Lactamase-Stabilität steht eine zunehmende Verbreitung von Carbapenemasen gegenüber, die das wesentliche Thema dieser Arbeit sind.

Eine wichtige Eigenschaft von Carbapenem bezüglich ihres Wirkmechanismus ist es, neben der Inhibierung von PBPs, auch  $\beta$ -Lactamasen zu inhibieren, wenn diese keine Carbapenemasen sind [10].



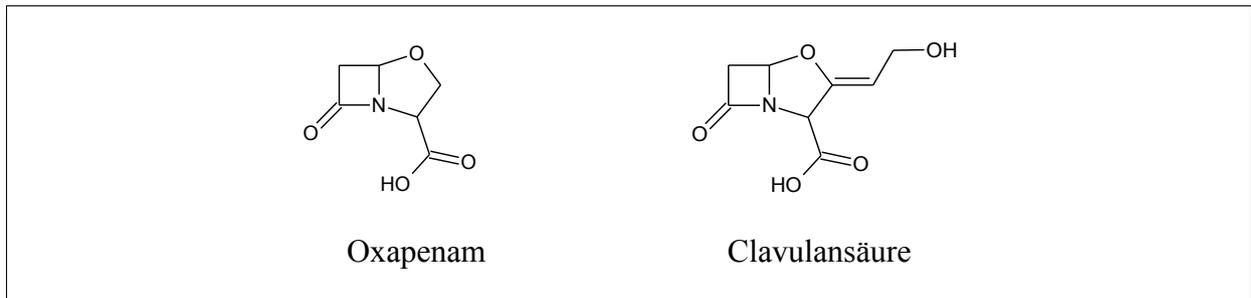
**Abbildung 1–9: Imipenem und Cilastatin.**



**Abbildung 1–10: Meropenem, Ertapenem und Doripenem.** Die Methylgruppe an C1 macht diese Carbapeneme stabil gegen die renale Dihydropeptidase [10].

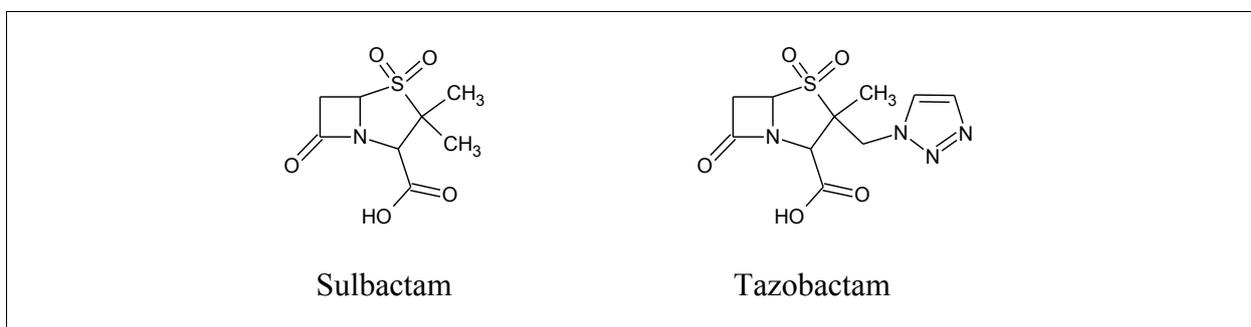
### 1.1.1.5 $\beta$ -Lactamase-Inhibitoren

$\beta$ -Lactamase-Inhibitoren sind in fixen Kombinationen mit bestimmten Penicillin-Derivaten im Handel (vgl. Kapitel 1.1.1.1, S. 22ff). Die in Abbildung 1–11 und Abbildung 1–12 dargestellten, verwendeten Inhibitoren weisen chemisch unterschiedliche Strukturen auf. Clavulansäure besitzt ein Oxapenam-Grundgerüst, während Sulbactam und Tazobactam 4,4-Dioxo-Derivate des Penams (vgl. Abbildung 1–1, S. 22) sind.



**Abbildung 1–11: Oxapenam und Clavulansäure.**

Clavulansäure wurde in den 1970er Jahren aus *Streptomyces clavuligerus* isoliert [11].



**Abbildung 1–12: Sulbactam und Tazobactam.**

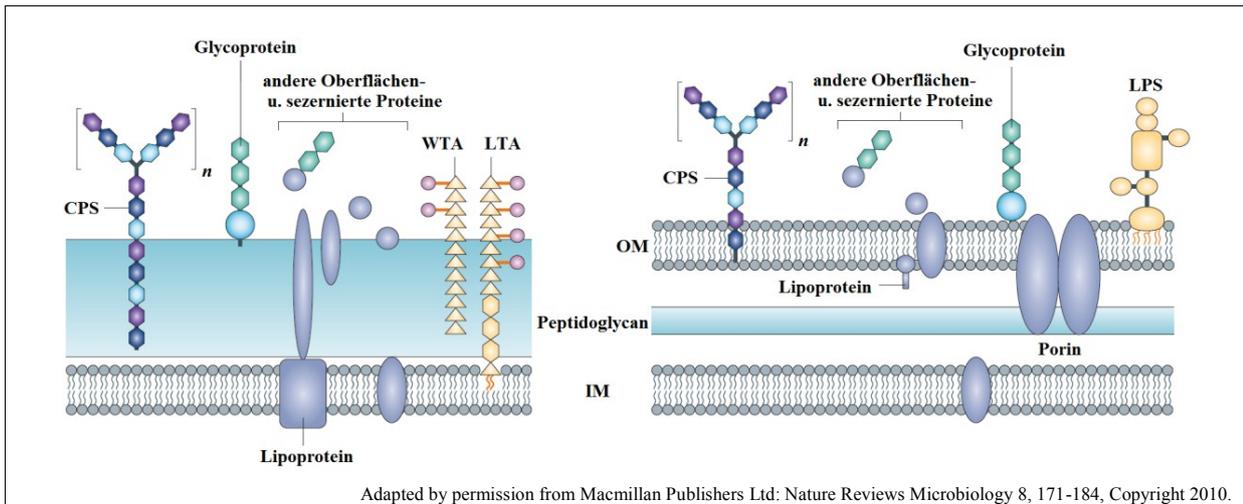
Sulbactam und Tazobactam sind beide synthetischen Ursprungs und wurden 1978 [12] bzw. 1984 [13] entwickelt.

Alle drei Substanzen inhibieren bevorzugt  $\beta$ -Lactamasen der Klasse A [14].

## 1.1.2 Wirkmechanismus der $\beta$ -Lactam-Antibiotika

### 1.1.2.1 Zellwand von Gram-negativen Bakterien

Einen Vergleich zwischen dem Aufbau der Zellwände von Gram-positiven und -negativen Bakterien gibt Abbildung 1–13.

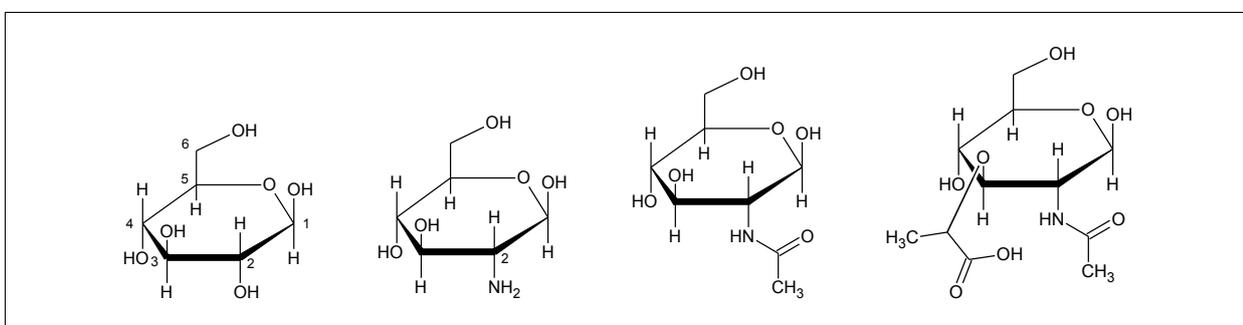


Adapted by permission from Macmillan Publishers Ltd: Nature Reviews Microbiology 8, 171-184, Copyright 2010.

**Abbildung 1–13: Vergleich des Zellaufbaus bei Gram-positiven und -negativen Bakterien.** Aus [15], modifiziert. Links ist die Zellwand der Gram-positiven Bakterien abgebildet, rechts der Gram-negativen Bakterien. IM: inner membrane (innere Membran); OM: outer membrane (äußere Membran); WTA / LTA: wall / lipoteichoic acids (Wand- / Lipoteichonsäuren); CPS: cell wall-associated polysaccharide (zellwandassoziiertes Polysaccharid); LPS: Lipopolysaccharid.

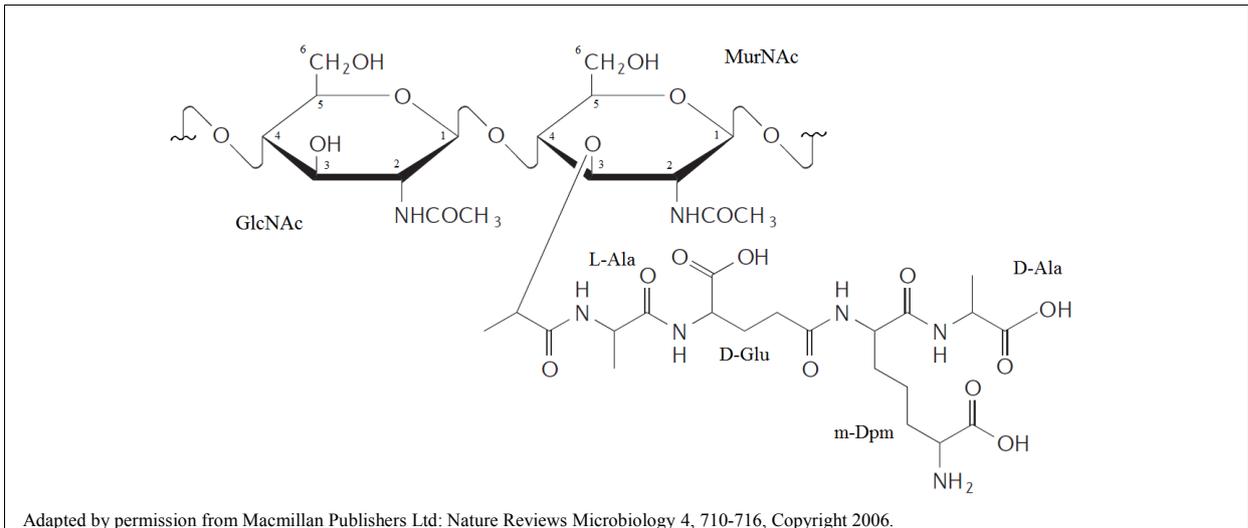
Bei beiden ist eine innere Membran, d.h. eine Doppellipidschicht mit intra- und transmembranären Proteinen, vorhanden. Im Gegensatz zu Gram-positiven Bakterien verfügen Gram-negative zusätzlich über eine zweite, äußere Membran. Sie bildet die Abgrenzung nach außen und schließt zusammen mit der inneren Membran den periplasmatischen Raum ein. Während bei den Gram-positiven Bakterien eine relativ dicke Schicht aus Peptidoglycan (Murein) auf die innere Membran aufgelagert ist, ist diese bei den Gram-negativen sehr dünn und gegebenenfalls einschichtig.

Die Mureinschicht setzt sich zusammen aus alternierend 1,4- $\beta$ -glykosidisch verknüpften Molekülen von N-Acetylglucosamin (GlcNAc) und N-Acetylmuraminsäure (MurNAc) (s. Abbildung 1–14).



**Abbildung 1–14: Aminozuckercomponenten des Mureins.** Zum Vergleich sind links  $\beta$ -D-Glucose und rechts daneben Glucosamin dargestellt, welches sich von D-Glucose durch eine Aminogruppe an C2 unterscheidet. Daneben ist N-Acetylglucosamin abgebildet und ganz rechts N-Acetylmuraminsäure, welche chemisch als der C3-Milchsäure-Ether des N-Acetylglucosamins angesehen werden kann.

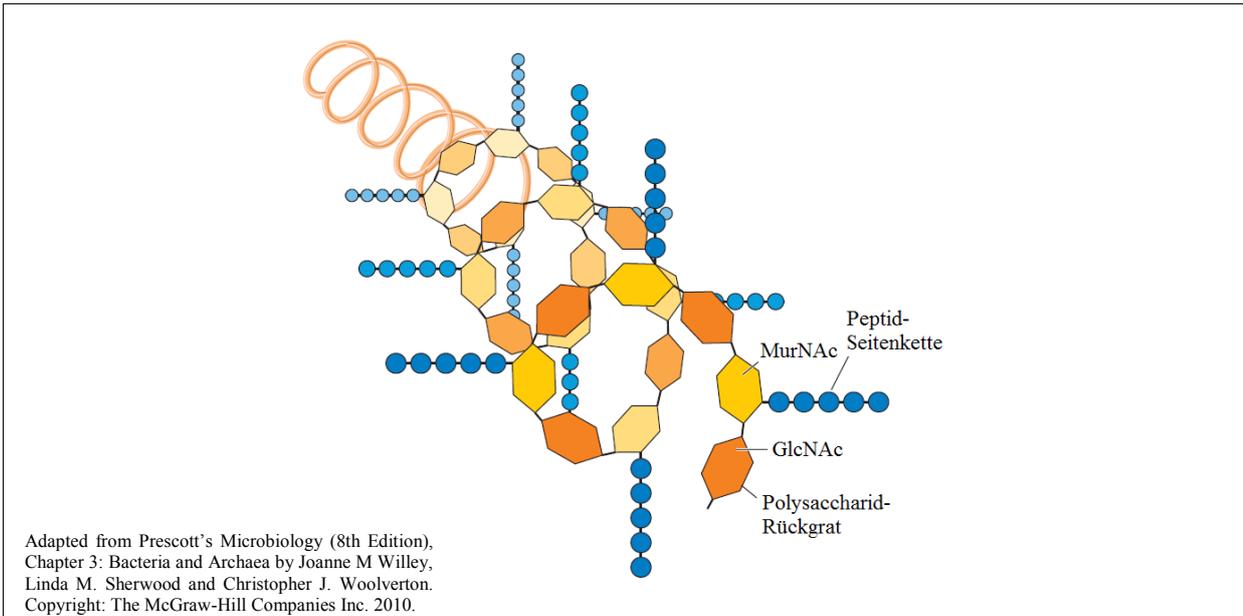
Der Milchsäurerest der MurNAc ist peptidisch verknüpft mit einem Tetrapeptid. Dieses besteht bei Gram-negativen Bakterien üblicherweise aus L-Alanin (L-Ala), D-Glutaminsäure (D-Glu), meso-Diaminopimelinsäure (m-Dpm) und D-Alanin (s. Abbildung 1–15). Bei der Biosynthese des Mureins liegt zunächst ein Pentapeptid mit einem endständigen D-Alanin vor, das jedoch bei der Quervernetzung abgespalten wird (s. S. 38 im folgenden Kapitel).



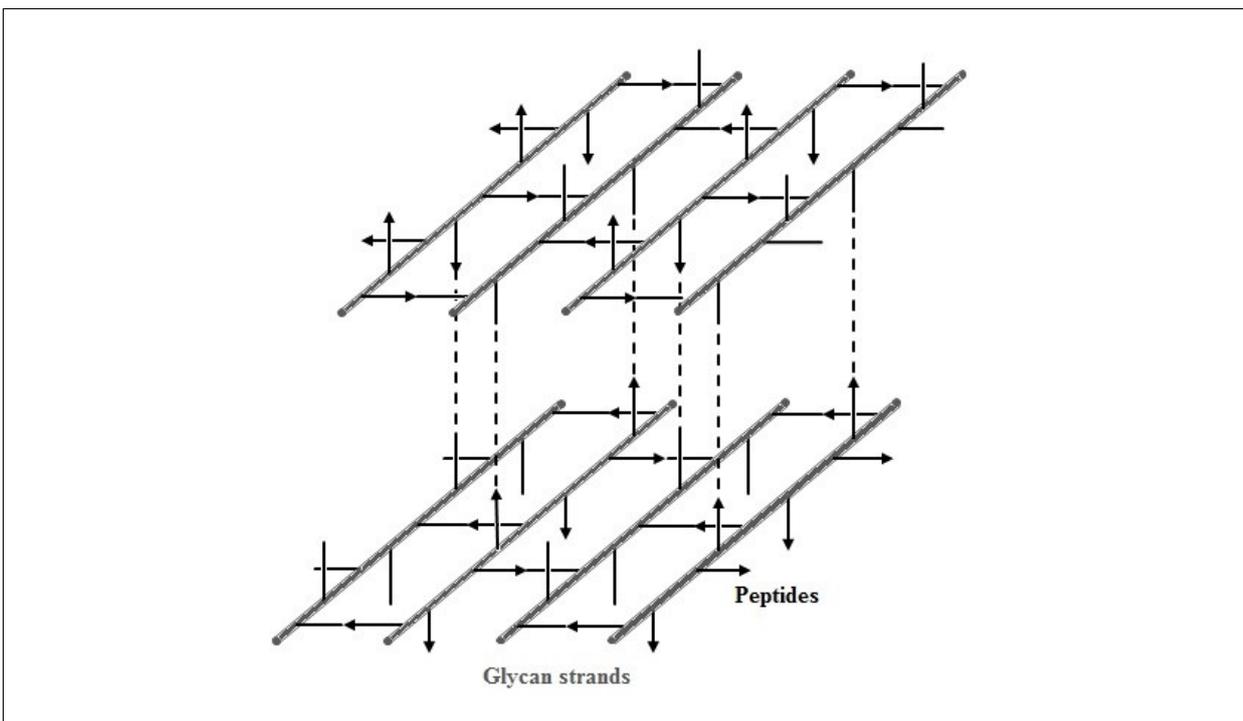
**Abbildung 1–15: Murein-Ausschnitt.** Aus [16], modifiziert.

Die freie Aminogruppe des m-Dpm kann dabei mit der freien Säuregruppe des endständigen D-Ala eines benachbarten Tetrapeptids peptidisch verknüpft werden. Dies führt dann zu einer Quervernetzung der Zuckerketten. Diese Art der Quervernetzung über m-Dpm und D-Ala ist in fast allen Gram-negativen sowie einigen Gram-positiven Bakterien zu finden [17].

Da die Zuckerketten eine helikale Konformation annehmen, sind die Tetrapeptide in verschiedene Richtungen relativ zueinander ausgerichtet, wodurch die Quervernetzung zu Nachbarsträngen räumlich erfolgen kann. Bei den folgenden, schematischen Abbildungen ist zu beachten, dass bis jetzt noch nicht geklärt ist, wie viele Disaccharide pro Windung der Helix vorkommen [18].



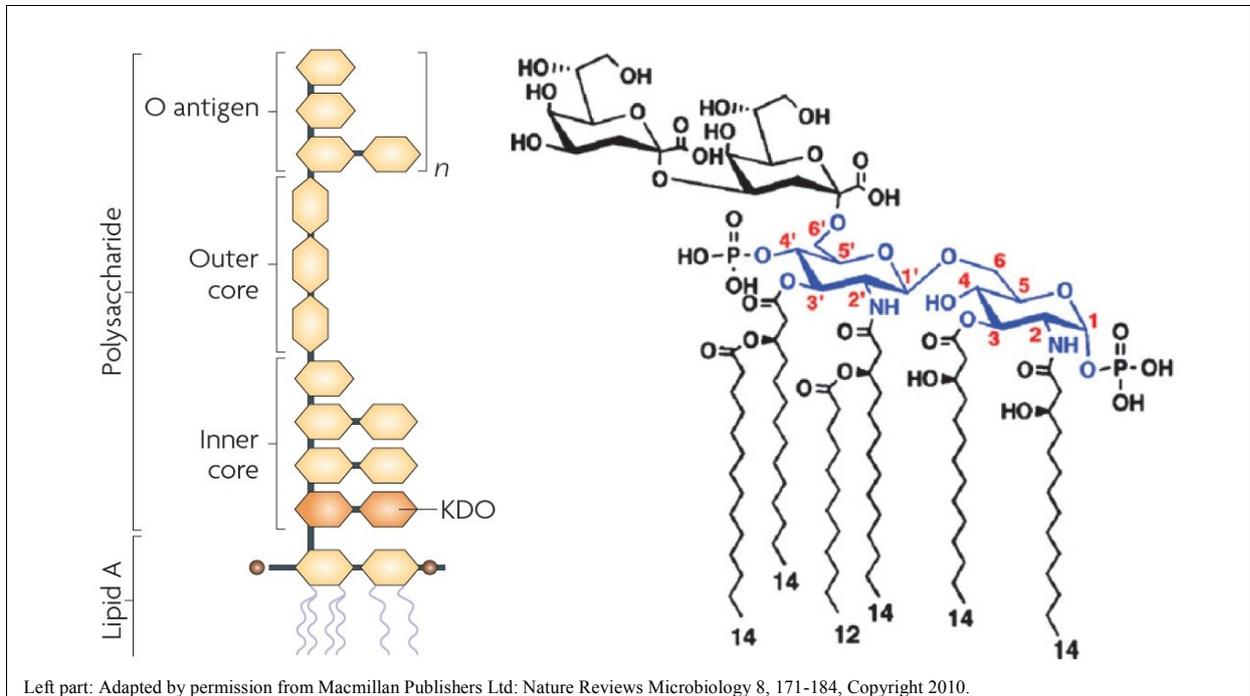
**Abbildung 1–16: Polysaccharid-Helix aus GlcNAc und MurNAc.** Aus [17], modifiziert. Durch die relative Ausrichtung der Peptid-Seitenketten in vier Richtungen sind eine entsprechende Quervernetzung und damit der Aufbau eines dreidimensionalen Netzwerkes möglich.



**Abbildung 1–17: Netzwerk-Struktur des Peptidoglycans.** Aus [19], modifiziert.

Die äußere Membran der Gram-negativen Bakterien ist ein wesentlicher Grund dafür, weshalb sie gegen viele, vor allem polare bzw. hydrophile Antibiotika, die bei Gram-positiven Bakterien wirken, intrinsisch resistent sind. Sie stellt bei den meisten Gram-negativen Bakterien eine asymmetrische Lipiddoppelschicht aus zum einen Phospholipiden und zum

anderen Lipopolysacchariden dar, wobei letztgenannte ausschließlich zellauswärts ausgerichtet sind [20].



**Abbildung 1-18: Struktur von Lipopolysacchariden.** Links: vereinfachte, schematische Darstellung von LPS, aus [15]. Lipopolysaccharide setzen sich zusammen aus Lipid A und einem Polysaccharid-Anteil, welcher seinerseits unterteilt werden kann in eine innere und äußere Kernregion sowie ein O-Antigen. Das O-Antigen kann dabei aus 1-40 repetitiven Einheiten bestehen. Die Bindung zwischen Lipid A erfolgt an 2-Keto-3-desoxy-octonat (KDO) als unterste Saccharidkomponente des Polysaccharids. Rechts: KDO<sub>2</sub>-Lipid A, aus [21]. In blau dargestellt sind GlcNAc-Bausteine, die das Grundgerüst des Lipid A bilden. Über die hydrophoben, langkettigen Kohlenwasserstoffe ist das Lipid A in die äußere Membran der Gram-negativen Bakterien verankert.

Bezüglich der Zusammensetzung der Phospholipide unterscheiden sich innere und äußere Membran nicht wesentlich, hier findet man ca. 80 % Phosphatidylethanolamine, ca. 15 % Phosphatidylglycerine und ca. 5 % Cardiolipine [20].

In der äußeren Membran sind einige Proteine ubiquitär vorhanden, vor allem OmpA, für das eine strukturgebende Funktion angenommen wird, sowie u.a. Porine.

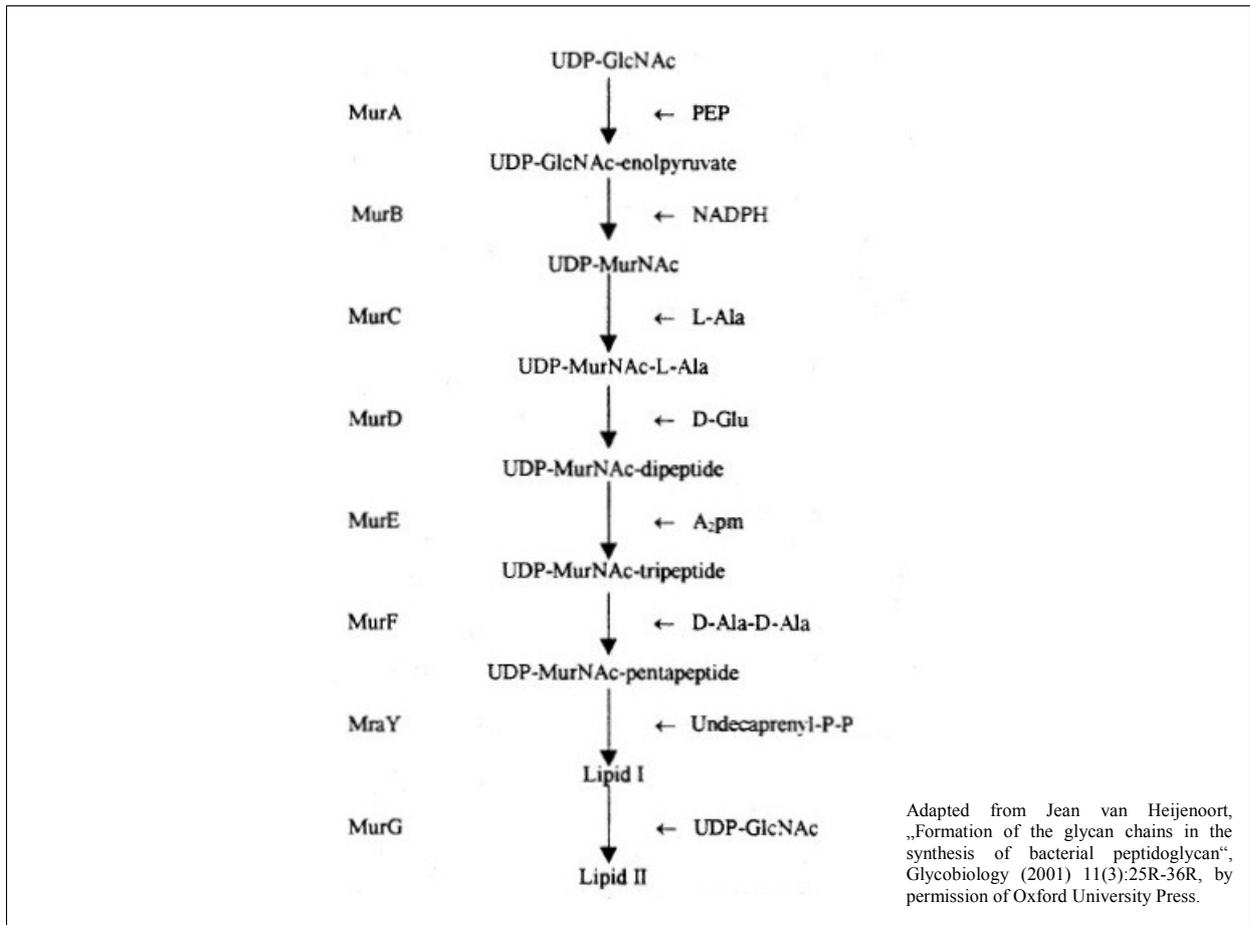
### 1.1.2.2 Synthese und Recycling der Mureinschicht

Die Synthese der Mureinschicht ist der Angriffspunkt der  $\beta$ -Lactamantibiotika und soll hier zunächst genauer betrachtet werden.

Die Synthese findet in zwei Kompartimenten der Bakterienzelle statt, nämlich zunächst im Cytoplasma bzw. an der Innenseite der Cytoplasmamembran und danach an der Außenseite

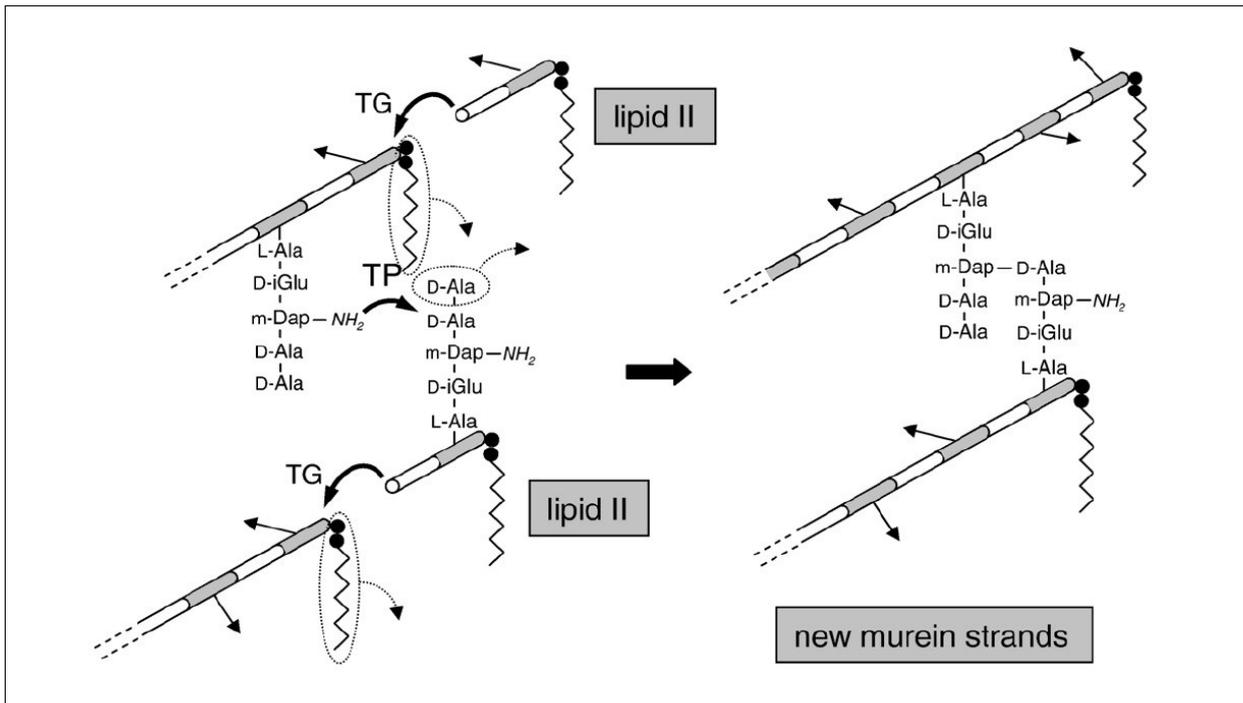
der Cytoplasmamembran bzw. im periplasmatischen Raum. Entsprechend der Lokalisationen kann man die Synthese als zweistufigen Prozess betrachten.

Im Cytoplasma werden Vorläufermoleküle des Mureins gebildet. Hier wird GlcNAc durch Kopplung mit UDP aktiviert. Ein Teil dieser Moleküle wird unter Katalyse durch MurA und MurB in UDP-MurNAc umgebaut. Das UDP-MurNAc wird dann an seinem Milchsäurerest sukzessive mit L-Ala, D-Glu, m-Dpm und zwei D-Ala verknüpft. Diese Reaktionen werden durch die Enzyme MurC bis MurF im Rahmen einer nicht-ribosomalen Peptidsynthese katalysiert. Das UDP-MurNAc-Pentapeptid wird dann unter Abspaltung von UDP membranseitig durch MraY an Undecaprenylpyrophosphat gebunden, was später dem Transfer durch die innere Membran dient. Das resultierende Vorläufermolekül wird Lipid I genannt. Vor der Passage wird durch MurG unter UDP-Abspaltung ein UDP-GlcNAc-Rest ergänzt, das Produkt ist Lipid II. Das fertige Vorläufermolekül kann nun unter Katalyse durch eine noch nicht näher bekannte Flippase aus dem Cytoplasma herausgeschleust werden [22, 23].



**Abbildung 1–19: Erste Stufe der Mureinsynthese: Bildung der Vorläufermoleküle.** Aus [23], modifiziert. PEP: Phosphoenolpyruvat; NADPH: Nicotinamiddinucleotidphosphat; A<sub>2</sub>pm: entspricht meso-Diaminopimelinsäure (m-Dpm).

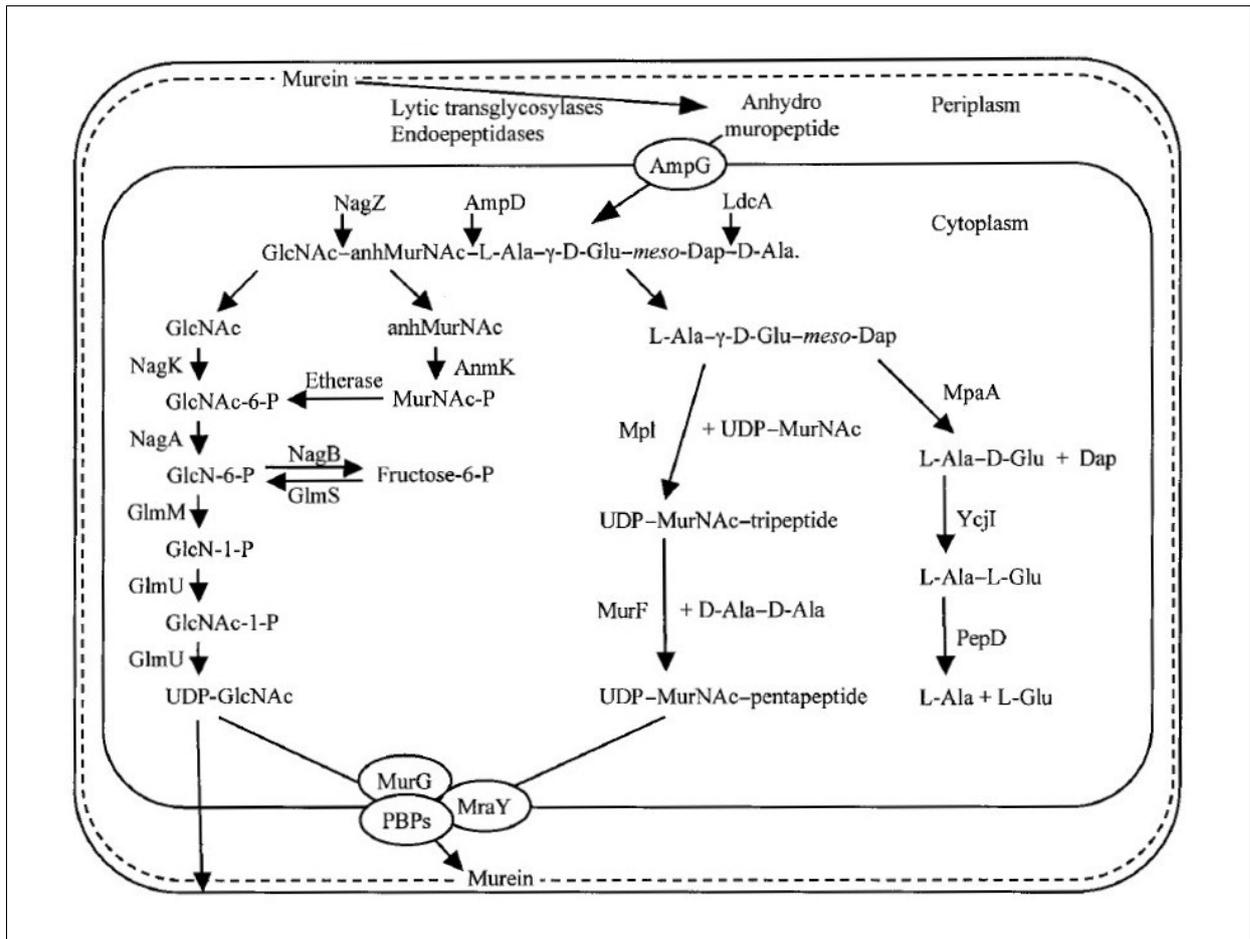
Auf der Außenseite der inneren Membran erfolgt nun in der zweiten Stufe der Einbau des Vorläufermoleküls Lipid II in das Murein-Netzwerk durch Murein-Synthasen. Dabei handelt es sich entweder um monofunktionale Transglycosylasen, bifunktionale Transglycosylasen / Transpeptidasen oder monofunktionale Transpeptidasen. Gemein ist ihnen eine Verankerung mit der Außenseite der Cytoplasmamembran, wobei das aktive Zentrum stets im periplasmatischen Raum lokalisiert ist [22]. Diejenigen Enzyme, die eine Transpeptidase-Aktivität besitzen, werden auch als Penicillin-bindende Proteine bezeichnet (vgl. nachfolgendes Kapitel ab S. 40).



**Abbildung 1–20: Transglycosylase- und Transpeptidase-Reaktion.** Aus [22], modifiziert. TG: Transglycosylierung; TP: Transpeptidierung; m-DAP: entspricht meso-Diaminopimelinsäure (m-Dpm). D-iGlu ist D-Glu, das „i“ soll darauf hinweisen, dass hier die  $\gamma$ -Carboxylgruppe der Glutaminsäure in das Peptidrückgrat einfließt. Weiße Zylinder sind GlcNAc, graue Zylinder MurNAC, davon ausgehende Pfeile sind Peptide, gezackte Linien Undecaprenyl-Reste und schwarze Punkte Phosphate.

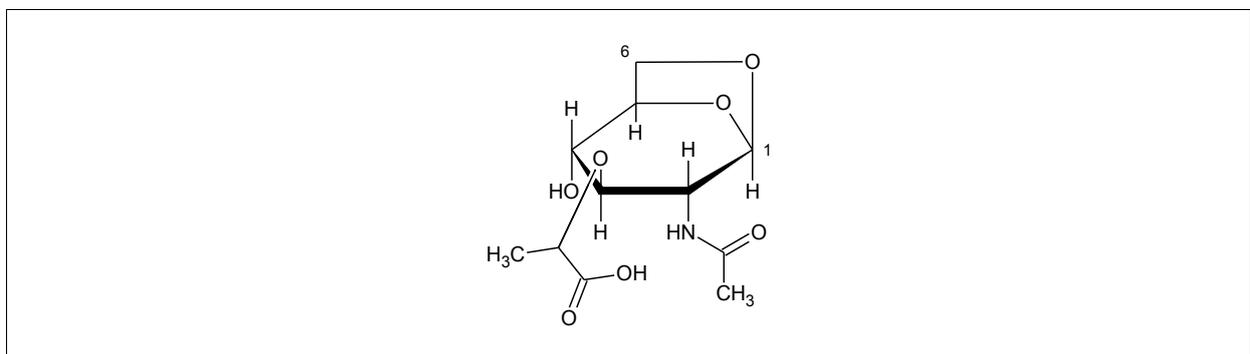
Die Transglycosylierungen sorgen für die  $\beta$ -1,4-Verknüpfung von endständigem MurNAC eines bestehenden, in der Synthese befindlichen Peptidoglycanstranges mit dem GlcNAc des Lipid II. Dabei wird das Undecaprenylpyrophosphat des zu verlängernden Stranges frei und steht nach einem Umklappen zur Innenseite der Membran wieder für die Aufnahme und den Transport eines neuen Disaccharid-Pentapeptidbausteins zur Verfügung. Die Transpeptidierung sorgt für die Quervernetzung von Peptidoglycansträngen, indem eine Peptidbindung zwischen der freien Aminogruppe des m-Dpm und der Carboxylgruppe des D-Ala an Position 4 des Nachbarpeptids erzeugt wird. Die dafür nötige Energie wird aus der Abspaltung des endständigen D-Ala an Position 5 gewonnen [22]. Daneben modulieren Carboxypeptidasen durch Abspaltung freier, endständiger D-Alaninreste den Gesamtgrad der Quervernetzung. Solche Enzyme zählen ebenfalls zu den PBPs.

Zellwachstum und Zellteilung bedingen ein Gleichgewicht aus Auf- und Abbau des Mureins. Für den Abbau mit anschließendem Recycling der Produkte sind vor allem Endopeptidasen, die die Hydrolyse der quervernetzenden Peptidbindungen zwischen m-Dpm und D-Ala katalysieren, sowie lytische Transglycosylasen, die die Lyse der  $\beta$ -1,4-glycosidische Bindung zwischen MurNAC und GlcNAc katalysieren, verantwortlich.



**Abbildung 1–21: Mureinrecycling.** Aus [24].

Bei den Abbauprozessen der lytischen Transglycosylasen fallen stets 1,6-Anhydro-MurNAc-Peptide an. Die freiwerdende Hydroxygruppe an C1 und diejenige an C6 des MurNAc bilden dabei eine intramolekulare Etherbindung aus.



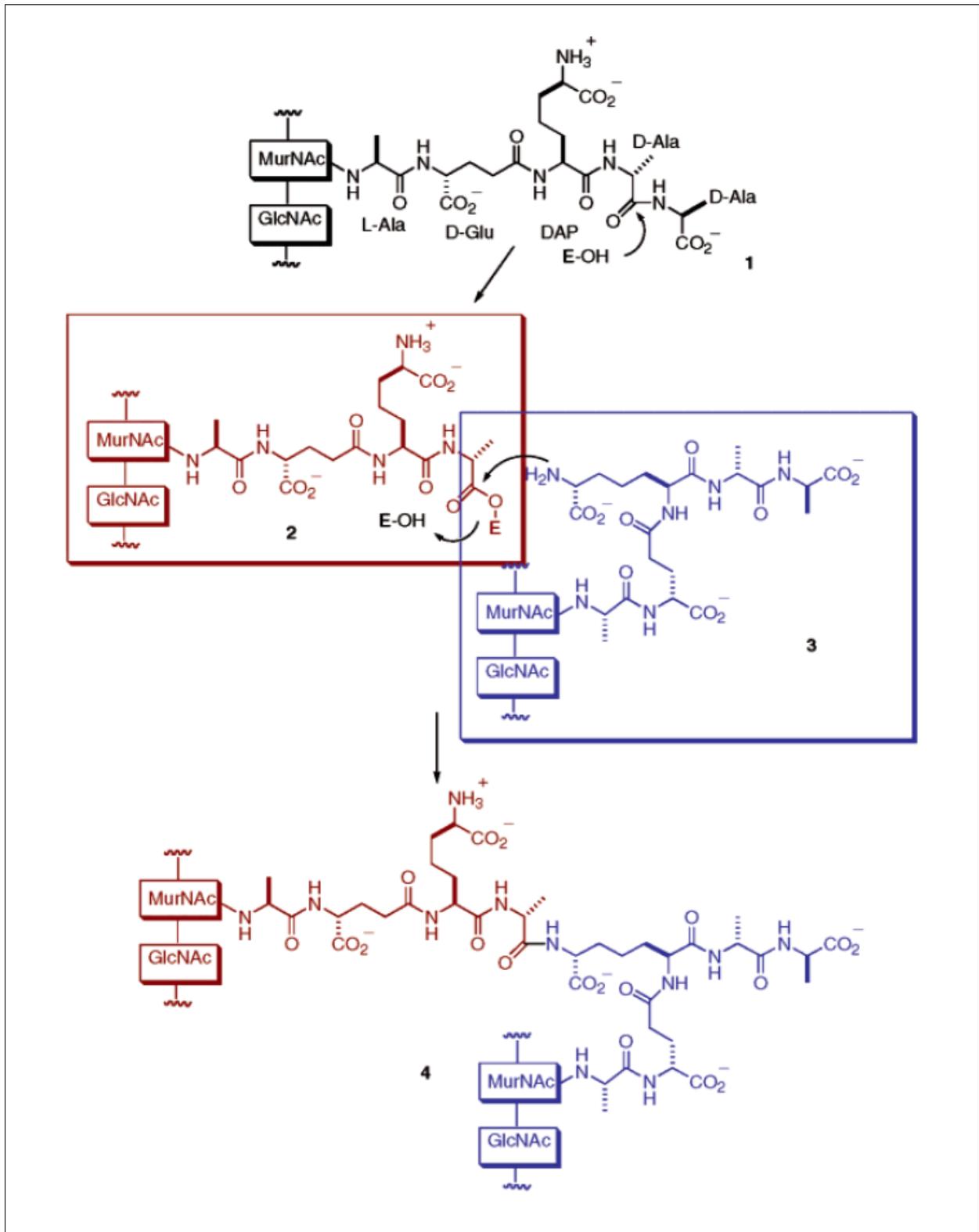
**Abbildung 1–22: Anhydro-MurNAc.**

Die entsprechenden Abbauprodukte können durch den Transporter AmpG zurück in das Cytoplasma gelangen und werden dort unter Einfluss verschiedener Enzyme abgebaut. Dabei

anfallendes, freies Anhydro-MurNAc wird dabei zunächst über die Anhydro-MurNAc-Kinase AnmK in MurNAc-Phosphat [24] und dann über die Etherase MurQ in GlcNAc-Phosphat und Lactat umgebaut [25]. Schließlich können die Einzelkomponenten des Mureinabbaus an den entsprechenden Stellen in der Synthese der Vorläufermoleküle des Mureins wieder als Substrate dienen.

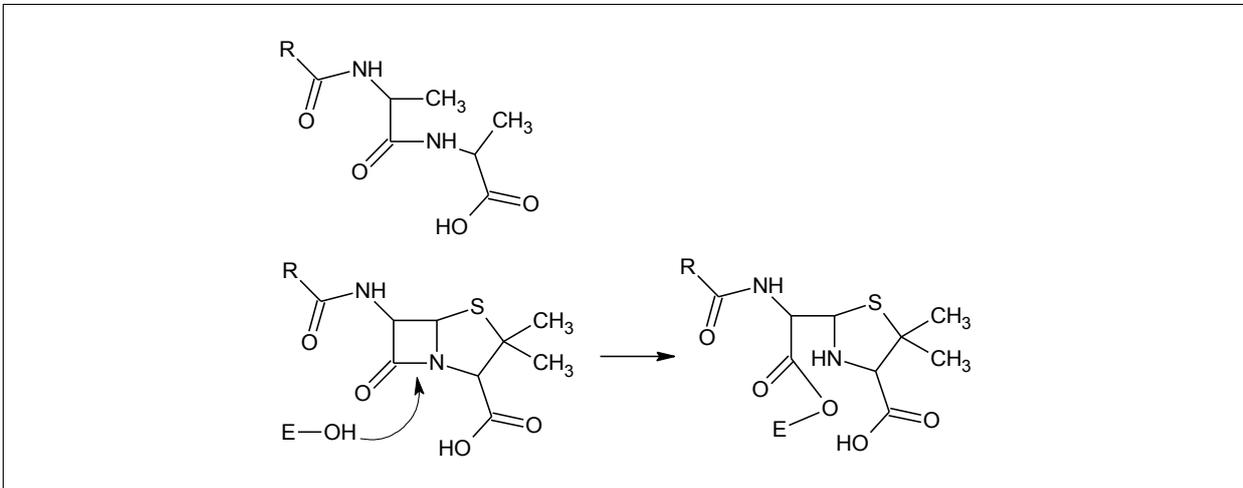
### 1.1.2.3 Angriffspunkt der $\beta$ -Lactam-Antibiotika

Die  $\beta$ -Lactam-Antibiotika greifen in der Transpeptidase-Reaktion der Mureinsynthese an. Diese Reaktion stellt man sich wie in Abbildung 1–23 dargestellt vor. Wichtig im Zusammenhang mit den  $\beta$ -Lactam-Antibiotika ist dabei der erste Schritt: das Vorhandensein der D-Ala-D-Ala-Peptidbindung kann zur Bindung der Transpeptidase mit der nachfolgenden Quervernetzung führen.



**Abbildung 1–23: Transpeptidase-Reaktionsmechanismus.** Aus [26], modifiziert. E: Enzym, d.h. Transpeptidase; DAP entspricht m-Dpm. Der Mechanismus ist Serin-katalysiert. Zunächst greift dessen Hydroxygruppe die Peptidbindung zwischen D-Ala und D-Ala an (1), was zur Abspaltung des endständigen D-Ala führt. Das Enzym bleibt als temporärer Ester gebunden (2). Die freie Aminogruppe eines benachbarten Pentapeptids greift den Peptid-Enzym-Ester an (3), was unter Abspaltung des Enzyms zur Bildung einer neuen Peptidbindung führt (4).

Die  $\beta$ -Lactam-Antibiotika sind durch ihren Azetidinon-Zyklus (vgl. Abbildung 1–1, S. 22) im Kontext ihrer Gesamtstruktur der D-Ala-D-Ala-Peptidbindung so ähnlich, dass sie von Transpeptidasen angegriffen werden.



**Abbildung 1–24: Reaktionsmechanismus von  $\beta$ -Lactam-Antibiotika.** E: Transpeptidase. Auf der linken Seite sind die terminale D-Ala-D-Ala-Peptidbindung des Pentapeptids sowie darunter ein Penicillin-Derivat dargestellt. Das Azetidinon ähnelt der Peptidbindung der Art, dass Transpeptidasen eine Reaktion eingehen. Das stabile Produkt der Reaktion ist rechts dargestellt.

Die resultierende Acylierung des Enzyms ist stabil, so dass das Enzym nicht weiter reagieren kann. Die Quervernetzung zum benachbarten Peptidoglycanstrang kann nicht stattfinden. Insgesamt kommt es zu einer Stagnation des Murein-Anabolismus, während der Katabolismus ungehindert weiterläuft. Schließlich bricht die strukturelle Integrität der Zellwand des Bakteriums durch dieses Ungleichgewicht zusammen, es kommt zur Lyse und damit zum Absterben des Bakteriums.

Neben diesem gut untersuchten Wirkungsmechanismus der  $\beta$ -Lactam-Antibiotika zeigen neuere Forschungsergebnisse, dass für ihre Wirkung auch die Erzeugung von oxidativem Schaden insbesondere durch Hydroxyl-Radikale eine wichtige Rolle spielt [27, 28].

### 1.1.3 Resistenzmechanismen

Grundsätzlich unterscheidet man bei Resistenzen gegen Antibiotika intrinsische, d.h. natürliche Resistenzen sowie erworbene Resistenzen. Unter intrinsischer Resistenz versteht man eine Unempfindlichkeit einer bestimmten Spezies gegenüber einer bestimmten Substanz, die per se vorhanden ist und keine genetische Änderung erfordert. Sie ist der Grund dafür, dass bestimmte Antibiotika nur gegen bestimmte Bakterienarten wirksam sind, also ein

---

bestimmtes Spektrum haben. Dem gegenüber stehen erworbene Resistenzen, wodurch sich einzelne Vertreter einer Spezies von der Gesamtheit abheben. Für den Erwerb von Resistenzgenen sind verschiedene Mechanismen verantwortlich, wie Mutation, Transformation, Konjugation und Transduktion.

Im Folgenden werden die drei Grundmechanismen von Antibiotikaresistenz am Beispiel von Resistenzmechanismen gegen  $\beta$ -Lactam-Antibiotika bei Gram-negativen Enterobakterien betrachtet.

### **1.1.3.1 Veränderungen der Antibiotika-Zielstruktur**

Ein Resistenzmechanismus dieser Kategorie ist bei  $\beta$ -Lactam-Antibiotika die Veränderung der Struktur der PBPs.

Der Begriff Penicillin-bindende Proteine fasst sämtliche Proteine zusammen, die Angriffspunkte für Penicillin (oder allgemeiner:  $\beta$ -Lactam-Antibiotika) sind. Eine Änderung ihrer Struktur mag zu einer verminderten Affinität eines  $\beta$ -Lactam-Antibiotikums und damit einem Aktivitätsverlust des Wirkstoffs führen. Das ist insbesondere bei Gram-positiven Bakterien ein verbreiteter Resistenzmechanismus [29], bei Gram-negativen spielt er im Vergleich dazu eine untergeordnete Rolle [30].

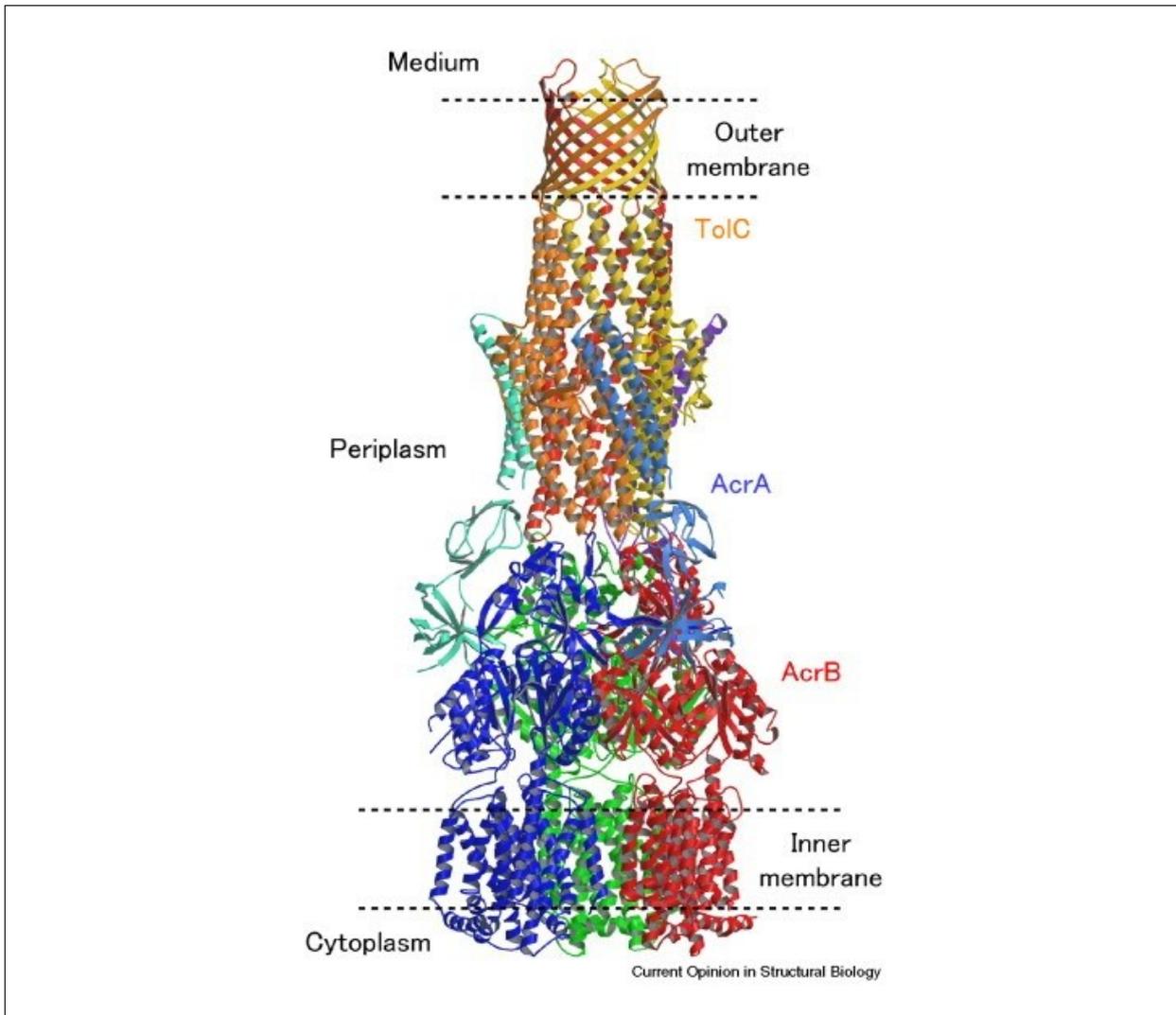
### **1.1.3.2 Veränderungen der Antibiotikakonzentration am Wirkort**

Die Zielstrukturen für Antibiotika liegen meist innerhalb der Bakterienzelle. Bei den  $\beta$ -Lactam-Antibiotika betrifft dies den periplasmatischen Raum, bzw. genauer die Außenseite der inneren Membran. Ein möglicher Resistenzmechanismus besteht nun darin, dass das Bakterium die Konzentration des Antibiotikums auf einem so niedrigen Niveau hält, dass es ihm nicht schaden kann. Dies kann erreicht werden, indem entweder eingedrungene Antibiotikamoleküle vermehrt ausgeschleust werden oder das Eindringen des Antibiotikums behindert bzw. vermindert wird.

#### **1.1.3.2.1 Reduktion der Antibiotikakonzentration am Wirkort durch Efflux**

Effluxpumpen, die zelltoxische, niedermolekulare Verbindungen wie z.B. Antibiotika unter Energieaufwand aus der Zelle pumpen, sind ubiquitär verbreitet. Eines der bekanntesten Beispiele ist die bakterielle AcrAB-TolC-Effluxpumpe, die bei Gram-negativen Erregern die innere und äußere Membran, d.h. den gesamten periplasmatischen Raum überspannt.

---



**Abbildung 1–25: AcrAB-TolC-Effluxpumpe.** Aus [31]. Dargestellt ist die Pumpe aus *E. coli*.

Die Effluxpumpe ist dreiteilig und - nach derzeitigem Kenntnisstand [32, 33] - aus je 3 Monomeren von AcrA, AcrB und TolC aufgebaut. Der outer membrane factor (OMF) TolC bildet einen Kanal in der äußeren Membran durch eine  $\beta$ -barrel-Domäne, die sich in den periplasmatischen Raum als  $\alpha$ -helicale Domäne aus insgesamt 12 Helices fortsetzt [34].

AcrB bindet an die Unterseite von TolC und definiert pro Monomer zum einen eine Porter-Domäne im periplasmatischen Raum sowie zum anderen, weiter zelleinwärts, eine transmembranäre Domäne aus 12  $\alpha$ -Helices in der inneren Membran [34]. AcrB gehört zu der RND (resistance nodulation deviation) Superfamilie der Efflux-Pumpen. Jedes Monomer kann in drei verschiedenen Konformationen vorliegen. Durch zyklische Rotationen der drei Konformationen über die drei Monomere entsteht der Pumpenmechanismus [35, 36]. Er wird in der Literatur häufig als „peristaltischer Pumpenmechanismus“ bezeichnet [35], bei dem der

---

dreistufige Zyklus mit einer Interaktion des Pumpensubstrates mit einer Bindungsstelle von AcrB beginnt, das in einer lockeren Konformation vorliegt (loose- bzw. access-Zustand). Danach kommt es zu einer Änderung der Konformation, bei der das Substrat fester gebunden wird (tight- bzw. binding-Zustand), um schließlich, in der dritten Konformation (open- bzw. extrusion-Zustand), in Richtung des Kanals von TolC hinaus geschleust zu werden. AcrB kehrt dann in die Ausgangskonformation zurück. Der Transport erhält seine Energie aus einem Antiport von Protonen entlang eines Gradienten ausgehend vom Periplasma in das Zellinnere hinein. Der genaue Weg der Pumpensubstrate durch AcrB ist noch nicht geklärt, gleiches gilt für den Transport von Substanzen aus dem Cytosol durch AcrB [37]. Galt letzterer früher als gesichert, wird er zunehmend kritisch diskutiert [38].

AcrA schließlich ist ein periplasmatic adaptor protein (PAP) und befindet sich jeweils an der Verbindungsstelle zwischen AcrB und TolC. Für dieses Protein wird angenommen, dass es die Konformationsänderungen von AcrB an TolC weitervermittelt [39], welches seinerseits eine gewisse, peristaltische Bewegung ausführen kann [40].

Sowohl *E. cloacae* [41, 42] als auch *K. pneumoniae* [43] verfügen über eine homologe Efflux-Pumpe AcrAB-TolC. Diese zählt bei klinischen Isolaten aus der Familie der *Enterobacteriaceae* generell auch bestimmte  $\beta$ -Lactam-Antibiotika zu ihrem Substratspektrum. Man nimmt inzwischen an, dass die AcrB-Pumpe einen nicht unwesentlichen Anteil an der intrinsischen Penicillin-Resistenz von z.B. *E. coli* hat [44]. Generell sind Penicilline und dessen Derivate vergleichsweise gute Substrate für die Pumpe [45, 46], während Cephalosporine eher schlechte Substrate zu sein scheinen [46]. Dies könnte an dem (vergleichsweise) lipophileren Kern der Penicilline gegenüber dem der Cephalosporine liegen [44], da man generell einen Zusammenhang zwischen der Lipophilie des Substrats und seinem Efflux durch AcrB festgestellt hat [45].

Die Sachlage ist bei der spezielleren Frage, ob Carbapeneme AcrB-Substrate sind, noch relativ unklar [47, 48]. Bisherige Publikationen zu diesem Thema geben bisher noch keinen eindeutigen Hinweis [49, 50] oder haben keinen Zusammenhang gefunden [51]. Pages et al. zeigten an einer Reihe untypischer, klinischer Isolate von *K. pneumoniae*, dass sich ihre Empfindlichkeit gegenüber Ertapenem erhöht, wenn das Carbapenem mit einem EPI (PA $\beta$ N) und sub-inhibitorischen Konzentrationen von Cloxacillin kombiniert wird. Die Wissenschaftler spekulieren bzgl. dieser Isolate, dass Cloxacillin ein direkter Kompetitor für einen  $\beta$ -Lactam-Efflux ggf. durch AcrAB-TolC ist. Der geringe, synergistische Effekt bei

---

Ertapenem lässt auf einen partiellen Efflux dieses Carbapenems schließen [49]. Doumith et al. konnten hingegen einen Ertapenem-Efflux bei einer Reihe klinischer Isolate verschiedener *Enterobacteriaceae* (einschließlich *K. pneumoniae* und *E. cloacae*) ausschließen [51]. Gröbner et al. fanden bei zwei klinischen Isolaten von *K. pneumoniae* eine Zunahme der Empfindlichkeit gegen Meropenem bei Kombination mit EPI, unter anderem mit PAβN. Der Effekt war jedoch nur gering [50].

Da Carbapeneme deutlich weniger lipophil sind als Penicilline und als die meisten Cephalosporine [52], ist anzunehmen, dass sie eher schlechte Substrate darstellen, wenn man oben erwähnte These des Zusammenhangs zwischen relativer Lipophilie und der Eignung als Pumpen-Substrat zu Grunde legt.

### 1.1.3.2.2 Reduktion der Antibiotikakonzentration am Wirkort durch reduzierten Einstrom

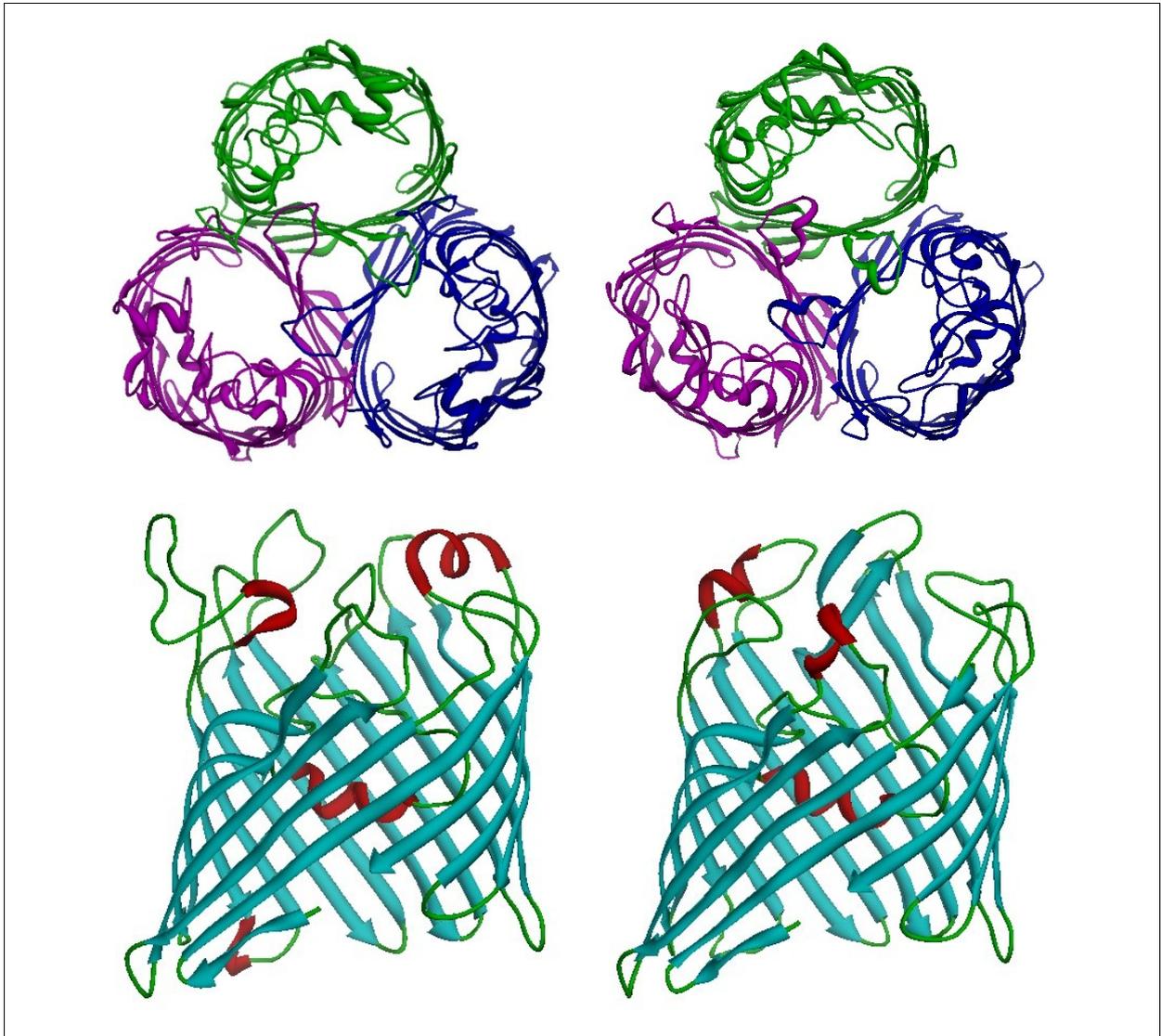
Eine verringerte Durchlässigkeit für eher lipophile Wirkstoffmoleküle erreichen Erreger über eine Änderung der Komposition ihrer äußeren Membran.

Bezüglich eher hydrophiler Moleküle wie den β-Lactam-Antibiotika sind unspezifische Porine die wichtigere Eingangspforte. Bakterien vermögen durch verschiedene Mutationen die Porinexpression anzupassen beziehungsweise einzustellen oder aber den Einbau der Porine in die äußere Membran zu unterbinden [53].

Bei *E. coli* sind die zwei wichtigsten, unspezifischen Porine, durch die β-Lactam-Antibiotika in den periplasmatischen Raum gelangen können, OmpC und OmpF. Man findet bei anderen Spezies aus der Familie der Enterobakterien dazu homologe Proteine, etwa OmpK36 und OmpK35 bei *K. pneumoniae* und Omp36 und Omp35 bei *E. cloacae* [54]. Die beiden Porine sind sich strukturell verhältnismäßig ähnlich: beide bilden physiologisch Trimere aus. Die Monomere sind jeweils sechszehnsträngige, antiparallele β-sheet barrel, die eine wasserhaltige Pore bilden. OmpF bildet wahrscheinlich eine etwas größere Pore als OmpC [53].

Die Regulation der Porinexpression ist Teil eines komplexen Netzwerks verschiedener Regelkreise im Stoffwechsel [53, 55]. Dementsprechend existieren viele Möglichkeiten für Mutationen, die letztlich zu einer ausbleibenden oder reduzierten Expression der Porine führen können. In der Literatur werden sowohl Mutationen direkt in den Poringenen beschrieben, als auch solche in z.B. *marR* (seinerseits reguliert über *micF*) oder *acrR*. Dies

umfasst vor allem Punktmutationen und Deletionen in den CDS, Mutationen in den Promotoren sowie Insertionen [51].



**Abbildung 1–26: OmpC und OmpF.** Links oben: OmpC-Trimer, wie es in der äußeren Membran vorkommt, in einer Betrachtung von oben. Darunter ein OmpC-Monomer in lateraler Ansicht (Protein-Datenbank ID 2J1N [56]). Oben rechts: OmpF-Trimer, darunter ein OmpF-Monomer (Protein-Datenbank ID 1OPF [57]). Bei der seitlichen Ansicht kann man den Fass-Anteil, der von den  $\beta$ -Faltblattstrukturen aufgebaut wird, als innerhalb der äußeren Membran liegend betrachten.

### 1.1.3.3 Veränderung der Struktur des Antibiotikums

Bei  $\beta$ -Lactam-Antibiotika ist die Spaltung des  $\beta$ -Lactam-Ringes durch  $\beta$ -Lactamasen einer der wichtigsten Resistenzmechanismen bezüglich dieser Antibiotikaklasse.

### 1.1.3.3.1 $\beta$ -Lactamasen – ein historischer Überblick

Nachdem Alexander Fleming festgestellt hatte, dass Penicillin nicht wirksam gegen z.B. *E. coli* war [2], fanden Abraham und Chain im Jahre 1940 in eben jener Spezies die erste  $\beta$ -Lactamase [58]. Sie stellten fest, dass ein Extrakt aus *E. coli* Penicillin zerstört, und schlossen auf ein Enzym zurück, das sie seinem Substrat entsprechend als Penicillinase bezeichneten. Ihnen gelangen damit auch die Erklärung der intrinsischen Resistenz von *E. coli* gegen Penicillin und folglich auch der retrospektive Nachweis, dass  $\beta$ -Lactamasen bereits vor dem breiten Einsatz von  $\beta$ -Lactam-Antibiotika vorhanden waren.

Relativ kurz danach, 1944, untersuchte Kirby Penicillin-resistente *Staphylococcus aureus*-Isolate von Patienten, die zuvor nicht mit Penicillin behandelt wurden [59, 60]. Dies stellte die erste Publikation über eine erworbene  $\beta$ -Lactam-Resistenz dar. Die Resistenz bei *S. aureus* nahm in den Krankenhäusern bis zum Ende der 40er Jahre in erheblichem Maße zu, was aus heutiger Sicht aus der damals unkontrollierten Anwendung von Penicillin und niedrigen Hygienestandards resultierte [61]. Wie man heute weiß, war dafür eine klonale Ausbreitung von mit Resistenzplasmiden infizierten Staphylokokken die Ursache. Die Plasmide codierten für eine induzierbare Klasse A  $\beta$ -Lactamase, die von den Gram-positiven Erregern in den extrazellulären Raum sezerniert wurde. Das Resistenzproblem konnte man erst gegen Ende der 50er Jahre durch eine Anhebung der Hygienestandards reduzieren [61]. Einen großen Fortschritt in der Behandlung brachte 1959 die Entwicklung des semi-synthetischen Methicillins, das speziell als stabiles Penicillin-Derivat gegen Staphylokokken-Penicillinase entwickelt wurde [62]. Kurz zuvor stellte die Entwicklung des Pheneticillins die allererste Semi-Synthese eines Penicillins dar [62]. Dem Methicillin folgte kurz danach das semi-synthetische Ampicillin, das man ebenfalls als Meilenstein ansehen muss, war es doch das erste Penicillin-Derivat mit Wirksamkeit gegen Gram-negative Erreger [61]. Relativ kurz nach Ampicillin wurden die ersten Cephalosporine eingeführt. Mitte der 60er Jahre begann damit die Zeit der Breitspektrum  $\beta$ -Lactam-Antibiotika.

Pollock prägte 1960 den Begriff  $\beta$ -Lactamase für die zuvor etwas ungenau als Penicillinase bezeichnete Enzymgruppe. Dies geschah weniger aus dem Bewusstsein, dass es sich bei  $\beta$ -Lactamasen, wie man heute weiß, um eine sehr heterogene Enzymgruppe handelt, sondern mehr wegen einer genaueren Spezifizierung der Angriffsstelle [62]. Ein Meilenstein in der Erforschung der  $\beta$ -Lactamasen war 1965 die Entdeckung des Typs TEM-1 auf einem R-Plasmid eines Ampicillin-resistenten *E. coli* [63] in Athen. Das Bakterium wurde 1963 aus

einer Patientin namens Temoneira isoliert, deren Namensteil in die Bezeichnung der  $\beta$ -Lactamase einfluss [64]. Die Entdeckung markierte einen Wendepunkt, denn nun war klar, dass sich das Resistenzgen zwangsläufig auch über Speziesgrenzen hinweg ausbreiten können würde, was dann letztlich auch der Fall war [61].

Bis in die 70er Jahre hinein wurden zahlreiche verschiedene  $\beta$ -Lactamasen in unterschiedlichen Spezies entdeckt, ohne sie einer genaueren Klassifizierung zu unterziehen. Das betraf sowohl chromosomal codierte wie auch Plasmid-codierte  $\beta$ -Lactamasen, etwa TEM-2 1969 [65], SHV-1 (zunächst noch als Pit-2 bezeichnet) durch Pitton 1972 [66], sowie die ersten OXA-Enzyme OXA-1 1967 [67], OXA-2 1965 [63] und OXA-3 1972 [68] (bezüglich der OXA-Enzyme siehe auch die Ausführungen über  $\beta$ -Lactamasen der Klasse D in Kapitel 1.1.3.3.2.1, S. 52ff).

Da man zunehmend eine Diversifizierung des Substratprofils feststellte, nahmen Richmond und Sykes 1973 eine erste Klassifizierung der bis dato bekannten Enzyme vor [69]. Heute zwar überholt, schärfte sie zu ihrer Zeit dennoch das Bewusstsein dafür, dass es viele verschiedene  $\beta$ -Lactamasen in Gram-negativen Keimen gibt und diese in definierte Gruppen fallen [70]. Wichtige Ergebnisse der Erforschung der  $\beta$ -Lactamasen jener Zeit sind 1974 die Entdeckung, dass das TEM-1-codierende Gen in einem Transposon (Tn3) lokalisiert ist [71] sowie 1976 die Einführung der isoelektrischen Fokussierung zur Detektion, Charakterisierung und Identifizierung von  $\beta$ -Lactamasen [72]. Generell verlagerte sich in den 70er Jahren der Schwerpunkt der Probleme mit  $\beta$ -Lactam-resistenten Keimen in Krankenhäusern von den Gram-Positiven zu den Gram-Negativen [61].

Cefoxitin wurde 1978 auf dem amerikanischen Markt eingeführt. Es war das erste Derivat der neuen Gruppe der Cephamyne. Es war seinerzeit stabil gegen alle bis dato bekannten, Plasmid-vermittelten  $\beta$ -Lactamasen, und damit ein enormer Fortschritt. Es war aber auch hydrolyseempfindlich gegen einige, chromosomal codierte  $\beta$ -Lactamasen bestimmter Spezies. Die Einführung von Cefamandol führte 1979 in einer Untersuchung zu der Erkenntnis, dass eine Dereprimierung von induzierbaren  $\beta$ -Lactamasen zu Resistenzen bei bestimmten Spezies führen kann [73].

Anfang der 80er Jahre wurden die ersten Oxyiminocephalosporine entwickelt, darunter solche bekannten Vertreter wie Cefuroxim, Cefotaxim und, Mitte der 80er Jahre, Ceftazidim [61]. Demgegenüber stand 1985 die Publikation der in Deutschland erfolgten Entdeckung der  $\beta$ -Lactamase SHV-2 bei einem Isolat von *Klebsiella ozaenae* aus dem Jahr 1983. Damit war die

---

erste extended spectrum  $\beta$ -lactamase identifiziert [74].

Ebenfalls in die Mitte der 80er Jahre fallen die Entwicklungen des Monobactams Aztreonam und des ersten Carbapenems Imipenem. Dessen Zulassung in den USA verzögerte sich, da man zunächst das Problem der Hydrolyse *in vivo* durch die renale Dihydropeptidase lösen musste. Es erfolgte die bekannte Kombination mit dem Dihydropeptidase-Inhibitor Cilastatin. Damit stand ein Antibiotikum zur Verfügung, das stabil war gegen sämtliche damals bekannten  $\beta$ -Lactamasen der Klassen A und C. Man wusste jedoch auch schon damals, dass es einige wenige Klasse-B-Metallo- $\beta$ -Lactamasen gibt, die eine Hydrolyse katalysieren können. Eine bekannte Spezies mit einer solchen intrinsischen Resistenz ist *Stenotrophomonas maltophilia*. Wichtige Neuerungen aus jener Zeit waren auch die Entwicklung von  $\beta$ -Lactamase-Inhibitoren [61] und 1989 die Entdeckung von Integrons als einem Verbreitungssystem von Resistenzgenen [75] (siehe dazu auch Kapitel 1.1.3.3.3, S. 56).

Wie sich zeigte, waren es neben den neu aufgetretenen ESBL die dereprimierten, chromosomal codierten  $\beta$ -Lactamasen, die massive Resistenzen auch gegen die neuen Klassen verursachten. Selbst Resistenzen gegen Imipenem traten auf, z.B. durch Dereprimierung eines chromosomal codierten AmpC-Enzyms bei *Enterobacter cloacae* in Kombination mit einer Porindefizienz. Dieser Phänotyp blieb zunächst aber selten. Die ESBL leiteten hingegen eine neue Ära der  $\beta$ -Lactamasen-vermittelten Resistenz gegen die neuen Wirkstoffklassen ein, die sich bis heute fortsetzt.

Wichtig waren auch Ende der 80er Jahre Erkenntnisse, die darauf hindeuteten, dass die chromosomal codierten Gene für AmpC-Enzyme einiger Spezies auf Plasmide gelangt waren und dadurch mobil bzw. mobilisierbar wurden [76]. So kam es auch zum erstmaligen Nachweis von Plasmid-codierten Metallo- $\beta$ -Lactamasen in Japan [77]. Anfang der 90er Jahre konnte dort IMP-1 nachgewiesen werden [61]. In Japan herrschte zu jener Zeit ein recht freier Gebrauch von Imipenem [61]. Im gleichen Zeitraum traten erste TEM-Mutanten auf, die gegen  $\beta$ -Lactamase-Inhibitoren resistent waren [78].

Die damals einsetzenden Tendenzen setzten sich sämtlich bis heute fort. Bezüglich der aktuellen Entwicklung bei den Carbapenemasen sei hier auf das Kapitel 1.1.3.3.2.1, S. 52 verwiesen.

### 1.1.3.3.2 Einteilung der $\beta$ -Lactamasen

Bezüglich einer Einteilung der  $\beta$ -Lactamasen haben sich vor allem zwei Systeme etabliert, die sich an den funktionalen und den molekularen Eigenschaften der  $\beta$ -Lactamasen orientieren. Ersteres wurde 1995 von Bush, Jacoby und Medeiros eingeführt [79] und zuletzt Ende 2009 durch Bush und Jacoby aktualisiert [80], letzteres wurde 1980 von Ambler initiiert [81], auf das auch in dieser Arbeit zurückgegriffen wird.

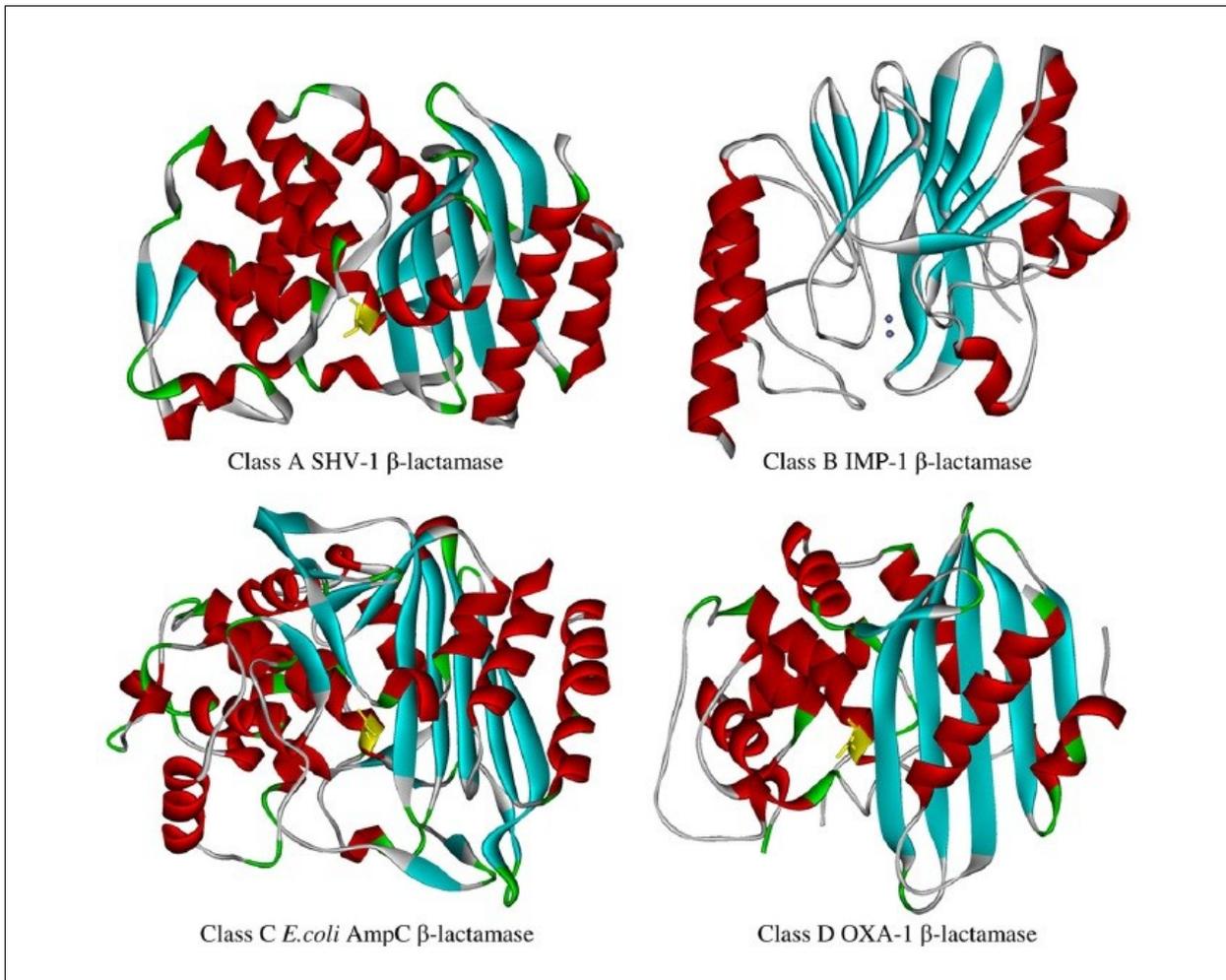
Tabelle 1–2: Einteilung der  $\beta$ -Lactamasen (adaptiert aus [80])

Klassifizierung		typische(s) Substrat(e)	Inhibition durch		repräsentative Enzyme
fkt. [80]	mol. [81]		CA/TZB	EDTA	
1	C	Cephalosporine	nein	nein	<i>E. coli</i> AmpC, P99, ACT-1, CMY-2, FOX-1, MIR-1
1e	C	Cephalosporine	nein	nein	GC1, CMY-37
2a	A	Penicilline	ja	nein	PC1
2b	A	Penicilline, frühe Cephalosporine	ja	nein	TEM-1, TEM-2, SHV-1
2be	A	ES-Cephalosporine, Monobactame	ja	nein	TEM-3, SHV-2, CTX-M-15, PER-1, VEB-1
2br	A	Penicilline	nein	nein	TEM-30, SHV-10
2ber	A	ES-Cephalosporine, Monobactame	nein	nein	TEM-50
2c	A	Carbencillin	ja	nein	PSE-1, CARB-3
2ce	A	Carbencillin, Cefepim	ja	nein	RTG-4
2d	D	Cloxacillin	variabel	nein	OXA-1, OXA-10
2de	D	ES-Cephalosporine	variabel	nein	OXA-11, OXA-15
2df	D	Carbapeneme	variabel	nein	OXA-23, OXA-48
2e	A	ES-Cephalosporine	ja	nein	CepA
2f	A	Carbapeneme	variabel	nein	KPC-2, IMI-1, SME-1
3a	B (B1)	Carbapeneme	nein	ja	IMP-1, VIM-1, CcrA, IND-1
	B (B3)	Carbapeneme	nein	ja	L1, CAU-1, GOB-1, FEZ-1
3b	B (B2)	Carbapeneme	nein	ja	CphA, Sfh-1

Für die Benennung neu gefundener  $\beta$ -Lactamase-Familien gab es nie Richtlinien im Sinne einer einheitlichen Nomenklatur. Bezüglich der zahlreichen Abkürzungen, die sich dadurch

im Laufe der Zeit ergeben haben und sich bei den repräsentativen Enzymen in Tabelle 1–2 andeuten, sei auf Referenz [64] verwiesen.

Wichtig im Zusammenhang mit der Einteilung auf molekularer Basis ist, dass die Klassen A, C und D solche Enzyme umfassen, die ein Serin im aktiven Zentrum besitzen, während diejenigen der Klasse B ihre katalytische Aktivität über ein oder zwei Zinkatom(e) vermitteln.



**Abbildung 1–27: „Familienporträt“ der  $\beta$ -Lactamasen.** Aus [14]. Molekulare Klassifizierungen. Bei den Klassen A, C und D ist das aktive Serin jeweils in Gelb dargestellt, bei dem IMP-Enzym der Klasse B sind die beiden Zink-Atome eingezeichnet.

#### 1.1.3.3.2.1 Carbapenemasen

Carbapenemasen zeichnen sich durch ein Substratspektrum aus, das sich entweder auf Carbapeneme verlagert oder - häufiger - um Carbapeneme erweitert hat. Diese Unterklasse der  $\beta$ -Lactam-Antibiotika galt lange Zeit als besonders stabil gegen den Zugriff von  $\beta$ -Lactamasen.

---

Carbapenemasen kommen in den Molekularen Klassen A, B und D vor [82]. In der Klasse C finden sich bislang keine Carbapenemasen im eigentlichen Sinne, auch wenn es bei solchen Stämmen mit einer Überproduktion eines Klasse C-Enzyms [83] oder einer ESAC [84] in Verbindung mit weiteren Mutationen zu einer phänotypischen Carbapenem-Unempfindlichkeit kommen kann.

Gab es zunächst nur Probleme mit chromosomal codierten Carbapenemasen, d.h. mit mehr oder weniger lokalen, klonalen Ausbrüchen einzelner Stämme, hat man ab den frühen 1990er Jahren eine zunehmende Ausbreitung über Speziesgrenzen hinweg festgestellt [82].

Die wichtigsten Vertreter der Carbapenemasen der Klasse A sind die Familien GES und KPC. Erstere hat man in *Enterobacteriaceae* und *P. aeruginosa* auf fast allen Kontinenten der Welt nachgewiesen [85], letztere primär in Nordamerika, wobei sich insbesondere KPC-2 jüngst auch weltweit auszubreiten scheint [85]

Die Metallo- $\beta$ -Lactamasen der Klasse B haben unter den Carbapenemasen das größte Bedrohungspotenzial [85, 86]. Ihr Substratspektrum umfasst alle gängigen  $\beta$ -Lactam-Antibiotika, mit Ausnahme des Monobactams Aztreonam [85]. Die gegenwärtig am massivsten auftretenden MBL sind VIM-2 in *P. aeruginosa* und VIM-1 in *Enterobacteriaceae* [85].

Die Klasse D, die hier zunächst allgemein abseits der Carbapenemasen eingeführt sein soll, beherbergt die große Familie der OXA-Enzyme. Diese besitzen, wie die Enzyme der Klassen A und C, ein Serin in ihrem aktiven Zentrum. Zum Zeitpunkt des Verfassens dieser Arbeit (Frühjahr 2012) sind ca. 200 Varianten bekannt [87]. Historisch betrachtet wurden dieser Gruppe Enzyme aufgrund ihres vergleichbaren Substratprofils zugeordnet, d.h. solche, die Oxacillin (und Cloxacillin) besser als Benzylpenicillin hydrolysieren konnten. Die ersten drei OXA-Enzyme wurden Mitte der 60er bis Anfang der 70er Jahre entdeckt [88], aber noch nicht als solche bezeichnet. Dass die Gruppe heterogen ist, deutete sich bereits bei einer ersten Unterklassifizierung der drei Enzyme auf biochemischer Ebene 1974 durch Dale und Smith an [89]. Zwei Jahre später wurde dies durch isoelektrische Fokussierung von Matthew und Hedges bestätigt [90]. Diese Autoren etablierten dabei auch die Gruppenbezeichnung OXA.

Die Bezeichnung OXA nach dem damals bevorzugten Substrat hat sich im Prinzip inzwischen überholt, denn unter den OXA-Enzymen gibt es inzwischen auch ESBL und Carbapenemasen sowie Varianten, die Oxacillin und Cloxacillin gar nicht zu ihrem

---

Substratspektrum zählen. Inzwischen haben auch Gen- und Proteinsequenzanalysen zur Zuordnung von solchen Enzymen in diese Gruppe beigetragen, die ein anderes Substratspektrum haben. Allen gemein ist jedoch, dass sie Amino- und Carboxypenicilline gut hydrolysieren können, und die meisten haben die Eigenschaft, nicht auf  $\beta$ -Lactamase-Inhibitoren anzusprechen, jedoch durch Natriumchlorid inhibiert zu werden. Informationen über die zahlreichen Untergruppen der Familie und ihre Eigenschaften finden sich in den Reviews [91] und [92].

OXA-Untertypen, die Carbapenemase-Aktivität aufweisen, werden als carbapenem-hydrolyzing class D  $\beta$ -lactamases (CHDL) bezeichnet. Sie lassen sich phylogenetisch in insgesamt 9 Untergruppen einteilen [82]. Am häufigsten werden CHDL in *A baumannii* nachgewiesen. OXA-23 ist diesbezüglich die momentan klinisch vorherrschende Variante [85].

Die zunehmend auftretende CHDL OXA-48 wurde zuerst 2004 beschrieben [93]. Sie tritt schwerpunktmäßig bei *K. pneumoniae* auf. Dieses Enzym bildet zusammen mit OXA-54, das chromosomal codiert in *Shewanella oneidensis* vorkommt und als Vorläufer von OXA-48 gilt [94], eine eigene der 9 Untergruppen der CHDL [95]. Inzwischen sind weitere Varianten von OXA-48 bekannt, die ebenfalls CHDL sind. Dazu zählen bisher OXA-162, OXA-163 und OXA-181 [96]. Bezüglich OXA-181 konnte ebenfalls eine *Shewanella* ssp. als Ursprung identifiziert werden [96].

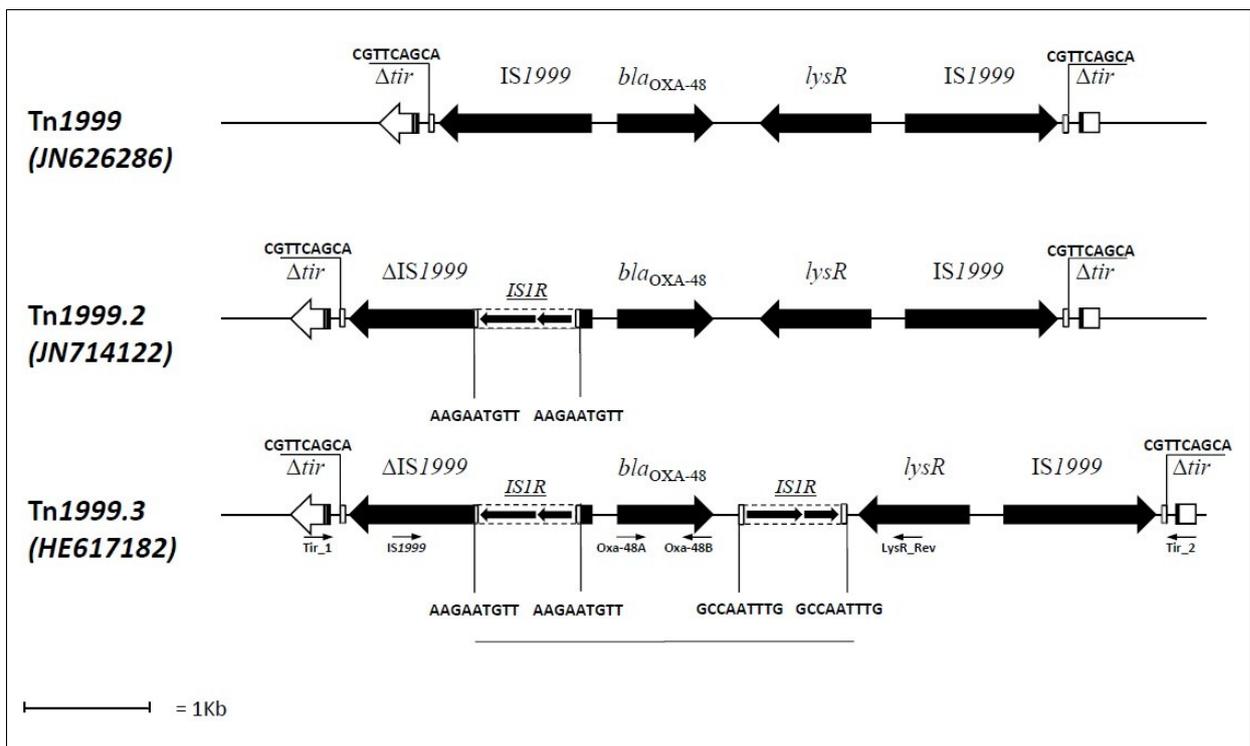
OXA-48 hat sich relativ erfolgreich verbreitet. Seit dem Erstnachweis in einem türkischen Isolat von 2001 erfolgten weitere Nachweise in der Türkei, Indien, Argentinien, in West- und Nordafrika, im europäischen Mittelmeerraum über Frankreich bis hinauf nach Belgien, in den Niederlanden, Großbritannien und Irland [97-99]. Es gibt inzwischen auch vermehrte Beobachtungen des Auftretens von OXA-48 in *E. coli* [100].

Das Gen *bla*<sub>OXA-48</sub> ist typischerweise Teil eines zusammengesetzten Transposons, welches als Tn1999 bezeichnet wird [101]. Transposons sind mobile genetische Elemente. Ihre Transposition wird durch eine Transposase vermittelt. Deren Gen ist Teil von Insertionselementen, die bei zusammengesetzten Transposons einen DNA-Abschnitt mit weiteren Genen, häufig Resistenzgenen, flankieren [102]. Bei Tn1999 findet man zwei identische IS-Elemente des Typs IS1999 an den Flanken. Das stromaufwärts gelegene IS1999 liefert mit seinem left inverted repeat (IRL) einen auswärts gerichteten Promotor für *bla*<sub>OXA-48</sub>.

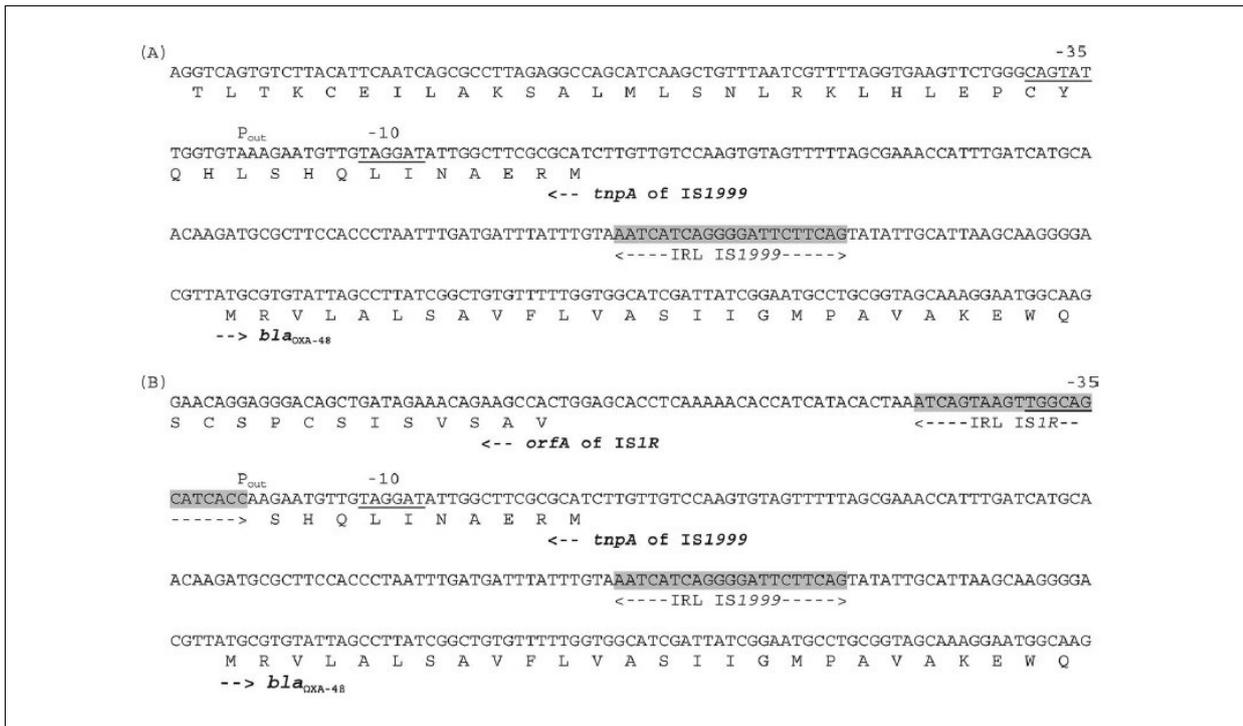
Eine Variante dieses Transposons ist Tn1999.2. Dort ist in das stromaufwärts von

---

*bla*<sub>OXA-48</sub> liegende IS1999 seinerseits die Insertionssequenz IS1R inseriert. Diese ist so orientiert, dass sich ein verhältnismäßig stärkerer Hybridpromotor aus einer auswärts gerichteten -35-Box von IS1R und der -10-Box von IS1999 bildet [103]. Eine 2012 von Giani et al. beschriebene, weitere Variante mit der Bezeichnung Tn1999.3 verfügt 199bp stromabwärts von *bla*<sub>OXA-48</sub> über eine weitere Kopie von IS1R. Die beiden IS1R-Kopien bilden zusammen mit *bla*<sub>OXA-48</sub> ein neues, putatives, zusammengesetztes Transposon, welches zu einer weiteren Mobilisierung des Carbenamase-Gens beitragen könnte [104].



**Abbildung 1–28: Tn1999 und Derivate.** Aus [104]. Bei Tn1999.2 wurde das stromaufwärts von *bla*<sub>OXA-48</sub> gelegene IS1999 durch Insertion von IS1R zerstört. Die rechte Flanke von IS1R bildet zusammen mit dem *bla*<sub>OXA-48</sub> zugewandten Rest von IS1999 einen starken Hybridpromotor (nicht eingezeichnet) für das Carbenamase-Gen. Bei Tn1999.3 ist stromabwärts von *bla*<sub>OXA-48</sub> eine weitere Kopie von IS1R inseriert.



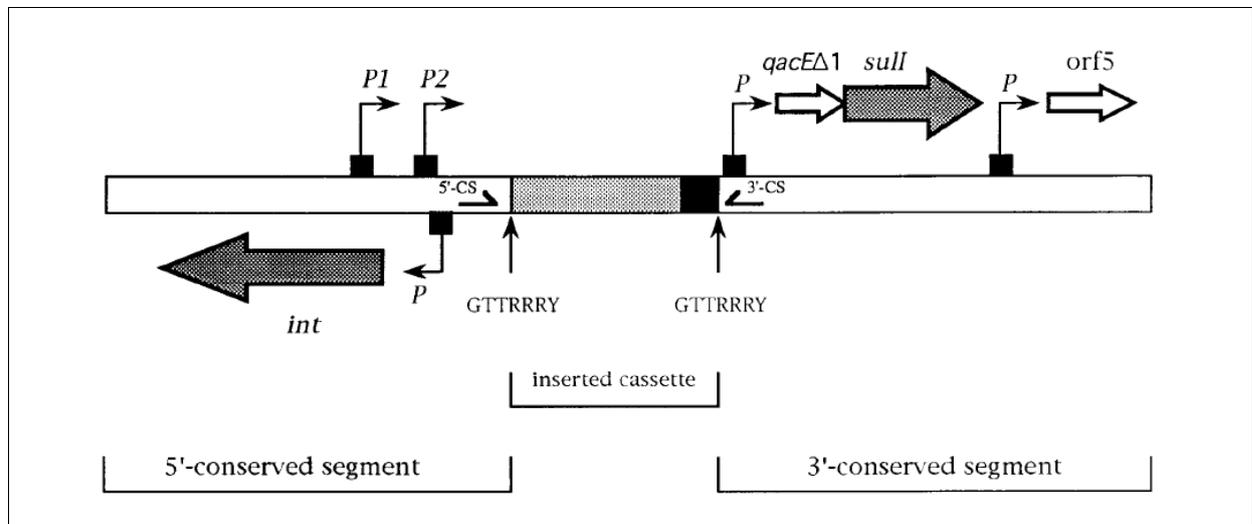
**Abbildung 1–29: Putative Promotoren in Tn1999 bzw. Tn1999.2.** Nach [103]. (A): Situation in Tn1999; (B): Situation in Tn1999.2. Grau unterlegt sind die left inverted repeats (IRL) von IS1999 bzw. IS1R. Unterstrichen sind putative -35- und -10-Regionen.

### 1.1.3.3.3 Verbreitung von $\beta$ -Lactam-Resistenzgenen: Integrons

Integrons stellen eines der bedeutendsten Verbreitungssysteme für Resistenzgene und insbesondere Gene, die für  $\beta$ -Lactamasen codieren, dar. Integrons wurden 1989 zuerst von Stokes und Hall beschrieben [75]. Das Wissen um ihre Verbreitungsmechanismen ist seit dem stetig weiter gewachsen [105].

Man kann ein Integron im Prinzip als ein System zum Einfangen und Exprimieren verschiedener Resistenzgenkassetten betrachten. Grundlegendes Strukturmerkmal eines Integrons ist das für eine Integrase codierende Gen *intI*. Dessen Genprodukt ist für das Ausschneiden und die sequenzspezifische Insertion von distinkten, genetischen Elementen, den sog. Resistenzgenkassetten, verantwortlich. Die Insertion erfolgt unmittelbar stromaufwärts von *intI*, in der primären Rekombinationsstelle *attI*. Da die Kassetten meistens keinen eigenen Promotor haben, werden sie über einen in *intI* oder in der *attI*-Stelle lokalisierten Promotor exprimiert, der in Richtung der Integrationsstelle orientiert ist. Neben diesem per se immobilen Teil des Integrons gibt es noch den mobilen Teil in Form der Kassetten, die sukzessive an *attI* eingebaut werden. Die Kassetten bestehen aus einem einzelnen, offenen Leserahmen, gefolgt von der Rekombinationsstelle *attC* (früher als 59 bp-

Element bezeichnet). Die Kassetten werden durch Ausschneiden als nicht-replikative, zirkuläre Elemente wieder mobilisiert [105].



**Abbildung 1–30: Grundstruktur eines Integrons.** Aus [106]. Die eingezeichneten Primer 5'-CS („five primed conserved segment“) und 3'-CS („three primed conserved segment“) umfassen einen grau markierten Bereich, welcher hier eine mobilisierbare Resistenzkassette mit seiner *attC*-site (schwarzes Quadrat) enthält. GTTRRRY: Konsensussequenz für die *attI*-site; P, ggf. mit Nummer: Promotoren; *qacEΔ1*: vermittelt Resistenz gegen Ethidiumbromid und quartäre Ammoniumverbindungen; *sull*: Sulfonamid-Resistenzgen; *orf5*: ein open reading frame.

#### 1.1.3.3.4 Reaktionsmechanismus

$\beta$ -Lactamasen hydrolysieren den  $\beta$ -Lactamring der  $\beta$ -Lactam-Antibiotika. Dies erfolgt meistens, aber nicht immer, unter einer raschen Hydrolyse des Enzym-Produkt-Komplexes, so dass  $\beta$ -Lactamasen sukzessive Substratmoleküle inaktivieren können.  $\beta$ -Lactamase-Inhibitoren vermögen einen irreversiblen Enzym-Produkt-Komplex zu bilden, wenn sie in das Substratspektrum der jeweiligen  $\beta$ -Lactamase fallen. Carbapeneme reagieren bei bestimmten Familien der  $\beta$ -Lactamasen ähnlich.

Der Reaktionsmechanismus erfolgt bei den Serin- $\beta$ -Lactamasen über die Hydroxygruppe des Serins im aktiven Zentrum, prinzipiell über einen Acyl-Enzym-Komplex wie in Abbildung 1–24 (S. 42) für die Transpeptidasen dargestellt. Im Falle der Metallo- $\beta$ -Lactamasen erfolgt der Mechanismus über ein koordinativ im aktiven Zentrum gebundenes Wassermolekül [107].

## 1.2 Enterobakterien als Krankheitserreger

Die Bakterienfamilie der *Enterobacteriaceae* ist die für die Humanmedizin wichtigste Bakterienfamilie. Einige große Seuchen der Menschheit werden von *Enterobacteriaceae*

verursacht: etwa Typhus (*Salmonella enterica* serovar Typhi), bakterielle Ruhr (*Shigella* spp.) und Pest (*Yersinia pestis*). Neben solchen Krankheiten mit typischer Symptomatik treten Enterobakterien auch häufig als opportunistische Krankheitserreger auf, die bei einem prädisponierten Organismus endogene und nosokomiale Infektionen hervorrufen können. Die Sepsis ist hier als eine besonders schwere Folge hervorzuheben.

Alle Enterobakterien sind Gram-negativ und fakultativ anaerobe Stäbchen. Sie kommen unter anderem im Darmtrakt von Menschen und Tieren vor.

### 1.2.1 Der *Enterobacter cloacae* Komplex

Innerhalb des Genus *Enterobacter* ist der sogenannte *Enterobacter cloacae* Komplex klinisch am bedeutendsten. Er umfasst gegenwärtig die 6 Spezies *E. asburiae*, *E. cloacae*, *E. hormaechei*, *E. kobei*, *E. ludwigii* und *E. nimipressuralis* [108]. Die Stamm-Typisierung „*E. cloacae*“ umfasst meist den Komplex. Sie wird klinisch üblicherweise nicht in die verschiedenen Spezies des Komplexes differenziert (oder beschränkt sich zuweilen auch nur auf den Genus „*Enterobacter* spp.“), da eine weitergehende Aufschlüsselung aufwändigere Analysen auf genetischer Ebene erfordert [108, 109].

*E. cloacae* ist ein Kommensal, der in (Ab-)Wasser, im Boden, in Fleisch, im hospitalen Umfeld, auf der Haut und im intestinalen Trakt von Menschen und Tieren vorkommt [110]. Ältere Untersuchungen fanden *E. cloacae* in ca. 3 % der Stuhlproben von Patienten bei Krankenhausaufnahme und bei ca. 10 % im Pharynx gesunder Personen [110].

Der Keim wurde in Zusammenhang mit verschiedensten Infektionstypen gebracht, darunter Endocarditis, Ventriculitis, Meningitis, Arthritis und Osteomyelitis, ferner bei Infektionen des Harntrakts und bei Lungenentzündungen [110]. Der erste Bericht über eine Bakteriämie erfolgte 1965 in Boston [110, 111]. *Enterobacter* spp. rangieren heute an Rang vier der Ursachen für Bakteriämien durch Gram-negative Bakterien bei Erwachsenen, nach *E. coli*, *Klebsiella* spp. und *Pseudomonas aeruginosa* [109]. Dabei wird *E. cloacae* innerhalb des Genus am Häufigsten detektiert, er macht zusammen mit *E. aerogenes* mehr als 90 % der Bakteriämien durch *Enterobacter* spp. aus [109], wobei ca. 65 bis 80 % monomikrobiell verursacht sind [109].

### 1.2.1.1 Chromosomal codierte, induzierbare AmpC- $\beta$ -Lactamase

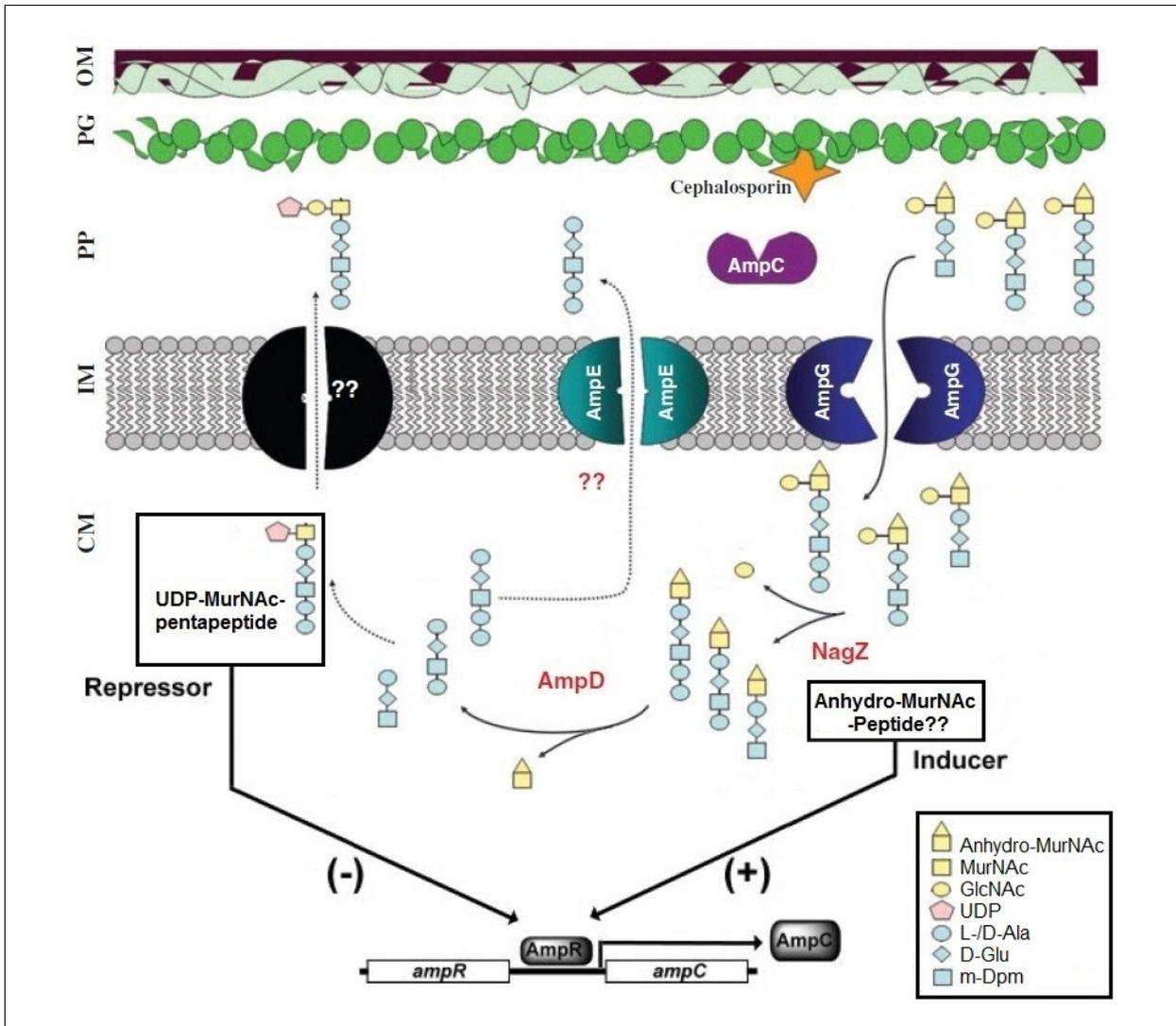
Die meisten Enterobakterien besitzen eine chromosomale AmpC- $\beta$ -Lactamase, so auch *E. cloacae*. Bei einigen dieser Enterobakterien ist das entsprechende Gen *ampC* an ein Induktionssystem gekoppelt, bei anderen nicht. Eine Übersicht hierzu gibt Tabelle 1–3.

Tabelle 1–3: Vorkommen von *ampC*-Genen bei *Enterobacteriaceae* (aus [112])

Spezies ohne chromosomal codiertes <i>ampC</i>	Spezies mit chromosomal codiertem <i>ampC</i> (nicht induzierbar)	Spezies mit chromosomal codiertem <i>ampC</i> (induzierbar)
<i>Salmonella</i> spp.	<i>Escherichia coli</i>	<i>Enterobacter cloacae</i>
<i>Klebsiella</i> spp.	<i>Escherichia fergusonii</i>	<i>Enterobacter aerogenes</i>
<i>Proteus mirabilis</i>	<i>Shigella</i> spp.	<i>Enterobacter cancerogenus</i>
		<i>Enterobacter hormaechii</i>
		<i>Enterobacter intermedius</i>
		<i>Enterobacter asburiae</i>
		<i>Citrobacter freundii</i>
		<i>Citrobacter werkmanii</i>
		<i>Citrobacter braakii</i>
		<i>Citrobacter murlinae</i>
		<i>Citrobacter youngae</i>
		<i>Hafnia alvei</i>
		<i>Serratia marcescens</i>
		<i>Serratia liquefaciens</i>
		<i>Serratia ficaria</i>
		<i>Providencia stuartii</i>
		<i>Morganella morganii</i>
		<i>Yersinia enterocolitica</i>
		<i>Butiauxella</i> spp.
		( <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , Nonfermenter)

Auch nach nunmehr über 40 Jahren seit der Entdeckung des Phänomens des induzierbaren *ampC*-Gens [113] ist der genaue Mechanismus auch heute noch immer nicht vollständig verstanden [114, 115]. Man weiß, dass bestimmte Gene, Genprodukte und Cofaktoren an der Induktion beteiligt sind und diese mit dem Katabolismus und Anabolismus der Mureinschicht (vgl. Kapitel 1.1.2.2, S. 35) zusammenhängen. Der Anabolismus stellt die Schnittstelle zum

Wirkungsmechanismus der  $\beta$ -Lactam-Antibiotika dar (vgl. Kapitel 1.1.2.3, S. 40). In Abbildung 1–31 ist das Modell der Induktion nach derzeitigem Wissensstand dargestellt.



**Abbildung 1–31: Modell der *ampC*-Induktion in *Enterobacteriaceae*.** Modifiziert aus [116] und [115]. CM: Cytoplasma, IM: innere Membran, PP: Periplasma, PG: Peptidoglykan, OM: äußere Membran. Der hier mit Fragezeichen besetzte Mechanismus zum Ausschleusen der Mureinvorläufermoleküle ist die in Kapitel 1.1.2.2 (ab S. 35) erwähnte Flippase-Reaktion, bei der noch nicht bekannt ist, welches Protein genau dafür verantwortlich ist [22].

Wie man der Abbildung entnehmen kann, sind zahlreiche Proteine an dem Induktionsmechanismus beteiligt. Das Peptidoglykan unterliegt unter normalen Umständen (d.h. keiner Exposition zu  $\beta$ -Lactam-Antibiotika) einem permanenten Gleichgewicht zwischen Auf- und Abbau, um Zellwachstum und -teilung gewährleisten zu können. GlcNAc-1,6-Anhydro-MurNAc-Tri-, Tetra- und Pentapeptide fallen dabei bei Abbauprozessen im Periplasma an und gelangen durch die Permease AmpG in das Zellinnere.

Dort werden GlcNAc-Reste von der  $\beta$ -N-Acetylglucosaminidase NagZ und 1,6-Anhydro-N-Acetylmuramin von der Anhydro-N-Acetylmuramyl-L-Alanin-Amidase AmpD abgespalten. Die resultierenden Zuckerkomponenten und Tri-, Tetra- und Pentapeptide fließen in einen Recyclingprozess ein (vgl. Abbildung 1–21, S. 39), der nach mehreren Schritten wieder in die Synthese von UDP-MurNAc-Pentapeptid mündet. Dieser Baustein gelangt nach weiteren Modifikationen zurück in den periplasmatischen Raum, wo es schließlich in der Peptidoglycan-Synthese verbaut werden kann (vgl. Kapitel 1.1.2.2, ab S. 35). Im Zellinneren gibt es zudem einen Corepressor für den *ampC*-Transkriptionsfaktor AmpR (ob dieser Corepressor tatsächlich das UDP-MurNAc-Pentapeptid ist, ist noch nicht mit letzter Gewissheit geklärt, vgl. [114]). AmpR gehört zur LysR-Familie DNA-bindender, regulativer Proteine. *ampC* und *ampR* werden divergent transkribiert. Das Genprodukt AmpR reguliert in Folge der Interaktion mit UDP-MurNAc-Pentapeptid die Expression von *ampC* und wahrscheinlich auch des eigenen Gens *negativ* (letzteres ist noch nicht eindeutig belegt, vgl. [115]). AmpR bindet dabei an den intergenischen Bereich zwischen *ampC* und *ampD*. Es nimmt also eine Konformation an, die die Expression von *ampC* reprimiert. So wird nur ein niedriger, basaler Level von AmpC hergestellt, der in den periplasmatischen Raum abgegeben wird.

Die Substrate von AmpD hingegen sind Inducer und damit aktivierende Cofaktoren von AmpR. Welches 1,6-Anhydromuramyl-Peptid der eigentliche Inducer ist, ist noch nicht abschließend geklärt [115], vieles deutet jedoch auf das Tripeptid hin. Es vermag das reprimierende UDP-MurNAc-Pentapeptid aus der Bindung mit AmpR zu verdrängen und führt zu einer Konformationsänderung, die AmpR letztlich als Aktivator der Expression von *ampC* fungieren lässt. Da die Substrate von AmpD unter Einsatz von  $\beta$ -Lactam-Antibiotika, die ja letztlich durch den Angriff an die Transpeptidasen störend in den Murein-Anabolismus eingreifen, vermehrt entstehen, ist darüber auch der induktive Effekt zu verstehen. Ab einer bestimmten Menge von Abbauprodukten wird AmpD abgesättigt, der Rückstau bedingt die Induktion. Dass die verschiedenen  $\beta$ -Lactam-Antibiotika dabei unterschiedlich starke, induktive Effekte haben, hängt ausschließlich mit deren jeweiliger Präferenz für bestimmte PBPs zusammen [117].

Die Funktion von AmpE ist noch nicht klar. Man weiß, dass es sich um ein Protein der inneren Membran handelt, und man hat einen Zusammenhang mit dem Ausschleusen von Pentapeptiden festgestellt [115].

---

Unter Selektionsdruck werden leicht *ampD*-Mutanten isoliert, die eine erhöhte Expression von *ampC* aufweisen. Durch eine *ampD*-Mutation kommt es zu einer stabilen Dereprimierung von *ampC*. Um diesen Resistenzmechanismus zu umgehen, wird momentan u.a. in Richtung von NagZ-Inhibitoren geforscht [116]. Diese könnten die Akkumulation der AmpD-Substrate im katabolen Stoffwechsel reduzieren. Neben dem dereprimierten Phänotyp können andere *ampD*-Mutationen auch zu einem hyperinduzierbaren Phänotyp führen, bei dem *ampC* unter entsprechenden Bedingungen viel stärker exprimiert wird als ohne die Mutation [118]. Es ist allerdings schwierig, anhand einer neuen Mutation in *ampD* auf einen bestimmten Phänotyp zu schließen [119].

Veränderungen in *ampR* gelten als selten, denn sie müssten AmpR derart verändern, dass es permanent als Aktivator funktioniert [83, 120].

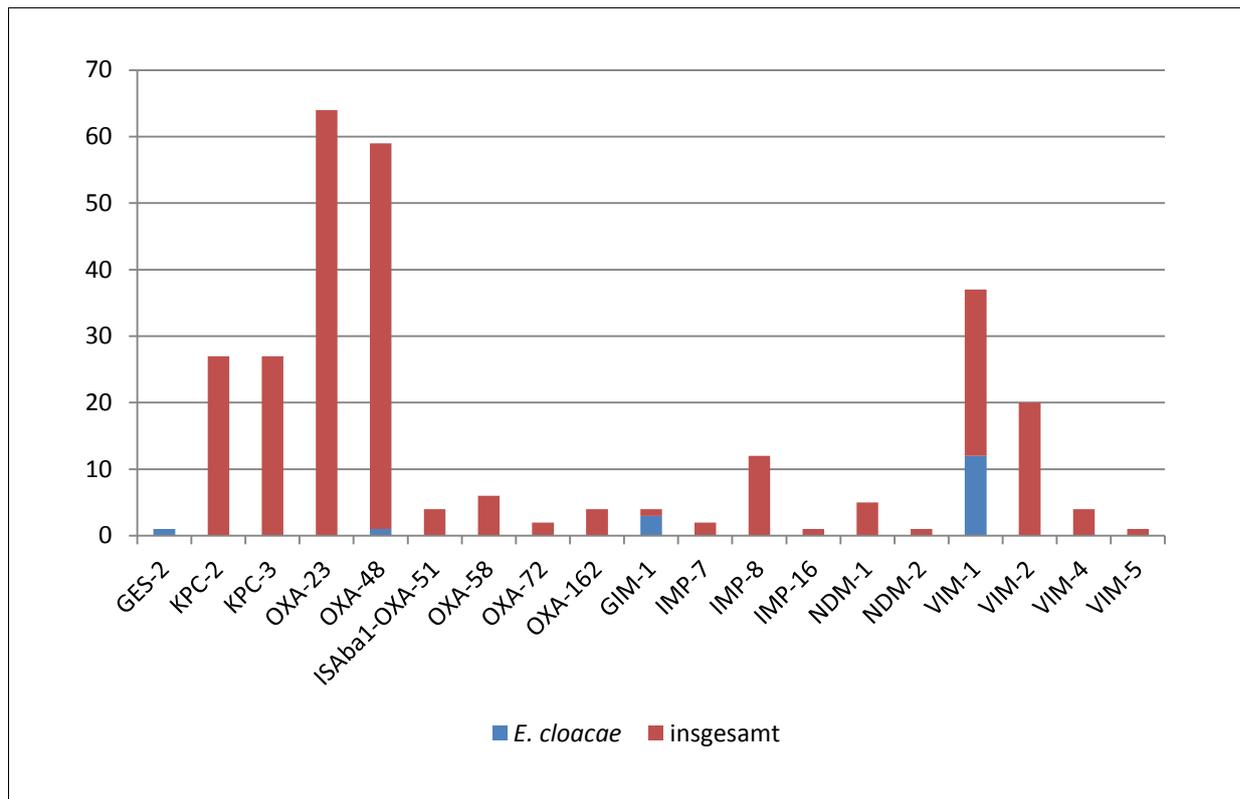
Mutationen in *ampG* führen zu einer verminderten Wiederaufnahme von Murein-Abbauprodukten als AmpD-Substraten [121]. Bezüglich einer erhöhten *ampC*-Expression findet man diese Mutationen also nicht. Auf der anderen Seite ist AmpG damit aber ein interessantes Target für Inhibitoren [122].

Bezüglich *ampE* weiß man, dass dessen Inaktivierung eine Inaktivierung des *ampC*-Induktionssystems zur Folge hat [123]. Damit sind entsprechende Mutationen ebenfalls unwahrscheinlich.

Im Gen *ampC* selbst sind zunehmend Mutationen identifiziert worden, die zu einer Erweiterung des Spektrums der  $\beta$ -Lactamase führen (extended spectrum AmpC  $\beta$ -Lactamases, ESACs [124]). Bezüglich einer Änderung der Expression sind Promotormutationen möglich, die aber eher bei denjenigen Stämmen relevant sind, die nicht über ein induzierbares, chromosomales *ampC* verfügen [112].

### 1.2.1.2 Resistenzsituation von Carbapenemen in Deutschland

*E. cloacae* sind als Träger von Carbapenemase-Genen gegenwärtig noch die Ausnahme in Deutschland, wie das folgende Diagramm illustriert. Es zeigt die Untersuchungsergebnisse des NRZ von 2010 für Nachweise von Carbapenemase-Genen bei *E. cloacae*.



**Abbildung 1–32: Nachgewiesene Carbapenemase-Gene in *E. cloacae* in Deutschland 2010 (NRZ).** Basiert auf den Angaben in [125]. Dargestellt sind auf der Abszisse sämtliche durch das NRZ nachgewiesene Carbapenemase-Gene des Jahres 2010, sowie auf der Ordinate deren Anzahl. Die Summe der Gen-Nachweise betrug 281, davon erfolgten 17 Nachweise bei *E. cloacae*. Einige  $\beta$ -Lactamasen sind nicht bekannt dafür, bei verschiedenen Spezies aufzutreten, bspw. OXA-23, das hier ausschließlich in *A. baumannii* nachgewiesen wurde. Sie flossen der Vollständigkeit halber aber dennoch in Diagramm und Berechnung ein.

Allerdings ist dem Diagramm auch zu entnehmen, dass *E. cloacae* sehr häufig mit der MBL VIM-1 assoziiert sind. Bei den Nachweisen dieses Gens war *E. cloacae* der häufigste Träger (12 von 31 Nachweisen) [125].

### 1.2.2 *Klebsiella pneumoniae*

*K. pneumoniae* wurden 1882 durch Friedländer isoliert und mit einer bestimmten Form der Pneumonie assoziiert [126]. Die Benennung der gefundenen Bakterien als Klebsiellen erfolgte 1885 durch Trevisan [127] nach dem ostpreußischen Mikrobiologen Edwin Klebs. Dieser hatte bereits 1875 festgestellt, dass Bakterien in den (i.w.S.) Atemwegen von Pneumonie-Opfern gefunden werden konnten [128].

*Klebsiella* spp. sind Ursache Nummer zwei, nach *E. coli*, für nosokomiale Bakteriämien durch Gram-negative Bakterien, wobei *K. pneumoniae* innerhalb des Genus am häufigsten nachgewiesen wird [129]. Damit assoziiert sind häufig Infektionen der Atemwege und des

Harntraktes [129].

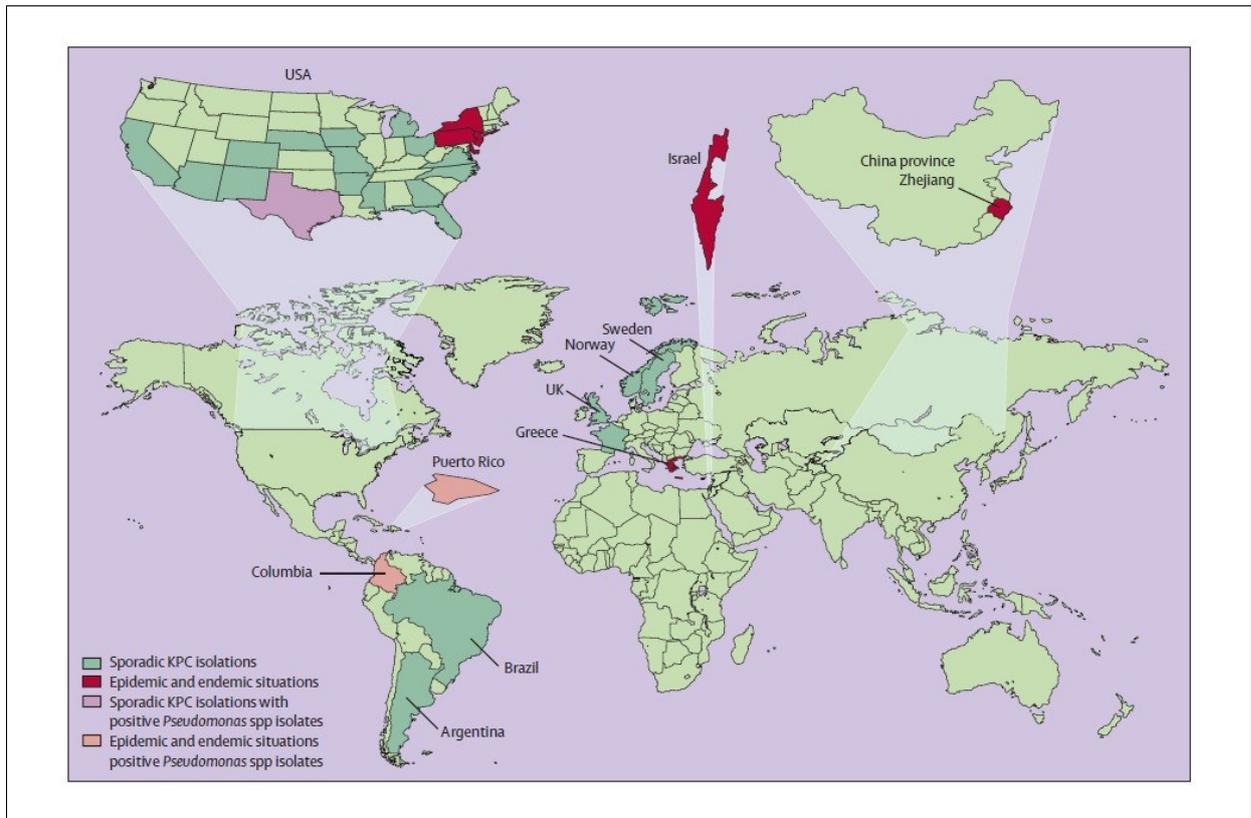
Die namensgebende (Friedländer-)Pneumonie ist eine heute in westlichen Ländern kaum noch beobachtete Erkrankung, die früher häufig bei chronisch alkoholabhängigen Personen diagnostiziert wurde [129].

### 1.2.2.1 Chromosomal codierte Klasse-A- $\beta$ -Lactamase

Im Gegensatz zu den meisten anderen Enterobakterien verfügt *K. pneumoniae* nicht über eine chromosomal codierte Klasse-C- $\beta$ -Lactamase (vgl. Tabelle 1–3, S. 59), dafür aber über eine chromosomal codierte  $\beta$ -Lactamase der Klasse A. Dabei handelt es sich üblicherweise um den Typ SHV-1 [130]. Darüber hinaus hat man einen Zusammenhang zwischen den phylogenetischen Gruppen von *K. pneumoniae* und anderen Typen von chromosomal codierten Klasse-A- $\beta$ -Lactamasen gefunden [131]. Die phylogenetische Gruppe KpI ist mit SHV assoziiert, KpIII mit der LEN- $\beta$ -Lactamase. Eine genetisch verwandte dritte Gruppe von  $\beta$ -Lactamasen, die mit der phylogenetischen Gruppe KpII assoziiert ist, ist OKP. Das Aktivitätsprofil der drei  $\beta$ -Lactamasen gilt als ähnlich. KpI ist die zumindest in Europa vorherrschende phylogenetische Gruppe, der ca. 90 % der klinischen Isolate angehören.

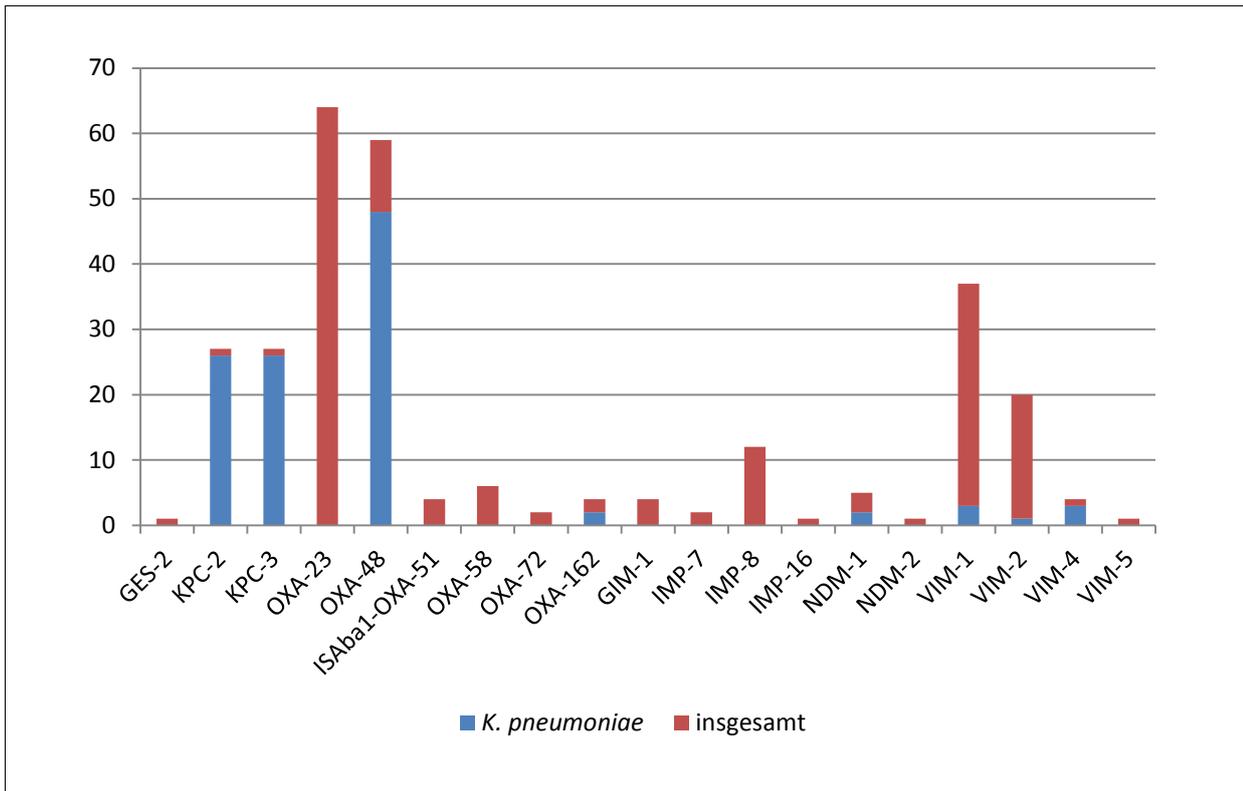
### 1.2.2.2 Resistenzsituation von Carbapenemen in Deutschland

*K. pneumoniae* ist in zweierlei Hinsicht ein ernstzunehmendes Problem bezüglich des Auftretens von Carbapenem-Resistenzen. Zum einen grassiert vor allem an der Ostküste der USA, insbesondere im Raum New York, eine schon länger andauernde Welle von Krankheitsfällen durch *K. pneumoniae*, die KPC- $\beta$ -Lactamasen exprimieren. Darüber hinaus ist diesbezüglich die Situation auch in Israel, Griechenland, Kolumbien sowie der ostchinesischen Provinz Zhèjiāng problematisch [132].



**Abbildung 1–33: Weltweites Auftreten von KPC-β-Lactamasen.** Aus [132]. In Texas, Kolumbien und Puerto Rico wurden KPC auch in erwähnenswertem Ausmaß in *P. aeruginosa* nachgewiesen (hier rosa bzw. violett), was eine Ausbreitung auf eine andere Ordnung der Bakterien verdeutlicht.

Zum anderen ist *K. pneumoniae* der mit Abstand häufigste Träger von Carbapenemase des Typs OXA-48. Folgendes Diagramm illustriert die Untersuchungsergebnisse des NRZ von 2010 bezüglich der Nachweise von Carbapenemase-Genen bei klinischen *K. pneumoniae*-Isolaten und verdeutlicht die Bedeutung dieses Keims in Deutschland.



**Abbildung 1–34: Nachgewiesene Carbapenemase-Gene in *K. pneumoniae* in Deutschland 2010 (NRZ).** Basiert, wie auch Abbildung 1–32, auf den Angaben in [125]; die Achsen ergeben sich entsprechend. 111 Nachweise der insgesamt 218 nachgewiesenen Carbapenemase-Gene erfolgten bei *K. pneumoniae*, was den größten Anteil ausmacht.

### 1.3 Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit war die möglichst vollständige Aufklärung von Resistenzmechanismen gegen  $\beta$ -Lactam-Antibiotika der Klasse der Carbapeneme bei verschiedenen Isolaten aus der Familie der *Enterobacteriaceae*. Zum einen wurde ein *K. pneumoniae*-Isolat aus Hamburg untersucht, sowie zum anderen ein Isolat-Kollektiv von *E. cloacae* aus Münster.

Dem schloss sich als weiterführendes Ziel die Aufklärung epidemiologischer Fragestellungen hinsichtlich der Isolate oder den gefundenen Resistenzmechanismen an. Neben der Untersuchung einer möglichen Verwandtschaft der Isolate untereinander (*E. cloacae*) bzw. zu Isolaten aus anderen Ländern (*K. pneumoniae*) umfasste dies die Identifizierung von mobilen genetischen Elementen, die zur Ausbreitung von Resistenzen beitragen.

Schließlich wurde im Falle des *Klebsiella*-Isolats die Untersuchung möglicher Synergismen verschiedener, bei ihr identifizierter Resistenzmechanismen verfolgt, um gegebenenfalls neue Erkenntnisse zu ihrem Einfluss auf das bestehende Resistenzprofil oder zu ihrer gegenseitigen Abhängigkeit bei der Manifestierung einer klinische Resistenz gewinnen zu können.

## 2 Material

### 2.1 Verwendete Bakterienstämme

#### 2.1.1 Klinische Isolate

In Tabelle 2–1 sind verwendete Bakterienstämme aufgeführt, bei denen es sich um klinische Isolate handelt.

Tabelle 2–1: klinische Isolate

Gattung, Art	Bezeichnung	Quelle	Datum d. Isolation
<i>E. cloacae</i>	K19968	UKM	17.10.2007
<i>E. cloacae</i>	K20606	UKM	26.10.2007
<i>E. cloacae</i>	K20608	UKM	26.10.2007
<i>E. cloacae</i>	K21198	UKM	05.11.2007
<i>E. cloacae</i>	K21370	UKM	05.11.2007
<i>E. cloacae</i>	K21373	UKM	05.11.2007
<i>E. cloacae</i>	A17244/1	UKM	08.11.2007
<i>E. cloacae</i>	A17244/2	UKM	08.11.2007
<i>K. pneumoniae</i>	Va22038/2004	UKE	19.07.2004

Die *E. cloacae*-Isolate K19968, K20606, K20608, K21198, K21370 und K21373 stammen aus Blutkulturen, die Isolate A17244/1 und A17244/2 von einem Portkatheter. Bei dem Isolat K21370 ist bekannt, dass es aus einer Blutkultur aus einer peripheren Vene isoliert wurde, während das Isolat K21373 aus Blut des Portkatheters stammt. Bei den übrigen Isolaten aus Blutkulturen ist die Herkunft des Blutes nicht mehr nachzuvollziehen.

##### 2.1.1.1 Fallbericht und Hintergründe zu den *E. cloacae*

Die *E. cloacae* aus Münster wurden bei einer 62-jährigen Patientin isoliert, die zu diesem Zeitpunkt wegen einer Anpassung der parenteralen Ernährung im Krankenhaus war. Dies wurde durch ein Kurzdarmsyndrom und eine Hypertriglyceridämie notwendig.

Die Patientin hat eine lange, von Morbus Crohn geprägte Krankheitsgeschichte, die durch Darm-Resektionen, dem erwähnten Kurzdarmsyndrom und infolgedessen Ileostoma gekennzeichnet ist. Dies ging einher mit einer chronischen Niereninsuffizienz, einem

chronischen Schmerzsyndrom sowie multiplen Allergien.

2006 hatte die Patientin mehrere Episoden von Fieber unbekannter Ursache (FUO), wobei *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus caprae* und *Staphylococcus capitis* in Blutkulturen nachgewiesen werden konnten. Im Februar 2006 erfolgte bei Verdacht auf eine Portkatheterinfektion eine Therapie mit Imipenem (3x 1 g / 4 d), Vancomycin und Doxycyclin. Bei weiteren Krankenhausaufenthalten 2006 erfolgte eine Behandlung mit Cefazolin und Gentamicin.

Bei einem Krankenhausaufenthalt im Zeitraum vom 26.09.2007 bis zum 03.12.2007 trat abermals Fieber unbekannter Ursache sowie eine Sepsis auf, wobei Carbapenem-resistente *E. cloacae* in Blutkulturen und im Portkatheter nachgewiesen wurden. Dies sind die in dieser Arbeit untersuchten Keime. Im Portkatheter wurden zudem *Enterococcus faecium* und *Staphylococcus epidermidis* identifiziert. Eine bei diesem Krankenhausaufenthalt initiale Therapie mit Vancomycin und anschließend Levofloxacin wurde nach der Identifikation der *E. cloacae* auf Tigecyclin umgestellt. Dies führte zusammen mit der Entfernung des Portkatheters zum Rückgang des Fiebers. Dieser Zustand blieb auch nach Absetzen der Tigecyclin-Therapie stabil. Die Konzentration von Entzündungsmarkern sank und ein neuer Portkatheter wurde implantiert.

### 2.1.1.2 Fallbericht und Hintergründe zu der *K. pneumoniae*

Der Fallbericht zu *K. pneumoniae* Va22038/2004 (im Folgenden als *K. pneumoniae* Va22038 bezeichnet) wurde 2007 durch Timmerbeil et al. im Chemotherapie Journal publiziert [133].

### 2.1.2 Laborstämme

Die verwendeten Laborstämme sind in Tabelle 2–2 aufgeführt.

Tabelle 2–2: verwendete Laborstämme

Gattung, Art	Bezeichnung	Quelle, Referenz	Verwendung
<i>E. coli</i>	KMBL1164/pBR329 (DSM 5590)	DSMZ	pBR329
<i>E. coli</i>	J53-1 NaI <sup>R</sup> Azid <sup>R</sup>	Marit G. Tellevik, Bergen [134]	Rezipient
<i>E. coli</i>	JM83/pBP131-3	Stammsammlung (GK59)	pBP131-3

Gattung, Art	Bezeichnung	Quelle, Referenz	Verwendung
<i>E. coli</i>	JM83/pBP507	Stammsammlung (GK395)	pBP507
<i>E. coli</i>	JM109	Stammsammlung (GK3154)	kompetente Zellen
<i>E. coli</i>	SN03	Stammsammlung (GK65)	<i>ampC8</i>
<i>E. coli</i>	SN0302	Stammsammlung (GK64)	<i>ampC8</i> , <i>ampD2</i>

*E. coli* J53-1 NaI<sup>R</sup> Azid<sup>R</sup> wird im Folgenden als *E. coli* J53-1 Azid<sup>R</sup> bezeichnet.

### 2.1.3 Referenzstämme

Stämme, die in Experimenten Referenzwerte bzw. Referenzdaten lieferten, sind in Tabelle 2–3 aufgeführt.

Tabelle 2–3: verwendete Referenzstämme

Gattung, Art	Bezeichnung	Quelle, Referenz	Eigenschaften
<i>E. cloacae</i>	129/08	Dr. Yvonne Pfeifer, RKI Wernigerode	<i>bla</i> <sub>VIM-1</sub>
<i>E. cloacae</i>	14	Stammsammlung (GK81)	<i>ampD</i> -Wildtyp
<i>E. cloacae</i>	14-M01	diese Arbeit	<i>ampD</i> <sup>+</sup>
<i>E. cloacae</i>	14-M02 bis M10	diese Arbeit	Cefotaxim <sup>R</sup>
<i>E. coli</i>	ATCC 25922	Stammsammlung (GK1114)	Referenzstamm bei MHK-Bestimmungen
<i>E. coli</i>	C600S/RP1H	Stammsammlung (GK329)	RP1H: ca. 61 kb [135]
<i>E. coli</i>	eo471	Stammsammlung (GK2850)	<i>aac(6')</i> -Ib
<i>K. pneumoniae</i>	Ref. 120	Stammsammlung (GK3109)	<i>qnrA</i>
<i>E. coli</i>	Ref. 157	Stammsammlung (GK3110)	<i>qnrB</i>
<i>E. coli</i>	JM109	Stammsammlung (GK3124)	<i>qnrS</i>
<i>E. coli</i>	V517	Stammsammlung (GK1217)	verschieden große Plasmide, vgl. Tabelle 2–4
<i>E. coli</i>	W3110	Stammsammlung (BT0007)	<i>bla</i> <sub>TEM-1</sub>

Gattung, Art	Bezeichnung	Quelle, Referenz	Eigenschaften
<i>K. pneumoniae</i>	11978	Dr. Gaëlle Cuzon und Dr. Thierry Naas, Bicêtre [93]	<i>bla</i> <sub>OXA-9</sub> , <i>bla</i> <sub>OXA-47</sub> , <i>bla</i> <sub>OXA-48</sub>
<i>K. pneumoniae</i>	375/08	Dr. Yvonne Pfeifer, RKI Wernigerode	<i>bla</i> <sub>KPC-2</sub>
<i>K. pneumoniae</i>	ATCC 13883 (DSM 30104)	DSMZ	<i>ompK35</i> <sup>+</sup> , <i>ompK36</i> <sup>+</sup>
<i>K. pneumoniae</i>	ATCC 700603	Stammsammlung (BT0080)	<i>bla</i> <sub>SHV-18</sub>
<i>K. pneumoniae</i>	C2	Dr. George A. Jacoby, Boston [136]	<i>ompK35</i> <sup>-</sup> , <i>ompK36</i> <sup>-</sup> , ESBL <sup>-</sup>
<i>K. pneumoniae</i>	Ref. 193 (CSUB10R/pSHA25K)	Dr. Luis Martínez-Martínez, Santander [137]	<i>ompK35</i> <sup>-</sup> , <i>ompK36</i> <sup>+</sup>
<i>K. pneumoniae</i>	Ref. 194 (CSUB10S/pSHA16K)	Dr. Luis Martínez-Martínez, Santander [137]	<i>ompK35</i> <sup>+</sup> , <i>ompK36</i> <sup>+</sup>
<i>K. pneumoniae</i>	Ref. 305 (CSUB10R)	Dr. Luis Martínez-Martínez, Santander [137]	<i>ompK35</i> <sup>-</sup> , <i>ompK36</i> <sup>-</sup>
<i>P. aeruginosa</i>	179	Dr. Renata C. Picão, São Paulo [138]	<i>bla</i> <sub>VIM-1</sub>
<i>S. Typhimurium</i>	LT2	Stammsammlung (GK3298)	PFGE-Referenz

Bezüglich *E. coli* V517 sind die in diesem Stamm vorkommenden, verschieden großen Plasmide [139, 140] in der folgenden Tabelle 2–4 aufgeführt (Umrechnung: 1 MDa = 1,52 kb).

Tabelle 2–4: Plasmide in *E. coli* V517 (Angaben aus [139] und [140])

Plasmid	m / MDa	Größe / kb
pVA517I	212,6	323,152
pVA517J	103,0	156,56
pV517A	35,84	54,48
pV517B	4,82	5,58
pV517C	3,67	5,3
pV517D	3,39	5,15
pV517E	2,63	4,00
pV517F	2,03	3,09
pV517G	1,79	2,72

Plasmid	m / MDa	Größe / kb
pV517H	1,36	2,07

## 2.2 Plasmide

In dieser Arbeit wurden die in Tabelle 2–5 aufgeführten Plasmide benutzt.

Tabelle 2–5: verwendete Plasmide

Bezeichnung	Verwendung, relevante Gene und Marker	Quelle, Referenz	siehe auch...
pBP131-3	<i>ampC</i> , <i>ampR</i> , Tet <sup>R</sup>	Dr. Gisela Korfmann, Bonn [141]	Kapitel 4.1.7.2.2, ab S. 205
pBP507	<i>aadB</i> , <i>aacA</i>	[142]	Kapitel 4.2.8.1, ab S. 223 Abbildung 4–45, S. 223
pBR329	Template für pBR329ΔAmp <sup>R</sup> Chl <sup>R</sup> , Tet <sup>R</sup> , Amp <sup>R</sup>	DSMZ [143]	Kapitel 4.1.7.2.1 ab S. 195 Abbildung 4–20, S. 195
pBR329ΔAmp <sup>R</sup>	<i>ampD</i> -Klonierungsvektor Chl <sup>R</sup> , Tet <sup>R</sup>	diese Arbeit	Kapitel 4.1.7.2.1, ab S. 195 Abbildung 4–23, S. 197
pHPJW12-11.1	<i>ampD</i> von <i>E. cloacae</i> K19968; Chl <sup>R</sup>	diese Arbeit	Tabelle 4–13, S. 207
pHPJW12-11.2	<i>ampD</i> von <i>E. cloacae</i> A17244/1; Chl <sup>R</sup>	diese Arbeit	
pHPJW12-11.3	<i>ampD</i> von <i>E. cloacae</i> A17244/2; Chl <sup>R</sup>	diese Arbeit	
pHPJW12-11.4	<i>ampD</i> von <i>E. cloacae</i> 14; Chl <sup>R</sup>	diese Arbeit	
pHPJW12-11.5	<i>ampD</i> von <i>E. cloacae</i> 14-M01; Chl <sup>R</sup>	diese Arbeit	
pHPJW30-21.1	Kan <sup>R</sup> ; Amp <sup>R</sup> , Gent <sup>R</sup> ; <i>ompK36</i>	diese Arbeit	Tabelle 4–22, S. 228
pHPJW30-22.1	Kan <sup>R</sup> ; Amp <sup>R</sup> , Gent <sup>R</sup> ; <i>ompK35</i>	diese Arbeit	
pOXA-48a	Resistenzplasmid aus <i>K. pneumoniae</i> 11978 <i>bla</i> <sub>OXA-48</sub>	Dr. Gaëlle Cuzon und Dr. Thierry Naas, Bicêtre [144]	
pOXA-48 (KpnVa22038)	Resistenzplasmid aus <i>K. pneumoniae</i> Va22038 <i>bla</i> <sub>OXA-48</sub>	diese Arbeit	
pSHA25K	Template für pHPJW30-21.1 Kan <sup>R</sup> , Amp <sup>R</sup> , <i>ompK36</i>	Dr. Luis Martínez-Martínez, Santander [137]	Tabelle 4–20, S. 222

Bezeichnung	Verwendung, relevante Gene und Marker	Quelle, Referenz	siehe auch...
pSHA16K	Template für pHPJW30-22.1 Kan <sup>R</sup> ; Amp <sup>R</sup> ; <i>ompK35</i>	Dr. Luis Martínez-Martínez, Santander [137]	
pVIM(EclK19968)	Resistenzplasmid aus <i>E. cloacae</i> K19968 <i>bla</i> <sub>VIM-1</sub> ; <i>aacA4</i> ; <i>aadA1</i>	diese Arbeit	

## 2.3 Antibiotika

Antibiotika wurden nach dem Lösen stets steril filtriert. Tabelle 2–6 gibt eine Übersicht über die verwendeten Antibiotika.

Tabelle 2–6: verwendete Antibiotika

Bezeichnung	Hersteller
Amoxicillin	GlaxoSmithKline
Ampicillin, Natriumsalz	Sigma-Aldrich
Aztreonam	Bristol-Myers Squibb
Cefalexin	GlaxoSmithKline
Cefepim	Bristol-Myers Squibb
Cefotaxim	Aventis
Cefoxitin	MSD Sharp & Dohme
Cefpirom	Aventis
Cefpodoxim	Sankyo
Ceftazidim	GlaxoSmithKline
Cefuroxim	GlaxoSmithKline
Chloramphenicol	Sigma-Aldrich
Clavulansäure, Lithiumsalz	GlaxoSmithKline
Ertapenem	MSD Sharp & Dohme
Etest <sup>®</sup> MBL (Imipenem ± EDTA)	bioMérieux
Gentamicin	Sigma-Aldrich
Imipenem	EDQM
Kanamycin	Sigma-Aldrich
Meropenem	AstraZeneca
Micronaut-S Mikrotiterplatte E1-914-100	Merlin
Micronaut-S Mikrotiterplatte ES-201-001	Merlin
Nalidixinsäure	Sigma-Aldrich

Bezeichnung	Hersteller
Nitrocefin	Calbiochem
Rifampicin	Sigma-Aldrich
Streptomycin	Sigma-Aldrich
Tetracyclin, Hydrochlorid	Sigma-Aldrich

Die Mikrotiterplatte Micronaut-S E1-914-100 der Firma Merlin enthielt die Antibiotika Ampicillin, Cefazolin, Ciprofloxacin, Cotrimoxazol (Sulfamethoxazol / Trimethoprim), Gentamicin, Levofloxacin, Mezlocillin, Moxifloxacin, Norfloxacin, Ofloxacin, Piperacillin und Tetracyclin in lyophilisierter Form. Die Mikrotiterplatte ES-201-001 umfasste die Aminoglykoside Amikacin, Apramycin, Gentamicin, Kanamycin, Neomycin, Netilmicin, Streptomycin und Tobramycin.

## 2.4 Laborchemikalien und andere Chemikalien

Tabelle 2–7: verwendete (Labor-)Chemikalien

Bezeichnung	Hersteller o. Lieferant
10x DreamTaq™ Puffer	Fermentas
10x FastAP™-Puffer	Fermentas
10x FastDigest®-Puffer	Fermentas
10x Ligase-Puffer	Fermentas
10x Tango™-Puffer	Fermentas
5x High Fidelity-Puffer	Finnzymes
5x LongAmp®-Puffer	NEB
Acrylamid 30 %	Bio-Rad Laboratories
Acrylamid 30 % / Bisacrylamid 0,8 %	Bio-Rad Laboratories
Acrylamid 40 %	Bio-Rad Laboratories
Agar-Agar	Carl Roth
Agarose, Broad-Range	Carl Roth
Agarose, PeqGold Universal	Peqlab
Ammoniumchlorid	Merck
Ammoniumpersulfat	Bio-Rad Laboratories
L-Arginin	Sigma-Aldrich
ATP	Sigma-Aldrich
Bisacrylamid 2 %	Bio-Rad Laboratories

<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller o. Lieferant</b>
Bismutnitrat Pentahydrat	Merck
Borsäure	Merck
Bromphenolblau	Bio-Rad Laboratories
sec-Butanol	Merck
Calciumchlorid Dihydrat	Merck
Chloroform	Merck
Coomassie Brilliantblue G-250	Bio-Rad Laboratories
dATP	Roche
dCTP	Roche
dGTP	Roche
Dinatriumhydrogenarsenat Heptahydrat	Sigma-Aldrich
Dinatriumhydrogenphosphat Dihydrat	Merck
DMSO	NEB
DTCS Quick Start Master Mix	Beckman Coulter
dTTP	Roche
EDTA, Dinatriumsalz Dihydrat	Carl Roth
Eisen(III)-chlorid Hexahydrat	Merck
Eisessig	Acros
Ethanol absolut p.a.	Merck
Ethidumbromid 1 %	Merck
Glucose Monohydrat	Merck
Glycerin 87 %	Merck
Glycin	Bio-Rad Laboratories
Glycogen	Beckman Coulter
Hefeextrakt granuliert	Carl Roth
HEPES	Carl Roth
IEF Ready Gele (pH 3 bis 10)	Bio-Rad Laboratories
Isopropanol absolut p.a.	Merck
Kaliumacetat	Merck
Kaliumchlorid	Merck
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck
Kaliumhydroxid	Merck
Lysin Monohydrat	Carl Roth
Magnesiumchlorid Hexahydrat	Merck
Magnesiumsulfat Heptahydrat	Merck

Bezeichnung	Hersteller o. Lieferant
$\beta$ -Mercaptoethanol	Merck
MOPS	Sigma-Aldrich
Methanol	Merck
Natriumacetat	Merck
Natriumazid	Sigma-Aldrich
Natriumchlorid	Carl Roth
Natriumdihydrogenphosphat Monohydrat	Merck
Natriumhydroxid	Grüssing
Natriumsalicylat	Carl Roth
Natriumsarcosylat	Sigma-Aldrich
PEG 8000	Sigma-Aldrich
Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol 25:24:1 (Roti-Phenol)	Carl Roth
Phosphorsäure 85 %	Merck
Propylenglycol	Fagron
Salzsäure 37 %	Merck
SDS	Serva
Sequencing Reaction Buffer	Beckman Coulter
SLS (Formamid)	Beckman Coulter
TEMED	Bio-Rad Laboratories
Tris-Base	Carl Roth
Tris-Hydrochlorid	Carl Roth
Trypton (Bacto™ Tryptone)	BD Difco - Becton Dickinson
Xylencyanol	Merck
Zinksulfat	Merck
Zitronensäure Monohydrat	Merck
Zwittergent 3-14	Sigma-Aldrich

Bei der im weiteren Verlauf dieser Arbeit auftauchenden Bezeichnung „Reinstwasser“ handelt es sich um „LiChrosolv<sup>®</sup> - Wasser für die Chromatographie“ der Firma Merck. Bei der Bezeichnung „dH<sub>2</sub>O“ handelt es sich im Folgenden um demineralisiertes und ultrafiltriertes Wasser, welches mit einer Wasseraufbereitungsanlage MilliQ<sup>®</sup> (vgl. Tabelle 2-16, ab S. 93) hergestellt wurde.

## 2.5 Gefahrstoffverzeichnis

Tabelle 2–8 listet die in dieser Arbeit verwendeten KMR-Stoffe auf, Tabelle 2–9 die verwendeten Gefahrstoffe.

Tabelle 2–8: verwendete KMR-Stoffe der Kategorien 1A, 1B und 2

CAS-Nr.	Stoffname (IUPAC)	Verfahren und eingesetzte Menge	Kategorie (GHS)
79-06-1	Acrylamid (Propensäureamid)	Auftrennung von Proteinen mittels PAGE Menge: max. 8,758 ml einer 40 %-Lösung	Karzinogenität Kategorie 1B; H350 Keimzellmutagenität Kategorie 1B; H340 Reproduktionstoxizität Kategorie 2; H361f
10043-35-3	Borsäure	Bestandteil des Laufpuffers bei PFGE Menge: 55 g	Reproduktionstoxizität Kategorie 1B; H360FD
67-66-3	Chloroform (Trichlormethan)	Aufreinigung von Nukleinsäurelösungen mittels Phenol-Chloroform-Extraktion; Lyse von Bakterien zur Protein-Extraktion Menge: max. 432 µl	Karzinogenität Kategorie 2; H351
7778-43-0	Dinatriumhydrogenarsenat Heptahydrat	Bestimmung der MHK von Arsenat Menge: 90 mg	Karzinogenität Kategorie 1A; H350
1239-45-8	Ethidiumbromid (3,8-Diamino-5-ethyl-6-phenylphenanthridinium-bromid)	Anfärben von DNA in Agarosegelen Menge: max. 15 µl einer 1 %igen Lösung	Keimzellmutagenität Kategorie 2; H341
75-12-7	Formamid	Lösungsmittel für DNA bei Sequenzierungen Menge: max. 30µl	Reproduktionstoxizität Kategorie 1B; H360D
108-95-2	Phenol (Benzenol)	Aufreinigung von Nukleinsäurelösungen mittels Phenol-Chloroform-Extraktion Menge: max. 450 µl	Keimzellmutagenität Kategorie 2; H341

Tabelle 2–9: verwendete Gefahrstoffe mit Gefahrstoffkennzeichnungen sowie H- und P-Sätzen

Substanz	GHS-Gefahrstoffkennzeichnung	H-Sätze	P-Sätze
Acrylamid	 Gefahr	350-340-361f- 301-372-332-312- 319-315-317	201-280-301+310- 305+351+338- 308+313
Ammoniumchlorid	 Achtung	302-319	305+351+338
Ammoniumpersulfat	 Gefahr	272-302-315-319- 335-334-317	280-305+351+338- 302+352-304+341- 342+311
L-Arginin	 Achtung	319	305+351+338
Bismutnitrat Pentahydrat	 Gefahr	272-315-319-335	220-261- 305+351+338
Borsäure	 Gefahr	360FD	201-308+313
sec-Butanol	 Achtung	226-319-335-336	210-304+340- 305+351+338
Calciumchlorid Dihydrat	 Achtung	319	305+351+338
Chloroform	 Achtung	302-315-351-373	302+352-314

## Material

Substanz	GHS- Gefahrstoffkennzeichnung	H-Sätze	P-Sätze
Dinatriumhydrogenarsenat Heptahydrat	 <b>Gefahr</b>	350-301-331-410	261-281-301+310- 321-405-501
EDTA	 <b>Achtung</b>	319	305+351+338
Eisen(III)-Chlorid	 <b>Gefahr</b>	302-315-318-290	280-302+352- 305+351+338-313
Eisessig	 <b>Gefahr</b>	226-314	280-301+330+331- 307+310- 305+351+338
Ethanol	 <b>Gefahr</b>	225	210
Ethidiumbromid	 <b>Gefahr</b>	341-330-302	281-302+352- 305+351+338- 304+340-309-310
Formamid	 <b>Gefahr</b>	360D	201-308+313
Isoamylalkohol	 <b>Achtung</b>	226-332-335; EUH066	305+351+338
Isopropanol	 <b>Gefahr</b>	225-319-336	210-233- 305+351+338
Kaliumhydroxid	 <b>Gefahr</b>	302-314	280-301+330+331- 305+351+338-309- 310

Substanz	GHS- Gefahrstoffkennzeichnung	H-Sätze	P-Sätze
$\beta$ -Mercaptoethanol	 Gefahr	301-310-330-315-318-410	280-273-302+352-304+340-305+351+338-309-310
Methanol	 Gefahr	225-331-311-301-370	210-233-280-302+352-370
MOPS	 Achtung	315-319-335	261-305+351+338
Natriumazid	 Gefahr	300-400-410; EUH032	273-309-310
Natriumhydroxid	 Gefahr	314	280-301+330+331-309-310-305+351+338
Natriumsalicylat	 Achtung	302-319	260-305+351+338
Natriumsarcosylat	 Gefahr	331	261-311
Phenol	 Gefahr	341-331-311-301-373-314	280-302+352-301+330+331-309-310-305+351+338
Phosphorsäure 85 %	 Gefahr	314	280-301+330+331-305+351+338-309+310
Salzsäure	 Gefahr	314-335	260-301+330+331-303+361+353-305+351+338-405-501

Substanz	GHS- Gefahrstoffkennzeichnung	H-Sätze	P-Sätze
SDS	 Gefahr	228-311-302-335-315-319	210-280-304+340-305+351+338-309+310
TEMED	 Gefahr	225-332-302-314	210-233-280-301+330+331-305+351+338-309+310
Tris-Base, Tris-Hydrochlorid	 Achtung	315-319-335	261-280-305+351+338-321-405-501
Xylencyanol	 Achtung	315-319-335	261-305+351+338
Zinksulfat	 Gefahr	302-318-410	280-273-305+351+338
Zitronensäure Monohydrat	 Gefahr	318	305+351+338-311
Zwittergent 3-14	 Achtung	315-319-335	261-305+351+338

## 2.6 Puffer und Lösungen

Tabelle 2–10 enthält die Zusammensetzung in dieser Arbeit verwendeter Puffer und Lösungen.

Tabelle 2–10: verwendete Puffer und Lösungen

Bezeichnung	Zusammensetzung
dNTPs	2 mM pro Nucleotid

<b>Bezeichnung</b>	<b>Zusammensetzung</b>
<b>Agarose-Gelelektrophorese</b>	
0,5x TAE-Puffer	20 mM Tris-Acetat, 1 mM EDTA; pH 8,5
Ladepuffer (Loading Dye)	0,08 % (m/m) Bromphenolblau; 0,05 % (m/m) Xylencyanol; 60 % (m/m) Glycerin
<b>PFGE</b>	
10x TBE-Puffer	890 mM Tris-Borat; 20 mM EDTA; pH 8,0
CSB-Puffer	100 mM Tris; 100 mM EDTA; pH 8,0
Cell-Lysis-Puffer	50 mM Tris; 50 mM EDTA; 1 % (m/V) Natriumsarcosylat; pH 8,0
TE-Puffer	10 mM Tris; 1 mM EDTA; pH 8,0
<b>S1-PFGE</b>	
S1 Nuclease-Puffer	200 mM Natriumacetat; 1,5 M Natriumchlorid; 10 mM Zinksulfat; pH 4,5
<b>alkalische Lyse</b>	
EB-Puffer	10 mM Tris-HCl; pH 8,5
GTE-Puffer	50 mM Glucose; 25 mM Tris-HCl; 10 mM EDTA; 200 µg/ml RNase; pH 8,0
Lysepuffer	0,2 M Natriumhydroxid; 1 % (m/V) SDS
Neutralisationspuffer	3 M Kaliumacetat; pH 4,8
<b>EPS-Minimierung</b>	
Bismutnitrat-Stammlösung	100 mM Bismutnitrat in alkalischem Propylenglycol
alkalisches Propylenglycol	400 mM Natriumhydroxid in Propylenglycol
Natriumsalicylat-Stammlösung	250 mM Natriumsalicylat in 50 % (m/m) Propylenglycol; pH 7,0
Eisen(III)-Stammlösung	15 mM Eisen(III)-chlorid
EDTA-Stammlösung	500 mM Natrium-EDTA; pH 10
saure, zwitterionische Detergens-Lösung	1 % (m/V) Zwittergent 3-14; 100 mM Zitronensäure
<b>Plasmidisolierung nach Kado &amp; Liu</b>	
Lysing Solution	50 mM Tris-Acetat; 3 % (m/V) SDS; pH 12,6
<b>Plasmidisolierung nach Crosa</b>	
TE-Puffer	s. PFGE
Lyse-Puffer	4 % (m/V) SDS in TE-Puffer; pH 12,4

## Material

Bezeichnung	Zusammensetzung
<b>Transformation gefrierkompetenter Zellen</b>	
TFB 1	50 mM Kaliumacetat; 100 mM Magnesiumchlorid; 100 mM Kaliumchlorid; 16 mM Calciumchlorid; 15 % (V/V) Glycerin
TFB 2	10 mM MOPS; 76 mM Calciumchlorid; 10 mM Kaliumchlorid; 15 % (V/V) Glycerin
<b>Präparation äußerer Membranproteine nach Carlone</b>	
HEPES-Puffer,	10 mM HEPES; pH 7,4:
Natriumsarcosylat-Lösung	2 % (m/V) in HEPES-Puffer
<b>SDS-PAGE</b>	
Probenpuffer	1,65 M Glycin; 5,7 % (m/V) SDS; 7,1 % (V/V) $\beta$ -Mercaptoethanol, 70 mM Tris-HCl; pH 6,8
SDS-PAGE-Ladepuffer	0,2 % (m/V) Bromphenolblau, 0,5 % (V/V) Essigsäure, 5 % (V/V) Ethanol
5x SDS-PAGE-Laufpuffer	960 mM Glycin; 125 mM Tris; 0,5 % (m/V) SDS; pH 8,3
Coomassie-Blue-Färbelösung	0,25 % (m/V) Coomassie Brilliant Blue R-250; 50 % (V/V) Methanol; 9,2 % (V/V) Essigsäure
Entfärbelösung	7 % (V/V) Essigsäure; 20 % (V/V) Methanol
<b>IEF</b>	
0,1 M Phosphat-Puffer, pH 7,0 nach Sörensen [145, 146]	19,5 % (V/V) 0,2 M Monobase; 30,5 % (V/V) 0,2 M Dibase
IEF-Probenpuffer	50 % (m/m) Glycerin; 0,03 % (m/V) Bromphenolblau
5x Kathodenpuffer	100 mM Lysin; 100 mM L-Arginin
10x Anodenpuffer	70 mM Phosphorsäure

## 2.7 Enzyme

Die in dieser Arbeit verwendeten Enzyme sind in der folgenden Tabelle 2–11 aufgeführt.

Tabelle 2–11: verwendete Enzyme

Restriktionsenzyme	Hersteller
<i>Aat</i> II	Fermentas (konventionelles Restriktionsenzym)
<i>Bam</i> HI	Fermentas (FastDigest <sup>®</sup> Restriktionsenzym)
<i>Bsp</i> HI	Fermentas (FastDigest <sup>®</sup> Restriktionsenzym)
<i>Eco</i> RI	Fermentas (FastDigest <sup>®</sup> Restriktionsenzym)
<i>Eco</i> RV	Fermentas (FastDigest <sup>®</sup> Restriktionsenzym)
<i>Kpn</i> I	Fermentas (FastDigest <sup>®</sup> Restriktionsenzym)

<b>Restriktionsenzyme</b>	<b>Hersteller</b>
<i>MssI</i>	Fermentas (FastDigest® Restriktionsenzym)
<i>PsiI</i>	Fermentas (FastDigest® Restriktionsenzym)
<i>PvuI</i>	Fermentas (konventionelles Restriktionsenzym)
<i>SacI</i>	Fermentas (FastDigest® Restriktionsenzym)
<i>SalI</i>	Fermentas (FastDigest® Restriktionsenzym)
<i>SapI</i>	Fermentas (FastDigest® Restriktionsenzym)
<i>SmaI</i>	Fermentas (FastDigest® Restriktionsenzym)
<i>SphI</i>	Fermentas (FastDigest® Restriktionsenzym)
<i>XbaI</i>	Fermentas (FastDigest® Restriktionsenzym)
<i>XhoI</i>	Fermentas (FastDigest® Restriktionsenzym)
<b>Polymerasen</b>	<b>Hersteller</b>
<i>Pfu</i> -DNA-Polymerase	Finnzymes (Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase)
<i>Taq</i> -DNA-Polymerase	Fermentas (DreamTaq™ DNA Polymerase) NEB (LongAmp® <i>Taq</i> -Polymerase)
<b>DNA modifizierende Enzyme</b>	<b>Hersteller</b>
alkalische Phosphatase, thermosensitiv	Fermentas (FastAP™)
Exonuclease I	Fermentas (Exo I)
Klenow Fragment	Fermentas
T4 DNA Ligase	Fermentas
S1 Nuclease	Fermentas
<b>sonstige Enzyme</b>	<b>Hersteller</b>
Proteinase K	Roche
RNase A	QIAGEN

## 2.8 Nährmedien, Nährböden

In dieser Arbeit wurden die in Tabelle 2–12 aufgeführten Nährmedien und -böden verwendet.

Tabelle 2–12: verwendete Nährmedien bzw. Nährböden

<b>Bezeichnung</b>	<b>Zusammensetzung</b>	<b>Hersteller o. Lieferant</b>
isotonische Natriumchlorid-Lösung	0,9 % (m/V) Natriumchlorid	Eigenherstellung
Dauerkultur-Lösung	66,7 % (V/V) NI-Medium, 33,3 % (V/V) Glycerin 87 % (m/V)	Eigenherstellung

---

Bezeichnung	Zusammensetzung	Hersteller o. Lieferant
LB-Agar-Nährboden	nach Herstellerangaben	Carl Roth
LB-Medium	nach Herstellerangaben	Carl Roth
M9-Minimalnährböden	47,75 mM Dinatriumhydrogenphosphat; 22,04 mM Kaliumdihydrogenphosphat; 8,56 mM Natriumchlorid; 18,7 mM Ammoniumchlorid; 2 mM Magnesiumsulfat; 0,1 mM Calciumchlorid; 0,4 % (m/V) Glucose; 1,5 % (m/V) Agar-Agar	Eigenherstellung
MH-Bouillon	nach Herstellerangaben	Difco
MH-Agar-Nährböden	1,5 % (m/V) Agar-Agar in MH-Bouillon	Eigenherstellung
SOC-Medium	0,5 % (m/V) Hefeextrakt; 2 % (m/V) Trypton; 10 mM Natriumchlorid; 2,5 mM Kaliumchlorid; 10 mM Magnesiumchlorid; 10 mM Magnesiumsulfat; 20 mM Glucose	Eigenherstellung
Standard NI-Medium	nach Herstellerangaben	Carl Roth

## 2.9 Oligonukleotide

Oligonukleotide wurden von der Firma Invitrogen in HPLC-gereinigter Form bezogen. Tabelle 2–13 listet die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide bzw. Primer mit ihrer Bezeichnung sowie ihrer Sequenz auf. In den weiteren Kapiteln wird stets auf eine systematische Bezeichnung der Oligonukleotide zurückgegriffen, die das Zielgen, den Abstand zum Zielgen sowie ggf. eine nähere Eingrenzung der zieltragenden Umgebung (Spezies, Plasmid u.a.) berücksichtigt. Die Nomenklatur erfolgt nach folgendem Schema:

Zielgen\_Bindestelle\_Orientierung\_Eingrenzung

Die Bindestelle des Primers ergibt sich aus dem Abstand zwischen dem A des Startcodons des Gens (entspricht Position +1) und der darauf bezogenen Bindepotion der ersten 5'-Base des Oligonukleotids (d.h., bindet sie bspw. eine Base vor dem A des Startcodons, wäre die Bindestelle -1, wäre sie zwei Basen hinter dem A des Startcodons, also bei dem G des ATG, wäre sie +3). Die Orientierung (angegeben als „fw“ oder „rev“) ergibt sich aus der Bindung des Oligonukleotids am direkten oder komplementären Strang des Zielgens.

Da diese systematische Nomenklatur auch bei solchen Oligonukleotiden verwendet wurde, die aus Publikationen übernommen wurden, wird folglich nicht die Bezeichnung aus der Publikation verwendet. In Tabelle 2–13 sind jedoch beide Bezeichnungen aufgeführt, um insbesondere noch einmal kenntlich zu machen, dass solche Primer nicht Produkt dieser Arbeit, sondern anderer Autoren sind.

Tabelle 2–13: verwendete Oligonukleotide

Bezeichnung	Bez. lt. Literatur	Sequenz (5' → 3')	Quelle
aac(6')-Ib +1 fw		ATG ACT GAG CAT GAC CTT GC	N. Emrich
aac(6')-Ib +66 fw		GGG CGG AGA AGA AGC AC	T. Lippert
aac(6')-Ib +201 rev		AAC GTA CGA CTG GGC ATA CCC AAT CCG CT	N. Emrich
aac(6')-Ib +519 rev		TTA GGC ATC ACT GCG TGT TC	N. Emrich
aac6'(Ib) + 20 rev		GCA AGG TCA TGC TCA GTC AT	diese Arbeit
aacA +1131 rev pBP507		GCT TCC ATA GAT ACC TTG TGC G	diese Arbeit
aadA1 +25 fw		GTA TCG ACT CAA CTA TCA GAG G	diese Arbeit
aadA1 +361 rev		TAC CTG CAA GAA TGT CAT TGC G	diese Arbeit
aadA1 +46 rev		CCT CTG ATA GTT GAG TCG ATA C	diese Arbeit
aadB -923 fw pBP507		TCT GTA ACA TCA TTG GCA ACG C	diese Arbeit
ampD +1 fw E.cloacae	AmpDF	ATG TTG TTA GAA AAC GGA TG	[147]
ampD +1144 rev E.cloacae		CGT GCA GGA TSG CAT CAA TG	diese Arbeit
ampD +178 rev E.cloacae		CAT CGG GAT CTA TCG TTC C	diese Arbeit
ampD +505 fw E.cloacae		TTT GAC TGG TCC CGG TTT CA	diese Arbeit

Tabelle 2–13 Fortsetzung

Bezeichnung	Bez. lt. Literatur	Sequenz (5' → 3')	Quelle
ampD +564 rev E.cloacae	ampDB	TCA TGT TAT CTC CTT ATC TG	[147]
ampD -374 fw E.cloacae		TCA CCG TCT TCA ACR TGC CA	diese Arbeit
aphA15 + 247 fw	aphA15-F	GTC TCG ACT TCA ACT GTC A	[148]
blaACC +212 fw	ACCMF	AAC AGC CTC AGC AGC CGG TTA	[149]
blaACC +557 rev	ACCMR	TTC GCC GCA ATC ATC CCT AGC	[149]
blaCTX-M +211 fw	CTX-MU1	ATG TGC AGY ACC AGT AAR GT	[150]
blaCTX-M +803 rev	CTX-MU2	TGG GTR AAR TAR GTS ACC AGA	[150]
blaDHA +258 fw	DHAMF	AAC TTT CAC AGG TGT GCT GGG T	[149]
blaDHA +662 rev	DHAMR	CCG TAC GCA TAC TGG CTT TGC	[149]
blaFOX +775 fw	FOXMF	AAC ATG GGG TAT CAG GGA GAT G	[149]
blaFOX +964 rev	FOXMR	CAA AGC GCG TAA CCG GAT TGG	[149]
blaGES +1 fw	GES-1A	ATG CGC TTC ATT CAC GCA C	[151]
blaGES +864 rev	GES-1B	CTA TTT GTC CGT GCT CAG G	[151]
blaGIM +191 fw	Gim-F	TCG ACA CAC CTT GGT CTG AA	[152]

Tabelle 2–13 Fortsetzung

Bezeichnung	Bez. lt. Literatur	Sequenz (5' → 3')	Quelle
blaGIM +667 rev	Gim-R	AAC TTC CAA CTT TGC CAT GC	[152]
blaIMP +307 fw	Imp-F	GGA ATA GAG TGG CTT AAY TCT C	[152]
blaIMP +495 rev	Imp-R	CCA AAC YAC TAS GTT ATCT	[152]
blaKPC +1 fw	KPC forward	ATG TCA CTG TAT CGC CGT CT	[153]
blaKPC +893 rev	KPC reverse	TTT TCA GAG CCT TAC TGC CC	[153]
blaLAT/CMY/BIL +337 fw	CITMF	TGG CCA GAA CTG ACA GGC AAA	[149]
blaLAT/CMY/BIL +798 rev	CITMR	TTT CTC CTG AAC GTG GCT GGC	[149]
blaMIR/ACT +188 fw	EBCMF	TCG GTA AAG CCG ATG TTG CCG	[149]
blaMIR/ACT +489 rev	EBCMR	CTT CCA CTG CCG CTG CCA GTT	[149]
blaMOX/CMY +126 fw	MOXMF	GCT GCT CAA GGA GCA CAG GAT	[149]
blaMOX/CMY +645 rev	MOXMR	CAC ATT GAC ATA GGT GTG GTG C	[149]
blaNDM-1 +117 fw	NDM-1-F	GGA AAC TGG CGA CCA ACG	[154]
blaNDM-1 +794 rev	NDM-1-R	ATG CGG GCC GTA TGA GTG A	[154]
blaOXA-1 +8 fw	OXA-1F	ACA CAA TAC ATA TCA ACT TCG C	[155]

Tabelle 2–13 Fortsetzung

Bezeichnung	Bez. lt. Literatur	Sequenz (5' → 3')	Quelle
blaOXA-1 +821 rev	OXA-1R	AGT GTG TTT AGA ATG GTG ATC	[155]
blaOXA-10 +123 fw	OXA-10F	CGT GCT TTG TAA AAG TAG CAG	[155]
blaOXA-10 +774 rev	OXA-10R	CAT GAT TTT GGT GGG AAT GG	[155]
blaOXA-2 +113 fw	OXA-2F	TTC AAG CCA AAG GCA CGA TAG	[155]
blaOXA-2 +815 rev	OXA-2R	TCC GAG TTG ACT GCC GGG TTG	[155]
blaOXA-47 +211 fw	OXA-1A	TCA ACT TTC AAG ATC GCA	[93]
blaOXA-47 +820 rev	OXA-1B	GTG TGT TTA GAA TGG TGA	[93]
blaOXA-48 +31 fw	OXA-48A	TTG GTG GCA TCG ATT ATC GG	[93]
blaOXA-48 +774 rev	OXA-48B	GAG CAC TTC TTT TGT GAT GGC	[93]
blaOXA-48 +913 rev		CCT AAC CGA TTA AGT ATG AGC C	diese Arbeit
blaOXA-9 +34 fw	OXA-9A	TTC GTT TCC GCC ACT CTC CC	[93]
blaOXA-9 +794 rev	OXA-9B	ACG AGA ATA TCC TCT CGT GC	[93]
blaSHV +11 fw	SHV duplex PCR-F	TTC GCC TGT GTA TTA TCT CCC	B. Timmerbeil
blaSHV +756 rev	SHV duplex PCR-R	CTC TGC TTT GTT ATT CGG GC	B. Timmerbeil

Tabelle 2–13 Fortsetzung

Bezeichnung	Bez. lt. Literatur	Sequenz (5' → 3')	Quelle
blaSIM +127 fw	Sim-F	TAC AAG GGA TTC GGC ATC G	[152]
blaSIM +697 rev	Sim-R	TAA TGG CCT GTT CCC ATG TG	[152]
blaSPM +239 fw	Spm-F	AAA ATC TGG GTA CGC AAA CG	[152]
blaSPM +509 rev	Spm-R	ACA TTA TCC GCT GGA ACA GG	[152]
blaTEM +16 fw	TEM duplex PCR-F	TTT CGT GTC GCC CTT ATT CCC	B. Timmerbeil
blaTEM +853 rev	TEM duplex PCR-R	GCT TAA TCA GTG AGG CAC CT	B. Timmerbeil
blaVIM +151 fw	Vim-F	GAT GGT GTT TGG TCG CAT A	[152]
blaVIM +540 rev	Vim-R	CGA ATG CGC AGC ACC AG	[152]
intI -40 rev Integrons	5'-CS	GGC ATC CAA GCA GCA AG	[106]
ISKpn14 +97 fw		TGA AGG CGT GAT GCG TAA TGG	diese Arbeit
ISKpn14 +610 rev		AAC GCT TAC TGA TGA CGT GC	diese Arbeit
lacZ -343 fw pBluescriptII	A1161 (BgIII-Site entfernt)	CAC ATG TTC TTT CCT GCG	[156]
ompK35 +1 fw K.pneum.		ATG ATG AAG CGC AAT ATT CTG	diese Arbeit
ompK35 +1080 rev K.pneum.		TTA GAA CTG GTA AAC GAT ACC C	diese Arbeit

Tabelle 2–13 Fortsetzung

Bezeichnung	Bez. lt. Literatur	Sequenz (5' → 3')	Quelle
ompK35 +1227 rev K.pneum.		CAG GTT AAC GGG AGA ATA ACG	diese Arbeit
ompK35 +182 rev K.pneum.		ATA CGG GCA TAG GTG GTA TCG	diese Arbeit
ompK35 -112 fw K.pneum.		ATG CCT TCA GAC ACC AAA CTC	diese Arbeit
ompK35 -664 fw K.pneum.	ompK35-R	TTA CGT CAC CGG CGT GCA GAA	[51]
ompK36 +1 fw K.pneum.		ATG AAA GTT AAA GTA CTG TCC	diese Arbeit
ompK36 +105 rev K.pneum.		GTA CAG GTC TAA TTT GTT GC	diese Arbeit
ompK36 +1098 rev K.pneum.		TTA GAA CTG GTA AAC CAG GC	diese Arbeit
ompK36 +1198 rev K.pneum.		TCG AGG CTC CTC TTA CCA G	diese Arbeit
ompK36 +880 fw K.pneum.		GCT TAC CTG CAG TCT AAA GGT	diese Arbeit
ompK36 -253 rev K.pneum.		TCA AAG TGA TAG ACG ACA GC	diese Arbeit
ompK36 -345 fw K.pneum.		AGT TAA TGA TGA TAG CGA CT	diese Arbeit
ompK36 -811 fw K.pneum.	ompK36/omp36-R	TGA TGT TGC CGG GGA TCA GGG A	[51]
ompK36 -82 fw K.pneum		TGA AAT AGC CGA CTG ATT AG	diese Arbeit
qacEΔ1 -53 rev Integrans	3'-CS	AAG CAG ACT TGA CCT GA	[106]

Tabelle 2–13 Fortsetzung

Bezeichnung	Bez. lt. Literatur	Sequenz (5' → 3')	Quelle
qnrA +24 fw		TCA GCA AGA GGA TTT CTC A	[157, 158]
qnrA +650 rev		GGC AGC ACT ATG ACT CCC A	[157, 158]
qnrB +1 fw		ATG WYG YCA TTA CTG TAT	N. Emrich
qnrB + 681 rev		YTA RCC MAT VAY MGC GAT RCC	N. Emrich
qnrS +1 fw		ATG GAA ACC TAC MRT CAY ACA	N. Emrich
qnrS +657 rev		YTA GTC AGG AWA AAC AAC AAT	N. Emrich
Sall-ampD +1145 rev E.cloacae		GAA GTC GAC GAC GTG CAG GAT SGC ATC AAT G	diese Arbeit
Sall-ampD -135 fw E.cloacae		GTG GTC GAC TCA CCG TCT TCA ACR TGC CA	diese Arbeit
tnpA +1146 rev IS1999	IS1999A	CAG CAA TTC TTT CTC CGT G	[93]
tnpA +162 fw IS1999	IS1999B1	CAA GCA CAA CAT CAA GCG C	[93]
tnpA +66 rev IS1999	IS1999B2INV	TCG TTT TAG GTG AAG TTC TGG	[159]

Tabelle 2–14 listet die beim PyroSequencing<sup>®</sup> der QRDR der 8 *E. cloacae*-Isolate verwendeten Oligonukleotide auf.

Tabelle 2–14: PyroSequencing<sup>®</sup>-Primer

Bezeichnung	Sequenz (5' → 3')	Quelle
gyrA Gram neg 5' +211	GGT GAC GTH ATC GGT AAA TAT CA	Antje Schnasse
gyrA Gram neg 3' +329	Biotin - CCG AAG TTA CCC TGN CCA TCH A	Antje Schnasse
5' gyrA MPC Seq +222	CGG TAA ATA CCA TCC CCA	Dr. Anke Heisig

## 2.10 Größenmarker

Die folgende Tabelle listet sämtliche Größenmarker auf, die in dieser Arbeit bei elektrophoretischen Trennungen mitgeführt wurden.

Tabelle 2–15: verwendete Größenmarker

DNA-Größenmarker	Hersteller
100 bp DNA Ladder	NEB
FastRuler Middle Range DNA Ladder	Fermentas
λ DNA- <i>Hind</i> III Digest ( <i>Hind</i> III-gespaltene λ-DNA)	NEB
GeneRuler DNA Ladder 1 kb	Fermentas
GeneRuler High Range	Fermentas
O'GeneRuler 100 bp plus	Fermentas
O'GeneRuler 1 kb DNA Ladder Plus	Fermentas
O'GeneRuler DNA Ladder Mix	Fermentas
Quick-Load 100 bp DNA Ladder	NEB
SmartLadder	Eurogentec
PFGE-Größenmarker	Hersteller
λ-Ladder PFG	NEB
MidRange PFG Marker I	NEB
Protein-Größenmarker	Hersteller
PageRuler Unstained Protein Ladder	Fermentas
Spectra Multi-color High Range Protein Ladder	Fermentas

## 2.11 Laborgeräte und Verbrauchsmaterialien

### 2.11.1 Laborgeräte

In Tabelle 2–16 sind die Laborgeräte aufgelistet, die in dieser Arbeit zum Einsatz kamen.

Tabelle 2–16: verwendete Laborgeräte

Gerät	Typ/en	Hersteller o. Vertrieb
Analysenwaage	LA120S	Sartorius
Autoklaven	Systec VX-95, Systec 3870 ELV, Systec mediaprep	Systec
Brutschränke	Heraeus function line B12, B20	Heraeus
Elektrophoresekammern f. Agarose-Gelelektrophorese	ComPhor Midi / Maxi	Biozym
Elektrophoresekammer f. SDS-PAGE	Multigel-Long G47	Biometra
Elektroporationsgerät	Gene Pulser II, Pulse Controller II	Bio-Rad Laboratories
IEF-Elektrophoresekammer	Mini-PROTEAN® 3	Bio-Rad Laboratories
IEF-Spannungsgeber	PowerPac™ 1000	Bio-Rad Laboratories
Kolbenhubpipetten	LABMATE	Abimed
Laborwaagen	laboratory L220S	Sartorius
	PLJ 2100-2M	Kern & Sohn
Mikrospritze	Hamilton Microliter Syringe	Hamilton Bonaduz
Muli-Kolbenhubpipetten	Transferpette-8 /-12	Brand
Multistep-Pipette	labopette electronic 50-1000 µl	Hirschmann Laborgeräte
pH-Meter	inoLab pH Level 1	WTW
PFGE-System	Chef-DR® III System	Bio-Rad Laboratories
PyroSequencing®-System	PSQ 96MA	QIAGEN
Spannungsgeber f. Agarose-Gelelektrophorese / SDS-PAGE	Model PS304 Power Supply	Biometra
Sequenzierautomat	GenomeLab™ GeXP Genetic Analysis System	Beckman Coulter
Schüttelinkubatoren	C25 Incubator Shaker Classic Series	New Brunswick Scientific
	Certomat H	B. Braun

## Material

Gerät	Typ/en	Hersteller o. Vertrieb
Schütteltisch	Unimax 2010	Heidolph Instruments
Schüttelwasserbad	Julabo Shake Temp SW22	Julabo Labortechnik
Sicherheitswerkbank	HERA guard	Heraeus
Sterilisator	k.A.	Heraeus
Sterilwerkbank	HERA safe	Heraeus
Thermocycler	T personal, T gradient, T3 Thermocycler	Biometra
Tischzentrifuge	MC_6 centrifuge	Sarstedt
Ultraschallstab	Bandelin Sonopuls UW mini20 u. Sonotrode MS 2.5	Bandelin
UV/Vis-Photometer	NanoDrop 1000 Spectralphotometer	ThermoFisher
	Cary 50 Bio	Varian
Videodokumentationsanlagen	BioDoc Analyze Ti5	Biometra
	Biovision 1500/ 3M	Vilber
Vortexer	Vortex-Genie 2	Scientific Industries
Wasseraufbereitungsanlagen	Milli-Q Synthesis; RiOs™ 5	Millipore
Wasserbad	MWB	Julabo Labortechnik
Zentrifugen	Biofuge fresco, stratos, pico	Heraeus
	Microfuge 16	Beckman Coulter

### 2.11.2 Verbrauchsmaterialien

Neben typischer Laborausrüstung wie Pinzetten, Glasgeräten etc., fanden die in Tabelle 2–17 aufgeführten Verbrauchsmaterialien Verwendung.

Tabelle 2–17: verwendete Verbrauchsmaterialien

Gegenstand	Marke / Bezeichnung	Hersteller o. Lieferant
Blotting-Papier	Gel Blot Papier GB003, 15 x 20 cm	Schleicher & Schuell
Kanülen	Neolus	Terumo
Kryoröhrchen	CryoPure 1,8 ml u. Codierplättchen	Sarstedt
Küvetten, Elektroporation	2mm Electroporation Cuvette	Eurogentec
Küvetten, PS	Einmal-Küvetten	Brand
Mikrotiterplatten	Mikrotiterplatten U-Form u. Klebefolien	VWR
Parafilm	Parafilm „M“	Peske

Gegenstand	Marke / Bezeichnung	Hersteller o. Lieferant
Petrischalen, Kunststoff	Petrischalen mit Nocken, 92 x 16 mm	Sarstedt
Pipettenspitzen	10 µl; 20 µl; 200 µl; 1000 µl	Sarstedt
Pipettenspitzen zum Gel-Stanzen	Bandenpicker-Spitzen, 6,5 x 1 mm	biostep
Reaktionsgefäße	Reagiergefäße (0,2 ml; 0,5 ml; 1,5 ml; 2 ml)	Sarstedt
Filterpapier, rund	S&S Rundfilter 595, Ø 70 mm	Schleicher & Schuell
Schraubgefäße	Schraubröhren 15 ml; 50 ml (Spitz- und Flachboden)	Sarstedt
Spritzen	Omnifix (20 ml; 10 ml; 5 ml)	B. Braun/ VWR
Sterilfilter	Minisart Sterilfilter 0,2 µm	Sartorius

### 2.11.3 Kits

Tabelle 2–18 führt kommerziell erhältliche Kits auf, welche in dieser Arbeit genutzt wurden.

Tabelle 2–18: verwendete, kommerzielle Kits

Bezeichnung	Hersteller
GenomeLab™ DTCS Quick Start Kit	Beckman Coulter
Hi Yield® Kit	SLG
NucleoBond® Xtra Midi	Macherey-Nagel
Plasmid Midi Kit	QIAGEN
NucleoSpin® Extract II	Macherey-Nagel

### 2.12 Software

Folgende Tabelle enthält die verwendete Software.

Tabelle 2–19: verwendete Software

Gebiet	Software	Hersteller
Bildbearbeitung	Paint	Microsoft
	Picture Manager	Microsoft
Bioinformatik	ChemSketch 12.01	Advanced Chemistry Development (ACD)
	UCSF Chimera 1.5.3	Resource for Biocomputing, Visualization, and Informatics (RBVI)
	Vector NTI Advance 11	Invitrogen

## Material

---

<b>Gebiet</b>	<b>Software</b>	<b>Hersteller</b>
Datenverarbeitung	Excel 2010	Microsoft
Literaturverwaltung	EndNote X4	Thomson Reuters
Textverarbeitung	Word 2010	Microsoft

---

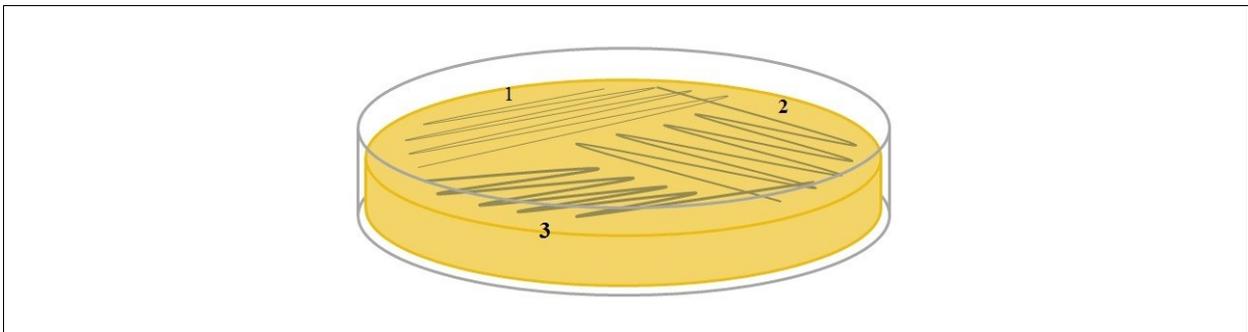
## 3 Methoden

### 3.1 Methoden der Mikrobiologie

Alle mikrobiologischen Methoden wurden unter Benutzung steriler Materialien und Nährlösungen sowie unter sterilen Bedingungen durchgeführt, d.h. mindestens in unmittelbarer Nähe zu einer Bunsenbrennerflamme.

#### 3.1.1 Picken von Kolonien, Überimpfen, Dreiösenausstrich

Einzelne Bakterien-Kolonien wurden mit der Hilfe steriler Glasstäbe, steriler Zahnstocher oder steriler Pipettenspitzen von Nährböden abgenommen. Wurden sie auf einen anderen Nährboden übertragen, erfolgte die Überimpfung entweder nach Art des Dreiösenausstrichs (mit Glasstäben), oder punktuell durch Antippen mit der Spitze (mit Zahnstochern bzw. Pipettenspitzen).



**Abbildung 3–1: Dreiösenausstrich.** Eine bei Ausstrich 1 mit einem Glasstab verteilte Bakterienkolonie wird bei den beiden weiteren Ausstrichen weiter ausgedünnt. Hier kamen entsprechend jeweils neue, sterile Glasstäbe zum Einsatz. Die Technik dient dem Vereinzeln von Kolonien.

Das Beimpfen eines flüssigen Nährmediums erfolgte durch suspendieren einer mit einem Glasstab abgenommenen Bakterienkolonie. Das Überimpfen von einer flüssigen Kultur zu einem flüssigen Nährmedium erfolgte durch Pipettieren.

#### 3.1.2 Herstellung und Verwendung von Dauerkulturen (Glycerinkulturen)

Glycerinkulturen dienen der langfristigen Lagerung von Bakterienkulturen. Durch das Glycerin in der Kulturlösung (vgl. Kapitel 2.8, S. 83) ist dies bei  $-80\text{ °C}$  möglich, ohne dabei einen wesentlichen Teil der Bakterien abzutöten. Die Kulturen enthalten farb- und hitzestabile

Bastelperlen, auf denen die betreffenden Bakterien einen Biofilm ausbilden.

Für die Herstellung einer Glycerinkultur wurde eine Kolonie des zu konservierenden Bakteriums mit einem sterilen Glasstab vom betreffenden Nährboden abgenommen und in der vorbereiteten Kulturlösung suspendiert. Das Kryoröhrchen wurde für 30 min ruhen gelassen und dann die überstehende Kulturlösung mit einer Kolbenhubpipette abgenommen. Das Röhrchen konnte nun verschlossen eingefroren werden.

Für die Rekultivierung wurde eine einzelne Perle aus dem kalten Röhrchen mit einer sterilen Impföse entnommen und auf einem Nährboden ausgestrichen. Der Nährboden wurde dann bei 37 °C über Nacht in einem Brutschrank inkubiert.

Die Herstellung einer Dauerkultur sowie das Rekultivieren wurden stets unter einer Sicherheitswerkbank durchgeführt.

### **3.1.3 Herstellung von Übernachtskulturen**

Übernachtskulturen (ÜNK) waren, wenn in dieser Arbeit nicht explizit anders erwähnt, sterile Kultur-Glasröhrchen mit 3 ml sterilem LB-Medium, verschlossen mit steriler Aluminium-Steckkappe, welche jeweils mit der Kolonie eines Bakteriums beimpft wurden. Die beimpften Nährlösungen wurden dann über Nacht (d.h. für 14 bis 16 h) auf einem Schüttelinkubator bei 37 °C und 130 U/min inkubiert.

### **3.1.4 Bestimmung von MHK-Werten**

Das Vorgehen zur Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration (MHK) einer bestimmten Substanz für ein bestimmtes Bakterium ist normiert durch die Richtlinien des CLSI (vormals NCCLS) der USA. Sie basiert auf einem Mikrobouillon-Dilutionsverfahren.

Die zu testende Substanz wurde in eine Mikrotiterplatte eingebracht, üblicherweise als quadratische Verdünnungsreihe in Mueller-Hinton-Bouillon. Pro Bakterium enthielt eine Vertiefung ausschließlich das Bouillon und keine Substanz.

Ausgehend von einer Übernachtskultur oder einem frisch beimpften und über Nacht in einem Brutschrank inkubierten Agar-Nährboden wurde eine auf eine definierte optische Dichte (McFarland 0,5) eingestellte Bakteriensuspension erzeugt. Dazu wurde die betreffende Kultur bzw. Kolonie steril in isotonischer Natriumchlorid-Lösung eingebracht, ggf. suspendiert und dann zu 1 ml am UV/Vis-Photometer bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 550 \text{ nm}$  vermessen. Zur NullwertEinstellung diente isotonische Natriumchlorid-Lösung. Die Suspension wurde dann

---

auf eine optische Dichte von  $0,125 \pm 0,020$  eingestellt. Dies erfolgte bei zu niedriger OD durch Zugabe von weiteren Kolonien mit anschließender Suspendierung bzw. weiterer Übernachtskultur (wobei ein Einfluss auf die  $OD_{550}$  durch Eintrag von Nährmedium vernachlässigt wurde) und bei zu hoher OD durch Verdünnung mit steriler, isotonischer Natriumchlorid-Lösung.

Alternativ kann die Einstellung nicht-instrumental gegen einen McFarland-Standard erfolgen. Dieser ist eine gesättigte Lösung von Bariumsulfat, deren Eigentrübung der anzustrebenden Trübung der Bakteriensuspension entspricht. Höher und niedriger konzentrierte, übersättigte Lösungen von Bariumsulfat erleichtern den Vergleich. In dieser Doktorarbeit wurde stets das Verfahren mit dem Photometer benutzt.

Die so eingestellten Suspensionen enthielten ca.  $10^5$  Bakterienzellen und mussten innerhalb der nächsten 30 min nach Einstellung für die Beimpfung der vorbereiteten Mikrotiterplatte verwendet werden.

Dazu wurde die eingestellte Suspension 1:100 in Mueller-Hinton-Bouillon verdünnt und zur Beimpfung der Vertiefungen einer quadratischen Verdünnungsreihe plus Nullkontrolle benutzt.

Neben der Wachstumskontrolle in der antibiotikafreien Vertiefung war es bei der Bestimmung als weitere Kontrolle notwendig, einen Stamm mitzuführen, der eine bekannte MHK gegen die zu untersuchende Substanz aufwies. Für diesen Zweck gibt es charakterisierte Vergleichsstämme. In dieser Arbeit kam beispielsweise sehr häufig der Stamm *E. coli* ATCC 25922 zum Einsatz.

Der Sinn beider Kontrollen lag in einer Prüfung der zu Grunde gelegten experimentellen Parameter. Die Wachstumskontrolle zeigte die Vitalität sowie das Grundwachstum des Bakteriums, der Kontrollstamm die Wirksamkeit der Substanz.

Die beimpften Platten wurden entweder mit Klebefolie steril verschlossen oder durch Aufstellen weiterer Mikrotiterplatten abgedeckt. Sie wurden bei 37 °C in einen Brutschrank gestellt. Es sollten dabei nicht mehr als 5 Platten gestapelt werden, damit eine gleichmäßige Temperierung der Platten in vergleichbarer Zeit eintreten kann. Nach 18 bis 24 h wurden die Platten entnommen. Sie wurden auf ein Metallgestell abgelegt, welches unterhalb der so positionierten Platte über einen rotierbaren Kosmetikspiegel verfügt, der eine bequeme Beurteilung des Wachstums in den einzelnen Vertiefungen erlaubt. Die minimale Hemmkonzentration war bei einer Verdünnungsreihe und einem getesteten Bakterium bei derjenigen Vertiefung mit der kleinsten Substanzkonzentration festzumachen, in der kein

---

sichtbares Wachstum erfolgte.

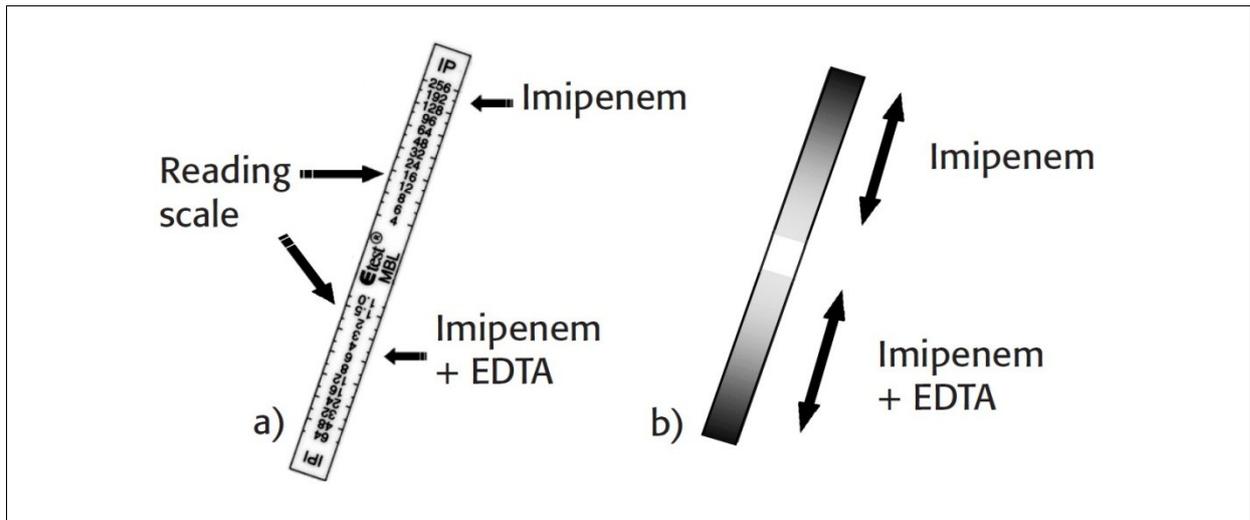
Die Methode der Bestimmung der MHK über die Mikrotiterplatte ist mit einer Unsicherheit von  $\pm 1$  Stufe behaftet. Daher wird beim Vergleich von Messwerten erst ein Abstand von  $\geq 2 \log_2$ -Verdünnungen als tatsächlicher Unterschied angesehen. Dies entspricht einem Quotienten beider Messwerte von  $\geq 4$  bzw.  $\leq 0,25$ .

Zuweilen kamen mit lyophilisierten Antibiotika fertig beschickte Mikrotiterplatten der Firma Merlin zum Einsatz. Das Vorgehen unterschied sich unwesentlich von dem oben aufgeführten. Die eingestellten Bakteriensuspensionen wurden hier 1:200 in MH-Bouillon verdünnt und jeweils zu 100  $\mu\text{l}$  in die trockenen Wells der Mikrotiterplatten gegeben. Es resultierten die jeweils vom Hersteller angegebenen Antibiotikakonzentrationen. Der Rest des Protokolls war identisch. Die Ergebnisse sind auf das oben angegebene Verfahren übertragbar.

### 3.1.5 Etest<sup>®</sup> MBL

Der Etest<sup>®</sup> (Epsilometertest) ist ein Verfahren zur Erfassung von Empfindlichkeiten von Bakterien gegen Antibiotika. Das System beruht auf einem permeablen Kunststoffstreifen, der ein Antibiotikum als Massen- bzw. Konzentrationsgradient enthält. Bringt man den Streifen auf einen Nährboden auf, der zuvor flächig mit einer Kultur des zu testenden Stammes beimpft wurde, diffundiert das betreffende Antibiotikum in den Nährboden. Die Diffusion bedingt ihrerseits einen Konzentrationsgradienten des Antibiotikums in Abhängigkeit vom Abstand zum Streifen sowie zur punktuellen Ausgangskonzentration des Antibiotikums. Nach Inkubation des so beschickten Nährbodens erfolgt ein Wachstum des zu testenden Stammes entsprechend seiner Empfindlichkeit nur bis zu jenen Konzentrationen des Antibiotikums, die ihm noch Wachstum erlauben, i.d.R. ergibt das einen mehr oder weniger großen, ellipsoiden Hemmhof um den Streifen. Der Stamm vermag irgendwo bis an den Streifen heranzuwachsen; die dort auf dem Streifen abzulesende Konzentration ist der Messwert.

Der Etest<sup>®</sup> MBL ist eine spezielle Variante zur Detektion von solchen Stämmen, die eine Metallo- $\beta$ -Lactamase bilden. Er bildet auf der einen Seite einen Konzentrationsgradienten von Imipenem (mit IP beschriftet) und auf der anderen Seite einen Konzentrationsgradienten von Imipenem + EDTA (mit IPI beschriftet), vgl. Abbildung 3–2.



**Abbildung 3–2: Konfiguration des Etest® MBL.** Aus [160]. a) Einteilung des Streifens, b) Konzentrationsgradienten auf dem Streifen (höhere Konzentration entspricht dunklerer Farbe).

Praktisch wurde von dem zu testenden Stamm, analog zum Vorgehen bei der Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration (s. Kapitel 3.1.1, S. 97), eine Suspension mit der Zellzahl von ca.  $10^5$  Bakterienzellen hergestellt. Die Suspension wurde mit Hilfe eines sterilen Wattestäbchens flächendeckend auf die Oberfläche eines LB-Nährbodens aufgetragen. Der Eteststreifen wurde steril mit einer Pinzette aus seiner Verpackung entnommen und mit der Unterseite nach unten (Beschriftung nach oben) mittig so auf dem Nährboden platziert, dass keine Luftblasen unter dem Streifen eingeschlossen wurden. Der so behandelte Nährboden wurde dann für 16 bis 18 h bei 37 °C in einem Brutschrank inkubiert. Anschließend erfolgte die Auswertung.

## 3.2 Methoden der Molekularbiologie

### 3.2.1 Isolation von genetischem Material

#### 3.2.1.1 Isolation von Gesamt-DNA mittels Koch-Methode

Drei Kolonien des betreffenden Bakteriums wurden mit einem sterilen Glasstab von einem frischen Nährboden abgenommen und in 100 µl Reinstwasser in einem 0,5 ml Reaktionsgefäß suspendiert. Das Reaktionsgefäß wurde dann in einem geeigneten Thermocycler für 15 min bei 99 °C erhitzt, anschließend wurde es für 5 min bei 13000 U/min zentrifugiert. Der Überstand, welcher nun einen wesentlichen Teil des gesamten genetischen Materials enthielt,

wurde in ein neues, steriles Reaktionsgefäß überführt. So gewonnene DNA diente als Template für PCRs.

### 3.2.1.2 Isolation und Profilierung von Plasmiden

In diesem Kapitel sind verschiedene Methoden zur Isolation und Profilierung von Plasmiden aufgeführt. Im Wesentlichen sind das Methoden, die ein Präparat liefern, mit dem sich in molekularbiologischer Hinsicht in verschiedenste Richtungen weiterarbeiten lässt. In dieser Arbeit war dies häufig das Erstellen von Plasmidprofilen. Bei der Erstellung eines Plasmidprofils werden die in einem Bakterium enthaltenen Plasmide visualisiert und ihre Anzahl sowie jeweilige Größe abgeschätzt. Dies gelingt relativ einfach durch Separierung der Bestandteile erzeugter Plasmid-DNA-Präparate mittels einer Agarose-Gelelektrophorese und der üblichen Dokumentation (vgl. Kapitel 3.2.6.1, S. 141ff).

Im Falle des S1-Mapping wurde dafür zusätzlich auf eine Variante der PFGE zurückgegriffen. Sie unterscheidet sich von den übrigen Methoden dadurch, dass ihr einziger Zweck die Profilierung ist, denn eine Isolation der Plasmide erfolgt nicht im eigentlichen Sinne.

#### 3.2.1.2.1 Alkalische Lyse

Die alkalische Lyse wurde von Birnboim und Doly entwickelt [161] und liefert in vergleichsweise kurzer Zeit ein Präparat mit einer Qualität, die für eine Plasmidprofilierung ebenso genügt wie für Restriktionsspaltungen mit Restriktionsenzymen. Sie basiert auf einem Zellaufschluss im Alkalischen, bei dem es unter diesen Bedingungen zu einer reversiblen Denaturierung der Plasmid-DNA kommt, während chromosomale DNA (wie auch diejenige sehr großer Plasmide) irreversibel denaturiert wird. Durch Neutralisierung und Zentrifugation kann die Plasmid-DNA im Überstand abgetrennt werden. Gegebenenfalls wird eine Protein-Extraktion mit Phenol / Chloroform / Isoamylalkohol angeschlossen. Eine abschließende Alkohol-Fällung dient der Reinigung und Aufkonzentrierung.

##### 3.2.1.2.1.1 Lyse der Zellen

Von einer ÜNK wurden 1,5 ml in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Die Bakterienzellen wurden abzentrifugiert (3 min bei 5000 g), der Überstand restlos abgenommen, verworfen und das verbliebene Pellet in 100 µl kaltem GTE-Puffer vollständig resuspendiert. Dabei war darauf zu achten, dass die Suspension optisch keine Zellagglomerate mehr enthält. Es wurden

---

200 µl Lysepuffer hinzugegeben. Das Reaktionsgefäß wurde sofort manuell geschüttelt und auf Eis gestellt. Innerhalb der folgenden 3 min wurden 150 µl kalter Neutralisationspuffer hinzugegeben. Das Reaktionsgefäß wurde unmittelbar nach der Zugabe durch Vortexen geschüttelt und dann für 5 min auf Eis gestellt. Danach wurden Zelltrümmer und chromosomale DNA durch Zentrifugation für 5 min bei 15000 U/min abgetrennt. 400 µl des erzeugten Überstandes wurden in ein neues Reaktionsgefäß überführt, ohne Teile des weißen Präzipitats zu verschleppen.

#### 3.2.1.2.1.2 Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Extraktion

Die Extraktion mit Phenol / Chloroform / Isoamylalkohol dient dem Entfernen gelöster Proteine, was insbesondere wegen noch eventuell enthaltener Nucleasen notwendig sein kann.

Dem Plasmid-DNA-Präparat wurde ein Volumen (hier 400 µl) einer fertigen, kommerziell erhältlichen Mischung von Phenol / Chloroform / Isoamylalkohol hinzugefügt. Die Mischung wurde gründlich geschüttelt, wobei eine optische Trübung entstand. Das Reaktionsgefäß wurde für 10 min bei 12000 g zentrifugiert, im Anschluss das Volumen der wässrigen Phase (oben) in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Bei diesem Schritt war das Verschleppen von organischem Lösungsmittel noch nicht kritisch, so dass hier üblicherweise 500 µl abgenommen wurden, um die gesamte wässrige Phase zu erfassen. Den 500 µl wurden abermals ein Volumen (500 µl) Phenol / Chloroform / Isoamylalkohol hinzugefügt, gut gemischt und zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde erneut in ein neues Reaktionsgefäß überführt, wobei ein wenig der wässrigen Phase zu Gunsten höherer Reinheit im Ausgangsgefäß belassen wurde. Die Überführung von 350 µl hatte sich hier als praktikabel erwiesen.

#### 3.2.1.2.1.3 Alkohol-Fällung der DNA

Für die Alkohol-Präzipitation der DNA wurden der Lösung zunächst zwei Volumina (d.h. 800 µl bzw. 700 µl, wenn die Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Extraktion durchgeführt wurde) absoluter Ethanol p.a. hinzugegeben und die Mischung für 2 min bei Raumtemperatur ruhen gelassen. Die Plasmid-DNA wurde durch Zentrifugation für 25 min bei 20000 U/min sedimentiert, der Überstand danach vorsichtig abgesaugt. Das (mit bloßem Auge nicht sichtbare) Pellet wurde durch Zugabe von 1 ml 70 % (V/V) Ethanol, Zentrifugation für 5 min bei 20000 U/min und vorsichtiges Absaugen des Überstandes gewaschen. Es wurde dann für

---

20 min bei 37 °C getrocknet und anschließend in 30 µl 1:10-verdünntem EB-Puffer gelöst. Die Lagerung der Plasmid-DNA-Präparate erfolgte bei -20 °C.

### 3.2.1.2.1.4 EPS-Minimierung

Angelehnt an das Vorgehen von Domenico et al. [162] wurden zuweilen Modifikationen dieses Protokolls vorgenommen, um die zum Teil starke Schleimbildung klinischer Isolate bestimmter Spezies der *Enterobacteriaceae* zu minimieren. Der Schleim besteht aus Exopolysacchariden bzw. Lipopolysacchariden und Kapselpolysacchariden, die die Qualität einer Präparation mittels alkalischer Lyse beeinträchtigen können.

Das gesamte Vorgehen umfasste die folgenden zwei Erweiterungen des Protokolls der alkalischen Lyse: erstens eine Modifikation der betreffenden ÜNK. Dieser wurden vor dem Beimpfen mit dem Stamm 15 µl einer sterilen Bismutnitrat-Stammlösung, 30 µl einer sterilen Natriumsalicylat-Stammlösung sowie 3 µl einer sterilen Eisen(III)-Stammlösung zugesetzt. Die Supplementierungen resultierten in Konzentrationen von ca. 0,5 mM Bismutnitrat, 2,5 mM Natriumsalicylat und 15 µM Fe<sup>3+</sup>. Bismutnitrat und Salicylat sollen die Schleimbildung inhibieren, während das Eisen einen negativen Einfluss des Bismuts auf das Bakterienwachstum ausgleichen soll. Zweitens erfolgte eine Vorbehandlung der Zellen der bewachsenen ÜNK. Zunächst wurde 1 ml der Bakterienkultur in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und 10 µl einer sterilen EDTA-Stammlösung hinzugegeben (resultierend in  $c_{\text{EDTA}} = 5 \text{ mM}$ ). Das Gefäß wurde gevortext und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Das EDTA soll Bismut und LPS sowie andere oberflächliche Zellkomponenten entfernen. Das Gefäß wurde dann für 2 min bei 8000 U/min zentrifugiert, der Überstand anschließend vorsichtig, aber gründlich entfernt und das Pellet in 975 µl isotonischer Natriumchlorid-Lösung resuspendiert. Es wurden 25 µl (bei sehr stark schleimenden Stämmen 50 µl) saure, zwitterionische Detergens-Lösung hinzugegeben, vorsichtig gemischt und für 10 min bei 37 °C inkubiert. Das Detergens diene dem Entfernen von Kapselpolysacchariden, LPS und Proteinen. Die Suspension wurde abermals für 2 min bei 8000 U/min zentrifugiert und der Überstand gründlich entfernt. Das resultierende Pellet wurde dem Protokoll der alkalischen Lyse zugeführt (Resuspension in GTE-Puffer).

### 3.2.1.2.2 Methode nach Kado & Liu

Die Plasmidisolierung nach Kado & Liu [163] ist eine mit der alkalischen Lyse verwandte Methode und bekannt dafür, auch größere Plasmide mit zu erfassen. Sie wurde hier in einer durch Toranzo et al. [164] modifizierten Variante durchgeführt.

1 ml einer ÜNK (späte exponentielle Wachstumsphase) wurde in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Das Reaktionsgefäß wurde dann für 3 min bei 12000 g zentrifugiert und der resultierende Überstand verworfen. Das verbliebene Pellet wurde in 50 bis 75 µl Lysing Solution resuspendiert, die Suspension sodann für 45 min bei 55 bis 60 °C im Wasserbad erhitzt. Darauf folgte die Zugabe eines identischen Volumens einer 1:1-Mischung von Phenol-Chloroform mit anschließender Zentrifugation für 10 min bei 12000 g. Die obere, wässrige Phase wurde in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Handelte es sich bei dem verwendeten Stamm um ein Bakterium, welches vermehrt Exopolysaccharide bildete, war bei diesem Schritt Fingerspitzengefühl gefragt, denn die wässrige Phase konnte hier enorm viskos und damit schwierig zu pipettieren sein. Es empfiehlt sich hier ggf. der Verzicht auf Volumen zu Gunsten einer verminderten Viskosität. Die überführte, wässrige Phase wurde bei -20 °C eingefroren oder direkt für eine Agarose-Gelelektrophorese verwendet. Dabei wurden 10 bis 20 µl des Plasmid-DNA-Präparats aufgetragen.

Die entsprechenden Agarose-Gelelektrophoresen erfolgten mit 0,5x TAE-Puffer im Gel und als Laufpuffer. Verwendet wurde ein aus 400 bis 450 ml 0,5 %iger Agarose bestehendes Gel in der ComPhor Maxi-Kammer der Firma Biozym. Die Elektrophorese erfolgte über Nacht bei 1,5 V/cm; das im Ladepuffer enthaltene Xylencyanol sollte ca. ein Drittel der Gelstrecke gelaufen sein, wobei dann das gesamte Größenspektrum der durch diese Methode isolierten Plasmid-DNA sichtbar wurde. Alternativ kam die ComPhor Midi-Kammer der Firma Biozym zum Einsatz. Die Elektrophorese erfolgte hier, bis die Xylencyanol-Bande die Gelmitte erreicht hatte. Der sichtbare Bandenbereich erstreckte sich dann von ca. 10 kb bis 2 kb. Das Gel wurde nach Abschluss der Elektrophorese mit Ethidiumbromid nachgefärbt und dokumentiert.

### 3.2.1.2.3 Methode nach Crosa

Die Methode nach Crosa [165] stellt prinzipiell eine besonders schonende, alkalische Lyse dar und wird in der angegebenen Referenz als „lysis in solution“ bezeichnet. Sie vereine in sich die Vorteile verschiedener anderer Methoden, decke ein breites Größenspektrum bei den zu

---

isolierenden Plasmiden ab (Obergrenze seien ca. 525 kb) und sei sowohl für Gram-negative als auch Gram-positive Stämme geeignet.

Eine junge Kolonie des zu untersuchenden Stammes wurde benutzt, um 2 ml steriles LB-Medium zu beimpfen. Das beimpfte Medium wurde bei 130 U/min und 37 °C auf einem Schüttelinkubator über Nacht inkubiert. Am Folgetag wurde die Kultur in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt und für 10 min bei 2500 g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Das Pellet wurde in 2 ml TE-Puffer resuspendiert und erneut unter den gleichen Bedingungen zentrifugiert. Der Überstand wurde möglichst gründlich entfernt, das verbliebene Pellet vorsichtig durch Schwenken in 40 µl TE-Puffer resuspendiert. 600 µl frisch zubereiteter Lyse-Puffer wurde in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß vorgelegt und die 40 µl Bakteriensuspension hinzugegeben. Es wurde gründlich, jedoch ohne Hilfe von starken Bewegungen oder mechanischer Unterstützung gemischt. Die Mischung wurde für 30 min bei 37 °C in einem Brutschrank inkubiert, um die Zellen aufzulösen. Zur Neutralisation wurden 30 µl 2,0 M Tris-HCl (pH 7,0) hinzugegeben und das Reaktionsgefäß langsam so lange invertiert, bis eine Änderung der Viskosität wahrnehmbar war. Dann wurden direkt 240 µl 5 M Natriumchlorid-Lösung hinzugegeben und langsam invertiert. Das Reaktionsgefäß wurde für 4 h auf Eis gelagert, um chromosomale DNA zu präzipitieren.

Das Reaktionsgefäß wurde nach diesem Zeitraum für 10 min bei 16000 g zentrifugiert und der Überstand durch Gießen in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Ein auftretender Flüssigkeitsrückstand wurde im Sinne der Probenreinheit ignoriert. 550 µl absolutes Isopropanol wurden hinzugegeben und das Reaktionsgefäß vorsichtig invertiert. Das Gefäß wurde dann für 30 min bei -20 °C im Gefrierschrank gelagert, um die Plasmid-DNA zu präzipitieren. Dann wurde für 20 min bei 16000 g zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Das Pellet wurde durch Zugabe von 100 µl TE-Puffer (pH 8,0) gelöst und 200 µl Phenol / Chloroform / Isoamylalkohol hinzugegeben. Das Gefäß wurde vorsichtig invertiert und dann für 1 min bei 16000 g zentrifugiert. Die obere, wässrige Phase (ca. 85 µl) wurde unter Nutzung einer gekürzten Pipettenspitze in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Zwei Volumina (ca. 170 µl) eiskalter, absoluter Ethanol wurden hinzugegeben und für 20 min bei 16000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde vollständig abgesaugt und das verbliebene Pellet in 50 µl Reinstwasser aufgenommen. Zwecks möglichst vollständiger Lösung des Pellets wurde das Reaktionsgefäß dann vor weiterer Verwendung über Nacht bei 4 °C im Kühlschrank gelagert.

So erzeugte Präparate von Plasmid-DNA enthalten ggf. sehr große Plasmide. Bei einer Trennung dieser Präparate mittels Agarose-Gelelektrophorese wurde stets ein 0,5 %iges Agarosegel in 0,5x TAE-Puffer benutzt und nur minimale Spannung eingesetzt, um Trapping der Plasmide in den Probenaschen zu minimieren.

#### 3.2.1.2.4 S1-PFGE

Die in dieser Arbeit benutzte Methode basiert im Wesentlichen auf den durch B. Guerra modifizierten [166] Angaben von Barton et al. [167]. Die Funktion der S1 Nuclease wird in Kapitel 3.2.3.5 (S. 116ff) näher erläutert.

Das Vorgehen entspricht bis zum Vorverdau demjenigen einer Standard-PFGE, wie in Kapitel 3.2.6.2 ab S. 142 angegeben. An jener Stelle musste man hier nun mit der S1 Nuclease weiterarbeiten.

**Tag 3:** Schnitte anfertigen, Restriktionsverdau, PFGE, Detektion.

Vorab wurde ein Wasserbad auf 37 °C und ein Schüttelwasserbad auf 54 °C eingestellt, damit beide zeitnah die erforderliche Temperatur erreichten. Zur weiteren Vorbereitung wurden pro Probe (d.h. pro sämtliche Schnitte einer Kultur) 160 µl Reinstwasser und 40 µl S1 Nuclease-Puffer (5fach konzentriert) in 1,5 ml Reaktionsgefäße vorgelegt. Dabei wurde die Verdünnung insgesamt zu  $n + 1$  hergestellt, denn der Überschuss konnte im weiteren Verlauf benutzt werden, um das Enzym an sich zu verdünnen.

Nun wurden die Schnitte aus den Agarose-Blöckchen angefertigt. Das Vorgehen ist diesbezüglich identisch zu demjenigen im Protokoll der Standard-PFGE. Die angefertigten Schnitte einer Kultur wurden in die vorbereiteten Reaktionsgefäße gegeben und für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert (Vorverdau). In der Zwischenzeit wurde die eigentliche Spaltung mit S1 Nuclease vorbereitet. Pro Probe (d.h. auch hier alle Schnitte einer Kultur) wurden 100 µl des Ansatzes benötigt, der sich nach den Angaben in Tabelle 3–1 ergab:

Tabelle 3–1: Zusammensetzung des S1 Nuclease-Ansatzes

Komponente	V für n = 1	resultierende Konzentration im Ansatz
5fach konz. S1-Puffer	20 µl	1fach
verdünnte S1 Nuclease (10 U/µl)	0,8 µl	8 U pro Ansatz
Σ	20,8 µl	
Endvolumen	100 µl	
Reinstwasser	79,2 µl	

Die S1 Nuclease wurde vorher mit dem zuvor hergestellten, einfach konzentrierten S1 Nuclease-Puffer von 100 U/µl auf 10 U/µl verdünnt.

Nach Beendigung der Inkubationszeit wurde die Lösung des Vorverdaus vorsichtig abpipettiert, ohne die Schnitte mit abzusaugen, und durch jeweils 100 µl des vorbereiteten S1-Ansatzes ersetzt. Es folgte eine Inkubation für 45 min bei 37 °C im Wasserbad. Dieser Zeitraum wurde genutzt, um die PFGE-Kammer mit Elektrophorese-Puffer zu befüllen, den Kühlprozess zu starten sowie die Blöckchen-Agarose (vgl. PFGE-Protokoll) aufzukochen, bis sie eine klare Lösung ergab. Sie wurde dann im verschlossenen Gefäß bis zur Verwendung im Schüttelwasserbad bei 54 °C unter leichter Rotation gelagert.

Alle folgenden Schritte entsprachen wieder dem Standard-PFGE-Protokoll.

Die Pulsfeld-Parameter der S1-PFGE sind in Tabelle 3–2 angegeben.

Tabelle 3–2: S1-PFGE-Parameter

Peripherie		Pulsfeld-Elektrophorese				
Pumpe	T	t	E	Winkel	initial switch time	final switch time
80 %	14 °C	21 h	6 V/cm	120°	5 s	35 s

### 3.2.1.2.5 Kommerziell erhältliche Kits zur Isolation von Plasmid-DNA

Bezüglich der in dieser Arbeit verwendeten, kommerziellen Kits zur Isolation von Plasmid-DNA sei auf die jeweiligen Herstellerangaben verwiesen. Im Folgenden werden jeweils nur kurz die den Kits jeweils zu Grunde liegenden Prinzipien vorgestellt, die im Übrigen bei allen Kits sehr ähnlich sind.

#### 3.2.1.2.5.1 Hi Yield<sup>®</sup> Kit (SLG)

Das Hi Yield<sup>®</sup> Kit basiert auf einer modifizierten alkalischen Lyse mit anschließender Aufreinigung der Plasmid-DNA durch Zentrifugen-Säulchen mit Silicat-Matrix.

#### 3.2.1.2.5.2 NucleoBond<sup>®</sup> Xtra Midi-Kit (Macherey-Nagel)

Das NucleoBond<sup>®</sup> Xtra Midi-Kit nutzt eine alkalische Lyse. Dem schließt sich eine kombinierte Filterung der Lösung und Beladung auf eine auf Silicat basierende Anionentauschersäule an. Nach der Elution der DNA muss eine Alkohol-Präzipitation durchgeführt werden.

#### 3.2.1.2.5.3 Plasmid Midi Kit (QIAGEN)

Dieses Kit verwendet eine modifizierte, alkalische Lyse in Kombination mit Silicat-Anionentauschersäulen. Der Behandlung durch die Säule schließt sich eine Alkohol-Fällung an.

### 3.2.2 Aufreinigung von genetischem Material

#### 3.2.2.1 NucleoSpin<sup>®</sup> Extract II (Macherey-Nagel)

Dieses Kit erlaubt die Aufreinigung von PCR-Produkten (und anderen enzymatischen Ansätzen) sowie die DNA-Elution aus Agarose von präparativen Agarose-Gelelektrophoresen. Es basiert auf einem Durchwaschen von unerwünschten Komponenten durch ein Silicat-Zentrifugen-Säulchen, an dessen Matrix die aufzureinigende DNA unter bestimmten pH-Bedingungen adsorbiert. Im Falle der Elution aus Agarose musste diese zunächst in einem Puffer geschmolzen werden.

Bei der Benutzung wurden die Angaben des Herstellers befolgt. In dieser Arbeit kam das Kit überwiegend bei präparativen Agarose-Gelelektrophoresen zum Einsatz, wurde aber auch zum Entfernen kleiner DNA-Fragmente benutzt.

#### 3.2.2.2 Präparative Agarose-Gelelektrophorese

Die präparative Agarose-Gelelektrophorese ist eine Erweiterung der herkömmlichen Agarose-Gelelektrophorese, die das Auftrennen und visualisieren von DNA-Fragmenten zum Ziel hat.

---

Bei der präparativen Variante wird dem ein Extraktionsschritt angeschlossen: man schneidet eine oder mehrere bestimmte Banden und damit DNA-Fragmente aus einem Agarosegel aus, um sie somit von anderen Fragmenten zu isolieren.

Das Vorgehen entsprach demjenigen der herkömmlichen Agarose-Gelelektrophorese (vgl. Kapitel 3.2.6.1, S. 141ff). Zum Schluss wurde das Gel nach der Dokumentation in der Dokumentationsanlage belassen und unter UV-Bestrahlung eine oder mehrere Banden mit Hilfe eines Skalpells markiert. Da kurzwellige UV-Bestrahlung DNA-Moleküle auf Dauer schädigt, wurden diesbezüglich erforderliche Schritte auf ein zeitliches Minimum beschränkt. Die markierten Banden wurden daher ohne UV-Licht vollständig ausgeschnitten und jeweils in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt. Hier war es von besonderer Bedeutung, das Skalpell zwischen den Schnitten bei verschiedenen Banden zu reinigen, um Kreuzkontaminationen zu vermeiden. Nach dem Ausschneiden wurde das Gel abermals dokumentiert, um die Qualität des Ausschneidens begutachten zu können. Zuweilen kamen als Alternative zum Skalpell Einweg-Kunststoff-Hohlspitzen zum Einsatz, mit denen man Banden vergleichsweise leicht ausstanzen konnte. Die Gefahr einer Kreuzkontamination war dabei ausgeschlossen. Das Gelmaterial wurde dann einfach aus den Spitzen heraus in die Reaktionsgefäße geklopft.

Für die Extraktion der DNA aus dem Gelmaterial kam das Kit NucleoSpin<sup>®</sup> Extract II der Firma Macherey-Nagel zum Einsatz (vgl. Kapitel 3.2.2.1, S. 109).

### **3.2.3 Enzymatische Modifikation von DNA**

Enzymatische Modifikationen von DNA war zuweilen abseits der DNA-Vervielfältigung erforderlich. Dies umfasste Restriktionsspaltungen mit Restriktionsenzymen sowie molekularbiologische Schritte, die der Klonierung oder dem Ausschalten von Genen dienen.

#### **3.2.3.1 Behandlung mit Restriktionsenzymen**

Restriktionsenzyme erkennen bestimmte Sequenzen im DNA-Doppelstrang und katalysieren die Trennung im Sinne eines Schneidens solcher Stellen. Die Sequenzen sind üblicherweise palindromisch, ihre Länge variiert in Abhängigkeit vom eingesetzten Enzym. Bestimmte Enzyme sind etwas variabler was die Erkennungssequenzen angeht, andere sind hochspezifisch.

Die erzeugten Schnittenden können eine oder mehrere Basen am direkten oder

---

komplementären Strang überhängen (3'- bzw. 5'-Überhänge) oder glatt (blunt) sein. Auch dies ist spezifisch für das jeweilige Enzym.

Restriktionsspaltungen mit Restriktionsenzymen dienen hier dem Ausschneiden von DNA-Fragmenten für nachfolgende Prozesse sowie der Charakterisierung von DNA, in dem sie Produkte definierter und, bei bekannter DNA-Sequenz, vorhersagbarer Größe liefern. Bis auf zwei waren alle Restriktionsenzyme FastDigest®-Enzyme.

Tabelle 3–3: allgemeiner Restriktionsansatz mit FastDigest®-Enzymen (ab 3 µg DNA aufwärts wird der Ansatz linear hochskaliert; bei einem Doppelverdau wird das zweite Enzym in gleichem Volumen ergänzt und der Gesamtansatz entsprechend vergrößert)

Komponente	finale Konzentration im Ansatz bzw. zu ergänzendes Volumen	
	DNA	1 bis 2 µg
10x FastDigest®-Puffer	ergänzt zu einfacher Pufferkonzentration	ergänzt zu einfacher Pufferkonzentration
FastDigest®-Enzym	1 bzw. 2 µl	3 µl
Reinstwasser	ad 20 µl	ad 30 µl
<b>Bedingungen</b>	spezifisch	spezifisch

Die beiden konventionellen Restriktionsenzyme waren *AatII* und *PvuI*, die in einem Doppelverdau eingesetzt wurden. Beide Enzyme arbeiten in Tango™-Puffer (Fermentas), *PvuI* allerdings ein wenig schlechter, weshalb dieses Enzym in größerer Menge eingesetzt wurde.

Tabelle 3–4: Ansatz für Doppelverdau mit *AatII* und *PvuI*

Komponente	finale Konzentration im Ansatz bzw. zu ergänzendes Volumen
DNA	1 µg
10x Tango™-Puffer	ergänzt zu einfacher Pufferkonzentration
<i>AatII</i>	10 U
<i>PvuI</i>	20 U
Reinstwasser	ad 30 µl
<b>Bedingungen</b>	37 °C 16 h 80 °C 20 min

### 3.2.3.2 Erzeugung glatter DNA-Enden (Blunting)

Die Erzeugung glatter Enden kann nicht kompatibel, da verschiedenartig überhängende Enden von DNA-Doppelsträngen kompatibel für eine Ligation machen.

Dies kann entweder durch Abdauen der Basen des überhängenden Stranges oder durch Auffüllen des retenierenden Stranges geschehen. Das in dieser Arbeit für die Katalyse solcher Vorgänge verwendete Enzym war das Klenow Fragment, dem großen Fragment der DNA Polymerase I. Es hat die Fähigkeit, sowohl die Auffüllung 5'-überhängender Enden (Polymerase-Aktivität) als auch die Entfernung 3'-überhängender Enden (3'-Exonuclease-Aktivität) zu katalysieren. Für beide Fälle erfordert der entsprechende Ansatz den Zusatz von dNTPs.

Die Exonuclease-Aktivität wurde im Zuge des Ausschaltens eines Gens (Gen-Knockout) ausgenutzt, wobei ein Plasmid zuvor mit *AatII* und *PvuI* verdaut, somit linearisiert und um einen gewissen Abschnitt verkürzt wurde. Der verbliebene Teil sollte religiert werden. Da beide Enzyme aber nicht kompatibel, 3'-überhängende Enden lieferten, mussten diese hier zuvor geglättet werden (vgl. Kapitel 4.1.7.2.1, ab S. 195).

Die Polymerase-Aktivität wurde bei der Vorbereitung eines linearisierten Plasmids für die Aufnahme eines DNA-Abschnitts mit blunt-Enden ausgenutzt. Die Linearisierung erfolgte mit *XhoI*, was 5'-überhängende Enden lieferte. Diese wurden entsprechend aufgefüllt (vgl. Kapitel 4.2.8.1, ab S. 223).

Die folgende Tabelle gibt die gewählten Bedingungen für die Behandlung mit Klenow Fragment wieder.

Tabelle 3–5: Reaktionsbedingungen für Behandlung mit Klenow Fragment

Komponente	finale Konzentration im Ansatz bzw. zu ergänzendes Volumen	
	„Exo“-Ansatz	„Pol“-Ansatz
DNA aus Restriktionsansatz	140 fmol	500 fmol
10x FastDigest®-Puffer	ergänzt zu einfacher Pufferkonzentration	ergänzt zu einfacher Pufferkonzentration
dNTPs	50 µM	50 µM
Klenow Fragment	5 U	10 U
Reinstwasser	ad 30 µl	ad 50 µl
<b>Bedingungen</b>	25 °C 30 min 75 °C 10 min	37 °C 30 min 75 °C 10 min

### 3.2.3.3 Dephosphorylierung

Bei einer durch Phosphatase katalysierten Dephosphorylierung wird das endständige Phosphat am 5'-Ende eines DNA-Stranges entfernt. Der Sinn liegt meist in einer gezielten Blockade von Doppelstrangenden für das Enzym Ligase, die für eine erfolgreiche Ligation Doppelstrangenden mit einem 5'-Phosphat benötigt. Besonders relevant ist dies bei Klonierungen, bei denen man den mit einem Restriktionsenzym geschnittenen Vektor einer Dephosphorylierung unterzieht, damit seine Religierung während der Behandlung mit dem zu klonierenden Fragment und der Ligase unwahrscheinlich wird. Das Fragment wird mit vorhandenen 5'-Phosphaten zugefügt, sodass die Wahrscheinlichkeit für die Ligation des Fragmentes in den Vektor relativ erhöht ist.

In dieser Arbeit wurde die Phosphatase zum einen zusammen mit einem Restriktionsenzym verwendet, um einen Vektor innerhalb eines enzymatischen Ansatzes für die Ligation mit einem zu klonierenden DNA-Fragment vorzubereiten (vgl. Kapitel 4.1.7.2.1, ab S. 195). Zum anderen wurde sie direkt bei Vektoren eingesetzt, die aus einer Behandlung mit Klenow Fragment zur Erzeugung glatter DNA-Enden hervorgingen (vgl. Kapitel 4.2.8.1, ab S. 223).

Tabelle 3–6: Restriktionsspaltung in Kombination mit Dephosphorylierung durch FastAP™

Komponente	finale Konzentration im Ansatz bzw. zu ergänzendes Volumen
Plasmid-DNA-Präparat	1,25 pmol bzw. hier 3 µg (ungepuffert)
10x FastDigest®-Puffer	ergänzt zu einfacher Pufferkonzentration
FastDigest®-Enzym	3 µl
FastAP™	3 U
Reinstwasser	ad 60 µl
<b>Bedingungen</b>	37 °C 10 h 65 °C 15 min

Tabelle 3–7: Dephosphorylierung glatter Enden aus Klenow-Ansatz mit FastAP™

Komponente	finale Konzentration im Ansatz bzw. zu ergänzendes Volumen
Vektor-Präparat aus Klenow-Ansatz	850 fmol Termini (einfach gepuffert (FastDigest®-Puffer))
10x FastAP™-Puffer	ergänzt zu einfacher Pufferkonzentration
FastAP™	2 U
Reinstwasser	ad 50 µl
<b>Bedingungen</b>	37 °C 45 min 75 °C 5 min

### 3.2.3.4 Ligation

Die T4 DNA Ligase katalysiert die Verknüpfung endständiger 3'-OH- und 5'-Phosphatgruppen von DNA-Doppelsträngen. Dies geschieht unter Verbrauch des Energielieferanten ATP. Sie katalysiert also die Bildung einer Phosphodiesterbindung und wird immer dann eingesetzt, wenn man zwei DNA-Abschnitte miteinander verbinden möchte. Dies kann zum Beispiel bei einer Klonierung der Fall sein.

Förderlich für eine Ligation ist es grundsätzlich, wenn die zu ligierenden Stränge in eine dafür zueinander günstige Orientierung kommen, ihre endständigen funktionalen Gruppen sich also in unmittelbare Nachbarschaft zueinander befinden. Das ist gerade bei kompatiblen, überhängenden Enden der Fall, wo eine Paarung der entsprechenden, endständigen Basen recht wahrscheinlich ist und damit eine optimale Position ihrer OH- bzw. Phosphatgruppen für die Ligase bieten. Dementsprechend gilt die Ligation von zwei glatten Enden als schwieriger, wobei sich aber ein Zusatz von PEG zum Ligationsansatz als förderlich für einen Erfolg erwiesen hat.

Der zweite Fall kam in dieser Arbeit einerseits bei der Religation eines zuvor linearisierten Plasmids vor, dessen DNA-Enden mittels Klenow Fragment geglättet wurden (vgl. Kapitel 4.1.7.2.1, ab S. 195), sowie andererseits bei dem Einbau eines DNA-Fragments mit blunt-Enden in einen linearisierten Vektor, dessen DNA-Enden ebenfalls mit Klenow Fragment geglättet und dephosphoryliert wurden (vgl. Kapitel 4.2.8.1, ab S. 223). In beiden Fällen wurde PEG 8000 zugesetzt. Eine Ligation von überhängenden Enden erfolgte ebenfalls in Zuge des Einbaus eines DNA-Fragmentes in einen linearisierten, dephosphorylierten Vektor (vgl. Kapitel 4.1.7.2.1, ab S. 195). Die folgenden Tabellen stellen die jeweils erfolgreichen Bedingungen dar.

Tabelle 3–8: Religation von linearisiertem Vektor (blunt)

Komponente	finale Konzentration im Ansatz bzw. zu ergänzendes Volumen
Vektor-Präparat aus Klenow-Ansatz	70 fmol (einfach gepuffert (FastDigest <sup>®</sup> -Puffer))
10x Ligase-Puffer	ergänzt zu einfacher Pufferkonzentration
PEG 8000 (50 % (m/V))	5 % (m/V)
ATP (100 mM)	500 $\mu$ M
T4 DNA Ligase	5 U
Reinstwasser	ad 30 $\mu$ l
<b>Bedingungen</b>	16 °C 16 h 65 °C 10 min

Tabelle 3–9: Ligation von linearisiertem, dephosphoryliertem Vektor mit einem DNA-Fragment (kompatible, überhängende Enden; das molekulare Verhältnis von Vektor zu Fragment betrug 1:2)

Komponente	finale Konzentration im Ansatz bzw. zu ergänzendes Volumen
Vektor-Präparat, dephosphoryliert	100 fmol (einfach gepuffert (FastDigest <sup>®</sup> -Puffer))
Fragment-Präparat	200 fmol (ungepuffert)
10x Ligase-Puffer	ergänzt zu einfacher Pufferkonzentration
ATP (100 mM)	500 $\mu$ M
T4 DNA Ligase	5 U
Reinstwasser	ad 30 $\mu$ l
<b>Bedingungen</b>	16 °C 16 h 65 °C 10 min

Tabelle 3–10: Ligation von dephosphoryliertem Vektor (geglättete Enden) mit einem DNA-Fragment (blunt; das molekulare Verhältnis von Vektor zu Fragment betrug 2:3)

<b>Komponente</b>	<b>finale Konzentration im Ansatz bzw. zu ergänzendes Volumen</b>
Vektor-Präparat, dephosphoryliert	130 fmol (einfach gepuffert (FastDigest <sup>®</sup> - bzw. FastAP <sup>™</sup> -Puffer))
Fragment-Präparat	195 fmol (einfach gepuffert (FastDigest <sup>®</sup> -Puffer))
10x Ligase-Puffer	ergänzt zu einfacher Pufferkonzentration
ATP (100 mM)	500 µM
50 % (m/V) PEG 8000	5 % (m/V)
T4 DNA Ligase	5 U
Reinstwasser	ad 30 µl
<b>Bedingungen</b>	16 °C 16 h 65 °C 10 min

### 3.2.3.5 S1 Nuclease

Die S1 Nuclease schneidet unspezifisch in DNA-Einzelsträngen. In dieser Arbeit wurde sie wegen eines Nebeneffektes ihrer Tätigkeit bei der S1-PFGE (vgl. Kapitel 3.2.1.2.4, S. 107ff) eingesetzt. Sie linearisiert nämlich unspezifisch negativ superspiralisierte Plasmide.

Man nimmt an, dass die negative Superspiralisierung bei Plasmiden in deren DNA-Strang Orte größerer Spannung erzeugen. An diesen ist der Strang temporär denaturiert. Solche exponierten, temporären Einzelstränge bilden das Substrat für die S1 Nuclease. Wird erst der eine Strang geschnitten, kann auch direkt der andere Strang an der gegenüberliegenden Stelle des Nicks geschnitten werden, die S1 Nuclease bildet sich also durch den ersten Schnitt gleich das eigene Substrat für den zweiten Schnitt. Ein einmal durchtrenntes, negativ superspiralisiertes Plasmid entwindet und entspannt sich, womit jegliche weiteren, potenziellen Schnittstellen der S1 Nuclease beseitigt werden [167, 168].

### 3.2.4 Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase Kettenreaktion (PCR, polymerase chain reaction) ist eine Methode zur Vervielfältigung (Amplifikation) von DNA-Abschnitten [169]. Sie basiert auf dem Einsatz einer hitzestabilen DNA-Polymerase, welche temperaturbedingten Denaturierungen von Template DNA widersteht. Zugesezte Oligonukleotide, die an bekannten Abschnitten der denaturierten Template DNA spezifisch binden können (Annealing), wenn die Temperatur eine bestimmte, spezifische Höhe hat (Annealing-Temperatur), liefern freie 3'-OH-Gruppen

---

und damit die Startstellen für die Synthesearbeit der Polymerase. Man spricht deshalb bei diesen Oligonukleotiden auch von Primern. In einer herkömmlichen PCR werden jeweils zwei Primer eingesetzt, die an den entgegengesetzten Enden des zu amplifizierenden DNA-Abschnitts auf dem codierenden und dem komplementären Strang binden. Die Synthese erfolgt bei einer für die Polymerase optimalen Temperatur unter Verbrauch von ebenfalls zugesetzten dNTPs. Die Synthesedauer hängt ab von der Länge des Amplikons sowie der Arbeitsgeschwindigkeit der eingesetzten DNA-Polymerase.

Diese drei Schritte, Denaturierung, Primer-Annealing und Synthese, umfassen einen Zyklus einer PCR. Durch wiederholen von mehreren Zyklen dienen die jeweils pro Zyklus erzeugten Amplifikate in Folgezyklen als zusätzliche Templates, wodurch die Konzentration der Produkte im Verlauf der PCR insgesamt exponentiell steigt. Eingerahmt werden diese Zyklen von einem initialen, i.d.R. etwas längeren Denaturierungsschritt, sowie einer abschließenden, etwas längeren Synthesephase. Erstere dient einem möglichst idealen Schmelzen der noch nicht synthetisierten und im Vergleich dazu häufig problematischeren Template-DNA, die im ersten Zyklus möglichst reibungslos amplifiziert werden muss, um maximale Effizienz der Folgezyklen zu gewährleisten. Die abschließende Synthesephase soll es der Polymerase ermöglichen, möglichst alle eventuell noch nicht vollständig synthetisierten Doppelstränge fertigzustellen.

Der Prototyp der hitzestabilen DNA-Polymerase ist die *Taq*-Polymerase aus *Thermophilus aquaticus*, die u.a. auch in dieser Arbeit eingesetzt wurde.

Die Amplifikation von DNA-Abschnitten mittels PCR dient also der Erhöhung ihrer Konzentration. Die Motivationen hierfür sind vielfältig und reichen vom so möglichen Überschreiten von Nachweisgrenzen beim Einsatz der PCR als Detektionsmethode bis zum Erstellen von Ausgangsmaterial für nachfolgende Prozesse wie bspw. der Sequenzierung.

#### **3.2.4.1 Standard-PCRs (*Taq*-Polymerase)**

Im Laufe dieser Arbeit wurden zahlreiche PCRs durchgeführt, deren Bedingungen den folgenden Tabellen zu entnehmen sind.

Unabhängig von der Marke der verwendeten *Taq*-Polymerase setzten sich die Ansätze der in Tabelle 3–12 angegebenen PCRs stets nach dem in Tabelle 3–11 angegebenen Muster zusammen. Einzige Ausnahme ist die Tn1999-Tri-Primer-PCR, wo 60 µM dNTPs eingesetzt wurden.

---

Tabelle 3–11: PCR mit *Taq*-Polymerase - Grundansatz

<b>Komponente</b>	<b>finale Konzentration im Ansatz bzw. zu ergänzendes Volumen</b>
DreamTaq™ Puffer	ergänzt zu einfacher Pufferkonzentration
dNTPs	50 µM
Primer	vgl. Tabelle 3–12
Template	Plasmide: 5 pg bis 500 pg chromosomale DNA: 50 ng bis 500 ng
DreamTaq™ DNA Polymerase	0,625 U
Reinstwasser	ad 25 µl

Tabelle 3–12: PCRs mit *Taq*-Polymerase

Ziel	NW/S	Primer	Amplikon / bp	Primer im Ansatz	Zyklus					
					init. Den.	Denat.	Prim. An.	Synth.	Zyklen	fin. Syn.
<i>aac(6')</i> -Ib	NW	<i>aac(6')</i> -Ib +1 fw	519	je 0,2 µM	94 °C 5 min	94 °C 30 s	55 °C 30 s	72 °C 30 s	30	72 °C 5 min
		<i>aac(6')</i> -Ib +519 rev								
<i>ampD</i>	S	<i>ampD</i> +1 fw <i>E.cloacae</i>	564	je 0,2 µM	94 °C 5 min	94 °C 30 s	54 °C 30 s	72 °C 1 min	30	72 °C 5 min
		<i>ampD</i> +564 rev <i>E.cloacae</i>								
<i>ampD</i>	S	<i>ampD</i> -374 fw <i>E.cloacae</i>	1518	je 0,4 µM	94 °C 5 min	94 °C 30 s	58 °C 30 s	72 °C 2 min	30	72 °C 5 min
		<i>ampD</i> +1144 rev <i>E.cloacae</i>								
<i>bla<sub>CTX-M</sub></i>	NW	<i>bla<sub>CTX-M</sub></i> +211 fw	593	je 0,2 µM	94 °C 7 min	94 °C 50 s	50 °C 40 s	72 °C 1 min	30	72 °C 5 min
		<i>bla<sub>CTX-M</sub></i> +803 rev								

Tabelle 3–12 Fortsetzung

Ziel	NW/S	Primer	Amplikon / bp	Primer im Ansatz	Zyklus					
					init. Den.	Denat.	Prim. An.	Synth.	Zyklen	fin. Syn.
<i>bla<sub>GES</sub></i>	NW	<i>bla<sub>GES</sub></i> +1 fw	863	je 0,2 µM	94 °C 5 min	94 °C 30 s	55 °C 30 s	72 °C 1 min	30	72 °C 5 min
		<i>bla<sub>GES</sub></i> +864 rev								
<i>bla<sub>KPC</sub></i>	NW	<i>bla<sub>KPC</sub></i> +1 fw	893	je 0,2 µM	94 °C 5 min	94 °C 30 s	60 °C 30 s	72 °C 1 min	30	72 °C 5 min
		<i>bla<sub>KPC</sub></i> +893 rev								
<i>bla<sub>NDM-1</sub></i>	NW	<i>bla<sub>NDM-1</sub></i> +1117 fw	678	je 0,2 µM	94 °C 5 min	94 °C 1 min	58 °C 30 s	72 °C 1 min	30	72 °C 5 min
		<i>bla<sub>NDM-1</sub></i> +794 rev								
<i>bla<sub>OXA</sub></i> Gr. 1	NW	<i>bla<sub>OXA-1</sub></i> +8 fw	814	je 0,2 µM	94 °C 5 min	94 °C 1 min	61 °C 1 min	72 °C 2 min	30	72 °C 10 min
		<i>bla<sub>OXA-1</sub></i> +821 rev								

Tabelle 3–12 Fortsetzung

Ziel	NW/S	Primer	Amplikon / bp	Primer im Ansatz	Zyklus					
					init. Den.	Denat.	Prim. An.	Synth.	Zyklen	fin. Syn.
<i>bla</i> <sub>OXA</sub> Gr. 2	NW	<i>bla</i> <sub>OXA</sub> -2 +113 fw	703	je 0,2 µM	94 °C 5 min	94 °C 1 min	65 °C 1 min	72 °C 2 min	30	72 °C 10 min
		<i>bla</i> <sub>OXA</sub> -2 +815 rev								
<i>bla</i> <sub>OXA-9</sub>	NW	<i>bla</i> <sub>OXA</sub> -9 +34 fw	761	je 0,2 µM	94 °C 5 min	94 °C 30 s	57 °C 30 s	72 °C 1 min	30	72 °C 5 min
		<i>bla</i> <sub>OXA</sub> -9 +794 rev								
<i>bla</i> <sub>OXA</sub> Gr. 10	NW	<i>bla</i> <sub>OXA</sub> -10 +123 fw	652	je 0,2 µM	94 °C 5 min	94 °C 1 min	61 °C 1 min	72 °C 2 min	30	72 °C 10 min
		<i>bla</i> <sub>OXA</sub> -10 +774 rev								
<i>bla</i> <sub>OXA-47</sub>	NW	<i>bla</i> <sub>OXA</sub> -47 +211 fw	610	je 0,2 µM	94 °C 5 min	94 °C 30 s	48 °C 30 s	72 °C 1 min	30	72 °C 5 min
		<i>bla</i> <sub>OXA</sub> -47 +820 rev								

Tabelle 3–12 Fortsetzung

Ziel	NW/S	Primer	Amplikon / bp	Primer im Ansatz	Zyklus					
					init. Den.	Denat.	Prim. An.	Synth.	Zyklen	fin. Syn.
	NW	blaOXA-48 +31 fw	744	je 0,2 µM	94 °C 5 min	94 °C 30 s	55 °C 30 s	72 °C 1 min	30	72 °C 5 min
		blaOXA-48 +774 rev								
<i>bla<sub>OXA-48</sub></i>	NW/S	tnpA +66 rev IS1999	972	je 0,2 µM	94 °C 5 min	94 °C 30 s	53,5 °C 30 s	72 °C 1 min	30	72 °C 5 min
		blaOXA-48 +774 rev								
	S	blaOXA-48 +31 fw	883	je 0,2 µM	94 °C 5 min	94 °C 30 s	54 °C 30 s	72 °C 1 min	30	72 °C 5 min
		blaOXA-48 +913 rev								
<i>bla<sub>TEM</sub></i>	NW	blaTEM +16 fw	838	je 0,2 µM	94 °C 5 min	94 °C 30 s	55 °C 30 s	72 °C 1 min	30	72 °C 5 min
		blaTEM +853 rev								

Tabelle 3–12 Fortsetzung

Ziel	NW/S	Primer	Amplikon / bp	Primer im Ansatz	Zyklus					
					init. Den.	Denat.	Prim. An.	Synth.	Zyklen	fin. Syn.
<i>bla<sub>VIM</sub></i>	NW	<i>bla<sub>VIM</sub></i> +151 fw	390	je 0,2 µM	94 °C 5 min	94 °C 30 s	52 °C 30 s	72 °C 1 min	30	72 °C 5 min
		<i>bla<sub>VIM</sub></i> +540 rev								
Integron- Aufkl.	NW	<i>bla<sub>VIM</sub></i> +151 fw		je 0,2 µM	94 °C 5 min	94 °C 30 s	52 °C 40 s	72 °C 5 min	35	72 °C 10 min
		<i>aac(6')-Ib</i> +1 fw								
Integron- Aufkl.	NW	<i>bla<sub>VIM</sub></i> +151 fw		je 0,2 µM	94 °C 5 min	94 °C 30 s	53 °C 40 s	72 °C 5 min	35	72 °C 10 min
		<i>aac(6')-Ib</i> +519 rev								
Integron- Aufkl.	NW	<i>bla<sub>VIM</sub></i> +540 rev		je 0,2 µM	94 °C 5 min	94 °C 30 s	53 °C 40 s	72 °C 5 min	35	72 °C 10 min
		<i>aac(6')-Ib</i> +1 fw								

Tabelle 3–12 Fortsetzung

Ziel	NW/S	Primer	Amplikon / bp	Primer im Ansatz	Zyklus					
					init. Den.	Denat.	Prim. An.	Synth.	Zyklen	fin. Syn.
	NW	blaVIM +540 rev		je 0,2 µM	94 °C 5 min	94 °C 30 s	55 °C 40 s	72 °C 5 min	35	72 °C 10 min
		aac(6')-Ib +519 rev								
	S	blaVIM +151 fw	995	je 0,2 µM	94 °C 5 min	94 °C 30 s	66,5 °C 30 s	72 °C 2 min	30	72 °C 5 min
		aac(6')-Ib +201 rev								
Integron- Sequ.	S	aphA15 + 247 fw	850	je 0,2 µM	94 °C 5 min	94 °C 30 s	51 °C 30 s	72 °C 1,5 min	30	72 °C 5 min
		qacEΔ1 -53 rev Integrans								
	S	aac(6')-Ib +66 fw	569	je 0,2 µM	94 °C 5 min	94 °C 30 s	54 °C 30 s	72 °C 1 min	30	72 °C 5 min
		aadA1 +46 rev								

Tabelle 3–12 Fortsetzung

Ziel	NW/S	Primer	Amplikon / bp	Primer im Ansatz	Zyklus					
					init. Den.	Denat.	Prim. An.	Synth.	Zyklen	fin. Syn.
	S	blaVIM +151 fw	814	je 0,2 µM	94 °C 5 min	94 °C 30 s	54 °C 30 s	72 °C 1 min	30	72 °C 5 min
		aac(6)-Ib +20 rev								
	S	aac(6)-Ib +66 fw	884	je 0,2 µM	94 °C 5 min	94 °C 30 s	56 °C 30 s	72 °C 1 min	30	72 °C 5 min
		aadA1 +361 rev								
	S	intI1 -40 rev Integrans	667	je 0,2 µM	94 °C 5 min	94 °C 30 s	59 °C 30 s	72 °C 1 min	30	72 °C 5 min
		blaVIM +540 rev								
	S	aadA1 +25 fw	337	je 0,2 µM	94 °C 5 min	94 °C 30 s	54 °C 30 s	72 °C 30 s	30	72 °C 5 min
		aadA1 +361 rev								

Tabelle 3–12 Fortsetzung

Ziel	NW/S	Primer	Amplikon / bp	Primer im Ansatz	Zyklus					
					init. Den.	Denat.	Prim. An.	Synth.	Zyklen	fin. Syn.
<i>ompK35</i>	S	ompK35 +1080 rev K.pneum.	hier: 1192	je 0,2 µM	94 °C 5 min	94 °C 1 min	62,8 °C 30 s	72 °C 105 s	30	72 °C 5 min
		ompK35 -112 fw K.pneum.								
	S	ompK35 +1 fw K.pneum.	1227	je 0,2 µM	94 °C 5 min	94 °C 1 min	62,8 °C 30 s	72 °C 105 s	30	72 °C 5 min
		ompK35 +1227 rev K.pneum.								
	S	ompK35 -664 fw K.pneum.	hier: 758	je 0,2 µM	94 °C 5 min	94 °C 1 min	54,8 °C 30 s	72 °C 2 min	30	72 °C 5 min
		ompK35 +182 rev K.pneum.								
	S	ompK35 +1 fw K.pneum.	1080	je 0,2 µM	94 °C 5 min	94 °C 1 min	58,4 °C 30 s	72 °C 3 min	30	72 °C 5 min
		ompK35 +1080 rev K.pneum.								

Tabelle 3–12 Fortsetzung

Ziel	NW/S	Primer	Amplikon / bp	Primer im Ansatz	Zyklus					
					init. Den.	Denat.	Prim. An.	Synth.	Zyklen	fin. Syn.
<i>ompK36</i>	S	ompK36 +1 fw K.pneum.	1198	je 0,2 µM	94 °C 5 min	94 °C 1 min	59,8 °C 30 s	72 °C 105 s	30	72 °C 5 min
		ompK36 +1198 rev K.pneum.								
	S	ompK36 -345 fw K.pneum.	hier: 2220	je 0,2 µM	94 °C 5 min	94 °C 1 min	59,8 °C 30 s	72 °C 5 min	30	72 °C 10 min
		ompK36 +1098 rev K.pneum.								
	S	ompK36 -811 fw K.pneum.	hier: 1693	je 0,2 µM	94 °C 5 min	94 °C 1 min	64,6 °C 30 s	72 °C 2 min	30	72 °C 5 min
		ompK36 +105 rev K.pneum.								
	S	ompK36 +880 fw K.pneum.	219	je 0,2 µM	94 °C 5 min	94 °C 1 min	56,1 °C 30 s	72 °C 30 s	30	72 °C 2,5 min
		ompK36 +1098 rev K.pneum.								

Tabelle 3–12 Fortsetzung

Ziel	NW/S	Primer	Amplikon / bp	Primer im Ansatz	Zyklus					
					init. Den.	Denat.	Prim. An.	Synth.	Zyklen	fin. Syn.
	S	ompK36 -811 fw K.pneum.	hier: 1422	je 0,2 µM	94 °C 5 min	94 °C 1 min	59,9 °C 30 s	72 °C 2 min	30	72 °C 5 min
		ISKpn14 +97 fw								
	S	ISKpn +610 rev	hier: 785	je 0,2 µM	94 °C 5 min	94 °C 1 min	56,6 °C 30 s	72 °C 2 min	30	72 °C 5 min
		ompK36 +105 rev K.pneum.								
<i>qnrA</i>	NW	qnrA +24 fw	634	je 0,2 µM	94 °C 5 min	94 °C 1 min	53 °C 30 s	72 °C 1 min	30	72 °C 5 min
		qnrA +650 rev								
<i>qnrB</i>	NW	qnrB +1 fw	681	je 0,8 µM	94 °C 5 min	94 °C 1 min	45 °C 30 s	72 °C 1 min	30	72 °C 5 min
		qnrB + 681 rev								

Tabelle 3–12 Fortsetzung

Ziel	NW/S	Primer	Amplikon / bp	Primer im Ansatz	Zyklus					
					init. Den.	Denat.	Prim. An.	Synth.	Zyklen	fin. Syn.
<i>qnrS</i>	NW	qnrS +1 fw	657	je 0,8 µM	94 °C 5 min	94 °C 1 min	48 °C 30 s	72 °C 1 min	30	72 °C 5 min
		qnrS +657 rev								
Tn1999 Tri-Primer -PCR	NW	tnpA +1146 rev IS1999		je 0,4 µM	94 °C 5 min	94 °C 30 s	53 °C 45 s	72 °C 225 s	30	72 °C 8 min
		tnpA +162 fw IS1999								
		tnpA +66 rev IS1999								
Tn1999 - weitere PCRs	NW	tnpA +66 rev IS1999		0,8 µM	94 °C 5 min	94 °C 30 s	52 °C 40 s	72 °C 7 min	30	72 °C 10 min
		tnpA +1146 rev IS1999								
	NW	tnpA +66 rev IS1999		je 0,4 µM	94 °C 5 min	94 °C 30 s	52 °C 40 s	72 °C 7 min	30	72 °C 10 min

Ferner wurden unter Verwendung von *Taq*-Polymerase eine Duplex-PCR auf *bla*<sub>TEM</sub> und *bla*<sub>SHV</sub> [170] sowie Multiplex-PCRs auf MBL-Gene [152] und pmAmpC-Gene [149] durchgeführt.

Die folgende Tabelle listet deren Grundzusammensetzungen und Zyklus-Bedingungen auf. Darauf folgen Tabellen mit den darin verwendeten Primern.

Tabelle 3–13: Zusammensetzungen und Bedingungen weiterer PCRs mit *Taq*-Polymerase

Komponente	finale Konzentration im Ansatz bzw. zu ergänzendes Volumen		
	SHV-/TEM-Duplex	MBL	pmAmpC
DreamTaq™ Puffer	zu 1x konzentriert	zu 1x konzentriert	zu 1x konzentriert
dNTPs	60 µM	50 µM	50 µM
Primer	je 0,4 µM	je 0,2 µM	vgl. Tabelle 3–15
Template	Plasmide: 5 pg bis 500 pg chromosomale DNA: 50 ng bis 500 ng	Plasmide: 5 pg bis 500 pg chromosomale DNA: 50 ng bis 500 ng	Plasmide: 5 pg bis 500 pg chromosomale DNA: 50 ng bis 500 ng
DreamTaq™ DNA Polymerase	1,25 U	0,625 U	0,625 U
Reinstwasser	ad 25 µl	ad 25 µl	ad 25 µl
Bedingungen			
Initiale Denaturierung.	94 °C 3 min	94 °C 5 min	94 °C 3 min
Denaturierung	94 °C 45 s	94 °C 30 s	94 °C 30 s
Primer-Annealing	55 °C 30 s	52 °C 30 s	64 °C 30 s
Synthese	72 °C 2,5 min	72 °C 50 s	72 °C 1 min
Zyklen	30	35	25
finale Synthese	72 °C 10 min	72 °C 5 min	72 °C 7 min

Tabelle 3–14: Primer der durchgeführten SHV/TEM-Duplex- sowie der MBL-Multiplex-PCR

Typ	Primer	Amplikon
SHV/TEM-Duplex	blaSHV +11 fw	746 bp
	blaSHV +756 rev	
	blaTEM +16 fw	838 bp
	blaTEM +853 rev	
MBL-Multiplex	blaVIM +151 fw	390 bp
	blaVIM +540 rev	
	blaGIM +191 fw	477 bp
	blaGIM +667 rev	
	blaSIM +127 fw	571 bp
	blaSIM +697 rev	
	blaSPM +239 fw	271 bp
	blaSPM +509 rev	
	blaIMP +307 fw	189 bp
	blaIMP +495 rev	

Tabelle 3–15: Primer der durchgeführten pmAmpC-Multiplex-PCR

Primer	Amplikon	Primer im Ansatz
blaACC +212 fw	346 bp	je 0,5 $\mu$ M
blaACC +557 rev		
blaDHA +258 fw	405 bp	je 0,6 $\mu$ M
blaDHA +662 rev		
blaFOX +775 fw	190 bp	je 0,4 $\mu$ M
blaFOX +964 rev		
blaLAT/CMY/BIL +337 fw	462 bp	je 0,6 $\mu$ M
blaLAT/CMY/BIL +798 rev		
blaMIR/ACT +188 fw	302 bp	je 0,5 $\mu$ M
blaMIR/ACT +489 rev		
blaMOX/CMY +126 fw	520 bp	je 0,6 $\mu$ M
blaMOX/CMY +645 rev		

Die pmAmpC-Multiplex-PCR erfasst die *bla*-Gene der Familien MOX-1, -2, CMY-1 bis 11, LAT-1 bis 4, BIL-1, DHA-1, -2, ACC, MIR-1T, ACT-1 und FOX-1 bis 5b.

### 3.2.4.2 LongAmp®-PCRs

Wo PCRs durchgeführt wurden, die ein relativ großes Amplikon erwarten ließen, wurde auf die LongAmp®-*Taq*-Polymerase zurückgegriffen. Sie ist laut Herstellerangaben eine Mischung aus *Taq*-Polymerase und Deep Vent<sub>R</sub> DNA-Polymerase. Die Deep Vent<sub>R</sub> DNA-Polymerase besitzt eine 3'→5'-Exonucleaseaktivität, die ihrerseits die Robustheit und Genauigkeit der *Taq*-Polymerase erhöhe. Die Synthesegeschwindigkeit wird mit 20 bp/s (50 s/kb) angegeben.

Benutzt wurde sie zum einen bei einer PCR zum Test auf Integronstrukturen, welche variable Größen haben (vgl. Kapitel 4.1.6.3, S. 191ff), sowie bei einer PCR mit einem einzelnen Primer, der an Insertionselemente des zusammengesetzten Transposons Tn1999 band und ein 4.741 bp großes Amplikon erwarten ließ (vgl. Kapitel 4.2.5.1, S. 217ff).

Tabelle 3–16: Zusammensetzungen und Bedingungen von PCRs mit LongAmp®-*Taq*-Polymerase

Komponente	finale Konzentration im Ansatz bzw. zu ergänzendes Volumen	
	Integron-PCR	Tn1999-PCR
LongAmp®-Puffer	zu 1x konzentriert	zu 1x konzentriert
dNTPs	300 µM	50 µM
Primer	je 0,4 µM	je 0,4 µM
Template	Plasmide: 5 pg bis 5 ng chromosomale DNA: 5 ng bis 50 ng	Plasmide: 5 pg bis 5 ng chromosomale DNA: 5 ng bis 50 ng
LongAmp®- <i>Taq</i>	1 U	0,125 U
Reinstwasser	ad 25 µl	ad 25 µl
Bedingungen		
Initiale Denaturierung	94 °C 30 s	94 °C 5 min
Denaturierung	94 °C 30 s	94 °C 30 s
Primer-Annealing	52,4 °C 30 s	51,5 °C 30 s
Synthese	65 °C 10 min	65 °C 5 min
Zyklen	30	30
finale Synthese	65 °C 15 min	65 °C 10 min

Tabelle 3–17: Primer in durchgeführten LongAmp<sup>®</sup>-*Taq*-PCRs

Ziel	Primer	Amplikon
Integron-Strukturgene	intI1 -40 rev Integrons	Integron-abhängig
	qacEΔ1 -53 rev Integrons	
Tn1999	tnpA +1146 rev IS1999	4741 bp

### 3.2.4.3 Phusion<sup>®</sup>-PCRs (*Pfu*-Polymerase)

Die *Pfu*-Polymerase erreicht eine deutlich höhere Genauigkeit beim Amplifizieren als die *Taq*-Polymerase und wurde daher in dieser Arbeit eingesetzt, wenn Genabschnitte zu Klonierungszwecken amplifiziert werden mussten. Dies betraf zwei Fragmente, nämlich eine kombinierte *aacA/aadB*-Resistenzkassette von pBP507 (vgl. Kapitel 4.2.8.1, S. 223ff) und *ampD*-Gene verschiedener Herkunft (vgl. Kapitel 4.1.7.2.1, S. 195ff). Die zu Grunde liegenden PCRs sind in der folgenden Tabelle aufgeschlüsselt.

Tabelle 3–18: Zusammensetzungen und Bedingungen von PCRs mit *Pfu*-Polymerase

Komponente	finale Konzentration im Ansatz bzw. zu ergänzendes Volumen	
	<i>aacA/aadB</i>	<i>ampD</i>
High Fidelity-Puffer	zu 1x konzentriert	zu 1x konzentriert
dNTPs	0,2 mM	0,2 mM
Primer	0,5 μM	0,5 μM
Template	Plasmide: 1 pg bis 10 ng chromosomale DNA: 50 ng bis 250 ng	Plasmide: 1 pg bis 10 ng chromosomale DNA: 50 ng bis 250 ng
<i>Pfu</i> -Polymerase	1 U	1 U
Reinstwasser	ad 50 μl	ad 50 μl
Bedingungen		
Initiale Denaturierung	98 °C 30 s	98 °C 30 s
Denaturierung	98 °C 10 s	98 °C 10 s
Primer Annealing	67,9 °C 30 s	64 °C 30 s
Synthese	72 °C 1,5 min	72 °C 1 min
Zyklen	35	35
finale Synthese	72 °C 5 min	72 °C 5 min

Tabelle 3–19: Primer in durchgeführten *Pfu*-PCRs

Ziel	Primer	Amplikon
<i>aacA/aadB</i> v. pBP507	aacA +1131 rev pBP507	2655 bp
	aadB -923 fw pBP507	
<i>ampD</i> -Fragment	Sall-ampD +1145 rev <i>E.cloacae</i>	1537 bp
	Sall-ampD -135 fw <i>E.cloacae</i>	

#### 3.2.4.4 „nested“ PCR

Im Sinne dieser Doktorarbeit bezeichnet eine „nested“ PCR die Amplifikation eines internen Fragmentes von einem zuvor per PCR generierten Amplikon, welches dann seinerseits als Template für die Reaktion dient.

Mit dieser Methode lässt sich prüfen, ob ein Primerpaar innerhalb des durch ein anderes Primerpaar abgesteckten DNA-Abschnitts bindet. Dies kann zur genaueren Lokalisation bestimmter DNA-Abschnitte beitragen. Wenn man beispielsweise ein Gen mittels PCR unter Nutzung von Gesamt-DNA als Template nachgewiesen hat und später mittels PCR ebenfalls feststellt, dass dort auch ein mobiles Element vorhanden ist, wäre es hier bspw. möglich, die Lokalisation des Gens innerhalb des mobilen Elements zu be- oder zu widerlegen. Dazu müsste man das Amplikon des mobilen Elementes in einer präparativen Elektrophorese isolieren, aufreinigen und dann seinerseits als Template für die andere PCR benutzen.

Damit ist die nested PCR ein Konzept zur Sublokalisierung eines bestimmten Gens. Methodisch umfasste sie herkömmliche PCRs sowie präparative Elektrophoresen samt Aufreinigung - hier sei bezüglich des Vorgehens auf die entsprechenden Kapitel verwiesen (Kapitel 3.2.4, S. 116ff, sowie Kapitel 3.2.2.2, S. 109ff).

### 3.2.5 Sequenzierung von DNA

#### 3.2.5.1 Sequenzierung nach der Methode von Sanger

Die Sequenzierung von DNA nach der Sanger-Methode [171] wurde mit einem GenomeLab™ GeXP Genetic Analysis System der Firma Beckman Coulter vorgenommen. Als Template dienten üblicherweise chromosomale DNA, Plasmide und vor allem PCR-Produkte.

Zunächst wurde die zu sequenzierende DNA einem als Cycle-Sequencing bezeichneten

---

Prozess unterzogen, bei dem ein Sequenzier-Primer (für den mindestens dessen Bindestelle beim Template vorhanden und damit bekannt sein muss), DNA-Polymerase und eine Mischung aus dNTPs und mit Fluoreszenz-Farbstoffmolekülen markierten Didesoxynucleotiden (ddNTPs) zugesetzt wird. Jede Didesoxybase (ddATP, ddCTP, ddGTP und ddTTP) besitzt dabei einen spezifischen Farbstoff. Der Ansatz wird mehreren Zyklen von Denaturierung, Primeranlagerung und Synthese in einem Thermocycler unterzogen. Anders als bei der PCR erfolgt hier eine lineare und keine exponentielle Amplifikation, da es nur einen Primer gibt. Die Polymerisation erfolgt dabei jeweils mit dNTPs bis zu dem Einbau eines markierten ddNTP, der zu einem Kettenabbruch führt, da der Polymerase nun die benötigte 3'-OH-Gruppe fehlt. Ob ein ddNTP eingebaut wird oder nicht, ist ein rein statistischer Prozess, der bei jedem Einbau vereinfacht betrachtet die gleiche Wahrscheinlichkeit aufweist (tatsächlich ändern sich die Konzentrationen der beiden Nucleotid-Typen dynamisch während der Synthese durch ihren Verbrauch, weshalb auch die Wahrscheinlichkeiten fluktuieren). Damit sinkt insgesamt die Synthesewahrscheinlichkeit mit der Fragmentlänge, weshalb nach Abschluss des Prozesses kürzere Fragmente höher konzentriert vorliegen als längere.

Der Ansatz wird im Sequenzierautomaten einer Kapillarelektrophorese unterzogen, um die erzeugten Fragmente der Länge nach aufzutrennen. Die separierten Fragmente werden dann mit Hilfe von Lasern angeregt, deren Wellenlängen auf die einzelnen Fluoreszenz-Farbstoffe abgestimmt sind. Da jedes Fragment an seinem Ende ein markiertes ddNTP besitzt, erhält man ein der dort eingebauten Base entsprechendes Fluoreszenzsignal, das detektiert und mit der Fragmentlänge, d.h. der Position der Base assoziiert wird. Im Gesamtbild erhält man durch automatische Umrechnung des Chromatogramms die DNA-Sequenz, und zwar ausgehend von der Primerbindestelle bis zu einem Punkt, an dem die Konzentration längerer Fragmente zu gering ist, um noch ausreichend starke Fluoreszenzsignale zu liefern, oder das Ende der Template-DNA erreicht wurde.

Praktisch unterteilt sich die Sequenzierung in drei Abschnitte: Erzeugung der Template DNA, Cycle-Sequencing mit anschließender Probenaufbereitung und der eigentlichen Sequenzierung.

In dieser Arbeit wurden ausschließlich durch Agarose-Gelelektrophorese auf ihre Konzentration und Reinheit geprüfte PCR-Produkte und Plasmide als Template benutzt. Plasmide müssen eine hohe Reinheit aufweisen, um als Template bei einer Sequenzierung

---

benutzt werden zu können. Dies wurde durch Verwendung kommerziell erhältlicher Kits zur Isolation von Plasmid-DNA (vgl. Kapitel 3.2.1.2.5, S. 108ff) erreicht. Wurden PCR-Produkte verwendet, mussten diese zunächst einer Aufreinigung unterzogen werden, da die übrigen Komponenten der PCR störend für die Sequenzierung sind bzw. diese unmöglich machen. Wurde ein PCR-Produkt einer präparativen Agarose-Gelelektrophorese (vgl. Kapitel 3.2.2.2, S. 109ff) unterzogen, weil es per se störende Nebenprodukte enthielt, beinhaltet dies auch gleichzeitig eine ausreichende Aufreinigung. Wurde keine präparative Elektrophorese vorgenommen, erfolgte eine Aufreinigung mit Exonuclease I und FastAP™ nach folgendem Ansatz:

Tabelle 3–20: Aufreinigung von PCR-Produkten für Sequenzierungen

<b>Komponente</b>	<b>finale Konzentration im Ansatz bzw. zu ergänzendes Volumen</b>
PCR-Ansatz	5 µl
Exonuclease I (20 U/µl)	0,5 µl (10 U)
FastAP™ (thermosensitive, alkalische Phosphatase)	1 µl (1 U)
<b>Bedingungen</b>	37 °C 15 min 85 °C 15 min

Die Exonuclease I baut einzelsträngige DNA ab, also hier verbliebene Primer des Ansatzes, und die alkalische Phosphatase deaktiviert das Triphosphat der verbliebenen dNTPs durch Katalysierung der Hydrolyse der Phosphoanhydridbindungen bzw. des Phosphorsäureesters. Beide Komponenten wären Störfaktoren beim Cycle-Sequencing. Die Enzyme zur Aufreinigung müssen deaktiviert werden, weil sie ihrerseits im Cycle-Sequencing zugesetzte Komponenten abbauen würden.

Das Cycle-Sequencing ist, wie oben angedeutet, einer herkömmlichen PCR ähnlich. Die Zusammensetzung des Ansatzes und die Zyklus-Bedingungen ergaben sich wie folgt:

Tabelle 3–21: Cycle-Sequencing

Komponente	finale Konzentration im Ansatz bzw. zu ergänzendes Volumen
Sequencing Reaction Buffer	4 $\mu$ l - V <sub>DTCS Quick Start Master Mix</sub>
Primer	1 $\mu$ l (10 pmol)
Template	spezifisch
DTCS Quick Start Master Mix	1 bis 4 $\mu$ l
DMSO	ggf. 1 $\mu$ l
Reinstwasser	ad 20 $\mu$ l
<b>Bedingungen</b>	
Denaturierung	96 °C 20 s
Primer-Annealing	spezifische T (45 °C-60 °C) 30 s
Synthese	60 °C 4 min
Zyklen	30

Die folgende Tabelle zeigt eine Übersicht der bei Sequenzierungen benutzten Primer, der dabei im Cycle-Sequencing jeweils eingestellten Annealing-Temperaturen sowie das jeweilige Template (für die Primer vgl. Kapitel 2.9, S. 84ff; für die PCR-Produkte vgl. Kapitel 3.2.4.1, S. 117ff).

Tabelle 3–22: Sequenzier-Primer

Primer	T <sub>Annealing</sub>	PCR / Plasmid
ampD +1 fw E.cloacae	50 °C	ampD +1 fw E.cloacae
ampD +564 rev E.cloacae	50 °C	ampD +564 rev E.cloacae
ampD -374 fw E.cloacae	58 °C	ampD -374 fw E.cloacae ampD +1144 rev E.cloacae
ampD +178 rev E.cloacae	55 °C	Plasmid
ampD +505 fw E.cloacae	55 °C	Plasmid
lacZ -343 fw pBluescriptII	60 °C	Plasmid
ompK35 -664 fw K.pneum.	55 °C	ompK35 -664 fw K.pneum.
ompK35 +182 rev K.pneum.	55 °C	ompK35 +182 rev K.pneum.
ompK35 +182 rev K.pneum.	55 °C	ompK35 +1080 rev K.pneum.
ompK35 -112 fw K.pneum.	55 °C	ompK35 -112 fw K.pneum.
ompK35 +1 fw K.pneum.	55 °C	ompK35 +1 fw K.pneum.
ompK35 +1080 rev K.pneum.	55 °C	ompK35 +1080 rev K.pneum.
ompK35 +1227 rev K.pneum.	55 °C	ompK35 +1 fw K.pneum. ompK35 +1227 rev K.pneum.
ompK36 +1 fw K.pneum.	55 °C	ompK36 +1 fw K.pneum.
ompK36 +1098 rev K.pneum.	55 °C	ompK36 +1098 rev K.pneum.
ompK36 +1098 rev K.pneum.	55 °C	ompK36 +880 fw K.pneum.
ompK36 +880 fw K.pneum.	55 °C	ompK36 +1098 rev K.pneum.
ompK36 +1198 rev K.pneum.	55 °C	ompK36 +1 fw K.pneum.
ompK36 +880 fw K. pneum.	55 °C	ompK36 +1198 rev K.pneum.
ompK36 -811 fw K.pneum.	57 °C	ompK36 -811 fw K.pneum.
ompK36 -345 fw	53 °C	ompK36 +105 rev K.pneum.
ompK36 -253 rev K.pneum.	53 °C	ompK36 -811 fw K.pneum. ISKpn14 +97 fw
ompK36 -811 fw K.pneum.	57 °C	
ompK36 -345 fw K.pneum.	53 °C	
ompK36 -82 fw K.pneum.	53 °C	
ISKpn14 +97 fw	57 °C	
ompK36 -345 fw K.pneum.	55 °C	ompK36 -345 fw K.pneum. ompK36 +1098 rev K.pneum.
ompK36 -82 fw K.pneum.	55 °C	
ompK36 +105 rev K.pneum.	55 °C	
ISKpn +610 rev	55 °C	ISKpn +610 rev
ompK36 +105 rev K.pneum.	55 °C	ompK36 +105 rev K.pneum.
intI1 -40 rev Integrons	52,5 °C	intI1 -40 rev Integrons
blaVIM +540 rev	52,5 °C	blaVIM +540 rev

Primer	T <sub>Annealing</sub>	PCR / Plasmid
aac(6')-Ib +20 rev	55 °C	blaVIM +151 fw aac(6')-Ib +20 rev
aac(6')-Ib +201 rev	60 °C	blaVIM +151 fw aac(6')-Ib +201 rev
aac(6')-Ib +66 fw	55 °C	aac(6')-Ib +66 fw
aadA1 +46 rev	55 °C	aadA1 +46 rev
aadA1 +361 rev	55 °C	aac(6')-Ib +66 fw aadA1 +361 rev
aadA1 +25 fw	52,5 °C	aadA1 +25 fw aadA1 +361 rev
qacEΔ1 -53 rev Integrons	51 °C	aphA15 + 247 fw qacEΔ1 -53 rev Integrons
tnpA +66 rev IS1999	53,5 °C	blaOXA-48 +774 rev tnpA +66 rev IS1999
blaOXA-48 +913 rev	54 °C	blaOXA-48 +31 fw blaOXA-48 +913 rev

Dem Cycle-Sequencing schloss sich eine Alkohol-Fällung zur Reinigung der Produkte und zum Wechsel des Lösungsmittels an. Eine dafür benötigte Fällungslösung setzte sich wie folgt zusammen:

Tabelle 3–23: Fällungslösung für Sequenzierungen

Komponente	V pro Sequenzierprobe
3 M Natriumacetat pH 5,2	2 µl
100 mM EDTA pH 8,0	2 µl
Glycogen	1 µl

5 µl dieser Lösung wurden zu den 20 µl des Cycle-Sequencing-Ansatzes gegeben und um 60 µl absoluten Ethanol p.a. ergänzt. Es wurde für 12 min bei 14000 U/min und Raumtemperatur zentrifugiert, anschließend wurde der Überstand vorsichtig abgenommen und verworfen. Zum Pellet wurden 200 µl 70 % Ethanol p.a. gegeben und für 30 s bei 14000 U/min und Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde erneut verworfen und der Waschschrift einschließlich Zentrifugation wiederholt. Der Überstand wurde abermals verworfen. Wenn nötig, wurde das Pellet für maximal 10 min bei Raumtemperatur getrocknet,

dann wurde es in 30 µl SLS aufgenommen und dem Sequenzierautomaten zugeführt oder bis zur Verwendung bei 4 °C unter Lichtausschluss gelagert.

### 3.2.5.2 PyroSequencing®

PyroSequencing® wurde benutzt, um die QRDR der *E. cloacae*-Isolate zu sequenzieren. Diese Versuche wurden von Tatjana Claußen durchgeführt, weshalb sich die Ausführung hier auf das zu Grunde liegende Prinzip beschränkt. Die von ihr benutzten Primer sind in Tabelle 2–14 (S. 92) aufgeführt.

PyroSequencing® basiert auf einer Sequenzierung durch Synthese. Als Template dient einzelsträngige DNA. Diese wird durch eine PCR gewonnen, bei der einer der Primer biotinyliert ist. Das Produkt lässt sich durch Bindung an Streptavidin-Agarose-Beads und Denaturierung der Doppelstränge zur gewünschten Einzelstrang-DNA aufreinigen. Diese wird mit einem spezifischen Sequenzier-Primer hybridisiert. Dann werden die Enzyme DNA-Polymerase, ATP-Sulfurylase, Luziferase und Apyrase sowie die Substrate Adenosin-5'-phosphosulfat und Luziferin hinzugegeben. Die Synthese des DNA-Strangs erfolgt durch die sequentielle Zugabe einzelner dNTPs. Wenn das jeweilige dNTP komplementär zur ersten, ungepaarten Base des Templatestranges ist, führt sein Einbau durch die DNA-Polymerase zur Freisetzung von PP<sub>i</sub>. Dieses wird in Gegenwart von Adenosin-5'-Phosphosulfat durch die ATP-Sulfurylase in ATP umgewandelt. Das ATP liefert die Energie für die Luziferase-katalysierte Reaktion von Luziferin zu Oxyluziferin. Bei dieser Reaktion wird Licht emittiert. Dieses ist quantifizierbar und gibt Auskunft über die Anzahl eingebauter, identischer Nukleotide. Insgesamt ergibt die Detektion der Lichtsignale nach Umrechnung grafisch Peaks, die mit dem jeweils zugesetzten dNTP assoziiert sind und im zeitlichen Verlauf das Pyrogramm ergeben.

Ist ein zugesetztes Nukleotid nicht komplementär zur nächsten ungepaarten Base des Templatestranges kann folglich kein Einbau und damit auch kein Lichtsignal erfolgen. Überschüssige bzw. nicht eingebaute dNTPs sowie ATP werden durch die Apyrase abgebaut.

Als Besonderheit wird beim Pyrosequencing kein dATP als Desoxynukleotid verwendet, da es der Luziferase als Substrat dienen und falsche Signale liefern würde. Stattdessen wird Desoxyadenosin- $\alpha$ -thiotriphosphat benutzt, welches nicht von der Luziferase, jedoch von der DNA Polymerase erkannt wird.

---

## 3.2.6 Auftrennung von genetischem Material

### 3.2.6.1 Agarose-Gelelektrophorese

Bei der Agarose-Gelelektrophorese werden DNA-Moleküle in einem Agarosegel durch Anlegen eines elektrischen Feldes der Größe nach getrennt. Man greift auf verschiedene Färbemöglichkeiten zurück, um die separierten Moleküle zu detektieren. In dieser Arbeit wurde ausschließlich Ethidiumbromid verwendet.

In dieser Arbeit kamen verschiedene Modelle von Elektrophoresekammern zum Einsatz, die jedoch allesamt horizontale Aufbauten darstellten. Das grundsätzliche Vorgehen für die Agarose-Gelelektrophorese war dabei stets identisch. Zunächst wurde die Kammer vorbereitet, das heißt nivelliert und der Gelträger so präpariert, dass er zu allen Seiten dicht war. Kämme für die Probenaschen wurden eingesetzt. Dann wurde ein ausreichend großes Volumen Agarose-Lösung hergestellt. Das Volumen richtete sich nach der verwendeten Kammer. Die einzuwiegende Masse von Agarose resultierte aus der angestrebten Konzentration des Gels. Die Einwaage erfolgte in einen ausreichend großen, sauberen Erlenmeyerkolben, dann wurde der in der später erfolgenden Elektrophorese zu verwendende Laufpuffer (meistens war dies 0,5x TAE-Puffer) als Lösungsmittel für die Agarose zum Zielvolumen ergänzt. Die Suspension wurde in der Mikrowelle aufgeköcht, bis sie eine zwar leicht viskose, aber klare Lösung gebildet hatte. Verdunstetes Lösungsmittel wurde durch dH<sub>2</sub>O zur vorherigen Ausgangsmasse substituiert. Die Lösung wurde erst weiterverwendet, als sie nicht mehr kochend heiß war. Erfolgte die Elektrophorese mit Ethidiumbromid im Gel, so wurde dieses nun ergänzt (zu 10 ppb (m/V) mittels kommerzieller Ethidiumbromid-Stammlösung). Das Gel wurde auf den Träger gegossen und gegebenenfalls vorhandene Luftblasen entfernt. Nach dem das Gel nicht mehr warm und damit erstarrt war, wurde der Gelträger in korrekter Orientierung und an Ober- und Unterseite frei von Begrenzungen in die Kammer eingebaut. Diese wurde dann mit dem Elektrophoresepuffer befüllt, bis das Gel gerade bedeckt war. Die Kämme wurden gezogen, Probenvolumina mit Ladepuffer vermischt (i.d.R. auf Parafilm, wo sie scharf abgegrenzte Tropfen bildeten). Die Probenvolumina sowie ein DNA-Größenmarker wurden in die Taschen pipettiert und die Elektrophorese gestartet.

Nach Abschluss der Elektrophorese wurde das Gel entnommen und mit Hilfe einer Gel-Dokumentationsanlage grafisch festgehalten. Wurde dem Gel kein Ethidiumbromid zugesetzt, so musste es zuvor noch in einem Ethidiumbromid-Bad (20 ppb (m/V) kommerzielle

---

Ethidiumbromid-Stammlösung in dH<sub>2</sub>O) für 30 min unter leichter Rotation auf einem Schütteltisch gefärbt werden.

### 3.2.6.2 Pulsfeld-Gelelektrophorese

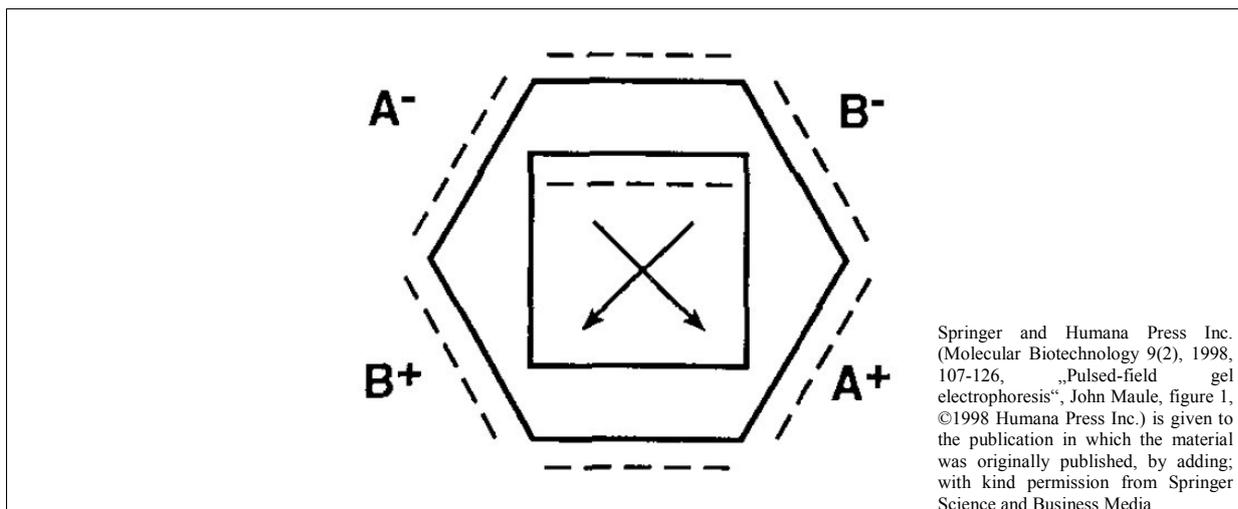
Die Pulsfeld-Gelelektrophorese hat ihre Ursprünge in den frühen 1980er Jahren [172] und kann als Spezialfall der Agarose-Gelelektrophorese angesehen werden. Durch einige verfahrenstechnische Besonderheiten wird das Auflösungsvermögen dabei auf ca. 1,2 Mb erhöht. In diesem Bereich kann man bei dem Vergleich von Schnittmustern verschiedener Stämme nach Makrorestriktion beurteilen, ob diese einer möglichen Verwandtschaft unterliegen oder sogar als klonal anzusehen sind.

Gemeinsam mit der Agarose-Gelelektrophorese hat die PFGE das grundsätzliche Prinzip, nämlich die Trennung von DNA-Molekülen in einem Agarosegel durch Anlegen eines elektrischen Feldes. Bei der PFGE erfolgt jedoch eine spezielle Probenvorbereitung, die verwendete Agarose ist ein etwas anderer Typ und auch der apparative Aufbau ist ein wenig anders, um das namensgebende Pulsfeld zu erzeugen.

Bei der normalen Agarose-Gelelektrophorese ist die Abhängigkeit zwischen Molekülgröße und Wandergeschwindigkeit bis zu einer bestimmten Molekülgröße logarithmisch, dann ab einer bestimmten Größe jedoch linear. Dies ist in etwa bei 25 kb der Fall und kommt durch eine Parallelausrichtung der zu trennenden Moleküle im elektrischen Feld zu Stande. Die PFGE umgeht dieses Phänomen: durch ein gepulstes elektrisches Feld zwingt man die DNA-Moleküle entsprechend der Pulsfrequenz des Feldes jeweils zu einer Neuausrichtung. Man kann sich vorstellen, dass größere Moleküle für diese Neuausrichtung länger brauchen als kleinere Moleküle. Dieses Prinzip verstärkt den Größenfaktor, der der Trennung zu Grunde liegt, und ist der Hauptgrund für die deutlich höhere Auflösung. Das in dieser Arbeit benutzte Gerät zur Erzeugung des Pulsfeldes bot die inzwischen gängige Möglichkeit, die Pulszeit als Gradienten über den Gesamtzeitraum der Elektrophorese zwischen zwei eingestellten Rahmenwerten (initial und final switch time) kontinuierlich zu verändern. Dies bietet den Vorteil, dass man nicht auf eine definierte Pulszeit während der gesamten Elektrophorese beschränkt ist. Die jeweilige Pulszeit hängt direkt mit einem bestimmten, besonders gut aufgelösten Bereich im Gesamtbild zusammen, da sie immer nur zur optimalen Retention einer bestimmten Molekülgröße führt. Zu kleine Moleküle richten sich für eine bestimmte Pulszeit vielleicht zu schnell neu aus, während zu große Moleküle eventuell erst eine bspw.

halbe Neuorientierung vollzogen haben. Dieser gut aufgelöste Bereich kann durch Anlegen eines Pulszeitgradienten erweitert werden.

Bezüglich der zahlreichen Untertypen der PFGE, die es mittlerweile gibt [173], sind Unterschiede meist bei der Geometrie der Elektroden zu finden, welche das Pulsfeld generieren. In dieser Arbeit kam eine Pulsfeldkammer mit CHEF-Konfiguration (Contour-Clamped Homogeneous Electric Fields) [174] zum Einsatz.



**Abbildung 3–3: Schema der CHEF-Konfiguration (PFGE).** Aus [173]. Das Quadrat in der Mitte stellt das Agarosegel mit seinen Taschen dar. A bzw. B zeigt die jeweilige Ausrichtung des elektrischen Feldes bei den Pulsen an, die zusammen mit der entsprechenden Migrationsrichtung auch durch die Pfeile angedeutet wird. Aus der Konfiguration wird deutlich, dass es nicht möglich ist, eine perfekt parallele Migration zwischen den einzelnen Spuren zu erreichen, da jede Position und Spur im Gel einem relativ leicht anderen Winkel zum Feld ausgesetzt ist. Die Vektorsumme der Pfeile zeigt auf einen Punkt in der Mitte der untersten Elektrode, wohin auch die Migrationsrichtungen der Moleküle orientiert sind.

Möchte man große DNA auftrennen, muss man sie besonders schonend isolieren und behandeln, da sie äußerst anfällig für Scherung durch mechanische Manipulation ist. Bei der PFGE wird die DNA daher in Agarose eingebettet: man fixiert die entsprechenden Zellen zunächst in Agarose, löst dann ihre Zellwände innerhalb der Agarose auf und führt anschließende Spaltungen mit Restriktionsenzymen innerhalb der Agarose durch. So wird eine Scherung der DNA etwa durch pipettieren minimiert, was aber auf der anderen Seite einen gewissen Arbeitsaufwand mit sich bringt.

Die Agarose, die man bei der PFGE verwendet, muss hinsichtlich enthaltener Ionen hohen Reinheitsansprüchen genügen – der Wert der Elektroendosmose muss möglichst klein sein.

Im Folgenden wird beschrieben, wie bei der Durchführung einer PFGE praktisch vorgegangen wurde.

**Tag 1:** Bakterien als ÜNK anzüchten.

**Tag 2:** Einbettung in Agarose.

Zunächst wurden ein Schüttelwasserbad auf 54 °C, ein kleines Wasserbad auf 37 °C sowie eine Großzentrifuge inkl. Kunstharzeinsätzen für 15 ml Schraubgefäße auf 4 °C vortemperiert.

Von den Bakterienkulturen wurde jeweils die OD<sub>578</sub> gemessen (ausgehend von 1 ml unverdünnter Kultur), dann wurde in einem 15 ml Schraubgefäß jede Kultur mit LB-Medium auf ein Zielvolumen von 5 ml und eine OD<sub>578</sub> von 0,3 verdünnt (dies entspricht etwa 10<sup>8</sup> KbE/ml). Die Schraubgefäße wurden dann für 15 min bei 4000 U/min und 4 °C zentrifugiert. In der Zwischenzeit wurde Blöckchenagarose vorbereitet: zu 0,36 g Broad-Range-Agarose wurden 30 ml dH<sub>2</sub>O gegeben (1,2 % (m/V)). Die Suspension wurde aufgekocht bis eine klare Lösung entstand, verdunstetes Wasser wurde zur Ausgangsmasse ergänzt. Die Lösung wurde dann im verschlossenen Gefäß bei 54 °C im Schüttelwasserbad unter leichter Rotation gelagert.

Nach dem Zentrifugieren wurde der Überstand jeweils verworfen und das Pellet in 5 ml CSB-Puffer aufgenommen und gevortext. Die Schraubgefäße wurden für 15 min bei 4000 U/min und 4 °C zentrifugiert. Dieser Zeitraum wurde genutzt, um verschiedene Vorbereitungen zu treffen. Die Form für die späteren Agaroseblöckchen wurde von unten mit milchigem Klebeband abgeklebt. Proteinase K wurde abgewogen und in Reinstwasser gelöst (zu 20 mg/ml, auf Eis gelagert; insgesamt wurden jeweils 50 µl dieser Lösung pro Probe benötigt). Ferner wurde pro Probe ein 1,5 ml Reaktionsgefäß vorbereitet.

Nach Beendigung des Zentrifugationsschrittes wurde abermals der Überstand entfernt. Verbliebener Überstand wurde mit Hilfe einer 100 µl-Kolbenhubpipette abgenommen. Das Pellet wurde in 500 µl CSB-Puffer durch auf- und abpipettieren resuspendiert. Jeweils 200 µl dieser Suspensionen (mit ca. 2x10<sup>7</sup> KbE) wurden in die vorbereiteten 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt und um je 10 µl der Proteinase-K-Lösung ergänzt. Die Lösung wurde durch 5- bis 6-maliges Auf- und Abpipettieren gemischt und dann für 10 min bei 37 °C im Wasserbad inkubiert.

Darauf folgte das Gießen von Blöckchen. Zunächst wurden alle benötigten Komponenten (d.h. Reaktionsgefäße und Blöckchenform sowie eine 1 ml-Kolbenhubpipette mit entsprechenden Spitzen) in der Nähe des Schüttelwasserbads mit der vorbereiteten Blöckchenagarose aufgebaut. Das Schüttelwasserbad wurde ausgeschaltet und das Gefäß mit der Blöckchenagarose geöffnet, jedoch im Wasserbad stehen gelassen. Nun wurden mit der

---

Kolbenhubpipette 200 µl der flüssigen und auf 54 °C temperierten Agarose entnommen und zu den 210 µl der Bakteriensuspension gegeben. Die verdünnte Suspension (nun mit ca.  $10^7$  KBE) wurde durch Auf- und Abpipettieren gemischt und schließlich wieder zu 200 µl luftblasenfrei entnommen. Damit wurden zunächst zwei der Öffnungen der Blöckchenform befüllt, in dem die Pipettenspitze am schmalen Rand der jeweiligen Öffnung positioniert wurde. Dies war hinsichtlich der Vermeidung von Lufteinschlüssen förderlich. Die Befüllung erfolgte ein wenig über die Oberkante hinaus, denn beim Erstarren der Agarose kommt es zu einer gewissen Volumenkontraktion. Für die dritte und finale Form wurde neue Suspension entnommen. Um hier Zeit zu sparen, konnte die Kolbenhubpipette auf 200 µl eingestellt bleiben, und man benötigte hier auch nur ungefähr 100 µl. Eingesaugte Luft wurde herausgedrückt, und, sobald die Agarose die Spitze gefüllt hatte, im gleichen Zug die dritte Form befüllt. Mit den übrigen Bakteriensuspensionen wurde analog verfahren. Die befüllten Formen, die zu einer Bakteriensuspension gehörten, wurden kenntlich gemacht, um Verwechslungen vorzubeugen. Problematisch an diesem Teil des Protokolls war sicherlich das luftblasenfreie Befüllen der Formen, bevor die Agarose erstarrte. Hier hatte es sich neben einer zügigen Arbeitsweise bewährt, die Agarose möglichst immer in Bewegung zu halten, d.h. einen längeren Stillstand etwa in der Pipettenspitze zu vermeiden. Die befüllte Form wurde am Ende für 20 bis 30 min in den Kühlschrank (4 °C) gestellt. Während dieser Zeit wurden pro Probe 1,5 ml Cell-Lysis-Puffer und 40 µl der Proteinase-K-Lösung in einem 2 ml Reaktionsgefäß zusammengegeben.

Nach der Kühlphase wurden die 3 Blöckchen einer Kultur in das jeweils vorbereitete 2 ml Reaktionsgefäß gegeben. Dazu wurde das Klebeband vorsichtig vom fraglichen Bereich der Form abgezogen und das Blöckchen mit Hilfe eines passgenauen, gereinigten Stempels von unten direkt in das offene Gefäß gedrückt. Die leere Form wurde abschließend zur Reinigung über Nacht in ein Seifenbad gelegt. Die Reaktionsgefäße mit den Blöckchen wurden für 2 h zunächst bei 54 °C und 130 U/min im Schüttelwasserbad inkubiert. Gegen Ende dieser Periode (nach ca. 1,5 h) wurde die Temperatur des Schüttelwasserbades auf 50 °C und die Rotation auf 100 U/min gesenkt. Pro Probe wurden 10 ml dH<sub>2</sub>O in einem 50 ml Spitzschraubgefäß vorgelegt und im gleichen Wasserbad vorgewärmt, ebenso Vorratsflaschen mit dH<sub>2</sub>O und TE-Puffer.

Nach Ablauf der zweistündigen Inkubationsdauer folgte ein mehrschrittiger Waschprozess. Zunächst wurden die Blöckchen aus je einem Reaktionsgefäß in jeweils eines der Spitzschraubgefäße überführt, indem erst die Flüssigkeit aus den Reaktionsgefäßen

---

abgegossen wurde und dann die Blöckchen einfach in das Schraubgefäß gekippt werden konnten. Die Spitzschraubgefäße wurden verschlossen und für 15 min im Schüttelwasserbad inkubiert. Nach dieser Periode wurde die Flüssigkeit vorsichtig abgegossen (zur Sicherheit wurde hier nicht direkt über einem einzelnen Abfallgefäß gearbeitet, sondern über einer stets ausgeleerte Petrischale, falls ein Blöckchen herausfallen sollte) und durch neue 10 ml des vorgewärmten dH<sub>2</sub>O ersetzt. Es erfolgte eine erneute Inkubation und eine weitere Wiederholung des Prozesses. Nach insgesamt 3 Durchgängen mit dH<sub>2</sub>O wurde der Prozess insgesamt 4x mit dem vorgewärmten TE-Puffer wiederholt. Während des letzten Durchgangs wurden parallel je 900 µl TE-Puffer in einer der Anzahl verwendeter Ausgangskulturen entsprechenden Menge von 1,5 ml Reaktionsgefäßen gegeben. Nach Abschluss des Waschvorganges wurden die Blöckchen einer Kultur in eines der Reaktionsgefäße gegeben und bis zum nächsten Tag bzw. bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C im Kühlschrank gelagert.

**Tag 3:** Schnitte anfertigen, Restriktionsverdau, PFGE, Detektion.

Pro Probe (d.h. sämtlichen Schnitten einer Kultur) wurden zunächst 225 µl dH<sub>2</sub>O und 25 µl 10fach konzentrierter Restriktionspuffer des noch zu verwendenden Enzyms in 1,5 ml Reaktionsgefäßen vorgelegt. Um Schnitte von den Blöckchen anzufertigen, wurden diese aus dem Reaktionsgefäß entnommen und auf einem mit Ethanol gereinigten Objektträger plan platziert. Jedwede überstehende Flüssigkeit wurde mit einem saugfähigen Papiertuch entfernt. Der Schnitt wurde mit einer mit Ethanol gereinigten Bügelklinge durchgeführt. Dazu wurde zunächst ein Begradigungsschnitt durchgeführt, der etwas Verschnitt und eine gerade Kante am Blöckchen lieferte. Dann wurde ein ca. 1 mm dicker Schnitt angefertigt: die Bügelklinge wurde zunächst ohne Druck angesetzt und dann durch eine schnelle, möglichst senkrechte Bewegung der Schnitt erzeugt. Der Vorgang wurde wiederholt, bis 2 bis 3 Schnitte zufriedenstellender Qualität erzeugt wurden. Insbesondere hinsichtlich der erzeugten Dicke war zu beachten, dass die Schnitte auf dem Objektträger nicht umkippten; in diesem Fall waren sie zu dünn, was beim späteren Einsetzen in das Pulsfeldgel zu Problemen hätte führen können. Die Reste der Blöckchen wurden zurück in ihr Ausgangsgefäß befördert, die Schnitte einer Kultur (mit rechnerisch je ca.  $2 \times 10^5$  KbE) in die jeweils vorbereiteten Restriktionspuffer, Verschnitte wurden entsorgt. Nachdem dieser Vorgang für die gewünschten Kulturen bzw. Blöckchen durchgeführt wurde, erfolgte eine Inkubation für 1 h bei Raumtemperatur (Vorverdau). Parallel wurde ein Wasserbad auf 37 °C vorgewärmt sowie Ansätze für die folgende Restriktionsspaltung vorbereitet. Pro Probe (d.h. allen Schnitten

---

einer Kultur) wurden 50 µl benötigt, deren Zusammensetzung den Angaben in Tabelle 3–24 entspricht:

Tabelle 3–24: Zusammensetzung des Restriktionsansatzes für PFGE

Komponente	V für n = 1	resultierende Konzentration im Ansatz
10fach konzentrierter Puffer (FastDigest®)	5 µl	1 fach
FastDigest® Restriktionsenzym	3 µl	20-50 U pro 100 µl Schnitt
Σ	8 µl	
Endvolumen	50 µl	
Reinstwasser	42 µl	

Nach Ablauf der Dauer des Vorverdaus wurde dieser vorsichtig mit einer Kolbenhubpipette entfernt, ohne die Schnitte mit abzusaugen. Es wurden je 50 µl des Restriktionsansatzes hinzugegeben, gefolgt von einer vierstündigen Inkubation bei enzymespezifischer Temperatur (hier stets 37 °C). Währenddessen (ungefähr zur Hälfte der Inkubationszeit der Restriktionsspaltung) wurde das PFGE-Gel gegossen. Die Komponenten der Gelapparatur wurden feucht abgewischt, um vor allem Staubpartikel zu entfernen. Dann wurde die Apparatur zusammengebaut und ihre Oberfläche nivelliert. Der Kamm wurde in seiner Halterung fixiert und auf die Apparatur gesetzt. Es wurde ein einprozentiges Pulsfeldagarosegel vorbereitet, indem zunächst 1,1 g Broad-Range-Agarose in einem sauberen Erlenmeyerkolben eingewogen und dann 110 ml 0,5x TBE-Puffer ergänzt wurden. Für diesen Zweck und für die Elektrophoresekammer wurden an dieser Stelle direkt 2,5 bis 3 Liter aus einer 10x TBE-Stammlösung verdünnt. Die Agarosesuspension wurde in der Mikrowelle erhitzt, bis sie eine klare Lösung ergab, und dann vergleichsweise heiß in die Gelapparatur gegossen. Nach einer kurzen Wartezeit, in der eventuell aufsteigende Luftblasen mit einer Pipettenspitze entfernt wurden, wurde die Apparatur komplett abgedeckt, um einen Staubeintrag während des 1,5 h dauernden Erstarrungsprozesses zu minimieren.

Ungefähr eine Stunde vor Ende der Restriktionsspaltung wurden 2 Liter 0,5x TBE-Puffer in die Elektrophoresekammer eingefüllt und deren Pumpen- und Kühlkreislauf gestartet. Die eingestellte Temperatur betrug 14 °C bei einer Durchflussgeschwindigkeit von 80 % des Maximums. Ferner wurde Blöckchenagarose bis zum Entstehen einer klaren Lösung aufgeköcht und bei 54 °C und geringer Rotation im Schüttelwasserbad gelagert.

Das Erstarren des Gels sowie die Verdauzeit waren in etwa gleichzeitig beendet. Der Kamm wurde durch vorsichtiges Hebeln aus dem Gel gezogen, um dieses mit den Schnitten beladen

zu können. Pro Restriktionsverdau wurde ein Schnitt in eine Tasche eingesetzt, wobei der Schnitt aufrecht, bodenbündig und bezüglich seiner breiten Seite bündig zu der der Laufrichtung zugewandten Seite der Tasche eingesetzt wurde. Das Entfernen desjenigen Rahmens der Gelapparatur, welcher an der Seite mit der Taschenleiste befestigt war, vereinfachte die Beobachtung der korrekten Positionierung. Diese erfolgte durch Platzierung eines Schnitts, der mit einer Pipettenspitze aus dem Verdau-Ansatz gezogen wurde, quer liegend auf einer mit Ethanol gereinigten Skalpellspitze, die dann vorsichtig senkrecht und wandnah in die Tasche eingeführt wurde. Mit Hilfe eines weiteren Werkzeugs wurde der Schnitt an Ort und Stelle gehalten, während das Skalpell unter ihm weggezogen wurde. Durch vorsichtiges Drücken von oben mit dem Werkzeug wurde der Schnitt in Position gebracht. Nicht benötigte Schnitte konnten für einen begrenzten Zeitraum bei 4 °C im Kühlschrank gelagert werden. Ein gegebenenfalls mitaufgetragener Größenmarker, der im Falle der PFGE stets in Gelform vorliegt, wurde nun ebenfalls vorbereitet. Das Vorgehen entspricht im Wesentlichen demjenigen zur Erzeugung der Schnitte aus den Blöckchen, d.h. es wird eine ca. 1mm dicke Scheibe des Markergels abgeschnitten. Diese wurde dann auf einen ca. 1mm hohen Schnitt der Scheibenmitte reduziert, der dann wie die anderen Schnitte in eine Tasche eingesetzt wurde. Wichtig war hier noch einmal die vorherige Reinigung aller Instrumente, die eventuell vorher mit Restriktionsansätzen in Berührung kamen. Mit Hilfe einer 1 ml-Kolbenhubpipette wurden dann alle (auch leere) Taschen mit der warmen Blöckchenagarose luftblasenfrei verschlossen und das zugefügte Gel für 10 bis 15 min bei Raumtemperatur bis zum Erstarren ruhen gelassen. Währenddessen wurden die PFGE-Parameter an der Elektrophoresekammer eingestellt.

Die Gelapparatur wurde auseinandergebaut und der Gelträger mit Hilfe von fusselreifen Papiertüchern von Gelresten befreit, welche sonst in den Kühlkreislauf hätten gelangen können. Das Kühlaggregat der Kammer wurde ausgeschaltet und das Gel samt Träger in die entsprechende Mulde in der Kammer eingesetzt. Die Kammer wurde geschlossen, das Kühlaggregat reaktiviert und die Elektrophorese gestartet.

Nach Beendigung der Elektrophorese am Folgetag wurden alle Komponenten der Kammer ausgeschaltet, das Gel entnommen und vom Träger herunter in eine Ethidiumbromid-Färbelösung (500 ml dH<sub>2</sub>O mit 30 ppb (m/V) Ethidiumbromid aus einer kommerziellen Stammlösung) überführt, in der es unter geringer Rotation (ca. 35 U/min) für 20 bis 30 min auf einem Schütteltisch gefärbt wurde. Anschließend wurde das Gel nach Überführung für 10 bis 20 min bei gleicher Rotation in dH<sub>2</sub>O gewaschen, um anschließend entnommen und in

---

einer Dokumentationsanlage graphisch festgehalten zu werden. Abschließend erfolgte die Reinigung aller benutzten Gerätschaften und Komponenten.

Die PFGE-Parameter waren mit denjenigen der S1-PFGE identisch und sind in Tabelle 3–2 (S. 108) aufgeführt.

### **3.2.7 Übertragung von genetischem Material**

#### **3.2.7.1 Konjugation**

Konjugation bezeichnet den Vorgang der Übertragung von Plasmiden über einen als Pilus bezeichneten Kanal von Bakterium zu Bakterium. Dabei wird eine Kopie des Plasmids vom Donor zum Rezipienten übertragen [175]. Damit dadurch ein Transkonjugand entsteht, muss das übertragene Plasmid kompatibel zu bereits im Rezipienten eventuell vorhandenen, anderen Plasmiden sein.

Man unterscheidet konjugierbare und mobilisierbare Plasmide. Konjugierbare Plasmide bringen sämtliche genetischen Elemente, die zur Übertragung notwendig sind, selbst mit. Hier ist etwa das *pil*-Gen zu nennen, welches für die Ausbildung des Pilus codiert. Bei mobilisierbaren Plasmiden liegen einige dieser Gene diesbezüglich *in trans* vor. Die Plasmide verfügen etwa nicht selbst über Gene zur Ausbildung des Pilus. Sie verfügen jedoch über die für die eigentliche Initiierung der Übertragung notwendigen Gene. Mobilisierbare Plasmide sind für ihre Übertragung folglich auf sogenannte Helferplasmide angewiesen, die die genannten Faktoren ergänzen. Daraus folgt auch, dass ein mobilisierbares Plasmid nicht weiter übertragen wird, wenn es in einen Rezipienten ohne Helferplasmid gelangt [175].

Es gibt verschiedene Arten von Pili. Vergleichsweise lange, flexible Pili erlauben Konjugationen in dynamischer Umgebung eher als kurze, starre Pili. Diese begünstigen eine Konjugation in eher statischen Umgebungen [176].

Konjugationsversuche sollen klären, ob ein Bakterium ein konjugierbares Plasmid besitzt. In diesem Sinne handelt es sich dabei um Versuche, die der näheren Charakterisierung eines Stammes dienen oder auch epidemiologische Fragestellungen beantworten sollen. Daneben wird die Konjugation auch zur gezielten Übertragung von Genen bzw. Plasmiden im Sinne einer molekularbiologischen Methode benutzt.

In beiden Fällen ist die konjugative Übertragung eines Plasmids an die Präsenz eines Resistenzmarkers auf demselben gebunden, den man bei den Transkonjuganden selektieren

---

kann. Man wählt als Rezipienten einen Stamm, der chromosomal codiert einen Resistenzmarker besitzt, welcher bei dem Donor nicht vorhanden ist. Selektiert man nach der Konjugation (dem sog. Mating, engl. für Paarung) auf den Resistenzmarker des Rezipienten und zusätzlich auf den fraglichen Resistenzmarker des Plasmids, selektiert man folglich ausschließlich Transkonjuganden. Statt eines Resistenzmarkers des Rezipienten könnte man auch eine Stoffwechselfungelmutation im Donor ausnutzen, gegen die man durch die Wahl entsprechender Bedingungen selektiert. Es sind also je nach System individuelle Vorgehensweisen möglich.

Grundsätzlich muss man bei Konjugationsversuchen Kontrollen mitführen, die die folgenden Punkte belegen bzw. klären sollen: 1. Donor und Rezipient sind zum Zeitpunkt des Matings vital; 2. bei der Selektion der Transkonjuganden selektiert man erfolgreich gegen Donor und Rezipient; und 3. die Resistenzmarker von Donor bzw. zu übertragendem Plasmid und Rezipient kann man zur wechselseitigen Selektion gegeneinander nutzen.

Man spricht von einem biparentalen Mating, wenn man nur Rezipient und Donor für das Mating einsetzt. Beim triparentalen Mating kommt ein weiterer Stamm hinzu, welcher seinerseits ein konjugierbares Helferplasmid besitzt. Sollte der Donor über ein mobilisierbares Plasmid verfügen, aber über kein eigenes Helferplasmid, ist er nach der Übertragung des Helferplasmids vom dritten Stamm in der Lage, sein mobilisierbares Plasmid zu übertragen [175].

Je nach der gewählten Matrix, in der das Mating stattfindet, unterscheidet man verschiedene Mating-Typen. Broth Matings etwa finden in einem flüssigen Nährmedium statt. Die in dieser Arbeit erfolgten Matingtypen Plate Mating und Filter Mating werden im Folgenden beschrieben.

### 3.2.7.1.1 Plate Mating

Beim Plate Mating erfolgt die Paarung der Bakterien auf einem Agar-Nährboden, es handelt sich also um ein Festphasen-Mating.

Diesbezüglich wurde nach einem Protokoll von N. Willetts [176] vorgegangen. Es wurden ÜNK von Donor und Rezipient erzeugt. Am Folgetag wurden je 100 µl beider Kulturen auf die Mitte eines sterilen LB-Nährbodens gegeben, welcher seinerseits bereits die Bedingungen zur Selektion der Resistenzmarker des erwarteten Transkonjuganden erfüllte (vgl. Kapitel 4.1.6, S. 186). Die Mischung aus Donor- und Rezipientenkultur wurde dann mit Hilfe eines

---

---

sterilen Glasstabs homogen auf dem Nährboden verteilt. Eine kurze Wartezeit ließ überstehende Flüssigkeit in den Nährboden einziehen. Die Petrischale wurde dann verschlossen und in einem Brutschrank bei 37 °C so lange inkubiert, bis Kolonien sichtbar waren.

Willetts bezeichnet diese Variante als ein vergleichsweise einfaches System, führt jedoch auch an, dass es unter Umständen erforderlich sei, das Mating nicht auf einem selektiven Nährboden durchzuführen, sondern dafür ggf. einen nicht selektiven Nährboden zu wählen. Dies sei dann der Fall, wenn bis zur Ausbildung des gewünschten Resistenzphänotyps der erwarteten Transkonjuganden eine gewisse Zeit vergehe. In diesem Fall könne man die entstandenen Kolonien (Donor-, Rezipienten- und ggf. Transkonjugandenkolonien) vom nicht selektiven Nährboden abnehmen und in Nährmedium resuspendieren, um diese Suspension dann auf einem für die Transkonjuganden selektiven Nährboden auszuimpfen und zu inkubieren. Diese minimal aufwändigere Variante war in dieser Arbeit nicht erforderlich.

#### 3.2.7.1.2 Filter Mating

Beim Filter Mating erfolgt die Paarung von Donor und Rezipient auf sterilen Rundfilterpapieren. Auch hier handelt es sich um ein Festphasen-Mating.

Von Donor und Rezipient wurden ÜNK hergestellt. Am Folgetag wurden Rundfilter (S&S Rundfilter 595, Ø 70 mm) durch 30 minütiges Kochen in siedendem dH<sub>2</sub>O sterilisiert. Ein Rundfilter wurde dem Wasser mit einer sterilen Pinzette entnommen und unter aseptischen Bedingungen mittig auf einen sterilen LB-Nährboden platziert. Der Nährboden diente hier einerseits als statische Unterlage für das Rundfilter und andererseits als vorbeugende Maßnahme gegen ein Austrocknen des Filters. Nach einer kurzen Wartezeit, in der übermäßige Feuchtigkeit des Rundfilters durch den Nährboden aufgenommen wurde, wurden jeweils 150 µl der Donor- und Rezipientenkultur mittig auf den Rundfilter pipettiert. Abermals diente eine kurze Wartezeit der Absorption überstehender Flüssigkeit durch den Nährboden. Dann wurde die Petrischale verschlossen, mit der Nährbodenseite nach unten in einen Brutschrank gelegt und für 6 h bei 37 °C inkubiert.

Nach diesem Zeitraum wurde das Filter unter aseptischen Bedingungen mit einer sterilen Pinzette abgenommen und in ein Glasröhrchen mit 4,5 ml einer sterilen, isotonischen Natriumchlorid-Lösung überführt. Durch Vortexen derselben wurden Donor-Zellen, Rezipienten-Zellen und ggf. Transkonjuganden resuspendiert. Die Suspension wurde mit

---

weiteren Glasröhrchen mit 4,5 ml steriler, isotonischer Natriumchlorid-Lösung in einer Verdünnungsreihe 2x 1:10 verdünnt.

Die Kulturen von Donor, Rezipient sowie die ausgehend vom Rundfilter erzeugten Suspensionen und deren Verdünnungen wurden auf geeigneten Nährböden ausplattiert (vgl. Kapitel 4.2.10, ab S. 234, Kapitel 4.2.11.3.2, ab S. 243 und Kapitel 4.2.12.1, S 246f).

### 3.2.7.2 Transformation

#### 3.2.7.2.1 Calciumchlorid-Methode

Die Calciumchlorid-Transformation lässt sich in zwei Einzelschritte unterteilen. Erstens muss zunächst das Zielbakterium durch Behandlung mit Calciumchlorid kompetent gemacht werden, d.h. aufnahmebereit für das zu übertragende, genetische Material, und zweitens der eigentlichen Transformation der kompetenten Zellen. Die Behandlung einer Bakterienkultur mit einer Calciumchlorid-Lösung macht die Bakterien quasi porös. Diese Porosität ist insbesondere bei niedrigen Temperaturen verhältnismäßig stabil. Gibt man DNA hinzu, lagert sich diese unter anderem an die poröse Zelloberfläche an. Eine spontane Temperaturerhöhung führt dann dazu, dass ein Teil der Bakterien das genetische Material aufnimmt.

Diese Methode wurde entweder mit frisch hergestellten,  $\text{CaCl}_2$ -kompetenten Bakterien durchgeführt, oder mit länger zu lagernden,  $\text{CaCl}_2$ -kompetenten Bakterien (sog. „gefrierkompetenten“ Bakterien).

##### 3.2.7.2.1.1 Transformation frisch hergestellter, kompetenter Bakterien

Der zu transformierende Stamm wurde als ÜNK angelegt. Am Folgetag wurden 50 ml steriles LB-Medium in einem verschließbaren Erlenmeyerkolben mit 500  $\mu\text{l}$  der ÜNK beimpft (was in etwa einer 1:100-Verdünnung entspricht). Während das beimpfte Medium bei 37 °C und 130 U/min inkubiert wurde, wurden eine sterile 100 mM  $\text{CaCl}_2$ -Lösung sowie 50 ml Spitzschraubgefäße im Kühlschrank bei 4 °C kühl gelagert. Ferner wurde eine Großzentrifuge auf 4 °C temperiert.

Das Wachstum der Kultur wurde mit einem Photometer regelmäßig durch Vermessung ihrer  $\text{OD}_{546}$  geprüft. Die Inkubation der Kultur wurde erst bei einem Wert von ca. 0,5 bis 0,7 beendet. Die dann folgenden Arbeitsschritte erfolgten alle unter Kühlung durch Eis. Zunächst wurde die Bakteriensuspension in ein vorgekühltes 50 ml Schraubgefäß überführt und für

5 min bei 5500 U/min und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt. Dem Rückstand im Schraubgefäß wurden nun 10 ml der gekühlten, 100 mM CaCl<sub>2</sub>-Lösung hinzugegeben. Der Zellrückstand wurde durch Schwenken resuspendiert. Diese Suspension wurde dann für 30 min auf Eis kühl gelagert. Der Zentrifugationsschritt wurde wiederholt, der Überstand abermals verworfen und das Pellet in 1 ml der CaCl<sub>2</sub>-Lösung resuspendiert. Diese nunmehr kompetenten Zellen konnten direkt einer Transformation zugeführt oder auch über Nacht bei 4 °C im Kühlschrank gelagert werden, um sie am Folgetag zu verwenden.

Für die Transformation wurden 80 µl der kalten Zellsuspension in ein 500 µl Reaktionsgefäß überführt und auf Eis gelagert. Dem wurden 80 bis 200 ng Plasmid-DNA hinzugefügt (wobei darauf zu achten war, dass das zugegebene Volumen nicht wesentlich mehr als 10 % des Volumens der Zellsuspension betrug). Der Ansatz wurde für 30 min auf Eis gelagert. In der Zwischenzeit wurde pro Ansatz 1 ml steriles SOC-Medium in ein steriles Kulturröhrchen mit Aluminiumkappe abgefüllt und ein für 500 µl Reaktionsgefäße geeigneter Thermocycler auf 42 °C temperiert. Das Reaktionsgefäß wurde nach Abschluss der Inkubationsdauer aus dem Eis direkt in den Thermocycler gestellt und dort für 2 min 42 °C ausgesetzt. Anschließend wurde das Reaktionsgefäß für weitere 5 min auf Eis gelagert und der Inhalt danach durch Pipettieren in das vorab abgefüllte SOC-Medium überführt. Das entsprechende Kulturröhrchen wurde für 30 min bei 37 °C und 130 U/min inkubiert, dann wurde der Ansatz vollständig zu 100 µl bis maximal 400 µl auf geeigneten Nährböden ausgeimpft. Diese enthielten eine dem transformierten Plasmid entsprechende Selektionskomponente. Die Nährböden wurden über Nacht bei 37 °C in einem Brutschrank inkubiert.

#### 3.2.7.2.1.2 Transformation gefrierkompetenter Bakterien

Die Schritte entsprechen zunächst bis einschließlich der Herstellung einer 50 ml-Kultur des zu transformierenden Stammes denen der vorangegangenen Methode. Die Kultur wurde hier dann zunächst für 10 min auf Eis gelagert, bevor sie wie oben angegeben zentrifugiert wurde. Das resultierende Zellpellet wird in diesem Protokoll in 10 ml eiskaltem TFB 1 resuspendiert, abermals für 10 min auf Eis gelagert und erneut zentrifugiert. Die Resuspension erfolgte nun mit 2 ml eiskaltem TFB 2. Nach einer weiteren, zehnminütigen Lagerung auf Eis wurde die Suspension in Teilen von 100 µl in 500 µl Reaktionsgefäßen abgefüllt. Diese wurden bis zur Verwendung bei -80 °C gelagert.

---

Die Durchführung der Transformation entsprach den Angaben im vorangegangenen Protokoll.

### 3.2.7.2.2 Elektroporation

Die Transformation mittels Elektroporation ist eine Alternative zur Calciumchlorid-Methode und gilt als effizienter.

Das zu Grunde liegende Prinzip basiert auf einem kurzen, elektrischen Feld, welchem eine zuvor aufgereinigte Bakterienkultur zusammen mit dem zu übertragenden, genetischen Material ausgesetzt wird. Das elektrische Feld, verursacht durch eine Kondensatorentladung, sorgt für eine temporäre Permeabilität der Bakterien, die zu einer Aufnahme des genetischen Materials führt.

Die eingesetzte Zellsuspension und Lösung von Plasmid-DNA muss weitestgehend frei von Salzen sein, damit es nicht zum Kurzschluss bei der Elektroporation kommt. Ein solcher fällt i.d.R. mit einer gewissen Heftigkeit aus und führt zum Absterben der Bakterien.

Die Methode kam in dieser Arbeit nur im Zusammenhang mit der Transformation von *Klebsiella* spp. zum Einsatz. Im Folgenden ist die Durchführung geschildert.

Von dem zu transformierenden Stamm wurde eine ÜNK hergestellt. Analog zur Vorgehensweise bei der CaCl<sub>2</sub>-Methode wurde eine 1:100-Verdünnung in sterilem LB-Medium vorgenommen, dem hier jedoch 0,7 mM EDTA zugesetzt wurden [177]. Eine Inkubation bei 37 °C und 130 U/min erfolgte bis zu einer OD<sub>620</sub> von 0,2 bis 0,6. Bei Erreichen des Wertes wurde die Suspension in ein 50 ml Spitzschraubgefäß überführt und auf Eis auf 4 °C abgekühlt. Zuvor wurden die Großzentrifuge auf 4 °C temperiert und dH<sub>2</sub>O kalt gestellt.

Die gekühlte Suspension wurde für 15 min bei 7000 U/min zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 10 ml des kalten dH<sub>2</sub>O resuspendiert. Der Zentrifugationsschritt wurde wiederholt, der Überstand verworfen und das Pellet abermals in 10 ml dH<sub>2</sub>O resuspendiert. Der Schritt wurde erneut wiederholt, eine Resuspension erfolgte in diesem Durchgang mit 5 ml dH<sub>2</sub>O. Eine finale Wiederholung wurde mit einer Resuspension in 500 µl dH<sub>2</sub>O abgeschlossen. Die Lagerung der nun elektrokompetenten Bakterien erfolgte bis zur Verwendung auf Eis. Parallel zu diesen Waschprozessen wurde die erforderliche Anzahl von Elektroporationsküvetten bei -20 °C kalt gestellt.

Für die Transformation wurden 40 µl der elektrokompetenten Zellen und 200 ng des zu transformierenden Plasmids in einem Reaktionsgefäß gemischt und für 10 min auf Eis

---

---

gelagert. Der Transformationsansatz wurde durch Pipettieren in die kalte Elektroporationsküvette überführt, die Küvette in das Elektroporationsgerät eingesetzt und der elektrische Puls ausgelöst (1,8 kV/mm, 200  $\Omega$ , 25  $\mu$ F). Unmittelbar nach dem Puls wurde 1 ml steriles SOC-Medium hinzu pipettiert, der Ansatz dann in ein steriles Kulturröhrchen mit Aluminiumkappe überführt und für 1 h bei 37 °C und 130 U/min inkubiert. Das übrige Vorgehen entsprach dem der CaCl<sub>2</sub>-Methode.

### 3.3 Methoden der Proteinbiochemie

#### 3.3.1 Isolation äußerer Membranproteine nach Carlone et al. (mod.)

Die Isolation der Proteine der äußeren Membran (outer membrane proteins, OMPs) von Gram-negativen Bakterien erfolgte nach Modifikation einer Methode von Carlone et al. [178]. 1,5 ml einer ÜNK des zu untersuchenden Stamms wurde in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und für 10 min bei 5000 g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, die restliche Bakteriensuspension ergänzt und der Zentrifugationsschritt wiederholt. Der Überstand wurde erneut verworfen und das erhaltene Bakterienpellet durch auf- und abpipettieren mit 1,5 ml auf 4 °C gekühltem, 10 mM HEPES-Puffer, resuspendiert. Die erhaltene Suspension wurde für 2 min bei 15600 g und 4 °C zentrifugiert, der Überstand wurde gründlich durch Abkippen und anschließendes Ausklopfen des Reaktionsgefäßes entfernt. Nach diesen Waschschritten konnte das erhaltene Bakterienpellet als convenient stopping point bei -80 °C eingefroren oder aber direkt weiterverwendet werden.

Das Pellet wurde in 1 ml auf 4 °C gekühlten HEPES-Puffer resuspendiert. Die erhaltene Suspension wurde durch Behandlung mit einem Ultraschallstab aufgeschlossen. Dazu wurde das Reaktionsgefäß auf Eis gelagert und die Suspension dort für 3x 10 s mit intermittierenden, 10 sekundigen Pausen mit dem Ultraschallstab Bandelin mini20 (100 % Amplitude, Sonotrode MS 2.5) behandelt.

Dem Zellaufschluss durch Ultraschall liegt physikalisch die Entstehung von akustischen Kavitationen zu Grunde. Die longitudinalen Schallwellen, die das Medium durchlaufen, sind letztlich eine Abfolge von Bereichen unterschiedlichen Drucks. In den Niederdruckbereichen kann es zur Bildung von Kavitationsblasen kommen, wenn der dortige Druck kleiner als der Dampfdruck der Flüssigkeit wird. Die Blasen wachsen durch weitere Dampfbildung aus der umgebenden Flüssigkeit und implodieren ab einer kritischen Größe, was kurzfristige Druck-

und Temperaturspitzen verursacht. Eine Implosion in der Nähe einer (Bakterienzell-)Wand verhindert einen gleichmäßigen Flüssigkeitsnachstrom, was einen Impuls der Flüssigkeit auf die Wand bedingt. Diese Microjets genannten Strahlen werden als die treibende Kraft bei dem Zellaufschluss diskutiert, ebenso Scherkräfte durch die Druckspitzen sowie turbulente Strömungen und ein explosiver Dampfdruck innerhalb der Bakterien, wenn sie in Kontakt mit einer Kavitation kommen [179].

Durch eine zweiminütige Zentrifugation der behandelten Suspension bei 15600 g und 4 °C wurden nicht aufgeschlossene Zellen und Zelltrümmer abgetrennt. Der Überstand (1 ml) wurde in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und zwecks Sedimentation der enthaltenen Zellmembranen für 30 min bei 15600 g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das verbleibende Pellet durch auf- und abpipettieren in 200 µl HEPES-Puffer gründlich resuspendiert. 200 µl Natriumsarcosylat-Lösung wurden hinzugegeben und die Lösung für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Durch diesen Schritt werden Cytoplasmamembranen gelöst. Durch abermaliges Zentrifugieren für 30 min bei 15600 g und 4 °C werden die verbleibenden äußeren Membranen pelletiert. Der Überstand wurde verworfen, das zurückbleibende, mit bloßem Auge nunmehr kaum noch sichtbare Pellet durch auf- und abpipettieren in 50 µl HEPES-Puffer resuspendiert. Dieses Präparat wurde im Sinne einer OMP-Profilierung entweder direkt in einer SDS-PAGE weiterverwendet oder zur Lagerung bei -20 °C eingefroren.

### 3.3.2 SDS-PAGE

SDS-PAGE bezeichnet die Trennung von denaturierten Proteinmischungen anhand ihrer Größe im elektrischen Feld mittels Elektrophorese unter Verwendung von Polyacrylamidgelen als Matrix. SDS dient dabei als denaturierendes Agens und maskiert eventuell vorhandene Ladungsunterschiede der Proteine.

Im Einzelnen werden die Proteine zunächst üblicherweise auf eine gegebene Art extrahiert und gegebenenfalls weiter aufgereinigt. Durch eine 1:1-Mischung mit Probenpuffer und anschließender Inkubation bei 95 °C werden die enthaltenen Proteine denaturiert. Der Probenpuffer enthält SDS für oben genannten Zweck, außerdem Mercaptoethanol, welches Disulfidbrücken in Proteinen trennt. Zur denaturierten Probe wird SDS-PAGE-Ladepuffer gegeben, was die Probe beim Beladen des Gels sowie die Lauffront bei der Elektrophorese visualisiert.

Die Polyacrylamidgele werden aus Lösungen von Acrylamid und Bisacrylamid in situ polymerisiert. Dazu mischt man die Lösungen so, dass sie definierte Konzentrationen beider Komponenten enthalten, und ergänzt zu definierten Konzentrationen Tris-HCl-Puffer eines bestimmten pH-Wertes, SDS-Lösung, Ammoniumpersulfat als Radikalstarter und TEMED zur Stabilisierung freier Radikale.

Zu unterscheiden sind Trenn- und Sammelgele. Trenngele bilden das eigentliche Trennsystem, während Sammelgele den Bereich der Taschen zum Auftragen der Proben bilden sowie darüber hinaus eine kurze Laufstrecke bis zum Trenngel liefern. Gesteuert wird die entstehende Art des Gels neben der Konzentration von Acrylamid / Bis-Acrylamid über den pH-Wert, welcher durch Zugabe eines Tris-HCl-Puffers eingestellt wird. Das Sammelgel wird üblicherweise unter Verwendung eines Puffers hergestellt, welcher 2 pH-Stufen unterhalb des Puffers bei der Herstellung des Trenngels liegt.

### **3.3.2.1 SDS-PAGE von OMP-Präparaten**

Für die Untersuchung von OMP-Präparaten wurden 10 µl einer OMP-Präparation mit 10 µl Probenpuffer in einem 200 µl Reaktionsgefäß gemischt und für 5 min bei 95 °C inkubiert. Anschließend wurden 2 µl SDS-PAGE-Ladepuffer hinzugegeben. Bei der Elektrophorese kamen 17,5 %ige Polyacrylamidgele zum Einsatz. Die Glaskomponenten wurden vor Verwendung mit dH<sub>2</sub>O und absolutem Ethanol gereinigt. Zur Konstruktion einer Gelkassette wurde ein zugehöriges Glasplattenpaar durch einen U-förmigen Silikon-Spacer nach unten und zu den Seiten abgedichtet und der Zusammenhalt der nach oben offenen Konstruktion durch Anbringen von insgesamt sechs Klammern gewährleistet. Die Komponenten für das 17,5 %ige Trenngel wurden nach einem der beiden Rezepte entsprechend den Angaben in Tabelle 3–25 in der angegebenen Reihenfolge in einer 50 ml Probenröhre gemischt. Die Lösung wurde in die vorbereitete Gelkassette bis ca. 1 cm unterhalb des zu erwartenden unteren Randes des Probenkamms gegossen. Die eingefüllte Lösung wurde mit 400 µl sec-Butanol überschichtet. Nach 3 h wurde das Butanol mit Hilfe einer Spritze abgenommen und die Oberfläche des nun polymerisierten Trenngels mehrmals mit dH<sub>2</sub>O gespült. Verbliebenes Wasser wurde mit einem Stück Filterpapier weggesaugt, ohne dabei das Trenngel zu berühren.

Die Komponenten für das Sammelgel wurden analog den Angaben in Tabelle 3–26 in der angegebenen Reihenfolge in einer 15 ml Probenröhre gemischt und bis ca. 1 bis 2 mm

---

unterhalb der Kammaussparung der vorderen Platte in die Gelkassette gegossen. Der zwölfzählige Probenkamm wurde mit einer lateralen Bewegung in die Kassette eingesetzt und die Fuge zwischen Kamm und Glasplatte mit Hilfe einer Kolbenhubpipette mit Sammelgel-Lösung aufgefüllt. Das Gel wurde in dieser Form senkrecht stehend bei Raumtemperatur über Nacht gelagert und am nächsten Tag weiterverwendet.

Am nächsten Tag wurde der Silikon-Spacer aus der Gelkassette entfernt, diese in die Gelkammer eingesetzt und dann seitlich mit Klammern fixiert. Die Rückseite der Kammer wurde analog mit einer Glasplatte abgeschlossen. Die kammerseitig vorhandenen Dichtringe wurden, falls erforderlich, mit Dichtungsmittel bestrichen. Der obere Puffertank wurde mit SDS-PAGE-Laufpuffer befüllt und der Kamm gezogen. Die entstandenen Probenaschen wurden mit Hilfe einer Mikrospritze mit SDS-PAGE-Laufpuffer gespült und eventuell in den Probenaschen vorhandene Polymerisationsartefakte mit Hilfe einer Edelstahlkanüle entfernt. Die Dichtigkeit der Konstruktion wurde für einen kurzen Zeitraum beobachtet und anschließend, falls die Dichtigkeit für akzeptabel befunden wurde, der untere Puffertank mit SDS-PAGE-Laufpuffer befüllt. Der in den SDS-PAGE-Laufpuffer eintauchende Zwischenraum der Gelkassette wurde unter Verwendung einer Spritze mit gebogener Kanüle mit SDS-PAGE-Laufpuffer gespült und von jeglichen Luftblasen befreit, um einen optimalen Kontakt zwischen Gel und SDS-PAGE-Laufpuffer zu gewährleisten.

Nun wurde das Gel mit den denaturierten Proben sowie einem PAGE-Größenmarker mittels einer Mikrospritze beladen. Die Kammer wurde geschlossen und an einen Spannungsgeber angeschlossen, die Elektrophorese erfolgte bei 4 V/cm für 14,5 h.

Nach der Elektrophorese wurde der Spannungsgeber abgeschaltet, die Kammer geöffnet und der SDS-PAGE-Laufpuffer beseitigt. Die Gelkassette wurde aus der Kammer entnommen, vorsichtig geöffnet und die seitlichen Gelkanten mit Hilfe eines Spatels gelöst. Jegliche Manipulation am Gel erfolgte nun unter Benutzung von mit Wasser benetzten Polynitrilhandschuhen, um ein Ankleben des Gels an die Handschuhe und damit verbundenen Rissen vorzubeugen. Das Gel wurde vorsichtig unter Zuhilfenahme von dH<sub>2</sub>O in eine ausreichend große Glasschale überführt und eventuell vorhandenes Wasser entfernt. Eine Coomassie-Blue-Färbelösung wurde hinzugegeben, so dass das Gel gut bedeckt und beweglich in der Glasschale vorlag. Die Färbung erfolgte für 30 min bei 60 U/min auf einem Schütteltisch.

Die Coomassie-Blue-Färbelösung wurde abgenommen und durch ein äquivalentes Volumen

---

Entfärbelösung ersetzt. Die Entfärbung erfolgte für ca. 4 h bei 60 U/min unter gelegentlichem Austausch der Entfärbelösung.

Das Gel wurde entnommen und auf einem UV-conversion screen in einer Videodokumentationsanlage optisch digital erfasst.

Tabelle 3–25: Rezeptur für PAGE-Trenngel (17,5 %ig)

Rezept 1		Rezept 2	
Komponente	V	Komponente	V
40 % Acrylamid	8,75 ml	30 % Acrylamid	11,65 ml
2 % Bisacrylamid	0,87 ml	2 % Bisacrylamid	0,87 ml
1,5 M Tris-HCl pH 8,8	5 ml	1,5 M Tris-HCl pH 8,8	5 ml
dH <sub>2</sub> O	5,18 ml	dH <sub>2</sub> O	2,28 ml
10 % SDS	200 µl	10 % SDS	200 µl
10 % APS	65 µl	10 % APS	65 µl
TEMED	6,5 µl	TEMED	6,5 µl
Σ	20,0715 ml 17,52 %ig	Σ	20,0715 ml 17,44 %ig

Tabelle 3–26: Rezept für PAGE-Sammelgel

Komponente	V
30 % Acrylamid / 0,8 % Bisacrylamid	950 µl
0,5 M Tris-HCl pH 6,8	1,25 ml
Reinstwasser	2,9 ml
10 % SDS	50 µl
10 % APS	35 µl
TEMED	5 µl
Σ	5,19 ml 5,64 %ig

### 3.3.3 Isolation von $\beta$ -Lactamasen mittels Chloroform-Methode

Für die Extraktion von  $\beta$ -Lactamasen wurde auf eine auf Chloroform basierende Extraktionsmethode [180-182] zurückgegriffen.

1,5 ml einer ÜNK wurden in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und für 10 min bei 1100 g zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und das Zellepellet durch kurzes Vortexen im

verbliebenen Flüssigkeitsrückstand resuspendiert. Nun wurden 20 µl Chloroform hinzugegeben und erneut kurz gevortext. Nach einer 15 minütigen Inkubation bei Raumtemperatur wurden 200 µl 0,01 M Tris-HCl (pH 8,0) hinzugegeben und dann für 20 min bei 6000 g zentrifugiert. Dabei entstanden drei Phasen: unten im Reaktionsgefäß befand sich die organische Phase, darüber scheibenförmig feste Bestandteile, und oben die wässrige Phase. Letztere, die unter anderem die extrahierten  $\beta$ -Lactamasen enthielt, wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt, kühl gelagert und am selben Tag weiterverwendet.

Als Vergleich wurde bei dieser Methode ein  $\beta$ -Lactamase-freier Stamm mitpräpariert und ebenfalls den nachfolgenden Prozessen zugeführt.

### 3.3.4 Isoelektrische Fokussierung

Die isoelektrische Fokussierung (IEF) ist ein spezieller Fall der Protein-Trennung durch Elektrophorese, bei der die Trennung nicht anhand der Proteingrößen wie bei der SDS-PAGE, sondern anhand der isoelektrischen Punkte der Proteine erfolgt. Dies erreicht man durch Verwendung einer Matrix, in der ein immobilisierter pH-Gradient entlang der Laufrichtung vorhanden ist. Die Migration der Proteine im elektrischen Feld erfolgt zwar aufgrund der Eigenladung der Proteine, jedoch nur bis sie den pH-Wert ihres isoelektrischen Punktes erreichen. Dort sind sie elektrisch neutral und migrieren folglich nicht mehr weiter. Im Gegensatz bspw. zur SDS-PAGE gibt es also einen konkreten Endpunkt der Elektrophorese. In dieser Arbeit wurden nur fertige, kommerziell erhältliche IEF-Polyacrylamid-Gele zur Trennung von  $\beta$ -Lactamasen-Extrakte verwendet.

#### 3.3.4.1 Einstellen der Extrakte

Das Einstellen der Extrakte erfolgte angelehnt an die Angaben von S. Huovinen [183]. Der Sinn liegt vor allem in der anschließenden Verwendung von Extrakten ähnlicher Aktivität, was besonders bei der abschließenden Detektion relevant ist.

Zunächst wurde eine Nitrocefin-Stammlösung (1 mM (bzw. 0,5 mg/ml) in 0,1 M Phosphat-Puffer, pH 7,0) mit 0,1 M Phosphat-Puffer (pH 7,0) um den Faktor 10 verdünnt. Von dieser (gelben) Lösung wurden 150 µl in ein 0,5 ml Reaktionsgefäß gegeben und dann 50 µl eines  $\beta$ -Lactamasen-Extraktes (siehe Kapitel 3.3.3) hinzugegeben. Es wurde die Zeit bis zum Entstehen des ersten Rosastichs bzw. einer Rotfärbung protokolliert. Aus Erfahrungswerten hatte sich ergeben, dass Extrakte aus klinischen Isolaten mit häufig mehreren exprimierten

$\beta$ -Lactamasen bei einer Reaktionszeit von 30 s bis 1 min sinnvoll verwendbar waren; bei Extrakten aus Referenzstämmen mit einer einzelnen  $\beta$ -Lactamase waren dies eine bis 2 min.

Die entsprechenden Zeiten wurden jeweils durch sukzessive 1:1-Verdünnungen der Extrakte mit 0,1 M Phosphatpuffer (pH 7,0) und erneute Vermessungen gegen die Nitrocefin-Lösung eingestellt.

### 3.3.4.2 Durchführung der Fokussierung

Die Isoelektrische Fokussierung erfolgte mit einer Mini-PROTEAN<sup>®</sup> 3-Zelle der Firma Bio-Rad Laboratories unter Verwendung von IEF Ready Gelen (pH 3 bis 10) derselben Firma.

10  $\mu$ l eingestellter  $\beta$ -Lactamase-Extrakt wurden in einem 200  $\mu$ l Reaktionsgefäß mit 20  $\mu$ l IEF-Probenpuffer versetzt. Das zu verwendende Ready Gel wurde aus seiner Tasche entnommen und entsprechend den Herstellerangaben vorbereitet. Dies umfasste im Wesentlichen das Entfernen des Kamms und das Spülen der Taschen mit dH<sub>2</sub>O, das Auftrennen der Versiegelung an der Kassetten-Unterseite mit Hilfe eines Skalpell sowie das Entfernen des entsprechenden Versiegelungsstreifens. Da die Mini-PROTEAN<sup>®</sup> 3-Kammer zwei Gele parallel fassen kann, hier i.d.R. aber immer nur eins zum Einsatz kam, wurde die frei bleibende Stelle des Kassettenträgers der Kammer mit einem Puffer-Damm verschlossen; auf der anderen Seite wurde das Ready Gel eingesetzt. Ready Gel und Puffer-Damm bilden so eine innere Kammer, die durch Einsatz des Trägers in einen Klammerrahmen zusammengehalten wird. Sodann erfolgte der Einbau dieses Klammerrahmens in die äußere Kammer entsprechend den Angaben des Herstellers. Tabelle 3–27 gibt einen Überblick über die physikalisch zusammengehörenden Komponenten des Gesamtaufbaus.

Tabelle 3–27: Zuordnung der Elektroden und Kammern bei der IEF

<b>Elektrode</b>	Anode	Kathode
<b>Farbe</b>	rot	schwarz
<b>Position</b>	unten	oben
<b>Kammer</b>	äußere Kammer	innere Kammer

Die innere Kammer wurde bis knapp unter den Rand mit Kathodenpuffer befüllt, bis insbesondere die Taschen des Ready Gels ebenfalls mit dem Puffer vollgelaufen waren. Hierzu wurden 150 ml Kathodenpuffer aus einer Mischung von 30 ml 5x Kathodenpuffer und 120 ml dH<sub>2</sub>O hergestellt. An dieser Stelle war darauf zu achten, die innere Kammer nicht zu überfüllen, da der Kathodenpuffer sonst in die äußere Kammer hätte gelangen können.

Die Taschen des Ready Gels wurden mit Hilfe einer Mikrospritze mit den vorbereiteten Proben befüllt. Zwischen den einzelnen Proben wurde die Spritze jeweils mit dH<sub>2</sub>O gespült. Dann wurde in die äußere Kammer mit Anodenpuffer bis zur Markierung befüllt. Hierzu wurden 200 ml aus einer Mischung von 20 ml 10x Anodenpuffer und 180 ml dH<sub>2</sub>O hergestellt. Die Kammer wurde entsprechend der Farbcodierung der Kammer verschlossen und die Elektrophorese bzw. Fokussierung gestartet. Die Elektrophoresebedingungen entsprachen den Angaben in Tabelle 3–28.

Tabelle 3–28: Elektrophoresebedingungen bei der IEF

<b>Power conditions</b>  <b>schrittweise:</b>	100 V konstant	60 min
	250 V konstant	60 min
	500 V konstant	30 min
	Starting current:	5-15 mA/Gel
	Final current:	5-15 mA/Gel
<b>Run Time:</b>	$\Sigma = 150 \text{ min}$	

Nach Abschluss der Elektrophorese wurde die innere Kammer entnommen, der Kathodenpuffer entleert und das Ready Gel entnommen, um es der Detektion zuzuführen. Dazu musste die Kassette aufgetrennt werden. Die Kassette hat eine Kunststoff- und eine kleinere Glasseite. Die Glasseite hat die Größe des Gels und zu diesem auch die höhere Adhäsion, so dass das Gel beim Öffnen der Kassette üblicherweise daran haften blieb. Dies wurde bei der Detektion als stabile Unterlage ausgenutzt.

### 3.3.4.3 Detektion

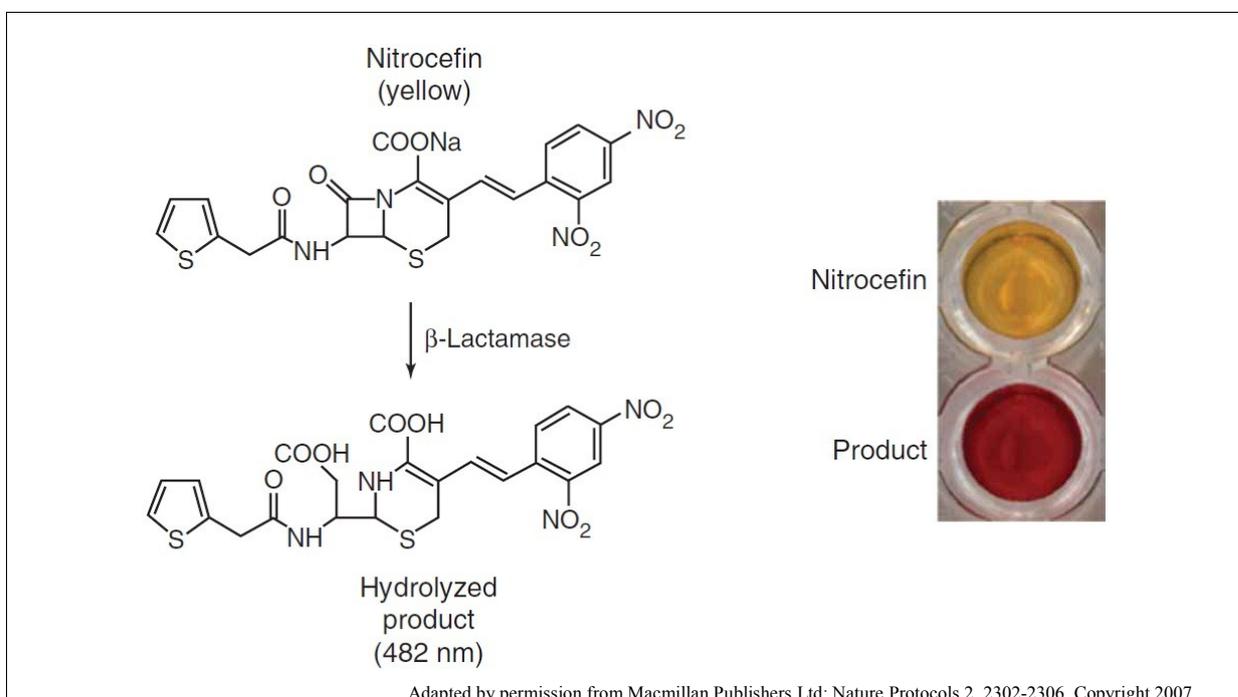
#### 3.3.4.3.1 Nitrocefin

Vor der Detektion mit Nitrocefin wurde ein Flachbett-Scanner eingeschaltet und vorbereitet, denn die spätere Farbreaktion verlief mitunter mit recht hoher Geschwindigkeit, so dass hierfür später wenig Zeit zur Verfügung gestanden hätte.

---

Ein Schleicher & Schuell Gel Blot Papier (GB003, 15 x 20 cm) wurde entsprechend der Größe des IEF-Gels zugeschnitten. Ca. 2 ml der 1 mM Nitrocefin-Lösung sowie ca. 18 ml dH<sub>2</sub>O wurden zusammen mit dem Blot Papier in eine Klarsichthülle gegeben. Das Papier wurde nun in der Hülle gründlich mit der Färbelösung durchtränkt.

Das IEF-Gel wurde mit der Glasplatte nach unten auf den Scanner platziert und darauf das durchtränkte Blot Papier gelegt. Das Blot Papier wurde vorsichtig angepresst, der Scanner verschlossen (hier machte es Sinn, rund um den Färbeaufbau auf der Scannerfläche etwas Dickeres zu platzieren, um einen direkten Kontakt der Scannerabdeckung mit dem durchtränkten Blot Papier zu vermeiden). Nun wurden sukzessive Aufnahmen vom Gel unter Protokollierung der jeweiligen Einwirkzeit des Nitrocefins gemacht.



**Abbildung 3–4: Nitrocefin-Farbreaktion.** Aus [184].

#### 3.3.4.3.2 Bioassay

Die Verwendung eines Bioassays als Detektionsmethode war in der hier durchgeführten Form an das Vorgehen von Pagani et al. [185] angelehnt. Sie basiert auf einer Überschichtung des fokussierten Gels mit einem Nährboden, der ein β-Lactam-Antibiotikum enthält, welches von einer oder mehreren der fokussierten β-Lactamasen hydrolisiert werden kann. Das Auftragen eines empfindlichen Stammes lässt diesen nach Inkubation in einem Brutschrank über Nacht

nur an den Stellen wachsen, wo das Antibiotikum hydrolysiert wurde - die Kolonien zeigen also die Positionen der fokussierten  $\beta$ -Lactamasen mit entsprechendem Substratspektrum an.

Die Detektion über einen Bioassay erforderte die folgenden drei Vorbereitungen: erstens benötigte man ein steriles, abdeckbares Gefäß mit einem ausreichend hohen Rand, um darin das Überschichten des IEF-Gels mit LB-Agar durchzuführen, zweitens die Vorbereitung des erwähnten Agars unter Zusatz eines Substrates für die zu detektierende  $\beta$ -Lactamase, sowie drittens das Beimpfen einer ÜNK eines Indikatorstammes am Vortag. Der Indikatorstamm musste dabei gegen das Substrat in seiner zugesetzten Konzentration empfindlich sein.

Das IEF-Gel wurde mit der Glasplatte nach unten in das Gefäß gelegt und mit einer solchen Menge des substrathaltigen LB-Agars überschichtet, dass das Gel gerade eben bedeckt war bzw. der LB-Agar gerade eine geschlossene Fläche im Gefäß bildete. Das Gefäß wurde abgedeckt und der LB-Agar bis zum Erstarren unbewegt gelagert. Anschließend wurde der Agar für 90 min bei 37 °C in einem Brutschrank inkubiert. In dieser Zeit hydrolysiert die fokussierte  $\beta$ -Lactamase ihr Substrat.

Währenddessen wurde von der ÜNK des Indikatorstammes eine Einstellung auf McFarland 0,5 vorgenommen (vgl. Kapitel 3.1.4, S. 98). Nach der Inkubation des LB-Agars wurde diese Bakteriensuspension mit Hilfe eines sterilen Wattestäbchens flächig auf dem Agar ausgestrichen, dieser dann abgedeckt, kurz trocknen gelassen und schließlich in einem Brutschrank über Nacht bei 37 °C inkubiert.

Am Folgetag erfolgte die Dokumentation des IEF-Gels samt überschichtetem LB-Agar mittels Fotografie.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 *Enterobacter cloacae* aus Münster

Informationen zu den Isolaten sind in Kapitel 2.1.1, S. 67, zu finden. Der dem Isolat-Kollektiv zu Grunde liegende Fallbericht ist in Kapitel 2.1.1.1, S. 67, hinterlegt.

#### 4.1.1 Charakterisierung der Isolate

Erste Charakterisierungen des Isolat-Kollektivs wurden durch das Universitätsklinikum Münster sowie in der Arbeitsgruppe von Professor Dr. Heisig durch die Mitarbeiterin Tatjana Claußen vorgenommen.

Im Zuge dieser Arbeit erfolgte zunächst die Bestimmung von MHK-Werten verschiedener Antibiotika, die ab Kapitel 4.1.1.2 (S. 168) aufgeführt sind.

##### 4.1.1.1 Ergebnisse aus Voruntersuchungen

###### 4.1.1.1.1 Daten vom Universitätsklinikum Münster

Die Isolate wurden seitens des Universitätsklinikums Münster mit dem diagnostischen System VITEK-2 der Firma bioMérieux biochemisch als *Enterobacter cloacae* typisiert. Dabei kam die Vitek-Karte „GN“ zum Einsatz. Ferner wurde unter Verwendung des gleichen Systems mit der Vitek-Karte „AST-N111“ eine Empfindlichkeitstestung durchgeführt. Die Ergebnisse dieser Bestimmung sind in Tabelle 4–1 dargestellt.

Tabelle 4–1: Antibiotogramm des UKM

	<i>E. cloacae</i> -Isolat...							
	K19968	K20606	K20608	K21198	K21370	K21373	A17244/1	A17244/2
Ampicillin	R	R	R	R	R	R	R	R
Ampicillin / Sulbactam	R	R	R	R	R	R	R	R
Piperacillin / Tazobactam	R	R	R	R	R	R	R	R
Cefazolin	R	R	R	R	R	R	R	R
Cefuroxim	R	R	R	R	R	R	R	R
Cefotaxim	R	R	R	R	R	R	R	R
Ceftriaxon	R	R	R	R	R	R	R	R
Cefepim	R	R	R	R	R	R	R	R
Ceftazidim	R	R	R	R	R	R	R	R
Aztreonam	R	R	R	R	R	R	R	R
Imipenem	I	I	R	I	I	I	I	I
Meropenem	R	I	I	R	R	R	I	R
Gentamicin	I	I	I	I	I	I	I	I
Tobramycin	R	R	R	R	R	R	R	R
Amikacin	S	S	S	S	S	S	S	S
Ciprofloxacin	R	I	S	I	R	S	S	R
Levofloxacin	R	R	S	S	R	S	S	R
Cotrimoxazol	S	S	S	S	S	S	S	S
Nitrofurantoin	I	S	S	S	S	S	S	S
Cefotetan	R	R	R	R	R	R	R	R
Ertapenem	R	I	I	R	R	R	I	R

#### 4.1.1.1.2 Typisierung mit Micronaut-E System

Die folgende Tabelle 4–2 gibt die Ergebnisse einer Speziesidentifizierung mit dem Micronaut-E System wieder, welche von Tatjana Claußen durchgeführt wurde.

Tabelle 4–2: Micronaut-E-Befunde beim *E. cloacae*-Kollektiv

	<i>E. cloacae</i> -Isolat...							
	K19968	K20606	K20608	K21198	K21370	K21373	A17244/1	A17244/2
TDA	-	-	+	-	-	-	-	-
H <sub>2</sub> S	-	-	-	-	-	-	-	-
ESC	+	-	-	+	+	+	+	+
IND	-	-	-	-	-	-	-	-
URE	-	-	-	-	-	-	-	-
LDC	-	-	+	-	-	-	-	-
ODC	+	+	+	+	+	+	+	+
ADH	+	+	-	+	+	+	+	+
DECO/GLUF	+	+	+	+	+	+	+	+
CIT	+	+	+	+	+	+	+	+
MAL	+	+	+	+	+	+	+	+
VP	+	+	+	+	+	+	+	+
RHAF	+	+	+	+	+	+	+	+
SUCF	+	+	+	+	+	+	+	+
ADOF	-	-	-	-	-	-	-	-
INOF	+	-	-	-	-	-	-	+
XYLF	+	+	+	+	+	+	+	+
SORF	+	+	+	+	+	+	+	+
ONPG	+	+	+	+	+	+	+	+
ONPX	+	+	+	+	+	+	+	+
PGUR	-	-	-	-	-	-	-	-
Taxon	<i>E. cl.</i>	<i>E. cl.</i>	?	<i>E. cl.</i>				
Zuverlässigk.	sehr gut	sehr gut	?	sehr gut				
rel. WS / %	99,96	100,00	?	100,00	100,00	100,00	100,00	99,96

#### 4.1.1.1.3 Sequenzanalyse der QRDR von *gyrA* mittels PyroSequencing®

Tatjana Claußen führte bei dem Isolat-Kollektiv eine Sequenzanalyse der QRDR der *gyrA*-Gene mittels PyroSequencing® durch. Zum Einsatz kamen die Primer „*gyrA* Gram neg 5‘ +211“ und „5‘ *gyrA* MPC Seq +222“. Es ergaben sich in allen 8 Fällen jeweils die gleichen Sequenzen.

Primer „*gyrA* Gram neg 5‘ +211“:

```
          +234                               +256
Kollektiv: T CCC CAT GGT GAT TAC GCG GTG G
           79  80  81  82  83  84  85
           Pro His Gly Asp Tyr Ala Val
```

Primer „5‘ *gyrA* MPC Seq +222“:

```
          +266                               +290
Kollektiv: TG GTG ATT ACG CGG TGT ACG ACA CC
           90  91  92  93  94  95  96
           Val Ile Lys Arg Cys Lys Thr
```

#### 4.1.1.2 Bestimmung minimaler Hemmkonzentrationen

MHK-Werte der Antibiotika, welche für das *E. cloacae*-Kollektiv bestimmt wurden, sind in Tabelle 4–3 zusammengefasst. Die Bestimmung erfolgte nach dem in Kapitel 3.1.1, S. 97ff aufgeführten Mikrobouillon-Dilutionsverfahren. Im Fall von Streptomycin und Nalidixinsäure erfolgte die Verdünnung des Antibiotikums arithmetisch. Bei Streptomycin wurden Konzentrationen in Schritten von 5 µg/ml erzeugt, bei Nalidixinsäure in Schritten von 10 µg/ml.

Tabelle 4–3: MHK-Werte für das *E. cloacae*-Kollektiv (alle Werte in µg/ml)

Antibiotikum / Stamm	<i>E. cl.</i> K19968	<i>E. cl.</i> K20606	<i>E. cl.</i> K20608	<i>E. cl.</i> K21198	<i>E. cl.</i> K21370	<i>E. cl.</i> K21373	<i>E. cl.</i> A17244/1	<i>E. cl.</i> A17244/2
Gentamicin	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Streptomycin	15	15	15	15	15	15	15	15
Amoxicillin	≥128	≥128	≥128	≥128	≥128	≥128	≥128	≥128
Amoxicillin + Clavulansäure (2 µg/ml)	≥64	≥64	≥64	≥64	≥64	≥64	≥64	≥64
Ampicillin	≥128	≥128	≥128	≥128	≥128	≥128	≥128	≥128
Aztreonam	64	≥128	≥128	≥128	≥128	≥128	≥128	≥128
Cefalexin	≥256	≥256	≥256	≥256	≥256	≥256	≥256	≥256
Cefazolin	≥64	≥64	≥64	≥64	≥64	≥64	≥64	≥64
Cefepim	≥128	≥128	≥128	64	≥128	64	≥128	64
Cefotaxim	512	512	512	512	512	512	512	512
Cefotaxim + Clavulansäure (4 µg/ml)	512	512	512	512	512	512	512	512

Tabelle 4–3 Fortsetzung

Antibiotikum / Stamm	<i>E. cl.</i> K19968	<i>E. cl.</i> K20606	<i>E. cl.</i> K20608	<i>E. cl.</i> K21198	<i>E. cl.</i> K21370	<i>E. cl.</i> K21373	<i>E. cl.</i> A17244/1	<i>E. cl.</i> A17244/2
Cefoxitin	≥64	≥64	≥64	≥64	≥64	≥64	≥64	≥64
Cefpirom	≥128	≥128	≥128	≥128	≥128	≥128	≥128	≥128
Cefpodoxim	≥64	≥64	≥64	≥64	≥64	≥64	≥64	≥64
Ceftazidim	512	512	512	512	512	512	512	512
Ceftazidim + Clavulansäure (4 µg/ml)	512	512	512	512	512	512	512	512
Cefuroxim	≥256	≥256	≥256	≥256	≥256	≥256	≥256	≥256
Ertapenem	4-8	4-8	4-8	4-8	4-8	4-8	4-8	4-8
Imipenem	2-4	2-4	2-4	2-4	2-4	2-4	2-4	2-4
Meropenem	4-8	4-8	4-8	4-8	4-8	4-8	4-8	4-8
Mezlocillin	≥256	≥256	≥256	≥256	≥256	≥256	≥256	≥256
Piperacillin	≥256	≥256	≥256	≥256	≥256	≥256	≥256	≥256
Nalidixinsäure	>70	>70	>70	>70	>70	>70	>70	>70

Tabelle 4–3 Fortsetzung

Antibiotikum / Stamm	<i>E. cl.</i> K19968	<i>E. cl.</i> K20606	<i>E. cl.</i> K20608	<i>E. cl.</i> K21198	<i>E. cl.</i> K21370	<i>E. cl.</i> K21373	<i>E. cl.</i> A17244/1	<i>E. cl.</i> A17244/2
Ciprofloxacin	1	2	1	1	2	1	1	4
Levofloxacin	1	1	1	1	1	1	1	1
Moxifloxacin	1	2	1	1	1	1	1	2
Norfloxacine	4	4	4	4	4	4	4	4
Ofloxacin	1	2	2	1	1	1	1	2
Tetracycline	4	4	4	8	4	8	4	8
Cotrimoxazole	16	16	8	16	8	16	8	32
Rifampicin	16	16	16	16	16	16	16	16

#### 4.1.1.3 MHK von EDTA und Einfluss auf die $\beta$ -Lactamase-Aktivität

Bei Carbapenem-resistenten Bakterien muss man die Expression einer MBL in Betracht ziehen. Das Zink-Atom bzw. die Zink-Atome im aktiven Zentrum einer MBL sowie freie, für die Aktivität benötigte Zink-Ionen lassen sich durch EDTA komplexieren. Während Nicht-Metallo- $\beta$ -Lactamasen davon nicht beeinflusst werden, wird die Aktivität einer MBL vermindert. Dies spiegelt sich dann in einer relativ erhöhten Empfindlichkeit gegen Carbapeneme wider, wenn bei der Bestimmung Exposition zu EDTA besteht. Dieser Einfluss sollte hier als ein indirekter MBL-Nachweis herangezogen werden. Dafür wurde zunächst die Toxizität von EDTA in Form eines eigenen MHK-Wertes bestimmt, um eine Auswirkung auf das Wachstum der Bakterien und damit auf das Ergebnis der MHK-Bestimmung anderer Substanzen berücksichtigen zu können.

Die MHK von EDTA wurde über eine arithmetische Verdünnungsreihe von 180  $\mu$ M bis 400  $\mu$ M in Schritten von 20  $\mu$ M durchgeführt. Untersucht wurden die Stämme *E. cloacae* 14, *E. cloacae* 129/08 (*bla<sub>VIM-1</sub>*) und *K. pneumoniae* 375/08 (*bla<sub>KPC-2</sub>*). In allen drei Fällen war die MHK von EDTA >400  $\mu$ M.

In weiteren Versuchen wurde dann zunächst mit diesen Stämmen der Einfluss von EDTA auf die MHK von Imipenem untersucht. Hier wurden konstante Konzentrationen von 200  $\mu$ M bzw. 400  $\mu$ M EDTA eingesetzt.

Tabelle 4–4: MHK-Werte von Imipenem unter EDTA-Einfluss bei Kontrollstämmen (alle Werte in  $\mu$ g/ml)

Stamm	Imipenem	Imipenem +200 $\mu$ M EDTA	Imipenem +400 $\mu$ M EDTA
<i>E. cloacae</i> 129/08	64	2	2
<i>K. pneumoniae</i> 375/08	32	32	32
<i>E. coli</i> ATCC 25922	0,063	0,063	0,063
<i>E. cloacae</i> 14	0,25	0,125	0,125

Die MHK-Werte von Imipenem unter Zusatz von EDTA (200  $\mu$ M oder 400  $\mu$ M) unterschieden sich für die verschiedenen Teststämmen nicht. Daher wurde für die MHK-Bestimmung an den klinischen Isolaten eine EDTA-Konzentration von 200  $\mu$ M gewählt, um

den prinzipiell sicher vorhandenen, toxischen und damit das Wachstum beeinflussenden Effekt von EDTA auf einem Minimum zu halten.

Tabelle 4–5: MHK-Werte von Imipenem unter EDTA-Einfluss (alle Werte in µg/ml)

	<i>E. cloacae</i> Isolat-Kollektiv	<i>E. cloacae</i> 129/08	<i>K. pneumoniae</i> 375/08	<i>E. coli</i> ATCC 25922
<b>Imipenem</b>	2-4	64	32	0,063
<b>Imipenem + 200 µM EDTA</b>	≤0,125	2	32	0,063

#### 4.1.1.4 Einfluss von Zink-Ionen auf die Ergebnisse der Imipenem-Empfindlichkeitsbestimmung

Bei Bakterien, die eine MBL exprimieren, kann die Konzentration von Zink-Ionen einen limitierenden Faktor für die Aktivität der MBL darstellen. Im Umkehrschluss zur Untersuchung des vorausgehenden Kapitels kann man annehmen, dass in diesem Fall eine Supplementierung mit Zink-Ionen zu einer relativ verminderten Empfindlichkeit gegen Carbapeneme führt.

Daher wurde untersucht, in wie weit eine Supplementierung mit Zink-Ionen bei einer MHK-Bestimmung von Imipenem auf das Ergebnis Einfluss nimmt. Getestet wurden die Isolate *E. cloacae* K21198, K21370 und A17244/1; es wurden 250 µM Zink-Ionen zugesetzt.

Tabelle 4–6: Einfluss v. Zink-Supplementierung auf Imipenem MHK (alle Werte in µg/ml)

	<i>E. cloacae</i> aus Kollektiv	<i>E. coli</i> ATCC 25922
<b>Imipenem</b>	2-4	0,063
<b>Imipenem + 250 µM Zink</b>	16	0,063

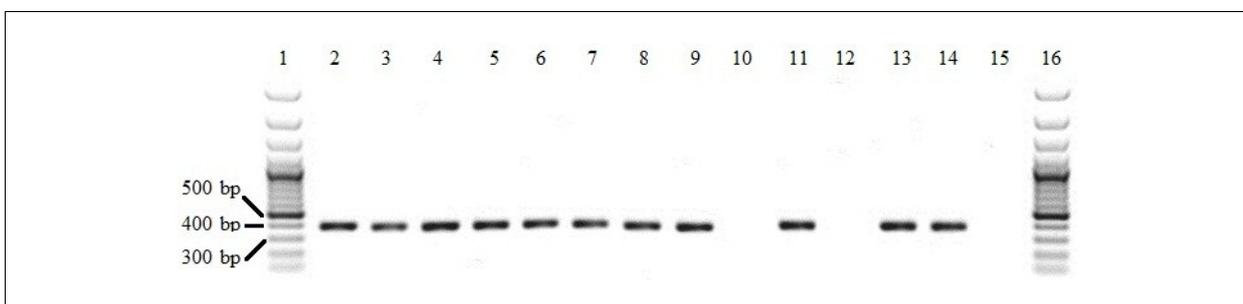
Vergleiche hierzu auch die Resultate von Kapitel 4.1.6.4 (S. 194).

#### 4.1.2 PCR-Screening auf β-Lactamase-Gene

Eine Übersicht über durchgeführte PCRs zum Screening auf β-Lactamase-Gene sowie den jeweils erhaltenen Befund ist in Tabelle 4–7 dargestellt.

Tabelle 4–7: PCR-Screening auf  $\beta$ -Lactamase-Gene beim *E. cloacae*-Kollektiv

Gen	Befund	vgl.
<i>bla</i> <sub>SHV</sub>	-	
<i>bla</i> <sub>TEM</sub>	-	
<i>bla</i> <sub>CTX-M</sub>	-	
<i>bla</i> <sub>OXA</sub> Gr. 1, 2 u. 10	-	
<i>bla</i> <sub>OXA-48</sub>	-	
<i>bla</i> <sub>KPC</sub>	-	
<i>bla</i> <sub>GES</sub>	-	
<i>bla</i> <sub>VIM</sub>	+	Abbildung 4–1
<i>bla</i> <sub>GIM</sub>	-	
<i>bla</i> <sub>SIM</sub>	-	
<i>bla</i> <sub>SPM</sub>	-	
<i>bla</i> <sub>IMP</sub>	-	
<i>bla</i> <sub>MOX-1</sub> u. 2	-	
<i>bla</i> <sub>CMY-1-11</sub>	-	
<i>bla</i> <sub>LAT-1-4</sub>	-	
<i>bla</i> <sub>BIL-1</sub>	-	
<i>bla</i> <sub>DHA-1</sub> u. 2	-	
<i>bla</i> <sub>ACC</sub>	-	
<i>bla</i> <sub>MIR-1T</sub>	-	
<i>bla</i> <sub>ACT-1</sub>	-	
<i>bla</i> <sub>FOX-1-5b</sub>	-	
<i>bla</i> <sub>NDM-1</sub>	-	



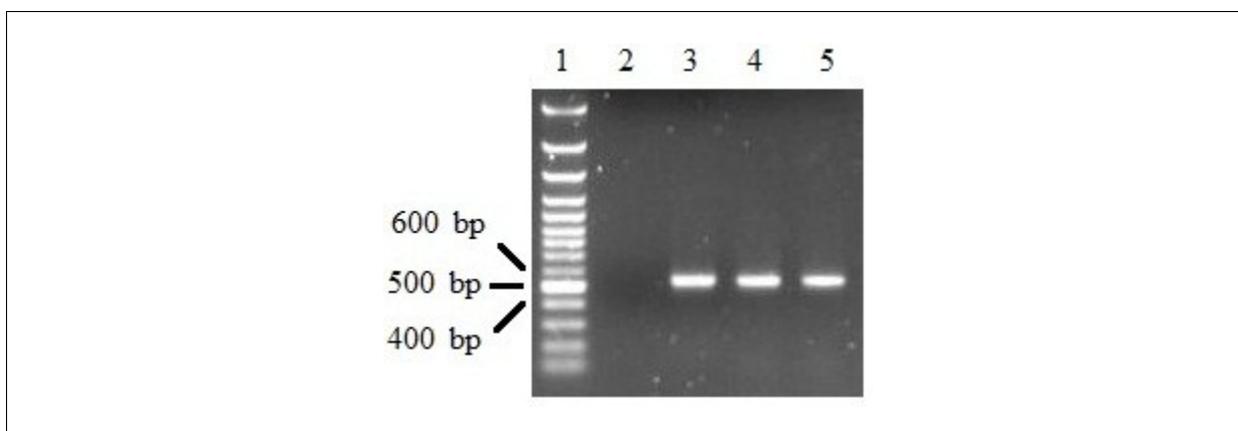
**Abbildung 4–1: PCR auf *bla*<sub>VIM</sub>.** TAE-Agarosegel, 1 %. Bei der PCR wurde ein 390 bp langer Sequenzbereich von *bla*<sub>VIM</sub> amplifiziert. Spuren 1 und 16: Größenmarker O’GeneRuler 100 bp plus (Fermentas). Spuren 2-9: *E. cloacae*-Kollektiv; Spur 10: *E. coli* J53-1 Azid<sup>R</sup>; Spur 11: *E. coli* J53-1 Azid<sup>R</sup>/pVIM(EclK19968); Spur 12: *E. coli* JM109; Spur 13: *E. coli* JM109/pVIM(EclK19968); Spur 14: *P. aeruginosa* 179 (*bla*<sub>VIM-1</sub>); Spur 15: Negativkontrolle. Eine gewisse Wölbung in der Lauffront in der Mitte des Agarosegels (Spuren 4-8) ist auf ein partiell nicht ganz parallel ausgerichtetes elektrisches Feld zurückzuführen.

### 4.1.3 PCR-Screening auf Resistenzgene gegen andere Antibiotikaklassen

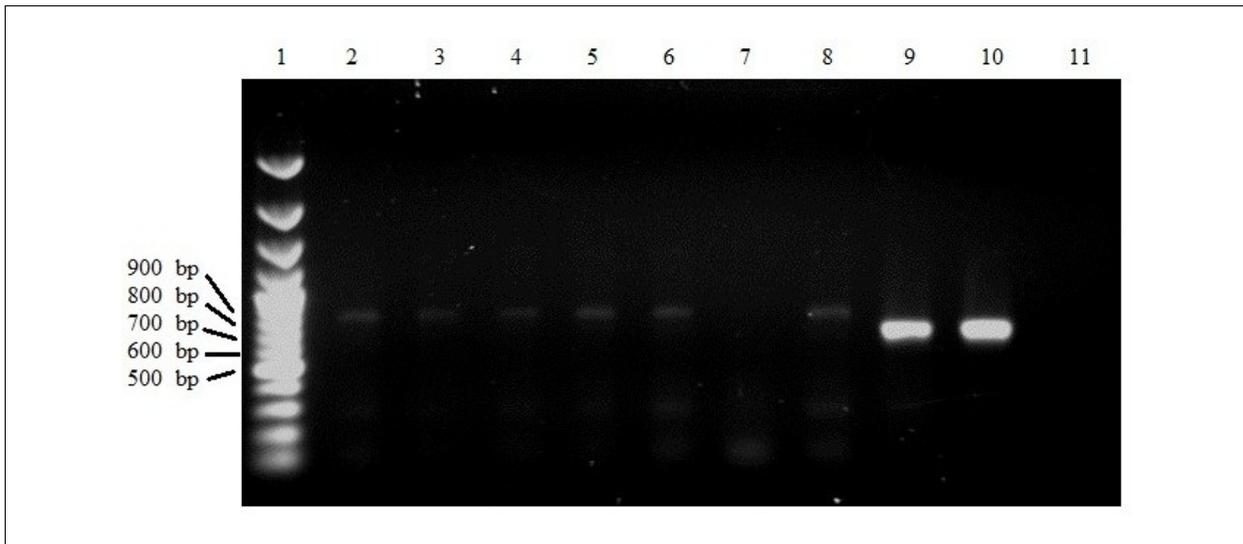
Im Zuge der weitergehenden Charakterisierung der Isolate wurde nach weiteren Resistenzgenen gesucht, die jedoch nicht ursächlich für  $\beta$ -Lactam-Resistenzen sind. Bestimmte Resistenzgene sind häufig räumlich mit  $\beta$ -Lactamase-Genen assoziiert und werden mit diesen zusammen weitergegeben. Die Anwesenheit dieser Resistenzgene gibt also unter Umständen auch Hinweise auf den Verbreitungsmechanismus. Die durchgeführten PCRs sind in Tabelle 4–8 dargestellt.

Tabelle 4–8: PCR-Screening auf weitere Gene

Gen	Befund	vgl.
Integron-Strukturgene	+	Abbildung 4–18 (S. 193)
<i>aac(6')-Ib</i>	+	Abbildung 4–2
<i>qnrA</i>	-	
<i>qnrB</i>	-	
<i>qnrS</i>	+ (nur bei <i>E. cloacae</i> A17244/2)	Abbildung 4–3



**Abbildung 4–2: PCR auf *aac(6')-Ib*.** TAE-Agarosegel, 1 %. Die Größe des erwarteten Amplikons betrug 519 bp. Spur 1: Größenmarker O'GeneRuler 100 bp plus (Fermentas); Spur 2: Negativkontrolle; Spur 3: *E. cloacae* K19968; Spur 4: *K. pneumoniae* Va22038; Spur 5: Referenz *E. coli* eo471.



**Abbildung 4–3: PCR auf *qnrS*.** TAE-Agarosegel, 1 %. Das bei der PCR zu erwartende Amplikon war 657 bp groß. Spur 1: Größenmarker O’GeneRuler 100 bp plus (Fermentas). Spur 9: *E. cloacae* A17244/2; Spuren 2-8: übrige *E. cloacae* aus Isolat-Kollektiv; Spur 10: *E. coli qnrS*-Referenz; Spur 11: Negativkontrolle.

#### 4.1.4 Phänotypischer Nachweis von MBL mittels Etest®

Ein Etest® MBL wurde bei den *E. cloacae*-Isolaten K19968, K20606, K20608, K21198, K21373, A17244/1 und A17244/2 wie in Kapitel 3.1.5 (S. 100ff) beschrieben durchgeführt.



*E. cloacae* K19968



*E. cloacae* K20606

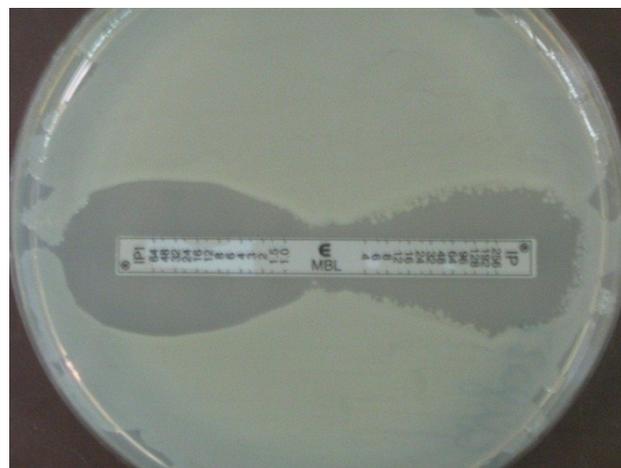


*E. cloacae* K20608

**Abbildung 4-4:** Ergebnisse der MBL-Tests bei *E. cloacae* K19968, K20606 und K20608.



*E. cloacae* K21198



*E. cloacae* K21373



*E. cloacae* A17244/1

**Abbildung 4–5:** Ergebnisse der MBL-Tests bei *E. cloacae* K21198, K21373 und A17244/1.



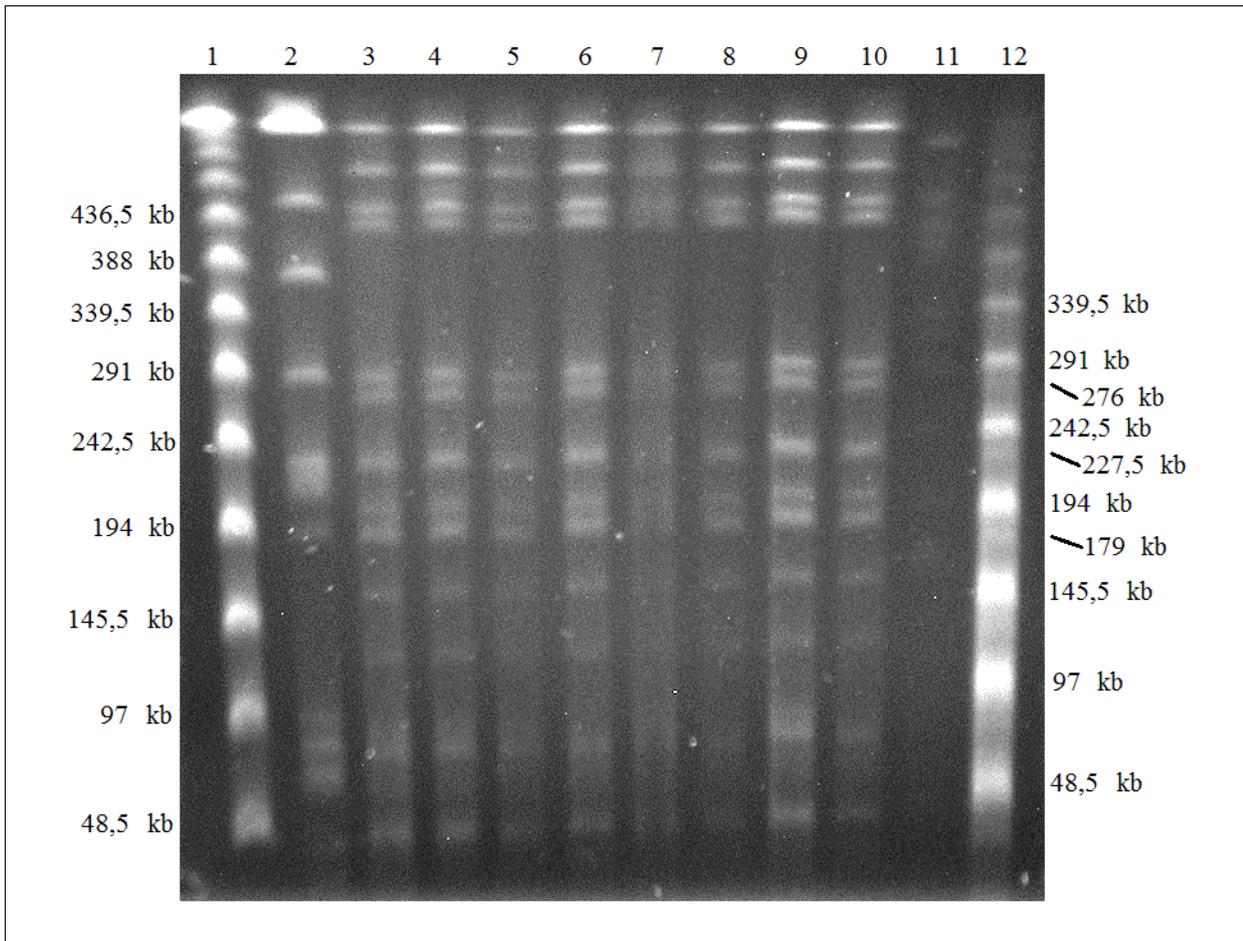
**Abbildung 4–6: Ergebnis des MBL-Etests bei *E. cloacae* A17244/2.**

Zum Vergleich wurde ein Etest<sup>®</sup> MBL mit *E. coli* ATCC 25922 durchgeführt, vgl. Abbildung 4–35 (S. 214).

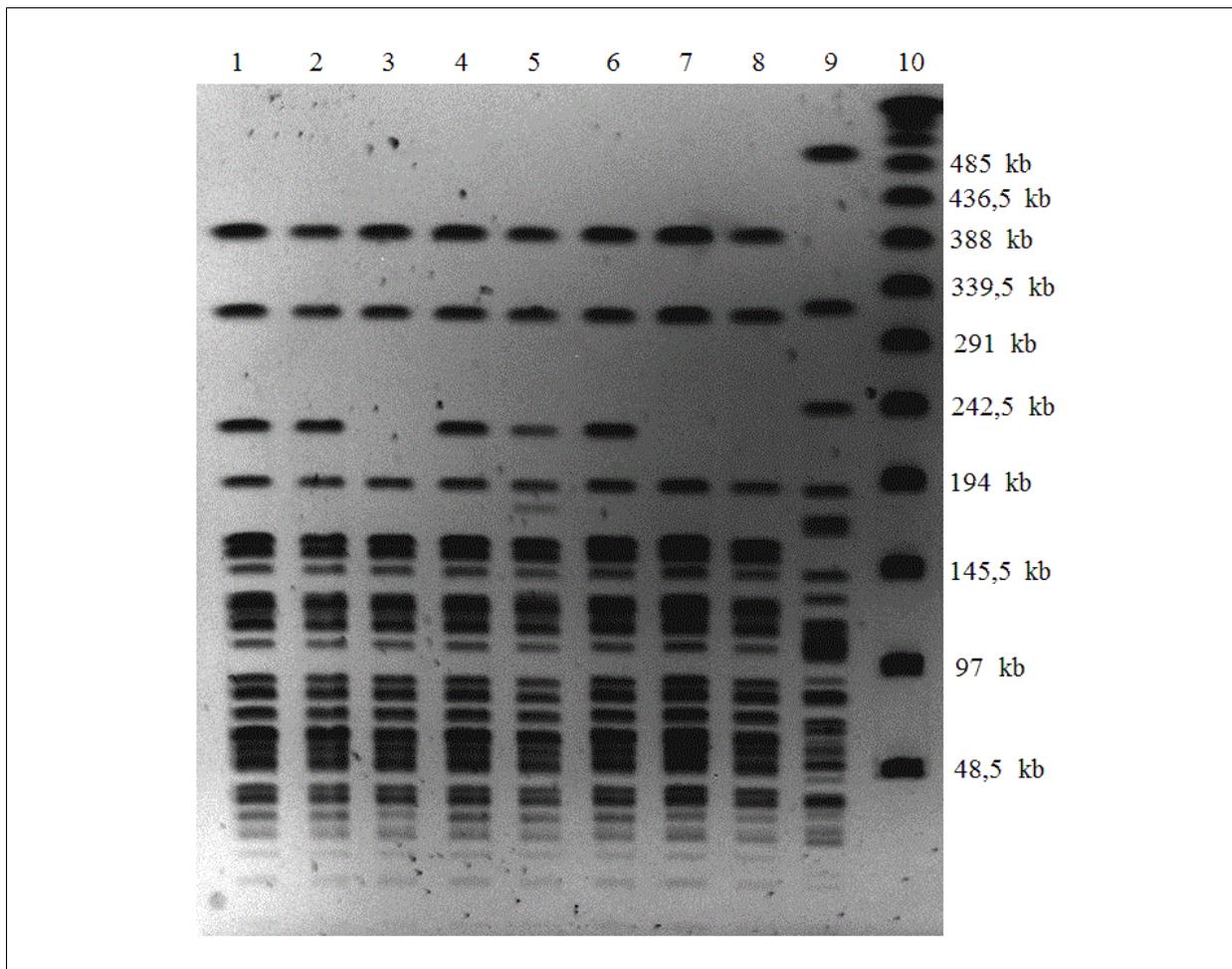
#### **4.1.5 Untersuchung der epidemiologischen Verwandtschaft der Isolate**

##### **4.1.5.1 Verwendung chromosomaler Marker zur Verwandtschaftsanalyse: PFGE nach Makrorestriktion**

Bei den 8 *E. cloacae*-Isolaten wurden PFGE-Analysen nach der in Kapitel 3.2.6.2 (S. 142ff) beschriebenen Methode durchgeführt, um die epidemiologische Verwandtschaft und einen möglichen, klonalen Ursprung zu untersuchen. Abbildung 4–7 zeigt das Ergebnis nach Makrorestriktion mit *Xba*I, Abbildung 4–8 nach Makrorestriktion mit *Mss*I.



**Abbildung 4–7: PFGE (*Xba*I).** Pulsfeld-Agarosegel, 1%. Spur 1: Größenmarker  $\lambda$ -Ladder PFG (NEB). Spur 2: *S. Typhimurium* LT2; Spur 3: *E. cloacae* K19968; Spur 4: *E. cloacae* K20606; Spur 5: *E. cloacae* K20608; Spur 6: *E. cloacae* K21198; Spur 7: *E. cloacae* K21370; Spur 8: *E. cloacae* 21373; Spur 9: *E. cloacae* A17244/1; Spur 10: *E. cloacae* A17244/2; Spur 11: *E. cloacae* 14 (schwächere Bandenintensität). Spur 12: MidRange PFG Marker I (NEB).

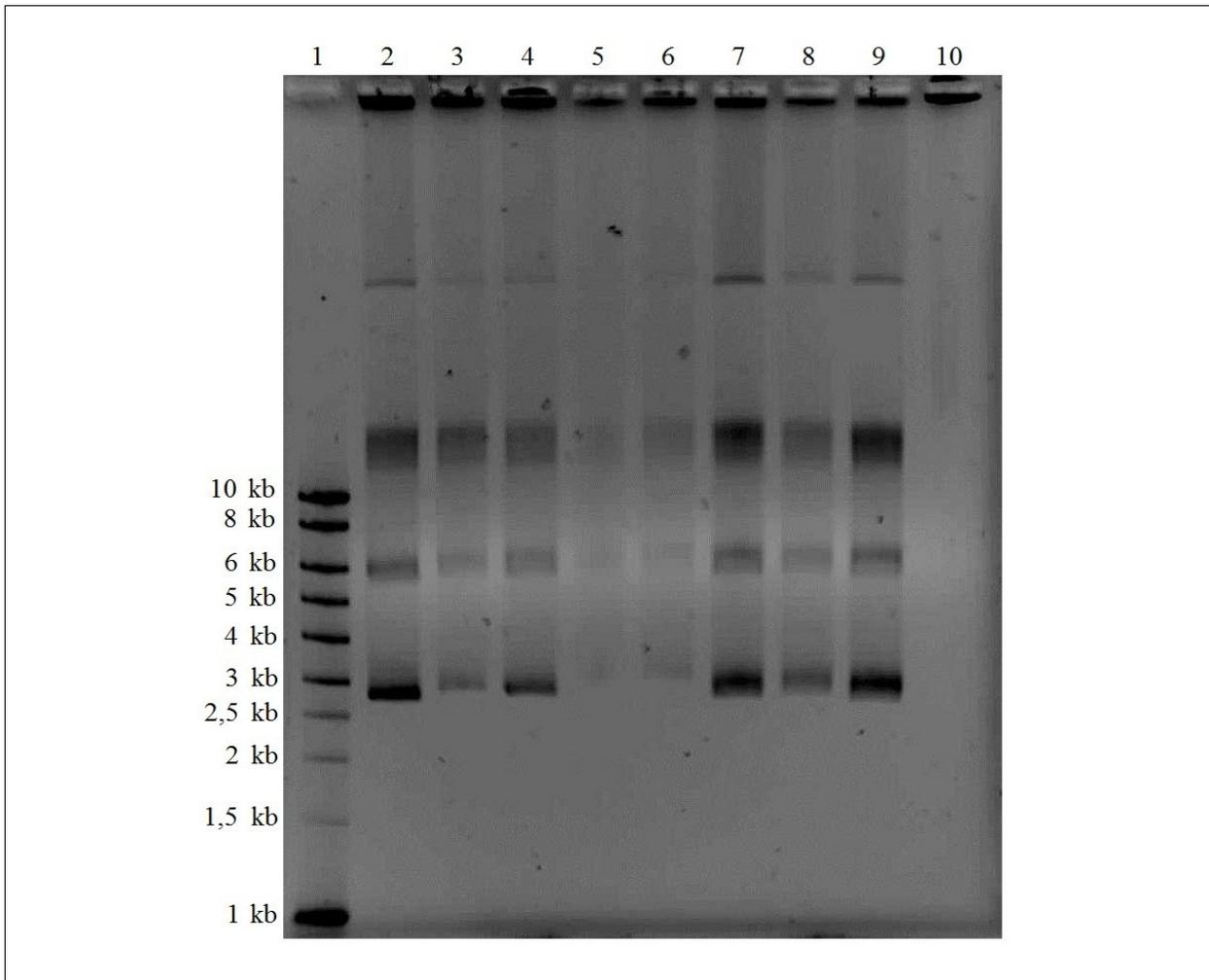


**Abbildung 4–8: PFGE (*MssI*).** Pulsfeld-Agarosegel, 1 %. Spur 1: *E. cloacae* K21370; Spur 2: *E. cloacae* A17244/1; Spur 3: *E. cloacae* K21198; Spur 4: *E. cloacae* K20608; Spur 5: *E. cloacae* K20606; Spur 6: *E. cloacae* K19968; Spur 7: *E. cloacae* K21373; Spur 8: *E. cloacae* A17244/2; Spur 9: *E. cloacae* 14; Spur 10: Größenmarker  $\lambda$ -Ladder PFG (NEB).

#### 4.1.5.2 Verwendung plasmidischer Marker zur Verwandtschaftsanalyse: Erstellung von Plasmidprofilen

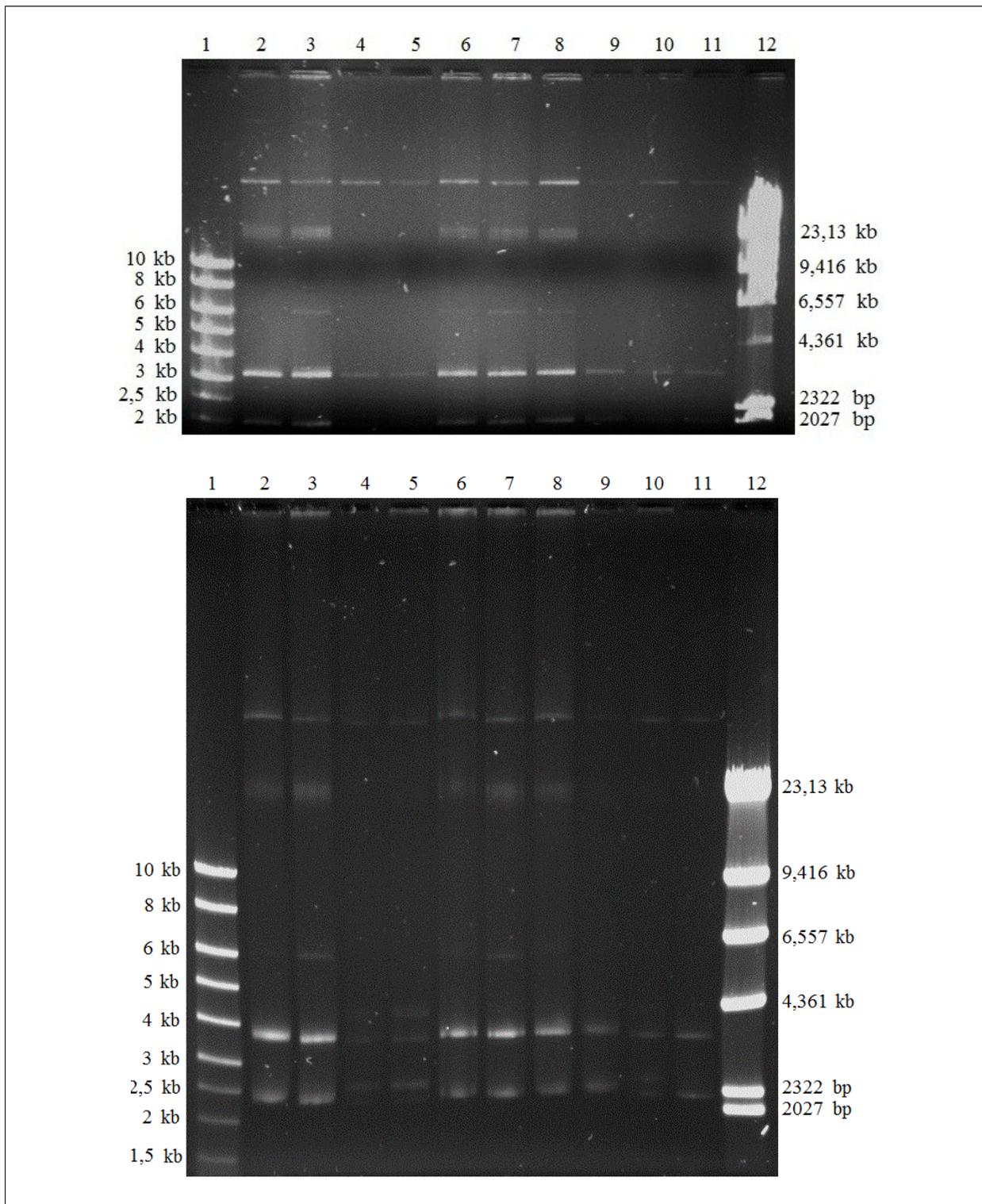
##### 4.1.5.2.1 alkalische Lyse

Eine alkalische Lyse (vgl. Kapitel 3.2.1.2.1 (S. 102ff) im Methodenteil) zur Untersuchung der vorhandenen Plasmide in dem *E. cloacae*-Kollektiv lieferte das in Abbildung 4–9 dargestellte Gelbild.



**Abbildung 4–9: Alkalische Lyse beim *E. cloacae*-Kollektiv.** TAE-Agarosegel, 1 %. Spur 1: Größenmarker SmartLadder (NEB). Spur 2: *E. cloacae* K21370; Spur 3: *E. cloacae* A17244/1; Spur 4: *E. cloacae* K21198; Spur 5: *E. cloacae* K20608; Spur 6: *E. cloacae* K20606; Spur 7: *E. cloacae* K19968; Spur 8: *E. cloacae* K21373; Spur 9: *E. cloacae* A17244/2. Spur 10: *K. pneumoniae* Va22038.

Mit dem Isolat *E. cloacae* K21370 wurden Versuche unternommen, den tendenziell negativen Einfluss von Exopolysacchariden auf die Ausbeute und Qualität einer mittels alkalischer Lyse erhaltenen Plasmid-DNA zu minimieren. Das Ergebnis dieser Versuche ist in Abbildung 4–10 zu sehen.



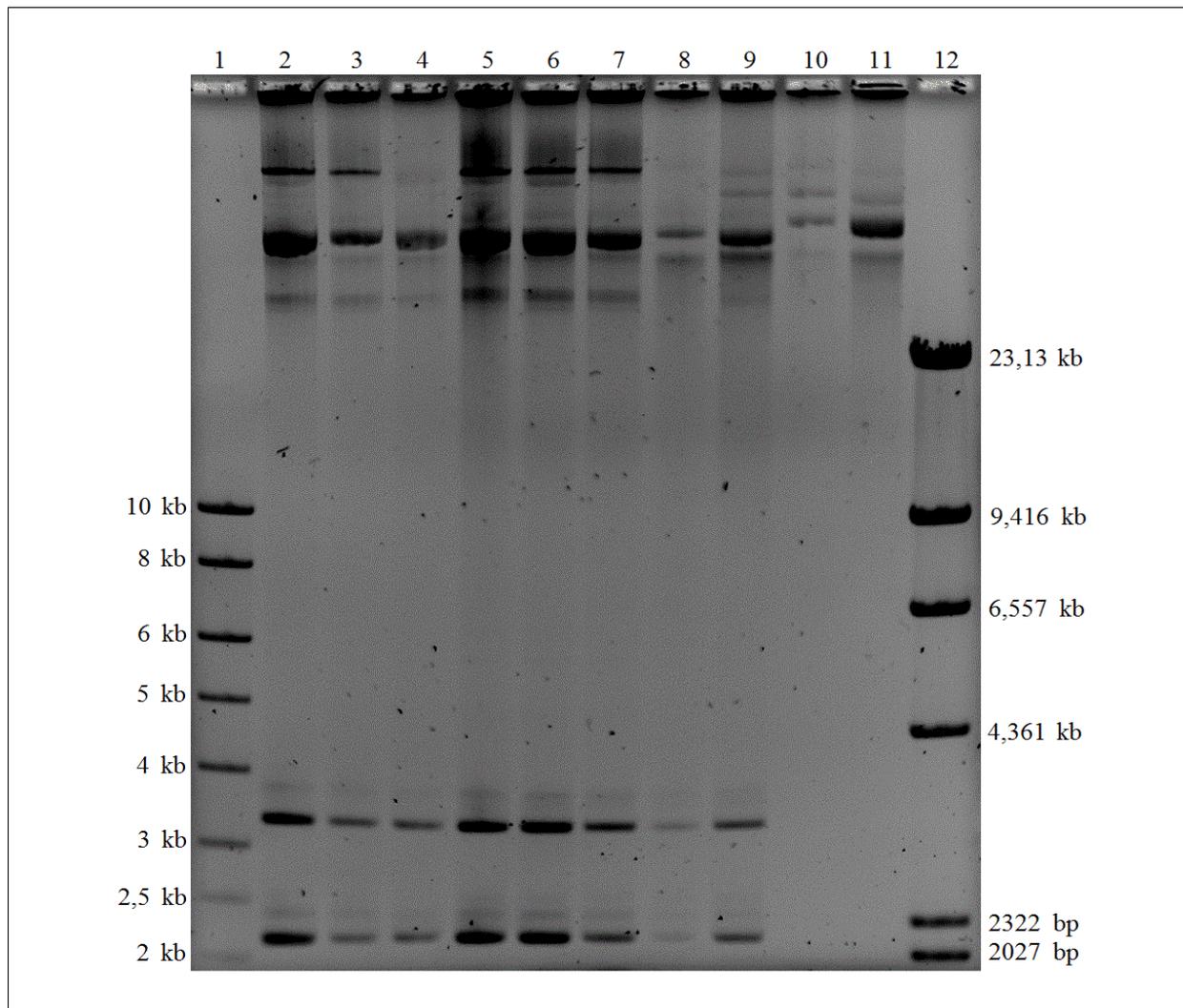
**Abbildung 4–10: Versuche zur EPS-Minimierung bei *E. cloacae* K21373.** Oben: TAE-Agarosegel, 0,5 %. Ethidiumbromid zur Färbung wurde dem Gel hinzugegeben. Spur 1: SmartLadder (NEB); Spur 12: Größenmarker *Hind*III-gespaltene  $\lambda$ -DNA (NEB; hier verschmiert durch Retentionseffekte). Bezüglich der übrigen Spuren s. die folgende Tabelle 4–9. Von den einzelnen Präparaten wurden jeweils 5  $\mu$ l aufgetragen. Unten: wie oberes Bild; es wurde jedoch mit Ethidiumbromid nachgefärbt; von den Präparaten wurden jeweils 15  $\mu$ l aufgetragen.

Tabelle 4–9: Beschickung der Agarose-Gele aus Abbildung 4–10 (abseits der hier speziell aufgeführten Punkte entsprach das Vorgehen den Angaben in Kapitel 3.2.1.2.1.4, ab S. 104)

Spur	ÜNK mit...		waschen der Plasmid-DNA mit Zwittergent 3-14	Alkohol zur DNA-Präzipitation	
	Bismut-Zusatz	Salicylat-Zusatz		Ethanol	Isopropanol
2	-	-	-	+	-
3	-	-	-	-	+
4	+	+	+	-	+
5	+	+	+	+	-
6	+	-	-	-	+
7	-	+	-	-	+
8	+	+	-	+	-
9	-	-	+	-	+
10	+	-	+	-	+
11	+	+	+	-	+

#### 4.1.5.2.2 Analyse von Plasmid-DNA isoliert nach der Methode von Crosa [165]

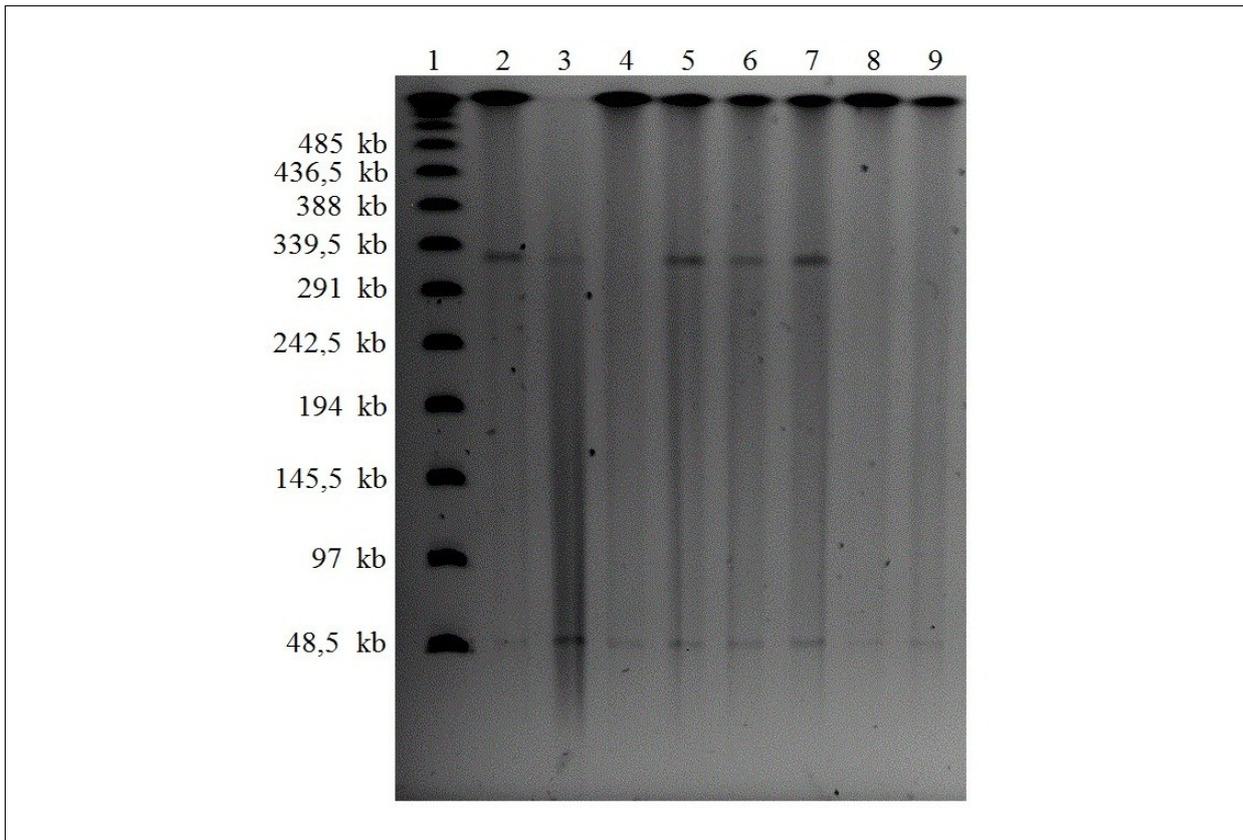
Das Ergebnis einer Plasmid-DNA Präparation nach der Methode von Crosa (Kapitel 3.2.1.2.3 (S. 105ff) im Methodenteil) ist in Abbildung 4–11 zu sehen.



**Abbildung 4–11: Plasmid-DNA Präparation nach Crosa für Isolate von *E. cloacae*.** TAE-Agarosegel, 0,5 %. Spur 1: Größenmarker SmartLadder (NEB). Spur 2: *E. cloacae* K21370; Spur 3: *E. cloacae* A17244/1; Spur 4: *E. cloacae* K21198; Spur 5: *E. cloacae* K20608; Spur 6: *E. cloacae* K20606; Spur 7: *E. cloacae* K19968; Spur 8: *E. cloacae* K21373; Spur 9: *E. cloacae* A17244/2. Spur 10: *K. pneumoniae* Va22038. Spur 11: *E. coli* C600S/RP1H (ca. 61 kb). Spur 12: Größenmarker *Hind*III-gespaltene  $\lambda$ -DNA (NEB).

#### 4.1.5.2.3 Detektion von großen Plasmiden mittels S1-PFGE

Die 8 Stämme des *E. cloacae*-Kollektivs wurden einer Analyse mittels S1-PFGE unterzogen (Abbildung 4–12). Dies diente zum einen der Erfassung auch vergleichsweise großer Plasmide, die durch andere Methoden nicht mehr detektiert werden konnten, und knüpft zum anderen an die epidemiologische Fragestellung eines möglichen klonalen Ursprungs an. Diese Methode ist in Kapitel 3.2.1.2.4 (S. 107ff) beschrieben.



**Abbildung 4–12: S1-PFGE für Stämme des *E. cloacae*-Kollektivs.** Pulsfeld-Agarosegel, 1 %. Spur 1: Größenmarker  $\lambda$ -Ladder PFG (NEB). Spur 2: *E. cloacae* K21370; Spur 3: *E. cloacae* A17244/1; Spur 4: *E. cloacae* K21198; Spur 5: *E. cloacae* K20608; Spur 6: *E. cloacae* K20606; Spur 7: *E. cloacae* K19968; Spur 8: *E. cloacae* K21373; Spur 9: *E. cloacae* A17244/2.

#### 4.1.5.2.4 Zusammenfassung der Ergebnisse zur Bestimmung des Plasmidprofils

Bei den *E. cloacae*-Isolaten konnten 3 bzw. 4 Plasmide gefunden werden. Alle *E. cloacae* verfügen über ein sehr kleines Plasmid mit ca. 2,4 kb, ein etwas größeres Plasmid mit ca. 6 kb sowie ein relativ großes Plasmid mit ca. 50 kb. Bis auf die Isolate K21198, K21373 und A17244/2 verfügen sie zudem über ein sehr großes Plasmid mit ca. 325 kb.

#### 4.1.6 Übertragung von Carbapenem-Resistenzeigenschaften durch Konjugation

Es wurde untersucht, ob Carbapenem-Resistenz-Determinante(n) auf einem konjugierbaren Plasmid codiert vorliegt. Dazu wurde in einem Konjugationsversuch (vgl. Kapitel 3.2.7.1, S. 149ff) mit dem chronologisch gesehen ersten *E. cloacae*-Isolat aus dem Kollektiv, *E. cloacae* K19968, als Donor gearbeitet, während *E. coli* J53-1 Azid<sup>R</sup> als Rezipient diente.

Zur Selektion von Transkonjuganden wurde auf einem Selektionsnährboden (LB-Agar) mit

---

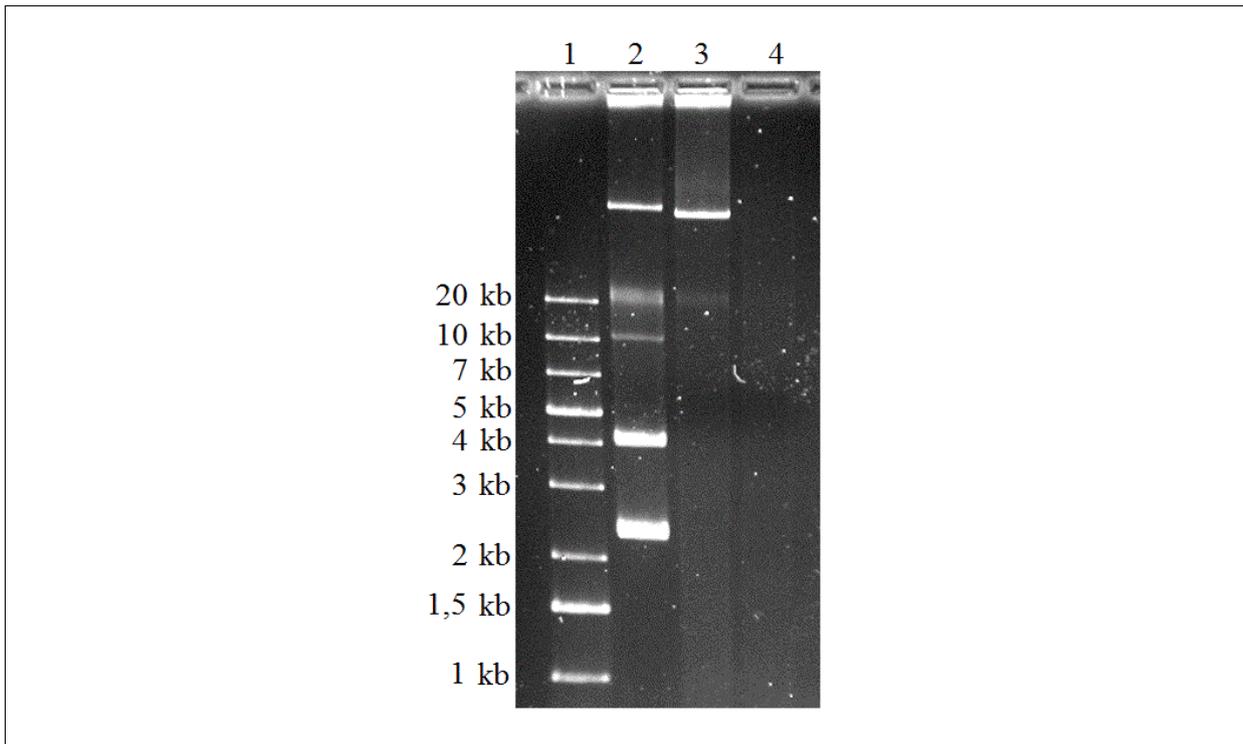
250 µg/ml Natriumazid und 1 µg/ml Meropenem gearbeitet. Imipenem erwies sich in Vorversuchen als zu instabil für dieses Unterfangen, wobei sich die relative Instabilität auch in der Literatur finden lässt [186]. Insbesondere im Zusammenspiel mit dem eher wachstumsbremsenden Natriumazid (diese Eigenschaft des Natriumazids tritt auch bei diesbezüglich resistenten Bakterien auf) kommt eine Instabilität zum Tragen. Die Konjugation erfolgte in einem qualitativen plate mating, wie in Kapitel 3.2.7.1.1 (S. 150) beschrieben.

#### **4.1.6.1 Nachweis erfolgreicher Konjugation mittels PCR**

Vermeintliche Transkonjuganden wurden durch Replikaplattierung vereinzelt, subkultiviert und einer Hitzelyse unterzogen, um ein grobes Präparat der Gesamt-DNA zu erhalten (Kapitel 3.2.1.1, S. 101). Dieses wurde als Template für eine PCR zum Nachweis von *bla*<sub>VIM</sub> benutzt, um die Übertragung des im *E. cloacae*-Kollektiv detektierten Carbapenemase-Gens zu untersuchen. Das Ergebnis ist Abbildung 4–1 (S. 174) zu entnehmen, in der auch die PCR-Resultate für Donor und Rezipient als jeweilige Positiv- und Negativkontrolle enthalten sind.

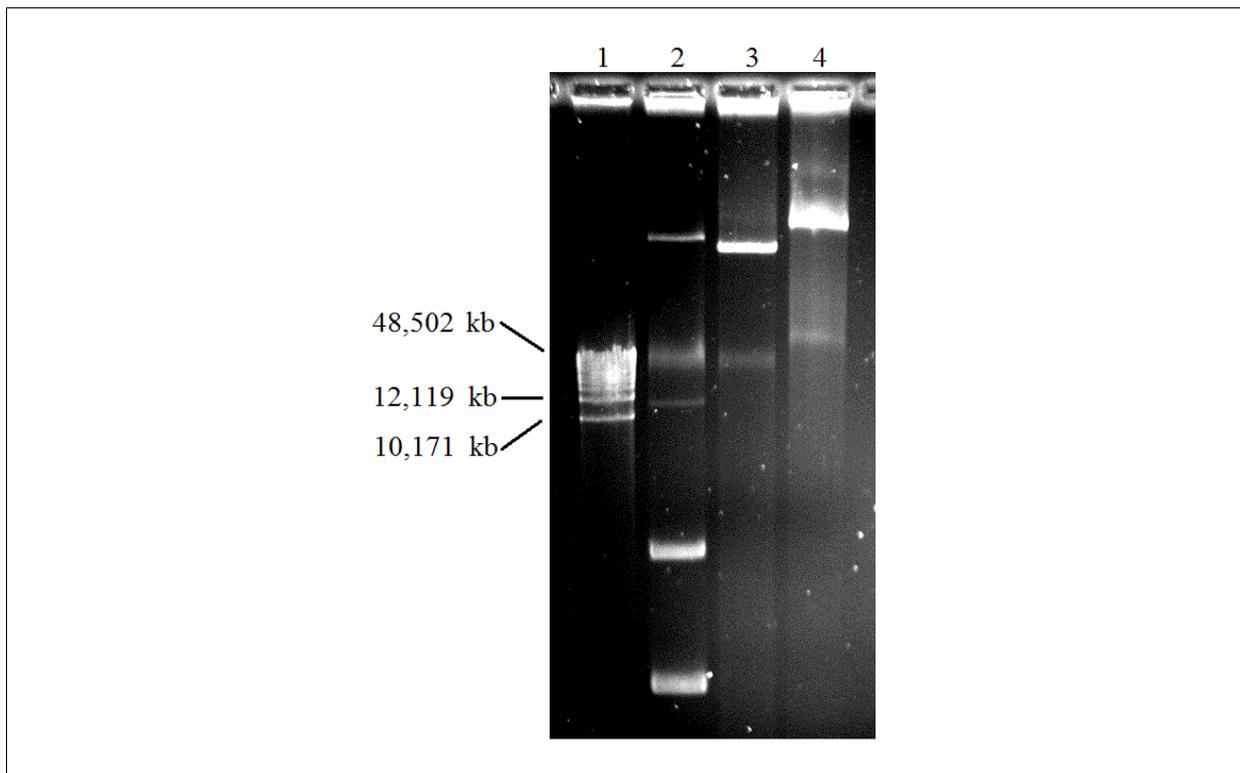
#### **4.1.6.2 Identifikation des übertragenen Plasmids**

Der Transkonjugand *E. coli* J53-1 Azid<sup>R</sup>/pVIM(EclK19968) wurde parallel mit dem Donor und dem Rezipienten einer alkalischen Lyse (Methode in Kapitel 3.2.1.2.1, S. 102ff) unterzogen, wobei den entsprechenden ÜNKs von Donor und Transkonjugand Meropenem in einer finalen Konzentration von 1 µg/ml zugesetzt wurde, um den Selektionsdruck aufrecht zu erhalten. Die isolierte Plasmid-DNA wurden in einer Agarose-Gelelektrophorese visualisiert (Abbildung 4–13).



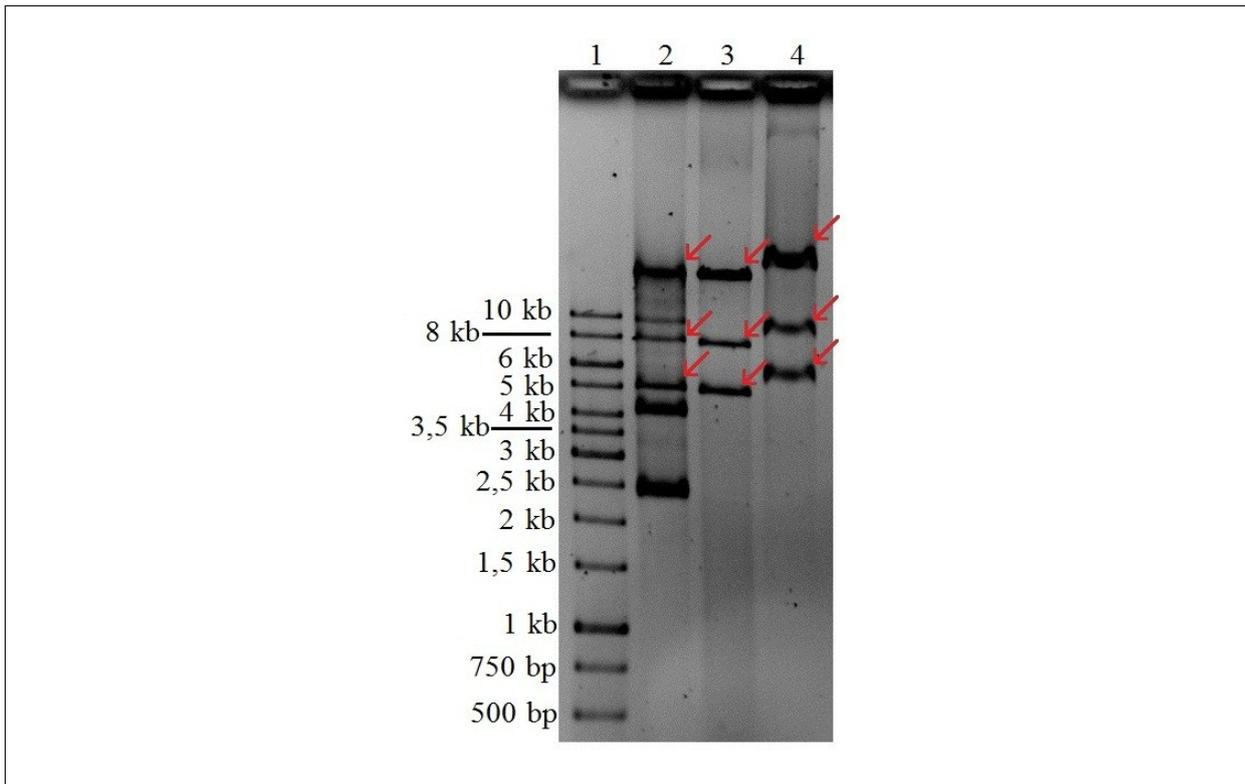
**Abbildung 4–13: Alkalische Lyse eines Transkonjuganden.** TAE-Agarosegel, 1 %, mit Ethidiumbromid nachgefärbt. Spur 1: Größenmarker O’GeneRuler 1 kb DNA Ladder Plus (Fermentas). Spur 2: Donor *E. cloacae* K19968; Spur 3: Transkonjugand *E. coli* J53-1 Azid<sup>R</sup>/pVIM(EclK19968); Spur 4: Rezipient *E. coli* J53-1 Azid<sup>R</sup>.

Plasmid-DNA aus dem Transkonjuganden wurde benutzt, um Calciumchlorid-kompetente *E. coli* JM109 zu transformieren. Die Methode ist in Kapitel 3.2.7.2.1 ab S. 152 beschrieben. Die Selektion der Transformanden erfolgte auf LB-Agar-Nährböden mit 0,5 µg/ml Meropenem. Ein Transformand wurde subkultiviert und analog dem Transkonjuganden einer Hitzelyse (Kapitel 3.2.1.1, S. 101 im Methodenteil) unterzogen, um die DNA als Template für eine PCR auf *bla*<sub>VIM</sub> zu verwenden (vgl. Abbildung 4–1, S. 174). Ferner wurde der Transformand ebenfalls einer alkalischen Lyse (Kapitel 3.2.1.2.1, S. 102) unterzogen, wobei auch hier bei der entsprechenden ÜNK Meropenem (Endkonzentration von 0,5 µg/ml) zugesetzt wurde. Das Resultat ist in Abbildung 4–14 dargestellt.



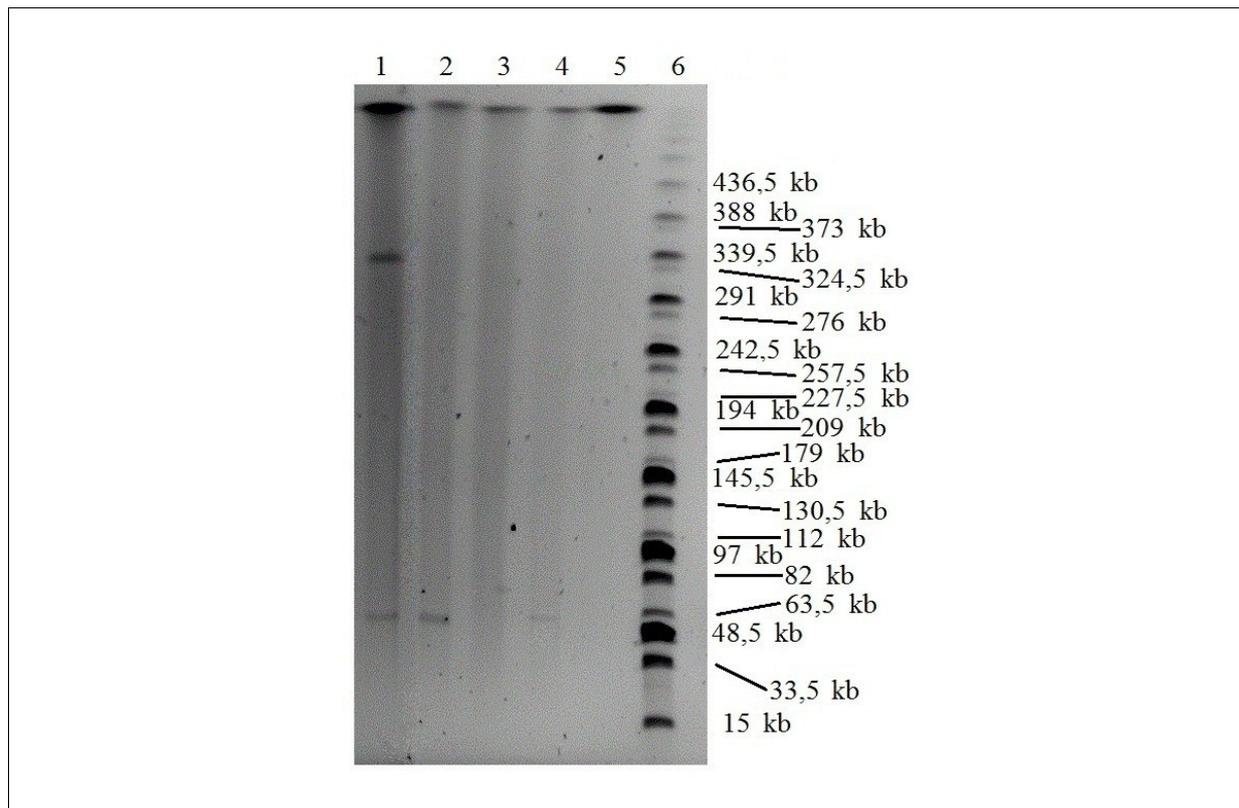
**Abbildung 4–14: Plasmid-DNA eines Transformanden nach alkalischer Lyse.** TAE-Agarosegel, 1 %, mit Ethidiumbromid nachgefärbt. Spur 1: Größenmarker GeneRuler High Range (Fermentas; hier nicht optimal aufgetrennt, da dieser Größenmarker auf 0,5 %ige Agarosegele ausgelegt ist). Spur 2: *E. cloacae* K19968; Spur 3: Transkonjugand *E. coli* J53-1 Azid<sup>R</sup>/pVIM(EclK19968); Spur 4: *E. coli* JM109/pVIM(EclK19968). Bei *E. coli* JM109/pVIM(EclK19968) wurde, im Gegensatz zu den beiden anderen Präparationen, keine Phenol-Chloroform-Extraktion durchgeführt.

Die Plasmid-DNA, wie sie mittels alkalischer Lyse isoliert wurde und in Abbildung 4–14 zu sehen ist, wurde jeweils einer Restriktionsspaltung mit dem Restriktionsenzym *Kpn*I unterzogen, um anhand des jeweils entstehenden Bandenmusters zu zeigen, dass es sich in den drei Fällen um das gleiche Plasmid handelt. Das resultierende Gelbild ist in Abbildung 4–15 zu sehen.



**Abbildung 4–15: *KpnI*-Restriktionsspaltung der Plasmid-DNA nach alkalischer Lyse.** TAE-Agarosegel, 1 %, mit Ethidiumbromid nachgefärbt. Spur 1: Größenmarker GeneRuler DNA Ladder 1 kb (Fermentas). Spur 2: *E. cloacae* K19968; Spur 3: Transkonjugand *E. coli* J53-1/pVIM(EclK19968); Spur 4: *E. coli* JM109/pVIM(EclK19968). Im Falle von *E. cloacae* K19968 wurden 5  $\mu$ l des Restriktionsspaltungsansatzes aufgetragen, von den übrigen beiden Ansätzen waren es jeweils 20  $\mu$ l. Die eingezeichneten Pfeile verdeutlichen identische Banden.

Abschließend wurden der Rezipient, der Transkonjugand sowie *E. coli* JM109 und dessen mit dem Plasmid pVIM(EclK19968) transformierte Variante einer S1-PFGE (Kapitel 3.2.1.2.4, S. 107ff) unterzogen, deren Resultat in Abbildung 4–16 zu sehen ist.

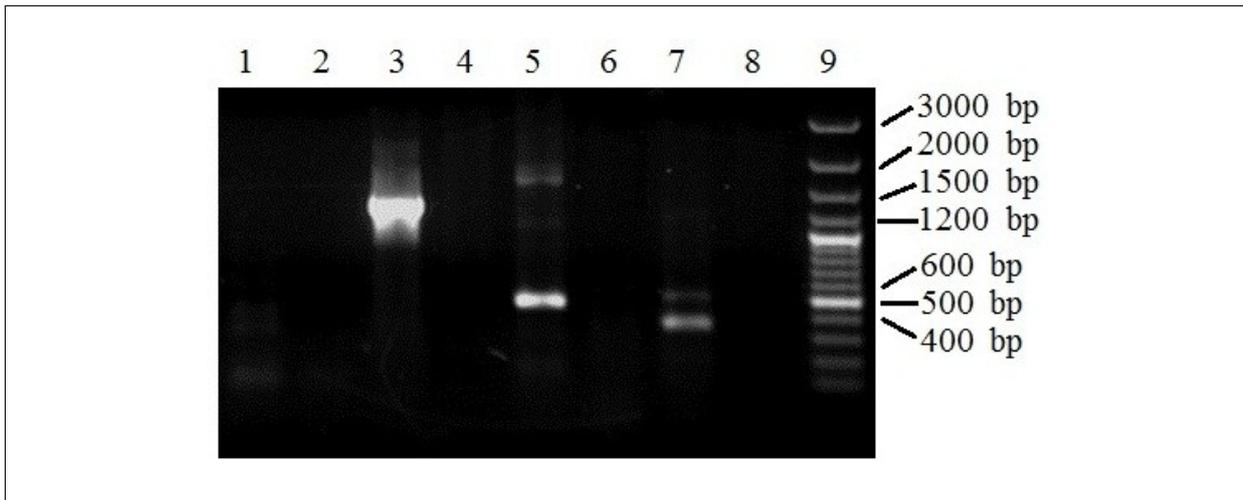


**Abbildung 4–16: S1-PFGE von Stämmen mit pVIM(EclK19968).** Pulsfeld-Agarosegel, 1 %. Spur 1: *E. cloacae* K19968; Spur 2: *E. coli* J53-1 Azid<sup>R</sup>/pVIM(EclK19968); Spur 3: *E. coli* J53-1 Azid<sup>R</sup>; Spur 4: *E. coli* JM109/pVIM(EclK19968); Spur 5: *E. coli* JM109. Spur 6: MidRange PFG Marker I (NEB).

#### 4.1.6.3 Untersuchung des übertragenen Plasmids (Integron)

Wie in Kapitel 4.1.3 gezeigt, wurde für das Isolat *E. cloacae* K19968 mittels PCR das Aminoglykosid-Resistenzgen *aac(6')*-Ib nachgewiesen. Solche Resistenzgene sind recht oft innerhalb eines Integrons assoziiert mit z.B. *bla<sub>VIM</sub>* [187].

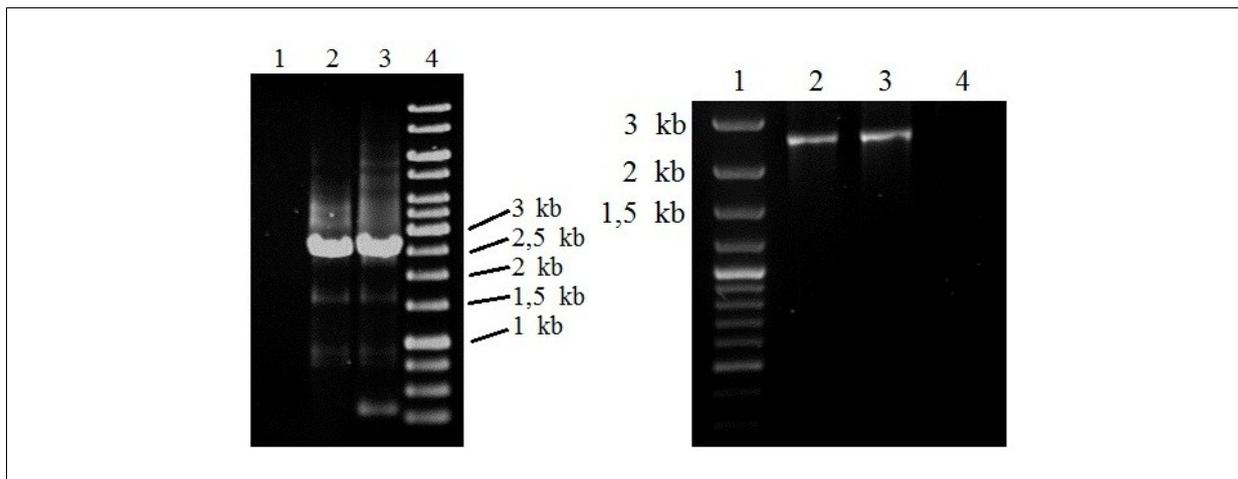
Um zu prüfen, ob die Gene *bla<sub>VIM</sub>* und *aac(6')*-Ib bei den *E. cloacae*-Isolaten benachbart und gegebenenfalls als Teil eines Integrons vorliegen, wurden im Zuge dieser Arbeit die Primer für die *aac(6')*-Ib-PCR und für die *bla<sub>VIM</sub>*-PCR wechselseitig in PCR-Ansätzen kombiniert. Als Template diente dabei der Transformand *E. coli* JM109/pVIM(EclK19968).



**Abbildung 4–17: Ergebnisse von PCRs mit Kombinationen von Primern für *aac(6')*-Ib- und *bla*<sub>VIM</sub>.** TAE-Agarosegel, 1 %. Spur 1: PCR mit Primern *bla*<sub>VIM</sub> +151 fw und *aac(6')*-Ib +1 fw; Spur 2: diesbezügliche Negativkontrolle. Spur 3: PCR mit Primern *bla*<sub>VIM</sub> +151 fw und *aac(6')*-Ib +519 rev; Spur 4: diesbezügliche Negativkontrolle. Spur 5: PCR mit Primern *bla*<sub>VIM</sub> +540 rev und *aac(6')*-Ib +1 fw; Spur 6: diesbezügliche Negativkontrolle. Spur 7: *bla*<sub>VIM</sub> +540 rev und *aac(6')*-Ib +519 rev; Spur 8: diesbezügliche Negativkontrolle. Spur 9: Größenmarker O'GeneRuler 100 bp plus (Fermentas).

Abbildung 4–17 zeigt ein Amplikon mit ca. 1.300 bp bei der Kombination des Forward-Primers für *bla*<sub>VIM</sub> und des Reverse-Primers von *aac(6')*-Ib. Dies kann man erwarten, wenn man annimmt, dass *bla*<sub>VIM</sub> als Kasette vor *aac(6')*-Ib lokalisiert ist, wie es in einem Integron der Fall sein könnte. Dazu passt *nicht* das ca. 500 bp große Amplikon bei der Kombination aus dem Reverse-Primer der *bla*<sub>VIM</sub>-PCR und dem Forward-Primer der *aac(6')*-Ib-PCR. Man kann hier über ein unspezifisches Produkt spekulieren, und tatsächlich bindet der *aac(6')*-Ib-Forward-Primer zu 65 % im vorderen Bereich von *bla*<sub>VIM</sub>, was zusammen mit dem Reverse-Primer der *bla*<sub>VIM</sub>-PCR in einem 490 bp-Amplikon resultieren würde.

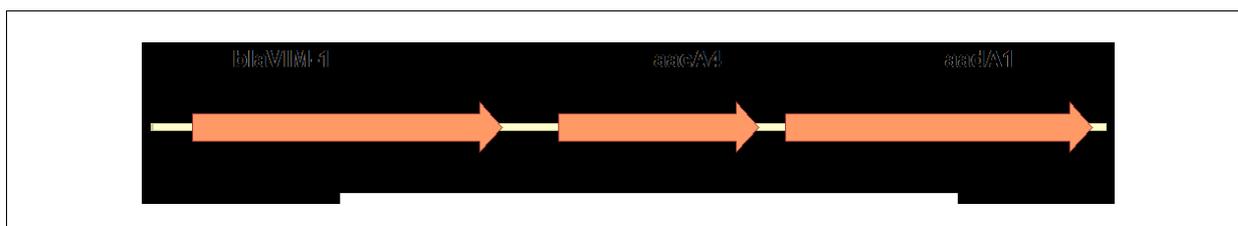
Um auf die Einbettung der Gene in ein Integron zu prüfen, wurde eine PCR durchgeführt, in der die Primer an den konservierten Strukturgenen im vorderen und hinteren Bereich eines Integrons binden (vgl. Abbildung 1–30, S. 60). Eine solche PCR gibt nicht nur eine prinzipielle Aussage über An- und Abwesenheit eines Integrons, sondern erlaubt bei positivem Ausfall über die Abschätzung der Amplikongröße auch Spekulationen über die Anzahl vorhandener Resistenzgenkassetten. Da Integrons mitunter relativ groß sein können [188], wurde hier eine LongAmp<sup>®</sup>-PCR (Kapitel 3.2.4.2, S. 132) durchgeführt, die mit einer Synthesezeit von 10 min theoretisch ein ca. 12 kb großes Integron erfassen könnte.



**Abbildung 4–18: Ergebnisse von Integron-PCRs.** Links: TAE-Agarosegel, 1 %. Spur 1: Negativkontrolle. Spur 2: *E. cloacae* K19968; Spur 3: *E. coli* JM109/pVIM(EclK19968). Spur 4: Größenmarker GeneRuler 1 kb (Fermentas). Rechts: TAE-Agarosegel, 1 %. Spur 1: Größenmarker O'GeneRuler 100 bp plus (Fermentas). Spur 2: *E. coli* JM109/pVIM(EclK19968); Spur 3: *E. cloacae* A17244/2; Spur 4: Negativkontrolle.

Abbildung 4–18 ist zu entnehmen, dass die Integron-PCR ein ca. 2.800 bp großes Amplikon lieferte. Durch wechselseitige Kombinationen der *bla*<sub>VIM</sub>-Primer, der *aac*(6')-Ib-Primer sowie der Primer für die Integron-Strukturgene konnte ermittelt werden, dass *bla*<sub>VIM</sub> die erste und *aac*(6')-Ib die zweite Resistenzkassette sein muss. Der verbleibende Teil hinter *aac*(6')-Ib bis zum Ende der Integronstruktur konnte noch eine, maximal zwei Resistenzkassetten umfassen.

Durch Sequenzierung ausgehend vom konservierten 3'-Segment des Integrons konnte der fehlende Bereich stromaufwärts schließlich als weiteres Aminoglykosid-Resistenzgen, nämlich *aadA1*, identifiziert werden. Dabei kam unter anderem auch ein für das hier nicht detektierte Gen *aphA15* spezifischer Primer zum Einsatz, welcher im vorliegenden Integron eher zufällig band und dies retrospektiv auch nur zu 63,2 %, was aber ausreichte. Das Integron wurde vollständig sequenziert und das Gen für die MBL wurde als *bla*<sub>VIM-1</sub> identifiziert. Das Integron ist bezüglich der Konstellation seiner Resistenzgen-Kassetten in Abbildung 4–19 dargestellt. Die Sequenz als solche ist in Anhang I (Kapitel 9.1, ab S. 305) zu finden.



**Abbildung 4–19: Anordnung der Resistenzkassetten im gefundenen Integron.** Direkt vor und hinter dem gezeigten Bereich binden die Primer „intI1 -40 rev Integrons“ und „qacEΔ1 -53 rev Integrons“.

#### 4.1.6.4 MHK-Werte unter Einfluss von pVIM(EclK19968)

Die Erfassung von MHK-Werten verschiedener Antibiotika (Methode in Kapitel 3.1.1 ab S. 97) ergab die in Tabelle 4–10 aufgeführten Werte für den Transformanden *E. coli* JM109/pVIM(EclK19968).

Tabelle 4–10: Einfluss von pVIM(EclK19968) auf MHK-Werte (angegeben in µg/ml)

	<i>E. coli</i> JM109	<i>E. coli</i> JM109/pVIM(EclK19968)
<b>Ertapenem</b>	0,004	1
<b>Ertapenem + Zn (250 mM)</b>	0,008	2
<b>Imipenem</b>	0,125	2
<b>Imipenem + Zn (250 mM)</b>	0,0625	4
<b>Meropenem</b>	0,004	1
<b>Meropenem + Zn (250 mM)</b>	0,008	4

#### 4.1.7 Untersuchung des *ampC*-Induktionssystems

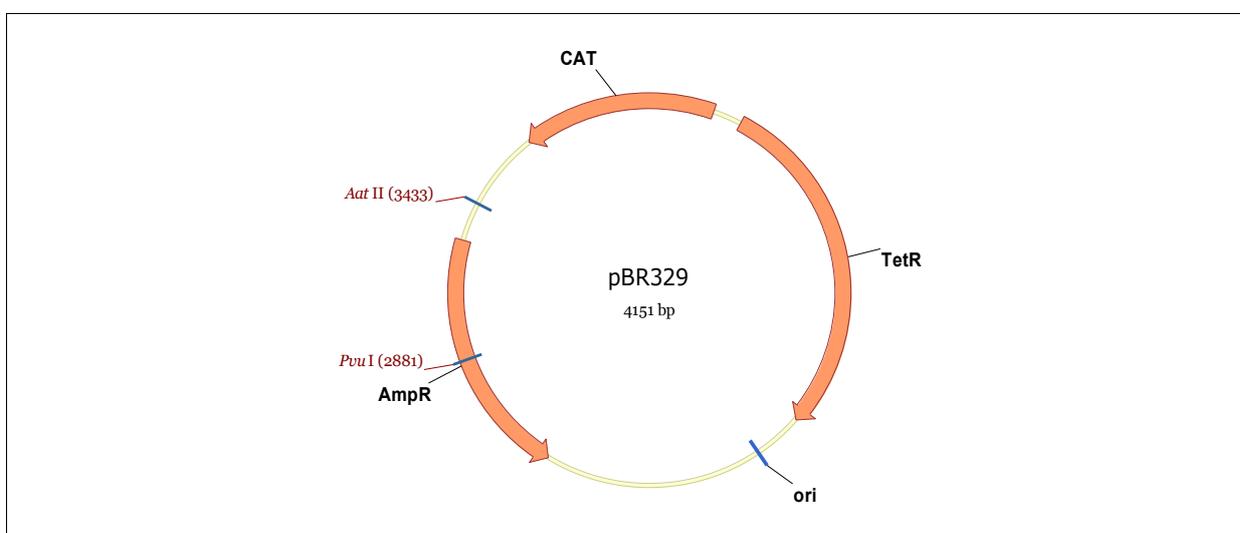
##### 4.1.7.1 Selektion einer *ampD*-Mutanten

Ausgehend von *E. cloacae* 14 wurde eine spontane *ampD*-Mutante selektiert. Dazu wurden 3 ml LB-Medium mit einer Kolonie des Bakteriums beimpft und für 7 h bei 37 °C und 130 U/min auf einem Schüttelinkubator inkubiert. Anschließend wurden 200 µl dieser Kultur auf LB-Nährböden mit 32 µg/ml Cefotaxim ausplattiert und über Nacht bei 37 °C in einem Brutschrank inkubiert. Zehn ausgewählte Kolonien (bezeichnet als *E. cloacae* 14-M01 bis 14-M10) wurden auf LB-Nährböden mit 32 µg/ml Cefotaxim subkultiviert (Kapitel 3.1.1, S. 97) und analog inkubiert. Die daraus erhaltenen Kulturen wurden als Glycerinkulturen angelegt (Kapitel 3.1.2, S. 97). Darüber hinaus wurden die *ampD*-Gene der erzeugten Mutanten sequenziert (Resultate in Kapitel 4.1.7.3, S. 208).

#### 4.1.7.2 System zur Untersuchung einer *ampC*-Dereprimierung

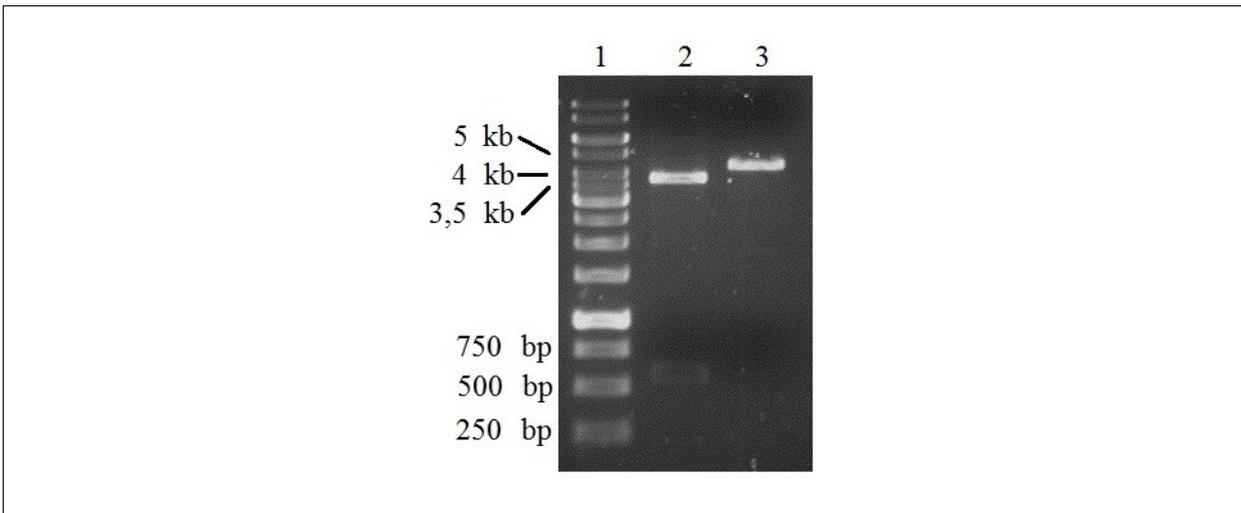
##### 4.1.7.2.1 Klonierung von *ampD*-Genen

*ampD*-Gene von *E. cloacae* 14, *E. cloacae* 14-M01, *E. cloacae* K19968, *E. cloacae* A17244/1 und *E. cloacae* A17244/2 wurden in den Vektor pBR329 $\Delta$ Amp<sup>R</sup> kloniert. Dafür wurde zunächst die Ampicillin-Resistenzkassette in pBR329 (Abbildung 4–20) durch eine interne Deletion zerstört: pBR329 wurde einem Doppelverdau mit *Aat*II und *Pvu*I unterzogen. *Pvu*I schneidet innerhalb der Ampicillin-Resistenzkassette, *Aat*II hierzu im 3'-Bereich.



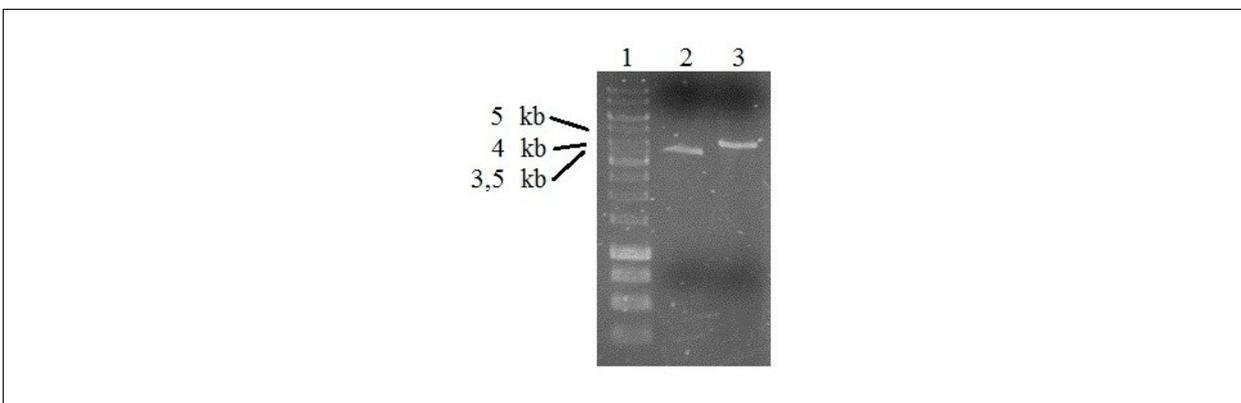
**Abbildung 4–20: Plasmidkarte von pBR329.**

Die Spaltprodukte wurden zur Kontrolle auf einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Die Restriktionsspaltung zeigt ein Fragment mit einer erwarteten Größe von 3.599 bp. Das kleinere Fragment mit 552 bp ist ebenfalls zu erkennen (Abbildung 4–21).



**Abbildung 4–21: *AatII/PvuI*-Doppelverdau von pBR329.** TAE-Agarosegel, 1 %. Spur 1: Größenmarker GeneRuler 1 kb (Fermentas). Spur 2: Doppelverdau. Spur 3, zum Vergleich: mit *AatII* verdautes, linearisiertes pBR329.

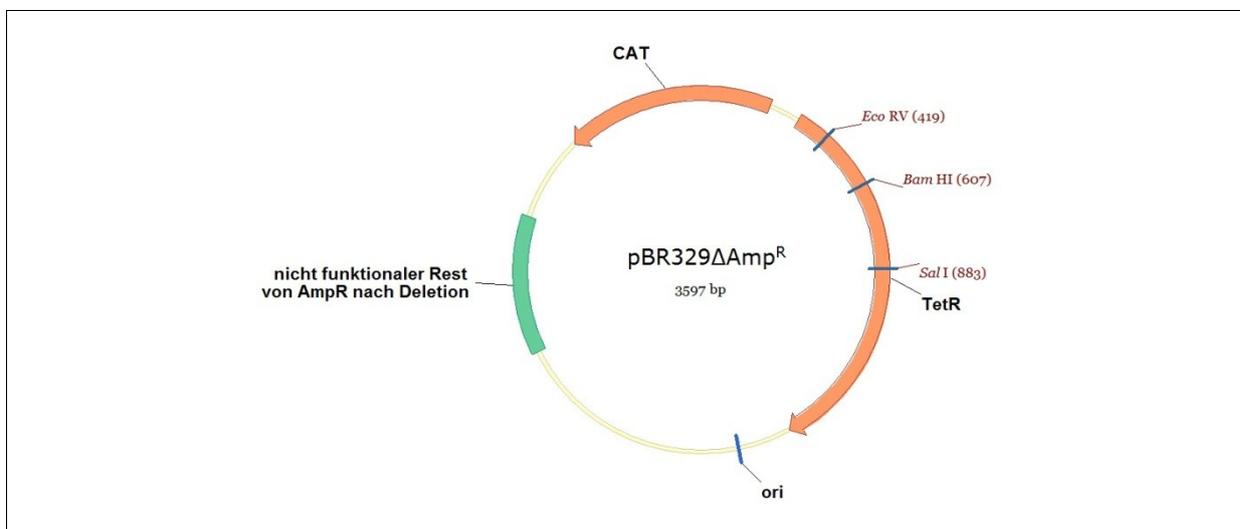
Der Verdau-Ansatz wurde mit Hilfe des NucleoSpin<sup>®</sup> Extract II Kits der Firma Macherey-Nagel aufgereinigt (Kapitel 3.2.2.1, S. 109). Dabei wurde der Puffer NT in einem Verhältnis von einem Teil Puffer mit 8 Teilen Reinstwasser gemischt, um den Angaben der Anleitung des Kits entsprechend [189] eine Entfernung des kleineren Fragmentes zu erreichen (vgl. Abbildung 4–22).



**Abbildung 4–22: pBR329-Doppelverdau, aufgereinigt.** TAE-Agarosegel, 1 %. Spur 1: Größenmarker GeneRuler 1 kb (Fermentas). Spur 2: aufgereinigtes 3599 bp-Produkt des Doppelverdaus; das kleinere 552 bp-Produkt aus Abbildung 4–21 wurde entfernt. Spur 3, zum Vergleich: *AatII*-Restriktionsspaltung von pBR329, der den gleichen Reinigungsvorgang durchlief.

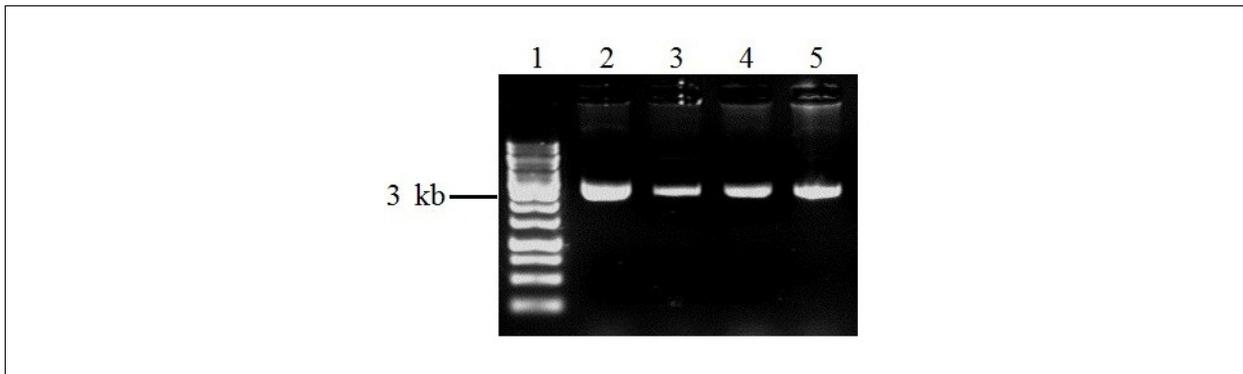
Die 3′-überhängenden Enden des verbliebenen Fragments wurden mit Klenow Fragment zu glatten Enden abgedaut (Kapitel 3.2.3.2, S. 111) und anschließend ligiert (Kapitel 3.2.3.4, S. 114). Insgesamt wurde somit ein zur Inaktivierung ausreichend großes Stück aus der

Ampicillin-Resistenzkassette herausgeschnitten. Abbildung 4–23 zeigt eine Plasmidkarte des Produktes.

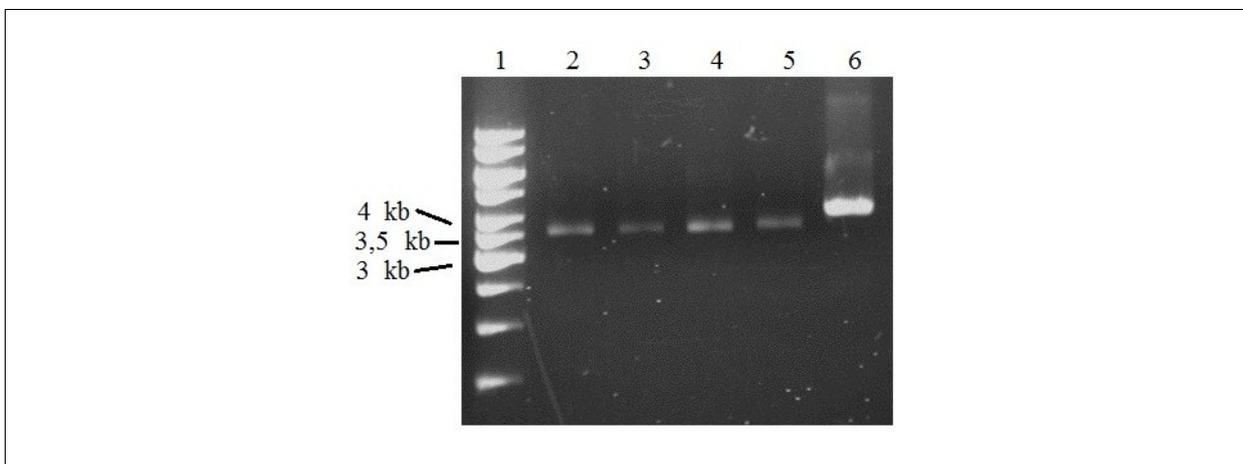


**Abbildung 4–23: Plasmidkarte von pBR329ΔAmp<sup>R</sup>.** Der grün eingezeichnete Abschnitt stellt den nunmehr inaktiven Rest der Ampicillin-Resistenzkassette dar.

Das Ligationsprodukt wurde benutzt, um gefrierkompetente *E. coli* JM109 zu transformieren (vgl. Kapitel 3.2.7.2.1, S. 152). Die Selektion der Transformanten erfolgte auf einem LB-Agar-Nährboden mit 30 µg/ml Chloramphenicol. Die gewachsenen Kolonien wurden einzeln mit sterilen Zahnstochern gepickt und mittels Replikaplattierung parallel auf einen LB-Agar-Nährboden mit 50 µg/ml Ampicillin sowie einen LB-Agar-Nährboden mit 30 µg/ml Chloramphenicol übertragen. Diejenigen Kolonien, die zwar auf Chloramphenicol, nicht aber auf Ampicillin wuchsen, verfügten am ehesten über das erwartete Plasmid mit der inaktivierten Ampicillin-Resistenzkassette. Mögliche, positive Kandidaten (d.h. diejenigen, die ausschließlich auf Chloramphenicol wuchsen) wurden einer alkalischen Lyse (Methode in Kapitel 3.2.1.2.1, S. 102; Resultat vgl. Abbildung 4–24) und einer Restriktionsspaltung mit *SalI* (vgl. Abbildung 4–25) unterzogen.

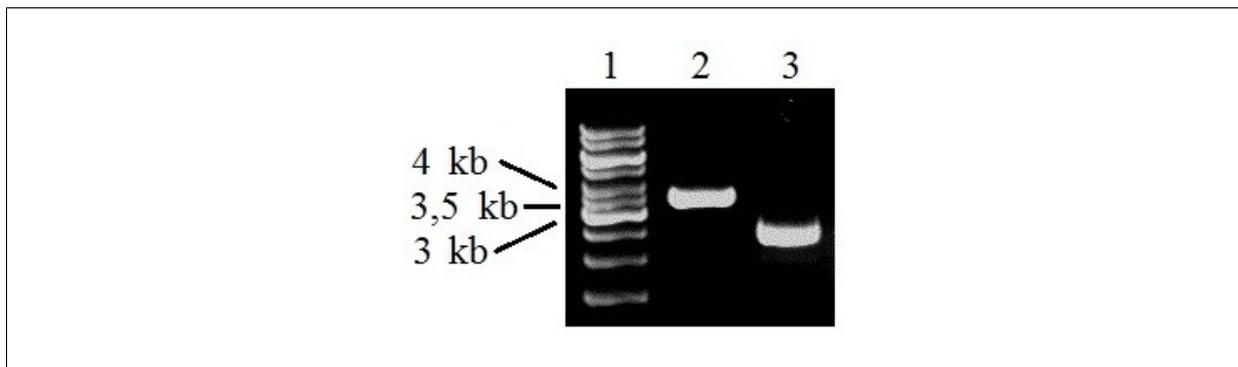


**Abbildung 4–24: Alkalische Lyse möglicher *E. coli* JM109/pBR329ΔAmp<sup>R</sup>.** TAE-Agarosegel, 1 %. Spur 1: Größenmarker GeneRuler 1 kb (Fermentas). Spuren 2 bis 5: alkalische Lysen von möglichen Kandidaten bzgl. des gewünschten Plasmids.



**Abbildung 4–25: *SalI*-Restriktionsspaltung von pBR329ΔAmp<sup>R</sup>.** TAE-Agarosegel, 1 %. Spur 1: Größenmarker GeneRuler 1 kb (Fermentas). Spuren 2 bis 5: *SalI*-Restriktionsspaltungen der alkalischen Lysen entsprechend Abbildung 4–24. Spur 6, zum Vergleich: *SalI*-Restriktionsspaltung von pBR329 (4.151 bp). Erwartet wurde für pBR329ΔAmp<sup>R</sup> eine Größe von 3.597 bp. Wie die Entwicklung des Gels zeigt, erfolgte die Elektrophorese nicht 100 %ig parallel zu den Gelseiten.

Von einem der als positiv befundenen Kandidaten wurde eine Glycerinkultur angelegt (Kapitel 3.1.2, S. 97) sowie eine Midi-Präparation mit dem NucleoBond<sup>®</sup> Xtra Midi-Kit des Unternehmens Macherey-Nagel (Kapitel 3.2.1.2.5.2, S. 109) durchgeführt, um den Klonierungsvektor in größerem Maßstab zu gewinnen. Dieser wurde dann einer Restriktionsspaltung mit *SalI* in direkter Kombination mit einer Dephosphorylierung (mit FastAP<sup>™</sup>) unterzogen (Abbildung 4–26).



**Abbildung 4–26: *SalI*-Restriktionsspaltung und Dephosphorylierung von pBR329ΔAmp<sup>R</sup>.** TAE-Agarosegel, 1 %. Spur 1: Größenmarker GeneRuler 1 kb (Fermentas). Spur 2: pBR329ΔAmpR verdaut mit *SalI* und dephosphoryliert mit FastAP<sup>TM</sup>. Spur 3: Midi-Präparation von pBR329ΔAmpR.

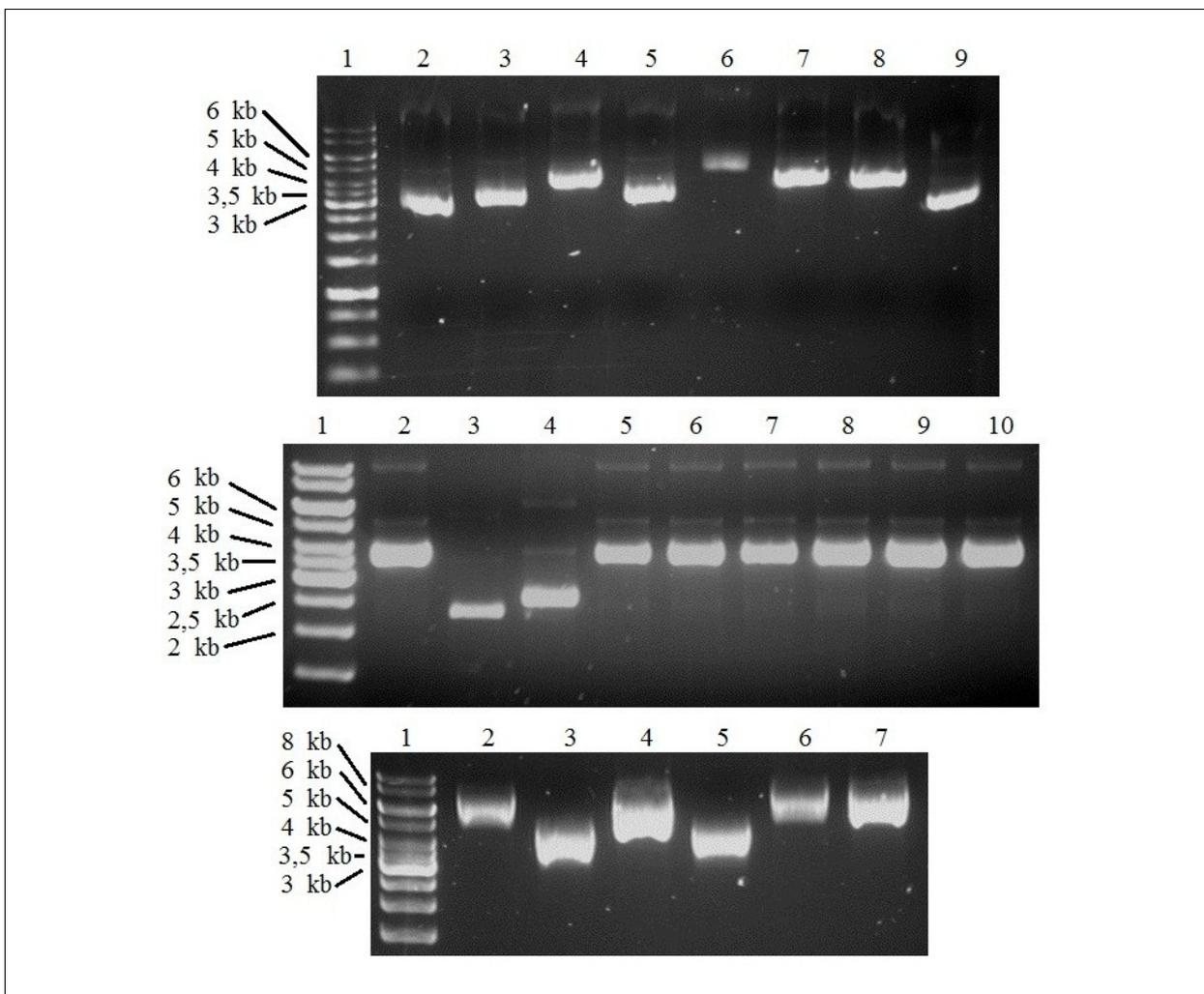
Der so für die Aufnahme eines *ampD*-Fragmentes vorbereitete Vektor wurde innerhalb der Tetracyclin-Resistenzkassette mit *SalI* geschnitten und linearisiert, so dass bei Insertion eines Fragmentes an dieser Stelle die Tetracyclin-Resistenz vermittelnde Eigenschaft des Vektors verloren ginge.

Unter Verwendung der Primer „*SalI*-ampD -135 fw *E.cloacae*“ und „*SalI*-ampD +1145 rev *E.cloacae*“ wurden die *ampD*-Gene der eingangs erwähnten Stämme mit Hilfe der Phusion<sup>®</sup>-Polymerase amplifiziert (Kapitel 3.2.4.3, S. 133) und gleichzeitig um eine *SalI*-Schnittstelle an den Enden des Amplifikats erweitert. Die Haupt-Amplifikate (erwartet: 1.537 bp) wurden aus einem präparativen Agarosegel unter Verwendung des NucleoSpin<sup>®</sup> Extract II Kits von Macherey-Nagel eluiert (Kapitel 3.2.2.2, S. 109). Die Produkte der Aufreinigung wurden einer *SalI*-Restriktionsspaltung unterzogen, wobei pro Molekül 3 Produkte entstanden: 2x 4 bp mit je 4 Basen 5'-Überhängen, sowie das Hauptfragment mit 1.521 bp inkl. den entsprechenden 5'-Überhängen von je 4 Basen an beiden Enden. Die beiden kleinen Fragmente würden in einer Ligation mit dem Klonierungsvektor Suizid-Substrate darstellen, deshalb wurden diese durch abermalige Aufreinigung mit dem NucleoSpin<sup>®</sup> Extract II Kit entfernt (Kapitel 3.2.2.1, S. 109).

Die Fragmente wurden mit dem vorbereiteten Vektor ligiert (Kapitel 3.2.3.4, S. 114). Der Ligationsansatz wurde benutzt, um *E. coli* JM109 zu transformieren (Kapitel 3.2.7.2.1, S. 152). Der Transformationsansatz wurde auf LB-Agar-Nährböden mit 30 µg/ml Chloramphenicol ausplattiert, entstandene Kolonien wurden einer Replikaplattierung durch Picken und paralleles Überimpfen auf LB-Agar-Nährböden mit zum einen 30 µg/ml Chloramphenicol sowie zum anderen 10 µg/ml Tetracyclin unterzogen. Wie oben erwähnt,

wird durch den Einbau des jeweiligen *ampD*-Fragments in die *SalI*-Schnittstelle von pBR329 $\Delta$ Amp<sup>R</sup> dessen Tetracyclin-Resistenzkassette inaktiviert, ergo durften positive Klone nicht auf dem Nährboden mit Tetracyclin wachsen.

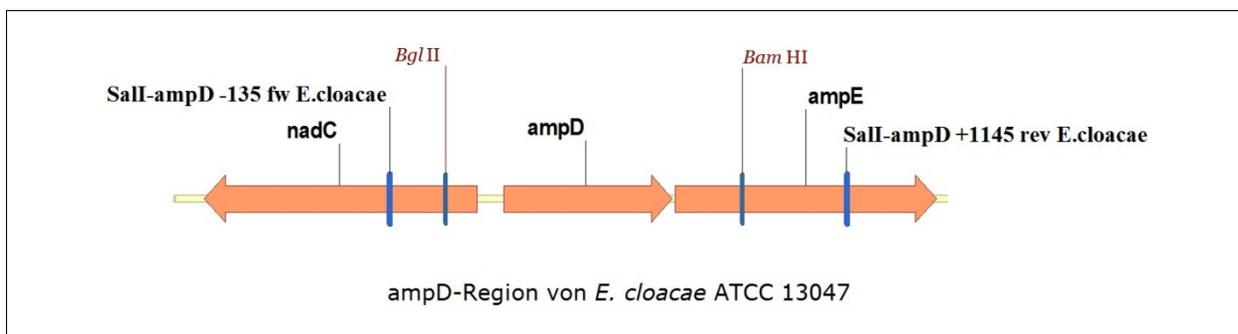
Vermeintlich positive Klone wurden als ÜNK (Kapitel 3.1.3, S. 98) mit Selektionsdruck durch Zusatz von 30  $\mu$ g/ml Chloramphenicol angeimpft. Am Folgetag erfolgte eine Präparation des jeweiligen Konstruktes mit Hilfe des Hi Yield<sup>®</sup> Kits von SLG (Kapitel 3.2.1.2.5.1, S. 109; die Gelbilder in Abbildung 4–27 zeigen die Resultate ausgewählter Kandidaten).



**Abbildung 4–27: Präparationen vermeintlich positiver Konstrukte.** TAE-Agarosegele, 1 %. Oben: Spur 1: Größenmarker GeneRuler 1 kb (Fermentas). Spuren 2 bis 5: Kandidaten für pHPJW12-11.1. Spuren 6 bis 8: Kandidaten für pHPJW12-11.2. Spur 9: Kandidat für pHPJW12-11.5. Mitte: Spur 1: Größenmarker GeneRuler 1 kb (Fermentas). Spuren 2 und 3: Kandidaten für pHPJW12-11.2. Spuren 4 bis 8: Kandidaten für pHPJW12-11.3. Spuren 9 und 10: Kandidaten für pHPJW12-11.4. Unten: Spur 1: Größenmarker GeneRuler 1 kb (Fermentas). Spuren 2 bis 7: Kandidaten für pHPJW12-11.5.

Die Präparate wurden dann einer Restriktionsspaltung mit *Bam*HI bzw. *Eco*RV unterzogen, um Informationen über einen korrekt erfolgten Einbau des *ampD*-Fragments sowie dessen Orientierung zu erhalten. Die Orientierung ist in diesem Fall für die Expression des klonierten *ampD*-Gens nicht relevant, es wurde zwecks Vergleichbarkeit aber eine identische „r“-Orientierung aller 5 klonierten *ampD*-Gene angestrebt.

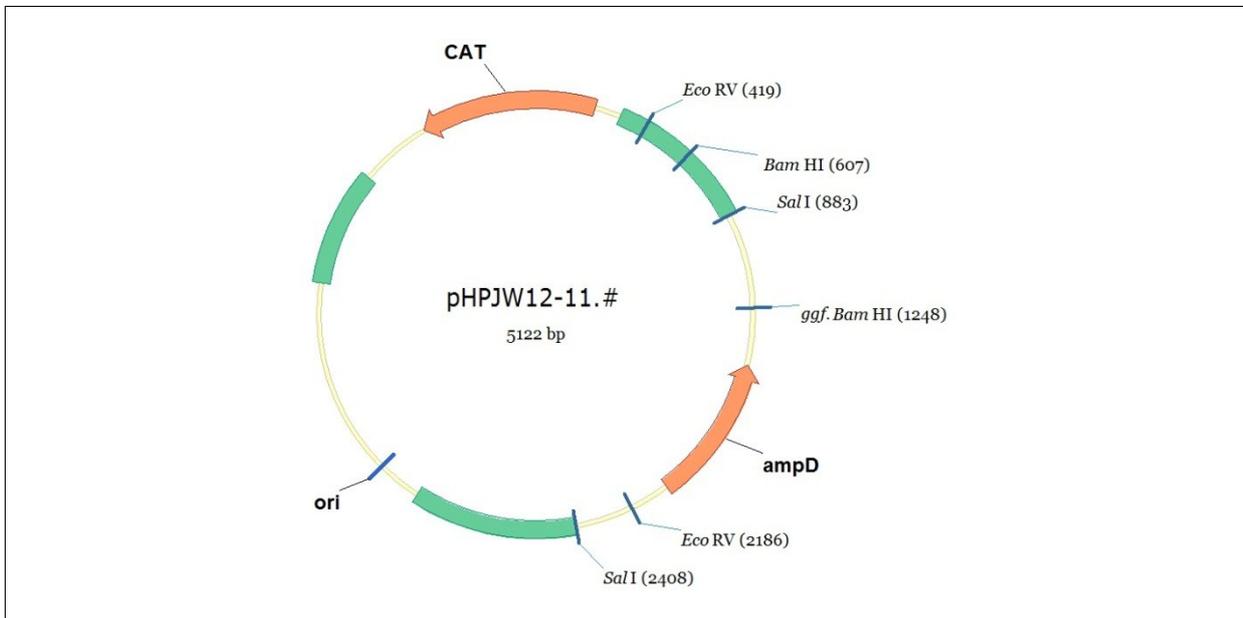
Aus Vorversuchen war zu diesem Zeitpunkt bekannt, dass die *ampD*-Fragmente aus dem *E. cloacae*-Kollektiv keine, das *ampD*-Fragment aus *E. cloacae* 14 und *E. cloacae* 14-M01 eine Schnittstelle für *Bam*HI besitzt. Die Vorversuche begründeten sich in einer zunächst anders ausgelegten Klonierungsstrategie, die auf der im Mai 2010 von Ren et al. publizierten Sequenz von *E. cloacae* ATCC 13047 (Genbank-ID CP001918) [190] basierte. Anhand dieser Sequenz wurden auch die oben erwähnten Primer entworfen, zunächst jedoch ohne die *Sal*I-Schnittstelle, denn ursprünglich war geplant, das Amplikon mit *Bam*HI und *Bgl*III doppelt zu verdauen, was kompatible Enden erzeugt und eine unproblematische Ligation in die *Bam*HI-Schnittstelle von pBR329 $\Delta$ Amp<sup>R</sup> ermöglicht hätte.



**Abbildung 4–28: *ampD*-Region von *E. cloacae* ATCC 13047.** Es sind die beiden Primer eingezeichnet, die für die Klonierung von *ampD* verwendet wurden und das Amplikon um *Sal*I-Schnittstellen an beiden Enden erweiterten.

Wie sich herausstellte, schnitt bei Amplikons ausgehend von *E. cloacae* K21370 sowie *E. cloacae* K19968 keines der beiden Enzyme. Bei einem Amplikon ausgehend von *E. cloacae* 14 schnitten wiederum beide Enzyme. Da die betreffenden Schnittstellen also z.T. offensichtlich fehlten, wurde die Strategie bezüglich der *ampD*-Klonierung zugunsten einer auf *Sal*I-basierenden verworfen. Hier interessant sind die gewonnenen Erkenntnisse, weil u.a. *Bam*HI zur Charakterisierung der Konstrukte herangezogen wurde.

Wie Abbildung 4–23 (S. 197) zu entnehmen ist, verfügt der Klonierungsvektor pBR329 $\Delta$ Amp<sup>R</sup> ebenfalls über eine Schnittstelle für *Bam*HI. *Eco*RV schneidet jeweils einmal in dem *ampD*-Fragment sowie im Vektor.



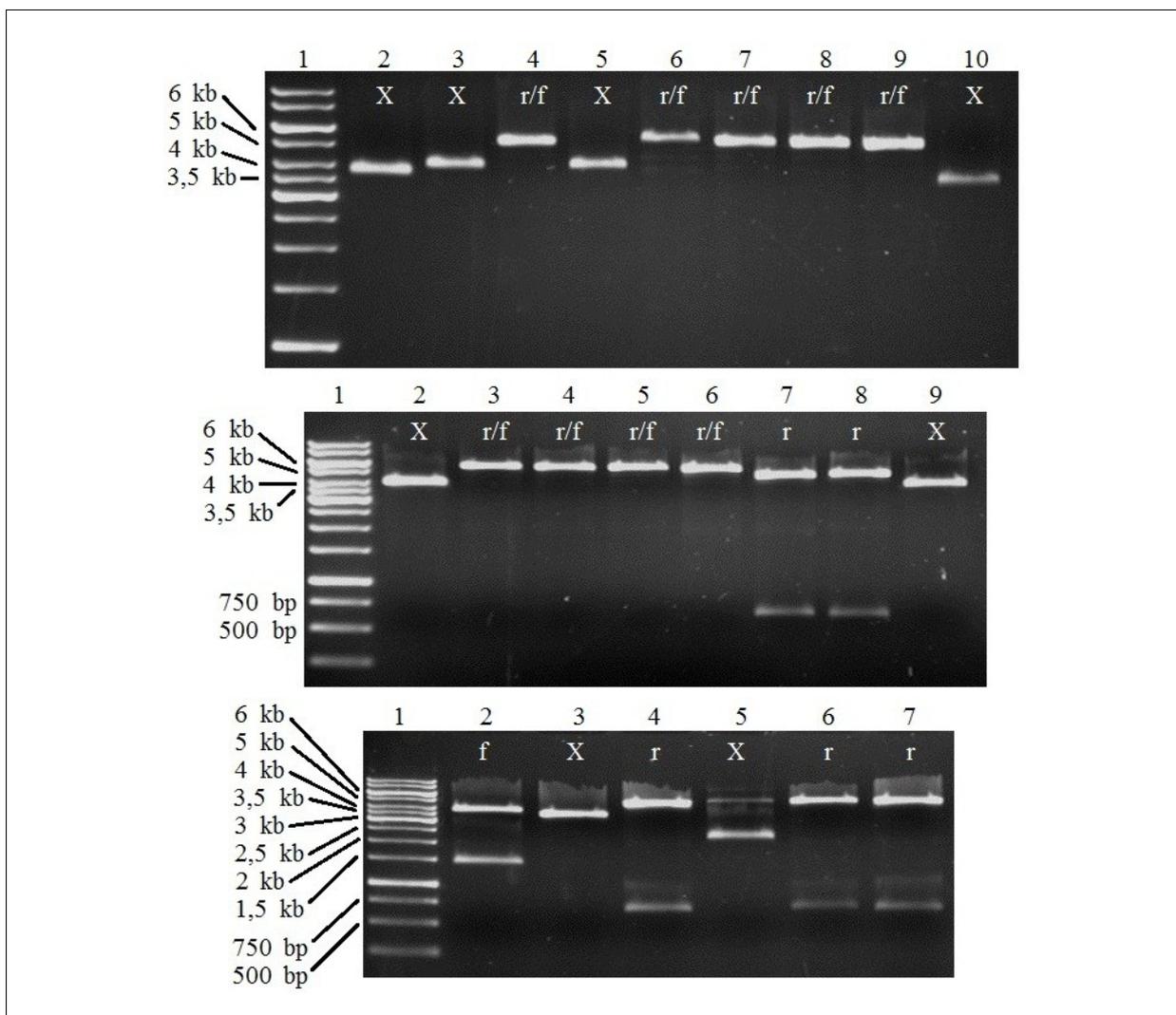
**Abbildung 4–29: Plasmide der pHPJW12-11.#-Serie.** Die # gibt eine laufende Nummer an, die für den Ursprung des klonierten *ampD* steht. 1: *E. cloacae* K19968; 2: *E. cloacae* A17244/1; 3: *E. cloacae* 17244/2; 4: *E. cloacae* 14; 5: *E. cloacae* 14-M01. In grün sind die Reste der nicht mehr funktionalen CDS Amp<sup>R</sup> bzw. TetR eingezeichnet. Das in TetR inserierte Fragment mit *ampD* wird von den beiden *Sal*I-Schnittstellen flankiert und ist hier in der „r“-Orientierung dargestellt. Die *Bam*HI-Schnittstelle im Insert ist nur bei den laufenden Nummern 4 und 5 vorhanden.

Für die Konstrukte ließen sich die in Tabelle 4–11 angegebenen Zusammenhänge zwischen Fragmentgrößen nach *Bam*HI- bzw. *Eco*RV-Restriktionsspaltung und Orientierung des jeweiligen *ampD*-Fragmentes ableiten. Die r(everse)-Orientierung bzw. die f(oward)-Orientierung bezieht sich hierbei auf die Expressionsrichtung von *ampD* relativ zur Expressionsrichtung der Tetracyclin-Resistenzkassette, in die das Fragment inseriert wurde.

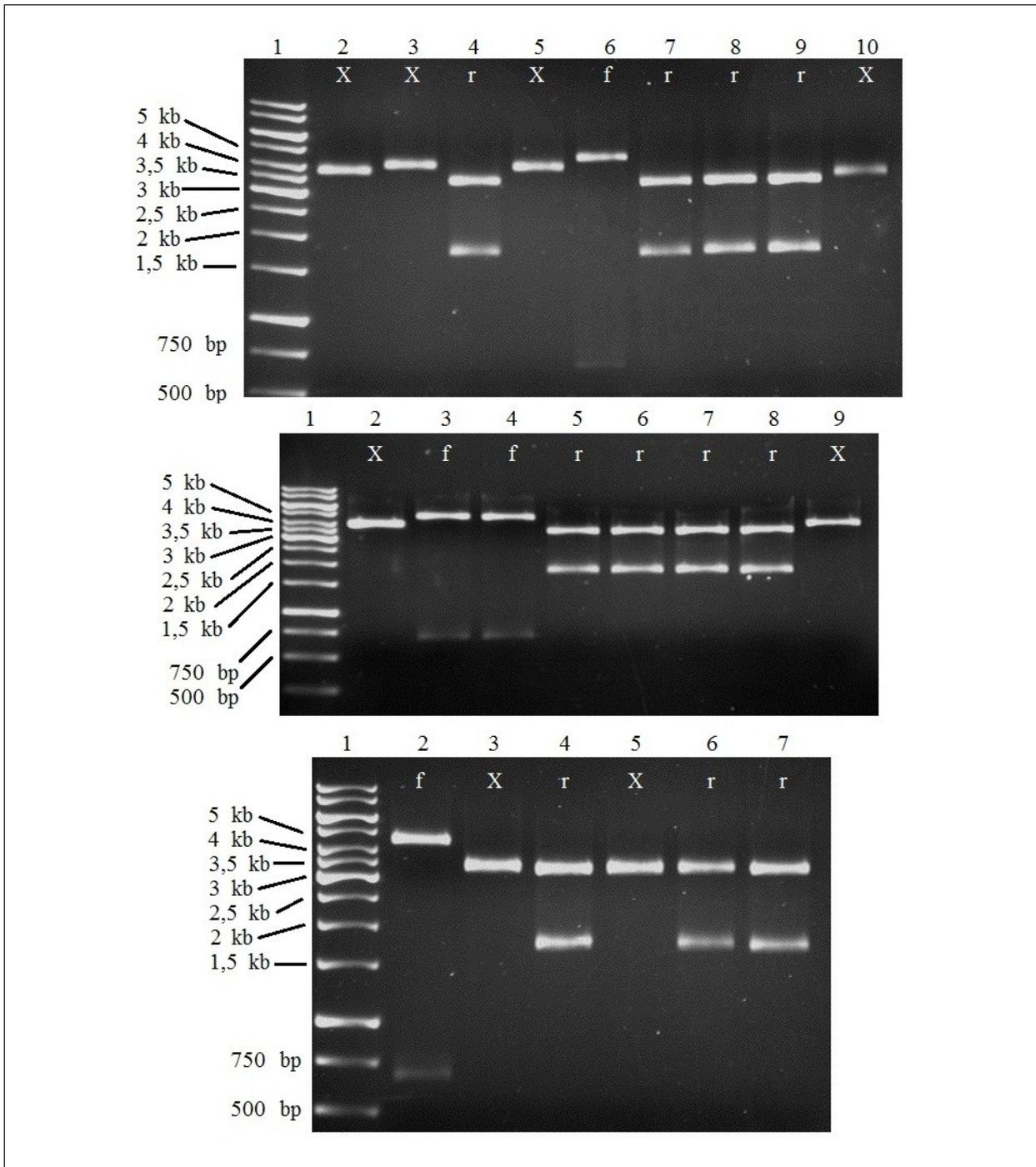
Tabelle 4–11: Charakterisierung durch *Bam*HI / *Eco*RV-Restriktionsspaltung

	„r“-Orientierung	„f“-Orientierung
<b><i>Bam</i>HI</b>	4.481 bp + 641 bp ( <i>E. cloacae</i> 14 / 14-M01) 5.122 bp ( <i>E. cloacae</i> aus Kollektiv)	3.690 bp + 1.432 bp ( <i>E. cloacae</i> 14 / 14-M01) 5.122 bp ( <i>E. cloacae</i> aus Kollektiv)
<b><i>Eco</i>RV</b>	3.355 bp + 1.767 bp	4.436 bp + 686 bp

Abbildung 4–30 und Abbildung 4–31 zeigen Bilder der betreffenden Restriktionsspaltungen bei den untersuchten Kandidaten für gegebenenfalls positive Konstrukte.



**Abbildung 4–30: *Bam*HI-Restriktionsspaltungen.** TAE-Agarosegele, 1 %. Spur 1 enthält immer den Größenmarker GeneRuler 1 kb (Fermentas). Die Markierungen „r“ und „f“ im Gelbild stellen die jeweilige Interpretation des Ergebnisses der jeweiligen Spur dar; war eine Interpretation in Hinblick auf die erwarteten Ergebnisse nicht möglich, ist dies durch ein „X“ markiert. Bei Konstrukten mit den *ampD*-Fragmenten aus den klinischen Isolaten erfolgt durch Restriktionsspaltung mit *Bam*HI nur eine Linearisierung; solche Spuren sind durch „r/f“ markiert. 1. Bild: Spuren 2 bis 5: Kandidaten für pHPJW12-11.1. Spuren 6 bis 10: Kandidaten für pHPJW12-11.2. 2. Bild: Spuren 2 bis 6: Kandidaten für pHPJW12-11.3. Spuren 7 und 8: Kandidaten für pHPJW12-11.4. Spur 9: Kandidat für pHPJW12-11.5. 3. Bild: Spuren 2 bis 7: Kandidaten für pHPJW12-11.5.



**Abbildung 4–31: *EcoRV*-Restriktionsspaltungen.** TAE-Agarosegele, 1 %. Spur 1 enthält stets den Größenmarker GeneRuler 1 kb (Fermentas). Die Markierungen „r“ und „f“ im Gelbild stellen die jeweilige Interpretation des Ergebnisses der jeweiligen Spur dar; war eine Interpretation in Hinblick auf die erwarteten Ergebnisse nicht möglich, ist dies durch ein „X“ markiert. 1. Bild: Spuren 2 bis 5: Kandidaten für pHPJW12-11.1. Spuren 6 bis 10: Kandidaten für pHPJW12-11.2. 2. Bild: Spuren 2 bis 6: Kandidaten für pHPJW12-11.3. Spuren 7 und 8: Kandidaten für pHPJW12-11.4. Spur 9: Kandidat für pHPJW12-11.5. 3. Bild: Spuren 2 bis 7: Kandidaten für pHPJW12-11.5.

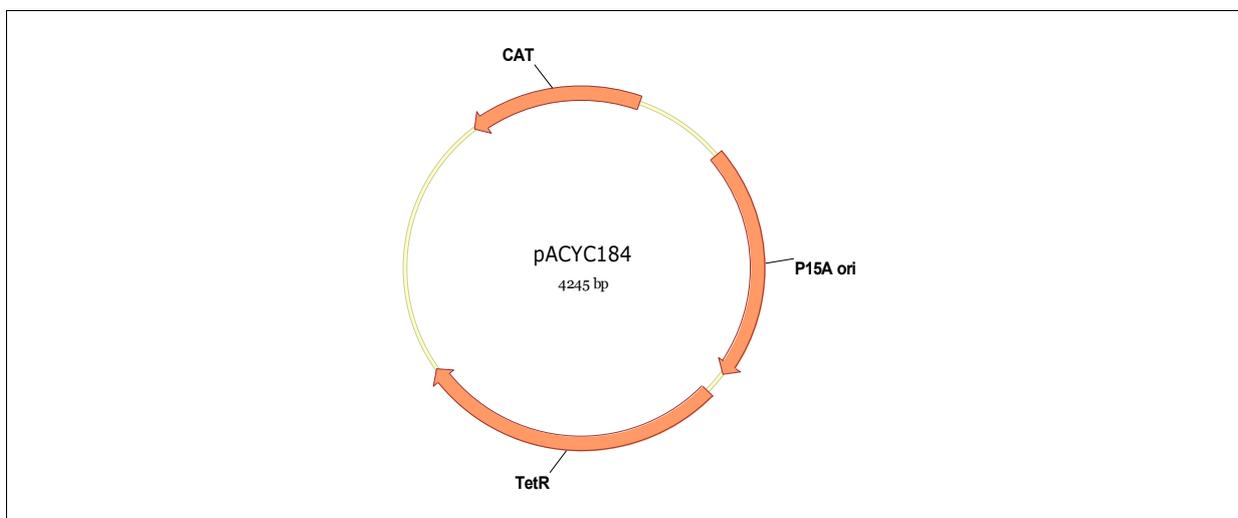
Man kann den Bildern entnehmen, dass insgesamt von allen 5 Konstrukten jeweils mindestens ein Kandidat mit der „r“-Orientierung erhalten wurde. Bei den Konstrukten pHPJW12-11.2,

pHPJW12-11.3 und pHPJW12-11.5 wurde zudem jeweils mindestens einmal die „f“-Orientierung erhalten. Die betreffenden Stämme jeweils einer „r“-orientierten, und, falls verfügbar, „f“-orientierten Variante wurden als Glycerinkultur angelegt. Im Zuge dieser Arbeit wurde mit den Konstrukten mit „r“-orientiertem *ampD*-Fragment weitergearbeitet, so dass die Orientierung der jeweiligen Fragmente bei den Plasmidbezeichnungen nicht mehr gesondert aufgeführt wurde.

#### 4.1.7.2.2 Untersuchung einer *ampD*-Komplementation

Das grundsätzliche Konzept zur Testung der *ampD*-Funktionalität basiert auf einer fehlenden Dereprimierung einer klonierten, induzierbaren *ampR-ampC*-Genkassette.

Als Wirtstamm hierfür wurde *E. coli* SN0302/pBP131-3 gewählt (erhalten durch Calciumchlorid-Transformation (Kapitel 3.2.7.2.1, S. 152) des Stammes *E. coli* SN0302 mit dem Plasmid pBP131-3). Bei *E. coli* SN0302 sind die chromosomal codierten Gene für *ampC* und *ampD* durch Mutation inaktiviert [191, 192]. *E. coli* besitzt generell kein funktionsfähiges *ampR*-Gen, so dass *ampC* nicht induziert werden kann (vgl. Tabelle 1–3, S. 59). Dieses wurde durch das Plasmid pBP131-3 eingebracht, welches ein ca. 8,8 kb-*EcoRI*-Fragment chromosomaler DNA mit den Genen *ampR* und *ampC* von *E. cloacae* 14 in der *EcoRI*-Schnittstelle von pACYC184 (Abbildung 4–32) trägt [141]. Dabei wurde die Chloramphenicol-Resistenzkassette von pACYC184 inaktiviert; die Tetracyclin-Resistenzkassette blieb funktionsfähig, so dass das Plasmid pBP131-3 mit Tetracyclin selektiert werden kann.



**Abbildung 4–32: Plasmidkarte von pACYC184.**

*E. coli* SN0302/pBP131-3 fehlt also ein funktionsfähiges AmpD, so dass das Plasmid-codierte *ampC* dereprimiert vorliegt (s. auch Kapitel 1.2.1.1, S. 59). Dies zeigt sich in den Ergebnissen der MHK-Bestimmungen für verschiedene  $\beta$ -Lactam-Antibiotika, die in Tabelle 4–12 zu sehen sind. Der Stamm ist unempfindlich gegen solche  $\beta$ -Lactam-Antibiotika, die in das Substratspektrum von AmpC fallen. Zum Vergleich wurde *E. coli* SN03/pBP131-3 bei diesen Bestimmungen mitgeführt, bei dem *ampD* nicht mutiert und AmpD damit funktionsfähig ist. Das Gen *ampC* ist dort folglich nicht dereprimiert und wird nur auf einem basalen Niveau exprimiert. Auch dies kann man anhand der MHK-Werte erkennen, die keine Unempfindlichkeit gegen  $\beta$ -Lactam-Antibiotika zeigen.

Tabelle 4–12: Basis-MHKs des *ampD*-Komplementationssystem (Werte in  $\mu\text{g/ml}$ )

<i>E. coli</i> ...	Ampicillin	Cefuroxim	Cefotaxim	Ceftazidim
SN03	1	4	<0,03	0,06
SN0302	0,5	1	<0,03	0,06
SN03/pBP131-3	8	8	0,5	0,5
SN0302/pBP131-3	1024	1024	64	64

Durch Transformation von *E. coli* SN0302/pBP131-3 mit einem weiteren Plasmid, welches ein kloniertes *ampD* enthält, kann man über eine Messung der MHKs von  $\beta$ -Lactam-Antibiotika Aussagen darüber treffen, ob *ampC* eher basal exprimiert wird oder etwa dereprimiert ist. Über die erfolgende oder ausbleibende Komplementierung des defekten, chromosomalen *ampD* durch dessen klonierte Variante lässt sich eine Aussage über deren Funktionalität treffen. Diese hat unmittelbar Einfluss auf den Expressionsstatus des *ampC*-Gens des jeweiligen Stammes, der als Quelle für die Klonierung von *ampD* diente.

Für die Transformation (Kapitel 3.2.7.2.1, S. 152) wurden die Plasmide pHPJW12-11.1 bis pHPJW12-11.5 verwendet. Das Plasmid pHPJW12-11.4 trägt das Wildtyp-*ampD* von *E. cloacae* 14 und pHPJW12-11.5, wie im folgenden Kapitel 4.1.7.3 erwähnt, ein defektes *ampD* von *E. cloacae* 14-M01. Die beiden Plasmide dienen als experimentelle Kontrollen für ein basal exprimiertes und dereprimiertes *ampC*. Die Plasmide pHPJW12-11.1 bis pHPJW12-11.3 tragen zu untersuchende *ampD* von *E. cloacae* aus dem Isolat-Kollektiv.

Während man pBP131-3 mit Tetracyclin selektieren kann, sind die Plasmide der pHPJW12-11-Reihe mit Chloramphenicol selektierbar. Ein Selektionsdruck musste insbesondere auch für Plasmide der pHPJW12-11-Reihe während der MHK-Bestimmung

---

aufrechterhalten bleiben. Im Falle eines intakten *ampD* auf dem Plasmid komplementiert dieses das defekte, chromosomale *ampD*, und dies bedeutet unter den Bedingungen der MHK-Bestimmungen einen Selektionsnachteil für das betreffende Bakterium. Ohne Selektionsdruck selektiert man damit auf einen Plasmidverlust. Daher wurden bei der MHK-Bestimmung 30 µg/ml Chloramphenicol konstant zugesetzt. Die hier verwendeten Stämme und Plasmide mit ihren relevanten Markern sind noch einmal in Tabelle 4–13 gelistet, in der der Vollständigkeit halber auch noch einmal *E. coli* SN03 mit aufgeführt ist.

Tabelle 4–13: Stämme und Plasmide im *ampD*-Komplementationsassay

Stamm bzw. Plasmid	relevante Mutationen / Gene	Selektionsmarker
<i>E. coli</i> SN03	<i>ampC8</i>	
<i>E. coli</i> SN0302	<i>ampC8, ampD2</i>	
pBP131-3	<i>ampC</i> und <i>ampD</i> <sup>+</sup> aus <i>E. cloacae</i> 14	Tet <sup>R</sup>
pHPJW12-11.1	<i>ampD</i> von <i>E. cloacae</i> K19968	Chl <sup>R</sup>
pHPJW12-11.2	<i>ampD</i> von <i>E. cloacae</i> A17244/1	Chl <sup>R</sup>
pHPJW12-11.3	<i>ampD</i> von <i>E. cloacae</i> A17244/2	Chl <sup>R</sup>
pHPJW12-11.4	<i>ampD</i> von <i>E. cloacae</i> 14	Chl <sup>R</sup>
pHPJW12-11.5	<i>ampD</i> von <i>E. cloacae</i> 14-M01	Chl <sup>R</sup>

Die Ergebnisse der MHK-Bestimmung (Kapitel 3.1.4, S. 98) sind in der folgenden Tabelle 4–14 aufgeführt. Da die Sequenzen von pHPJW12-11.1 bis pHPJW12-11.3 einhundertprozentig homolog zueinander sind (vgl. das folgende Kapitel 4.1.7.3) und die Plasmide darüber hinaus auch identische Resultate in der MHK-Bestimmung hervorbrachten, wurden sie in Tabelle 4–14 als pHPJW12-11.1-3 zusammengefasst.

Tabelle 4–14: MHK-Werte im *ampD*-Komplementationsassay (Ampicillin- und Cephalosporin-MHK-Werte wurden unter Zusatz von 30 µg/ml Chloramphenicol bestimmt; alle Werte angegeben in µg/ml)

Stamm / Antibiotikum	<i>E. coli</i> SN0302/pBP131-3 und...		
	pHPJW12-11.1-3	pHPJW12-11.4	pHPJW12-11.5
Ampicillin	1024	16	1024
Cefalexin	2048	128	2048
Cefepim	0,03125	0,03125	1

Stamm / Antibiotikum	<i>E. coli</i> SN0302/pBP131-3 und...		
	pHPJW12-11.1-3	pHPJW12-11.4	pHPJW12-11.5
Ceftazidim	0,5	0,5	64
Cefotaxim	1	1	128
Cefoxitin	128	8	128
Cefpirom	0,0625	0,03125	2
Cefpodoxim	64	16	1024
Cefuroxim	1024	8	1024
Chloramphenicol	128	ND	ND
Tetracyclin	32	ND	ND

#### 4.1.7.3 Sequenzierung von *ampD*-Genen

Die *ampD*-Sequenz von *E. cloacae* 14, welche pHPJW12-11.4 zu Grunde liegen sollte und hier als Wildtyp-Sequenz angesehen wurde, wurde bereits 1993 publiziert (Genbank-ID Z14003) [193].

Das betreffende Gen von *E. cloacae* 14 wurde im Zuge dieser Arbeit ebenfalls sequenziert (Kapitel 3.2.5, S. 134), und zwar ausgehend von dem Plasmid pHPJW12-11.4. Dabei fiel auf, dass es in einem kleinen Bereich Abweichungen zwischen der publizierten und der hier bestimmten Sequenz gibt, wie in der folgenden Abbildung 4–33 zu sehen ist.

	200	210	220	230
ampD: Genbank-ID Z14003 ( <i>E. cloacae</i> 14)	ATTGCGCATCTG	GCGCTATCGGCCG	ACTGTCTGATCCGT	
ampD: pHPJW12-11.4 ( <i>E. cloacae</i> 14)	ATTGCGCATCTG	GCGCTATCGGCCG	ACTGTCTGATCCGT	
AmpD: Genbank-ID Z14003 ( <i>E. cloacae</i> 14)	I A H L A L S A D C L I R			
AmpD: pHPJW12-11.4 ( <i>E. cloacae</i> 14)	I A H L R V S A H C L I R			

**Abbildung 4–33: Sequenz-Alignments von *ampD*/AmpD aus *E. cloacae* 14 und pHPJW12-11.4.** Dargestellt sind in den oberen zwei Zeilen die Sequenzen der *ampD*-Gene von *E. cloacae* 14, wie in Genbank-ID Z14003 publiziert, und von *E. cloacae* 14, wie es in pHPJW12-11.4 kloniert wurde, von den Basen 199 bis 237. Die unteren beiden Zeilen zeigen die sich daraus ergebenden Aminosäuren. Dargestellt sind dort entsprechend die Aminosäuren 67 bis 79. Über die hier abgebildeten Sequenzunterschiede hinaus sind die Sequenzen einhundertprozentig homolog.

Der gleichen Abbildung ist auch zu entnehmen, dass diese insgesamt 6 Abweichungen auch Einfluss auf die resultierenden Proteinsequenzen haben. Im Folgenden werden weitere Indizien genannt, die dafür sprechen, dass die Sequenz von Genbank-ID Z14003 als fehlerhaft erachtet werden kann.

Von den in Kapitel 4.1.7.1 (S. 194) erwähnten, aus *E. cloacae* 14 selektierten *ampD*-Mutanten wurden ebenfalls die *ampD*-Gene sequenziert. Bei allen auswertbaren Sequenzen entsprachen diese im oben erwähnten, strittigen Bereich derjenigen Sequenz von *ampD* aus pHPJW12-11.4.

Die in dieser Arbeit weiter verwendete *E. cloacae* Mutante 14-M01 hat eine Punktmutation G284A in *ampD*, welche eine W95amber Mutation bedingt. Das üblicherweise 188 Aminosäuren lange Protein liegt damit um ca. 50 % verkürzt und mit hoher Wahrscheinlichkeit nicht mehr funktional vor. Die Mutation findet sich dann entsprechend auch im Plasmid pHPJW12-11.5 wieder.

Die übrigen Mutanten M02, M03, M09 und M10 tragen eine identische Mutation. Die Mutanten M04-M06 weisen den Aminosäureaustausch I78N auf, Mutante M07 einen Austausch A164G. Die DNA-Sequenz der Mutante M08 war nicht auszuwerten. Die Mutanten M02 bis M10 wurden im Rahmen dieser Arbeit nicht weiterverwendet. Die 3 identifizierten Mutationen sind in Tabelle 4–15 zusammengefasst.

Tabelle 4–15: identifizierte Punktmutationen bei Selektion von *ampD*-Mutanten

Mutation	Basentriplet	Aminosäure-Ebene
G284A	283-285	Trp95amber
	TGG→TAG	
T233A	232-234	Ile78Asn
	ATC→AAC	
A491G	490-492	Asp164Gly
	GAC→GGC	

Eine spontane Inaktivierung von *ampD* gilt generell als häufig anzutreffen [194]. Die hier gefundene Mutation G284A sowie eine Mutation des Codons für Aspartat-164 wurden bereits bei *C. freundii* als Ursache für eine vollständige *ampC*-Dereprimierung identifiziert [118]. Dass hier bestimmte Mutationen z.T. häufiger gefunden wurden, spiegelt einen gewissen Anteil bestimmter Klone innerhalb des untersuchten Inokulums wieder, deren spezifische

Mutation dann auch mehrmals untersucht wurde.

Die DNA-Sequenz von *ampD* aus *E. cloacae* 14-M01 ist mittels eines Sequenz-Alignments verschiedenen *ampD*-Gensequenzen (vgl. Kapitel 4.1.7.4) in Kapitel 9.2 (Anhang II, S. 306) gegenübergestellt.

Auch die *ampD*-Gene der *E. cloacae*-Isolate aus dem Kollektiv wurden sequenziert, z.T. ausgehend von den Plasmiden pHPJW12-11.1 bis pHPJW12-11.3, z.T. ausgehend von den chromosomalen Kopien der Gene in den Stämmen. Auch hier waren in allen Fällen die strittigen Bereiche homolog zur Sequenz von pHPJW12-11.4.

Ferner konnte festgestellt werden, dass die Sequenzen bei denjenigen klinischen Isolaten, von denen die *ampD*-Gene kloniert wurden, homolog sind (das betrifft dann also den chronologisch zuerst isolierten Stamm sowie die chronologisch beiden zuletzt isolierten Stämme). Bei diesen Stämmen bzw. Plasmiden (sowie pHPJW12-11.5, *ampD* von *E. cloacae* 14-M01) wurden die klonierten *ampD*-Gene auch bezüglich Ihres Promotorbereichs und bezüglich Ihres Gen-Endes ausgehend von den Plasmiden sequenziert. Auffälligkeiten wurden bezüglich dieser beiden Punkte nicht gefunden. Darüber hinaus sei noch erwähnt, dass, wie auf S. 201 in Kapitel 4.1.7.2.1 angeführt, die Sequenzen der klinischen Isolate in der Tat keine Schnittstellen für *Bam*HI und *Bgl*III aufweisen, im Gegensatz zu der *ampD*-Sequenz von *E. cloacae* 14.

Die *ampD*-Gene der übrigen fünf *E. cloacae* aus dem Kollektiv wurden unter Verwendung der Primer „ampD +1 fw E.cloacae“ und „ampD +564 rev E.cloacae“ sequenziert. Da diese Primer bündig an Genanfang und -ende von *ampD* binden, können sie nicht zur Ermittlung der vollständigen Gensequenzen verwendet werden. Der erfasste Sequenzbereich war stets homolog zu den *ampD*-Sequenzen der klonierten Gene der drei klinischen Isolate und bestätigt im Übrigen abermals den strittigen Bereich von pHPJW12-11.4 und GenBank-ID Z14003.

#### **4.1.7.4 Sequenz-Alignment mit publizierten *ampD*-Sequenzen**

Das bei den klinischen Isolaten identische *ampD* wurde einem Sequenz-Alignment mit 48 *ampD*-Sequenzen aus der GenBank unterzogen. Die dabei genutzten Sequenzen stammten dabei ausschließlich von Gram-negativen und überwiegend von Enterobakterien.

Bezüglich der klinischen Isolate aus dem *E. cloacae*-Kollektiv fällt bei näherer Betrachtung des Alignments auf Aminosäureebene eine Aminosäure auf, nämlich das Glutamin an

Position 30. Dort haben bis auf zwei im Alignment enthaltene *A. baumannii*, die an dieser Stelle ein Methionin besitzen, alle Stämme ein Leucin. Verursacht wird die Aminosäuremutation L30Q durch eine Punktmutation T89A auf Genebene, durch die aus dem zu Grunde liegenden Basentriplet CTG das Triplet CAG wird. Diese Variante ist im Alignment einzigartig.

Neben einer Einordnung der AmpD-Sequenzen der *E. cloacae*-Isolate aus dem Kollektiv erlaubt das Alignment auch eine weitere Beurteilung des bei pHPJW12-11.4 und GenBank-ID Z14003 strittigen Sequenzbereichs in *ampD*. Hier kann man feststellen, dass die Basen 211 bis 214, so wie sie in dieser Arbeit bei Sequenzierungen gefunden wurden (CGCG), dem Konsensus entsprechen. Ferner ist bei den Basen 222 und 223 (hier gefunden: GC) die Base C223 zusammen mit der Base A224 Teil eines durch das gesamte Alignment konservierten Bereichs.

## **4.2 *Klebsiella pneumoniae* Va22038 aus Hamburg**

### **4.2.1 Charakterisierung des Isolates**

#### **4.2.1.1 Erstcharakterisierungen**

Erste Charakterisierungen wurden durch Mitarbeiter des UKE sowie der Arbeitsgruppe Heisig vorgenommen. Näheres hierzu ist der Publikation von Timmerbeil et al. [133] sowie der Dissertation von B. Timmerbeil [170] zu entnehmen.

#### **4.2.1.2 Bestimmung minimaler Hemmkonzentrationen**

Die Resultate von Bestimmungen der MHKs verschiedener Antibiotika (Kapitel 3.1.4, S. 98ff) sind in Tabelle 4–16 zusammengefasst. Dort sind zum Vergleich auch die MHK-Werte aus der Dissertation von B. Timmerbeil aufgeführt.

Tabelle 4–16: MHK-Werte für *K. pneumoniae* Va22038 u.a. (alle Werte in µg/ml, wenn nicht anders angegeben; der Wert für Nalidixinsäure wurde über arithmetische Verdünnungen in Schritten von 10µg/ml bestimmt)

	<i>K. pneum. Va22038</i>		<i>K. pneum.</i> 375/08	<i>K. pneum.</i> Ref. 193	<i>K. pneum.</i> Ref. 194	<i>K. pneum.</i> Ref. 305
	diese Arbeit	[170]				
Amikacin	8	8		1		1
Amoxicillin + Clavulansäure (2 µg/ml)		>256				
Ampicillin	>2048	>256	>2048			
Ampicillin + Sulbactam (8 µg/ml)		>128				
Apramycin	2			1		1
Arsenat (mM)	4					
Aztreonam	>128		>128			
Cefepim		8				
Cefotaxim	32	32	1024			
Cefotaxim + Clavulansäure (4 µg/ml)		1-2				
Cefoxitin		16				
Ceftazidim		>64				
Ceftazidim + Clavulansäure (4 µg/ml)		8				
Ceftriaxon		>64				
Cefuroxim		>256				
Ciprofloxacin		1				
Cotrimoxazol		128				
Doxycyclin		2				
Ertapenem	32	32				
Gentamicin	0,5	2		2		4
Imipenem	16	32	32			
Kanamycin	128			256	256	1
Meropenem	8	8				
Moxifloxacin		1				
Nalidixinsäure	>70					

	<i>K. pneum.</i> Va22038		<i>K. pneum.</i> 375/08	<i>K. pneum.</i> Ref. 193	<i>K. pneum.</i> Ref. 194	<i>K. pneum.</i> Ref. 305
	diese Arbeit	[170]				
Natriumazid	128					
Neomycin	2			16		1
Netilmicin	32			≤0,625		≤0,625
Piperacillin + Sulbactam (8 µg/ml)		≤1				
Piperacillin + Tazobactam (4 µg/ml)		64				
Rifampicin	8					
Streptomycin	16			4		8
Tobramycin	4	4		0,125		0,25

#### 4.2.2 Phänotypischer Nachweis von MBL mittels Etest®

Ein Etest® MBL wurde entsprechend der in Kapitel 3.1.5 (S. 100) aufgeführten Methode durchgeführt.

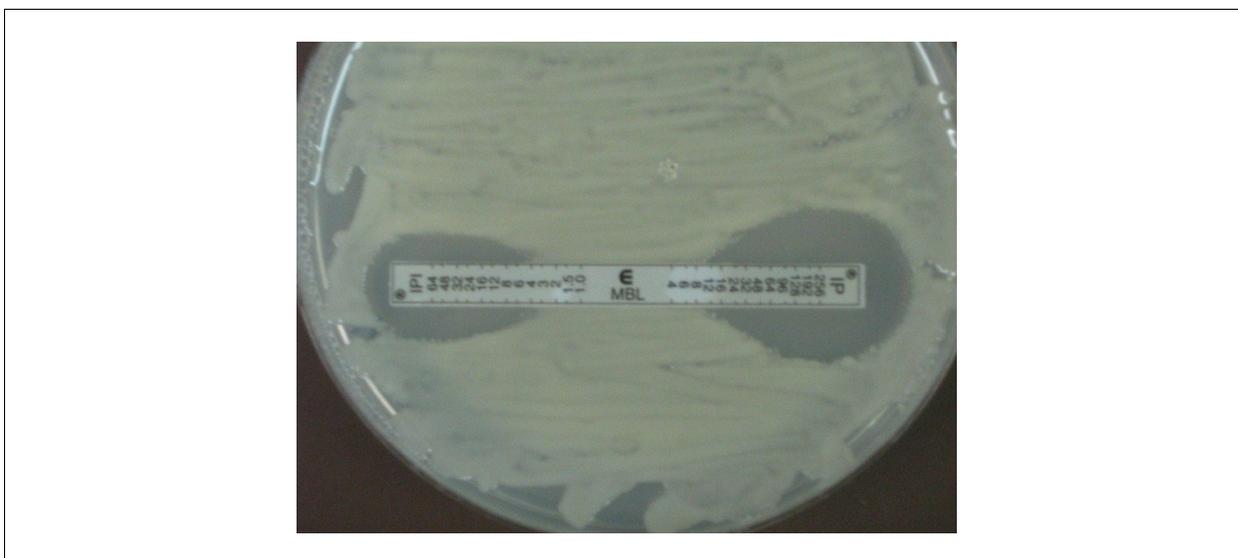


Abbildung 4–34: Ergebnis des MBL-Etests bei *K. pneumoniae* Va22038.

Zum Vergleich wurde ein Etest® MBL mit *E. coli* ATCC 25922 durchgeführt, s. Abbildung 4–35.

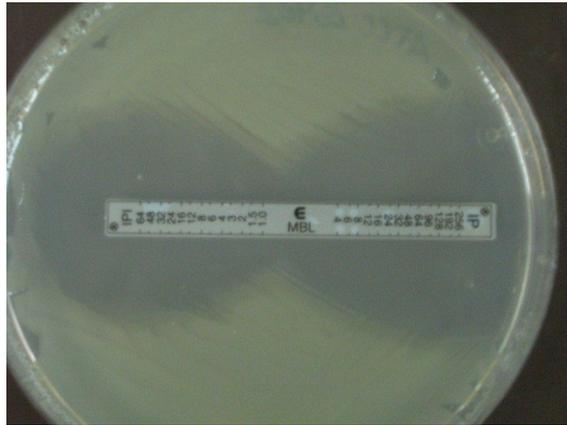


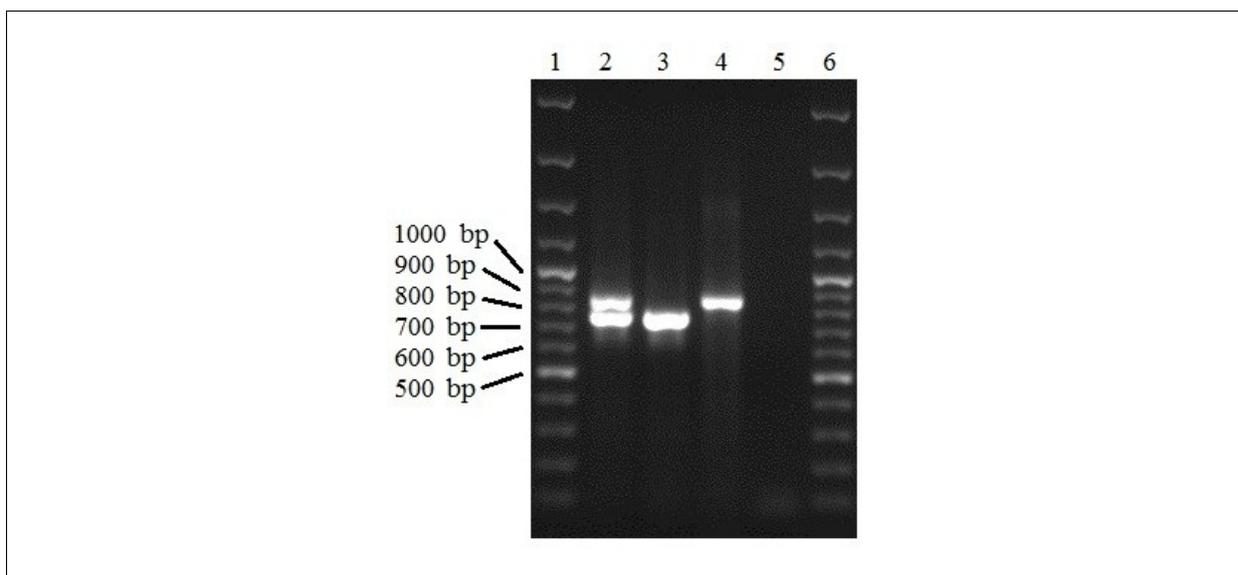
Abbildung 4–35: Ergebnis des MBL-Etests bei *E. coli* ATCC 25922.

#### 4.2.3 PCR-Screening auf $\beta$ -Lactamase-Gene

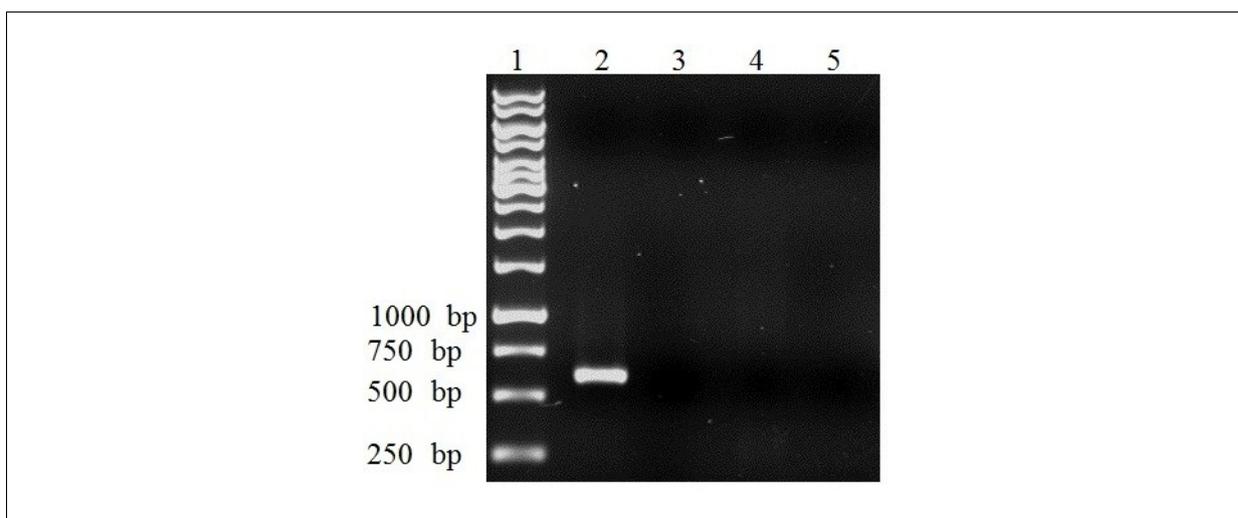
Tabelle 4–17: PCR-Screening auf *bla*-Gene bei *K. pneumoniae* Va22038

Gen	Befund	vgl.
<i>bla</i> <sub>SHV</sub>	+	Abbildung 4–36
<i>bla</i> <sub>TEM</sub>	+	Abbildung 4–36
<i>bla</i> <sub>CTX-M</sub>	-	
<i>bla</i> <sub>OXA</sub> Gr. 1, 2 u. 10	-	
<i>bla</i> <sub>OXA-47</sub>	-	Abbildung 4–37
<i>bla</i> <sub>OXA-48</sub>	+	Abbildung 4–38
<i>bla</i> <sub>OXA-9</sub>	+	Abbildung 4–39
<i>bla</i> <sub>KPC</sub>	-	
<i>bla</i> <sub>GES</sub>	-	
<i>bla</i> <sub>VIM</sub>	-	
<i>bla</i> <sub>GIM</sub>	-	
<i>bla</i> <sub>SIM</sub>	-	
<i>bla</i> <sub>SPM</sub>	-	
<i>bla</i> <sub>IMP</sub>	-	
<i>bla</i> <sub>MOX-1 u. 2</sub>	-	
<i>bla</i> <sub>CMY-1-11</sub>	-	
<i>bla</i> <sub>LAT-1-4</sub>	-	
<i>bla</i> <sub>BIL-1</sub>	-	
<i>bla</i> <sub>DHA-1 u. 2</sub>	-	
<i>bla</i> <sub>ACC</sub>	-	

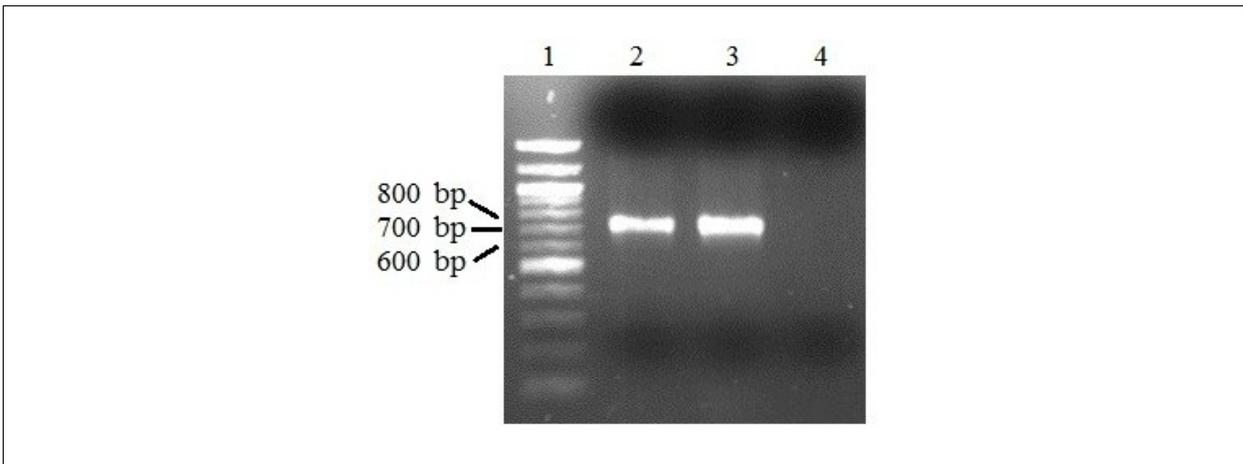
Gen	Befund	vgl.
<i>bla</i> <sub>MIR-1T</sub>	-	
<i>bla</i> <sub>ACT-1</sub>	-	
<i>bla</i> <sub>FOX-1-5b</sub>	-	
<i>bla</i> <sub>NDM-1</sub>	-	



**Abbildung 4–36: SHV-/TEM-Duplex-PCR.** TAE-Agarosegel, 1 %. Bei dieser PCR werden von *bla*<sub>SHV</sub> 746 bp und von *bla*<sub>TEM</sub> 838 bp amplifiziert. Spuren 1 und 6: Größenmarker O'GeneRuler 100 bp Plus (Fermentas). Spur 2: *K. pneumoniae* Va22038; Spur 3: *K. pneumoniae* ATCC 700603 (*bla*<sub>SHV-18</sub>); Spur 4: *E. coli* *bla*<sub>TEM-1</sub>-Referenz; Spur 5: Negativkontrolle.

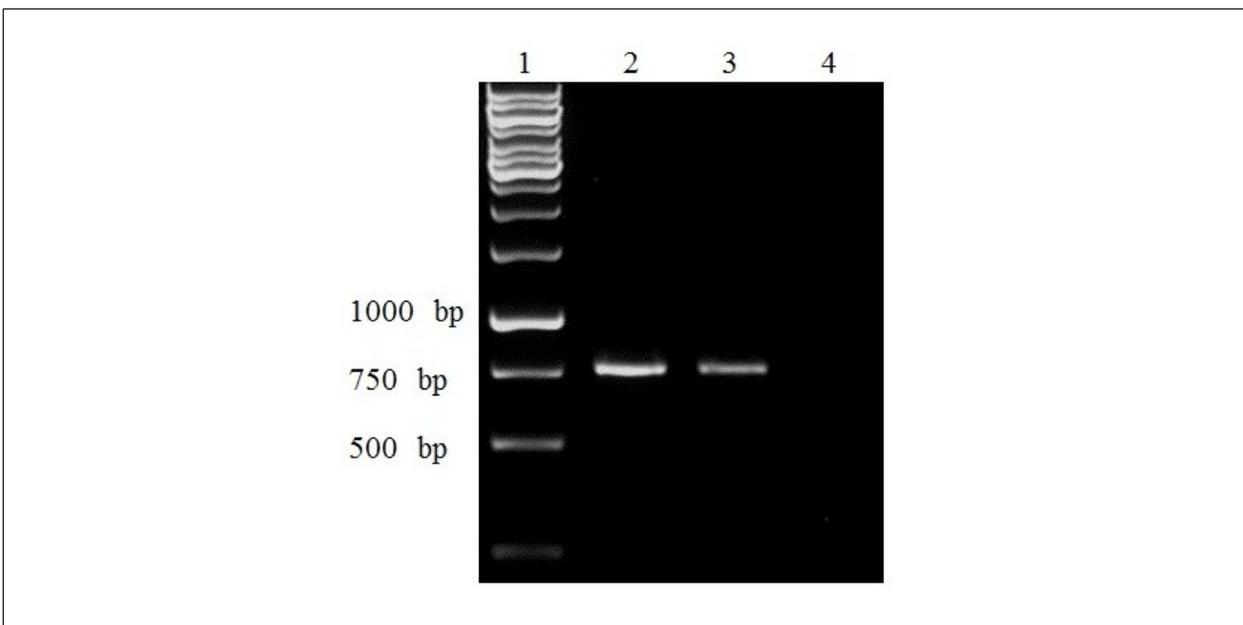


**Abbildung 4–37: PCR auf *bla*<sub>OXA-47</sub>.** TAE-Agarosegel, 1 %. Das erwartete Amplikon ist 610 bp groß. Spur 1: Größenmarker GeneRuler 1 kb (Fermentas). Spur 2: *K. pneumoniae* 11978; Spur 3: *K. pneumoniae* Va22038; Spur 4: *E. coli* ATCC 25922; Spur 5: Negativkontrolle.



**Abbildung 4–38: PCR auf *bla*<sub>OXA-48</sub>.** TAE-Agarosegel, 1 %. Dabei wird ein 744 bp großes Amplikon für *bla*<sub>OXA-48</sub>-positive Stämme erwartet. Spur 1: Größenmarker 100 bp DNA Ladder (NEB). Spur 2: *K. pneumoniae* Va22038; Spur 3: *K. pneumoniae* 11978; Spur 4: Negativkontrolle.

Details zu *bla*<sub>OXA-48</sub> sind Kapitel 1.1.3.3.2.1 (ab S. 52) zu entnehmen.



**Abbildung 4–39: PCR auf *bla*<sub>OXA-9</sub>.** TAE-Agarosegel, 1 %. Amplifiziert wird ein 761 bp langer Sequenzabschnitt. Spur 1: Größenmarker GeneRuler 1 kb (Fermentas); Spur 2: *K. pneumoniae* 11978; Spur 3: *K. pneumoniae* Va22038; Spur 4: Negativkontrolle.

#### 4.2.4 PCR-Screening auf mit MDR-Phänotyp oder bestimmten Resistenzgenen assoziierte Gene

Tabelle 4–18: PCR-Screening auf weitere Gene bei *K. pneumoniae* Va22038

Gen / DNA-Abschnitt	Befund	vgl.
Integron-Strukturgene	-	
IS1999	+	Kapitel 4.2.5.1 (S. 217)
<i>aac(6')-Ib</i>	+	Abbildung 4–2 (S. 175)

#### 4.2.5 Untersuchung von *bla*<sub>OXA-48</sub>

Der positive Nachweis von *bla*<sub>OXA-48</sub> mittels PCR war Anlass für weiterführende Untersuchungen sowie eine Verifizierung des Resultats durch Sequenzierung.

##### 4.2.5.1 Identifikation des Transposons Tn1999 durch PCR-Mapping

Verschiedene PCRs ergaben bei *K. pneumoniae* Va22038 Amplikons mit Größen, die man für eine zu *K. pneumoniae* 11978 homologe Einbettung von *bla*<sub>OXA-48</sub> in Tn1999 erwarten würde (vgl. Kapitel 1.1.3.3.2.1, S. 52).

Zunächst wurde in einem Tri-Primer-PCR Ansatz mit den Primern „tnpA +1146 rev IS1999“, „tnpA +162 fw IS1999“ und „tnpA +66 rev IS1999“, die allesamt in dem Gen *tnpA* von IS1999 binden, nach möglichen Insertionssequenzen desselben Typs gesucht (Abbildung 4–41). Nimmt man eine genetische Konfiguration wie in *K. pneumoniae* 11978 an, sind bei dieser PCR die in Abbildung 4–40 und Tabelle 4–19 angegebenen Amplikons denkbar:

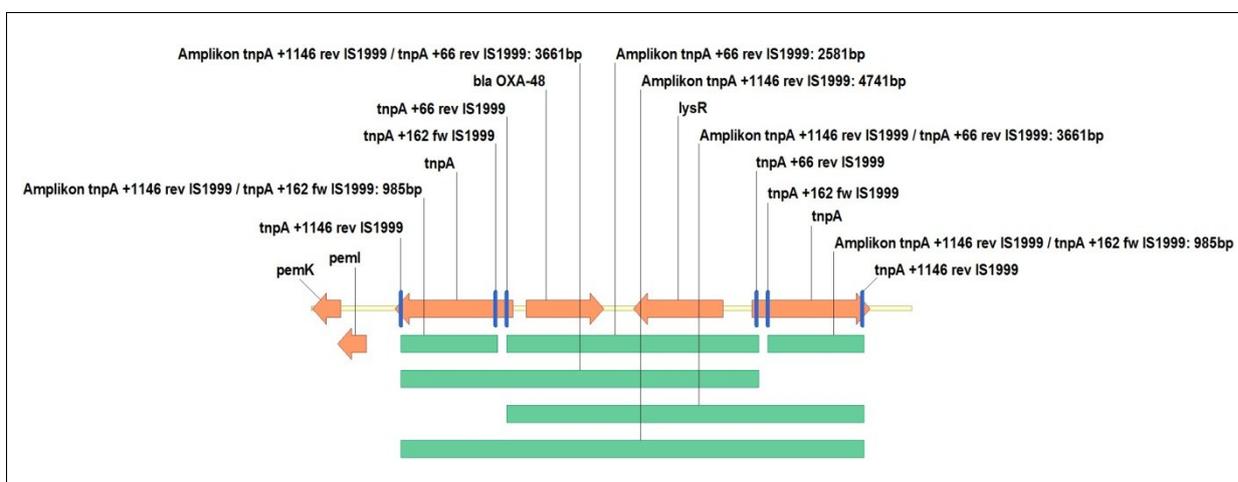
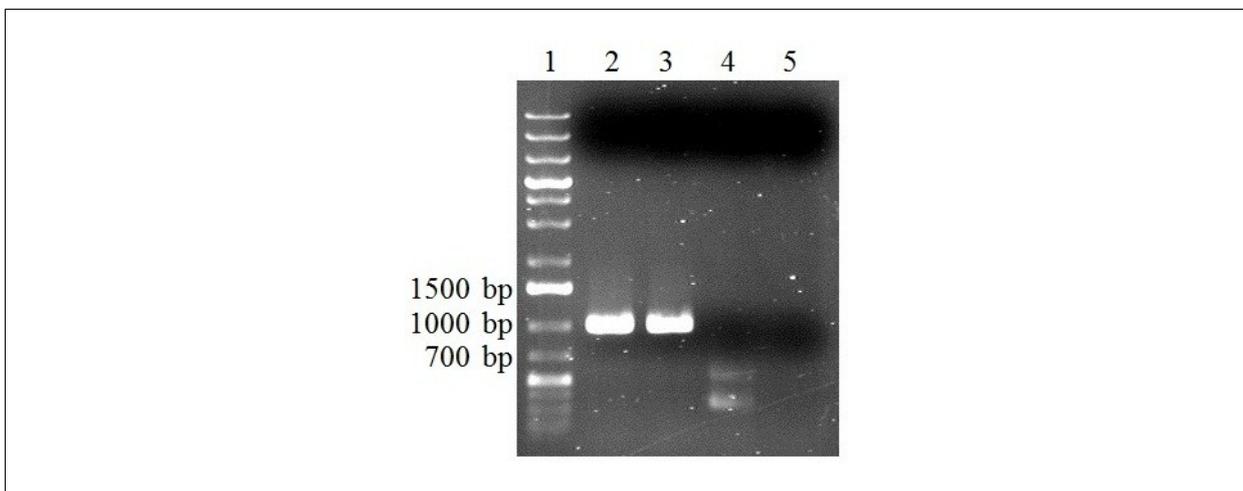


Abbildung 4–40: Mögliche Amplikons einer Tri-Primer-PCR auf IS1999.

Tabelle 4–19: mögliche Amplikons der Tri-Primer-PCR auf IS1999

	<b>tnpA +1146 rev IS1999</b>	<b>tnpA +162 fw IS1999</b>	<b>tnpA +66 rev IS1999</b>
<b>tnpA +1146 rev IS1999</b>	4.741 bp	985 bp	3.661 bp
<b>tnpA +162 fw IS1999</b>	985 bp		
<b>tnpA +66 rev IS1999</b>	3.661 bp		2.581 bp

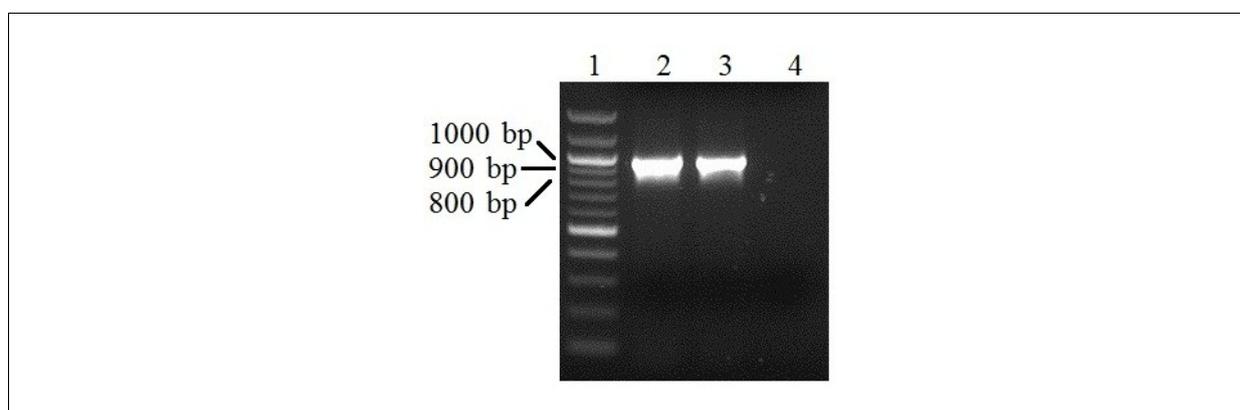


**Abbildung 4–41: IS1999-Tri-Primer-PCR.** Bei dieser PCR kamen die drei Primer „tnpA +1146 rev IS1999“, „tnpA +162 fw IS1999“ und „tnpA +66 rev IS1999“ zum Einsatz. TAE-Agarosegel, 1 %. Spur 1: Größenmarker GeneRuler 1 kb plus (Fermentas). Spur 2: *K. pneumoniae* 11978; Spur 3: *K. pneumoniae* Va22038; Spur 4: *E. coli* ATCC 25922; Spur 5: Negativkontrolle.

Hier bildete sich nur das kleinste der zu erwartenden Produkte, welches ein internes Amplikon aus dem Gen *tnpA* darstellt. Da einerseits *tnpA* nicht nur ausschließlich mit *bla<sub>OXA-48</sub>* assoziiert vorkommen muss und andererseits die größeren Amplikons zumindest bei *K. pneumoniae* 11978 theoretisch hätten gebildet werden müssen, wurden jeweils PCRs mit den Primern „tnpA +1146 rev IS1999“ und „tnpA +66 rev IS1999“ (die bei der erwarteten Konfiguration bezüglich *bla<sub>OXA-48</sub>* jeweils forward und reverse binden) einzeln sowie mit beiden Primern kombiniert durchgeführt. So sollte der bevorzugten Bildung bestimmter Produkte entgegengewirkt und Amplikons erhalten werden, die den theoretischen Bereich mit *bla<sub>OXA-48</sub>* einschließen. Im Falle der PCR nur mit dem Primer „tnpA +1146 rev“ wurde auf

einen LongAmp<sup>®</sup>-Ansatz zurückgegriffen (vgl. Kapitel 3.2.4.2, S. 132). Alle PCRs ergaben jeweils die erwarteten Produkte, aber auch stets kleinere Nebenprodukte, und zwar sowohl bei *K. pneumoniae* 11978 als auch bei *K. pneumoniae* Va22038. Im Falle der PCR mit „tnpA +66 rev IS1999“ wurde das erwartete PCR-Produkt bei beiden Stämmen aus dem Gel ausgeschnitten, mit Hilfe des NucleoSpin<sup>®</sup> Extract II Kits von Macherey-Nagel eluiert (Kapitel 3.2.2.2, S. 109) und dann jeweils als Template für eine PCR auf *bla*<sub>OXA-48</sub> benutzt. Diese nested PCR (Kapitel 3.2.4.4, S. 134) verlief in beiden Fällen positiv, womit das Gen auf dem zuvor amplifizierten Sequenzabschnitt liegen musste.

Um dies weiter zu untermauern, wurde eine PCR mit den Primern „*bla*OXA-48 +774 rev“ und „tnpA +66 rev IS1999“ durchgeführt, welche ein Amplikon erwarteter Größe ergab (Abbildung 4–42).



**Abbildung 4–42: PCR mit *bla*<sub>OXA-48</sub>- und IS1999-Primer.** TAE-Agarosegel, 1 %. Zu erwarten war bei dieser PCR ein Amplikon der Größe 972 bp. Spur 1: Größenmarker Quick-Load 100 bp DNA Ladder (NEB). Spur 2: *K. pneumoniae* 11978; Spur 3: *K. pneumoniae* Va22038; Spur 4: Negativkontrolle.

Dieses sowie ein internes Amplikon von *bla*<sub>OXA-48</sub> wurden zur Sequenzierung (Kapitel 3.2.5, S. 134) des Carbapenemase-Gens herangezogen.

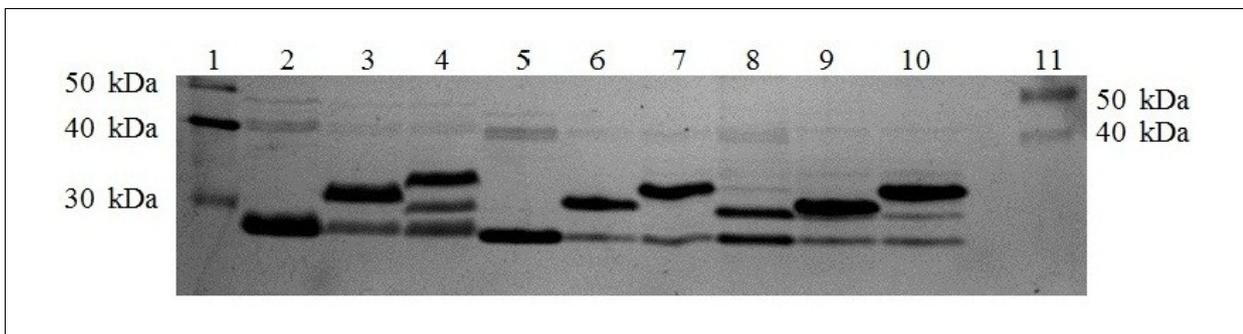
Anzumerken ist, dass der Primer „tnpA +66 rev IS1999“ genau vor der möglichen Insertionsstelle von IS1R bindet und dieses Element mit erfassen würde, wenn es, wie im Falle einer Tn1999.2 entsprechenden Konstellation, vorhanden wäre. Da IS1R ca. 760 bp groß ist, hätte sich dies in der PCR deutlich in einem größeren Amplikon zeigen müssen, was hier also nicht der Fall war.

#### 4.2.5.2 Sequenzierung von *bla*<sub>OXA-48</sub>

Die Sequenz (s. Kapitel 3.2.5, S. 134 für die Methode) von *bla*<sub>OXA-48</sub> in *K. pneumoniae* Va22038 ist in Kapitel 9.3 (Anhang III, S. 325) aufgeführt. Sie ist komplett identisch mit der unter GenBank-ID AY236073 erstpublizierten Sequenz von *bla*<sub>OXA-48</sub> in *K. pneumoniae* 11978. Sie zeigt darüber hinaus auch den homologen Anfang des Transposase-Gens *tnpA*, stromaufwärts von *bla*<sub>OXA-48</sub> gelegen, sowie dazwischen liegende, für IS1999 postulierte repeats. Es wurde über *bla*<sub>OXA-48</sub> hinaus noch ein kurzer, stromabwärts liegender Bereich sequenziert, der im Vergleich zu der publizierten Sequenz eine C-Insertion aufweist. Diese befindet sich jedoch weder in codierender Sequenz noch in einem Bereich, in dem strukturelle Sequenzabschnitte (repeats) des Insertionselementes vorhanden sind.

#### 4.2.6 Bestimmung des Profils der äußeren Membranproteine (OMP-Profil)

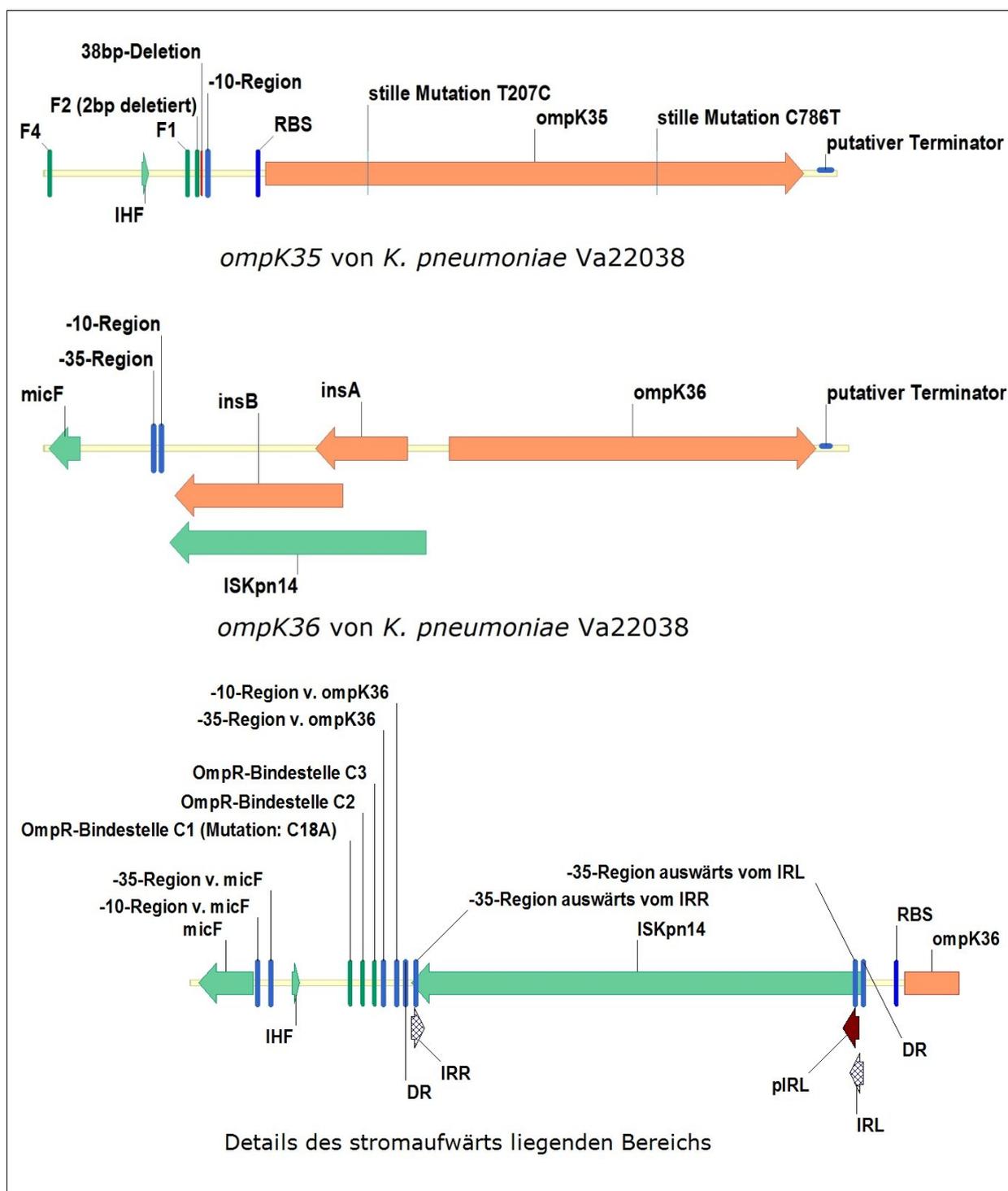
Das OMP-Profil von *K. pneumoniae* Va22038 ist in Abbildung 4–43 abgebildet. Es wurde gemäß den Methoden in den Kapiteln 3.3.1 (S. 155) bis 3.3.2.1 (S. 157) erstellt.



**Abbildung 4–43: OMP-Profile verschiedener *K. pneumoniae*.** Spur 1: Größenmarker PageRuler Unstained Protein Ladder (Fermentas); Spur 2: *K. pneumoniae* Ref. 305 (CSUB10R); Spur 3: *K. pneumoniae* Ref. 193 (CSUB10R/pSHA25K); Spur 4: *K. pneumoniae* Ref. 194 (CSUB10S/pSHA16K); Spur 5: *K. pneumoniae* Va22038; Spur 6: *K. pneumoniae* Va22038/pHPJW30-21.1; Spur 7: *K. pneumoniae* Va22038/pHPJW30-22.1; Spur 8: *K. pneumoniae* ATCC 13883; Spur 9: *K. pneumoniae* ATCC 13883/pHPJW30-21.1; Spur 10: *K. pneumoniae* ATCC 13883/pHPJW30-22.1. Spur 11: Größenmarker Spectra Multi-color High Range Protein Ladder (Fermentas).

#### 4.2.7 Sequenzierung von OMP-Genen

Die Sequenzen (Kapitel 3.2.5, S. 134) der Gene *ompK35* und *ompK36* von *K. pneumoniae* Va22038 finden sich in Kapitel 9.4 (Anhang IV, S. 325). Es haben sich die in Abbildung 4–44 dargestellten, genetischen Anordnungen ergeben.



**Abbildung 4–44: *ompK35* und *ompK36* von *K. pneumoniae* Va22038.** Die benannten Sequenzabschnitte wurden anhand der Angaben in Referenz [195] identifiziert. Das untere Bild zeigt den stromaufwärts liegenden Bereich von *ompK36* mit weiteren Details.

#### 4.2.8 Komplementation defizienter Porin-Gene

Die ursprüngliche Idee war, die Plasmide pSHA16K und pSHA25K (vgl. Tabelle 4–20 für deren Eigenschaften) zu benutzen, um die defekten Poringene in *K. pneumoniae* Va22038 zu

komplementieren und den daraus folgenden Einfluss auf die Empfindlichkeit des Transformanden gegen Carbapeneme zu untersuchen. Bei *K. pneumoniae* Va22038 konnte mittels PCR ein Aminoglycosid-Resistenzgen nachgewiesen werden (vgl. Abbildung 4–2, S. 175), das nach Empfindlichkeitsbestimmung Resistenz insbesondere gegen Kanamycin vermittelte. Da die Plasmide pSHA16K und pSHA25K zur Selektion ausschließlich über je eine Ampicillin- und Kanamycin-Resistenzgen-Kassette verfügen, wäre eine Selektion der betreffenden Plasmide in *K. pneumoniae* Va22038 also nicht möglich gewesen. Daher wurden die Plasmide um eine Amikacin-Gentamicin-Resistenzkassette erweitert, um die Transformanden entsprechend selektieren zu können, da gegen diese Aminoglycosid-Antibiotika keine Resistenz nachgewiesen wurde.

Tabelle 4–20: Eigenschaften der pSHA-Plasmide

Plasmid	basiert auf:	Eigenschaften	Literatur
pSHA16K	pWKS30	Kan <sup>R</sup> ; Amp <sup>R</sup> ; <i>ompK35</i>	[137, 196]
pSHA25K	pWSK29	Kan <sup>R</sup> ; Amp <sup>R</sup> ; <i>ompK36</i>	[137]

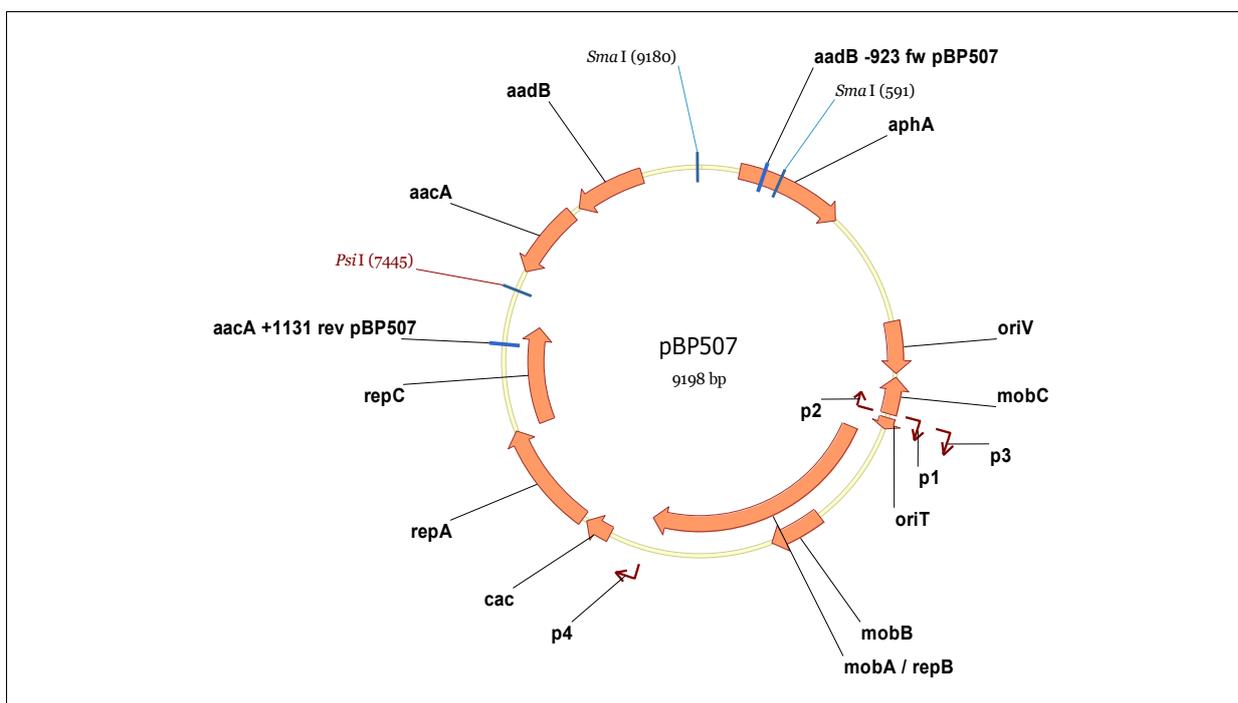
Bezüglich den Literaturangaben zu pSHA16K ist anzumerken: in beiden zitierten Publikationen wird auf die Konstruktion von pSHA16K eingegangen. Die Beschreibung der Konstruktion in [196] weicht jedoch in einigen Details von den Angaben der Tab. 1 in Referenz [137] ab: einmal ist von pWSK30 als Ausgangsplasmid die Rede, ein anderes Mal von pWSK29. In beiden Fällen wird dabei jeweils Referenz [156] als Literaturstelle für das Ausgangsplasmid angegeben. In dieser ist, neben der Thematisierung von pWSK29, wiederum nicht von einem Plasmid mit der Bezeichnung pWSK30 die Rede, sondern von einem mit der Bezeichnung pWKS30.

Durch Sequenzieren eines Teils der multiple cloning site von pSHA16K mit dem Primer „lacZ -343 fw pBluescriptII“ konnte festgestellt werden, dass das Ausgangsplasmid pWKS30 gewesen ist, wie es auch hier in Tabelle 4–20 aufgeführt wurde. Wichtiger ist die Tatsache, dass die Plasmide pSHA16K und pSHA25K jeweils auf dem Replikon des Plasmids R6 (Kopienzahl 5) basieren und damit beide zur Inkompatibilitätsgruppe IncFII gehören – eine Transformation von *K. pneumoniae* Va22038 mit beiden Plasmiden gleichzeitig wäre folglich nicht möglich gewesen.

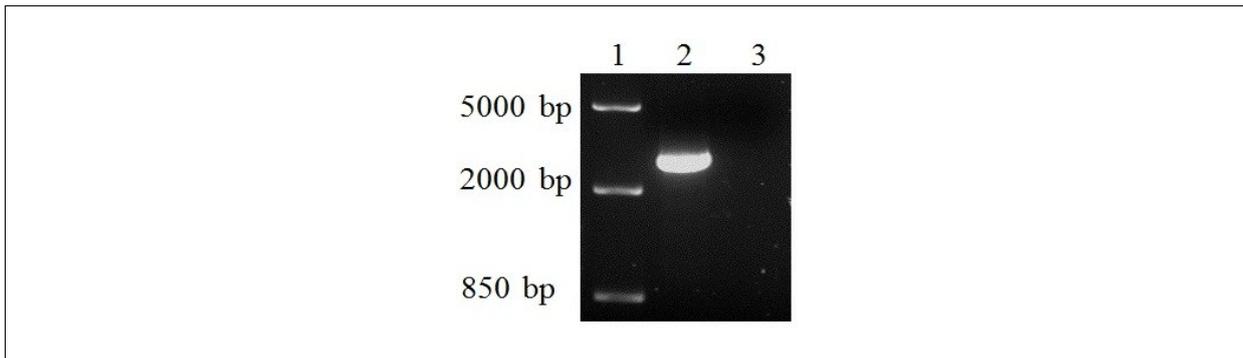
#### 4.2.8.1 Klonierung von Aminoglycosid-Resistenzgenen in Komplementationsplasmide

##### 4.2.8.1.1 Amplifikation der $\text{Ami}^{\text{R}}$ - $\text{Gen}^{\text{R}}$ -Kassette

Als Quelle für die Amikacin-Gentamicin-Resistenzgenkassette diente das Plasmid pBP507 [142]. In Abbildung 4–45 ist das Plasmid mit den Primern „aadB -923 fw pBP507“ und „aacA +1131 rev pBP507“ dargestellt, die zur Amplifikation der Kassette verwendet wurden.



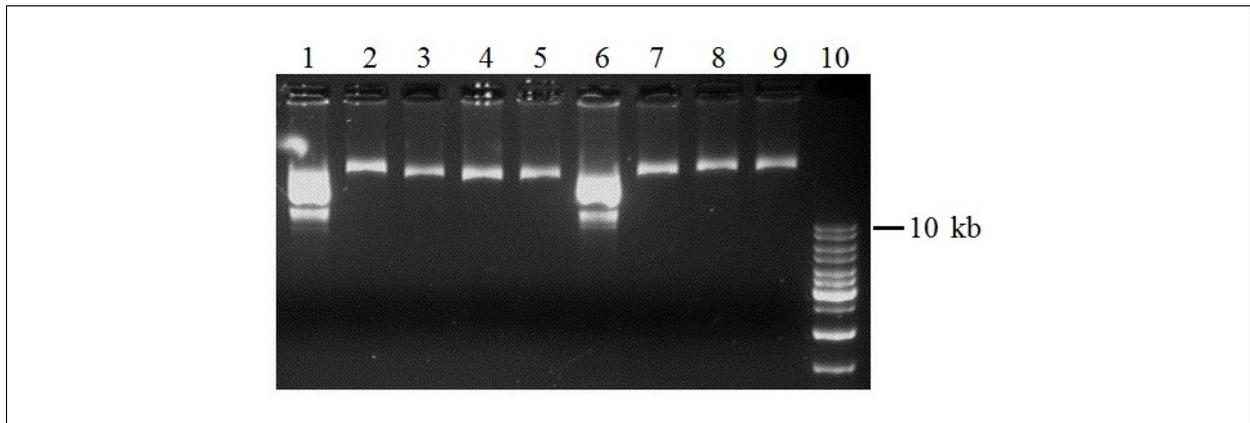
**Abbildung 4–45: Plasmidkarte von pBP507.** Die PCR sollte rechnerisch ein Amplikon der Größe 2.655 bp liefern. Abbildung 4–46 zeigt das PCR-Produkt nach Elektrophorese in einem Agarosegel. Das Produkt wurde einem Doppelverdau mit den Enzymen *Sma*I und *Psi*I unterzogen, was ein Fragment mit blunt ends lieferte. Dabei entstanden neben dem gewünschten Fragment mit 1.735 bp noch zwei seitlich vom Amplikon abgeschnittene Nebenprodukte mit 418 bp und 502 bp. Diese stellten in einer nachfolgenden Ligation mit den Vektoren Suizidsubstrate dar, deren Anwesenheit jedoch toleriert wurde.



**Abbildung 4–46: Amplifikation der Aminoglycosid-Resistenzgene von pBP507.** TAE-Agarosegel, 1 %. Spur 1: Größenmarker FastRuler Middle Range DNA Ladder (Fermentas). Spur 2: PCR-Produkt. Spur 3: Negativkontrolle.

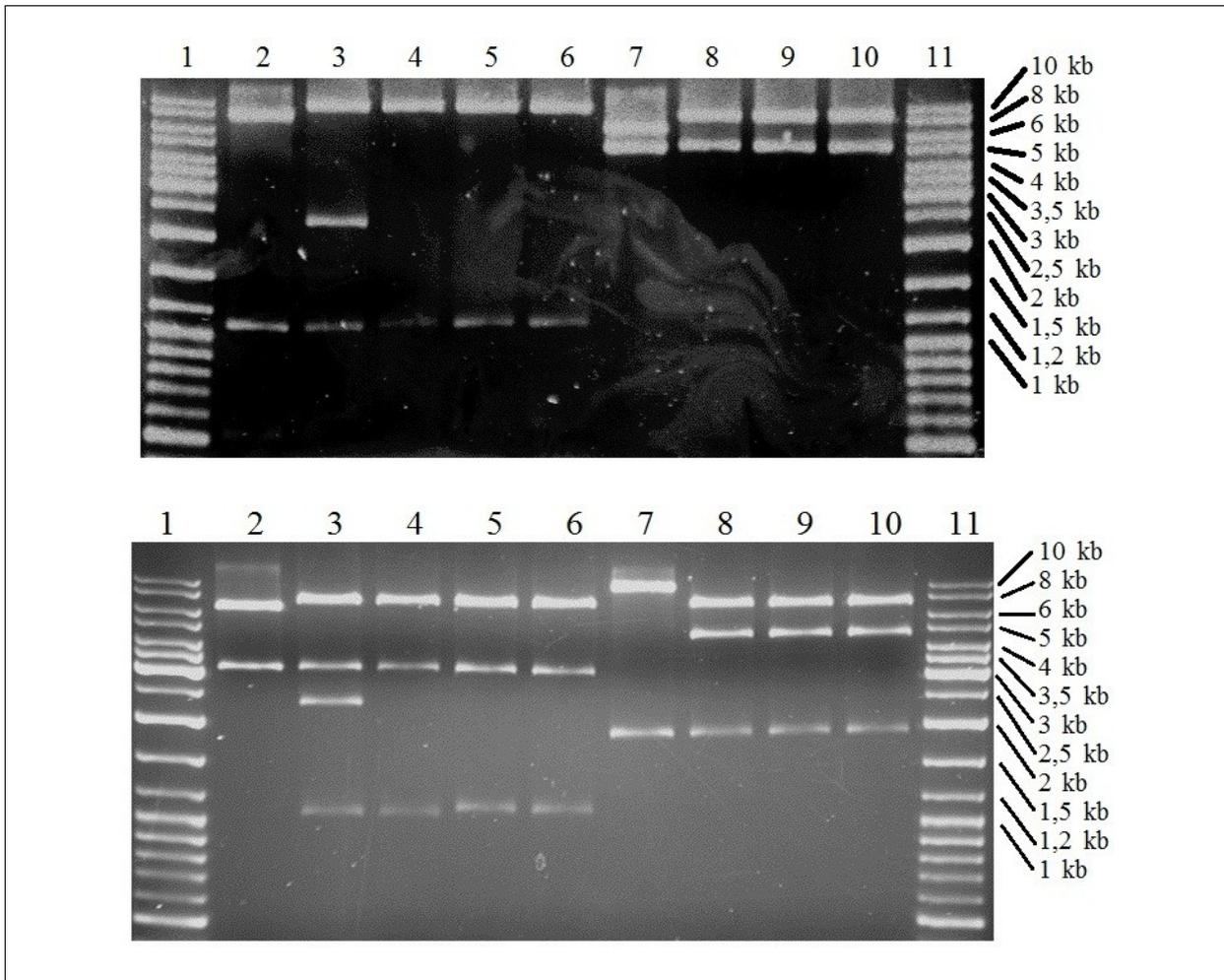
Die pSHA-Plasmide wurden mit dem NucleoBond<sup>®</sup> Xtra Midi Kit von Macherey-Nagel präpariert (Kapitel 3.2.1.2.5.2, S. 109) und mit *Xho*I linearisiert. Die dadurch erzeugten 5'-überhängenden Enden wurden anschließend mit Klenow Fragment zu blunt ends aufgefüllt (Kapitel 3.2.3.2, S. 111). Somit standen für eine Ligation mit dem zuvor erzeugten blunt-end Fragment kompatible Enden zur Verfügung. Nach einer Behandlung der Vektoren erfolgten eine Dephosphorylierung mit FastAP<sup>™</sup> (Kapitel 3.2.3.3, S. 113), eine Kontrolle dieser Reaktion und dann die Ligation (Kapitel 3.2.3.4, S. 114). Der Ligationsansatz wurde anschließend benutzt, um *E. coli* JM109 zu transformieren (Kapitel 3.2.7.2.1, S. 152). Die Transformanden wurden auf LB-Nährböden mit 5 µg/ml Gentamicin selektiert, auf identischen Nährböden subkultiviert und positiv getestete Klone als Glycerinkulturen angelegt (Kapitel 3.1.2, S. 97).

Die Konstrukte aus den vermeintlich positiven Transformanden wurden mittels alkalischer Lyse (Kapitel 3.2.1.2.1, S. 102) aus ÜNK (5 µg/ml Gentamicin) reisoliert. Die Präparate wurden einer Agarose-Gelelektrophorese unterzogen (vgl. Abbildung 4–47).



**Abbildung 4–47: Reisolation möglicher Konstrukte.** TAE-Agarosegel, 1 %. Spur 1: Midi-Präparation von pSHA25K; Spuren 2 bis 5: mögliche Konstrukte von pHPJW30-21.1; Spur 6: Midi-Präparation von pSHA16K; Spuren 7 bis 9: mögliche Konstrukte von pHPJW30-22.1; Spur 10: Größenmarker O'GeneRuler DNA Ladder Mix (Fermentas).

Der Einbau der Fragmente in die pSHA-Plasmide wurde durch Restriktionsspaltungen mit den Restriktionsenzymen *EcoRI* und *SphI* geprüft, vgl. Abbildung 4–48 für die entsprechenden Bilder aus Agarose-Gelelektrophorese-Analysen.



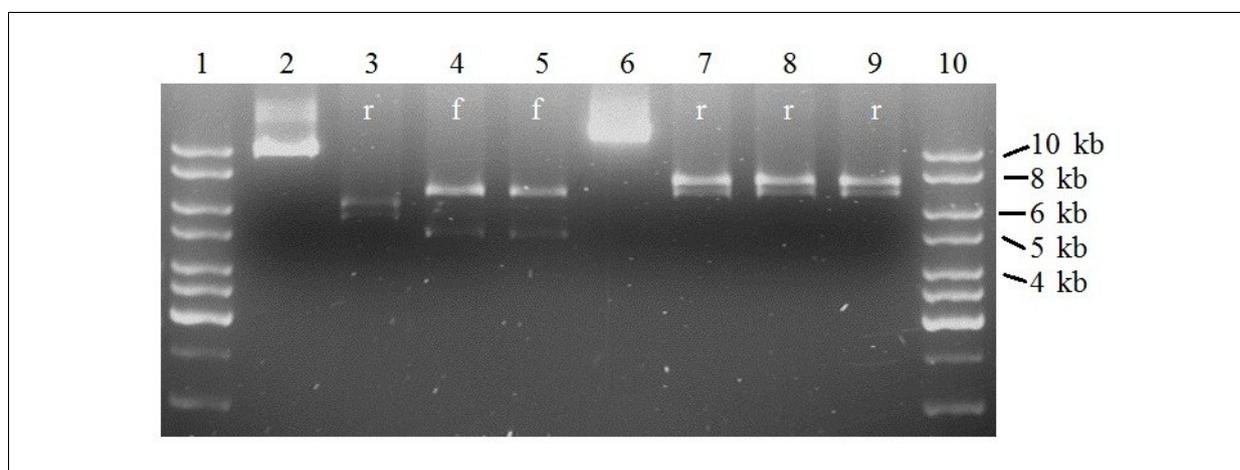
**Abbildung 4–48: *EcoRI*- und *SphI*-Restriktionsspaltung möglicher Konstrukte.** TAE-Agarosegele, 1 %. Das obere Bild zeigt *EcoRI*-Restriktionsspaltungen (hier mit Ethidiumbromid nachgefärbt), das untere *SphI*-Restriktionsspaltungen. Die Beschickung der Spuren ist identisch: Spuren 1 und 11: Größenmarker O’GeneRuler DNA Ladder Mix (Fermentas). Spur 2: Midi-Präparation von pSHA25K; Spuren 3 bis 6: mögliche Konstrukte von pHPJW30-21.1; Spur 7: Midi-Präparation von pSHA16K; Spuren 8 bis 10: mögliche Konstrukte von pHPJW30-22.1. Bei den hier betrachteten Konstrukten zeigen alle bis auf dasjenige in Spur 3 eine Größenzunahme von ca. 1.700 bp gegenüber dem Ausgangsvektor, wie man es bei einer erfolgreichen Klonierung erwarten würde.

Die Orientierung der klonierten Fragmente wurde durch eine *SacI*-Restriktionsspaltung untersucht (Abbildung 4–49). Dabei konnten aus den Angaben der Konstruktion der pSHA-Plasmide folgende Fragmentgrößen in Abhängigkeit der Orientierung des hier klonierten Fragmentes abgeleitet werden (Tabelle 4–21):

Tabelle 4–21: Fragmentgrößen in Abhängigkeit der Fragment-Orientierung nach *SacI*-Restriktionsspaltung

Plasmid	Produkt(e)
pSHA25K	1 Fragment: ~10 kb
pHPJW30-21.1f	2 Fragmente: 6.444 bp und Rest (~5.200 bp)
pHPJW30-21.1r	2 Fragmente: 5.883 bp und Rest (~5.800 bp)
pSHA16K	1 Fragment: ~13 kb
pHPJW30-22.1f	2 Fragmente: 5.883 bp und Rest (~8.800 bp)
pHPJW30-22.1r	2 Fragmente: 6.444 bp und Rest (~8.200 bp)

Die Sequenz der Plasmide pSHA16K und pSHA25K ist nicht vollständig bekannt und ihre Konstruktion nicht bis ins letzte Detail nachzuvollziehen, daher sind in Tabelle 4–21 nur ungefähre Größen der Spaltprodukte angegeben.



**Abbildung 4–49: *SacI*-Restriktionsspaltung der Konstrukte.** TAE-Agarosegel, 1 %. Spuren 1 und 11: Größenmarker O'GeneRuler DNA Ladder Mix (Fermentas). Spur 2: Midi-Präparation von pSHA25K; Spuren 3 bis 5: pHPJW30-21; Spur 6: Midi-Präparation von pSHA16K; Spuren 7 bis 9: pHPJW30-22. Die aus dem Bandenmuster abgeleitete Orientierung ist bei der jeweiligen Spur als „r“ bzw. „f“ angegeben.

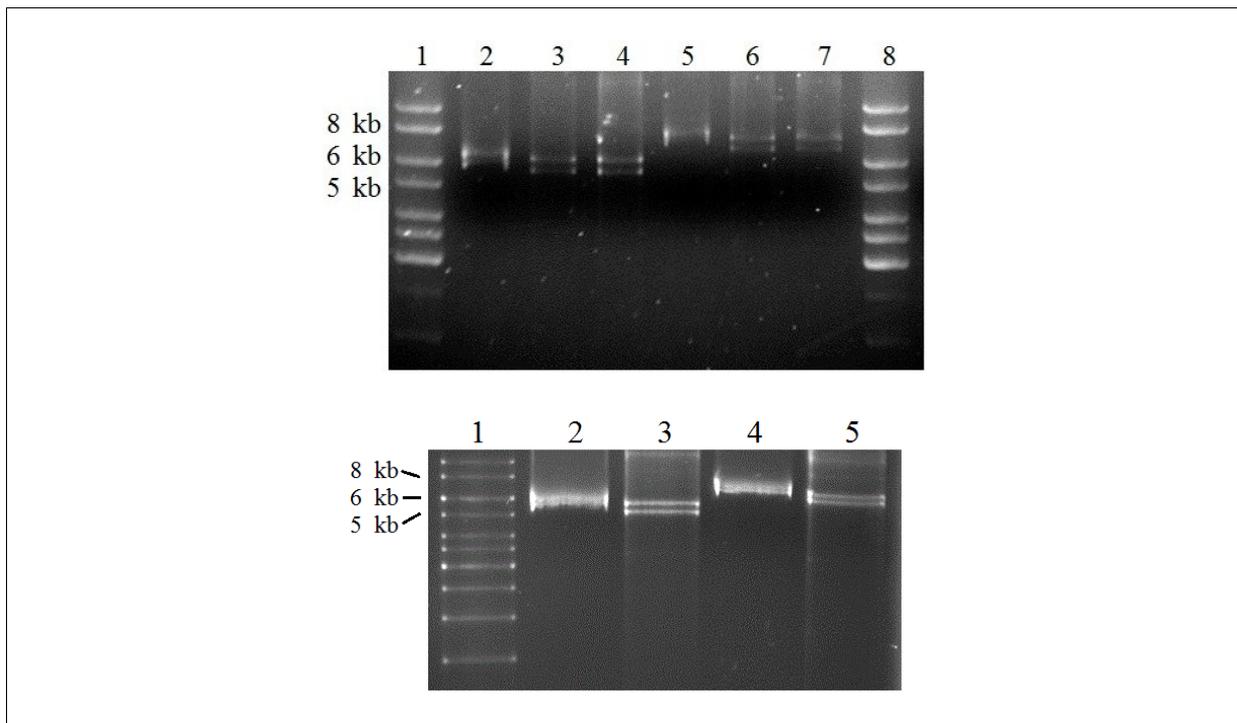
Für das weitere Vorgehen wurden diejenigen Konstrukte gewählt, die das Fragment in der „r“-Orientierung enthielten.

Tabelle 4–22 fasst die Konstruktion der Plasmide sowie die Verbindung zu den beiden pSHA-Plasmiden zusammen.

Tabelle 4–22: Übersicht der Modifikation der pSHA-Plasmide

ursprüngl.	Eigenschaften	Modifikation	neue Bezeichnung
pSHA16K	Kan <sup>R</sup> ; Amp <sup>R</sup> ; <i>ompK35</i>	Ami <sup>R</sup> /Gen <sup>R</sup> -Fragment mittels PCR und <i>SmaI/PsiI</i> -Doppelverdau aus pBP507 isoliert; pSHA-Plasmide mit <i>XhoI</i> linearisiert; 5'-Überhänge mit Klenow Fragment geglättet; Fragment blunt ligiert. Kontrolle der Anzahl eingebauter Fragmente durch <i>SphI</i> / <i>EcoRI</i> -Restriktionsspaltungen; Kontrolle der Orientierung durch <i>SacI</i> -Restriktionsspaltung.	pHPJW30-22.1
pSHA25K	Kan <sup>R</sup> ; Amp <sup>R</sup> ; <i>ompK36</i>		pHPJW30-21.1

pHPJW30-21.1 und pHPJW30-22.1 wurden benutzt, um *K. pneumoniae* ATCC 13883 und *K. pneumoniae* Va22038 mittels Elektroporation zu transformieren (s. Kapitel 3.2.7.2.2, S. 154). Die Transformationsansätze wurden auf LB-Nährböden mit 5 µg/ml Gentamicin ausplattiert. Mögliche Transformanden wurden auf analogen Nährböden subkultiviert, als ÜNK (5 µg/ml Gentamicin) angeimpft und am folgenden Tag mit dem Hi Yield<sup>®</sup> Kit von SLG präpariert (Kapitel 3.2.1.2.5.1, S. 109). Die Präparate wurden dann einer *SacI*-Restriktionsspaltung unterzogen, um den Erfolg der Transformation zu verifizieren.



**Abbildung 4–50: *Sac*I-Restriktionsspaltung von Plasmiden aus transformierten Klebsiellen.** TAE-Agarosegele, 1 %. Oberes Bild: Spuren 1 und 8: Größenmarker O’GeneRuler DNA Ladder Mix (Fermentas). Spur 2: pHPJW30-21.1 aus *E. coli* JM109; Spuren 3 und 4: aus *K. pneumoniae* Va22038; Spur 5: pHPJW30-22.1 aus *E. coli* JM109; Spuren 6 und 7: aus *K. pneumoniae* Va22038. Unteres Bild: Spur 1: Größenmarker GeneRuler 1 kb (Fermentas). Spur 2: pHPJW30-21.1 aus *E. coli* JM109; Spur 3: aus *K. pneumoniae* ATCC 13883; Spur 4: pHPJW30-22.1 aus *E. coli* JM109; Spur 5: aus *K. pneumoniae* ATCC 13883. Bei beiden Bildern sind die Plasmide aus *E. coli* JM109 vor der Restriktionsspaltung mittels alkalischer Lyse präpariert worden, was das etwas andere Laufverhalten gegenüber den Klebsiellen-Präparaten erklärt, die mit dem Hi Yield® Kit präpariert wurden.

#### 4.2.8.2 Effekt der *ompK35/36*-Komplementation

*K. pneumoniae* ATCC 13883/pHPJW30-21.1 und *K. pneumoniae* ATCC 13883/pHPJW30-22.1 dienen in diesem Versuch als Kontrollen, die den Einfluss der Plasmide auf einen Stamm mit intakten Porinen zeigen sollten. Diese beiden Stämme sowie *K. pneumoniae* Va22038/pHPJW30-21.1 und *K. pneumoniae* Va22038/pHPJW30-22.1 wurden Bestimmungen der MHK von Carbapenemen unterzogen. Dabei wurden stets 5 µg/ml Gentamicin konstant zugesetzt, um einen Verlust der Plasmide zu verhindern – insbesondere bei *K. pneumoniae* Va22038 war nämlich zu erwarten, dass die komplementierten *ompK*-Gene durch die eingebrachten Plasmide dem Stamm bezüglich seiner Carbapenem-Unempfindlichkeit zum Nachteil gereichen. Damit wäre ein Plasmidverlust bei der MHK-Bestimmung sehr wahrscheinlich gewesen.

Die Ergebnisse der MHK-Bestimmung sind in Tabelle 4–23 dargestellt.

Tabelle 4–23: MHK-Bestimmung nach *ompK*-Komplementation (Werte in µg/ml)

	<i>K. pneumoniae</i> Va22038				<i>K. pneumoniae</i> ATCC 13883					
	MHK	komplementiert			MHK	Kontrolle der Komplementationsplasmide				
		<i>ompK35</i>	Quotient	<i>ompK36</i>		Quotient	<i>ompK35</i>	Quotient	<i>ompK36</i>	Quotient
<b>Ertapenem</b>	32	0,25	128↓	1	32↓	0,0156	0,0078	2↓	0,0078	2↓
<b>Imipenem</b>	16	1	16↓	1	16↓	0,5	0,25	2↓	0,5	1
<b>Meropenem</b>	8	0,125	64↓	0,25	32↓	0,03125	0,0156	2↓	0,03125	1

#### **4.2.9 Plasmidprofil**

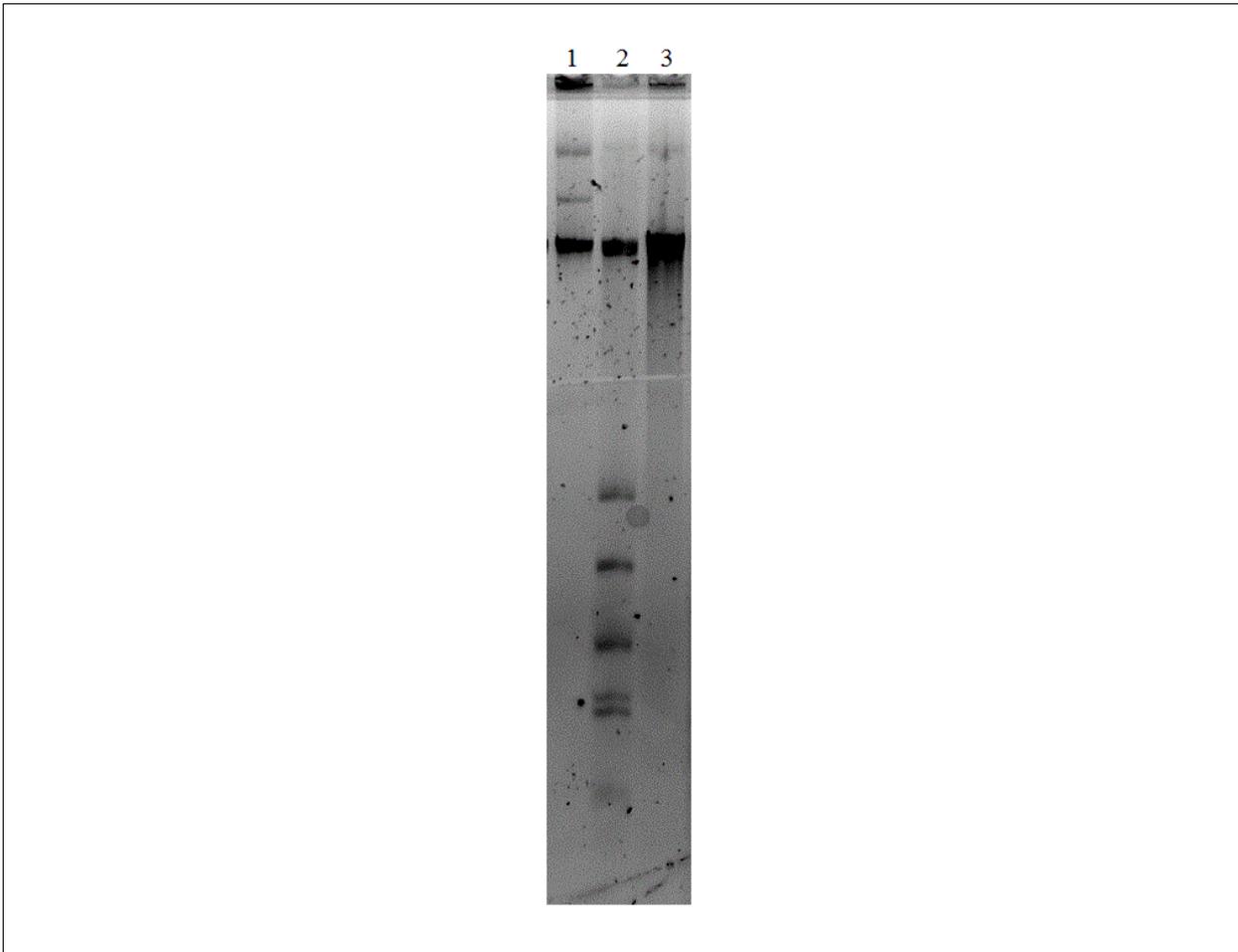
Im Laufe dieser Arbeit wurden verschiedene Methoden zur Isolation von Plasmiden aus *K. pneumoniae* Va22038 angewendet, deren Resultate im Folgenden dargestellt sind.

##### **4.2.9.1 Alkalische Lyse**

Eine alkalische Lyse (Kapitel 3.2.1.2.1, S. 102) zeigte bei *K. pneumoniae* Va22038 keine als Plasmide zu deutende Banden in einer Agarose-Gelelektrophorese (vgl. Abbildung 4–9, S. 182).

##### **4.2.9.2 Analyse von Plasmid-DNA isoliert nach der Methode von Kado & Liu**

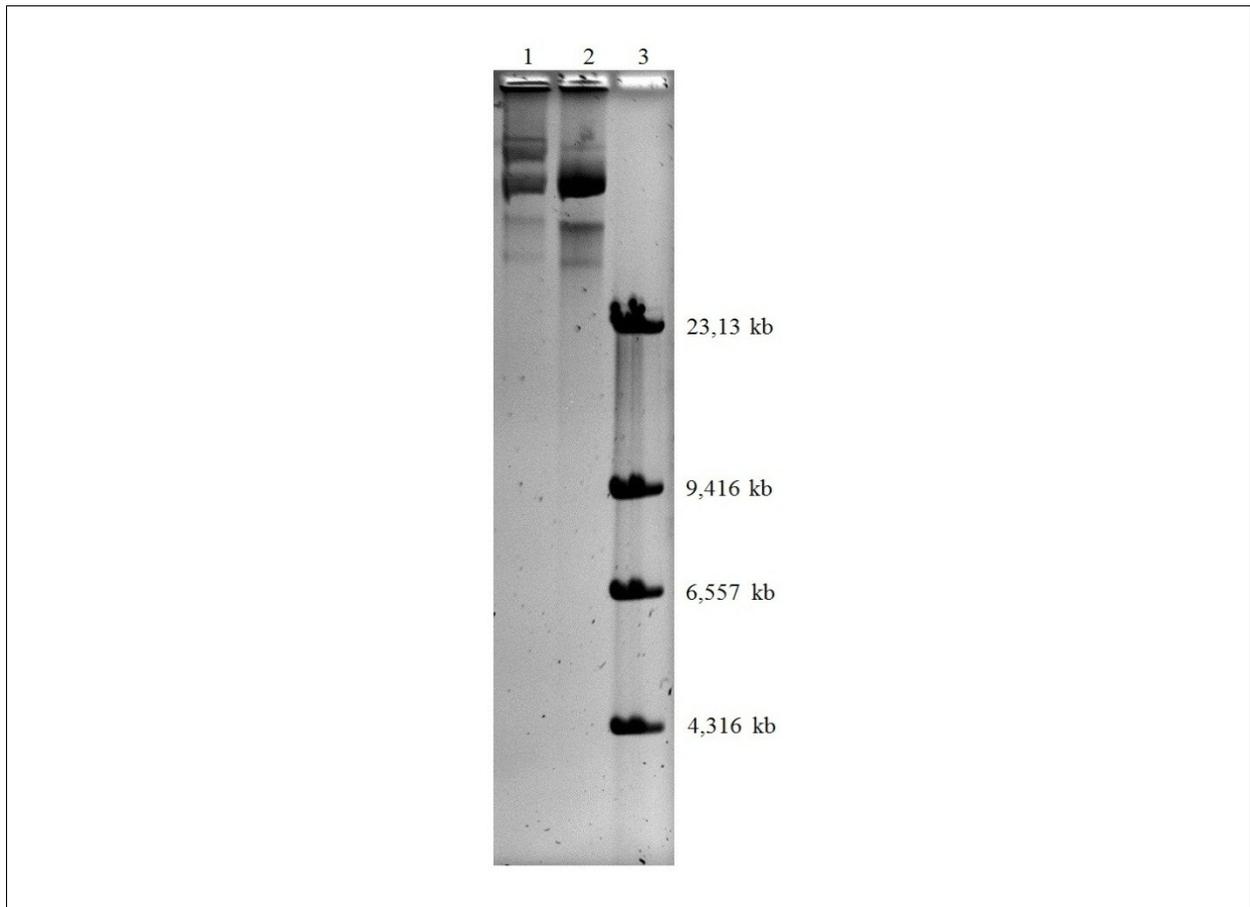
Die Präparation nach Kado & Liu (modifiziert nach Toranzo, Kapitel 3.2.1.2.2, S. 105) ergab das in Abbildung 4–51 zu sehende, dokumentierte Agarosegel.



**Abbildung 4–51: Isolierung von großen Plasmiden nach Kado & Liu.** TAE-Agarosegel, 0,5 %. Spur 1: *K. pneumoniae* Va22038; Spur 2: *E. coli* V517 (Plasmidgrößen: vgl. Tabelle 2–4, S. 70); Spur 3: *E. coli* C600S/RP1H (RP1H: ca. 61 kb).

#### 4.2.9.3 Analyse von Plasmid-DNA isoliert nach der Methode von Crosa

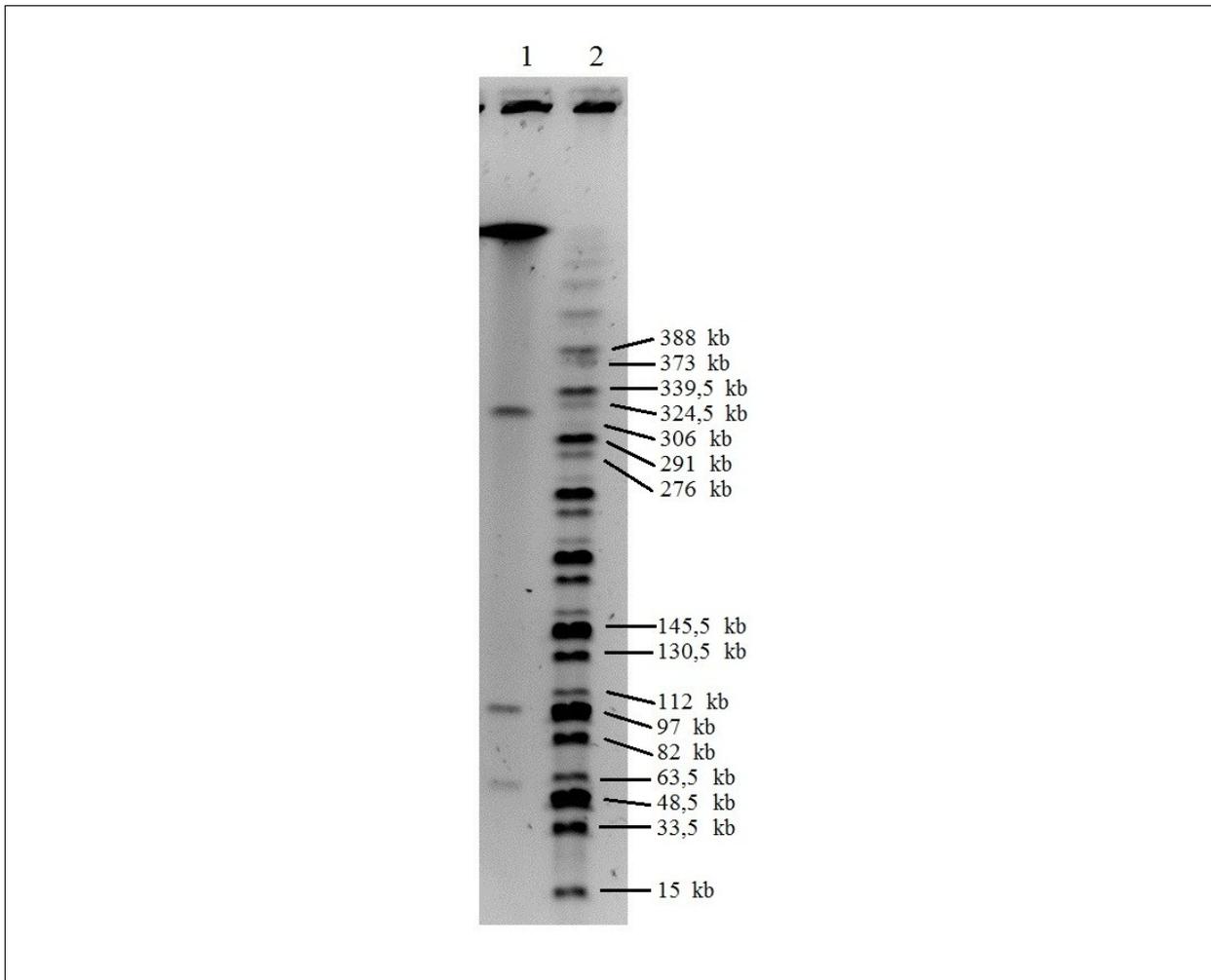
Abbildung 4–11 (S. 185) zeigt die analytische Auftrennung mittels Agarose-Gelelektrophorese einer Präparation nach Crosa (die Methode ist in Kapitel 3.2.1.2.3, S. 105ff, beschrieben). Die folgende Abbildung 4–52 zeigt noch einmal den *K. pneumoniae* Va22038 betreffenden Ausschnitt deutlicher.



**Abbildung 4–52: Isolierung von großen Plasmiden durch Präparation nach Crosa.** TAE-Agarosegel, 0,5 %. Spur 1: *K. pneumoniae* Va22038; Spur 2: *E. coli* C600S/RP1H (RP1H: ca. 61 kb); Spur 3: Größenmarker *Hind*III-gespaltene  $\lambda$ -DNA (NEB).

#### 4.2.9.4 Detektion von großen Plasmiden mittels S1-PFGE

Das Ergebnis eines S1-Mappings (für die Methode vgl. Kapitel 3.2.1.2.4 ab S. 107) ist in Abbildung 4–53 zu sehen.



**Abbildung 4–53: S1-PFGE von *K. pneumoniae* Va22038.** Pulsfeld-Agarosegel, 1 %. Spur 1: *K. pneumoniae* Va22038; Spur 2: MidRange PFG Marker I (NEB).

#### 4.2.9.5 Zusammenfassung der Ergebnisse zur Bestimmung des Plasmidprofils

Zusammengefasst konnten bei *K. pneumoniae* Va22038 3 Plasmide gefunden werden. Plasmid 1 hat eine Größe von ca. 62 kb, Plasmid 2 von ca. 100 kb und Plasmid 3 von ca. 315 kb.

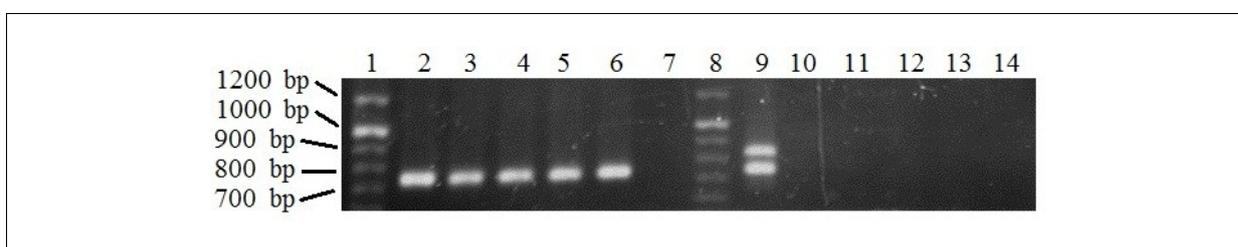
#### 4.2.10 Übertragung von Carbapenem-Resistenz durch Konjugation

*K. pneumoniae* Va22038 wurde als Donor in einem Konjugationsversuch benutzt, um herauszufinden, ob die die Carbapenem-Resistenz vermittelnde Determinante übertragbar ist. Als Rezipient wurde *E. coli* J53-1 Azid<sup>R</sup> benutzt, der Versuch wurde als 6 Stunden dauerndes Filter Mating (Kapitel 3.2.7.1.2, S. 151) durchgeführt. Die Selektion der Transkonjuganden erfolgte auf LB-Agar-Nährböden mit 100 µg/ml Ampicillin und 250 µg/ml Natriumazid. Die

Selektion der Determinante erfolgte also nicht mit einem Carbapenem (vgl. hierzu die Diskussion in Kapitel 5.2.5, S. 272ff).

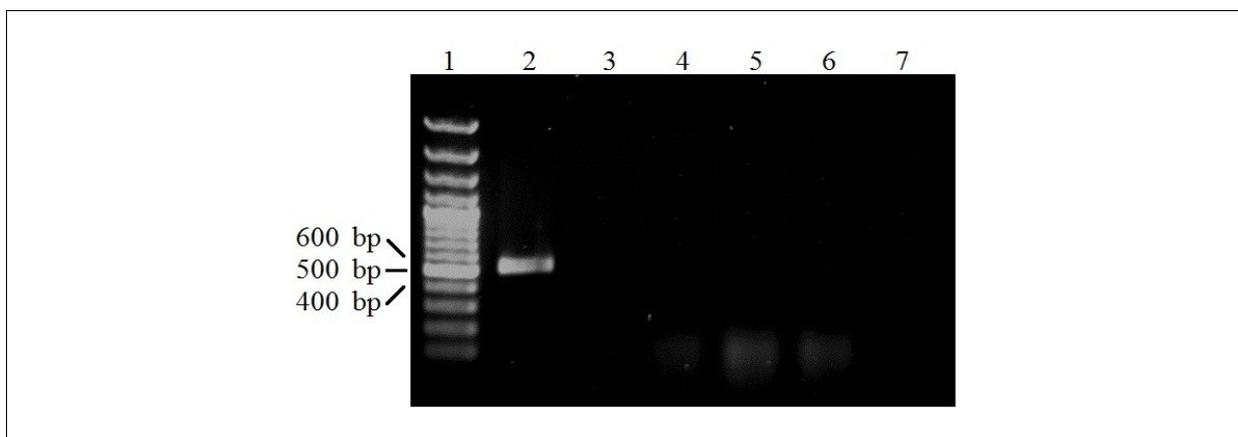
#### 4.2.10.1 Nachweis der Übertragung mittels PCR

Vermeintliche Transkonjuganden wurden subkultiviert und einer Hitzelyse (Kapitel 3.2.1.1, S. 101) unterzogen. Die gewonnene DNA diente als Template für PCRs, welche der Verifizierung der Transkonjuganden dienen sollten. Zum einen kam dazu die PCR auf *bla*<sub>OXA-48</sub> zum Einsatz, zum anderen die TEM-/SHV-Duplex-PCR (Abbildung 4–54).



**Abbildung 4–54: *bla*<sub>OXA-48</sub> u. TEM-/SHV-Duplex-PCR f. Transkonjuganden.** TAE-Agarosegel, 1 %. Linke Gelhälfte: PCR auf *bla*<sub>OXA-48</sub>, erwartetes Amplikon: 744 bp. Spur 1: Größenmarker O'GeneRuler 100 bp Plus (Fermentas). Spur 2: *K. pneumoniae* Va22038; Spuren 3-6: mögliche Transkonjuganden; Spur 7: Negativkontrolle. Rechte Gelhälfte: SHV-/TEM-Duplex-PCR, erwartete Amplikongrößen: 746 bp für *bla*<sub>SHV</sub> und 838 bp für *bla*<sub>TEM</sub>. Spur 8: Größenmarker O'GeneRuler 100 bp Plus (Fermentas). Spur 9: *K. pneumoniae* Va22038; Spuren 10-13: mögliche Transkonjuganden; Spur 14: Negativkontrolle. Dem Gelbild ist anzusehen, dass die Lauffront nicht ganz unterseitenparallel migrierte.

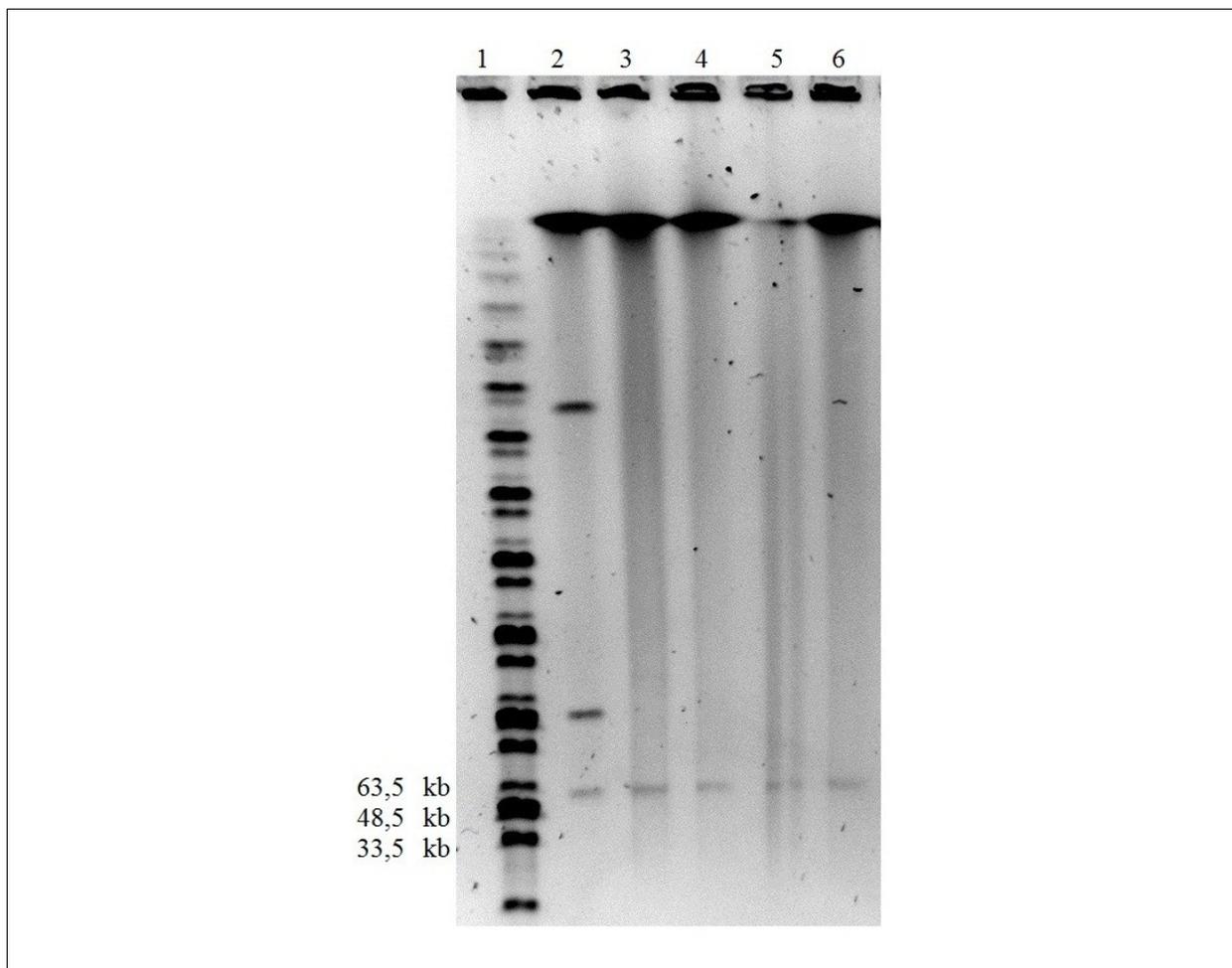
Daneben wurde auch untersucht, ob gegebenenfalls das nachgewiesene Aminoglykosid-Resistenzgen auf dem gleichen Plasmid lokalisiert ist wie *bla*<sub>OXA-48</sub>. Näheres dazu ist der folgenden Abbildung zu entnehmen.



**Abbildung 4–55: *aac(6')*-Ib-PCR mit Transkonjuganden.** TAE-Agarosegel, 1 %. Die erwartete Amplikongröße beträgt 515 bp. Spur 1: Größenmarker O'GeneRuler 100 bp Plus (Fermentas). Spur 2: *K. pneumoniae* Va22038; Spuren 3-6: Transkonjuganden; Spur 7: Negativkontrolle.

#### 4.2.10.2 Identifikation des übertragenen Plasmids anhand des Plasmidprofils

Um zu überprüfen, welches der Plasmide von *K. pneumoniae* Va22038 zum Rezipienten übertragen wurde, wurde ein S1-Mapping (Kapitel 3.2.1.2.4, S. 107) durchgeführt. Das Ergebnis ist in Abbildung 4–56 zu sehen.



**Abbildung 4–56: S1-PFGE; *K. pneumoniae* Va22038 und Transkonjuganden.** Pulsfeld-  
Agarosegel, 1 %. Spur 1: MidRange PFG Marker I (NEB). Spur 2: *K. pneumoniae* Va22038; Spuren 3 bis 6:  
Transkonjuganden aus Mating zwischen *K. pneumoniae* Va22038 und *E. coli* J53-1 Azid<sup>R</sup>.

#### 4.2.10.3 MHK-Werte unter Einfluss von pOXA-48(KpnVa22038)

Tabelle 4–24: Einfluss von pOXA-48(KpnVa22038) auf MHK-Werte (angegeben in µg/ml)

	<i>E. coli</i> J53-1 Azid <sup>R</sup>	<i>E. coli</i> J53-1 Azid <sup>R</sup> / pOXA-48(KpnVa22038)
<b>Ampicillin</b>	4	1024

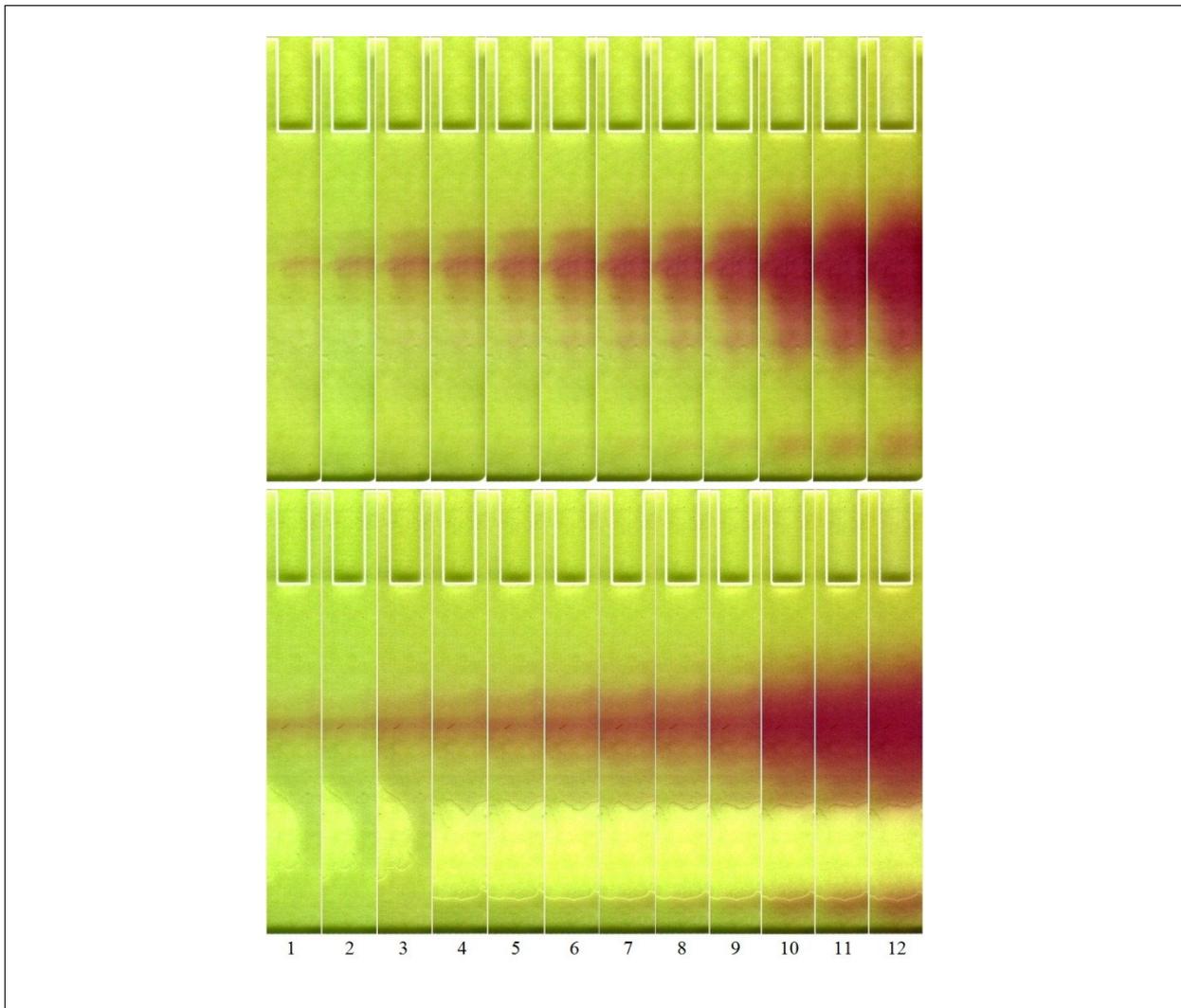
	<i>E. coli</i> J53-1 Azid <sup>R</sup>	<i>E. coli</i> J53-1 Azid <sup>R</sup> / pOXA-48(KpnVa22038)
<b>Aztreonam</b>	0,0625	0,0625
<b>Cefotaxim</b>	0,03125	0,25
<b>Ceftazidim</b>	0,0625	0,25
<b>Cefuroxim</b>	8	8
<b>Ertapenem</b>	0,0156	1
<b>Imipenem</b>	0,125	0,5
<b>Meropenem</b>	0,03125	0,25
<b>Natriumazid</b>	512	n.b.

#### 4.2.11 Untersuchungen zur Verwandtschaft mit *K. pneumoniae* 11978

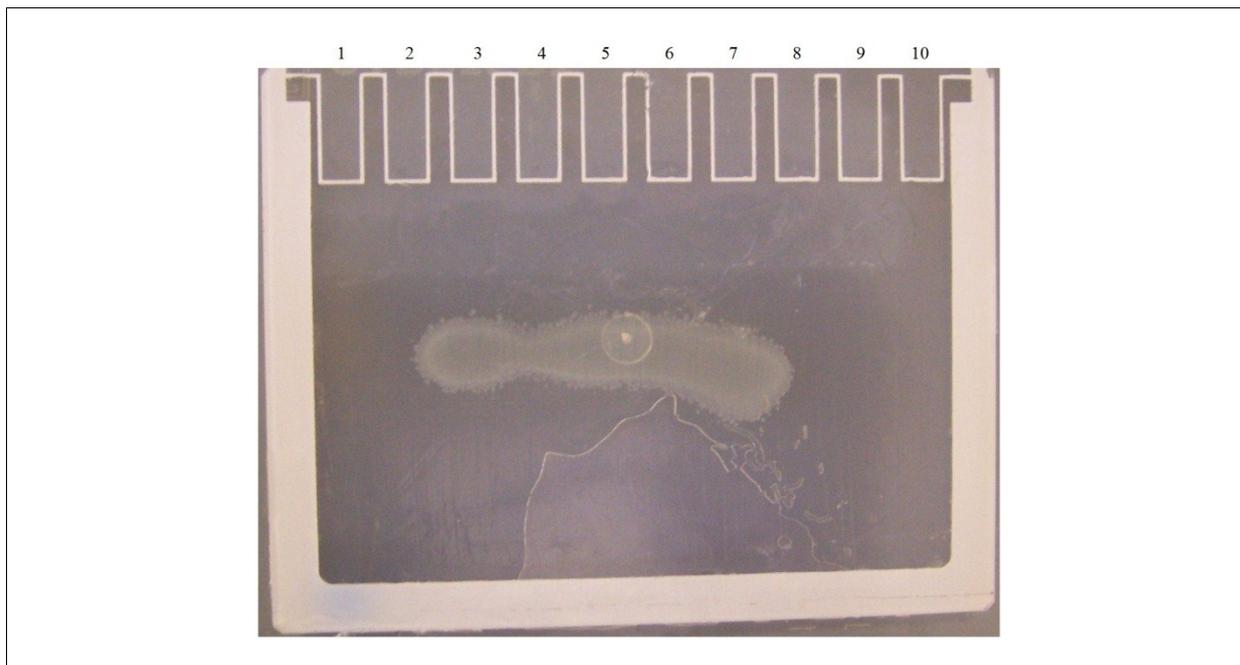
##### 4.2.11.1 Isoelektrische Fokussierung und Bioassay

Ziel dieses Versuchs war es herauszufinden, ob *K. pneumoniae* Va22038 und *K. pneumoniae* 11978 ein ähnliches Bild liefern, wenn man ihre  $\beta$ -Lactamasen-Extrakte einer isoelektrischen Fokussierung (IEF) unterzieht und mit Nitrocefin detektiert. Darüber hinaus sollten in einem analogen Ansatz durch nachfolgende Detektion der Enzymaktivität mittels eines Bioassays die in beiden Stämmen exprimierten Carbapenemasen verglichen werden.

Die Gewinnung der  $\beta$ -Lactamase-Extrakte erfolgte mit der Chloroform-Methode (Kapitel 3.3.3, S. 159). Die IEF wurde entsprechend den Angaben in Kapitel 3.3.4 (ab S. 160) durchgeführt, wo auch sowohl die Detektion mit Nitrocefin als auch die Detektion mit einem Bioassay beschrieben ist.



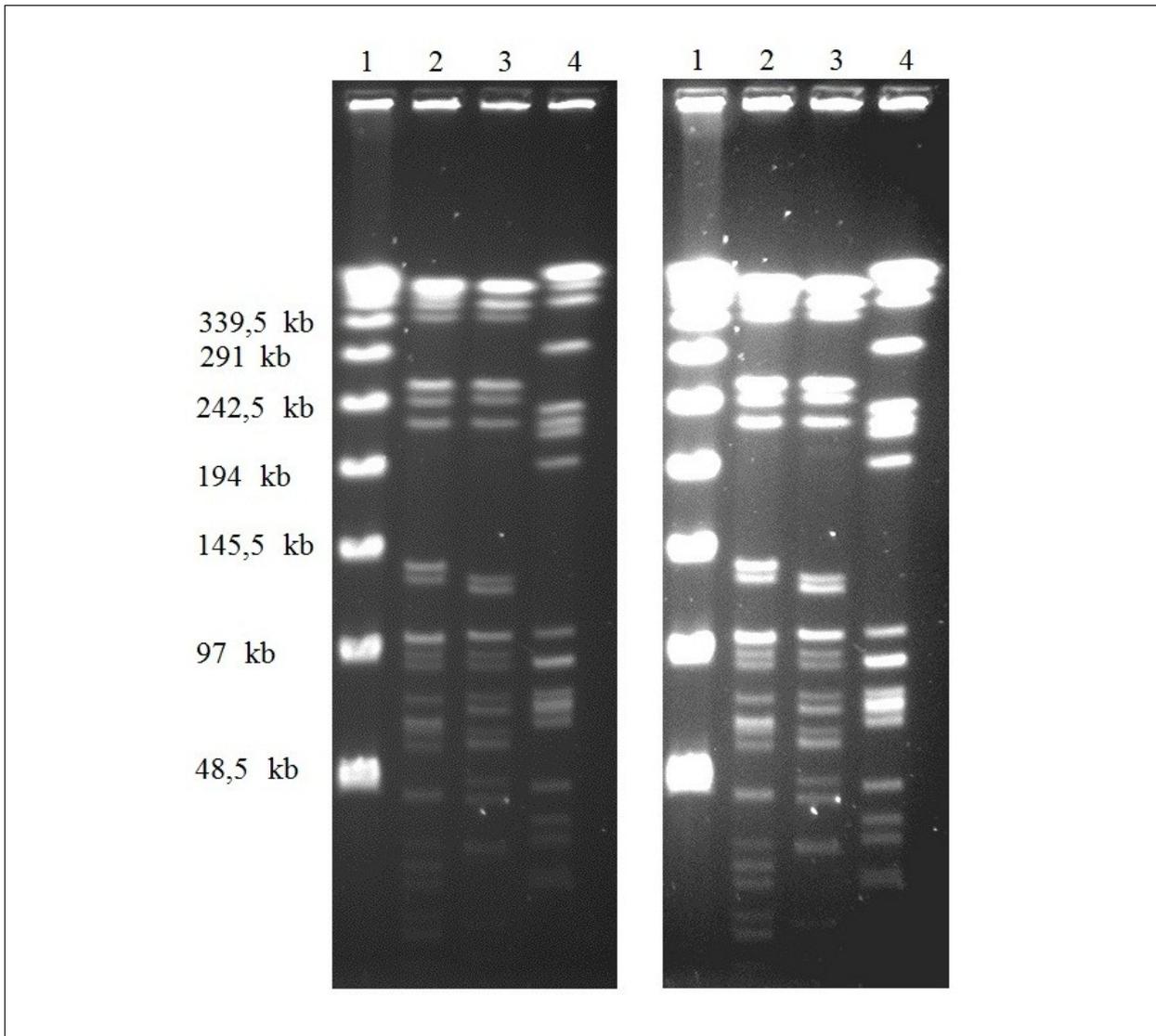
**Abbildung 4–57: IEF, Nitrocefin-Detektion.** Die beiden zusammengesetzten Bilder zeigen je 12 Momentaufnahmen jeweils einer Spur eines IEF-Fertiggels während der Entwicklung mit Nitrocefin. Oberes Bild: *K. pneumoniae* 11978; unteres Bild: *K. pneumoniae* Va22038. Nr. 1: Aufnahme nach 1 min nach Beginn der Entwicklung; Nr. 2: nach 2,5 min; Nr. 3: nach 4 min; Nr. 4: nach 6 min; Nr. 5: nach 8 min; Nr. 6: nach 13 min; Nr. 7: nach 18 min; Nr. 8: nach 21 min; Nr. 9: nach 30 min; Nr. 10: nach 65 min; Nr. 11: nach 95 min; Nr. 12: nach 145 min.



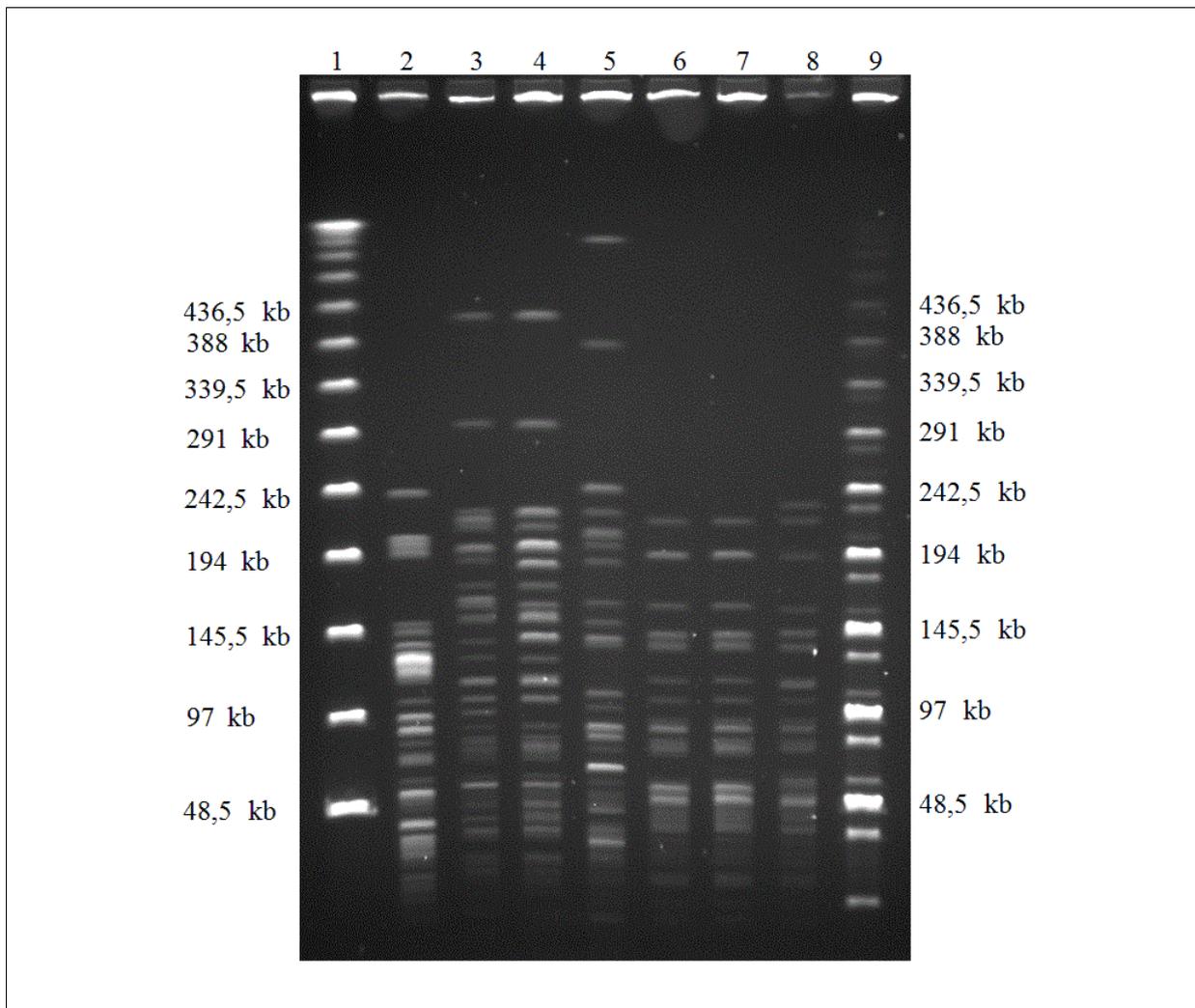
**Abbildung 4–58: IEF, Detektion mittels Bioassay.** Spur 3: *K. pneumoniae* 11978 (bla<sub>OXA-48</sub>), Spur 5: *K. pneumoniae* Va22038, Spur 7: *K. pneumoniae* 375/08 (bla<sub>KPC-2</sub>). Der Kreis mit Punkt in der Bildmitte stammt von einem sterilen Kunststoffgefäß, in das das Fertiggel gelegt und mit dem entsprechenden LB-Agar überschichtet wurde.

#### 4.2.11.2 PFGE-Untersuchungen

*K. pneumoniae* Va22038 und *K. pneumoniae* 11978 wurden mittels Pulsfeldgelelektrophorese sowohl nach Makrorestriktion (Kapitel 3.2.6.2, S. 142) als auch nach Spaltung mit S1 Nuclease (Kapitel 3.2.1.2.4, S. 107) auf eine mögliche Verwandtschaft untersucht. Die Resultate dieser Untersuchungen sind in den folgenden Abbildungen dargestellt.

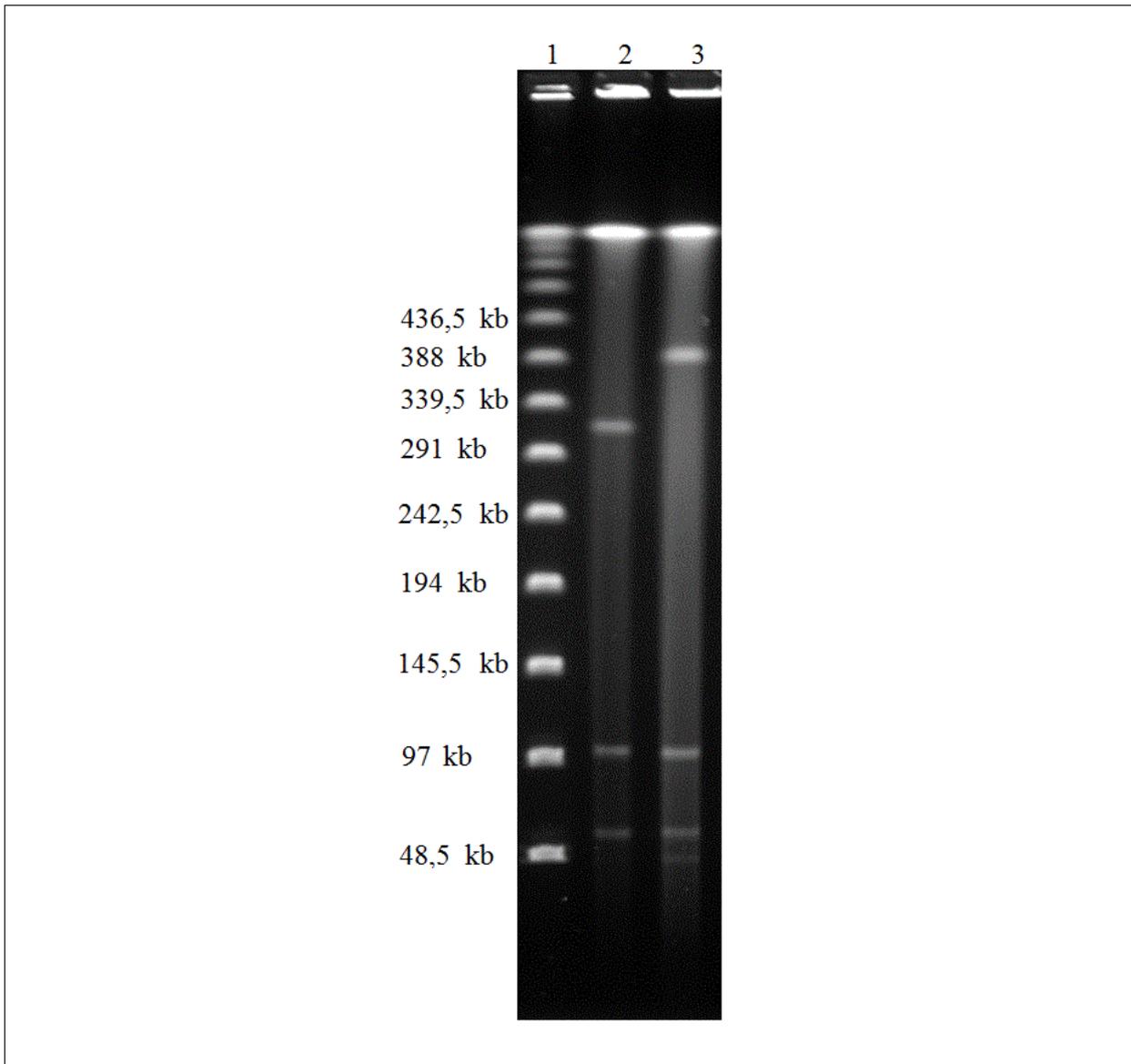


**Abbildung 4–59: XbaI-PFGE.** Pulsfeld-Agarosegele, 1 %. Dargestellt ist das gleiche Bild bei zwei unterschiedlichen Belichtungsintensitäten, um stärkere bzw. schwächere Details zu verdeutlichen. Spur 1:  $\lambda$ -Ladder PFG Größenmarker (NEB). Spur 2: *K. pneumoniae* 11978; Spur 3: *K. pneumoniae* Va22038; Spur 4: *S. Typhimurium* LT2.



**Abbildung 4–60: MssI-PFGE.** Pulsfeld-Agarosegel, 1 %. Spur 1:  $\lambda$ -Ladder PFG Marker (NEB). Spur 2: *S. Typhimurium* LT2; Spur 3: *K. pneumoniae* Va22038; Spur 4: *K. pneumoniae* 11978; Spur 5: *K. pneumoniae* ATCC 13883; Spur 6: *E. coli* J53-1 Azid<sup>R</sup>/pOXA-48KpnVa22038); Spur 7: *E. coli* J53-1 Azid<sup>R</sup>; Spur 8: *E. coli* JM109. Spur 9: MidRange PFG Marker I (NEB).

Abbildung 4–61 zeigt die Gegenüberstellung eines S1-Mappings von *K. pneumoniae* Va22038 und *K. pneumoniae* 11978.



**Abbildung 4–61: S1-PFGE; *K. pneumoniae* Va22038 und 11978.** Pulsfeld-Agarosegel, 1 %. Spur 1: Größenmarker  $\lambda$ -Ladder PFG Marker (NEB); Spur 2: *K. pneumoniae* Va22038; Spur 3: *K. pneumoniae* 11978.

#### 4.2.11.3 Vergleichende Untersuchung der Plasmidprofile

##### 4.2.11.3.1 Untersuchung auf identische Plasmide im Gesamtprofil

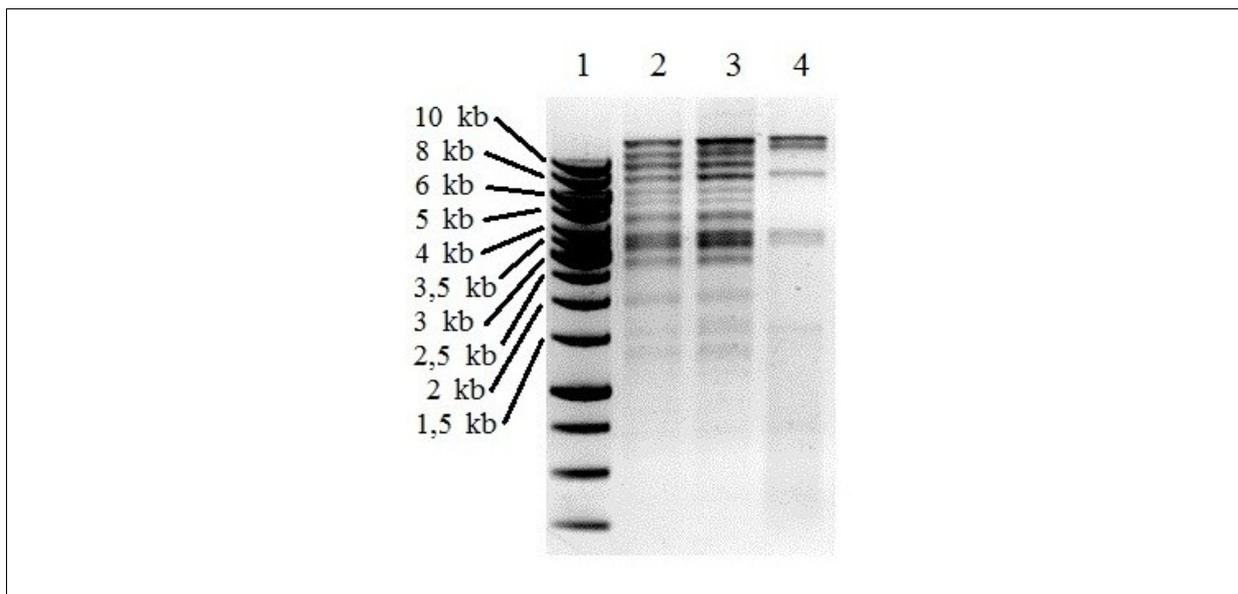
Da im S1-PFGE-Profil zwei der Plasmide von *K. pneumoniae* Va22038 und 11978 eine gleiche Größe aufwiesen, wurde dies als Anlass genommen, die Plasmide weitergehend auf Homologie zu untersuchen.

Dazu wurden Plasmid-DNA-Präparate mit dem Plasmid Midi Kit der Firma QIAGEN hergestellt (vgl. Kapitel 3.2.1.2.5.3, S. 109). Der Transkonjugand *E. coli* J53-1

---

Azid<sup>R</sup>/pOXA-48(KpnVa22038) wurde zu Vergleichszwecken mitgeführt. Den Herstellerangaben zufolge isoliert das Midi Kit Plasmide bis zu einer Größe von 150 kb, das bedeutet hier für diesen Ansatz, dass das jeweils größte Plasmid der beiden *Klebsiella*-Isolate kaum in einer Gesamtpräparation enthalten ist.

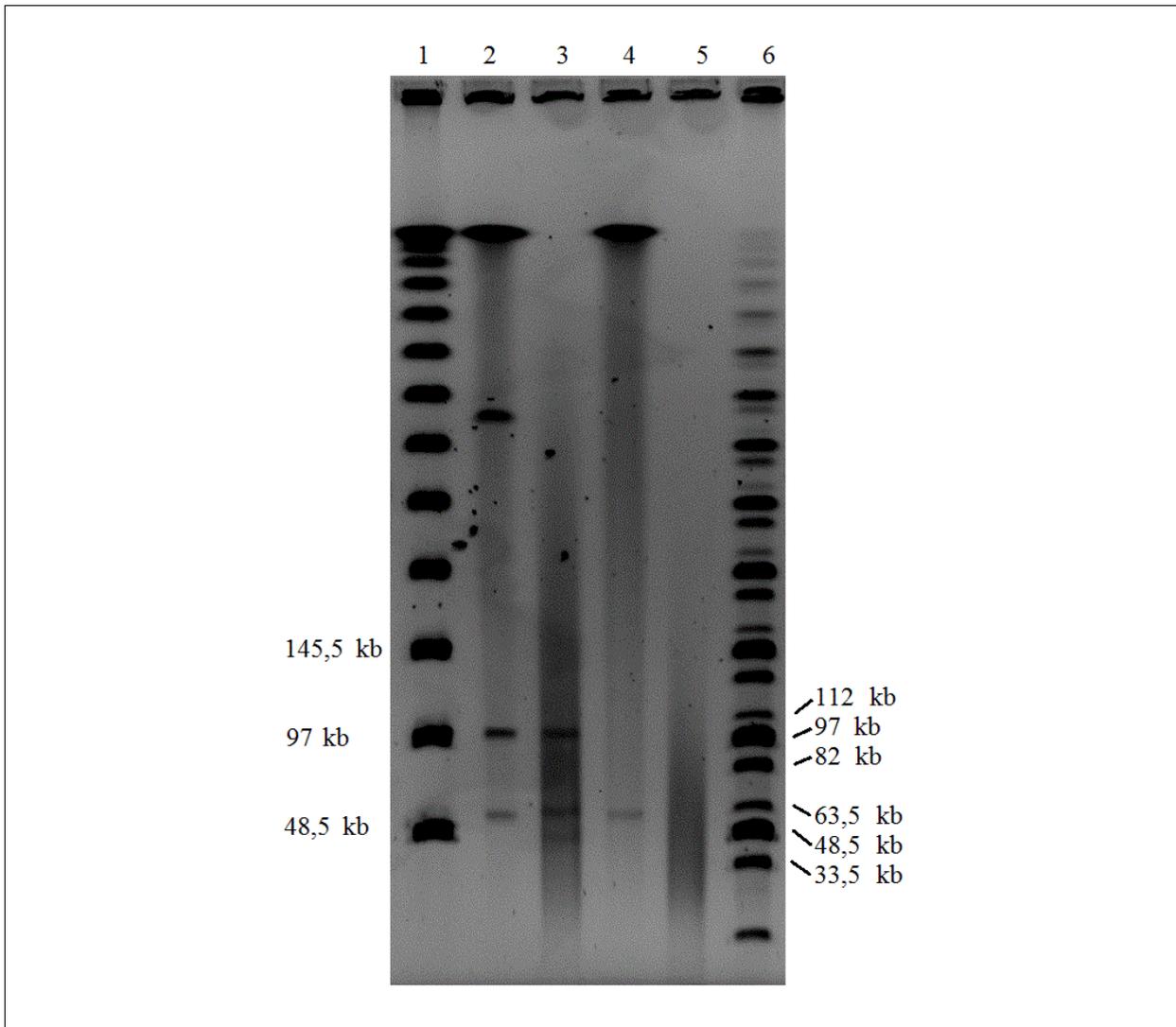
Die Präparate wurden einer Restriktionsspaltung mit *Bsp*HI und anschließend einer Agarose-Gelelektrophorese unterzogen (Abbildung 4–62).



**Abbildung 4–62: *Bsp*HI-Restriktionsspaltung von Plasmid-DNA-Präparaten (QIAGEN-Kit).** TAE-Agarosegel, 1 %. Spur 1: Größenmarker GeneRuler 1 kb (Fermentas). Spur 2: *K. pneumoniae* Va22038; Spur 3: *K. pneumoniae* 11978; Spur 4: *E. coli* J53-1 Azid<sup>R</sup>/pOXA-48(KpnVa22038).

#### 4.2.11.3.2 Untersuchung der genetischen Verwandtschaft von *bla*<sub>OXA-48</sub>-tragenden Plasmiden

Wie in Abbildung 4–63 noch einmal zeigt, weist das bei der Konjugation von *K. pneumoniae* Va22038 übertragene Plasmid, welches *bla*<sub>OXA-48</sub> codiert, offensichtlich die gleiche Größe wie das ca. 62 kb-Plasmid von *K. pneumoniae* 11978 auf.

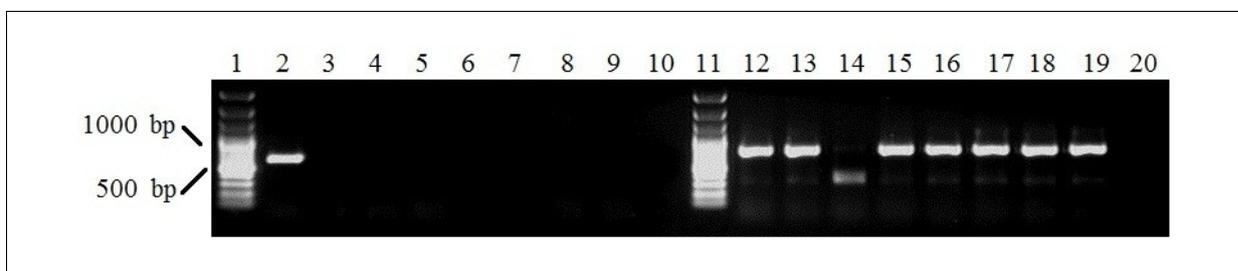


**Abbildung 4–63: S1-Mapping - Größe des konjugierbaren Plasmids.** Pulsfeld-Agarosegel, 1 %. Spur 1:  $\lambda$ -Ladder PFG Marker (NEB). Spur 2: *K. pneumoniae* Va22038, Spur 3: *K. pneumoniae* 11978 (hier ist das größte Plasmid des Stamms aufgrund von Alterung des Präparats nicht mehr zu erkennen; vgl. Abbildung 4–61), Spur 4: J53-1 Azid<sup>R</sup>/pOXA-48(KpnVa22038), Spur 5: *E. coli* J53-1 Azid<sup>R</sup>. Spur 6: MidRange PFG Marker I (NEB).

Deshalb wurde untersucht, ob die *bla*<sub>OXA-48</sub>-codierenden Plasmide der beiden *Klebsiella*-Isolate weitergehend verwandt oder gar identisch sind. Dazu wurde *bla*<sub>OXA-48</sub> in einem Konjugationsexperiment von *K. pneumoniae* 11978 als Donor zu *E. coli* J53-1 Azid<sup>R</sup> als Rezipienten übertragen und damit vereinzelt. Die Bedingungen bei diesem Versuch entsprachen exakt denjenigen von dem zuvor beschriebenen Versuch mit *K. pneumoniae* Va22038 als Donor (s. Kapitel 4.2.10, S. 234), dessen Plasmid schon vereinzelt vorlag.

Die Identifizierung positiver Transkonjuganden erfolgte durch Subkultivierung betreffender Kolonien auf geeigneten Selektionsnährböden, Hitzelyse der Zellen aus Einzelkolonien (Kapitel 3.2.1.1, S. 101) und Verwendung dieser DNA-Präparate als Template für PCRs auf

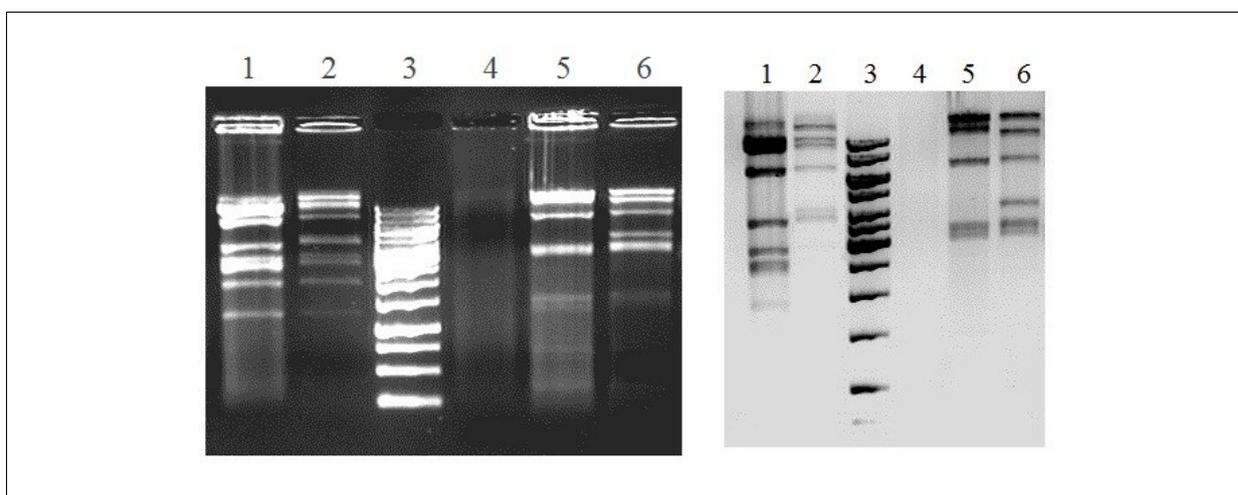
*bla*<sub>OXA-47</sub> (positiv nur bei *K. pneumoniae* 11978, vgl. Abbildung 4–37, S. 215) und *bla*<sub>OXA-48</sub> (positiv auch bei den Transkonjuganden). Die Ergebnisse der PCRs sind in der folgenden Abbildung 4–64 dargestellt.



**Abbildung 4–64: PCRs auf *bla*<sub>OXA-47</sub> und *bla*<sub>OXA-48</sub> bei potenziellen Transkonjuganden.**

TAE-Agarosegel, 1 %. Linke Gelhälfte: PCR auf *bla*<sub>OXA-47</sub> (610 bp). Spur 1: Größenmarker O'GeneRuler 100 bp Plus (Fermentas). Spur 2: *K. pneumoniae* 11978; Spuren 3 bis 9: mögliche Transkonjuganden; Spur 10: Negativkontrolle. Rechte Gelhälfte: PCR auf *bla*<sub>OXA-48</sub> (744 bp). Spur 11: Größenmarker O'GeneRuler 100 bp Plus (Fermentas). Spur 12: *K. pneumoniae* 11978; Spuren 13 bis 19: mögliche Transkonjuganden; Spur 20: Negativkontrolle.

Die vereinzelt Plasmide wurden mit dem QIAGEN Plasmid Midi Kit aus *E. coli* J53-1 Azid<sup>R</sup>/pOXA-48(KpnVa22038) und *E. coli* J53-1 Azid<sup>R</sup>/pOXA-48a isoliert (Kapitel 3.2.1.2.5.3, S. 109) und zum einen mit *SapI* und zum anderen mit *BspHI* gespalten, um nach Agarose-Gelelektrophorese anhand des resultierenden Bandenmusters den Grad der Identität bestimmen zu können. Die erhaltenen Bandenmuster sind in Abbildung 4–65 zu sehen.



**Abbildung 4–65: Spaltungsmuster der vereinzelt, *bla*<sub>OXA-48</sub>-codierenden Plasmide mit *SapI* bzw. *BspHI*.**

Die beiden Abbildungen stellen das gleiche Agarosegel (1%) bei unterschiedlichen Migrationsweiten dar. Spur 1: *E. coli* J53-1 Azid<sup>R</sup>/pOXA-48(KpnVa22038), *SapI*-Restriktionsspaltung; Spur 2: *E. coli* J53-1 Azid<sup>R</sup>/pOXA-48a, *SapI*-Restriktionsspaltung. Spur 3: Größenmarker GeneRuler 1 kb (Fermentas). Spur 4: *E. coli* J53-1 Azid<sup>R</sup> (ist ebenfalls die Präparation mit dem QIAGEN Plasmid Midi Kit durchlaufen); Spur 5: *E. coli* J53-1 Azid<sup>R</sup>/pOXA-48(KpnVa22038), *BspHI*-Restriktionsspaltung; Spur 6: *E. coli* J53-1 Azid<sup>R</sup>/pOXA-48a, *BspHI*-Restriktionsspaltung.

#### 4.2.12 Rolle von Porinen für eine Carbapenem-Resistenz von *bla*<sub>OXA-48</sub>-tragenden Zellen

Ziel des Versuchs war es herauszufinden, welche Bedeutung die Hauptporine OmpK35 und OmpK36 für die Carbapenem-Empfindlichkeit eines *K. pneumoniae*-Isolats im Zusammenspiel mit der Expression von *bla*<sub>OXA-48</sub> haben.

Als porindefiziente *K. pneumoniae* wurde *K. pneumoniae* C2 [136, 197] ausgewählt. Als Stamm mit intakten Porinen wurde *K. pneumoniae* ATCC 13883 herangezogen. Beide dienten als Rezipienten bei einer konjugativen Übertragung von *bla*<sub>OXA-48</sub> via pOXA-48 ausgehend von *K. pneumoniae* Va22038 als Donor.

##### 4.2.12.1 Übertragung des Plasmids pOXA-48

Die Übertragung erfolgte mittels Filter Mating (s. Kapitel 3.2.7.1.2, S. 151). Bei der Konjugation wurde ausgenutzt, dass der Donor *K. pneumoniae* Va22038 nicht auf Glucosehaltigen M9-Minimalnährböden wächst, im Gegensatz zu den beiden Rezipienten (Erkenntnisse aus Vorversuchen). Bis zu jenem Zeitpunkt war die Annahme, dass das zu übertragende Plasmid Carbapenem-Resistenz vermittelt, wenn der Rezipient über keine Hauptporine verfügt. Da dies bei dem Rezipienten *K. pneumoniae* C2 der Fall war, konnte das Plasmid im Transkonjuganden direkt mit einem Carbapenem selektiert werden, gewählt wurden 1 µg/ml Meropenem. Bei *K. pneumoniae* ATCC 13883 war die Sachlage anders, da dieser Stamm über intakte Hauptporine verfügt. Ein zurückgreifen auf das bei dem Rezipienten *E. coli* J53-1 Azid<sup>R</sup> bewährte System zur Selektion von Transkonjuganden mit 100 µg/ml Ampicillin (vgl. Kapitel 4.2.10, S. 234) konnte hier nicht eingesetzt werden, weil *K. pneumoniae* ATCC 13883 eine intrinsische Ampicillin-Resistenz durch eine chromosomal codierte SHV-1-β-Lactamase besitzt [131]. Deshalb wurde auf eine Kombination aus 100 µg/ml Ampicillin zur Selektion des Plasmids bei gleichzeitigem Zusatz von 2 µg/ml Clavulansäure zur Inhibition der SHV-1-β-Lactamase zurückgegriffen. So konnte gewährleistet werden, dass das Wachstum auf 100 µg/ml Ampicillin durch die Expression von *bla*<sub>OXA-48</sub> und nicht durch die Expression von *bla*<sub>SHV-1</sub> bedingt wird. Tabelle 4–25 stellt das Selektionssystem im Überblick dar.

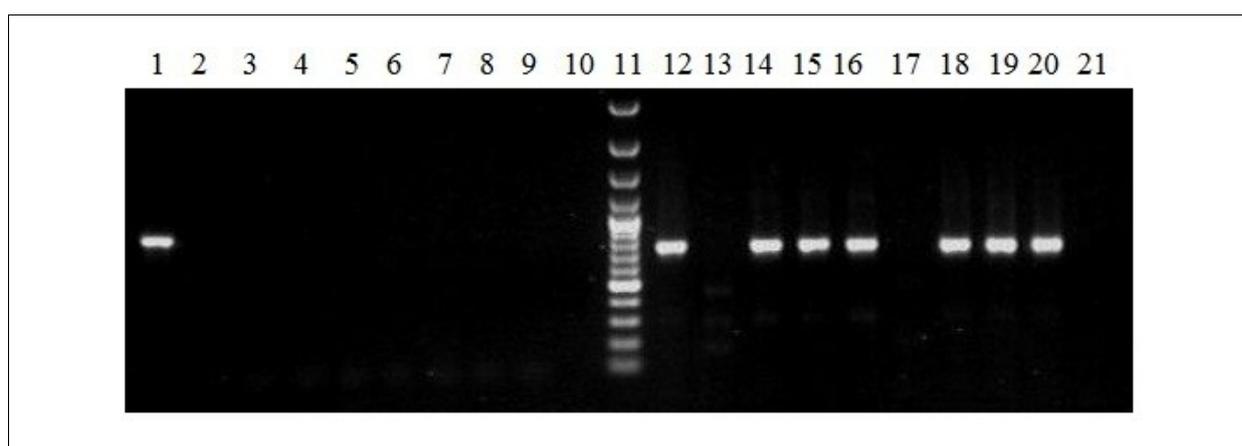
Tabelle 4–25: Selektionssystem bei konjugativer Übertragung von pOXA-48 in *K. pneumoniae*

	Rezipient 1: <i>K. pneumoniae</i> C2	Rezipient 2: <i>K. pneumoniae</i> ATCC 13883
Donor: <i>K. pneumoniae</i> Va22038	Selektionskomponente 1: M9-Minimalnährboden + Glucose Selektionskomponente 2: 1 µg/ml Meropenem	Selektionskomponente 1: M9-Minimalnährboden + Glucose Selektionskomponente 2: 100 µg/ml Ampicillin + 2 µg/ml Clavulansäure

Transkonjuganden wurden auf den entsprechenden Selektionsnährböden subkultiviert und als Glycerinkulturen angelegt (Kapitel 3.1.2, S. 97).

#### 4.2.12.2 Nachweis der Übertragung mittels PCR

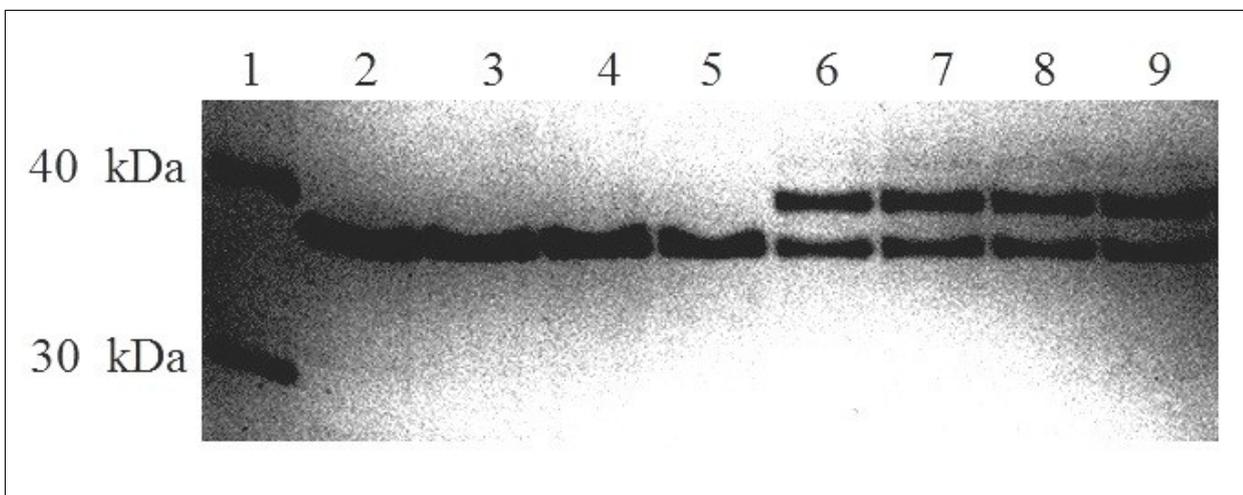
Von beiden Transkonjuganden wurden je 3 potenzielle Kandidaten einer PCR auf die Gene *bla*<sub>TEM</sub> und *bla*<sub>OXA-48</sub> unterzogen. Das Zusammenspiel aus beiden PCRs sollte der Identifikation von Transkonjuganden dienen. *K. pneumoniae* Va22038 ist als einziger Stamm innerhalb dieses experimentellen Blocks positiv für *bla*<sub>TEM</sub>, also sollten die Transkonjuganden diesbezüglich negativ ausfallen, während sie bei der PCR auf *bla*<sub>OXA-48</sub> ein Signal liefern sollten. Abbildung 4–66 zeigt das resultierende Bild der entsprechenden Agarose-Gelelektrophorese.



**Abbildung 4–66: *bla*<sub>TEM</sub>- und *bla*<sub>OXA-48</sub>-PCRs bei möglichen Transkonjuganden.** TAE-Agarosegel, 1 %. Linke Gelhälfte: PCR auf *bla*<sub>TEM</sub> (838 bp). Spur 1: Donor *K. pneumoniae* Va22038; Spur 2: Rezipient *K. pneumoniae* C2; Spuren 3 bis 5: mögliche Transkonjuganden; Spur 6: Rezipient *K. pneumoniae* ATCC 13883; Spuren 7 bis 9: mögliche Transkonjuganden; Spur 10: Negativkontrolle. Spur 11: Größenmarker GeneRuler 1 kb (Fermentas). Rechte Gelhälfte: PCR auf *bla*<sub>OXA-48</sub> (744 bp). Spur 12: Donor *K. pneumoniae* Va22038; Spur 13: Rezipient *K. pneumoniae* C2; Spuren 14 bis 16: mögliche Transkonjuganden; Spur 17: Rezipient *K. pneumoniae* ATCC 13883; Spuren 18 bis 20: mögliche Transkonjuganden; Spur 21: Negativkontrolle.

#### 4.2.12.3 Überprüfung des OMP-Profiles der Transkonjuganden

Da nicht auszuschließen war, dass sich insbesondere bei *K. pneumoniae* ATCC 13883 durch Mutationen unerwünschte Änderungen im OMP-Profil ergeben könnten – Porinverluste würden dem Stamm durch die Aufnahme von pOXA-48(KpnVa22038) voraussichtlich eine ausgeprägtere Unempfindlichkeit gegen Carbapeneme geben – wurde dieses für je zwei *K. pneumoniae* C2/pOXA-48(KpnVa22038) und *K. pneumoniae* ATCC 13883/pOXA-48(KpnVa22038) überprüft. Die Bestimmung des OMP-Profiles erfolgte mittels modifizierter Methode nach Carlone (vgl. Kapitel 3.3.1, S. 155) mit anschließender SDS-PAGE und Detektion mit Coomassie-Blue-Färbung (Kapitel 3.3.2.1, S. 157). Das Ergebnis der Untersuchung ist in Abbildung 4–67 zu sehen.



**Abbildung 4–67: OMP-Profil von Transkonjuganden.** Spur 1: PageRuler Unstained Protein Ladder (Fermentas). Spuren 2 bis 5: Transkonjuganden, *K. pneumoniae* C2/pOXA-48(KpnVa22038); Spuren 6 bis 9: Transkonjuganden, *K. pneumoniae* ATCC 13883/pOXA-48(KpnVa22038). Das Bild ist in seinem Kontrast verstärkt, damit die vergleichsweise schwache Bande von OmpK36 zur Geltung kommt.

#### 4.2.12.4 MHK-Werte verschiedener $\beta$ -Lactam-Antibiotika bei den Transkonjuganden

Es wurden die MHK-Werte von Aztreonam, Cefepim, Ceftazidim, Cefotaxim, Ertapenem, Imipenem und Meropenem erfasst (vgl. Kapitel 3.1.4, S. 98). Die Ergebnisse der Untersuchung sind in Tabelle 4–26 zusammengefasst.

Tabelle 4–26: Ergebnis der MHK-Bestimmung für *Klebsiella*-Isolate mit poXA-48(KpnVa22038) (alle Werte in µg/ml)

Stamm	Aztreonam	Cefepim	Cefotaxim	Ceftazidim	Ertapenem	Imipenem	Meropenem
<i>E. coli</i> ATCC 25922	0,125	0,03125	0,0625	0,125	0,0156	0,0625	0,03125
<i>K. pneumoniae</i> C2	0,25	0,5	0,25	0,5	0,5	0,25	0,125
<i>K. pneumoniae</i> C2/ poXA-48(KpnVa22038)	0,25	1	2	0,5	256	64	64
<i>K. pneumoniae</i> ATCC 13883	0,125	0,0625	0,125	0,25	0,0156	0,5	0,03125
<i>K. pneumoniae</i> ATCC 13883/ poXA-48(KpnVa22038)	0,125	0,25	1	0,25	2	1	0,5

## 5 Diskussion

Das Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung von  $\beta$ -Lactam-Resistenzmechanismen im Allgemeinen und Carbapenem-Resistenzmechanismen im Speziellen bei klinischen Isolaten aus der Familie der *Enterobacteriaceae*. Durch die vorliegenden, Carbapenem-resistenten Isolate ergaben sich dabei zwei Schwerpunkte.

Zum einen handelt es sich dabei um ein Kollektiv von 8 *E. cloacae*-Isolaten, bei dem neben der Untersuchung einer Carbapenem-Resistenz auch ein epidemiologischer Zusammenhang innerhalb des Kollektivs sowie ein möglicher Einfluss des Gens *ampD* auf eine chromosomal codierte AmpC- $\beta$ -Lactamase und damit auf das Resistenzprofil von Interesse war. Zum anderen wurde ein *K. pneumoniae*-Isolat hinsichtlich seiner Carbapenem-Resistenz und bezüglich des Zustands seiner äußeren Membranproteine untersucht. Das Zusammenspiel verschiedener Resistenzmechanismen war hier von besonderem Interesse.

### 5.1 Diskussion der Ergebnisse bzgl. der *E. cloacae*-Isolate

#### 5.1.1 Phänotypische Eigenschaften mit Hinweis auf das Vorkommen von MBL

Das gesamte Kollektiv unterscheidet sich nur minimal in den Empfindlichkeiten für die untersuchten Antibiotika. Anhand der MHK-Werte (Tabelle 4–3, S. 169) wird eine vollständige Resistenz gegen  $\beta$ -Lactam-Antibiotika dokumentiert.

##### 5.1.1.1 Einfluss von EDTA auf MHK-Werte von Imipenem

Metallo- $\beta$ -Lactamasen sind im Prinzip Metallo-Proteasen und verfügen über ein Zink-Atom oder zwei Zink-Atome in ihrem aktiven Zentrum. Blockiert man diese, wird das Enzym inaktiviert. Der Chelator EDTA vermag dies durch Bildung stöchiometrischer Komplexe mit dem zweiwertigen Metall-Ion Zink zu bewirken.

In dieser Arbeit wurde bei MHK-Bestimmungen von Imipenem EDTA zugesetzt, um im Falle einer Reduktion der MHK einen indirekten Hinweis auf eine MBL zu erhalten. EDTA selbst ist ab einer gewissen Konzentration toxisch, weshalb vorab die MHK von EDTA an Kontrollstämmen alleine bestimmt wurde. Dafür dienten die Angaben in Referenz [198], in der eine ähnliche Bestimmung durchgeführt wurde, als erste Orientierung für die geeignete

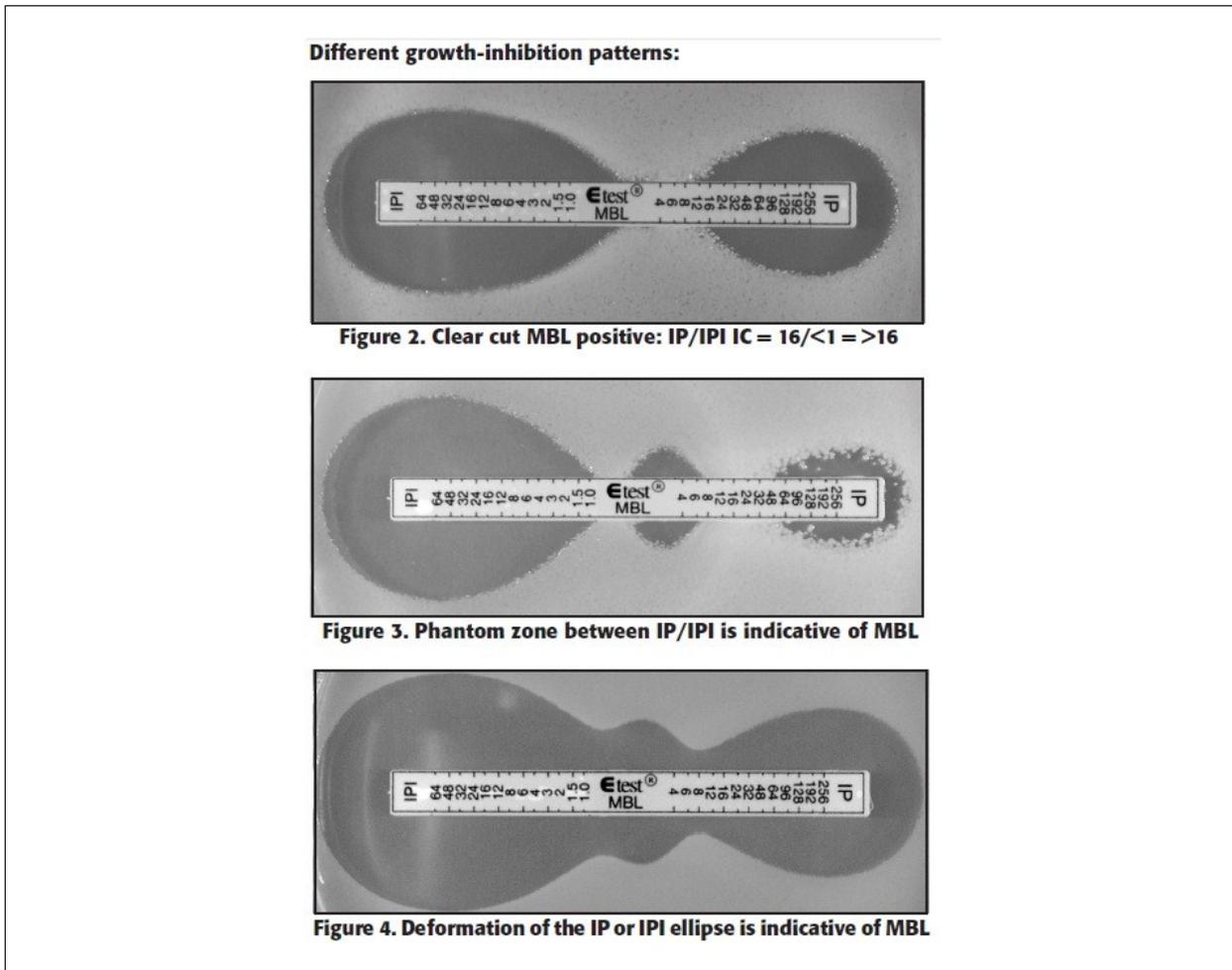
Konzentration von EDTA. In der Referenz erfolgte die Bestimmung bei *P. aeruginosa* und unter Zusatz eines weiteren Komplexbildners (1,10-Phenanthrolin), so dass eine direkte Übertragung der Resultate jedoch nicht möglich war. Bei der hiesigen MHK-Bestimmung wurden daher Konzentrationen bis 400  $\mu\text{M}$  EDTA untersucht, was sich für die Kontrollstämme als unbedenklich erwies.

Bei einer Untersuchung des EDTA-Einflusses auf die MHK von Imipenem bei den Kontrollstämmen (Tabelle 4–4, S. 172) zeigte sich bei *E. cloacae* 129/08 eine Abnahme der MHK um 5 serielle Stufen von 64  $\mu\text{g/ml}$  auf 2  $\mu\text{g/ml}$  sowohl unter Zusatz von 200  $\mu\text{M}$  als auch von 400  $\mu\text{M}$  EDTA. Dass dies aus einer Inhibition der MBL resultiert, verdeutlichten die MHK-Werte der übrigen Kontrollstämme: der Stamm *K. pneumoniae* 375/08 mit einer Carbapenemase, die keine MBL war, zeigte keine Veränderung der MHK, ebenso der per se gegen Imipenem empfindliche Referenzstamm *E. coli* ATCC 25922.

Da zwischen einem Zusatz von 200  $\mu\text{M}$  und 400  $\mu\text{M}$  EDTA kein Unterschied bei der MHK von Imipenem zu erkennen war, wurde für eine entsprechende Untersuchung der klinischen Isolate von *E. cloacae* auf den niedrigeren EDTA-Zusatz zurückgegriffen. Dabei kam es bei allen 8 Stämmen zu einer Abnahme der MHK von Imipenem um mindestens 4 Stufen (Tabelle 4–5, S. 173). Durch die Kontrollen liegt nahe, dass dies durch die Inhibition einer MBL verursacht wird.

Der Versuch belegt, dass ein EDTA-Zusatz bei MHK-Bestimmungen von Imipenem als Screening-Methode auf MBL bei *E. cloacae* geeignet ist. Erfahrungen mit auf EDTA/Carbapenem-Synergismus beruhenden Screeningmethoden auf MBL sind nach Daten von Referenz [199] neben Tests an *P. aeruginosa* und *Acinetobacter* spp. begrenzt und eine dringend zu evaluierende Angelegenheit bei Enterobakterien. Der hier durchgeführte Versuch stellt diesbezüglich einen möglichen, neuen Ansatz dar.

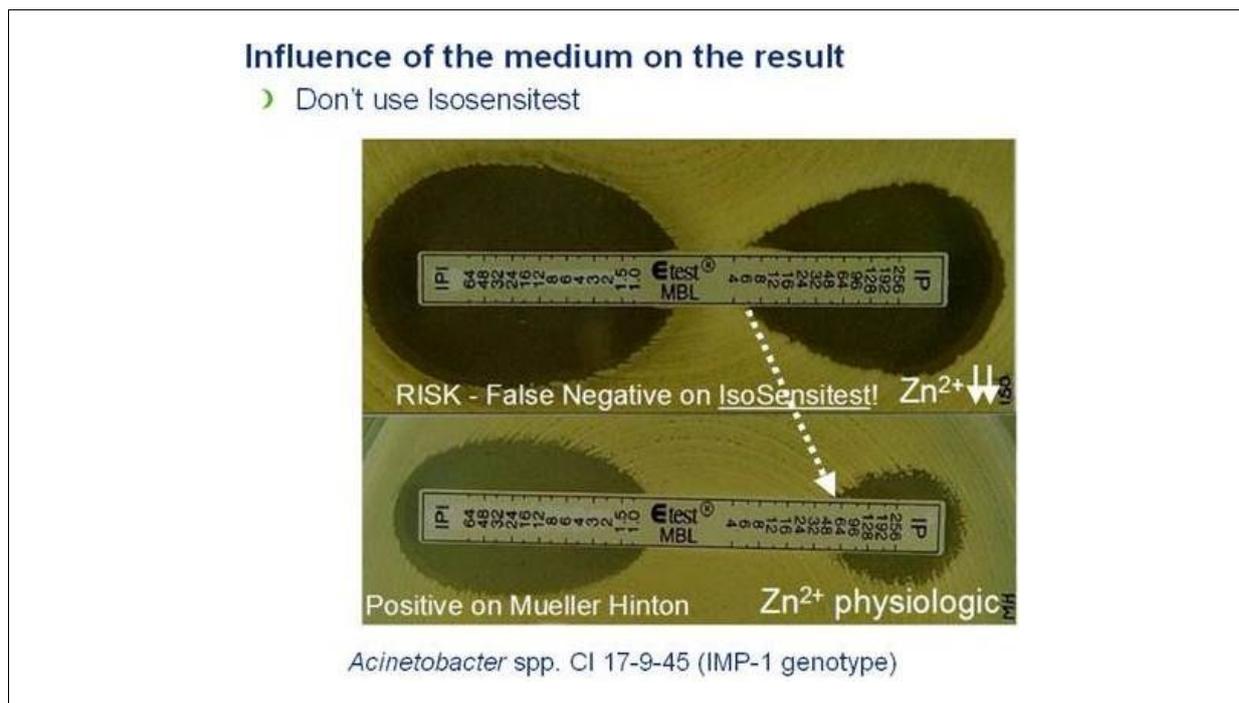
Die Ergebnisse werden durch die Resultate eines ebenfalls durchgeführten Etest<sup>®</sup> MBL bestätigt.



**Abbildung 5–1: Interpretation des Etest<sup>®</sup> MBL.** Auszug aus der betreffenden Anleitung des Herstellers bioMérieux [160]. Die Abbildungen zeigen Wachstumsinhibitions-Zonen, die die Anwesenheit einer MBL anzeigen oder auf eine MBL hinweisen.

Vergleicht man die Ergebnisse der durchgeführten MBL-Etests (Abbildung 4–4, Abbildung 4–5 und Abbildung 4–6, Seiten 177 bis 179) mit obiger Abbildung 5–1, so entspricht das erhaltene Muster einer Mischung aus den dort angegebenen Bildern 5 und 6. In der Anleitung des Herstellers [160] heißt es sinngemäß: eine Phantomzone oder eine Deformation der Ellipse zeigt eine MBL an, unabhängig vom Verhältnis IP/IPI (bei dem gilt:  $IP / IPI \geq 8$  bzw.  $\geq 3 \log_2$ -Verdünnungen zeigt MBL an). Dies ist hier der Fall.

Bedeutsam für das folgende Kapitel ist die Angabe in der Anleitung, dass die Menge bioverfügbaren Zinks in Mueller-Hinton-Agar zwischen Chargen und Marken variieren könne, was u.U. die MHK-Werte von Carbapenemen und daher den MBL-Test beeinflussen könne. Auf Nachfrage beim Hersteller wurde darauf hingewiesen, dass prinzipiell Mueller-Hinton-Agar aller Hersteller verwendet werden könne, jedoch keinesfalls Isosensitest-Agar, der grundsätzlich zu wenig Zink enthalte und deshalb zu falsch negativen Ergebnissen führe.



**Abbildung 5–2: Falsch-negativer Etest<sup>®</sup> MBL auf Isosensitestest-Agar.** Aus Korrespondenz mit bioMérieux.

### 5.1.1.2 Einfluss von Zink auf die MHK von Carbapenemen

Trotz hoher Affinität von MBL für Zink-Ionen ist eine Mindestkonzentration für eine ausreichende Aktivität der MBL erforderlich. Wiederholte MHK-Bestimmungen von Carbapenemen lieferten im Falle der klinischen Isolate von *E. cloacae* schwer reproduzierbare Werte, d.h. es traten Schwankungen bei Imipenem, Meropenem und Ertapenem um 2 serielle Verdünnungsstufen (entsprechend die Angaben in Tabelle 4–3, S. 169) auf. Die Einordnung der Empfindlichkeit der klinischen Isolate bezüglich dieser Antibiotika erfolgte grenzwertig in die Kategorie intermediär. Da dies z.T. auch den Ergebnissen der Antibiogramme des UKM (Tabelle 4–1, S. 166) widersprach, wurde der Einfluss der Zink-Konzentration auf die Empfindlichkeit der Isolate näher untersucht.

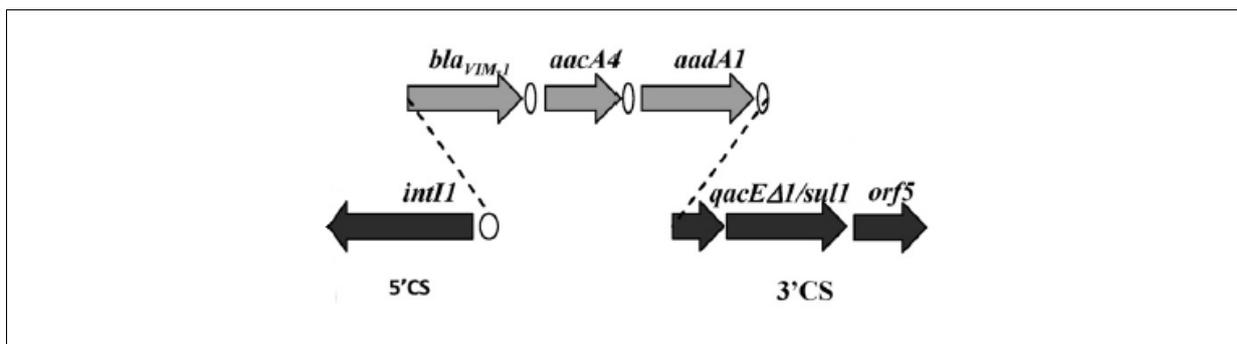
Als Orientierung für die Konzentration von Zink-Ionen bei einer MHK-Bestimmung dienten die Angaben in Referenz [200], wo eine Supplementierung mit 250 µM Zink für den phänotypischen Nachweis von MBL bei *P. aeruginosa* erfolgte. Durch die entsprechende Supplementierung zeigt sich ein signifikanter Anstieg der MHK von Imipenem um 2 bzw. 3 Stufen von 2–4 µg/ml auf 16 µg/ml. Dieser Effekt trat bei dem mitgeführten Kontrollstamm *E. coli* ATCC 25922 nicht auf, was darauf schließen lässt, dass sich eine Zink-Konzentration von 250 µM (bzw. die parallel ergänzte Sulfat-Konzentration) grundsätzlich nicht negativ

oder positiv auf die Empfindlichkeit gegen Imipenem auswirkt. Dies wäre z.B. durch Prüfung eines zu den klinischen Isolaten von *E. cloacae* isogenen Stammes, der jedoch keine MBL besitzt, zu untermauern. Ein solcher Stamm ist nicht vorhanden, jedoch wurde das die MBL codierende Gen, welches auf einem konjugierbaren Plasmid lokalisiert ist (vgl. Kapitel 4.1.6, S. 186ff), durch Transformation auf *E. coli* JM109 übertragen. Dadurch wurde ein vergleichbarer, genetischer Hintergrund (*E. coli* JM109 mit und ohne Resistenzplasmid) verfügbar. Die Bestimmung der MHK von Carbapenemen für den MBL-positiven Stamm (Tabelle 4–10, S. 194) zeigt für alle Substanzen einen Anstieg der MHK unter Zink-Supplementierung im Vergleich zu einem Test ohne Supplementierung, jedoch nur im Falle von Meropenem signifikant um 2 Stufen.

Es konnte gezeigt werden, dass ein unter Umständen bei MHK-Bestimmungen von Carbapenemen verdeckter MBL-Einfluss durch eine Supplementierung mit Zink aufgehoben werden kann. Dies kann gegebenenfalls die Einordnung eines Stammes in die Kategorien sensibel oder resistent verändern und deckt sich mit Empfehlungen bezüglich des phänotypischen Nachweises von Carbapenemasen durch den Hodge-Test (Disk-basiert), in dem durch Zink-Supplementierung falsch negativen Ergebnissen vorgebeugt werden kann [201].

### **5.1.2 PCR-Nachweise von Resistenzgenen, Identifizierung einer MBL, Aufklärung der Integron-Struktur**

Ein PCR-basierter Nachweis von  $\beta$ -Lactamase-Genen ergab nur für *bla<sub>VIM</sub>* ein positives Ergebnis (Abbildung 4–1, S. 174). Da in diesem Fall auch das Gen für *aac(6')*-Ib (*aacA4*) mit PCR nachgewiesen werden konnte (Abbildung 4–2, S. 175), war anzunehmen, dass beide Gene innerhalb eines Integrons lokalisiert vorliegen. Diese Annahme konnte ebenso bestätigt werden (Abbildung 4–17, S. 192, und Abbildung 4–18, S. 193) wie die Anwesenheit des Resistenzgens *aadA1* (Kapitel 9.1 (Anhang I), S. 305). Die weiter stromauf- und –abwärts liegenden Bereiche der Kassetten wurden im Zuge dieser Arbeit nicht untersucht; man kann jedoch annehmen, dass sie der herkömmlichen Struktur von Integrons entsprechen, da die hier verwendeten Primer, die an die konservierten Segmente von Integrons binden, ein positives Ergebnis mittels PCR ergaben. Die Anordnung der Resistenzgenkassetten (Abbildung 4–19, S. 193) und der Nachweis eines identischen Integrons wurden bereits publiziert [202].



**Abbildung 5–3: Aufbau einer publizierten, homologen Integron-Struktur.** Aus [202].

Wie später in Kapitel 5.1.4 diskutiert wird, ist das Integron auf einem konjugierbaren Plasmid lokalisiert.

Neben der genannten Resistenzgene konnte bei einem einzelnen Isolat aus dem Kollektiv, *E. cloacae* A17244/2, das Chinolon-Resistenzgen *qnrS* nachgewiesen werden (Abbildung 4–3, S. 176). Dies ist hier insbesondere aus epidemiologischer Sicht interessant und wird im folgenden Kapitel 5.1.3 näher betrachtet.

### 5.1.3 Verwandtschaft innerhalb des *E. cloacae*-Kollektivs

Die Frage, ob die 8 *E. cloacae*-Isolate verwandt oder gar klonal sind, gehört auf den ersten Blick zur grundsätzlichen Charakterisierung der Isolate, ist auf den zweiten Blick jedoch auch epidemiologisch interessant. Die *E. cloacae* waren von einer einzelnen Patientin über einen Zeitraum von 3 Wochen isoliert worden. Ein Ziel dieser Arbeit war es zu untersuchen, ob innerhalb dieses genannten Zeitraums genetische Veränderungen aufgetreten sind, durch die sich die verschiedenen Isolate unterscheiden.

Die zur Beantwortung dieser Fragestellung verwendeten Methoden beruhen darauf, genetische Unterschiede zunächst auf chromosomaler Ebene (mittels PFGE) sowie auf Ebene extrachromosomaler Moleküle anhand des Plasmidprofils zu identifizieren. Aufgrund des Ergebnisses der PFGE-Untersuchung nach Makrorestriktion scheinen die 8 Isolate nicht unterscheidbar bzw. klonal (nach *Xba*I-Restriktionsspaltung, Abbildung 4–7, S. 180) oder - nach den Kriterien von Tenover [203] - nahe verwandt zu sein (*Mss*I-Restriktionsspaltung, Abbildung 4–8, S. 181). Das Plasmidprofil zeigt nach normaler Agarose-Gelelektrophorese und Ethidiumbromid-Färbung identische Plasmide bei allen Isolaten (Kapitel 4.1.5.2.1 und 4.1.5.2.2, S. 181ff und 184ff). Ein mittels S1-PFGE erzeugtes Plasmidprofil erlaubt den Nachweis und die Größenabschätzung auch sehr großer Plasmide, was eine Agarose-

Gelelektrophorese ab einer Größe von ca. 25 kb nicht mehr leisten kann. Dabei wird die Anwesenheit eines großen Plasmids bei 5 der 8 Isolate deutlich (Abbildung 4–12, S. 186). Man kann aufgrund der Ergebnisse das Kollektiv folgendermaßen einteilen:

Tabelle 5–1: Einordnung des *E. cloacae*-Kollektivs anhand von PFGE-Bandenmustern

	<b>Muster 1</b>	<b>Muster 2 (eine Bande weniger als Muster 1)</b>	<b>Muster 3 (eine Bande mehr als Muster 1)</b>
<b>MssI-PFGE</b>	K19968, K20608, K21370, A17244/1	K21198, K21373, A17244/2	K20606
<b>S1-PFGE</b>	K19968, K20606, K20608, K21370, A17244/1	K21198, K21373, A17244/2	

Die *E. cloacae*-Isolate K19968, K20608, K21370 und A17244/1 sind klonal verwandt und bilden ein Cluster im Kollektiv, die Isolate K21198, K21373 und A17244/2 sind ebenfalls klonal untereinander verwandt und bilden ein weiteres Cluster. Das Isolat K20606 steht für sich, da es eine Bande mehr im *MssI*-PFGE-Bandenmuster zeigt. Die Cluster selbst sind nach Tenover [203] nahe miteinander verwandt. Die Stämme aus Cluster 1 einschließlich *E. cloacae* K20606 zeigen eine ca. 230 kb große Bande mehr im *MssI*-Bandenmuster als die übrigen Stämme. Es ist sehr wahrscheinlich, dass es sich dabei um ein Spaltprodukt des 325 kb-Plasmids handelt, welches nur bei diesen Stämmen vorkommt. Ist dies der Fall, wäre die chromosomale DNA identisch und auf dieser Ebene klonal mit den Stämmen aus Cluster 2. Ein interessanter Nebenaspekt ist die Tatsache, dass wiederum nur die Stämme aus Cluster 2 phänotypisch *lac*<sup>-</sup> sind, die übrigen 5 Stämme sind *lac*<sup>+</sup>.

Eine weitere Sonderstellung nimmt *E. cloacae* A17244/2 ein. Er ist der einzige Stamm des Kollektivs, bei dem mittels PCR das Gen *qnrS* und damit ein übertragbares Resistenzgen gegen Chinolone nachweisbar ist (Abbildung 4–3, S. 176). In der chronologischen Abfolge der Isolierungen sind *E. cloacae* A17244/2 und *E. cloacae* A17244/1 die beiden jüngsten Isolate des Kollektivs. Der Erwerb des Resistenzgens *qnrS* könnte also unter Umständen als Folge eines Selektionsdrucks durch Chinolontherapie angesehen werden. Tatsächlich wurde die Patientin, von der die *E. cloacae* isoliert wurden, unter anderem mit Levofloxacin behandelt (vgl. den Fallbericht in Kapitel 2.1.1.1 ab S. 67). Diese Therapie erfolgte jedoch nur bis zum Nachweis der ersten Carbapenem-resistenten *E. cloacae*-Isolate und wurde dann auf Tigecyclin umgestellt. Bis zur Isolation des *qnrS*-tragenden Stammes vergingen dann noch ca.

---

3 Wochen, in denen keine weitere Behandlung mit Chinolonen erfolgte. Diese Sachlage spricht gegen den Erwerb von *qnrS* als direkte Folge eines Selektionsdrucks durch die Chinolontherapie. Zusammenfassend ist es mit der vorliegenden Datenlage nicht möglich, Rückschlüsse auf Zusammenhänge zwischen den phänotypischen und genetischen Unterschieden bzw. Gemeinsamkeiten der Stämme und einer erfolgten Antibiotikatherapie zu ziehen.

#### 5.1.4 Identifizierung des *bla<sub>VIM</sub>*-codierenden Plasmids

Das Gen für die  $\beta$ -Lactamase *bla<sub>VIM</sub>* ist in einem Klasse-1-Integron lokalisiert. Dass dieses wiederum auf einem übertragbaren Plasmid lokalisiert ist, konnte mittels eines Konjugationsexperimentes bewiesen werden (Kapitel 4.1.6). Das Plasmid wurde aus dem Transkonjuganden reisoliert und zur Transformation von *E. coli* JM109 benutzt. Der Nachweis der Übertragung erfolgte in beiden Fällen mittels PCR auf *bla<sub>VIM</sub>* (Abbildung 4–1, S. 174). Das ca. 50 kb große Plasmid, welches in allen 8 klinischen Isolaten vorkommt, konnte so beim Donor *E. cloacae* K19968 als Träger des Integrons identifiziert werden (Abbildung 4–12, S. 186 und Kapitel 4.1.6.2). Es muss als sehr wahrscheinlich gelten, dass das Plasmid bei allen 8 *E. cloacae* identisch ist, wofür der oben erwähnte, hohe Grad der Verwandtschaft der 8 Isolate im Zusammenspiel mit dem Vorhandensein von *bla<sub>VIM</sub>* in allen 8 Stämmen spricht.

#### 5.1.5 Vollständige Aufklärung der Ursache für die $\beta$ -Lactam-Resistenz

Das Gen *bla<sub>VIM</sub>* codiert für eine Carbapenemase, was nur einen Teil des vorhandenen Resistenzprofils der 8 Stämme gegen  $\beta$ -Lactam-Antibiotika erklärt. *E. cloacae* verfügen über eine chromosomal codierte, induzierbare AmpC- $\beta$ -Lactamase, welche die Hauptursache für  $\beta$ -Lactam-Resistenz in *E. cloacae* darstellt. Dieser Effekt ist besonders ausgeprägt, wenn *ampC* entweder transient durch bestimmte  $\beta$ -Lactam-Antibiotika induziert oder durch Mutationen in z.B. *ampD* konstitutiv exprimiert wird.

Ein Funktionsverlust von *ampD* führt zu einer Akkumulation von Murein-Abbauprodukten, die ihrerseits ursächlich sind für eine AmpR-vermittelte, dereprimierte Expression von *ampC* [204] (vgl. hierzu auch Kapitel 1.2.1.1, S. 59).

In dieser Arbeit wurde ein Komplementationsassay verwendet, der eine Aussage über den Expressionsstatus von *ampD* bzw. dessen Funktionalität zulässt (Kapitel 4.1.7.2, S. 195).

Für den Komplementationstest wurde *E. coli* SN0302, ein *ampC*- und *ampD*-defekter Stamm, mit dem Plasmid pBP131-3, welches das *ampC*-Induktionssystem (also *ampC* und *ampR*) von *E. cloacae* 14 trägt, transformiert. Unter diesen Bedingungen liegt das plasmidcodierte *ampC* dereprimiert vor. Daneben wurden die *ampD*-Gene der zu untersuchenden Stämme in pBR329 kloniert, bei dem zuvor das Ampicillin-Resistenzgen durch eine gezielte Deletion ausgeschaltet wurde (Kapitel 4.1.7.2.1, S. 195). Als Kontrollen wurden das Wildtyp-Gen *ampD* von *E. cloacae* 14 sowie das defekte *ampD* von einer Cefotaxim-resistenten Mutante, selektiert aus *E. cloacae* 14 (Kapitel 4.1.7.1, S. 194), mitgeführt. Mit den resultierenden Plasmiden wurden *E. coli* SN0302/pBP131-3-Zellen transformiert und dann MHK-Werte von  $\beta$ -Lactam-Antibiotika bestimmt.

Bei defektem, kloniertem *ampD* wie bei Plasmid pHPJW12-11.5 bleibt eine Komplementation des chromosomal codierten, ebenfalls defekten *ampD* von *E. coli* SN0302 aus. Das plasmidcodierte *ampC* vom Plasmid pBP131-3 bleibt dereprimiert, was sich in einer entsprechenden Unempfindlichkeit gegen  $\beta$ -Lactam-Antibiotika widerspiegelt. Ist es intakt, wie man es bei dem klonierten *ampD* von *E. cloacae* 14 bei Plasmid pHPJW12-11.4 erwarten kann, komplementiert es das defekte *ampD* und das *ampC* wird reprimiert, der Stamm folglich empfindlich.

Die Ergebnisse der Untersuchung zeigen zunächst bezüglich der Kontrollen mit den Plasmiden pHPJW12-11.4 und pHPJW12-11.5, dass diese gewissermaßen den Rahmen abstecken zwischen Komplementation und vollständiger Dereprimierung. Interessanterweise liefern die *ampD* von den klinischen Isolaten auf den Plasmiden pHPJW12-11.1 bis -11.3 MHK-Werte, die mal zu der einen, mal zu der anderen Seite tendieren und in einem Fall dazwischen liegen. Dies hängt ab von dem jeweils getesteten  $\beta$ -Lactam-Antibiotikum.

Tabelle 5–2: Einordnung der MHK-Werte bei *E. coli* SN0302/pBP131-3/pHPJW12-11.1-3 nach *ampD*-Komplementationstest

<b>β-Lactam-Antibiotikum</b>	<b>Generation</b>	<b>Wert der MHK...</b>
<b>Ampicillin</b>	-	ist vergleichbar mit der MHK bei <i>E. coli</i> SN0302/pBP131-3/pHPJW12-11.5 ( <i>ampD</i> -Mutante)
<b>Cefalexin</b>	1	
<b>Cefoxitin</b>	2	
<b>Cefuroxim</b>	2	
<b>Cefpodoxim</b>	3	liegt zwischen den MHK-Werten bei <i>E. coli</i> SN0302/pBP131-3/pHPJW12-11.4 und <i>E. coli</i> SN0302/pBP131-3/pHPJW12-11.5 (zwischen <i>ampD</i> -Wildtyp und -Mutante)
<b>Cefotaxim</b>	3	ist vergleichbar mit der MHK bei <i>E. coli</i> SN0302/pBP131-3/pHPJW12-11.4 ( <i>ampD</i> -Wildtyp)
<b>Ceftazidim</b>	3	
<b>Cefepim</b>	4	
<b>Cefpirom</b>	4	

Es fällt auf, dass die älteren, weniger β-Lactamase-stabilen Cephalosporine (und Ampicillin) bei dem Komplementationsassay mit dem *ampD* der klinischen Isolate offenbar gut hydrolysiert werden. Dies spricht für eine ausbleibende Komplementation des defekten, chromosomal codierten *ampD*. Die neueren, stabileren Cephalosporine der 3. und 4. Generation zeigen das gegenteilige Bild: hier impliziert das Resultat eine Komplementation von *ampD*. Einzig Cefpodoxim liefert ein dazwischen liegendes Resultat.

Die Untersuchung fand, abgesehen vom jeweils klonierten *ampD*, bei völlig identischem, genetischem Hintergrund statt. Dies bedeutet, dass die Unterschiede in der MHK einzig und allein durch die verschiedenen, klonierten *ampD*-Gene und den daraus resultierenden Folgen verursacht werden. Nimmt man an, dass das Wildtyp-*ampD* tatsächlich einhundertprozentige Aktivität repräsentiert und das *ampD* von *E. cloacae* 14-M01 komplette Inaktivität, lassen die Resultate nur einen Schluss zu: das von den klinischen Isolaten isolierte und klonierte *ampD* ist nicht vollständig defekt und besitzt noch eine Restaktivität. Wenn dies der Fall ist, hängt die jeweilige MHK, die man mit den getesteten Antibiotika bestimmt, stärker vom

Induktionsvermögen und damit von der gebildeten Menge der  $\beta$ -Lactamase AmpC ab, als es bei dem *ampD* von *E. cloacae* 14-M01 der Fall ist, das ja per se ein stabil dereprimiertes *ampC* liefert und damit eine konstante Menge des Genproduktes. Der induktive Effekt ist bei dem stabil dereprimierten Phänotyp daher nivelliert. Aus diesen Schlüssen lässt sich folgern, dass die klinischen Isolate unter Umständen keinen stabil dereprimierten Phänotyp aufweisen. Dagegen spricht allerdings das MHK-Profil der Stämme, das wegen seiner umfassenden Resistenz gegen sämtliche  $\beta$ -Lactam-Antibiotika auf einen solchen Phänotyp hinweist.

Der Komplementationsversuch lässt aber auf einen verstärkt induzierbaren Phänotyp schließen. Bezüglich des relativen Induktionsvermögens von  $\beta$ -Lactam-Antibiotika gibt es sehr große Unterschiede, die auf ihrer unterschiedlichen Affinität zu bestimmten PBPs beruhen. Da die PBPs bei verschiedenen Spezies nicht identisch sind, ist es auch nicht möglich, das Induktionsvermögen für eine Spezies auf eine andere zu übertragen. Bei einigen  $\beta$ -Lactam-Antibiotika sind dennoch speziesübergreifende Tendenzen bekannt: Aminopenicilline, Cephamycine (insbesondere Cefoxitin) und Cephalosporine der ersten Generation, Imipenem und Clavulansäure gelten als starke Induktoren, die neueren Cephalosporine als zunehmend schwache Induktoren [205].

Tabelle 5–3: Inducer-Aktivitäten der verwendeten  $\beta$ -Lactam-Antibiotika

Antibiotikum	kinetische Parameter für die Aktivität von AmpC aus <i>E. cloacae</i>				Inducer-Aktivität
	<i>E. cloacae</i> ...	$k_{cat} / s^{-1}$	$K_m / \mu M$	$k_{cat} / K_m / s^{-1}\mu M^{-1}$	
Ampicillin	P99 [206]	0,74	0,4	1,85	stark [207]
	908R [206]	0,53	0,4	1,325	
Cefalexin	P99 [208]	70	10	7	stark [209]
	908R [208]	72	8,5	8,471	
Cefoxitin	P99 [208]	0,06	0,024	2,5	stark [207]
	908R [208]	0,08	0,020	4	
Cefuroxim	P99 [208]	0,05	0,016	3,125	schwach [118]
	908R [208]	0,05	0,016	3,125	
Cefpodoxim	908R [210]	ND	0,3	sinngemäß schlechtes Substrat	schwach [211]
Cefotaxim	P99 [212]	0,5	0,5 ( $K_i$ )	1	schwach [118]
	P99 [208]	0,015	0,010	1,5	
	908R [208]	0,010	0,010	1	

Antibiotikum	kinetische Parameter für die Aktivität von AmpC aus <i>E. cloacae</i>				Inducer-Aktivität
	<i>E. cloacae</i> ...	$k_{cat} / s^{-1}$	$K_m / \mu M$	$k_{cat} / K_m / s^{-1} \mu M^{-1}$	
Ceftazidim	P99 [212]	<1	20 ( $K_i$ )	<0,05	schwach [207]
	P99 [213]	0,021	2,9	0,007	
	908R [213]	2,3	3,5	0,664	
Cefepim	P99 [212]	1,0	15 ( $K_i$ )	0,067	schwach [214]
	P99 [213]	0,27	67	0,004	
	908R [213]	0,82	16	0,051	
Cefpirom	P99 [212]	1,25	67 ( $K_i$ )	0,019	schwach [215]

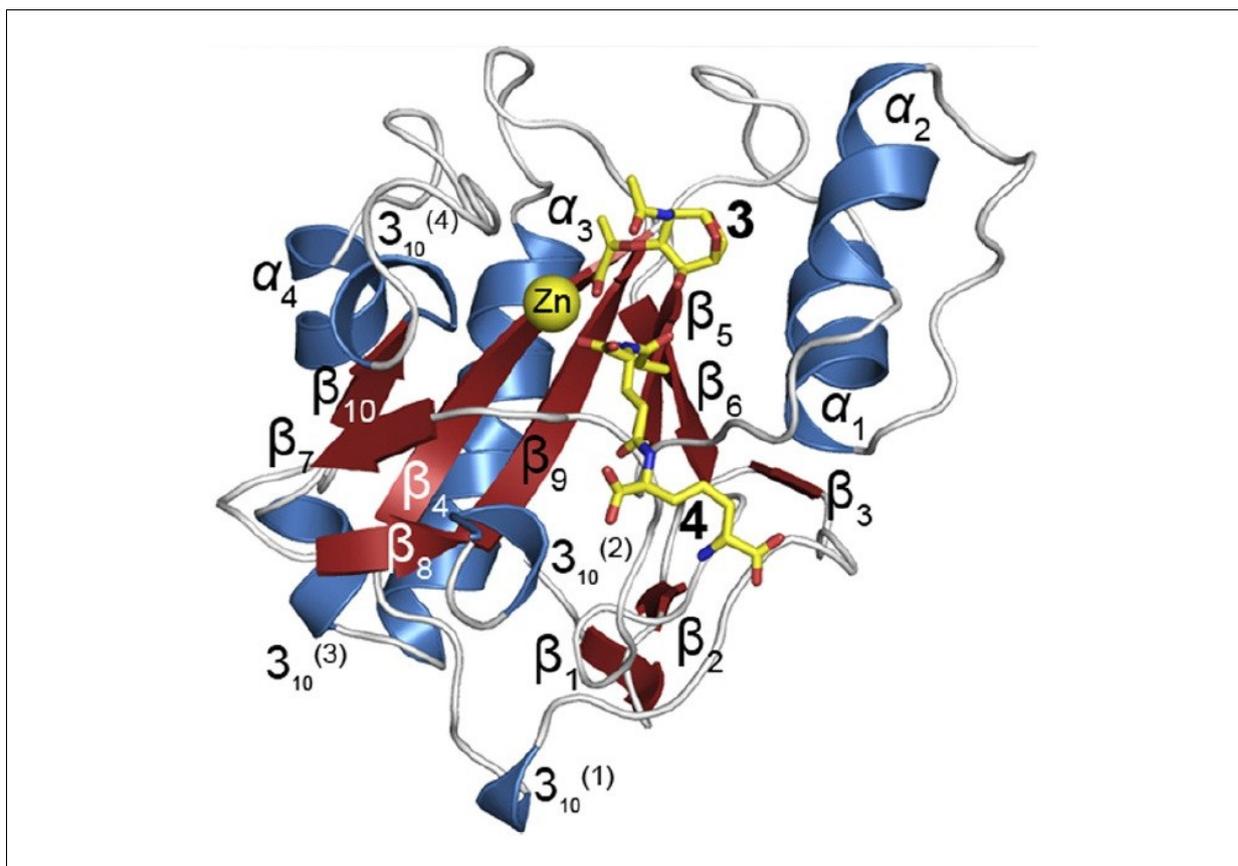
Oben wurde bereits auf die relative  $\beta$ -Lactamase-Stabilität der untersuchten  $\beta$ -Lactam-Antibiotika hingewiesen. Die Stabilität äußert sich in den beiden kinetischen Parametern  $k_{cat}$ , das die Umsatzgeschwindigkeit angibt, sowie  $K_m$ , das die Affinität zum Enzym wiedergibt. Tendenziell geht eine erhöhte Stabilität mit einer verminderten Inducer-Aktivität einher, wenn auch nicht direkt ursächlich. Es ist daher bezüglich der Ergebnisse mit den *ampD*-Genen der klinischen Isolate schwierig zu sagen, ob die labilen  $\beta$ -Lactam-Antibiotika wegen einer erhöhten Basalexpression von *ampC* eine MHK wie die defekte Mutante zeigen [118], oder ob es an einer verstärkten Induktion liegt. Gegen die erhöhte basale Expression spricht das Verhalten gegenüber Cefotaxim, denn eine MHK wie beim Wildtyp impliziert eine identische Basalexpression [118]. Der alternativen Theorie, dass der Phänotyp durch Hyperinduzierbarkeit zustande kommt, widerspricht die Höhe der MHK von Cefpodoxim, da es eine nur schwache Inducer-Aktivität besitzt und als eher schlechtes Substrat für AmpC gilt. Der MHK-Wert zeigt jedoch eine erhöhte AmpC-Bildung an, ohne zu den relativ niedrigen bzw. hohen MHK-Werten der Kontrollen zu streben. Leider fehlen für dieses Cephalosporin verlässliche kinetische Parameter eines AmpC-Enzyms aus *E. cloacae*, so dass man dessen auffälligen MHK-Wert nicht abschließend erklären kann.

Durch Sequenzierung der (identischen) *ampD*-Gene des *E. cloacae*-Kollektivs und anschließendes Alignment mit *ampD*-Genen zahlreicher, Gram-negativer Keime sollten Unregelmäßigkeiten in den Gensequenzen und damit Mutationen auf Gen- und auch Proteinebene identifiziert werden, die möglicherweise die veränderte AmpD-Aktivität erklären. Als Resultat der Analyse ist festzustellen, dass das AmpD des *E. cloacae*-Kollektivs als einzigen spezifischen Unterschied an Position 30 die Aminosäure Glutamin anstelle von

Leucin trägt, was sich bei der Mehrzahl der übrigen, alignierten AmpD-Sequenzen an dieser Position findet. Zwei im Alignment enthaltene *A. baumannii*-Stämme tragen an dieser Stelle ein Methionin (Kapitel 4.1.7.4, S. 210, und Kapitel 9.2 (Anhang II), S. 306). Da sonst keine Auffälligkeiten im Alignment vorhanden sind, ist anzunehmen, dass Glutamin an Position 30 die mutmaßliche, verminderte Aktivität von AmpD verursacht, welche ihren Anteil an dem Phänotyp des *E. cloacae*-Kollektivs haben dürfte.

Es ist noch anzumerken, dass die *ampD*-Gene ebenfalls bzgl. der DNA-Sequenzen ihres Promotorbereichs und ihrer Gen-Enden untersucht wurden. Das Gen-Ende ist deshalb von Interesse, weil dort *ampD* und *ampE* direkt nebeneinander auf dem codierenden Strang liegen. Wie für *P. aeruginosa* gezeigt werden konnte, können die Gene zur Bildung eines nicht funktionalen Fusionsproteins führen, wenn es zu einer Basendeletion am Ende von *ampD* kommt [216]. Die Untersuchungen blieben ohne auffälligen Befund, so dass die These einer funktionsmindernden Mutation *innerhalb* des Gens bestehen bleibt.

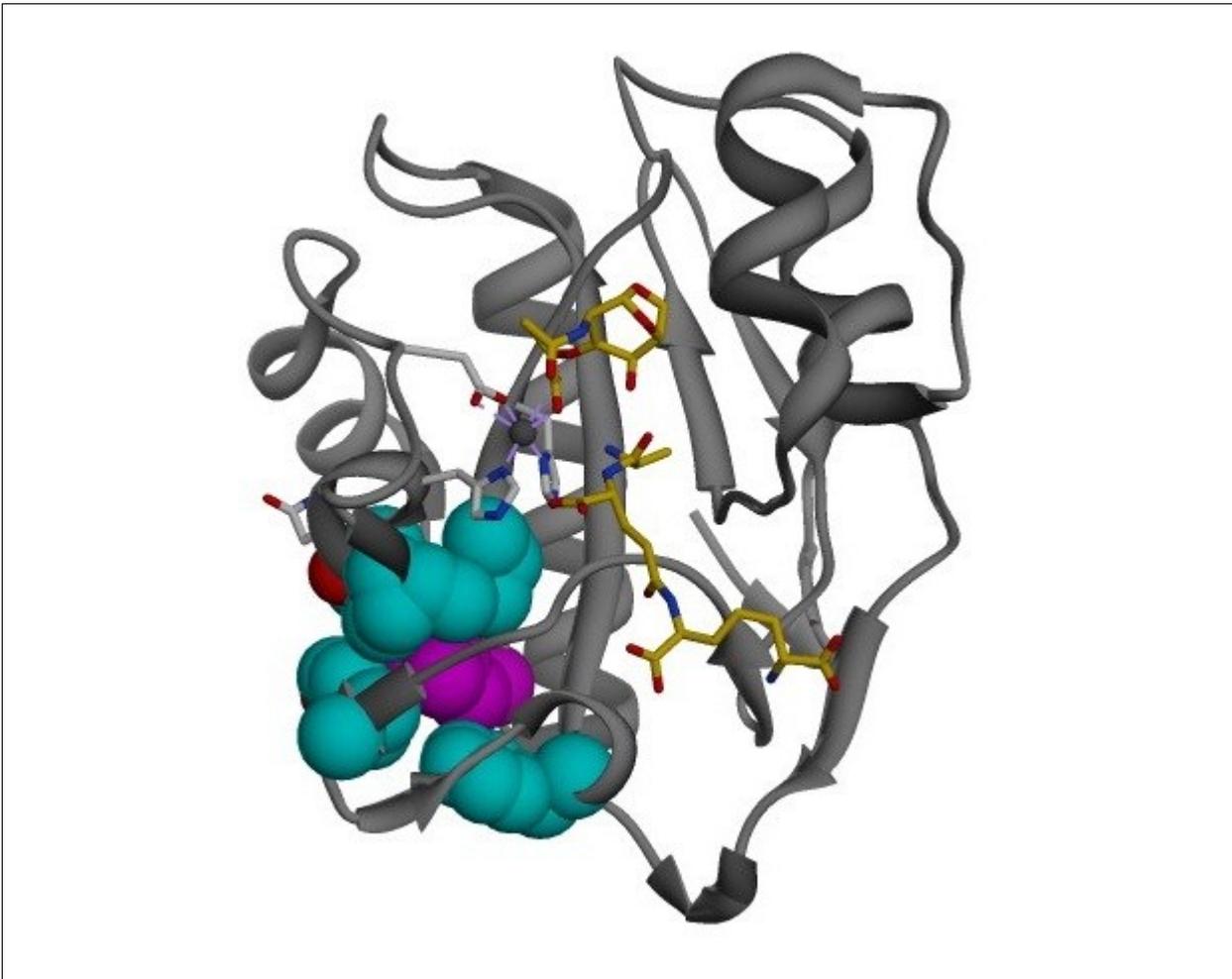
Es gibt eine publizierte NMR-Struktur von AmpD von *Citrobacter freundii* [217] sowie seit Kurzem auch eine Kristallstruktur [218] des Proteins von der gleichen Spezies. Aus letzterer wird deutlich, dass die NMR-Struktur AmpD in einer inaktiven Form abgebildet hat, die bei Züchtung von AmpD-Kristallen bei einem pH < 6 produziert wurden [218]. AmpD vermittelt seine Aktivität als Amidase über ein Zink-Atom im aktiven Zentrum, welches von den Aminosäuren Histidin-34, Histidin-154 und Aspartat-164 koordinativ fixiert wird. Die Oberfläche der Substratbindungstasche wird durch die Helix  $\alpha 2$  sowie einige Loops gebildet.



**Abbildung 5–4: Kristallstruktur von AmpD (*C. freundii*).** Aus [218]. Die Darstellung zeigt AmpD als Komplex mit den zwei Reaktionsprodukten 3 (Anhydromuraminsäure) und 4 (hier das Tripeptid L-Ala-D-Glu-meso-Dpm, wobei das Alanin mit seiner Aminogruppe vor der enzymatischen Spaltung mit der Säuregruppe der Anhydromuraminsäure als Amid verbunden war).

Leucin-30 ist lokalisiert am N-Terminus der Faltblattstruktur  $\beta_4$  in einem hydrophoben Bereich auf der Rückseite der Bindungstasche gegenüber der Helix  $\alpha_2$ . Dieser Bereich wird bei AmpD von *C. freundii* zusätzlich gebildet durch die Aminosäuren Valin-32, Tyrosin-102, Phenylalanin-111, der Methylgruppe von Threonin-152 und Isoleucin-157. Die OH-Gruppen von Tyrosin-102 und Threonin-152 sind dabei vom hydrophoben Bereich weg nach außen gerichtet und bilden mit Asparagin-150 und -156 Wasserstoffbrücken. Alle genannten Aminosäuren sind auch bei dem *E. cloacae*-Kollektiv konserviert, einzig das Asparagin-156 ist dort ein Aspartat. Dies scheint aber die Regel zu sein (vgl. Alignment in Anhang II, Kapitel 9.2, S. 306ff).

Der hydrophobe Bereich befindet sich in direkter Nachbarschaft zu den beiden Histidinresten in den Positionen 34 und 154, die das Zink-Ion im aktiven Zentrum fixieren.



**Abbildung 5–5: Hydrophober Bereich in AmpD mit Leucin-30.** Die Aminosäuren Valin-32, Tyrosin-102, Phenylalanin-111, Threonin-152 und Isoleucin-157 sind bezüglich der hydrophoben Kohlenwasserstoffanteile ihrer Seitenketten als Sphären in Cyan dargestellt, bei Leucin-30 in Magenta. Oberhalb des hydrophoben Sphären-Bereichs sind Histidin-34, Histidin-154 und Aspartat-164 zu erkennen, die das Zink-Ion fixieren. Die Reaktionsprodukte sind golden dargestellt (Protein-Datenbank ID 2Y2B [218]).

Durch die Mutation Leu30Gln findet ein Wechsel von einer hydrophoben zu einer hydrophilen Seitenkette statt [219]. Es ist denkbar, dass entweder der hydrophobe Bereich in seiner Ausdehnung verändert wird, wenn die polare Carboxamid-Gruppe in diesen Bereich eindringt, was Einfluss auf die benachbarte Zink-Bindungsregion haben mag, oder aber die polare Gruppe eher in Richtung der Peptidbindestelle des aktiven Zentrums zum Loop  $\beta_6$ - $\beta_7$  ragt, was diesen Bereich beeinflussen könnte. Beide Fälle wären eine mögliche Erklärung für eine veränderte Aktivität von AmpD.

Unklar ist jedoch, warum sich das latent defekte *ampD* bei den klinischen Isolaten viel stärker auszuwirken scheint. Dort sind deutlich höhere MHK-Werte der Cephalosporine festzustellen. Dies kann mehrere Ursachen haben, die nicht zwingend mit *ampD* zusammenhängen müssen:

defekte Porine, Mutationen in *ampC*, die das Spektrum der  $\beta$ -Lactamase erweitern (ESACs), oder auch Mutation in *ampR* (vgl. Kapitel 1.2.2.1, S. 64ff). Wie bereits oben erwähnt wurde, sind die MHK-Werte von diesem Komplementationsversuch nicht grundsätzlich auf diejenigen der *E. cloacae* übertragbar [207]. Darüber hinaus mag es weitere Resistenz- und Regulierungsmechanismen geben, die noch nicht bekannt sind (hier sei auf den Ausblick in Kapitel 5.3, S. 276, verwiesen).

## **5.2 Diskussion der Ergebnisse bzgl. *K. pneumoniae* Va22038**

### **5.2.1 Nachweis der OXA-48- $\beta$ -Lactamase und assoziierte Untersuchungen**

Bei dem Isolat *K. pneumoniae* Va22038 war bekannt, dass es Gene für SHV- und TEM- $\beta$ -Lactamasen besitzt [133]. Im Zuge dieser Arbeit konnte weiterhin ein Gen für die  $\beta$ -Lactamase OXA-48 nachgewiesen werden. Dabei diente das klinische Isolat *K. pneumoniae* 11978 als Referenz, bei dem von Poirel et al. der Erstdnachweis von *bla*<sub>OXA-48</sub> gelang [93]. Die Sequenzierung des in dieser Arbeit hergestellten Amplikons ergab im Bereich des Gens eine einhundertprozentige Homologie mit der dort publizierten Sequenz von *bla*<sub>OXA-48</sub>.

Neben der Amplifikation von Teilsequenzen des Gens selbst gelang es auch flankierende Bereiche zu amplifizieren, wie sie für *K. pneumoniae* 11978 postuliert sind. Dort ist *bla*<sub>OXA-48</sub> Teil eines zusammengesetzten Transposons mit der Bezeichnung Tn1999 [93, 159]. Ein durchgeführtes PCR-Mapping (Kapitel 4.2.5.1, S. 217) ergab, dass es sich hier um das gleiche Transposon handelt, jedoch *nicht* um das Transposon Tn1999.2.

Es ist davon auszugehen, dass das Isolat *K. pneumoniae* Va22038 das gegenwärtig in Deutschland älteste mit dem Gen *bla*<sub>OXA-48</sub> ist. In Deutschland ist die Situation bezüglich dieser  $\beta$ -Lactamase als zunehmend problematisch zu bezeichnen, ist OXA-48 doch inzwischen die am häufigsten nachgewiesene Carbapenemase [125]. Die hier gefundene Carbapenemase lief diesem Trend deutlich voraus.

Dass mit *bla*<sub>OXA-48</sub> assoziierte Infektionen ernst zu nehmen sind, zeigt ein jüngerer Fall aus den Niederlanden, bei dem in einem Rotterdamer Krankenhaus die Verbreitung einer OXA-48-positiven, multiresistenten *K. pneumoniae* zu mehreren Todesfällen führte [125].

### 5.2.2 Identifikation des *bla*<sub>OXA-48</sub>-codierenden Plasmids

Mit der Übertragung des Gens *bla*<sub>OXA-48</sub> von *K. pneumoniae* Va22038 auf *E. coli* J53-1 Azid<sup>R</sup> (4.2.10, S. 234) konnte bewiesen werden, dass dieses auf einem konjugativen Plasmid lokalisiert ist (Abbildung 4–54, S. 235). Eine weitergehende Untersuchung von Donor und Transkonjugand mittels S1-PFGE führte zur Identifikation eines ca. 62 kb großen Plasmids als putativer Träger des Carbapenemase-Gens (Abbildung 4–56, S. 236).

Bei dem Erstnachweis von *bla*<sub>OXA-48</sub> in *K. pneumoniae* 11978 sowie nachfolgenden Nachweisen in anderen klinischen Isolaten war das Gen fast immer auf einem konjugativen Plasmid lokalisiert, dessen Größe mit 70 kb angegeben wurde [93, 97, 99, 220]. Cuzon et al. postulierten, dass sich *bla*<sub>OXA-48</sub> über ein einzelnes Plasmid ausbreitet [101]. Dazu passen Untersuchungen aus Deutschland, in denen bei 20 klinischen Isolaten jeweils sehr ähnliche Plasmide gefunden wurden [221]. In aktuellen Studien wurde die Größe des Plasmids zunächst mit ca. 62 kb genauer [100] und schließlich im Falle des Stammes *K. pneumoniae* 11978 (Plasmid pOXA-48a) nach vollständiger Sequenzierung mit 61.881 bp exakt bestimmt [144]. Diese Angabe betrifft alle Publikationen, in denen dieses Plasmid als Referenz zur Größenbestimmung verwendet und dabei eine identische Größe festgestellt wurde. Daher ist denkbar, dass es sich bei allen Isolaten - auch bei dem Isolat dieser Arbeit - um das gleiche oder zumindest ein äußerst ähnliches Plasmid handelt. Legt man die Sequenz von pOXA-48a zu Grunde, ist *bla*<sub>OXA-48</sub> das einzige Resistenzgen dieses Plasmids [144].

### 5.2.3 Verwandtschaft von *K. pneumoniae* Va22038 mit *K. pneumoniae* 11978

Die Homologie der Lokalisation von *bla*<sub>OXA-48</sub> aus *K. pneumoniae* 11978 und aus *K. pneumoniae* Va22038 gab Anlass, nach weiteren Homologien auf chromosomaler Ebene zu suchen, um den Verwandtschaftsgrad beider Isolate zu analysieren. Dies ist besonders aus epidemiologischer Sicht interessant. *K. pneumoniae* 11978, isoliert im September 2001 in Istanbul in der Türkei [93], gilt als ältestes Isolat, bei dem *bla*<sub>OXA-48</sub> nachgewiesen wurde. *K. pneumoniae* Va22038 wurde im Juli 2004 in Hamburg isoliert. Eine mögliche Verwandtschaft würde auf eine Verbreitung des Isolats bzw. dessen Nachkommen von der Türkei nach Deutschland hindeuten.

Ähnlichkeiten weisen zunächst die IEF-Profile von  $\beta$ -Lactamase-Rohextrakten auf (Abbildung 4–57, S. 238). Ein nachfolgend durchgeführter Bioassay zur Detektion der OXA-48-Carbapenemase ergibt, dass das Enzym bei beiden Isolaten den identischen

---

isoelektrischen Punkt aufweist (Abbildung 4–58, S. 239). Diese Methode lässt sich beliebig an das jeweilige Substratprofil bestimmter  $\beta$ -Lactamasen anpassen und auch mit  $\beta$ -Lactamase-Inhibitoren kombinieren, um dadurch nur bestimmte  $\beta$ -Lactamasen aus einem Gesamtextrakt zu charakterisieren - ein Vorteil gegenüber Nitrocefin, das von den meisten  $\beta$ -Lactamasen umgesetzt werden kann. Dies impliziert einen weiteren Nachteil des Nitrocefins: bei  $\beta$ -Lactamase-Extrakten aus klinischen Isolaten, die zwei oder mehr dieser Enzyme bilden, wird man für jedes Enzym jeweils unterschiedliche Mengen erhalten; dies gepaart mit der jeweiligen Umsatzgeschwindigkeit und Spezifität für Nitrocefin als Substrat führt dazu, dass bestimmte Banden im IEF-Gel viel schneller sichtbar werden als andere. Eine direkte Exposition des IEF-Gel mit einer Nitrocefin-Lösung kommt daher nicht in Frage.

Die hier angewendete Technik mit einem Filterpapier als Farbstoffträger gewährleistet zwar eine dauerhafte Exposition zum IEF-Gel und auch eine gewisse Fixierung des umgesetzten Farbstoffs, lässt diesen aber langfristig dennoch in Bereiche diffundieren, wo eventuell noch weitere Banden entstehen können. Man erhält dabei unter Umständen einen Hintergrund, der eine vollständige Auswertung schwierig macht. Kontinuierliche Bildaufnahmen über den zeitlichen Verlauf des Anfärbe-Prozesses hinweg, wie in Abbildung 4–57 (S. 238) dargestellt, können dies möglicherweise verhindern. Versuche im Rahmen dieser Arbeit, den Farbstoff im Agar zu fixieren und dadurch eine Diffusion des Produktes zu minimieren, waren nicht erfolgreich und darüber hinaus hinsichtlich des Nitrocefin-Verbrauchs auch deutlich unökonomischer.

Der elegantere Weg über den Bioassay, der allerdings auch mehr Zeit zur Durchführung benötigt, wurde in dieser Arbeit nicht weiter eingesetzt. Er bedarf auch noch weiterer Optimierung, etwa bezüglich der Inkubationszeiten, um distinkte, gut unterscheidbare Bakterien-Kolonien zu erhalten. Eine Verwendung von Ampicillin ist dagegen preiswerter und ermöglicht bei entsprechender Optimierung die parallele Detektion mehrerer  $\beta$ -Lactamasen eines Extraktes, wie man es auch mit Nitrocefin anstrebt.

Zur weiteren Identifizierung genetischer Gemeinsamkeiten der *Klebsiella*-Isolate wurden PCRs zum Nachweis von *bla*<sub>OXA-9</sub> und *bla*<sub>OXA-47</sub> durchgeführt. Beide Gene wurden bei *K. pneumoniae* 11978 auf Plasmiden gefunden, *bla*<sub>OXA-9</sub> in einer inaktiven Form [93]. *K. pneumoniae* Va22038 war in PCRs für *bla*<sub>OXA-9</sub> positiv (Abbildung 4–39, S. 216), für *bla*<sub>OXA-47</sub> (Abbildung 4–37, S. 215) jedoch negativ.

Damit konnte jedoch die Frage, ob es sich bei beiden Isolaten um einen Klon handeln könnte,

---

nicht direkt beantwortet werden. Zu klären galt es weiterhin, ob es einen anders gearteten Grad der Verwandtschaft gibt. Um dies zu untersuchen, wurden Makrorestriktionsanalysen der Gesamt-DNA mit anschließender PFGE-Analyse durchgeführt. Die Ergebnisse (zusammengefasst in Tabelle 5–4) zeigen bei einer Restriktionsspaltung der DNA der beiden Isolate mit *Xba*I insgesamt 13 unterschiedliche Banden für den untersuchten Größenbereich. Bei Verwendung von *Mss*I sind es 8 unterschiedliche Banden.

Tabelle 5–4: Auswertung des PFGE-Vergleichs der *Klebsiella*-Isolate

RE	Anzahl d. Banden bei <i>K. pneumoniae...</i>		Unterschiede	genet. Ereignisse	Gemeinsamkeiten	Dice- Koeff.
	Va22038	11978				
<i>Xba</i> I	18	21	13	≥4	13	0,67
<i>Mss</i> I	34	32	8	≥2	29	0,88

Es ist nicht legitim, hier, wie bei dem *E. cloacae*-Kollektiv, die Kriterien von Tenover et al. [203] für die Interpretation der Bandenmuster und damit den Grad der Verwandtschaft zu verwenden, denn diese Kriterien sind ausschließlich für Keime eines zeitlich begrenzten Ausbruchs gedacht. Zeitlich begrenzt heißt in diesem Zusammenhang 1-3 Monate zwischen den Isolierungszeitpunkten. Die Autoren erwähnen explizit, dass die Anwendung ihrer Richtlinie nicht adäquat ist, wenn die untersuchten Stämme über einen weiter gefassten Zeitraum, z.B. ein Jahr oder länger, isoliert wurden. Zwischen den Zeitpunkten der Isolierung der hier verglichenen Stämme liegen jedoch 2 Jahre und 10 Monate. In diesem Zeitraum ist es als äußerst unwahrscheinlich anzusehen, dass sich ein Stamm nicht weitergehend verändert, als dies die Kriterien von Tenover et al. berücksichtigen.

Im vorliegenden Fall ist daher eine abweichende Interpretation der Bandenmuster vorzunehmen. In Bezug auf die Kriterien nach Tenover erscheint es gerechtfertigt, für Isolate, die in einem größeren zeitlichen Abstand isoliert wurden, weniger stringente Kriterien anzulegen. Eine eher in der Computer-gestützten Auswertung von PFGE-Bandenmustern angewandte Größe ist der Dice-Koeffizient, der hier auch in der Tabelle 5–4 aufgeführt ist. Der Dice-Koeffizient ist definiert als die Anzahl gemeinsamer Banden zweier Stämme bezogen auf die Gesamtzahl:

---

$$\text{Dice-Koeffizient: } S_D = \frac{2N_{AB}}{N_A + N_B} \quad [222]$$

Dabei ist  $N_{AB}$  die Anzahl der gemeinsamen Banden und  $N_A$  bzw.  $N_B$  die Gesamtanzahl der Banden des jeweiligen Stammes. Je näher der resultierende Wert 1 ist, desto ähnlicher sind sich die untersuchten Bandenmuster. Der Dice-Koeffizient kann also auch als eine Prozentangabe für die Ähnlichkeit der Muster angesehen werden. Nach *Xba*I-Restriktionsspaltung zeigen die Stämme eine Ähnlichkeit von 67 %, nach *Mss*I von 88 %. In Cut-Off-Werte, nach denen man sagen kann, dass Stämme nicht mehr verwandt sind, fließen als Variablen die Methode (d.h. vor allem PFGE-Parameter und das verwendete Restriktionsenzym), die Spezies und der zeitliche Abstand zwischen den Isolierungen der untersuchten Keime ein. Der für eine Auswertung notwendige Validierungsprozess konnte in dieser Arbeit aus praktischen wie zeitlichen Gründen nicht geleistet werden. Dennoch erscheint objektiv betrachtet die Ähnlichkeit für zwei Isolate aus unterschiedlichen Ländern mit einem zeitlichen Abstand ihrer Isolationen von fast 3 Jahren erstaunlich hoch. Van Belkum et al. empfehlen, bei der Auswertung von PFGE-Bandenmustern nicht zu starr nach Richtlinien vorzugehen, sondern den Kontext weiterer Informationen zu berücksichtigen [223].

Damit erscheint eine Verwandtschaft der beiden Isolate äußerst wahrscheinlich, denn ein dementsprechendes Resultat liefert auch das Plasmidprofil mittels S1-PFGE (vgl. Abbildung 4–61, S. 242). Diese zeigt bei beiden Isolaten jeweils 3 Plasmide, wobei jeweils 2 eine offensichtlich identische Größe aufweisen (ca. 62 kb und ca. 100 kb). Das jeweils größte, detektierte Plasmid ist in seiner Größe unterschiedlich (ca. 315 kb bei *K. pneumoniae* Va22038 und ca. 390 kb bei *K. pneumoniae* 11978). Das Ergebnis passt zu der These, dass die beiden Stämme nicht klonal (wobei man ein identisches Plasmidprofil erwartet hätte), wohl aber verwandt sind.

Hinsichtlich der Lokalisation des Gens *bla*<sub>OXA-48</sub> wurden weitere Untersuchungen vorgenommen. Wie bereits erwähnt konnte durch Konjugationsversuche hier nicht nur gezeigt werden, dass *bla*<sub>OXA-48</sub> bei dem Isolat *K. pneumoniae* Va22038 - analog zu dem Isolat *K. pneumoniae* 11978 - auf einem übertragbaren Plasmid codiert vorliegt, sondern auch, dass es sich bei beiden Isolaten um identisch große Plasmide handelt (Abbildung 4–61, S. 242). Ein analoger Konjugationsversuch mit *K. pneumoniae* 11978 verlief unterschiedslos zu demjenigen mit *K. pneumoniae* Va22038 (Kapitel 4.2.11.3, S. 242). Reisolierung der

---

Plasmide aus den Transkonjuganden und ihre Spaltung mit Restriktionsenzymen ergab nach Agarose-Gelelektrophorese identische Bandenmuster (Abbildung 4–65, S. 245), so dass man mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit davon ausgehen kann, dass sie zu großen Teilen homolog sind.

Insgesamt ergibt sich aus den durchgeführten PCR-Analysen, den Sequenzierungen, der PFGE-Analyse sowie der Untersuchung des Plasmidprofils mittels S1-PFGE ein starker Verdacht auf eine mögliche Verwandtschaft der Isolate *K. pneumoniae* Va22038 und 11978. Die Patientendaten des Hamburger Isolates lassen keine Rückschlüsse auf einen Kontakt des Patienten zum mutmaßlichen Ursprungsherd und vorherrschendem Lokalisationsort von *bla*<sub>OXA-48</sub>, der Türkei, zu. Somit bleibt offen, wie sich der (seinerzeit vermeintlich einzelne) Stamm verbreitet haben mag.

### 5.2.4 OMP-Profil

Die Erstellung eines Profils der äußeren Membranproteine zeigt nach der modifizierten Methode von Carlone [178] unter den gewählten Bedingungen keine Banden für OmpK35 und OmpK36 in der SDS-PAGE. Dies legt nahe, dass die entsprechenden Proteine nicht in der äußeren Membran vorhanden sind – sei es, weil die entsprechenden Gene nicht oder in einem zu geringen Maße für die Detektionsgrenze dieser Methode exprimiert werden, oder weil wegen einer Mutation der entsprechenden Gene die Proteine so verändert sind, dass deren Einbau in die äußere Membran nicht erfolgt. Beide Ursachen sind bei *K. pneumoniae* bekannt [51].

Um die Ursache für das Fehlen der Hauptporine aufzuklären, wurden die Gene *ompK35* und *ompK36* sowie stromaufwärts und –abwärts liegende, intergenische Bereiche sequenziert und mit der publizierten und als repräsentativ anzusehenden Sequenz des klinischen Isolats *K. pneumoniae* NVT2001 [195] verglichen (Anhang IV, Kapitel 9.4, S. 325).

Für *ompK35* wurde dabei im stromaufwärts liegenden Bereich der CDS eine 38 bp lange Deletion gefunden. Sie umfasst dabei 2 Basen der OmpR-Bindestelle F2, die gesamte OmpR-Bindestelle F3 sowie die -35-Region des *ompK35*-Promotors.

Der letztgenannte Punkt kann als Ursache für eine fehlende Transkription des Gens angesehen werden. Daneben zeigte die Sequenz des Gens selbst, neben zwei stillen Mutationen (T207C: das Triplet ATT wird zu ATC, die codierte Aminosäure bleibt Isoleucin; und C786T: das

---

Triplet GCC wird zu GCT, die codierte Aminosäure bleibt Alanin), keine weiteren, nennenswerten Auffälligkeiten.

Bei *ompK36* zeigte die Sequenzierung im stromaufwärts liegenden Bereich ebenfalls eine Veränderung im Vergleich zu der Referenzsequenz. Hier wurde eine 768 bp lange Insertion gefunden, die homolog ist zu ISKpn14 [224] (vgl. Genbank-ID GU553923 und CP000649). Die Insertionssequenz gehört damit zur IS1-Familie und zeigt deren typische Merkmale: die Insertionssequenz hat an beiden Flanken 23 bp lange, imperfekte inverted repeats [225]. Diese wiederum werden flankiert von 9 bp langen, duplizierten direct repeats der Zielsequenz [225, 226], welche also zum ursprünglichen, stromaufwärts liegenden, intergenischen Bereich von *ompK36* gehören. Die IS ist so platziert, dass sie genau zwischen der CDS von *ompK36* mit deren Ribosom-Bindestelle und dem Promotor von *ompK36* lokalisiert ist. Der Abstand zwischen Promotor und Startcodon hat sich also um  $768 \text{ bp} + 9 \text{ bp} = 777 \text{ bp}$  vergrößert.

Insertionssequenzen der Familie IS1 haben bei ihrem linken inverted repeat (IRL) einen inwärts gerichteten, schwachen Promotor (pIRL), der die Transkription der für die Transposition erforderlichen Gene steuert [225]. Darüber hinaus sind sowohl im IRL als auch im rechten inverted repeat (IRR) auswärts gerichtete -35-Regionen vorhanden [227], die, bei entsprechend günstiger Platzierung einer solchen Insertionssequenz vor eine -10-Region eines bestehenden Promotors, zur Bildung eines relativ stärkeren Hybridpromotors führen können. Dieser bedingt dann eine relativ verstärkte Expression des betreffenden Gens [227].

Im hiesigen Fall ist die IRL-Flanke die *ompK36* zugewandte Seite der Insertionssequenz. Da die Insertion des ISKpn14-Homologs aber nicht vor, sondern hinter der -10-Region des *ompK36*-Promotors erfolgt ist, kam es dabei nicht zur Bildung eines Hybridpromotors. Stattdessen hat die Insertionssequenz den Promotor von *ompK36* inaktiviert, was die Ursache für die fehlende Expression des Gens sein dürfte. Die Inaktivierung von Promotoren durch Insertion von IS-Elementen ist ein bekanntes Phänomen [228].

IS1 hat die Eigenschaft, bevorzugt in A+T-reiche Sequenzabschnitte zu inserieren. Eine weitergehende Sequenzspezifität wird diskutiert, denn häufig findet man homologe Bereiche von 6 bis 7 bp zwischen den äußeren 7 bp der inverted repeats und der angrenzenden DNA-Sequenz - entweder in dem bei der Insertion duplizierten Bereich der direct repeats, oder auch weiter außerhalb liegend [229, 230]. Dies ist auch hier der Fall (im Folgenden türkis unterlegt ist IRL, dort eingerahmt die letzten 7 bp, gelb unterlegt DR, stromabwärts eingerahmt 6 homologe Basen im Zielgebiet der Insertion):

---

```
TACACTAAAT CAGCAAGTTG GTAGCATCAC CGACTGATTA GAAGGGTAAT CAGTAAGCAG TGGCATAATA
ATGTGATTTA GTCGTTCAAC CATCGTAGTG GCTGACTAAT CTTCCCATTA GTCATTGTC ACCGTATTAT
← ISKpn14          IRL          DR
```

Bezüglich der Poringene kann zusammenfassend festgestellt werden, dass sowohl bei *ompK35* als auch *ompK36* Mutationen im Promotorbereich der Gene dazu geführt haben, dass die Bildung der entsprechenden Porine ausbleibt.

Dieser Phänotyp bedeutet für Isolate von *Klebsiella* hinsichtlich der Empfindlichkeit gegen  $\beta$ -Lactam-Antibiotika einen Vorteil [136], da die Antibiotika am Erreichen ihrer Zielstrukturen gehindert werden (vgl. Kapitel 1.1.3.2.2, S. 46).

### 5.2.5 Zusammenspiel zwischen Carbapenemresistenz und Porindefizienz

Die defekten Porine von *K. pneumoniae* Va22038 wurden durch Transformation mit entsprechenden Plasmiden komplementiert, um den Effekt auf die Empfindlichkeit gegen Carbapeneme zu untersuchen (Kapitel 4.2.8, S. 221). Zur Selektion der Plasmide mussten diese zuvor eine Gentamicin-Resistenzkassette erhalten (Kapitel 4.2.8.1, S. 223). Eine erfolgreiche Komplementation wurde über den Nachweis der Porine mittels SDS-PAGE erbracht (Abbildung 4–43, S. 220). Nach Transformation mit komplementierenden Poringenen wurden die MHK-Werte von Carbapenemen bestimmt (Kapitel 4.2.8.2, S. 229, und Tabelle 4–23, S. 230). Als Kontrolle für dieses Experiment wurde zunächst *K. pneumoniae* ATCC 13883 mit beiden Plasmiden parallel transformiert. Dieser Stamm mit intakten Porinen zeigt eventuelle Auswirkungen auf die Empfindlichkeit gegen Antibiotika durch die Präsenz der Plasmide an. Dies ist nicht abwegig, da eine unkontrollierte Bildung von Porinen für die Fitness und Empfindlichkeit eines Stammes sicherlich mehr Nach- als Vorteile birgt. Das Ergebnis des Versuchs zeigt, dass die Komplementation eines der beiden Porine ausreicht, um eine Empfindlichkeit gegen Carbapeneme vollständig zu rekonstituieren. Die Kontrolle zeigt teilweise ebenfalls eine gewisse Erhöhung der Empfindlichkeit an, die gegenüber dem Effekt bei *K. pneumoniae* Va22038 jedoch vernachlässigbar gering ausfällt.

Tabelle 5–5: Empfindlichkeitszunahme gg. Carbapeneme durch *ompK*-Komplementation (der angegebene Faktor ergibt sich aus  $MHK_{\text{unkomplimentiert}} / MHK_{\text{komplimentiert}}$ )

	Abnahme der MHK um Faktor...			
in trans:	<i>ompK35</i>		<i>ompK36</i>	
<i>K. pneumoniae</i>	Va22038	ATCC 13883	Va22038	ATCC 13883
<b>Ertapenem</b>	128	2	32	2
<b>Imipenem</b>	16	2	16	1 (keine)
<b>Meropenem</b>	64	2	32	1 (keine)

Man kann daraus schließen, dass die Wirkung der Carbapenemase OXA-48 immer erst dann besonders zum Tragen kommt, wenn die Wirtszelle eine reduzierte Permeabilität für  $\beta$ -Lactam-Antibiotika aufweist. Dazu passt der Befund, dass der Transkonjugand mit dem *bla*<sub>OXA-48</sub> codierenden Plasmid, ein *E. coli* mit intakten Porinen, zwar eine Zunahme der MHK-Werte von Carbapenemen zeigt, jedoch unterhalb der Einstufung für klinische Resistenz bleibt (Tabelle 4–24, S. 236):

Tabelle 5–6: Empfindlichkeitsabnahme gg. Carbapeneme durch *bla*<sub>OXA-48</sub> (*E. coli* J53-1 Azid<sup>R</sup> gegenüber *E. coli* J53-1 Azid<sup>R</sup>/pOXA-48(KpnVa22038))

	Zunahme der MHK um Faktor...	MHK (Transkonjugand)
<b>Ertapenem</b>	64	1 $\mu\text{g/ml}$
<b>Imipenem</b>	4	0,5 $\mu\text{g/ml}$
<b>Meropenem</b>	8	0,25 $\mu\text{g/ml}$

Dieses Ergebnis erklärt auch, warum man bei einem Konjugationsexperiment zur Übertragung von *bla*<sub>OXA-48</sub>, wie es in dieser Arbeit durchgeführt wurde, eher auf 100  $\mu\text{g/ml}$  Ampicillin als auf ein Carbapenem zurückgreifen muss (MHK von Ampicillin des Transkonjuganden: 1024  $\mu\text{g/ml}$ ). Warum dann ausschließlich *bla*<sub>OXA-48</sub> und keines der anderen  $\beta$ -Lactamase-Gene übertragen wird, ist am Einfachsten dadurch zu erklären, dass diese nicht auf konjugierbaren Plasmiden codiert vorliegen.

Die beiden Befunde bezüglich *bla*<sub>OXA-48</sub> - Zunahme der Carbapenem-Empfindlichkeit bei Komplementation der Porine in einem diesbezüglich defizienten Stamm sowie Abnahme der Empfindlichkeit bei einem Transkonjuganden, der jedoch noch immer im sensiblen Bereich bleibt - wurden in einem weiteren Versuch näher untersucht. Hier wurde das *bla*<sub>OXA-48</sub> codierende Plasmid in zwei *Klebsiella*-Stämme übertragen, und zwar in einen mit intakten und einen mit defekten Porinen (Kapitel 4.2.12, S. 246). Die Übertragung wurde durch PCR-Analyse belegt (Abbildung 4–66, S. 247). Denkbare Mutationen in den intakten Poringenen bei *K. pneumoniae* ATCC 13883, die für den Stamm unter Exposition zu  $\beta$ -Lactam-Antibiotika einen Vorteil darstellen würden, wurden durch OMP-Profile nach erfolgter Übertragung ausgeschlossen (Abbildung 4–67, S. 248).

Bei den MHK-Bestimmungen von Carbapenemen bei den Transkonjuganden (Tabelle 4–26, S. 249) wurden die Ergebnisse aus den vorherigen Versuchen untermauert.

Tabelle 5–7: Einfluss der Porine auf Empfindlichkeitsabnahme für Carbapeneme durch *bla*<sub>OXA-48</sub> (*K. pneumoniae* C2 gegenüber C2/pOXA-48(KpnVa22038) und ATCC 13883 gegenüber ATCC 13883/pOXA-48(KpnVa22038))

	<i>K. pneumoniae</i> C2 ( <i>ompK35/36</i> )		<i>K. pneumoniae</i> ATCC 13883 ( <i>ompK35/36</i> <sup>+</sup> )	
	Zunahme der MHK um Faktor...	MHK (Transkonjugand)	Zunahme der MHK um Faktor...	MHK (Transkonjugand)
<b>Ertapenem</b>	512	256 $\mu$ g/ml	128	2 $\mu$ g/ml
<b>Imipenem</b>	256	64 $\mu$ g/ml	2	1 $\mu$ g/ml
<b>Meropenem</b>	512	64 $\mu$ g/ml	16	0,5 $\mu$ g/ml

Die Auswirkungen von *bla*<sub>OXA-48</sub> bei dem porindefizienten Stamm *K. pneumoniae* C2 sind deutlich. Die MHK-Werte der Carbapeneme nehmen signifikant zu und der Stamm wird resistent.

Bei der *ompK35/36*-positiven *K. pneumoniae* ATCC 13883 lässt sich eine zu *E. coli* J53-1 Azid<sup>R</sup> analoge Veränderung der MHK-Werte feststellen. Die Unempfindlichkeit nimmt zu, der Stamm bleibt jedoch im klinisch sensiblen Bereich. Die relativ stärkste Zunahme ist in

beiden Fällen bei Ertapenem zu sehen, die relativ schwächste bei Meropenem. Imipenem liegt in beiden Fällen dazwischen.

Tabelle 5–8: Carbapenem-MHK-Werte von Rezipienten mit intakten Porinen mit / ohne *bla*<sub>OXA-48</sub> (*E. coli* J53-1 Azid<sup>R</sup> gegenüber J53-1 Azid<sup>R</sup>/pOXA-48(KpnVa22038) und ATCC 13883 gegenüber ATCC 13883/ pOXA-48(KpnVa22038; alle Werte in µg/ml))

	<i>E. coli</i> J53-1 Azid <sup>R</sup>		<i>K. pneumoniae</i> ATCC 13883	
	MHK (Rezipient)	MHK (Transkonjugand)	MHK (Rezipient)	MHK (Transkonjugand)
<b>Ertapenem</b>	0,0156	1	0,0156	2
<b>Imipenem</b>	0,125	0,5	0,5	1
<b>Meropenem</b>	0,03125	0,25	0,03125	0,5

Durch die Versuche konnte gezeigt werden, dass erst ein Zusammenspiel aus der Expression der Carbapenemase OXA-48 mit der Inaktivierung von mindestens einem der Hauptporine bei *Klebsiella pneumoniae* zu einer ausgeprägten Carbapenemresistenz führt. In anderen Publikationen wurde bereits ein entsprechendes Verhalten postuliert, denn der *in vitro*-Befund eines Carbapenem-empfindlichen Transkonjuganden mit *bla*<sub>OXA-48</sub> ist häufig, wobei als Rezipient dabei üblicherweise nicht auf einen porindefizienten Stamm zurückgegriffen wird [231]. Die hier erhaltenen Resultate belegen diesen Zusammenhang und dürften sich auf andere Enterobakterien übertragen lassen.

Man kann spekulieren, welcher der beiden Resistenzmechanismen (*bla*<sub>OXA-48</sub> bzw. Porinverlust) bei Carbapenem-resistenten Isolaten zuerst auftritt. Für klinische Isolate von *K. pneumoniae* konnte gezeigt werden, dass die Abwesenheit meistens eines Hauptporins, zuweilen beider Hauptporine generell häufig ist, wenn diese zugleich ein Gen für eine extended spectrum  $\beta$ -lactamase besitzen [232]. Bei Isolaten mit *bla*<sub>OXA-48</sub> wurden diese Befunde ebenfalls festgestellt [233]. Hinzu kommt, dass *bla*<sub>OXA-48</sub> üblicherweise mit dem Auftreten einiger anderer  $\beta$ -Lactamasen assoziiert ist, darunter in der Regel auch ESBL, was auf den Porinstatus zurückschließen lässt. Andererseits stellt ein Verlust der Hauptporine für Bakterien unter nicht-selektiven Bedingungen einen Nachteil dar, so dass es durchaus zu einer Reversion des Porinstatus kommen mag, wie man es auch schon gefunden hat [234]. Das auf

der anderen Seite *Klebsiella*-Stämme mit intakten Porinen unter Selektionsdruck Porinverluste erleiden, konnte *in vitro* gezeigt werden [228].

Für die Carbapenem-Therapie von potenziell OXA-48-positiven Isolaten, die ihre Hauptporine noch exprimieren und zunächst sensibel erscheinen (Anschlagen der Therapie), würden die Befunde dieser Arbeit eine hohe Wahrscheinlichkeit für die Selektion von porindefizienten Mutanten bedeuten, die dann gegenüber Carbapenemen nicht mehr empfindlich sind. Eine Prüfung auf *bla*<sub>OXA-48</sub>, etwa mittels PCR, sollte in jedem Fall eine Standard-Bestimmung bei klinischen Isolaten aus der Familie der *Enterobacteriaceae* sein, und bei positivem Ausfall - unabhängig von der MHK der Carbapeneme - ein Ausweichen auf eine andere Antibiotika-Klasse bedeuten.

### 5.3 Ausblick

In dieser Arbeit wurden an einigen Stellen Spekulationen an- und Thesen aufgestellt, bei denen nähere Untersuchungen oder abschließende Beweisführungen durch nachfolgende Arbeiten klinisch relevant wären.

Bezüglich des *E. cloacae*-Kollektivs wurde die These aufgestellt, dass die Aminosäure-Mutation L30Q in der Amidase AmpD zu einer eingeschränkten Funktionalität des Proteins führt. Dies könnte man durch ein einfaches Experiment nachvollziehen, in dem man etwa bei *E. cloacae* 14, der in dieser Arbeit als Wildtyp betrachtet wurde, *ampD* auf chromosomaler Ebene durch *in vitro* Mutagenese entsprechend verändert. Dies könnte man z.B. direkt bei dem bereits vorhandenen Plasmid pHPJW12-11.4 (mit *ampD* von *E. cloacae* 14) durch oligonucleotidgesteuerte Mutagenese bewerkstelligen, wobei in *ampD* die Punktmutation T89A vorgenommen werden müsste. Das Produkt könnte man in dem hier durchgeführten *ampD*-Komplementationsassay verwenden. Dabei resultierende MHK-Werte wie bei den Plasmiden pHPJW12-11.1-3 würden die aufgestellte These bestätigen. Darüber hinaus wäre es sehr interessant, die entsprechenden Kristallstrukturen zu untersuchen. Dadurch könnten gegebenenfalls Erkenntnisse über den hyperinduzierbaren Phänotyp durch Mutationen in *ampD* und damit auch über die Funktionsweise von AmpD an sich gewonnen werden.

Es wurde darauf hingewiesen, dass in dem Kollektiv bestimmte Faktoren zur Resistenz gegen  $\beta$ -Lactam-Antibiotika beitragen können, die hier nicht untersucht wurden. Naheliegend sind die Erstellung eines OMP-Profiles, um den Einfluss gegebenenfalls nicht exprimierter Porine einschätzen zu können, sowie die Sequenzierung von *ampC*, um herauszufinden, ob hier

Mutationen vorhanden sind, die das Spektrum der resultierenden  $\beta$ -Lactamase noch erweitern. Ferner ist auch bekannt, dass Mutationen in *ampR* zu einer erhöhten Expression von *ampC* beitragen [83], insofern wäre auch bei diesem Gen eine Sequenzierung sinnvoll.

Bezüglich der gängigen Theorie über das promiskuitive Plasmid, das gegenwärtig massiv zur Ausbreitung von *bla*<sub>OXA-48</sub> beiträgt [101], stellten mehrere Wissenschaftler fest, dass sich eine auf PCR basierende Methode zur Typisierung des Replikons von Plasmiden [235] hier nicht eignete [97, 144]. Die Typisierungsmethode wurde in dieser Arbeit ebenfalls verwendet und führte ebenso zu keinem Ergebnis.

Poirel et al. haben kürzlich die vollständige Sequenz des *bla*<sub>OXA-48</sub>-tragende Plasmids pOXA-48a aus *K. pneumoniae* 11978 publiziert [144]. Wie sich herausstellte, gehört das Plasmid zur Inkompatibilitätsgruppe IncL/M. Frühere Befunde, es gehöre zur IncP [97], stellten sich damit als falsch heraus [236]. Es zeigte sich, dass die Bindungsstelle eines IncL/M-spezifischen PBRT-Primers verändert ist, was die negativen Befunde nach Typisierungsversuchen mit dieser Methode erklärt [144]. In der Publikation von Poirel et al. sind 3 Primerpaare angegeben, die eine Bestimmung der IncL/M dieses Plasmids mittels PCR erlauben. Die Durchführung dieser PCR-Analysen mit dem in dieser Arbeit untersuchten, *bla*<sub>OXA-48</sub> codierenden Plasmid als Template würde bei positivem Resultat die These stützen, dass es sich um das gleiche Plasmid handelt wie das Plasmid pOXA-48a aus *K. pneumoniae* 11978.

Daneben erlauben die Sequenzdaten eine Vorhersage der zu erwartenden Fragmente nach Restriktionsspaltungen. Für eine vergleichende Restriktionsspaltung von pOXA-48a und pOXA-48(KpnVa22038) sollten dann idealerweise Restriktionsenzyme benutzt werden, die eine für eine Agarose-Gelelektrophorese möglichst günstige Anzahl von Fragmenten in einem gut auflösenden Größenbereich liefern würden. Für eine weitergehende Identitätsprüfung sollte schließlich eine komplette Sequenzierung des Plasmids aus *K. pneumoniae* Va22038 und ein anschließendes Sequenzalignment mit dem Plasmid pOXA-48a durchgeführt werden.

In den Ausführungen in Kapitel 5.2.3 zur Detektionsmethode bei der IEF von  $\beta$ -Lactamasen - Nitrocefin gegenüber einem Bioassay - wird auf das Potenzial des Bioassays hingewiesen. Optimierungen erscheinen sinnvoll, denn die IEF ist nach wie vor die Standardmethode zur experimentellen Bestimmung des isoelektrischen Punktes von (neuen)  $\beta$ -Lactamasen.

Für alle in dieser Arbeit untersuchten Isolate muss man abschließend feststellen: eine vollständige Erfassung des gesamten Resistenzmechanismus, sei es bezüglich der in der

---

Arbeit untersuchten  $\beta$ -Lactam-Antibiotika oder gegen eine andere Antibiotika-Klasse, ist nur sehr schwierig zu bewerkstelligen. So lange man nicht den Resistenzphänotyp eines klinischen Isolats reproduziert hat, macht es daher aus wissenschaftlicher Sicht durchaus Sinn, im Nachhinein immer wieder auf neu entdeckte Resistenzgene zu screenen. Im positiven Fall vervollständigt eine solche Information das Mosaik, welches der Resistenzmechanismus eines jeden klinischen Isolats darstellt. Im Falle der  $\beta$ -Lactamasen ist dabei ein kontinuierlicher Zuwachs neuer Typen zu verzeichnen. Für einen Kliniker ist diese Fragestellung sicherlich weniger relevant, muss doch vordringlich für den Patienten über eine effektive Therapie angesichts möglicher Resistenzen entschieden werden.

Eine anzustrebende, nahezu perfekte Lösung mag die vollständige Sequenzierung des gesamten genetischen Materials eines klinischen Isolats und deren automatischer Abgleich mit einem Pool genetischer Informationen sämtlich bekannter Resistenzmechanismen sein.

## 6 Zusammenfassung

Die zunehmende Resistenz bakterieller Krankheitserreger gegen gängige Antibiotika-Klassen wird ein immer größeres Problem der modernen Medizin und fordert auch in steigendem Maße Menschenleben. Die immer weiter voranschreitende Resistenzentwicklung auch gegen die Klasse der  $\beta$ -Lactam-Antibiotika ist dabei besonders erwähnenswert, weil diese nach wie vor als die wichtigste Waffe gegen bakterielle Infektionen angesehen wird. Zu den Unterfamilien der  $\beta$ -Lactam-Antibiotika gehören unter anderem die Carbapeneme. Zeichneten sich die Carbapeneme lange Zeit durch ihre generell hohe Stabilität gegen verbreitete  $\beta$ -Lactamasen aus, bricht dieser Zustand gegenwärtig zunehmend um: es werden immer mehr  $\beta$ -Lactamasen nachgewiesen, die auch Carbapeneme zu ihrem Substratspektrum zählen.

Wie bei allen auftretenden Resistenzmechanismen ist es auch bei der Carbapenemresistenz die Aufgabe der Wissenschaft, diese zu untersuchen und zu analysieren, um Erkenntnisse über ihre Entstehung, ihren Mechanismus und ihre Ausbreitung zu gewinnen. Aus solchen Erkenntnissen lassen sich epidemiologische Prognosen erstellen, man kann Schlüsse für die Therapie ziehen und auch neue, gegebenenfalls robustere Ansätze für neue Antibiotika finden.

In dieser Arbeit wurden klinische Isolate der Familie der *Enterobacteriaceae* untersucht, die durch eine Resistenz gegen Carbapeneme auffällig geworden sind. Dabei handelte es sich zum einen um ein Isolat-Kollektiv der Spezies *E. cloacae* sowie zum anderen um ein Isolat der Spezies *K. pneumoniae*.

Bezüglich der *E. cloacae*, deren Isolation sukzessive von einer einzelnen Patientin erfolgte, konnte gezeigt werden, dass ihre Carbapenemresistenz primär durch die Expression der Metallo- $\beta$ -Lactamase VIM-1 verursacht wird. Diese MBL zählt inzwischen zu den weltweit häufigsten Ursachen von Carbapenemresistenz. Wie weiter gezeigt werden konnte, ist das Gen Teil eines Integrons auf einem ca. 50 kb großen, konjugativen Plasmid. Diese Konstellation verkörpert gleich zwei sehr verbreitete Ausbreitungsmechanismen von Resistenzgenen.

Weitere Untersuchungen ließen darauf schließen, dass vermutlich eine Punktmutation im Gen *ampD* der *E. cloacae* zu einer erhöhten *ampC*-Expression führte, die ihrerseits das Resistenzprofil auf die übrigen Unterklassen der  $\beta$ -Lactam-Antibiotika erweiterte.

Bei der *K. pneumoniae* konnte das Carbapenemase-Gen *bla*<sub>OXA-48</sub> nachgewiesen werden. Damit verfügt dieses Isolat über eine  $\beta$ -Lactamase, bei der man von einer zunehmenden

---

Ausbreitung auch in Deutschland ausgehen kann. Das hier untersuchte Isolat stellt das momentan Älteste in Deutschland dar, bei dem dieser Nachweis gelungen ist. Das Gen wurde 2004 zuerst in einem türkischen Isolat von 2002 beschrieben, während das hier untersuchte Isolat von 2004 stammt.

Wie gezeigt werden konnte, ist das Carbapenemase-Gen *bla*<sub>OXA-48</sub> auf einem konjugativen, ca. 62 kb großen Plasmid lokalisiert. Dieses Plasmid zeigte identische Bandenmuster nach Spaltung mit Restriktionsenzymen wie das Referenzplasmid pOXA-48a aus dem Isolat *K. pneumoniae* 11978, bei dem der Erstnachweis von *bla*<sub>OXA-48</sub> gelang. Man kann anhand der Ergebnisse dieser Arbeit davon ausgehen, dass die Plasmide identisch sind. Dies passt zu einer gängigen Theorie, nach der die Ausbreitung von *bla*<sub>OXA-48</sub> primär durch dieses Plasmid vorangetrieben wird.

Es konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass das Isolat die Hauptporine OmpK35 und OmpK36 nicht bildet, was zu einer Verstärkung der  $\beta$ -Lactam-Resistenz im Allgemeinen und der Carbapenemresistenz im Besonderen führt. Die Poringene *ompK35* und *ompK36* zeigten eine Insertion bzw. Deletion von DNA in ihren jeweiligen Promotoren, was die Ursache für das Fehlen der Porine ist.

In weiteren Versuchen wurde gezeigt, dass es einen starken Synergismus zwischen Porinverlust und der Expression von *bla*<sub>OXA-48</sub> gibt. Erst die Kombination aus beiden Resistenzmechanismen lässt einen Stamm von *K. pneumoniae* als phänotypisch resistent erscheinen, wobei die Ergebnisse sicherlich auf andere Enterobakterien übertragbar sind. Diese Erkenntnis legt einen pauschalen Test auf *bla*<sub>OXA-48</sub> bei klinischen Isolaten aus dieser Familie nahe, auch wenn sie sensibel gegen Carbapeneme sind. Ein Einsatz von Carbapenemen schließt sich bei positivem Ergebnis in jedem Fall aus, da er zu einer Selektion porindefizienter und damit hochresistenter Stämme führen kann.

Die Arbeit gewährt einen aktuellen Einblick in die Verbreitung von gegenwärtig hochproblematischen Resistenzgenen gegen die Antibiotikaklasse der Carbapeneme. Sie trägt ferner zum weitergehenden Verständnis dieser Resistenzmechanismen bei.

## 7 Summary

The increasing resistance against most of the current available classes of antibiotics is a major concern of modern medicine and is one of the leading causes of global death. The progressing evolution of resistance mechanisms against the class of  $\beta$ -lactam-antibiotics is particularly notable since this class still is one of the most important weapons against bacterial infections. A subclass of  $\beta$ -lactam-antibiotics is formed by the carbapenems. Although they have been seen as very stable against widespread  $\beta$ -lactamases since their introduction, this situation is currently changing: an increasing number of  $\beta$ -lactamases is detected which are able to hydrolyze carbapenems.

As with all appearing resistance mechanisms, it is the challenge of scientists to examine and analyze the mechanisms behind a carbapenem resistance in order to understand their evolution and epidemiology. With these insights it is possible to develop epidemiological projections, to optimize therapy schemes and to find new, perhaps more robust approaches for the development of new antibiotics.

In this work clinical isolates of the family of *Enterobacteriaceae* showing carbapenem resistance were examined. Those were a collective of *E. cloacae* on one hand and a single *K. pneumoniae* on the other.

Regarding the *E. cloacae*, which have been isolated from a single patient, it could be shown that their carbapenem resistance is primarily due to the expression of the metallo- $\beta$ -lactamase VIM-1. This MBL is one of the most frequent causes of carbapenem resistance worldwide. Here, the gene is part of an integron on a conjugative plasmid with an approximate size of 50 kb. This constellation represents even two very common mechanisms of dissemination of resistance genes.

Further examinations showed that a point mutation in *ampD* of the *E. cloacae* might lead to an increased expression of *ampC*, thus extending the resistance profile over the other classes of  $\beta$ -lactam-antibiotics.

The *K. pneumoniae* isolate was found to be positive for the carbapenemase resistance gene *bla<sub>OXA-48</sub>*. Therefore this isolate owns a  $\beta$ -lactamase which is considered to experience an increasing dissemination. The isolate examined here currently is the oldest in Germany being positive for this gene. It first was described in 2004 and found in an isolate from Turkey from 2002, while the *K. pneumoniae* of this work is from 2004.

---

It could be shown that the carbapenemase gene is located on a conjugative plasmid with an approximate size of 62 kb. This plasmid yielded an identical pattern of DNA fragments like the reference plasmid pOXA-48a from the isolate of first detection, *K. pneumoniae* 11978, when both were digested with restriction enzymes. One can conclude that the plasmids are identical. This fits to the popular theory of the dissemination of *bla*<sub>OXA-48</sub> primarily by this single plasmid.

Furthermore it was found that the isolate is not expressing both its major outer membrane porins OmpK35 and OmpK36, leading to an enhanced  $\beta$ -lactam-resistance, especially against carbapenems. The porin genes *ompK35* and *ompK36* both showed a DNA-insertion and a DNA-deletion respectively in their promoter regions, which is the cause for the missing porins.

Further experiments showed that there is a strong synergism between the loss of porins and the presence of *bla*<sub>OXA-48</sub>. Only the combination of both mechanisms is leading to the carbapenem resistance phenotype. The results should also apply for other species of *Enterobacteriaceae*. These findings suggest establishing a standard assay for the detection of *bla*<sub>OXA-48</sub> in clinical isolates from this family, even if they first seem to be susceptible to carbapenems. The use of carbapenems should be excluded if the result is positive, since it could lead to the selection of porin deficient and therefore highly resistant strains.

This work allows for a present insight into the dissemination of currently highly problematic resistance genes regarding the antibiotic class of carbapenems. It further helps on the detailed understanding of these resistance mechanisms.

---

## 8 Literaturverzeichnis

1. Livermore, D. M. und J. D. Williams: "β-Lactams: Mode of Action and Mechanisms of Bacterial Resistance." Kapitel 12 (S. 502-578) aus "Antibiotics in laboratory medicine". Herausgeber V. Lorian. Williams & Wilkins, 4. Auflage, 1996.
  2. Fleming, A. (1929): "On the antibacterial action of cultures of a penicillium, with special reference to their use in the isolation of *B. influenzae*." British Journal of Experimental Pathology 10: 226-236.
  3. Brotzu, G. (1948): "Ricerche su di un nuovo antibiotico [Untersuchungen an einem neuen Antibiotikum]." Lavori dell'Istituto di Igiene di Cagliari: 1-11.
  4. WHO Collaborating Centre for Drug Statistics Methodology: "Guidelines for ATC classification and DDD assignment 2011." 14. Auflage, 2010.
  5. Mandell, G. L., R. G. Douglas, et al.: "Principles and practice of infectious diseases." Elsevier - Health Sciences Division, 2005.
  6. Shah, P. M., M. Kresken, et al. (2009): "Einteilung der parenteralen Cephalosporine." Chemotherapie Journal 18(6): 252-253.
  7. Mutschler, E., G. Geisslinger, et al.: "Mutschler - Arzneimittelwirkungen, Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie." Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart, 8. Auflage, 2001.
  8. Burgis, E.: "Intensivkurs - Allgemeine und spezielle Pharmakologie." Urban & Fischer Verlag, Elsevier GmbH, 3. Auflage, 2005.
  9. Kahan, J. S., F. M. Kahan, et al.: "Abstracts of the Sixteenth Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Abstract 227." 16th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy (1976), Chicago, Illinois.
  10. Papp-Wallace, K. M., A. Endimiani, et al. (2011): "Carbapenems: past, present, and future." Antimicrobial Agents and Chemotherapy 55(11): 4943-4960. DOI: 10.1128/aac.00296-11
  11. Reading, C. und M. Cole (1977): "Clavulanic acid: a β-lactamase-inhibiting β-lactam from *Streptomyces clavuligerus*." Antimicrobial Agents and Chemotherapy 11(5): 852-857. DOI: 10.1128/aac.11.5.852
  12. English, A. R., J. A. Retsema, et al. (1978): "CP-45,899, a β-lactamase inhibitor that extends the antibacterial spectrum of β-lactams: initial bacteriological characterization." Antimicrobial Agents and Chemotherapy 14(3): 414-419. DOI: 10.1128/aac.14.3.414
  13. Aronoff, S. C., M. R. Jacobs, et al. (1984): "Comparative activities of the β-lactamase inhibitors YTR 830, sodium clavulanate, and sulbactam combined with amoxicillin or ampicillin." Antimicrobial Agents and Chemotherapy 26(4): 580-582. DOI: 10.1128/aac.26.4.580
-

14. Drawz, S. M. und R. A. Bonomo (2010): "Three decades of  $\beta$ -lactamase inhibitors." *Clinical Microbiology Reviews* 23(1): 160-201. DOI: 10.1128/cmr.00037-09
15. Lebeer, S., J. Vanderleyden, et al. (2010): "Host interactions of probiotic bacterial surface molecules: comparison with commensals and pathogens." *Nature Reviews Microbiology* 8(3): 171-184. DOI: 10.1038/nrmicro2297
16. Cloud-Hansen, K. A., S. B. Peterson, et al. (2006): "Breaching the great wall: peptidoglycan and microbial interactions." *Nature Reviews Microbiology* 4(9): 710-716. DOI: 10.1038/nrmicro1486
17. Willey, J. M., L. M. Sherwood, et al.: "Bacteria and Archaea." Kapitel 3 aus "Prescott's Microbiology". McGraw-Hill Higher Education, 8. Auflage, 2010.
18. Vollmer, W. und S. J. Seligman (2010): "Architecture of peptidoglycan: more data and more models." *Trends in Microbiology* 18(2): 59-66. DOI: 10.1016/j.tim.2009.12.004
19. Höltje, J.-V. (1998): "Growth of the stress-bearing and shape-maintaining murein sacculus of *Escherichia coli*." *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 62(1): 181-203.
20. Delcour, A. H. (2009): "Outer membrane permeability and antibiotic resistance." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins & Proteomics* 1794(5): 808-816. DOI: 10.1016/j.bbapap.2008.11.005
21. Raetz, C. R. H., Z. Guan, et al. (2009): "Discovery of new biosynthetic pathways: the lipid A story." *Journal of Lipid Research* 50 (Supplement): S103-S108. DOI: 10.1194/jlr.r800060-jlr200
22. Vollmer, W. und U. Bertsche (2008): "Murein (peptidoglycan) structure, architecture and biosynthesis in *Escherichia coli*." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1778(9): 1714-1734. DOI: 10.1016/j.bbamem.2007.06.007
23. Heijenoort, J. v. (2001): "Formation of the glycan chains in the synthesis of bacterial peptidoglycan." *Glycobiology* 11(3): 25R-36R. DOI: 10.1093/glycob/11.3.25r
24. Uehara, T., K. Suefuji, et al. (2005): "Recycling of the anhydro-N-acetylmuramic acid derived from cell wall murein involves a two-step conversion to N-acetylglucosamine-phosphate." *Journal of Bacteriology* 187(11): 3643-3649. DOI: 10.1128/jb.187.11.3643-3649.2005
25. Jaeger, T., M. Arsic, et al. (2005): "Scission of the lactyl ether bond of N-acetylmuramic acid by *Escherichia coli* "etherase". *Journal of Biological Chemistry* 280(34): 30100-30106. DOI: 10.1074/jbc.m502208200
26. Lee, M., D. Heseck, et al. (2003): "A mechanism-based inhibitor targeting the dd-transpeptidase activity of bacterial penicillin-binding proteins." *Journal of the American Chemical Society* 125(52): 16322-16326. DOI: 10.1021/ja038445l

- 
27. Kohanski, M. A., D. J. Dwyer, et al. (2007): "A common mechanism of cellular death induced by bactericidal antibiotics." *Cell* 130(5): 797-810. DOI: 10.1016/j.cell.2007.06.049
  28. Dwyer, D. J., M. A. Kohanski, et al. (2009): "Role of reactive oxygen species in antibiotic action and resistance." *Current Opinion in Microbiology* 12(5): 482-489. DOI: 10.1016/j.mib.2009.06.018
  29. Woodford, N. (2005): "Biological counterstrike: antibiotic resistance mechanisms of Gram-positive cocci." *Clinical Microbiology and Infection* 11: 2-21. DOI: 10.1111/j.1469-0691.2005.01140.x
  30. Zapun, A., C. Contreras-Martel, et al. (2008): "Penicillin-binding proteins and  $\beta$ -lactam resistance." *FEMS Microbiology Reviews* 32(2): 361-385. DOI: 10.1111/j.1574-6976.2007.00095.x
  31. Murakami, S. (2008): "Multidrug efflux transporter, AcrB - the pumping mechanism." *Current Opinion in Structural Biology* 18(4): 459-465. DOI: 10.1016/j.sbi.2008.06.007
  32. Fernandez-Recio, J., F. Walas, et al. (2004): "A model of a transmembrane drug-efflux pump from Gram-negative bacteria." *FEBS Letters* 578(1): 5-9. DOI: 10.1016/j.febslet.2004.10.097
  33. Symmons, M. F., E. Bokma, et al. (2009): "The assembled structure of a complete tripartite bacterial multidrug efflux pump." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America PNAS* 106(17): 7173-7178. DOI: 10.1073/pnas.0900693106
  34. Blair, J. M. A. und L. J. V. Piddock (2009): "Structure, function and inhibition of RND efflux pumps in Gram-negative bacteria: an update." *Current Opinion in Microbiology* 12(5): 512-519. DOI: 10.1016/j.mib.2009.07.003
  35. Seeger, M. A., A. Schiefner, et al. (2006): "Structural asymmetry of AcrB trimer suggests a peristaltic pump mechanism." *Science* 313(5791): 1295-1298. DOI: 10.1126/science.1131542
  36. Murakami, S., R. Nakashima, et al. (2006): "Crystal structures of a multidrug transporter reveal a functionally rotating mechanism." *Nature* 443(7108): 173-179. DOI: 10.1038/nature05076
  37. Nikaido, H. und Y. Takatsuka (2009): "Mechanisms of RND multidrug efflux pumps." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins & Proteomics* 1794(5): 769-781. DOI: 10.1016/j.bbapap.2008.10.004
  38. Nikaido, H.: "Structure and Mechanism of RND-Type Multidrug Efflux Pumps." S. 1-60 aus "Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology". Herausgeber E. J. Toone. John Wiley & Sons, Inc., 2011. DOI: 10.1002/9780470920541.ch1
-

39. Pos, K. M. (2009): "Drug transport mechanism of the AcrB efflux pump." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins & Proteomics* 1794(5): 782-793. DOI: 10.1016/j.bbapap.2008.12.015
40. Vaccaro, L., K. A. Scott, et al. (2008): "Gating at both ends and breathing in the middle: conformational dynamics of TolC." *Biophysical Journal* 95(12): 5681-5691. DOI: 10.1529/biophysj.108.136028
41. Linde, H.-J., F. Notka, et al. (2002): "Increase in MICs of ciprofloxacin in vivo in two closely related clinical isolates of *Enterobacter cloacae*." *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 49(4): 625-630. DOI: 10.1093/jac/49.4.625
42. Perez, A., D. Canle, et al. (2007): "Cloning, nucleotide sequencing, and analysis of the AcrAB-TolC efflux pump of *Enterobacter cloacae* and determination of its involvement in antibiotic resistance in a clinical isolate." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 51(9): 3247-3253. DOI: 10.1128/aac.00072-07
43. Domenech-Sanchez, A., S. Alberti, et al.: "Genetic Characterization and Role in Antimicrobial Resistance of the AcrAB Efflux Pump of *Klebsiella pneumoniae* (KP)." Abstract C1-2018, 41st Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy (2001), Chicago, Illinois.
44. Lim, S. P. und H. Nikaido (2010): "Kinetic parameters of efflux of penicillins by the multidrug efflux transporter AcrAB-TolC of *Escherichia coli*." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 54(5): 1800-1806. DOI: 10.1128/aac.01714-09
45. Nikaido, H., M. Basina, et al. (1998): "Multidrug efflux pump AcrAB of *Salmonella Typhimurium* excretes only those  $\beta$ -lactam antibiotics containing lipophilic side chains." *Journal of Bacteriology* 180(17): 4686-4692.
46. Mazzariol, A., G. Cornaglia, et al. (2000): "Contributions of the AmpC  $\beta$ -lactamase and the AcrAB multidrug efflux system in intrinsic resistance of *Escherichia coli* K-12 to  $\beta$ -lactams." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 44(5): 1387-1390. DOI: 10.1128/aac.44.5.1387-1390.2000
47. Landman, D., S. Bratu, et al. (2009): "Contribution of OmpK36 to carbapenem susceptibility in KPC-producing *Klebsiella pneumoniae*." *Journal of Medical Microbiology* 58(10): 1303-1308. DOI: 10.1099/jmm.0.012575-0
48. Nikaido, H. und J.-M. Pagès (2011): "Broad-specificity efflux pumps and their role in multidrug resistance of Gram-negative bacteria." *FEMS Microbiology Reviews - digitale Vorveröffentlichung*. DOI: 10.1111/j.1574-6976.2011.00290.x
49. Pages, J.-M., J.-P. Lavigne, et al. (2009): "Efflux pump, the masked side of  $\beta$ -lactam resistance in *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates." *PLoS ONE* 4(3): e4817. DOI: 10.1371/journal.pone.0004817
50. Gröbner, S., D. Linke, et al. (2009): "Emergence of carbapenem-non-susceptible extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates at the

- 
- university hospital of Tübingen, Germany." *Journal of Medical Microbiology* 58(7): 912-922. DOI: 10.1099/jmm.0.005850-0
51. Doumith, M., M. J. Ellington, et al. (2009): "Molecular mechanisms disrupting porin expression in ertapenem-resistant *Klebsiella* and *Enterobacter* spp. clinical isolates from the UK." *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 63(4): 659-667. DOI: 10.1093/jac/dkp029
  52. De Sarro, A., D. Ammendola, et al. (1995): "Relationship between structure and convulsant properties of some  $\beta$ -lactam antibiotics following intracerebroventricular microinjection in rats." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 39(1): 232-237. DOI: 10.1128/aac.39.1.232
  53. De la Cruz, M. A. und E. Calva (2010): "The complexities of porin genetic regulation." *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology* 18(1): 24-36. DOI: 10.1159/000274309
  54. Pages, J.-M., C. E. James, et al. (2008): "The porin and the permeating antibiotic: a selective diffusion barrier in Gram-negative bacteria." *Nature Reviews Microbiology* 6(12): 893-903. DOI: 10.1038/nrmicro1994
  55. Davin-Regli, A., J. M. Bolla, et al. (2008): "Membrane permeability and regulation of drug "influx and efflux" in enterobacterial pathogens." *Current Drug Targets* 9(9): 750-759.
  56. Baslé, A., G. Rummel, et al. (2006): "Crystal structure of osmoporin OmpC from *E. coli* at 2.0 Å." *Journal of Molecular Biology* 362(5): 933-942. DOI: 10.1016/j.jmb.2006.08.002
  57. Cowan, S. W., R. M. Garavito, et al. (1995): "The structure of OmpF porin in a tetragonal crystal form." *Structure* 3(10): 1041-1050. DOI: 10.1016/s0969-2126(01)00240-4
  58. Abraham, E. P. und E. Chain (1940): "An enzyme from bacteria able to destroy penicillin." *Nature* 146: 837. DOI: 10.1038/146837a0
  59. Kirby, W. M. M. (1944): "Extraction of a highly potent penicillin inactivator from penicillin resistant *Staphylococci*." *Science* 99(2579): 452-453. DOI: 10.1126/science.99.2579.452
  60. Jacoby, G. A.: "History of Drug-Resistant Microbes." S. 3-7 aus "Antimicrobial Drug Resistance". Herausgeber D. L. Mayers. Humana Press, 2009. DOI: 10.1007/978-1-59745-180-2\_1
  61. Medeiros, A. A. (1997): "Evolution and dissemination of  $\beta$ -lactamases accelerated by generations of  $\beta$ -lactam antibiotics." *Clinical Infectious Diseases* 24 (Supplement 1): S19-S45. DOI: 10.1093/clinids/24.supplement\_1.s19
  62. Hamilton-Miller, J. M. (1982): " $\beta$ -lactamases and their clinical significance." *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 9 (Supplement B): 11-19. DOI: 10.1093/jac/9.suppl\_b.11
-

63. Datta, N. und P. Kontomichalou (1965): "Penicillinase synthesis controlled by infectious R factors in *Enterobacteriaceae*." *Nature* 208(5007): 239-241. DOI: 10.1038/208239a0
  64. Jacoby, G. A. (2006): " $\beta$ -lactamase nomenclature." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 50(4): 1123-1129. DOI: 10.1128/aac.50.4.1123-1129.2006
  65. Lowbury, E. J. L., H. A. Lilly, et al. (1969): "Sensitivity of *Pseudomonas aeruginosa* to antibiotics: emergence of strains highly resistant to carbenicillin." *The Lancet* 294(7618): 448-452. DOI: 10.1016/s0140-6736(69)90163-9
  66. Pitton, J. S.: "Mechanisms of bacterial resistance to antibiotics." S. 15-93 aus "Reviews of Physiology", Ausgabe 65. Springer Berlin Heidelberg, 1972. DOI: 10.1007/3-540-05814-1\_2
  67. Egawa, R., T. Sawai, et al. (1967): "Drug resistance of enteric bacteria. XII. Unique substrate specificity of penicillinase produced by R-factor." *Japanese Journal of Microbiology* 11: 173-178.
  68. Chabbert, Y. A., M. R. Scavizzi, et al. (1972): "Incompatibility groups and the classification of  $\text{fi}^-$  resistance factors." *Journal of Bacteriology* 112(2): 666-675.
  69. Richmond, M. H. und R. B. Sykes (1973): "The  $\beta$ -lactamases of Gram-negative bacteria and their possible physiological role." *Advances in Microbial Physiology* 9: 31-88.
  70. Richmond, M. H. (1986): "Citation classic - the  $\beta$ -lactamases of Gram-negative bacteria and their possible physiological role." *Current Contents / Clinical Practice* 23: 14.
  71. Hedges, R. W. und A. E. Jacob (1974): "Transposition of ampicillin resistance from RP4 to other replicons." *Molecular and General Genetics MGG* 132(1): 31-40. DOI: 10.1007/bf00268228
  72. Matthew, M., A. M. Harris, et al. (1975): "The use of analytical isoelectric focusing for detection and identification of  $\beta$ -lactamases." *Journal of General Microbiology* 88(1): 169-178. DOI: 10.1099/00221287-88-1-169
  73. Sanders, C. C. und W. E. Sanders, Jr. (1979): "Emergence of resistance to cefamandole: possible role of cefoxitin-inducible  $\beta$ -lactamases." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 15(6): 792-797. DOI: 10.1128/aac.15.6.792
  74. Kliebe, C., B. A. Nies, et al. (1985): "Evolution of plasmid-coded resistance to broad-spectrum cephalosporins." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 28(2): 302-307. DOI: 10.1128/aac.28.2.302
  75. Stokes, H. W. und R. M. Hall (1989): "A novel family of potentially mobile DNA elements encoding site-specific gene-integration functions: integrons." *Molecular Microbiology* 3(12): 1669-1683. DOI: 10.1111/j.1365-2958.1989.tb00153.x
  76. Philippon, A., G. Arlet, et al. (2002): "Plasmid-determined AmpC-type  $\beta$ -lactamases." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 46(1): 1-11. DOI: 10.1128/aac.46.1.1-11.2002
-

- 
77. Bando, K., K. Watanabe, et al. (1992): "Conjugal transfer of imipenem resistance in *Bacteroides fragilis*." *The Journal of Antibiotics* 45(4): 542-547. DOI: 10.7164/antibiotics.45.542
  78. Cantón, R., M. I. Morosini, et al. (2008): "IRT and CMT  $\beta$ -lactamases and inhibitor resistance." *Clinical Microbiology and Infection* 14(s1): 53-62. DOI: 10.1111/j.1469-0691.2007.01849.x
  79. Bush, K., G. A. Jacoby, et al. (1995): "A functional classification scheme for  $\beta$ -lactamases and its correlation with molecular structure." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 39(6): 1211-1233. DOI: 10.1128/aac.39.6.1211
  80. Bush, K. und G. A. Jacoby (2010): "Updated functional classification of  $\beta$ -lactamases." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 54(3): 969-976. DOI: 10.1128/aac.01009-09
  81. Ambler, R. P. (1980): "The structure of  $\beta$ -lactamases." *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 289(1036): 321-331. DOI: 10.1098/rstb.1980.0049
  82. Queenan, A. M. und K. Bush (2007): "Carbapenemases: the versatile  $\beta$ -lactamases." *Clinical Microbiology Reviews* 20(3): 440-458. DOI: 10.1128/cmr.00001-07
  83. Jacoby, G. A. (2009): "AmpC  $\beta$ -lactamases." *Clinical Microbiology Reviews* 22(1): 161-182. DOI: 10.1128/cmr.00036-08
  84. Mammeri, H., P. Nordmann, et al. (2008): "Contribution of extended-spectrum AmpC (ESAC)  $\beta$ -lactamases to carbapenem resistance in *Escherichia coli*." *FEMS Microbiology Letters* 282(2): 238-240. DOI: 10.1111/j.1574-6968.2008.01126.x
  85. Walsh, T. R. (2008): "Clinically significant carbapenemases: an update." *Current Opinion in Infectious Diseases* 21(4): 367-371. DOI: 10.1097/qco.0b013e328303670b
  86. Walsh, T. R. (2005): "The emergence and implications of metallo- $\beta$ -lactamases in Gram-negative bacteria." *Clinical Microbiology and Infection* 11: 2-9. DOI: 10.1111/j.1469-0691.2005.01264.x
  87. El Garch, F., P. Bogaerts, et al. (2011): "OXA-198, an acquired carbapenem-hydrolyzing class D  $\beta$ -lactamase from *Pseudomonas aeruginosa*." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 55(10): 4828-4833. DOI: 10.1128/aac.00522-11
  88. Sykes, R. B. und M. Matthew (1976): "The  $\beta$ -lactamases of Gram-negative bacteria and their role in resistance to  $\beta$ -lactam antibiotics." *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2(2): 115-157. DOI: 10.1093/jac/2.2.115
  89. Dale, J. W. und J. T. Smith (1974): "R-factor-mediated  $\beta$ -lactamases that hydrolyze oxacillin: evidence for two distinct groups." *Journal of Bacteriology* 119(2): 351-356.
  90. Matthew, M. und R. W. Hedges (1976): "Analytical isoelectric focusing of R factor-determined  $\beta$ -lactamases: correlation with plasmid compatibility." *Journal of Bacteriology* 125(2): 713-718.
-

91. Naas, T. und P. Nordmann (1999): "OXA-type  $\beta$ -lactamases." *Current Pharmaceutical Design* 5(11): 865-879.
  92. Poirel, L., T. Naas, et al. (2010): "Diversity, epidemiology, and genetics of class D  $\beta$ -lactamases." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 54(1): 24-38. DOI: 10.1128/aac.01512-08
  93. Poirel, L., C. Heritier, et al. (2004): "Emergence of oxacillinase-mediated resistance to imipenem in *Klebsiella pneumoniae*." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 48(1): 15-22. DOI: 10.1128/aac.48.1.15-22.2004
  94. Poirel, L., C. Heritier, et al. (2004): "Chromosome-encoded Ambler class D  $\beta$ -lactamase of *Shewanella oneidensis* as a progenitor of carbapenem-hydrolyzing oxacillinase." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 48(1): 348-351. DOI: 10.1128/aac.48.1.348-351.2004
  95. Walther-Rasmussen, J. und N. Hoiby (2006): "OXA-type carbapenemases." *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 57(3): 373-383. DOI: 10.1093/jac/dki482
  96. Potron, A., L. Poirel, et al. (2011): "Origin of OXA-181, an emerging carbapenem-hydrolyzing oxacillinase, as a chromosomal gene in *Shewanella xiamenensis*." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 55(9): 4405-4407. DOI: 10.1128/aac.00681-11
  97. Carrer, A., L. Poirel, et al. (2010): "Spread of OXA-48-encoding plasmid in Turkey and beyond." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 54(3): 1369-1373. DOI: 10.1128/aac.01312-09
  98. Kalpoe, J. S., N. Al Naiemi, et al. (2011): "Detection of an Ambler class D OXA-48-type  $\beta$ -lactamase in a *Klebsiella pneumoniae* strain in The Netherlands." *Journal of Medical Microbiology* 60(5): 677-678. DOI: 10.1099/jmm.0.028308-0
  99. Pitart, C., M. Sole, et al. (2011): "First outbreak of a plasmid-mediated carbapenem-hydrolyzing OXA-48  $\beta$ -lactamase in *Klebsiella pneumoniae* in Spain." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 55(9): 4398-4401. DOI: 10.1128/aac.00329-11
  100. Poirel, L., S. Bernabeu, et al. (2011): "Emergence of OXA-48-producing *Escherichia coli* clone ST38 in France." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 55(10): 4937-4938. DOI: 10.1128/aac.00413-11
  101. Cuzon, G., J. Ouanich, et al. (2011): "Outbreak of OXA-48-positive carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* Isolates in France." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 55(5): 2420-2423. DOI: 10.1128/aac.01452-10
  102. Knippers, R.: "Molekulare Genetik." Georg Thieme Verlag, 9. Auflage, 2006.
  103. Carrer, A., L. Poirel, et al. (2008): "Spread of OXA-48-positive carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates in Istanbul, Turkey." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 52(8): 2950-2954. DOI: 10.1128/aac.01672-07
-

- 
104. Giani, T., V. Conte, et al. (2012): "*Escherichia coli* from Italy producing OXA-48 carbapenemase encoded by a novel Tn1999 transposon derivative." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 56(4): 2211-2213. DOI: 10.1128/aac.00035-12
  105. Cambray, Guillaume, Guerout, Anne-Marie, et al. (2010): "Integrans." *Annual Review of Genetics* 44(1): 141-166. DOI: 10.1146/annurev-genet-102209-163504
  106. Levesque, C., L. Piche, et al. (1995): "PCR mapping of integrans reveals several novel combinations of resistance genes." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 39(1): 185-191. DOI: 10.1128/aac.39.1.185
  107. Page, M. I. und A. Badarau (2008): "The mechanisms of catalysis by metallo  $\beta$ -lactamases." *Bioinorganic Chemistry and Applications* 2008. DOI: 10.1155/2008/576297
  108. Paauw, A., M. P. M. Caspers, et al. (2008): "Genomic diversity within the *Enterobacter cloacae* complex." *PLoS ONE* 3(8): e3018. DOI: 10.1371/journal.pone.0003018
  109. Janda, J. M. und S. L. Abbott: "The Genus *Enterobacter*." Kapitel 11 (S. 151-180) aus "The Enterobacteria". ASM Press, 2. Auflage, 2006.
  110. Grimont, F. und P. Grimont: "The Genus *Enterobacter*." Kapitel 3.3.9 (S. 197-214) aus "The Prokaryotes". Herausgeber M. Dworkin, S. Falkow, E. Rosenberg, et al. Springer New York, 2006. DOI: 10.1007/0-387-30746-x\_9
  111. Maiztegui, J. I., J. Z. Biegeleisen, et al. (1965): "Bacteremia due to Gram-negative rods." *New England Journal of Medicine* 272(5): 222-229. DOI: 10.1056/nejm196502042720502
  112. Wiegand, I. (2003): "Molekulare und biochemische Grundlagen der  $\beta$ -Lactam-Resistenz durch  $\beta$ -Lactamasen." *Chemotherapie Journal* 12(6): 151-167.
  113. Hennessey, T. D. (1967): "Inducible  $\beta$ -lactamase in *Enterobacter*." *Journal of General Microbiology* 49(2): 277-285. DOI: 10.1099/00221287-49-2-277
  114. Park, J. T. und T. Uehara (2008): "How bacteria consume their own exoskeletons (turnover and recycling of cell wall peptidoglycan)." *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 72(2): 211-227. DOI: 10.1128/mmbr.00027-07
  115. Kong, K.-F., L. Schneper, et al. (2010): " $\beta$ -lactam antibiotics: from antibiosis to resistance and bacteriology." *Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica APMIS* 118(1): 1-36. DOI: 10.1111/j.1600-0463.2009.02563.x
  116. Stubbs, K. A., M. Balcewich, et al. (2007): "Small molecule inhibitors of a glycoside hydrolase attenuate inducible AmpC-mediated  $\beta$ -lactam resistance." *Journal of Biological Chemistry* 282(29): 21382-21391. DOI: 10.1074/jbc.m700084200
  117. Pfeifle, D., E. Janas, et al. (2000): "Role of penicillin-binding proteins in the initiation of the AmpC  $\beta$ -lactamase expression in *Enterobacter cloacae*." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 44(1): 169-172. DOI: 10.1128/aac.44.1.169-172.2000
-

118. Stapleton, P., K. Shannon, et al. (1995): "DNA sequence differences of ampD mutants of *Citrobacter freundii*." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 39(11): 2494-2498. DOI: 10.1128/aac.39.11.2494
  119. Hanson, N. D. und C. C. Sanders (1999): "Regulation of inducible AmpC  $\beta$ -lactamase expression among *Enterobacteriaceae*." *Current Pharmaceutical Design* 5(11): 881-894.
  120. Kuga, A., R. Okamoto, et al. (2000): "*ampR* gene mutations that greatly increase class C  $\beta$ -lactamase activity in *Enterobacter cloacae*." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 44(3): 561-567. DOI: 10.1128/aac.44.3.561-567.2000
  121. Korfmann, G. und C. C. Sanders (1989): "*ampG* is essential for high-level expression of AmpC  $\beta$ -lactamase in *Enterobacter cloacae*." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 33(11): 1946-1951. DOI: 10.1128/aac.33.11.1946
  122. Zamorano, L., T. M. Reeve, et al. (2011): "AmpG inactivation restores susceptibility of pan- $\beta$ -lactam-resistant *Pseudomonas aeruginosa* clinical strains." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 55(5): 1990-1996. DOI: 10.1128/aac.01688-10
  123. Honoré, N., M. H. Nicolas, et al. (1989): "Regulation of enterobacterial cephalosporinase production: the role of a membrane-bound sensory transducer." *Molecular Microbiology* 3(8): 1121-1130. DOI: 10.1111/j.1365-2958.1989.tb00262.x
  124. Mammeri, H. und P. Nordmann (2007): "Extended-spectrum cephalosporinases in *Enterobacteriaceae*." *Anti-Infective Agents in Medicinal Chemistry* 6: 71-82. DOI: 10.2174/187152107779314133
  125. Kaase, M. (2011): "Nachweis von Carbapenemasen im Jahr 2010." *Epidemiologisches Bulletin* 32: 301-304.
  126. Friedlaender, C. (1882): "Ueber die Schizomyceten bei der acuten fibrösen Pneumonie." *Virchows Archiv* 87(2): 319-324. DOI: 10.1007/bf01880516
  127. Trevisan, V. (1885): "Caratteri di alcuni nuovi generi di Batteriaceae [Charakteristika einiger, neuer Genera der Bacteriaceae]." *Atti della Accademia Fisio-Medico-Statistica di Milano* 4(3): 92-106.
  128. Klebs, E. (1875): "Beiträge zur Kenntniss der pathogenen Schizomyceten." *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 4(5): 409-488. DOI: 10.1007/bf01929859
  129. Brisse, S., F. Grimont, et al.: "The Genus *Klebsiella*." Kapitel 3.3.8 (S. 159-196) aus "The Prokaryotes". Herausgeber M. Dworkin, S. Falkow, E. Rosenberg, et al. Springer New York, 2006. DOI: 10.1007/0-387-30746-x\_8
  130. Chaves, J., M. G. Ladona, et al. (2001): "SHV-1  $\beta$ -lactamase is mainly a chromosomally encoded species-specific enzyme in *Klebsiella pneumoniae*." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 45(10): 2856-2861. DOI: 10.1128/aac.45.10.2856-2861.2001
-

- 
131. Haeggman, S., S. Lofdahl, et al. (2004): "Diversity and evolution of the class A chromosomal  $\beta$ -lactamase gene in *Klebsiella pneumoniae*." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 48(7): 2400-2408. DOI: 10.1128/aac.48.7.2400-2408.2004
  132. Nordmann, P., G. Cuzon, et al. (2009): "The real threat of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing bacteria." *The Lancet Infectious Diseases* 9(4): 228-236. DOI: 10.1016/s1473-3099(09)70054-4
  133. Timmerbeil, B. S., B. Saager, et al. (2007): "Nachweis eines Carbapenem-resistenten *Klebsiella-pneumoniae*-Isolats in Norddeutschland." *Chemotherapie Journal* 16(6): 186-188.
  134. Tellevik, M. G., J. E. Sollid, et al. (2007): "Extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-type SHV-12-producing *Enterobacteriaceae* causing septicemia in Tanzanian children: vectors for horizontal transfer of antimicrobial resistance." *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 59(3): 351-354. DOI: 10.1016/j.diagmicrobio.2007.06.015
  135. Heisig, P. und B. Wiedemann (1991): "Use of a broad-host-range *gyrA* plasmid for genetic characterization of fluoroquinolone-resistant Gram-negative bacteria." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 35(10): 2031-2036. DOI: 10.1128/aac.35.10.2031
  136. Martinez-Martinez, L., A. Pascual, et al. (1999): "Roles of  $\beta$ -lactamases and porins in activities of carbapenems and cephalosporins against *Klebsiella pneumoniae*." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 43(7): 1669-1673.
  137. Domenech-Sanchez, A., S. Hernandez-Alles, et al. (1999): "Identification and characterization of a new porin gene of *Klebsiella pneumoniae*: its role in  $\beta$ -lactam antibiotic resistance." *Journal of Bacteriology* 181(9): 2726-2732.
  138. Picao, R. C., S. S. Andrade, et al. (2008): "Metallo- $\beta$ -lactamase detection: comparative evaluation of double-disk synergy versus combined disk tests for IMP-, GIM-, SIM-, SPM-, or VIM-producing isolates." *Journal of Clinical Microbiology* 46(6): 2028-2037. DOI: 10.1128/jcm.00818-07
  139. Macrina, F. L., D. J. Kopecko, et al. (1978): "A multiple plasmid-containing *Escherichia coli* strain: convenient source of size reference plasmid molecules." *Plasmid* 1(3): 417-420. DOI: 10.1016/0147-619X(78)90056-2
  140. Pedraza, R. O. und J. C. Díaz Ricci (2002): "In-well cell lysis technique reveals two new megaplasmids of 103·0 and 212·6 MDa in the multiple plasmid-containing strain V517 of *Escherichia coli*." *Letters in Applied Microbiology* 34(2): 130-133. DOI: 10.1046/j.1472-765x.2002.01059.x
  141. Korfmann, G.: "Molekulargenetische Untersuchungen zur Regulation der *Enterobacter cloacae*  $\beta$ -Laktamase." Dissertation, Universität Bonn, 1988.
  142. Heisig, P. (1993): "High-level fluoroquinolone resistance in a *Salmonella* Typhimurium isolate due to alterations in both *gyrA* and *gyrB* genes." *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 32(3): 367-377. DOI: 10.1093/jac/32.3.367
-

143. Covarrubias, L. und F. Bolivar (1982): "Construction and characterization of new cloning vehicles VI. Plasmid pBR329, a new derivative of pBR328 lacking the 482-base-pair inverted duplication." *Gene* 17(1): 79-89. DOI: 10.1016/0378-1119(82)90103-2
144. Poirel, L., R. A. Bonnin, et al. (2012): "Genetic features of the widespread plasmid coding for the carbapenemase OXA-48." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 56(1): 559-562. DOI: 10.1128/aac.05289-11
145. Sörensen, S. P. L. (1909): "Über die Messung und die Bedeutung der Wasserstoffionenkonzentration bei enzymatischen Prozessen." *Biochemische Zeitschrift* 21.
146. Sörensen, S. P. L. (1909): "Ergänzung zu der Abhandlung: Enzymstudien II: Über die Messung und die Bedeutung der Wasserstoffionenkonzentration bei enzymatischen Prozessen." *Biochemische Zeitschrift* 22.
147. Naas, T., S. Massuard, et al. (2001): "AmpD is required for regulation of expression of NmcA, a carbapenem-hydrolyzing  $\beta$ -lactamase of *Enterobacter cloacae*." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 45(10): 2908-2915. DOI: 10.1128/aac.45.10.2908-2915.2001
148. Balázs, L., P. Laurent, et al. (2008): "Identification of PER-1 extended-spectrum  $\beta$ -lactamase producing *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates of the international clonal complex CC11 from Hungary and Serbia." *FEMS Immunology & Medical Microbiology* 54(3): 330-338. DOI: 10.1111/j.1574-695X.2008.00483.x
149. Perez-Perez, F. J. und N. D. Hanson (2002): "Detection of plasmid-mediated AmpC  $\beta$ -lactamase genes in clinical isolates by using multiplex PCR." *Journal of Clinical Microbiology* 40(6): 2153-2162. DOI: 10.1128/jcm.40.6.2153-2162.2002
150. Pagani, L., E. Dell'Amico, et al. (2003): "Multiple CTX-M-type extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in nosocomial isolates of *Enterobacteriaceae* from a hospital in northern Italy." *Journal of Clinical Microbiology* 41(9): 4264-4269. DOI: 10.1128/jcm.41.9.4264-4269.2003
151. Poirel, L., I. Le Thomas, et al. (2000): "Biochemical sequence analyses of GES-1, a novel class A extended-spectrum  $\beta$ -lactamase, and the class 1 integron In52 from *Klebsiella pneumoniae*." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 44(3): 622-632. DOI: 10.1128/aac.44.3.622-632.2000
152. Ellington, M. J., J. Kistler, et al. (2007): "Multiplex PCR for rapid detection of genes encoding acquired metallo- $\beta$ -lactamases." *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 59(2): 321-322. DOI: 10.1093/jac/dkl481
153. Bradford, P. A., S. Bratu, et al. (2004): "Emergence of carbapenem-resistant *Klebsiella* species possessing the class A carbapenem-hydrolyzing KPC-2 and inhibitor-resistant TEM-30  $\beta$ -lactamases in New York City." *Clinical Infectious Diseases* 39(1): 55-60. DOI: 10.1086/421495

- 
154. Limbago, B., J. K. Rasheed, et al.: "Recognition of NDM-1 among *Enterobacteriaceae* in the United States." 50th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy (2010), Boston, Massachusetts.
  155. Steward, C. D., J. K. Rasheed, et al. (2001): "Characterization of clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* from 19 laboratories using the National Committee for Clinical Laboratory Standards extended-spectrum  $\beta$ -lactamase detection methods." *Journal of Clinical Microbiology* 39(8): 2864-2872. DOI: 10.1128/jcm.39.8.2864-2872.2001
  156. Wang, R. F. und S. R. Kushner (1991): "Construction of versatile low-copy-number vectors for cloning, sequencing and gene expression in *Escherichia coli*." *Gene* 100: 195-199. DOI: 10.1016/0378-1119(91)90366-j
  157. Robicsek, A., J. Strahilevitz, et al. (2006): "*qnr* prevalence in ceftazidime-resistant *Enterobacteriaceae* isolates from the United States." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 50(8): 2872-2874. DOI: 10.1128/aac.01647-05
  158. Kehrenberg, C., S. Friederichs, et al. (2006): "Identification of the plasmid-borne quinolone resistance gene *qnrS* in *Salmonella enterica* serovar Infantis." *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 58(1): 18-22. DOI: 10.1093/jac/dkl213
  159. Aubert, D., T. Naas, et al. (2006): "Functional characterization of IS1999, an IS4 family element involved in mobilization and expression of  $\beta$ -lactam resistance genes." *Journal of Bacteriology* 188(18): 6506-6514. DOI: 10.1128/jb.00375-06
  160. bioMérieux, Bedienungsanleitung "Etest<sup>®</sup> MBL". Version vom März 2011.
  161. Birnboim, H. C. und J. Doly (1979): "A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA." *Nucleic Acids Research* 7(6): 1513-1523. DOI: 10.1093/nar/7.6.1513
  162. Domenico, P., J. L. Marx, et al. (1992): "Rapid plasmid DNA isolation from mucoid Gram-negative bacteria." *Journal of Clinical Microbiology* 30(11): 2859-2863.
  163. Kado, C. I. und S. T. Liu (1981): "Rapid procedure for detection and isolation of large and small plasmids." *Journal of Bacteriology* 145(3): 1365-1373.
  164. Toranzo, A. E., J. L. Barja, et al. (1983): "Characterization of plasmids in bacterial fish pathogen." *Infection and Immunity* 39(1): 184-192.
  165. Crosa, J. H., M. E. Tomalsky, et al.: "Plasmids." Kapitel 16.1.3.1 (S. 371-372) aus "Methods for General and Molecular Bacteriology". Herausgeber P. Gerhardt. American Society for Microbiology, 1994.
  166. Med-Vet-Net: "Guidelines for plasmid characterisation."  
[http://www.medvetnet.org/pdf/Public\\_Reports/D9-4.pdf](http://www.medvetnet.org/pdf/Public_Reports/D9-4.pdf)
  167. Barton, B. M., G. P. Harding, et al. (1995): "A general method for detecting and sizing large plasmids." *Analytical Biochemistry* 226(2): 235-240. DOI: 10.1006/abio.1995.1220
-

168. Germond, J. E., V. M. Vogt, et al. (1974): "Characterization of the single-strand-specific nuclease S<sub>1</sub> activity on double-stranded supercoiled polyoma DNA." *European Journal of Biochemistry* 43(3): 591-600. DOI: 10.1111/j.1432-1033.1974.tb03446.x
169. Saiki, R., S. Scharf, et al. (1985): "Enzymatic amplification of  $\beta$ -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia." *Science* 230(4732): 1350-1354. DOI: 10.1126/science.2999980
170. Timmerbeil, B. S.: "Entwicklung eines Pyrosequencing<sup>TM</sup>-basierten Verfahrens zum genetischen Nachweis der in Europa prävalenten extended-spectrum  $\beta$ -lactamases (ESBLs) sowie Identifizierung und biochemische Charakterisierung der neuen *bla*<sub>TEM</sub>-Variante TEM-142." Dissertation, Universität Hamburg, 2007.
171. Sanger, F., S. Nicklen, et al. (1977): "DNA sequencing with chain-terminating inhibitors." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America PNAS* 74(12): 5463-5467.
172. Schwartz, D. C., W. Saffran, et al. (1983): "New techniques for purifying large DNAs and studying their properties and packaging." *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* 47: 189-195. DOI: 10.1101/sqb.1983.047.01.024
173. Maule, J. (1998): "Pulsed-field gel electrophoresis." *Molecular Biotechnology* 9(2): 107-126. DOI: 10.1007/BF02760813
174. Chu, G., D. Vollrath, et al. (1986): "Separation of large DNA molecules by contour-clamped homogeneous electric fields." *Science* 234(4783): 1582-1585. DOI: 10.1126/science.3538420
175. Snyder, L. und W. Champness: "Molecular Genetics of Bacteria." ASM Press, 3. Auflage, 2007.
176. Willetts, N., J. Grinsted, et al.: "Conjugation." Kapitel 3 (S. 49-77) aus "Methods in Microbiology", Ausgabe 21. Academic Press, 1988. DOI: 10.1016/S0580-9517(08)70070-9
177. Fournet-Fayard, S., B. Joly, et al. (1995): "Transformation of wild type *Klebsiella pneumoniae* with plasmid DNA by electroporation." *Journal of Microbiological Methods* 24(1): 49-54. DOI: 10.1016/0167-7012(95)00053-4
178. Carlone, G. M., M. L. Thomas, et al. (1986): "Rapid microprocedure for isolating detergent-insoluble outer membrane proteins from *Haemophilus* species." *Journal of Clinical Microbiology* 24(3): 330-332.
179. Kampen, I.: "Einfluss der Zellaufschlussmethode auf die Expanded Bed Chromatographie." Dissertation, Technische Universität Braunschweig, 2005.
180. Ames, G. F., C. Prody, et al. (1984): "Simple, rapid, and quantitative release of periplasmic proteins by chloroform." *Journal of Bacteriology* 160(3): 1181-1183.

- 
181. Lall, S. D., B. E. Eriho, et al. (1989): "Comparison for four methods for extracting periplasmic proteins." *Journal of Microbiological Methods* 9(3): 195-199. DOI: 10.1016/0167-7012(89)90036-5
  182. Arstila, T., G. A. Jacoby, et al. (1993): "Evaluation of five different methods to prepare bacterial extracts for the identification of  $\beta$ -lactamases by isoelectric focusing." *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 32(6): 809-816. DOI: 10.1093/jac/32.6.809
  183. Huovinen, S. (1988): "Rapid isoelectric focusing of plasmid-mediated  $\beta$ -lactamases with Pharmacia PhastSystem." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 32(11): 1730-1732. DOI: 10.1128/aac.32.11.1730
  184. Remy, I., G. Ghaddar, et al. (2007): "Using the  $\beta$ -lactamase protein-fragment complementation assay to probe dynamic protein-protein interactions." *Nature Protocols* 2(9): 2302-2306. DOI: 10.1038/nprot.2007.356
  185. Pagani, L., F. Luzzaro, et al. (1994): "Outbreak of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase producing *Serratia marcescens* in an intensive care unit." *FEMS Immunology & Medical Microbiology* 10(1): 39-46. DOI: 10.1111/j.1574-695x.1994.tb00009.x
  186. Mudaliar, U. A., N. I. Furyk, et al. (1996): "In Vitro Activity Of Meropenem Compared To Nine Other Antimicrobial Agents: Importance of its stability when used in agar dilution systems." *Pathology* 28(4): 352-355. DOI: 10.1080/00313029600169334
  187. Zhao, W. H. und Z. Q. Hu (2011): "Epidemiology and genetics of VIM-type metallo- $\beta$ -lactamases in Gram-negative bacilli." *Future Microbiology* 6(3): 317-333. DOI: 10.2217/fmb.11.13
  188. Sally, R. P., T. Guy, et al. (2009): "Gene cassettes and cassette arrays in mobile resistance integrons." *FEMS Microbiology Reviews* 33(4): 757-784. DOI: 10.1111/j.1574-6976.2009.00175.x
  189. Macherey-Nagel, Bedienungsanleitung "NucleoSpin<sup>®</sup> Extract II (PCR clean-up, Gel extraction)". Version vom Mai 2010, Revision 10.
  190. Ren, Y., Y. Ren, et al. (2010): "Complete genome sequence of *Enterobacter cloacae* subsp. *cloacae* type strain ATCC 13047." *Journal of Bacteriology* 192(9): 2463-2464. DOI: 10.1128/jb.00067-10
  191. Lindberg, F., S. Lindquist, et al. (1987): "Inactivation of the *ampD* gene causes semiconstitutive overproduction of the inducible *Citrobacter freundii*  $\beta$ -lactamase." *Journal of Bacteriology* 169(5): 1923-1928.
  192. Normark, S. und L. G. Burman (1977): "Resistance of *Escherichia coli* to penicillins: fine-structure mapping and dominance of chromosomal  $\beta$ -lactamase mutations." *Journal of Bacteriology* 132(1): 1-7.
  193. Kopp, U., B. Wiedemann, et al. (1993): "Sequences of wild-type and mutant *ampD* genes of *Citrobacter freundii* and *Enterobacter cloacae*." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 37(2): 224-228. DOI: 10.1128/aac.37.2.224
-

194. Balcewich, M. D., T. M. Reeve, et al. (2010): "Crystal structure of the AmpR effector binding domain provides insight into the molecular regulation of inducible AmpC  $\beta$ -lactamase." *Journal of Molecular Biology* 400(5): 998-1010. DOI: 10.1016/j.jmb.2010.05.040
  195. Tsai, Y.-K., C.-P. Fung, et al. (2011): "*Klebsiella pneumoniae* outer membrane porins OmpK35 and OmpK36 play roles in both antimicrobial resistance and virulence." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 55(4): 1485-1493. DOI: 10.1128/aac.01275-10
  196. Domenech-Sanchez, A., L. Martinez-Martinez, et al. (2003): "Role of *Klebsiella pneumoniae* OmpK35 porin in antimicrobial resistance." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 47(10): 3332-3335. DOI: 10.1128/aac.47.10.3332-3335.2003
  197. Pichardo, C., M. Del Carmen Conejo, et al. (2005): "Activity of cefepime and carbapenems in experimental pneumonia caused by porin-deficient *Klebsiella pneumoniae* producing FOX-5  $\beta$ -lactamase." *Clinical Microbiology and Infection* 11(1): 31-38. DOI: 10.1111/j.1469-0691.2004.01018.x
  198. Migliavacca, R., J.-D. Docquier, et al. (2002): "Simple microdilution test for detection of metallo- $\beta$ -lactamase production in *Pseudomonas aeruginosa*." *Journal of Clinical Microbiology* 40(11): 4388-4390. DOI: 10.1128/jcm.40.11.4388-4390.2002
  199. Cornaglia, G., M. Akova, et al. (2007): "Metallo- $\beta$ -lactamases as emerging resistance determinants in Gram-negative pathogens: open issues." *International Journal of Antimicrobial Agents* 29(4): 380-388. DOI: 10.1016/j.ijantimicag.2006.10.008
  200. Giakkoupi, P., S. Vourli, et al. (2008): "Supplementation of growth media with Zn<sup>2+</sup> facilitates detection of VIM-2-producing *Pseudomonas aeruginosa*." *Journal of Clinical Microbiology* 46(4): 1568-1569. DOI: 10.1128/jcm.02345-07
  201. Lee, K., Y. S. Lim, et al. (2003): "Evaluation of the Hodge test and the imipenem-EDTA double-disk synergy test for differentiating metallo- $\beta$ -lactamase-producing isolates of *Pseudomonas* spp. and *Acinetobacter* spp." *Journal of Clinical Microbiology* 41(10): 4623-4629. DOI: 10.1128/jcm.41.10.4623-4629.2003
  202. Tato, M., T. M. Coque, et al. (2010): "Dispersal of carbapenemase *bla*<sub>VIM-1</sub> gene associated with different Tn402 variants, mercury transposons, and conjugative plasmids in *Enterobacteriaceae* and *Pseudomonas aeruginosa*." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 54(1): 320-327. DOI: 10.1128/aac.00783-09
  203. Tenover, F. C., R. D. Arbeit, et al. (1995): "Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing." *J Clin Microbiol* 33(9): 2233-2239.
  204. Petrosino, J. F., A. R. Pendleton, et al. (2002): "Chromosomal system for studying AmpC-mediated  $\beta$ -lactam resistance mutation in *Escherichia coli*." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 46(5): 1535-1539. DOI: 10.1128/aac.46.5.1535-1539.2002
-

- 
205. Livermore, D. M. (1987): "Clinical significance of  $\beta$ -lactamase induction and stable derepression in Gram-negative rods." *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases* 6(4): 439-445. DOI: 10.1007/bf02013107
  206. Galleni, M. und J. M. Frere (1988): "A survey of the kinetic parameters of class C  $\beta$ -lactamases. Penicillins." *Biochemical Journal* 255(1): 119-122.
  207. Sanders, C. C. und W. E. S. Jr (1986): "Type I  $\beta$ -lactamases of Gram-negative bacteria: interactions with  $\beta$ -lactam antibiotics." *The Journal of Infectious Diseases* 154(5): 792-800. DOI: 10.1093/infdis/154.5.792
  208. Galleni, M., G. Amicosante, et al. (1988): "A survey of the kinetic parameters of class C  $\beta$ -lactamases. Cephalosporins and other  $\beta$ -lactam compounds." *Biochemical Journal* 255(1): 123-129.
  209. Minami, S., A. Yotsuji, et al. (1980): "Induction of  $\beta$ -lactamase by various  $\beta$ -lactam antibiotics in *Enterobacter cloacae*." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 18(3): 382-385. DOI: 10.1128/aac.18.3.382
  210. Alba, J., Y. Ishii, et al. (2002): "Cefcapene inactivates chromosome-encoded class C  $\beta$ -lactamases." *Journal of Infection and Chemotherapy* 8(3): 207-210. DOI: 10.1007/s10156-002-0177-7
  211. Babini, G. S., M. Yuan, et al. (1998): "Interactions of  $\beta$ -lactamases with sanfetrinem (GV 104326) compared to those with imipenem and with oral  $\beta$ -lactams." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 42(5): 1168-1175.
  212. Barnaud, G., R. Labia, et al. (2001): "Extension of resistance to cefepime and ceftiofime associated to a six amino acid deletion in the H-10 helix of the cephalosporinase of an *Enterobacter cloacae* clinical isolate." *FEMS Microbiology Letters* 195(2): 185-190. DOI: 10.1111/j.1574-6968.2001.tb10519.x
  213. Queenan, A. M., W. Shang, et al. (2007): "Interactions of ceftobiprole with  $\beta$ -lactamases from molecular classes A to D." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 51(9): 3089-3095. DOI: 10.1128/aac.00218-07
  214. Barradell, L. B. und H. M. Bryson (1994): "Cefepime. A review of its antibacterial activity, pharmacokinetic properties and therapeutic use." *Drugs* 47(3): 471-505.
  215. Kobayashi, S., S. Arai, et al. (1986): " $\beta$ -lactamase stability of ceftiofime (HR 810), a new cephalosporin with a broad antimicrobial spectrum." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 30(5): 713-718. DOI: 10.1128/aac.30.5.713
  216. Juan, C., M. D. Macia, et al. (2005): "Molecular mechanisms of  $\beta$ -lactam resistance mediated by AmpC hyperproduction in *Pseudomonas aeruginosa* clinical strains." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 49(11): 4733-4738. DOI: 10.1128/aac.49.11.4733-4738.2005
-

217. Liepinsh, E., C. Génereux, et al. (2003): "NMR structure of *Citrobacter freundii* AmpD, comparison with bacteriophage T7 lysozyme and homology with PGRP domains." *Journal of Molecular Biology* 327(4): 833-842. DOI: 10.1016/s0022-2836(03)00185-2
218. Carrasco-López, C., A. Rojas-Altuve, et al. (2011): "Crystal structures of bacterial peptidoglycan amidase AmpD and an unprecedented activation mechanism." *Journal of Biological Chemistry* 286(36): 31714-31722. DOI: 10.1074/jbc.m111.264366
219. Kyte, J. und R. F. Doolittle (1982): "A simple method for displaying the hydropathic character of a protein." *Journal of Molecular Biology* 157(1): 105-132. DOI: 10.1016/0022-2836(82)90515-0
220. Levast, M., L. Poirel, et al. (2011): "Transfer of OXA-48-positive carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* from Turkey to France." *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 66(4): 944-945. DOI: 10.1093/jac/dkq504
221. Kaase, M., A. Hoffmann, et al.: "Spread of *K. pneumoniae* Isolates harbouring the OXA-48 Carbapenemase in Germany." Abstract C2-715, 50th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy (2010), Boston, Massachusetts.
222. Goering, R. V. (2010): "Pulsed field gel electrophoresis: a review of application and interpretation in the molecular epidemiology of infectious disease." *Infection, Genetics and Evolution* 10(7): 866-875. DOI: 10.1016/j.meegid.2010.07.023
223. van Belkum, A., P. T. Tassios, et al. (2007): "Guidelines for the validation and application of typing methods for use in bacterial epidemiology." *Clinical Microbiology and Infection* 13(s3): 1-46. DOI: 10.1111/j.1469-0691.2007.01786.x
224. Siguier, P., J. Perochon, et al. (2006): "ISfinder: the reference centre for bacterial insertion sequences." *Nucleic Acids Research* 34 (Database issue): D32-D36. DOI: 10.1093/nar/gkj014 (<http://www-is.biotoul.fr>)
225. Mahillon, J. und M. Chandler (1998): "Insertion sequences." *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 62(3): 725-774.
226. Chandler, M. und J. Mahillon: "Insertion Sequences Revisited." Kapitel 15 aus "Mobile DNA II". Herausgeber N. L. Craig, R. Craigie, M. Gellert, et al. ASM Press, 2002.
227. Galas, D. J. und M. Chandler: "Bacterial Insertion Sequences." Kapitel 4 aus "Mobile DNA". Herausgeber D. E. Berg und M. M. Howe. American Society for Microbiology, 1989.
228. Hernandez-Alles, S., V. J. Benedi, et al. (1999): "Development of resistance during antimicrobial therapy caused by insertion sequence interruption of porin genes." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 43(4): 937-939.
229. Galas, D. J., M. P. Calos, et al. (1980): "Sequence analysis of Tn9 insertions in the *lacZ* gene." *Journal of Molecular Biology* 144(1): 19-41. DOI: 10.1016/0022-2836(80)90213-2
-

- 
230. Matsutani, S. (1997): "Genetic analyses of the interactions of the IS1-encoded proteins with the left end of IS1 and its insertion hotspot." *Journal of Molecular Biology* 267(3): 548-560. DOI: 10.1006/jmbi.1996.0894
231. Kaase, M. (2011): "Zum Auftreten von *Enterobacteriaceae* mit OXA-48-Carbapenemase in Deutschland." *Epidemiologisches Bulletin* 32: 304-306.
232. Hernandez-Alles, S., S. Alberti, et al. (1999): "Porin expression in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*." *Microbiology* 145(3): 673-679. DOI: 10.1099/13500872-145-3-673
233. Gülmez, D., N. Woodford, et al. (2008): "Carbapenem-resistant *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates from Turkey with OXA-48-like carbapenemases and outer membrane protein loss." *International Journal of Antimicrobial Agents* 31(6): 523-526. DOI: 10.1016/j.ijantimicag.2008.01.017
234. Raimondi, A., A. Traverso, et al. (1991): "Imipenem- and meropenem-resistant mutants of *Enterobacter cloacae* and *Proteus rettgeri* lack porins." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 35(6): 1174-1180. DOI: 10.1128/aac.35.6.1174
235. Carattoli, A., A. Bertini, et al. (2005): "Identification of plasmids by PCR-based replicon typing." *Journal of Microbiological Methods* 63(3): 219-228. DOI: 10.1016/j.mimet.2005.03.018
236. Persönliche Korrespondenz mit Dr. Laurent Poirel.
237. Vallenet, D., P. Nordmann, et al. (2008): "Comparative analysis of *Acinetobacters*: three genomes for three lifestyles." *PLoS ONE* 3(3): e1805. DOI: 10.1371/journal.pone.0001805
238. Barbe, V., D. Vallenet, et al. (2004): "Unique features revealed by the genome sequence of *Acinetobacter* sp. ADP1, a versatile and naturally transformation competent bacterium." *Nucleic Acids Research* 32(19): 5766-5779. DOI: 10.1093/nar/gkh910
239. Petty, N. K., R. Bulgin, et al. (2010): "The *Citrobacter rodentium* genome sequence reveals convergent evolution with human pathogenic *Escherichia coli*." *Journal of Bacteriology* 192(2): 525-538. DOI: 10.1128/jb.01144-09
240. Ehrhardt, A. F., C. C. Sanders, et al. (1996): "Sequencing and analysis of four new *Enterobacter ampD* alleles." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 40(8): 1953-1956.
241. Johnson, T. J., S. Kariyawasam, et al. (2007): "The genome sequence of avian pathogenic *Escherichia coli* strain O1:K1:H7 shares strong similarities with human extraintestinal pathogenic *E. coli* genomes." *Journal of Bacteriology* 189(8): 3228-3236. DOI: 10.1128/jb.01726-06
242. Ferenci, T., Z. Zhou, et al. (2009): "Genomic sequencing reveals regulatory mutations and recombinational events in the widely used MC4100 lineage of *Escherichia coli* K-12." *Journal of Bacteriology* 191(12): 4025-4029. DOI: 10.1128/jb.00118-09
-

243. Welch, R. A., V. Burland, et al. (2002): "Extensive mosaic structure revealed by the complete genome sequence of uropathogenic *Escherichia coli*." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America PNAS 99(26): 17020-17024. DOI: 10.1073/pnas.252529799
244. Durfee, T., R. Nelson, et al. (2008): "The complete genome sequence of *Escherichia coli* DH10B: insights into the biology of a laboratory workhorse." Journal of Bacteriology 190(7): 2597-2606. DOI: 10.1128/jb.01695-07
245. Blattner, F. R., G. Plunkett, et al. (1997): "The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12." Science 277(5331): 1453-1462. DOI: 10.1126/science.277.5331.1453
246. Ogura, Y., T. Ooka, et al. (2009): "Comparative genomics reveal the mechanism of the parallel evolution of O157 and non-O157 enterohemorrhagic *Escherichia coli*." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America PNAS 106(42): 17939-17944. DOI: 10.1073/pnas.0903585106
247. Iguchi, A., N. R. Thomson, et al. (2009): "Complete genome sequence and comparative genome analysis of enteropathogenic *Escherichia coli* O127:H6 strain E2348/69." Journal of Bacteriology 191(1): 347-354. DOI: 10.1128/jb.01238-08
248. Perna, N. T., G. Plunkett, et al. (2001): "Genome sequence of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7." Nature 409(6819): 529-533. DOI: 10.1038/35054089
249. Kulasekara, B. R., M. Jacobs, et al. (2009): "Analysis of the genome of the *Escherichia coli* O157:H7 2006 spinach-associated outbreak isolate indicates candidate genes that may enhance virulence." Infection and Immunity 77(9): 3713-3721. DOI: 10.1128/iai.00198-09
250. Zhou, Z., X. Li, et al. (2010): "Derivation of *Escherichia coli* O157:H7 from its O55:H7 precursor." PLoS ONE 5(1): e8700. DOI: 10.1371/journal.pone.0008700
251. Touchon, M., C. Hoede, et al. (2009): "Organised genome dynamics in the *Escherichia coli* species results in highly diverse adaptive paths." PLoS Genetics 5(1): e1000344. DOI: 10.1371/journal.pgen.1000344
252. Fricke, W. F., M. S. Wright, et al. (2008): "Insights into the environmental resistance gene pool from the genome sequence of the multidrug-resistant environmental isolate *Escherichia coli* SMS-3-5." Journal of Bacteriology 190(20): 6779-6794. DOI: 10.1128/jb.00661-08
253. Chen, S. L., C. S. Hung, et al. (2006): "Identification of genes subject to positive selection in uropathogenic strains of *Escherichia coli*: a comparative genomics approach." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America PNAS 103(15): 5977-5982. DOI: 10.1073/pnas.0600938103
254. Fouts, D. E., H. L. Tyler, et al. (2008): "Complete genome sequence of the N<sub>2</sub>-fixing broad host range endophyte *Klebsiella pneumoniae* 342 and virulence predictions verified in mice." PLoS Genetics 4(7): e1000141. DOI: 10.1371/journal.pgen.1000141
-

- 
255. Wu, K. M., L. H. Li, et al. (2009): "Genome sequencing and comparative analysis of *Klebsiella pneumoniae* NTUH-K2044, a strain causing liver abscess and meningitis." *Journal of Bacteriology* 191(14): 4492-4501. DOI: 10.1128/jb.00315-09
256. Peng, J., L. Yang, et al. (2008): "Characterization of ST-4821 complex, a unique *Neisseria meningitidis* clone." *Genomics* 91(1): 78-87. DOI: 10.1016/j.ygeno.2007.10.004
257. Winstanley, C., M. G. I. Langille, et al. (2009): "Newly introduced genomic prophage islands are critical determinants of in vivo competitiveness in the Liverpool Epidemic Strain of *Pseudomonas aeruginosa*." *Genome Research* 19(1): 12-23. DOI: 10.1101/gr.086082.108
258. Roy, P. H., S. G. Tetu, et al. (2010): "Complete genome sequence of the multiresistant taxonomic outlier *Pseudomonas aeruginosa* PA7." *PLoS ONE* 5(1): e8842. DOI: 10.1371/journal.pone.0008842
259. Stover, C. K., X. Q. Pham, et al. (2000): "Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen." *Nature* 406(6799): 959-964. DOI: 10.1038/35023079
260. Lee, D., J. Urbach, et al. (2006): "Genomic analysis reveals that *Pseudomonas aeruginosa* virulence is combinatorial." *Genome Biology* 7(10): R90. DOI: 10.1186/gb-2006-7-10-r90
261. Nelson, K. E., C. Weinel, et al. (2002): "Complete genome sequence and comparative analysis of the metabolically versatile *Pseudomonas putida* KT2440." *Environmental Microbiology* 4(12): 799-808. DOI: 10.1046/j.1462-2920.2002.00366.x
262. Thomson, N. R., D. J. Clayton, et al. (2008): "Comparative genome analysis of *Salmonella* Enteritidis PT4 and *Salmonella* Gallinarum 287/91 provides insights into evolutionary and host adaptation pathways." *Genome Research* 18(10): 1624-1637. DOI: 10.1101/gr.077404.108
263. McClelland, M., K. E. Sanderson, et al. (2004): "Comparison of genome degradation in Paratyphi A and Typhi, human-restricted serovars of *Salmonella enterica* that cause typhoid." *Nature Genetics* 36(12): 1268-1274. DOI: 10.1038/ng1470
264. Parkhill, J., G. Dougan, et al. (2001): "Complete genome sequence of a multiple drug resistant *Salmonella enterica* serovar Typhi CT18." *Nature* 413(6858): 848-852. DOI: 10.1038/35101607
265. Deng, W., S. R. Liou, et al. (2003): "Comparative genomics of *Salmonella enterica* serovar Typhi strains Ty2 and CT18." *Journal of Bacteriology* 185(7): 2330-2337. DOI: 10.1128/jb.185.7.2330-2337.2003
266. McClelland, M., K. E. Sanderson, et al. (2001): "Complete genome sequence of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium LT2." *Nature* 413(6858): 852-856. DOI: 10.1038/35101614
-

267. Parkhill, J., B. W. Wren, et al. (2001): "Genome sequence of *Yersinia pestis*, the causative agent of plague." *Nature* 413(6855): 523-527. DOI: 10.1038/35097083

## 9 Anhänge

Bei Sequenzen sind Unterschiede einzelner Basen gegenüber einer Referenzsequenz **ockerfarben** hervorgehoben. Zusammengehörende bzw. funktionale Sequenzabschnitte sind durch farbliche Abhebung, Umrandung oder Unterstreichung kenntlich gemacht.

Tabelle 9–1: Farbcodierung in DNA- und Protein-Alignments

	Vordergrund	Hintergrund	Beispiel
<b>nicht ähnlich zum Konsensus</b>	schwarz	weiß	CGA TAG GC
<b>Konsensus in einem Block</b>	blau	türkis	TT TAT
<b>100 % Konsensus</b>	rot	gelb	TID TLD TLN
<b>ähnlicher Block (&gt;50 %)</b>	schwarz	grün	TID TLD TLN
<b>bedingt ähnlich zum Konsensus</b>	grün	weiß	TID TLD TLN

### 9.1 Anhang I: Integron-Sequenz von pVIM(Ecl19968)

```

1          GCCGTGGGTC GATGTTTGAT GTTATGGAGC AGCAACGATG TTACGCAGCA GGGCAGTCGC CCTAAAAACA AGTTATGCCG CACCCACCCC TATGGAGTCT 100
101      TGATGTAAA AGTTATTAGT AGTTATTGG TCTACATGAC CGCGTCTGTC ATGGCTGTGC CAAGTCCGTT AGCCCATTC CAGGAGCCGA GTGGTGGTA 200
201      TCCGACAGTC AACGAAATTC CGGTCGGAGA GGTCCGACTT TACCAGATTG CCGATGGTGT TTGGTCGCAT ATCGCAACGC AGTCGTTTGA TGGCGCGTC 300
301      TACCCGTCCA ATGGTCTCAT TGTCCGTGAT GGTGATGAGT TGCTTTTGAT TGATACAGCG TGGGGTGC GA AACACAGC GGCACCTCTC GCGGAGATTG 400
401      AAAAGCAAAT TGGACTTCCC GTAACGCGTG CAGTCTCCAC GCACTTTCAT GACGACCGCG TCGGCGGCGT TGATGTCTT CAGGCGGCTG GGGTGGCAAC 500
          blaVIM-1
501      GTACGCATCA CCGTCGACAC GCCGGCTAGC CGAGGCAGAG GGAACGAGA TTCCCAGCA TTCTCTAGAA GGACTCTCAT CGAGCGGGGA CGCAGTGCCG 600
601      TTCGGTCCAG TAGAGCTCTT CTATCCTGGT GCTGCGCATT CGACCGACAA TCTGGTTGTA TACGTCCCGT CAGCGAACGT GCTATACGGT GGTGTGCGCG 700
701      TTCATGAGTT GTCAAGCAGC TCTGCGGGGA ACGTGGCCGA TGCCGATCTG GCTGAATGGC CCACCTCCGT TGAGCGGATT CAAAAACACT ACCCGGAAGC 800
801      AGAGGTCGTC ATTCCCGGGC ACGGTCTACC GGGCGGTCTA GACTTGCTCC AGCACACAGC GAACGTTGTC AAAGCACACA AAAATCGCTC AGTCGCCGAG 900
901      TAGCAGATGC GGCATAACAA ATCGTTGGAG CGGGACTTTT GCTACGCAGG CTGCGCCTAC TCCGCAAAAG CCCCTCAACT CAGGCGTTAG GCATCACAAA 1000
1001     GTACAGCATC GTGACCAACA GCAACGATTC CGTCACACTG CGCCTCATGA CTGAGCATGA CCTTGCATG CTCTATGAGT GGCTAAATCG ATCTCATATC 1100
1101     GTCGAGTGGT GGGCGGAGA AGAAGCAGC CCGACACTTG CTGACGTACA GGAACAGTAC TTGCCAAGCG TTTTAGCGCA AGAGTCCGTC ACTCCATACA 1200

```

```

1201                                     1300
TTGCAATGCT GAATGGAGAG CCGATTGGGT ATGCCAGTC GTACGTTGCT CTTGGAAGCG GGGACGGATG GTGGGAAGAA GAAACCGATC CAGGAGTACG
aacA4
1301                                     1400
CGGAATAGAC CAGTCACTGG CGAATGCATC ACAACTGGGC AAAGGCTTGG GAACCAAGCT GGTTCGAGCA CTGGTTGAGT TGCTGTTCAA TGATCCCGAG
1401                                     1500
GTCACCAAGA TCCAAACGGA CCCGTCGCCG AGCAACTTGC GAGCGATCCG ATGCTACGAG AAAGCGGGGT TTGAGAGGCA AGGTACCCTA ACCACCCAG
1501                                     1600
ATGGTCCAGC CGTGTACATG GTTCAAACAC GCCAGGCATT CGAGCGAACA CGCAGTGATG CCTAACCCCTT CCATCGAGGG GGACGTCCAA GGGCTGGCGC
1601                                     1700
CCTTGGCCCG CCCTCATGTC AAACGTTAAA CATCATGAGG GAAGCGGTGA TCGCCGAAGT ATCGACTCAA CTATCAGAGG TAGTTGGCGT CATCGAGCGC
1701                                     1800
CATCTCGAAC CGACGTTGCT GGCCGTACAT TTGTACGGCT CCGCAGTGA TGGCGGCTG AAGCCACACA GTGATATTGA TTTGCTGGTT ACGGTGACCC
1801                                     1900
TAAGGCTTGA TGAAACAACG CGGCGAGCTT TGATCAACGA CCTTTTGAA ACTTCGGCTT CCCCTGGAGA GAGCGAGATT CTCCGCGCTG TAGAAGTCAC
1901                                     2000
CATTGTTGTG CACGACGACA TCATTCCGTG GCGTTATCCA GCTAAGCGCG AACTGCAATT TGGAGAATGG CAGCGCAATG ACATTCTTGC AGGTATCTTC
2001                                     2100
GAGCCAGCCA CGATCGACAT TGATCTGGCT ATCTTGCTGA CAAAAGCAAG AGAACATAGC GTTGCCTTGG TAGGTCCAGC GGCGGAGGAA CTCTTTGATC
aadA1
2101                                     2200
CGGTTCTCTGA ACAGGATCTA TTTGAGGCGC TAAATGAAAC CTTAACGCTA TGGAACTCGC CGCCCGACTG GGCTGGCGAT GAGCGAAATG TAGTGCTTAC
2201                                     2300
GTTGTCCCGC ATTTGGTACA GCGCAGTAAC CGGCAGAATC GCGCCGAAGG ATGTCGCTGC CCACTGGGCA ATGGAGCGCC TGCCGGCCCA GTATCAGCCC
2301                                     2400
GTCATACTTG AAGCTAGACA GGCTTATCTT GGACAAGAAG AAGATCGCTT GGCTCGCGC GCAGATCAGT TGGAAGAATT TGTTCACTAC GTGAAAGGCG
2401                                     2460
AGATCACCAA GGTAGTCGGC AAATAATGTC TAACTCAAGC GTTAGATGCA CTAAGCACAT

```

## 9.2 Anhang II: ampD-Alignment

Tabelle 9–2: für das ampD-Alignment verwendete Sequenzen aus der GenBank

Stamm	Bez.	GenBank-ID	Referenz
<i>A. baumannii</i>	AYE	CU459141	[237]
<i>A. baumannii</i>	SDF	CU468230	[237]
<i>Acinetobacter</i> sp.	ADP1	CR543861	[238]
<i>Citrobacter rodentium</i>	ICC168	FN543502	[239]
<i>E. cloacae</i>	029	U40785	[240]
<i>E. cloacae</i>	ATCC 13047	CP001918	[190]
<i>E. cloacae</i>	NCTC 9394	FP929040	-
<i>E. cloacae</i>	SCF1	CP002272	-
<i>Enterobacter</i> sp.	638	CP000653	-
<i>E. coli</i>	55989	CU928145	-
<i>E. coli</i>	APEC O1	CP000468	[241]
<i>E. coli</i>	B str. REL606	CP000819	-
<i>E. coli</i>	BW2952	CP001396	[242]
<i>E. coli</i>	CFT073	AE014075	[243]
<i>E. coli</i>	E24377A	CP000800	-

Stamm	Bez.	GenBank-ID	Referenz
<i>E. coli</i>	ED1a	CU928162	-
<i>E. coli</i>	HS	CP000802	-
<i>E. coli</i>	IAI1	CU928160	-
<i>E. coli</i>	IAI39	CU928164	-
<i>E. coli</i>	K-12 DH10B	CP000948	[244]
<i>E. coli</i>	K-12 MG1655	U00096	[245]
<i>E. coli</i>	O103:H2 str. 12009	AP010958	[246]
<i>E. coli</i>	O111:H- str. 11128	NC_013364	[246]
<i>E. coli</i>	O127:H6 str. E2348/69	NC_011601	[247]
<i>E. coli</i>	O157:H7 str. EC4115	NC_011353	-
<i>E. coli</i>	O157:H7 str. EDL933	NC_002655	[248]
<i>E. coli</i>	O157:H7 str. TW14359	NC_013008	[249]
<i>E. coli</i>	O26:H11 str. 11368	NC_013361	[246]
<i>E. coli</i>	O55:H7 str. CB9615	NC_013941	[250]
<i>E. coli</i>	S88	NC_011742	[251]
<i>E. coli</i>	SMS-3-5	NC_010498	[252]
<i>E. coli</i>	UMN026	NC_011751	[251]
<i>E. coli</i>	UTI89	NC_007946	[253]
<i>K. pneumoniae</i>	342	NC_011283	[254]
<i>K. pneumoniae</i>	MGH78578	NC_009648	-
<i>K. pneumoniae</i>	NTUH-K2044	NC_012731	[255]
<i>N. meningitidis</i>	053442	NC_010120	[256]
<i>P. aeruginosa</i>	LESB58	NC_011770	[257]
<i>P. aeruginosa</i>	PA7	NC_009656	[258]
<i>P. aeruginosa</i>	PA01	NC_002516	[259]
<i>P. aeruginosa</i>	UCBPP-PA14	NC_008463	[260]
<i>P. putida</i>	KT2440	NC_002947	[261]
<i>S. Enteritidis</i>	PT4 str. P125109	NC_011294	[262]
<i>S. Paratyphi A</i>	ATCC 9150	NC_006511	[263]
<i>S. Typhi</i>	CT18	NC_003198	[264]
<i>S. Typhi</i>	str. Ty2	NC_004631	[265]
<i>S. Typhimurium</i>	LT2	NC_003197	[266]
<i>Y. pestis</i>	CO92	NC_003143	[267]

Im Folgenden ist das Alignment der *ampD*-Gene aufgeführt.

	1	50
<i>A. baumannii</i> AYE	(1) ATGAAGCAAATCACACCGTATGAACT--TATAGATGGACAATAAAAGGG	
<i>A. baumannii</i> SDF	(1) ATGAAGCAAATCACACCGTATGAACT--TATAGATGGACAATAAAAGGG	
<i>Acinetobacter</i> sp. ADP1	(1) ----ATGAAATCACA--TTTTCAAGT--TAAGGATGGCGTCTGATGGG	
<i>N. meningitidis</i> 053442	(1) --ATGGACAATCCCCTACGGCACCCCTGGCAGGACGGTTGGGTGCAAAGC	
<i>P. aeruginosa</i> LESB58	(1) --ATG--CATTCGATTCCGTTACC--GGCTGGGTCGGTGGCGTCC--G-	
<i>P. aeruginosa</i> UCBPP-PA14	(1) --ATG--CATTCGATTCCGTTACC--GGCTGGGTCGGTGGCGTCC--G-	
<i>P. aeruginosa</i> PA01	(1) --ATG--CATTCGATTCCGTTACC--GGCTGGGTCGGTGGCGTCC--G-	
<i>P. aeruginosa</i> PA7	(1) --ATG--CATTCGATTCCGTTACC--GGCTGGGTCGGTGGCGTCC--G-	
<i>P. putida</i> KT2440	(1) --ATG--CAATGGACTATGCCACT--GGCTGGTCCACGGAATCG--GA	
<i>Y. pestis</i> CO92	(1) -----ATGCTGCTGGAAACG---GCTGGATTCTCGGGTTAA--	
<i>E. cloacae</i> 14	(1) -----ATGTTGTTAGAAACG---GATGGCTGGTGGACGCGC--G-	
<i>E. cloacae</i> 14-M01	(1) -----ATGTTGTTAGAAACG---GATGGCTGGTGGACGCGC--G-	
<i>E. cloacae</i> NCTC 9394	(1) -----ATGTTGTTAGAAACG---GATGGCTGGTGGACGCGC--G-	
<i>E. cloacae</i> Kollektiv MS	(1) -----ATGTTGTTAGAAACG---GATGGCTGGTGGACGCGC--G-	
<i>E. cloacae</i> ATCC 13047	(1) -----ATGTTGTTAGAAACG---GATGGCTGGTGGATGCGC--G-	
<i>E. cloacae</i> 029	(1) -----ATGTTGTTAGAAACG---GATGGCTGGTGGATGCGC--G-	
<i>E. cloacae</i> sp. 638	(1) -----ATGCAATTACAAACG---GATGGCTGGTGGACGCGC--G-	
<i>E. cloacae</i> SCF1	(1) -----ATGCAATTAGAAACG---GATGGCTGGTGGCGCGC--G-	
<i>K. pneumoniae</i> 342	(1) -----ATGCAATTGAAACGAGG---GATGGCTGGTGGCGCGC--G-	
<i>K. pneumoniae</i> MGH78578	(1) -----ATGCAATTGAAACAGG---GGTGGTTGGTGGCGCGC--G-	
<i>K. pneumoniae</i> NTUH-K2044	(1) -----ATGCAATTGAAACGAGG---GGTGGTTGGTGGCGCGC--G-	
<i>Citrobacter rodentium</i> ICC168	(1) -----ATGTTGTTAGAAACAGG---GCTGGCTGGCAGAGCGCGC--G-	
<i>S. Enteritidis</i> PT4 str. P125109	(1) -----ATGTTGCCAGATAAGG---CTTGGTTAGTAGAGCGCGC--G-	
<i>S. Typhi</i> CT18	(1) -----ATGTTGCCAGATAAGG---CTTGGTTGGTAGAGCGCGC--G-	
<i>S. Typhi</i> str. Ty2	(1) -----ATGTTGCCAGATAAGG---CTTGGTTGGTAGAGCGCGC--G-	
<i>S. Paratyphi</i> A ATCC 9150	(1) -----ATGTTGCCAGATAAGG---CTTGGTTGGTAGAGCGCGC--G-	
<i>S. Typhimurium</i> LT2	(1) -----ATGTTGCCAGATAAGG---CTTGGTTGGTAGAGCGCGC--G-	
<i>E. coli</i> APEC O1	(1) -----ATGTTGTTAGAACAGG---GGTGGCTGGCTGGCGCGC--G-	
<i>E. coli</i> S88	(1) -----ATGTTGTTAGAACAGG---GGTGGCTGGCTGGCGCGC--G-	
<i>E. coli</i> UTI89	(1) -----ATGTTGTTAGAACAGG---GGTGGCTGGCTGGCGCGC--G-	
<i>E. coli</i> O127:H6 str. E2348/69	(1) -----ATGTTGTTAGAACAGG---GGTGGCTGGCTGGCGCGC--G-	
<i>E. coli</i> CFT073	(1) -----ATGTTGTTAGAACAGG---GGTGGCTGGTGGCGCGC--G-	
<i>E. coli</i> ED1a	(1) -----ATGTTGTTAGAACAGG---GGTGGCTGGTGGCGCGC--G-	
<i>E. coli</i> IAI39	(1) -----ATGTTGTTAGAACAGG---GGTGGCTGGCTGGCGCGC--G-	
<i>E. coli</i> SMS-3-5	(1) -----ATGTTGTTAGAACAGG---GGTGGCTGGCTGGCGCGC--G-	
<i>E. coli</i> UMN026	(1) -----ATGTTGTTAGAACAGG---GGTGGCTGGTGGCGCGC--G-	
<i>E. coli</i> O157:H7 str. EC4115	(1) -----ATGTTGTTAGAACAGG---GGTGGCTGGTGGCGCGC--G-	
<i>E. coli</i> O157:H7 str. EDL933	(1) -----ATGTTGTTAGAACAGG---GGTGGCTGGTGGCGCGC--G-	
<i>E. coli</i> O157:H7 str. TW14359	(1) -----ATGTTGTTAGAACAGG---GGTGGCTGGTGGCGCGC--G-	
<i>E. coli</i> O55:H7 str. CB9615	(1) -----ATGTTGTTAGAACAGG---GGTGGCTGGTGGCGCGC--G-	
<i>E. coli</i> E24377A	(1) -----ATGTTGTTAGAACAGG---GGTGGCTGGTGGCGCGC--G-	
<i>E. coli</i> 55989	(1) -----ATGTTGTTAGAACAGG---GGTGGCTGGTGGCGCGC--G-	
<i>E. coli</i> B str. REL606	(1) -----ATGTTGTTAGAACAGG---GGTGGCTGGTGGCGCGC--G-	
<i>E. coli</i> BW2952	(1) -----ATGTTGTTAGAACAGG---GGTGGCTGGTGGCGCGC--G-	
<i>E. coli</i> HS	(1) -----ATGTTGTTAGAACAGG---GGTGGCTGGTGGCGCGC--G-	
<i>E. coli</i> IAI1	(1) -----ATGTTGTTAGAACAGG---GGTGGCTGGTGGCGCGC--G-	
<i>E. coli</i> K-12 DH10B	(1) -----ATGTTGTTAGAACAGG---GGTGGCTGGTGGCGCGC--G-	
<i>E. coli</i> K-12 MG1655	(1) -----ATGTTGTTAGAACAGG---GGTGGCTGGTGGCGCGC--G-	
<i>E. coli</i> O103:H2 str. 12009	(1) -----ATGTTGTTAGAACAGG---GGTGGCTGGTGGCGCGC--G-	
<i>E. coli</i> O111:H- str. 11128	(1) -----ATGTTGTTAGAACAGG---GGTGGCTGGTGGCGCGC--G-	
<i>E. coli</i> O26:H11 str. 11368	(1) -----ATGTTGTTAGAACAGG---GGTGGCTGGTGGCGCGC--G-	

	51	100
<i>A. baumannii</i> AYE	(49)	GCGAGACAAGTACCTTCTCCAAATTTTAAACAGCGTCCCCTGGTACCGA
<i>A. baumannii</i> SDF	(49)	GCGAGACAAGTACCTTCTCCAAATTTTAAACAGCGTCCCCTGGTACCGA
<i>Acinetobacter</i> sp. ADP1	(43)	GCTCAGCAATTGTATCGCCAAATTAATAACAGCGTCCCTGAAAATACCGA
<i>N. meningitidis</i> 053442	(49)	GTGCGCCATATTCGGTCGCGGAATTTCCGCCCGAGGGATCCAAAGAAAG
<i>P. aeruginosa</i> LESB58	(42)	-----CCATGCCCTTCAACCGAATTTCAACCTGCGTCCCGAAGGGGACGC
<i>P. aeruginosa</i> UCBPP-PA14	(42)	-----CCATGCCCTTCAACCGAATTTCAACCTGCGTCCCGAAGGGGACGC
<i>P. aeruginosa</i> PA01	(42)	-----CCATGCCCTTCAACCGAATTTCAACCTGCGTCCCGAAGGGGACGC
<i>P. aeruginosa</i> PA7	(42)	-----CCATGTCCTTCAACCGAATTTCAACCTGCGTCCCGAAGGGGAAAT
<i>P. putida</i> KT2440	(43)	ATCACCCATGCCCATCGCCGAATTTCAACTGCGTCCCGAAGGGGAAAT
<i>Y. pestis</i> CO92	(36)	-----ACAGGTGCTGTCCCGCAATTTGATCTGAGGCCAGAGGGTGAAT
<i>E. cloacae</i> 14	(36)	-----GCATGTACCGTCGCGGCAACACGACTGCGGCCCGGAGGATGAAAA
<i>E. cloacae</i> 14-M01	(36)	-----GCATGTACCGTCGCGGCAACACGACTGCGGCCCGGAGGATGAAAA
<i>E. cloacae</i> NCTC 9394	(36)	-----GCATGTACCGTCGCGGCAACACGACTGCGGCCCGGAGGATGAAAA
<i>E. cloacae</i> Kollektiv MS	(36)	-----ACATGTACCGTCGCGGCAACACGACTGCGGCCCGGAGGATGAAAA
<i>E. cloacae</i> ATCC 13047	(36)	-----GCTGTACCGTCGCGGCAACACGACTGCGGCCCGGAGGATGAAAA
<i>E. cloacae</i> 029	(36)	-----GCATGTACCTTCGCGGCAACACGACTGCGGCCCGGAGGATGAAAA
<i>E. cloacae</i> sp. 638	(36)	-----GCATGTACCTTCGCGGCAACACGACTGCGGCCCGGAGGACGAAT
<i>E. cloacae</i> SCF1	(36)	-----TCGGTTCCGTCGCGGCAACACGACTGCGGCCCGGAGGAGAAAC
<i>K. pneumoniae</i> 342	(36)	-----TCGGTTCCGTCGCGGCAACACGACTGCGGCCCGGATGAGAAAGC
<i>K. pneumoniae</i> MGH78578	(36)	-----TCGGTTCCGTCGCGGCAACACGACTGCGGCCCGGATGAGAAAGC
<i>K. pneumoniae</i> NTUH-K2044	(36)	-----TCGGTTCCGTCGCGGCAACACGACTGCGGCCCGGATGAGAAAGC
<i>Citrobacter rodentium</i> ICC168	(36)	-----GCGGTCCTTCTCCCATTTACGATTGCCGCCCGGATGACGAAAA
<i>S. Enteritidis</i> PT4 str. P125109	(36)	-----ACGGTCCCTTCTCCGATTATGATTGCCGCCCGGATGACGAAAA
<i>S. Typhi</i> CT18	(36)	-----ACGGTCCCTTCTCCGATTATGATTGCCGCCCGGATGACGAAAA
<i>S. Typhi</i> str. Ty2	(36)	-----ACGGTCCCTTCTCCGATTATGATTGCCGCCCGGATGACGAAAA
<i>S. Paratyphi</i> A ATCC 9150	(36)	-----ACGGTCCCTTCTCCGATTATGATTGCCGCCCGGATGACGAAAA
<i>S. Typhimurium</i> LT2	(36)	-----ACGGTCCCTTCTCCGATTATGATTGCCGCCCGGATGACGAAAA
<i>E. coli</i> APEC 01	(36)	-----CCGCGTTCCTTCAACACATTACGATTGCCGCCCGGATGACGAAAC
<i>E. coli</i> S88	(36)	-----CCGCGTTCCTTCAACACATTACGATTGCCGCCCGGATGACGAAAC
<i>E. coli</i> UTI89	(36)	-----CCGCGTTCCTTCAACACATTACGATTGCCGCCCGGATGACGAAAC
<i>E. coli</i> O127:H6 str. E2348/69	(36)	-----CCGCGTTCCTTCAACACATTACGATTGCCGCCCGGATGACGAAAC
<i>E. coli</i> CFT073	(36)	-----CCGCGTTCCTTCAACACATTACGATTGCCGCCCGGATGACGAAAC
<i>E. coli</i> ED1a	(36)	-----CCGCGTTCCTTCAACACATTACGATTGCCGCCCGGATGACGAAAC
<i>E. coli</i> IAI39	(36)	-----CCGCGTTCCTTCAACACATTACGATTGCCGCCCGGATGACGAAAC
<i>E. coli</i> SMS-3-5	(36)	-----CCGCGTTCCTTCAACACATTACGATTGCCGCCCGGATGACGAAAC
<i>E. coli</i> UMN026	(36)	-----CCGCGTTCCTTCAACACATTACGATTGCCGCCCGGATGACGAAAC
<i>E. coli</i> O157:H7 str. EC4115	(36)	-----CCGCGTTCCTTCAACACATTACGATTGCCGCCCGGATGACGAAAC
<i>E. coli</i> O157:H7 str. EDL933	(36)	-----CCGCGTTCCTTCAACACATTACGATTGCCGCCCGGATGACGAAAC
<i>E. coli</i> O157:H7 str. TW14359	(36)	-----CCGCGTTCCTTCAACACATTACGATTGCCGCCCGGATGACGAAAC
<i>E. coli</i> O55:H7 str. CB9615	(36)	-----CCGCGTTCCTTCAACACATTACGATTGCCGCCCGGATGACGAAAC
<i>E. coli</i> E24377A	(36)	-----CCGCGTTCCTTCAACACATTACGATTGCCGCCCGGATGACGAAAC
<i>E. coli</i> 55989	(36)	-----CCGCGTTCCTTCAACACATTACGATTGCCGCCCGGATGACGAAAC
<i>E. coli</i> B str. REL606	(36)	-----CCGCGTTCCTTCAACACATTACGATTGCCGCCCGGATGACGAAAC
<i>E. coli</i> BW2952	(36)	-----CCGCGTTCCTTCAACACATTACGATTGCCGCCCGGATGACGAAAC
<i>E. coli</i> HS	(36)	-----CCGCGTTCCTTCAACACATTACGATTGCCGCCCGGATGACGAAAC
<i>E. coli</i> IAI1	(36)	-----CCGCGTTCCTTCAACACATTACGATTGCCGCCCGGATGACGAAAC
<i>E. coli</i> K-12 DH10B	(36)	-----CCGCGTTCCTTCAACACATTACGATTGCCGCCCGGATGACGAAAC
<i>E. coli</i> K-12 MG1655	(36)	-----CCGCGTTCCTTCAACACATTACGATTGCCGCCCGGATGACGAAAC
<i>E. coli</i> O103:H2 str. 12009	(36)	-----CCGCGTTCCTTCAACACATTACGATTGCCGCCCGGATGACGAAAC
<i>E. coli</i> O111:H- str. 11128	(36)	-----CCGCGTTCCTTCAACACATTACGATTGCCGCCCGGATGACGAAAC
<i>E. coli</i> O26:H11 str. 11368	(36)	-----CCGCGTTCCTTCAACACATTACGATTGCCGCCCGGATGACGAAAC

	101	150
<i>A. baumannii</i> AYE	(99)	AATACAAATGATTGGTGGTTCATAATATAGCTTGCCGCCCTTCTCAGTTTG
<i>A. baumannii</i> SDF	(99)	AATACAAATGATTGGTGGTTCATAATATAGCTTGCCGCCCTTCTCAGTTTG
<i>Acinetobacter</i> sp. ADP1	(93)	AATTGCGCTGATCGTGGTGCATAACATAGTTTGCCACCGTCGCAGTTTG
<i>N. meningitidis</i> 053442	(99)	GGTTTCCTTGTTCGTATTGCACAATATCTCGCTGCGGCCGTTCCGAATATG
<i>P. aeruginosa</i> LESB58	(87)	GGTGTGCGTCTGGTCATCCACAATATCAGCCTGCGCCGGGACAGTTTCG
<i>P. aeruginosa</i> UCBPP-PA14	(87)	GGTGTGCGTCTGGTCATCCACAATATCAGCCTGCGCCGGGACAGTTTCG
<i>P. aeruginosa</i> PA01	(87)	GGTGTGCGTCTGGTTATCCACAATATCAGCCTGCGCCGGGACAGTTTCG
<i>P. aeruginosa</i> PA7	(87)	GGTGTGCTGGTGGTCATCCACAACATCAGCCTGCGCCGGGACAGTTTCG
<i>P. putida</i> KT2440	(93)	GATTTCCCTGCTGGTGATCCACAACATCAGTCTGCCCGCCCTGTTCG
<i>Y. pestis</i> CO92	(81)	GCCCTCTCTGCTGGTGATTCAATAGTATCAGTCTACCGCCCACTGAGTTTG
<i>E. cloacae</i> 14	(81)	GCCCACTGCTGGTGGTTCACAATATAGTCTCCCGCCGGGTGAGTTTG
<i>E. cloacae</i> 14-M01	(81)	GCCCACTGCTGGTGGTTCACAATATAGTCTCCCGCCGGGTGAGTTTG
<i>E. cloacae</i> NCTC 9394	(81)	GCCCACTGCTGGTGGTTCACAATATAGTCTCCCGCCGGGTGAGTTTG
<i>E. cloacae</i> Kollektiv MS	(81)	GCCCACTGCTGGTGGTTCACAACATAAGTCTCCCGCCAGGTGAGTTTG
<i>E. cloacae</i> ATCC 13047	(81)	GCCCACTGCTGGTGGTTCATAACATAGTCTCCCGCCGGGTGAGTTTG
<i>E. cloacae</i> 029	(81)	GCCCACTGCTGGTGGTTCATAATATAGTCTCCCGCCGGGGAATTTG
<i>E. cloacae</i> sp. 638	(81)	GCCCTCACTGCTGGTGGTTCATAACATAGCCTGCCACCTGGCGAATTTG
<i>E. cloacae</i> SCF1	(81)	GCCCTCGTGGTGGTGGTTCACAATATCAGCCTGCGCCCGGCGAATTTG
<i>K. pneumoniae</i> 342	(81)	CCCTTCTTACTGGTGGTGCATAACATAGCCTGCCACCGGTTGAAATTTG
<i>K. pneumoniae</i> MGH78578	(81)	CCCTTCTTACTGGTGGTGCATAACATAGCCTGCCACCGGTTGAAATTTG
<i>K. pneumoniae</i> NTUH-K2044	(81)	CCCTTCTTACTGGTGGTGCATAACATAGCCTGCCACCGGTTGAAATTTG
<i>Citrobacter rodentium</i> ICC168	(81)	TCCTTCTCTGCTGGTGGTGCACAATATCAGCCTGCGCCCGGTGAATTTG
<i>S. Enteritidis</i> PT4 str. P125109	(81)	ACCGTCCTTGCTGGTGGTGCATAATATAGCCTGCCCGCCGGCGAGTTTG
<i>S. Typhi</i> CT18	(81)	ACCGTCCTTGCTGGTGGTGCATAATATAGCCTGCCCGCCGGCGAGTTTG
<i>S. Typhi</i> str. Ty2	(81)	ACCGTCCTTGCTGGTGGTGCATAATATAGCCTGCCCGCCGGCGAGTTTG
<i>S. Paratyphi</i> A ATCC 9150	(81)	ACCGTCCTTGCTGGTGGTGCATAATATAGCCTGCCCGCCGGCGAGTTTG
<i>S. Typhimurium</i> LT2	(81)	ACCGTCCTTGCTGGTGGTGCATAATATAGCCTGCCCGCCGGCGAGTTTG
<i>E. coli</i> APEC O1	(81)	ACCCACTCTGCTGGTGGTGCACAATATAGCCTGCCCGCAGGCGAGTTTG
<i>E. coli</i> S88	(81)	ACCCACTCTGCTGGTGGTGCACAATATAGCCTGCCCGCAGGCGAGTTTG
<i>E. coli</i> UTI89	(81)	ACCCACTCTGCTGGTGGTGCACAATATAGCCTGCCCGCAGGCGAGTTTG
<i>E. coli</i> O127:H6 str. E2348/69	(81)	ACCCACCCTGCTGGTGGTGCACAATATAGCCTGCCCGCAGGCGAGTTTG
<i>E. coli</i> CFT073	(81)	ACCCACCCTGCTGGTGGTGCACAATATAGCCTGCCCGCAGGCGAGTTTG
<i>E. coli</i> ED1a	(81)	ACCCACCCTGCTGGTGGTGCACAATATAGCCTGCCCGCAGGCGAGTTTG
<i>E. coli</i> IAI39	(81)	ACCCACCCTGCTGGTGGTGCACAATATAGCCTGCCCGCAGGCGAGTTTG
<i>E. coli</i> SMS-3-5	(81)	ACCCACCCTGCTGGTGGTGCACAATATAGCCTGCCCGCAGGCGAGTTTG
<i>E. coli</i> UMN026	(81)	ACCCACCCTGCTGGTGGTGCACAATATAGCCTGCCCGCAGGCGAGTTTG
<i>E. coli</i> O157:H7 str. EC4115	(81)	ACCCACCCTGCTGGTGGTGCACAATATAGCCTGCCCGCAGGCGAGTTTG
<i>E. coli</i> O157:H7 str. EDL933	(81)	ACCCACCCTGCTGGTGGTGCACAATATAGCCTGCCCGCAGGCGAGTTTG
<i>E. coli</i> O157:H7 str. TW14359	(81)	ACCCACCCTGCTGGTGGTGCACAATATAGCCTGCCCGCAGGCGAGTTTG
<i>E. coli</i> O55:H7 str. CB9615	(81)	ACCCACCCTGCTGGTGGTGCACAATATAGCCTGCCCGCAGGCGAGTTTG
<i>E. coli</i> E24377A	(81)	ACCCACCCTGCTGGTGGTGCACAATATAGCCTGCCCGCAGGCGAGTTTG
<i>E. coli</i> 55989	(81)	ACCCACCCTGCTGGTGGTGCACAATATAGCCTGCCCGCAGGCGAGTTTG
<i>E. coli</i> B str. REL606	(81)	ACCCACCCTGCTGGTGGTGCACAATATAGCCTGCCCGCAGGCGAGTTTG
<i>E. coli</i> BW2952	(81)	ACCCACCCTGCTGGTGGTGCACAATATAGCCTGCCCGCAGGCGAGTTTG
<i>E. coli</i> HS	(81)	ACCCACCCTGCTGGTGGTGCACAATATAGCCTGCCCGCAGGCGAGTTTG
<i>E. coli</i> IAI1	(81)	ACCCACCCTGCTGGTGGTGCACAATATAGCCTGCCCGCAGGCGAGTTTG
<i>E. coli</i> K-12 DH10B	(81)	ACCCACCCTGCTGGTGGTGCACAATATAGCCTGCCCGCAGGCGAGTTTG
<i>E. coli</i> K-12 MG1655	(81)	ACCCACCCTGCTGGTGGTGCACAATATAGCCTGCCCGCAGGCGAGTTTG
<i>E. coli</i> O103:H2 str. 12009	(81)	ACCCACCCTGCTGGTGGTGCACAATATAGCCTGCCCGCAGGCGAGTTTG
<i>E. coli</i> O111:H- str. 11128	(81)	ACCCACCCTGCTGGTGGTGCACAATATAGCCTGCCCGCAGGCGAGTTTG
<i>E. coli</i> O26:H11 str. 11368	(81)	ACCCACCCTGCTGGTGGTGCACAATATAGCCTGCCCGCAGGCGAGTTTG

	151	200
<i>A. baumannii</i> AYE (149)	GGGAGGCATATTCGAACAGTTTTC	CAGAATAAATAGATTGCTCCGTT
<i>A. baumannii</i> SDF (149)	GGGAGGCATATTCGAACAGTTTTC	CAGAATAAATAGATTGCTCCGTT
<i>Acinetobacter</i> sp. ADP1 (143)	GTGGTGGTATATTCGAACAGTTTTC	CAAATCAGTAGATTGGCGCTTG
<i>N. meningitidis</i> 053442 (149)	GTACGGATGCGGTGAAAAGCTGTTG	CAACCGGCTGACCCCGACGGG
<i>P. aeruginosa</i> LESB58 (137)	GCACCGCAAGGTCAGGCGTTCTTC	CAGAATCGCCTGGACCCGACCGAA
<i>P. aeruginosa</i> UCBPP-PA14 (137)	GCACCGCAAGGTCAGGCGTTCTTC	CAGAATCGTCTGGACCCGACCGAA
<i>P. aeruginosa</i> PA01 (137)	GCACCGTAAGGTCAGGCGTTCTTC	CAGAATCGCCTGGACCCGACCGAA
<i>P. aeruginosa</i> PA7 (137)	GCACCGCAAGGTCAGGCGTTTTC	CAGAACCGCCTGGACGCGGACCGAG
<i>P. putida</i> KT2440 (143)	GCACGGCAAGGTCAGCAATTC	CAGAACCGCCTGCCCTGATGAA
<i>Y. pestis</i> CO92 (131)	GTGGCCCTATATCGATCAGCTCTTC	CACGGGACACTCAATGCCGATGAG
<i>E. cloacae</i> 14 (131)	GCGTCCGTGGATCGATGCGTTATTC	ACTGGAACGATAGATCCCGATGCC
<i>E. cloacae</i> 14-M01 (131)	GCGTCCGTGGATCGATGCGTTATTC	ACTGGAACGATAGATCCCGATGCC
<i>E. cloacae</i> NCTC 9394 (131)	GCGTCCGTGGATCGATGCGTTATTC	ACTGGAACGATAGATCCCGATGCC
<i>E. cloacae</i> Kollektiv MS (131)	GCGTCCGTGGATCGACGCGTTATTC	ACAGGAACGATAGATCCCGATGCT
<i>E. cloacae</i> ATCC 13047 (131)	GCGTCCGTGGATCGATGCGTTATTC	ACGGGAACGATAGATCCCGATGCC
<i>E. cloacae</i> 029 (131)	GCGTCCGTGGATCGATGCGTTATTC	ACGGGAACGATAGATCCCGATGCC
<i>E. cloacae</i> sp. 638 (131)	GTGGTCCGTGGATGACCGCATTATTC	ACTGGAACATAGATCCCGACCGCT
<i>E. cloacae</i> SCF1 (131)	GCGGCCCTGGATTGACCGCATTATTC	ACGGCACGATAGACCCGACCGCA
<i>K. pneumoniae</i> 342 (131)	GTGGTCCGTGGATTGATGCGCTGTT	CACTGGCACCTGGATCCCGATGCG
<i>K. pneumoniae</i> MGH78578 (131)	GTGGTCCGTGGATTGATGCGCTGTT	CACTGGTACCTGGATCCCGACCGG
<i>K. pneumoniae</i> NTUH-K2044 (131)	GTGGTCCGTGGATTGATGCGCTGTT	CACTGGTACCTGGATCCCGACCGG
<i>Citrobacter rodentium</i> ICC168 (131)	GCGTCCGTGGATTGATGCGTTATTC	CAGCGAAACATAGATCCAGCCGCA
<i>S. Enteritidis</i> PT4 str. P125109 (131)	GCGTCCGTGGATCGATGTCATATTC	CACGGGAACGATAGATCCAGACGCC
<i>S. Typhi</i> CT18 (131)	GCGTCCGTGGATCGATGTCATATTC	CACGGGAACGATAGATCCAGACGCC
<i>S. Typhi</i> str. Ty2 (131)	GCGTCCGTGGATCGATGTCATATTC	CACGGGAACGATAGATCCAGACGCC
<i>S. Paratyphi</i> A ATCC 9150 (131)	GCGTCCGTGGATCGATGTCATATTC	CACGGGAACGATAGATCCAGACGCC
<i>S. Typhimurium</i> LT2 (131)	GCGTCCGTGGATCGATGTCATATTC	CACGGGAACGATAGATCCAGACGCC
<i>E. coli</i> APEC O1 (131)	GCGGCCGTGGATCGACGCATATTC	CACTGGAACATAGATCCCGAGGCG
<i>E. coli</i> S88 (131)	GCGGCCGTGGATCGACGCATATTC	CACTGGAACATAGATCCCGAGGCG
<i>E. coli</i> UTI89 (131)	GCGGCCGTGGATCGACGCATATTC	CACTGGAACATAGATCCCGAGGCG
<i>E. coli</i> O127:H6 str. E2348/69 (131)	GCGTCCGTGGATCGACGCATATTC	CACTGGAACATAGATCCCGAGGCG
<i>E. coli</i> CFT073 (131)	GCGTCCGTGGATCGACGCATATTC	CACTGGAACATAGATCCCGAGGCG
<i>E. coli</i> ED1a (131)	GCGTCCGTGGATCGACGCATATTC	CACTGGAACATAGATCCCGAGGCA
<i>E. coli</i> IAI39 (131)	GCGTCCGTGGATCGACGCATATTC	CACTGGAACATAGATCCCGAGGCA
<i>E. coli</i> SMS-3-5 (131)	GCGTCCGTGGATCGACGCATATTC	CACTGGAACATAGATCCCGAGGCA
<i>E. coli</i> UMN026 (131)	GCGTCCGTGGATCGACGCATATTC	CACTGGAACATAGATCCCGAGGCA
<i>E. coli</i> O157:H7 str. EC4115 (131)	GCGTCCGTGGATCGACGCATATTC	CACTGGAACATAGATCCCGAGGCA
<i>E. coli</i> O157:H7 str. EDL933 (131)	GCGTCCGTGGATCGACGCATATTC	CACTGGAACATAGATCCCGAGGCA
<i>E. coli</i> O157:H7 str. TW14359 (131)	GCGTCCGTGGATCGACGCATATTC	CACTGGAACATAGATCCCGAGGCA
<i>E. coli</i> O55:H7 str. CB9615 (131)	GCGTCCGTGGATCGACGCATATTC	CACTGGAACATAGATCCCGAGGCA
<i>E. coli</i> E24377A (131)	GCGTCCGTGGATCGACGCATATTC	CACTGGAACATAGATCCCGAGGCA
<i>E. coli</i> 55989 (131)	GCGTCCGTGGATCGACGCATATTC	CACTGGAACATAGATCCCGAGGCA
<i>E. coli</i> B str. REL606 (131)	GCGTCCGTGGATCGACGCATATTC	CACTGGAACATAGATCCCGAGGCA
<i>E. coli</i> BW2952 (131)	GCGTCCGTGGATCGACGCATATTC	CACTGGAACATAGATCCCGAGGCA
<i>E. coli</i> HS (131)	GCGTCCGTGGATCGACGCATATTC	CACTGGAACATAGATCCCGAGGCA
<i>E. coli</i> IAI1 (131)	GCGTCCGTGGATCGACGCATATTC	CACTGGAACATAGATCCCGAGGCA
<i>E. coli</i> K-12 DH10B (131)	GCGTCCGTGGATCGACGCATATTC	CACTGGAACATAGATCCCGAGGCA
<i>E. coli</i> K-12 MG1655 (131)	GCGTCCGTGGATCGACGCATATTC	CACTGGAACATAGATCCCGAGGCA
<i>E. coli</i> O103:H2 str. 12009 (131)	GCGTCCGTGGATCGACGCATATTC	CACTGGAACATAGATCCCGAGGCA
<i>E. coli</i> O111:H- str. 11128 (131)	GCGTCCGTGGATCGACGCATATTC	CACTGGAACATAGATCCCGAGGCA
<i>E. coli</i> O26:H11 str. 11368 (131)	GCGTCCGTGGATCGACGCATATTC	CACTGGAACATAGATCCCGAGGCA

	201	250
<i>A. baumannii</i> AYE (199)	CATCCCTATTTTCAGACTAT	TGAAGGTATGCAAGTCTCTACACACCTGTT
<i>A. baumannii</i> SDF (199)	CATCCCTATTTTCAGACTAT	TGAAGGTATGCAAGTCTCTACACACCTGTT
<i>Acinetobacter</i> sp. ADP1 (193)	CATCCGTATTTTGAACGAT	ACAGGGCATGCAGGTGTCGGGACATTTATT
<i>N. meningitidis</i> 053442 (199)	CATCCGTTCTTCAGCCTGAT	ACACTTTGCGCGTATCCAGCCATTTT
<i>P. aeruginosa</i> LESB58 (187)	CATCCCTATTTTCAGGAGAT	CGCCACCTGACGGTTTTCGGGCATTTCCT
<i>P. aeruginosa</i> UCBPP-PA14 (187)	CATCCCTATTTTCAGGAGAT	CGCCACCTGACGGTTTTCGGGCATTTCCT
<i>P. aeruginosa</i> PA01 (187)	CATCCCTATTTTCAGGAGAT	CGCCACCTGACGGTTTTCGGGCATTTCCT
<i>P. aeruginosa</i> PA7 (187)	CATCCCTATTTTCAGGAGAT	CGCCACCTGACGGTTTTCGGGCATTTCCT
<i>P. putida</i> KT2440 (193)	CATCCGTATTTTGCCAGCAT	CAACCACTGACCGGTTCGGGCACCTGTT
<i>Y. pestis</i> CO92 (181)	CATCCCTATTTTGCTAGTAT	TGTACATTTACCGGTTCGGGCCATTTCCT
<i>E. cloacae</i> 14 (181)	CATCCCTTCTTTTGCTGAGAT	TGCGCATCTGCGCGTATCGGGCACTGTCT
<i>E. cloacae</i> 14-M01 (181)	CATCCCTTCTTTTGCTGAGAT	TGCGCATCTGCGCGTATCGGGCACTGTCT
<i>E. cloacae</i> NCTC 9394 (181)	CATCCCTTCTTTTGCTGAGAT	TGCGCATCTGCGCGTATCGGGCACTGTCT
<i>E. cloacae</i> Kollektiv MS (181)	CATCCCTTCTTTTGCTGAGAT	TGCGCATCTGCGCGTATCGGGCACTGTCT
<i>E. cloacae</i> ATCC 13047 (181)	CATCCCTTCTTTTGCTGAGAT	TGCGCATCTGCGCGTATCGGGCACTGTCT
<i>E. cloacae</i> 029 (181)	CATCCCTTCTTTTGCTGAGAT	TGCGCATCTGCGCGTATCGGGCACTGTCT
<i>E. cloacae</i> sp. 638 (181)	CATCCCTTCTTTTGCTGAGAT	TGCGCATCTGCGCGTATCGGGCACTGTCT
<i>E. cloacae</i> SCF1 (181)	CATCCCTTCTTTTGCTGAGAT	TGCGCATCTGCGCGTATCGGGCACTGTCT
<i>K. pneumoniae</i> 342 (181)	CATCCCTTCTTTTGCTGAGAT	TGCGCATCTGCGCGTATCGGGCACTGTCT
<i>K. pneumoniae</i> MGH78578 (181)	CATCCCTTCTTTTGCTGAGAT	TGCGCATCTGCGCGTATCGGGCACTGTCT
<i>K. pneumoniae</i> NTUH-K2044 (181)	CATCCCTTCTTTTGCTGAGAT	TGCGCATCTGCGCGTATCGGGCACTGTCT
<i>Citrobacter rodentium</i> ICC168 (181)	CATCCCTTCTTTTGCTGAGAT	TGCGCATCTGCGCGTATCGGGCACTGTCT
<i>S. Enteritidis</i> PT4 str. P125109 (181)	CATCCCTTCTTTTGCTGAGAT	TGCGCATCTGCGCGTATCGGGCACTGTCT
<i>S. Typhi</i> CT18 (181)	CATCCCTTCTTTTGCTGAGAT	TGCGCATCTGCGCGTATCGGGCACTGTCT
<i>S. Typhi</i> str. Ty2 (181)	CATCCCTTCTTTTGCTGAGAT	TGCGCATCTGCGCGTATCGGGCACTGTCT
<i>S. Paratyphi</i> A ATCC 9150 (181)	CATCCCTTCTTTTGCTGAGAT	TGCGCATCTGCGCGTATCGGGCACTGTCT
<i>S. Typhimurium</i> LT2 (181)	CATCCCTTCTTTTGCTGAGAT	TGCGCATCTGCGCGTATCGGGCACTGTCT
<i>E. coli</i> APEC O1 (181)	CATCCCTTCTTTTGCTGAGAT	TGCGCATCTGCGCGTATCGGGCACTGTCT
<i>E. coli</i> S88 (181)	CATCCCTTCTTTTGCTGAGAT	TGCGCATCTGCGCGTATCGGGCACTGTCT
<i>E. coli</i> UTI89 (181)	CATCCCTTCTTTTGCTGAGAT	TGCGCATCTGCGCGTATCGGGCACTGTCT
<i>E. coli</i> O127:H6 str. E2348/69 (181)	CATCCCTTCTTTTGCTGAGAT	TGCGCATCTGCGCGTATCGGGCACTGTCT
<i>E. coli</i> CFT073 (181)	CATCCCTTCTTTTGCTGAGAT	TGCGCATCTGCGCGTATCGGGCACTGTCT
<i>E. coli</i> ED1a (181)	CATCCCTTCTTTTGCTGAGAT	TGCGCATCTGCGCGTATCGGGCACTGTCT
<i>E. coli</i> IAI39 (181)	CATCCCTTCTTTTGCTGAGAT	TGCGCATCTGCGCGTATCGGGCACTGTCT
<i>E. coli</i> SMS-3-5 (181)	CATCCCTTCTTTTGCTGAGAT	TGCGCATCTGCGCGTATCGGGCACTGTCT
<i>E. coli</i> UMN026 (181)	CATCCCTTCTTTTGCTGAGAT	TGCGCATCTGCGCGTATCGGGCACTGTCT
<i>E. coli</i> O157:H7 str. EC4115 (181)	CATCCCTTCTTTTGCTGAGAT	TGCGCATCTGCGCGTATCGGGCACTGTCT
<i>E. coli</i> O157:H7 str. EDL933 (181)	CATCCCTTCTTTTGCTGAGAT	TGCGCATCTGCGCGTATCGGGCACTGTCT
<i>E. coli</i> O157:H7 str. TW14359 (181)	CATCCCTTCTTTTGCTGAGAT	TGCGCATCTGCGCGTATCGGGCACTGTCT
<i>E. coli</i> O55:H7 str. CB9615 (181)	CATCCCTTCTTTTGCTGAGAT	TGCGCATCTGCGCGTATCGGGCACTGTCT
<i>E. coli</i> E24377A (181)	CATCCCTTCTTTTGCTGAGAT	TGCGCATCTGCGCGTATCGGGCACTGTCT
<i>E. coli</i> 55989 (181)	CATCCCTTCTTTTGCTGAGAT	TGCGCATCTGCGCGTATCGGGCACTGTCT
<i>E. coli</i> B str. REL606 (181)	CATCCCTTCTTTTGCTGAGAT	TGCGCATCTGCGCGTATCGGGCACTGTCT
<i>E. coli</i> BW2952 (181)	CATCCCTTCTTTTGCTGAGAT	TGCGCATCTGCGCGTATCGGGCACTGTCT
<i>E. coli</i> HS (181)	CATCCCTTCTTTTGCTGAGAT	TGCGCATCTGCGCGTATCGGGCACTGTCT
<i>E. coli</i> IAI1 (181)	CATCCCTTCTTTTGCTGAGAT	TGCGCATCTGCGCGTATCGGGCACTGTCT
<i>E. coli</i> K-12 DH10B (181)	CATCCCTTCTTTTGCTGAGAT	TGCGCATCTGCGCGTATCGGGCACTGTCT
<i>E. coli</i> K-12 MG1655 (181)	CATCCCTTCTTTTGCTGAGAT	TGCGCATCTGCGCGTATCGGGCACTGTCT
<i>E. coli</i> O103:H2 str. 12009 (181)	CATCCCTTCTTTTGCTGAGAT	TGCGCATCTGCGCGTATCGGGCACTGTCT
<i>E. coli</i> O111:H- str. 11128 (181)	CATCCCTTCTTTTGCTGAGAT	TGCGCATCTGCGCGTATCGGGCACTGTCT
<i>E. coli</i> O26:H11 str. 11368 (181)	CATCCCTTCTTTTGCTGAGAT	TGCGCATCTGCGCGTATCGGGCACTGTCT

	251	300
<i>A. baumannii</i> AYE (249)	AAATTTTACGAACA	GGTGAAGTCCACAGTTTGTAACTTTAATGATCGTGG
<i>A. baumannii</i> SDF (249)	AAATTTTACGAACA	GGTGAAGTCCACAGTTTGTAACTTTAATGATCGTGG
<i>Acinetobacter</i> sp. ADP1 (243)	GATTTTACGCTCGG	GGTGAAGTTATCCAGTTTGTCAATTTTCAGGATCGTGG
<i>N. meningitidis</i> 053442 (249)	AAATCAAACGGGACGG	CGAAACGGTACAGTTCGTTTCCTGGCACAATATGG
<i>P. aeruginosa</i> LESB58 (237)	CATCGAACCGCGACGG	CGCCATCACCCAGTTCGCTCTCTGTACGACCGCGG
<i>P. aeruginosa</i> UCBPP-PA14 (237)	CATCGAACCGCGACGG	CGCCATCACCCAGTTCGCTCTCTGTACGACCGCGG
<i>P. aeruginosa</i> PA01 (237)	CATCGAACCGCGACGG	CGCCATCACCCAGTTCGCTCTCTGTACGACCGCGG
<i>P. aeruginosa</i> PA7 (237)	CATCGAACCGCGACGG	CGCCATCACCCAGTTCGCTCTCTGTACGACCGCGG
<i>P. putida</i> KT2440 (243)	CGTCGAGCGTGACGG	CGCGGTGACTCAGTTCGTTGCGTTGCATGACCGTGG
<i>Y. pestis</i> CO92 (231)	GATTCGGCGTGGT	GAAATCATTCAGTATGTTCCGTTTCGATAAACGGG
<i>E. cloacae</i> 14 (231)	GATTCGGTGGT	GAAATGGTTCAGTATGTTCCCTTTTGATAAGCGGAG
<i>E. cloacae</i> 14-M01 (231)	GATTCGGTGGT	GAAATGGTTCAGTATGTTCCCTTTTGATAAGCGGAG
<i>E. cloacae</i> NCTC 9394 (231)	GATTCGGTGGT	GAAATGGTTCAGTATGTTCCCTTTTGATAAGCGGAG
<i>E. cloacae</i> Kollektiv MS (231)	GATTCGGTGGT	GAAATGGTTCAGTATGTTCCCTTTTGATAAGCGGAG
<i>E. cloacae</i> ATCC 13047 (231)	GATTCGGTGGT	GAAATGGTTCAGTATGTTCCCTTTTGATAAGCGGAG
<i>E. cloacae</i> 029 (231)	GATTCGGTGGT	GAAATGGTTCAGTATGTTCCCTTTTGATAAGCGGAG
<i>E. cloacae</i> sp. 638 (231)	GATTCGGTGGT	GAAATGGTTCAGTATGTTCCCTTTTGATAAGCGGAG
<i>E. cloacae</i> SCF1 (231)	GATTCGGTGGT	GAAATGGTTCAGTATGTTCCCTTTTGATAAGCGGAG
<i>K. pneumoniae</i> 342 (231)	GATTCGGTGGT	GAAATGGTTCAGTATGTTCCCTTTTGATAAGCGGAG
<i>K. pneumoniae</i> MGH78578 (231)	GATTCGGTGGT	GAAATGGTTCAGTATGTTCCCTTTTGATAAGCGGAG
<i>K. pneumoniae</i> NTUH-K2044 (231)	GATTCGGTGGT	GAAATGGTTCAGTATGTTCCCTTTTGATAAGCGGAG
<i>Citrobacter rodentium</i> ICC168 (231)	GATTCGGTGGT	GAAATGGTTCAGTATGTTCCCTTTTGATAAGCGGAG
<i>S. Enteritidis</i> PT4 str. P125109 (231)	GATTCGGTGGT	GAAATGGTTCAGTATGTTCCCTTTTGATAAGCGGAG
<i>S. Typhi</i> CT18 (231)	GATTCGGTGGT	GAAATGGTTCAGTATGTTCCCTTTTGATAAGCGGAG
<i>S. Typhi</i> str. Ty2 (231)	GATTCGGTGGT	GAAATGGTTCAGTATGTTCCCTTTTGATAAGCGGAG
<i>S. Paratyphi</i> A ATCC 9150 (231)	GATTCGGTGGT	GAAATGGTTCAGTATGTTCCCTTTTGATAAGCGGAG
<i>S. Typhimurium</i> LT2 (231)	GATTCGGTGGT	GAAATGGTTCAGTATGTTCCCTTTTGATAAGCGGAG
<i>E. coli</i> APEC 01 (231)	GATTCGGTGGT	GAAATGGTTCAGTATGTTCCCTTTTGATAAGCGGAG
<i>E. coli</i> S88 (231)	GATTCGGTGGT	GAAATGGTTCAGTATGTTCCCTTTTGATAAGCGGAG
<i>E. coli</i> UTI89 (231)	GATTCGGTGGT	GAAATGGTTCAGTATGTTCCCTTTTGATAAGCGGAG
<i>E. coli</i> O127:H6 str. E2348/69 (231)	GATTCGGTGGT	GAAATGGTTCAGTATGTTCCCTTTTGATAAGCGGAG
<i>E. coli</i> CFT073 (231)	GATTCGGTGGT	GAAATGGTTCAGTATGTTCCCTTTTGATAAGCGGAG
<i>E. coli</i> ED1a (231)	GATTCGGTGGT	GAAATGGTTCAGTATGTTCCCTTTTGATAAGCGGAG
<i>E. coli</i> IAI39 (231)	GATTCGGTGGT	GAAATGGTTCAGTATGTTCCCTTTTGATAAGCGGAG
<i>E. coli</i> SMS-3-5 (231)	GATTCGGTGGT	GAAATGGTTCAGTATGTTCCCTTTTGATAAGCGGAG
<i>E. coli</i> UMN026 (231)	GATTCGGTGGT	GAAATGGTTCAGTATGTTCCCTTTTGATAAGCGGAG
<i>E. coli</i> O157:H7 str. EC4115 (231)	GATTCGGTGGT	GAAATGGTTCAGTATGTTCCCTTTTGATAAGCGGAG
<i>E. coli</i> O157:H7 str. EDL933 (231)	GATTCGGTGGT	GAAATGGTTCAGTATGTTCCCTTTTGATAAGCGGAG
<i>E. coli</i> O157:H7 str. TW14359 (231)	GATTCGGTGGT	GAAATGGTTCAGTATGTTCCCTTTTGATAAGCGGAG
<i>E. coli</i> O55:H7 str. CB9615 (231)	GATTCGGTGGT	GAAATGGTTCAGTATGTTCCCTTTTGATAAGCGGAG
<i>E. coli</i> E24377A (231)	GATTCGGTGGT	GAAATGGTTCAGTATGTTCCCTTTTGATAAGCGGAG
<i>E. coli</i> 55989 (231)	GATTCGGTGGT	GAAATGGTTCAGTATGTTCCCTTTTGATAAGCGGAG
<i>E. coli</i> B str. REL606 (231)	GATTCGGTGGT	GAAATGGTTCAGTATGTTCCCTTTTGATAAGCGGAG
<i>E. coli</i> BW2952 (231)	GATTCGGTGGT	GAAATGGTTCAGTATGTTCCCTTTTGATAAGCGGAG
<i>E. coli</i> HS (231)	GATTCGGTGGT	GAAATGGTTCAGTATGTTCCCTTTTGATAAGCGGAG
<i>E. coli</i> IAI1 (231)	GATTCGGTGGT	GAAATGGTTCAGTATGTTCCCTTTTGATAAGCGGAG
<i>E. coli</i> K-12 DH10B (231)	GATTCGGTGGT	GAAATGGTTCAGTATGTTCCCTTTTGATAAGCGGAG
<i>E. coli</i> K-12 MG1655 (231)	GATTCGGTGGT	GAAATGGTTCAGTATGTTCCCTTTTGATAAGCGGAG
<i>E. coli</i> O103:H2 str. 12009 (231)	GATTCGGTGGT	GAAATGGTTCAGTATGTTCCCTTTTGATAAGCGGAG
<i>E. coli</i> O111:H- str. 11128 (231)	GATTCGGTGGT	GAAATGGTTCAGTATGTTCCCTTTTGATAAGCGGAG
<i>E. coli</i> O26:H11 str. 11368 (231)	GATTCGGTGGT	GAAATGGTTCAGTATGTTCCCTTTTGATAAGCGGAG

		301	350
<i>A. baumannii</i> AYE (299)		CATGGCATGCAGGGCGTTC	AAGCTACTTACC
<i>A. baumannii</i> SDF (299)		CATGGCATGCAGGGCGTTC	AAGCTACTTACC
<i>Acinetobacter</i> sp. ADP1 (293)		CATGGCATGCAGGGCGTTC	CAATATCTTGGGCAGT
<i>N. meningitidis</i> 053442 (299)		CATACATGCGGGCGTATC	TCTGTTTCGGCGACGGG
<i>P. aeruginosa</i> LESB58 (287)		CCTGGCATGCAGGGCGTTC	CTGCTTCGACGGTTCGCG
<i>P. aeruginosa</i> UCBPP-PA14 (287)		CCTGGCATGCAGGGCGTTC	CTGCTTCGACGGTTCGCG
<i>P. aeruginosa</i> PA01 (287)		CCTGGCATGCAGGGCGTTC	CTGCTTCGACGGTTCGCG
<i>P. aeruginosa</i> PA7 (287)		CCTGGCATGCAGGGCGTTC	CTGCTTCGACGGTTCGCG
<i>P. putida</i> KT2440 (293)		CCTGGCATGCAGGGCGTTC	CTGCTTCGACGGTTCGCG
<i>Y. pestis</i> C092 (281)		CTTGGCATGCAGGTGTTTC	CGTATTTGCTGGGCGT
<i>E. cloacae</i> 14 (281)		CCTGGCATGCAGGGCGTTC	GATCAGGGGCGCGAG
<i>E. cloacae</i> 14-M01 (281)		CCTAG-----	-----
<i>E. cloacae</i> NCTC 9394 (281)		CCTGGCATGCAGGGCGTTC	GATCAGGGGCGCGAG
<i>E. cloacae</i> Kollektiv MS (281)		CCTGGCATGCAGGGCGTTC	GATCAGGGGCGCGAG
<i>E. cloacae</i> ATCC 13047 (281)		CCTGGCATGCAGGGCGTTC	GATCAGGGGCGCGAG
<i>E. cloacae</i> 029 (281)		CCTGGCATGCAGGGCGTTC	GATCAGGGGCGCGAG
<i>E. cloacae</i> sp. 638 (281)		CCTGGCATGCAGGGCGTTC	GATCAGGGGCGCGAG
<i>E. cloacae</i> SCF1 (281)		CCTGGCATGCAGGGCGTTC	GATCAGGGGCGCGAG
<i>K. pneumoniae</i> 342 (281)		CGTGGCATGCAGGGCGTTC	TCTCTGCTATCAGGGG
<i>K. pneumoniae</i> MGH78578 (281)		CGTGGCATGCAGGGCGTTC	TCTCTGCTATCAGGGG
<i>K. pneumoniae</i> NTUH-K2044 (281)		CGTGGCATGCAGGGCGTTC	TCTCTGCTATCAGGGG
<i>Citrobacter rodentium</i> ICC168 (281)		CGTGGCATGCAGGGCGTTC	GATCAGGGGCGCGAG
<i>S. Enteritidis</i> PT4 str. P125109 (281)		CGTGGCATGCAGGGCGTTC	ATCAAATCAGGGGCGG
<i>S. Typhi</i> CT18 (281)		CGTGGCATGCAGGGCGTTC	ATCAAATCAGGGGCGG
<i>S. Typhi</i> str. Ty2 (281)		CGTGGCATGCAGGGCGTTC	ATCAAATCAGGGGCGG
<i>S. Paratyphi</i> A ATCC 9150 (281)		CGTGGCATGCAGGGCGTTC	ATCAAATCAGGGGCGG
<i>S. Typhimurium</i> LT2 (281)		CGTGGCATGCAGGGCGTTC	ATCAAATCAGGGGCGG
<i>E. coli</i> APEC 01 (281)		CCTGGCATGCAGGGAGTCTCT	CAGTATCAGGGGCGT
<i>E. coli</i> S88 (281)		CCTGGCATGCAGGGAGTCTCT	CAGTATCAGGGGCGT
<i>E. coli</i> UTI89 (281)		CCTGGCATGCAGGGAGTCTCT	CAGTATCAGGGGCGT
<i>E. coli</i> O127:H6 str. E2348/69 (281)		CCTGGCATGCAGGGAGTCTCT	CAGTATCAGGGGCGT
<i>E. coli</i> CFT073 (281)		CCTGGCATGCAGGGAGTCTCT	CAGTATCAGGGGCGT
<i>E. coli</i> ED1a (281)		CCTGGCATGCAGGGAGTCTCT	CAGTATCAGGGGCGT
<i>E. coli</i> IAI39 (281)		CCTGGCATGCAGGGAGTCTCT	CAGTATCAGGGGCGT
<i>E. coli</i> SMS-3-5 (281)		CCTGGCATGCAGGGAGTCTCT	CAGTATCAGGGGCGT
<i>E. coli</i> UMN026 (281)		CCTGGCATGCAGGGAGTCTCT	CAGTATCAGGGGCGT
<i>E. coli</i> O157:H7 str. EC4115 (281)		CATGGCATGCAGGGAGTCTCT	CAGTATCAGGGGCGT
<i>E. coli</i> O157:H7 str. EDL933 (281)		CATGGCATGCAGGGAGTCTCT	CAGTATCAGGGGCGT
<i>E. coli</i> O157:H7 str. TW14359 (281)		CATGGCATGCAGGGAGTCTCT	CAGTATCAGGGGCGT
<i>E. coli</i> O55:H7 str. CB9615 (281)		CATGGCATGCAGGGAGTCTCT	CAGTATCAGGGGCGT
<i>E. coli</i> E24377A (281)		CATGGCATGCAGGGAGTCTCT	CAGTATCAGGGGCGT
<i>E. coli</i> 55989 (281)		CATGGCATGCAGGGAGTCTCT	CAGTATCAGGGGCGT
<i>E. coli</i> B str. REL606 (281)		CATGGCATGCAGGGAGTCTCT	CAGTATCAGGGGCGT
<i>E. coli</i> BW2952 (281)		CATGGCATGCAGGGAGTCTCT	CAGTATCAGGGGCGT
<i>E. coli</i> HS (281)		CATGGCATGCAGGGAGTCTCT	CAGTATCAGGGGCGT
<i>E. coli</i> IAI1 (281)		CATGGCATGCAGGGAGTCTCT	CAGTATCAGGGGCGT
<i>E. coli</i> K-12 DH10B (281)		CATGGCATGCAGGGAGTCTCT	CAGTATCAGGGGCGT
<i>E. coli</i> K-12 MG1655 (281)		CATGGCATGCAGGGAGTCTCT	CAGTATCAGGGGCGT
<i>E. coli</i> O103:H2 str. 12009 (281)		CATGGCATGCAGGGAGTCTCT	CAGTATCAGGGGCGT
<i>E. coli</i> O111:H- str. 11128 (281)		CATGGCATGCAGGGAGTCTCT	CAGTATCAGGGGCGT
<i>E. coli</i> O26:H11 str. 11368 (281)		CATGGCATGCAGGGAGTCTCT	CAGTATCAGGGGCGT

	351	400
<i>A. baumannii</i> AYE (349)	TAATCAATTGGTATTGAGCTTGAAGGAAGTGATGATTACCTTTTGAAGA	
<i>A. baumannii</i> SDF (349)	TAATCAATTGGTATTGAGCTTGAAGGAAGTGATGATTACCTTTTGAAGA	
<i>Acinetobacter</i> sp. ADP1 (343)	TACTCGATTGGTATTGAACTTGAAGGAAGTGACGATCTGCCTTTTGAAGA	
<i>N. meningitidis</i> 053442 (349)	TTTTCCATCGGCATCGAACTGGAAGGCTGGATTTGGAACCTTTACC	
<i>P. aeruginosa</i> LESB58 (337)	TTCTCCCTTGGCATCGAACTGGAGGGGACCGACACGGAACCGTACACGGA	
<i>P. aeruginosa</i> UCBPP-PA14 (337)	TTCTCCCTTGGCATCGAACTGGAGGGGACCGACACGGAACCGTACACGGA	
<i>P. aeruginosa</i> PA01 (337)	TTCTCCCTTGGCATCGAACTGGAGGGGACCGACACGGAACCGTACACGGA	
<i>P. aeruginosa</i> PA7 (337)	TTTTTCCCTGGGGTGGAACTGGAAGGACCGGACACGGAACCGTACACGGA	
<i>P. putida</i> KT2440 (343)	TTTTCCATCGGCATCGAGCTGGAAGGCACCGACGACCTGCCCTATACCGA	
<i>Y. pestis</i> CO92 (331)	TTTTCTATTGGGATCGAGCTGGAAGGACAGATGTCTTACCGTTTACTCC	
<i>E. cloacae</i> 14 (331)	TTCTCCATTGGAATTGAACTGGAAGGAACGGACACACCTTTACACCGA	
<i>E. cloacae</i> 14-M01 (286)	-----	
<i>E. cloacae</i> NCTC 9394 (331)	TTCTCCATTGGAATTGAACTGGAAGGAACGGACACACCTTTACACCGA	
<i>E. cloacae</i> Kollektiv MS (331)	TTCTCCATTGGAATTGAACTGGAAGGAACGGACACACCTTTACACCGA	
<i>E. cloacae</i> ATCC 13047 (331)	TTCTCTATTGGGATTTGAACTGGAAGGCACGGACACACCCCTTATACCGA	
<i>E. cloacae</i> 029 (331)	TTTTCTATCGGGATCGAACTGGAAGGCACGGATACACCTTACACCGA	
<i>E. cloacae</i> sp. 638 (331)	TTTTCCATCGGCATCGAGCTGGAAGGCACCGATACACCTTTACACCGA	
<i>E. cloacae</i> SCF1 (331)	TTCTCTATCGGTATCGAGCTGGAAGGCACCGACACGCTGGCTTATACCGA	
<i>K. pneumoniae</i> 342 (331)	TTTTCCATTGGCATTGAGCTGGAAGGCACGGATACCTGGCGTATACCGA	
<i>K. pneumoniae</i> MGH78578 (331)	TTTTCCATCGGCATCGAGCTGGAAGGCACCGATACCTGGCGTATACCGA	
<i>K. pneumoniae</i> NTUH-K2044 (331)	TTTTCCATCGGCATCGAGCTGGAAGGCACCGATACCTGGCGTATACCGA	
<i>Citrobacter rodentium</i> ICC168 (331)	TTTTCGATAGGCATTGAGCTGGAAGGCACCGATACGCTGGCTTATACCGA	
<i>S. Enteritidis</i> PT4 str. P125109 (331)	TTCTCCATTGGTATTGAGCTGGAGGGGACAGATACGCTGGCTTATACCGA	
<i>S. Typhi</i> CT18 (331)	TTCTCCATTGGTATTGAGCTGGAGGGGACGGATACGCTGGCTTATACCGA	
<i>S. Typhi</i> str. Ty2 (331)	TTCTCCATTGGTATTGAGCTGGAGGGGACGGATACGCTGGCTTATACCGA	
<i>S. Paratyphi</i> A ATCC 9150 (331)	TTCTCCATTGGTATTGAGCTGGAGGGGACGGATACGCTGGCTTATACCGA	
<i>S. Typhimurium</i> LT2 (331)	TTCTCCATTGGTATTGAGCTGGAGGGGACGGATACGCTGGCTTATACCGA	
<i>E. coli</i> APEC O1 (331)	TTTTCTATTGGGATTGAGCTGGAAGGCACCGATACGCTGGCGTATACCGA	
<i>E. coli</i> S88 (331)	TTTTCTATTGGGATTGAGCTGGAAGGCACCGATACGCTGGCGTATACCGA	
<i>E. coli</i> UTI89 (331)	TTTTCTATTGGGATTGAGCTGGAAGGCACCGATACGCTGGCGTATACCGA	
<i>E. coli</i> O127:H6 str. E2348/69 (331)	TTTTCTATTGGGATTGAGCTGGAAGGCACCGATACGCTGGCGTATACCGA	
<i>E. coli</i> CFT073 (331)	TTTTCTATTGGGATTGAGCTGGAAGGCACCGATACGCTGGCGTATACCGA	
<i>E. coli</i> ED1a (331)	TTTTCTATTGGGATTGAGCTGGAAGGCACCGATACGCTGGCGTATACCGA	
<i>E. coli</i> IAI39 (331)	TTTTCTATTGGGATTGAGCTGGAAGGCACCGATACGCTGGCGTATACCGA	
<i>E. coli</i> SMS-3-5 (331)	TTTTCTATTGGGATTGAGCTGGAAGGCACCGATACGCTGGCGTATACCGA	
<i>E. coli</i> UMN026 (331)	TTTTCTATTGGGATTGAGCTGGAAGGCACCGATACGCTGGCGTATACCGA	
<i>E. coli</i> O157:H7 str. EC4115 (331)	TTTTCTATTGGGATTGAGCTTGAAGGCACCGATACGCTGGCGTATACCGA	
<i>E. coli</i> O157:H7 str. EDL933 (331)	TTTTCTATTGGGATTGAGCTTGAAGGCACCGATACGCTGGCGTATACCGA	
<i>E. coli</i> O157:H7 str. TW14359 (331)	TTTTCTATTGGGATTGAGCTTGAAGGCACCGATACGCTGGCGTATACCGA	
<i>E. coli</i> O55:H7 str. CB9615 (331)	TTTTCTATTGGGATTGAGCTTGAAGGCACCGATACGCTGGCGTATACCGA	
<i>E. coli</i> E24377A (331)	TTTTCTATTGGGATTGAGCTTGAAGGCACCGATACGCTGGCGTATACCGA	
<i>E. coli</i> 55989 (331)	TTTTCTATTGGGATTGAGCTTGAAGGCACCGATACGCTGGCGTATACCGA	
<i>E. coli</i> B str. REL606 (331)	TTTTCTATTGGGATTGAGCTTGAAGGCACCGATACGCTGGCGTATACCGA	
<i>E. coli</i> BW2952 (331)	TTTTCTATTGGGATTGAGCTTGAAGGCACCGATACGCTGGCGTATACCGA	
<i>E. coli</i> HS (331)	TTTTCTATTGGGATTGAGCTTGAAGGCACCGATACGCTGGCGTATACCGA	
<i>E. coli</i> IAI1 (331)	TTTTCTATTGGGATTGAGCTTGAAGGCACCGATACGCTGGCGTATACCGA	
<i>E. coli</i> K-12 DH10B (331)	TTTTCTATTGGGATTGAGCTTGAAGGCACCGATACGCTGGCGTATACCGA	
<i>E. coli</i> K-12 MG1655 (331)	TTTTCTATTGGGATTGAGCTTGAAGGCACCGATACGCTGGCGTATACCGA	
<i>E. coli</i> O103:H2 str. 12009 (331)	TTTTCTATTGGGATTGAGCTTGAAGGCACCGATACGCTGGCGTATACCGA	
<i>E. coli</i> O111:H- str. 11128 (331)	TTTTCTATTGGGATTGAGCTTGAAGGCACCGATACGCTGGCGTATACCGA	
<i>E. coli</i> O26:H11 str. 11368 (331)	TTTTCTATTGGGATTGAGCTTGAAGGCACCGATACGCTGGCGTATACCGA	

		401	450
<i>A. baumannii</i> AYE (399)		CGTACAATATGAA-----GTGCTAACTGACGTTGTTACTGCTATTCGTC	
<i>A. baumannii</i> SDF (399)		CTTACAATATGAA-----GTGCTAACTGACGTTGTTACTGCTATCCGTC	
<i>Acinetobacter</i> sp. ADP1 (393)		TATTCAGTATGAACGCTTGAGCGAAGTGACGCAGCTACTGCAA-----CA	
<i>N. meningitidis</i> 053442 (399)		AGCGCAATACGGTTCGCTCAAGCCTTGTTGACGCAATCTGC-----CG	
<i>P. aeruginosa</i> LESB58 (387)		CGCGCAGTACACTGCCCTGGCCGGCTGACGCGGCTGTTGCGC-----GC	
<i>P. aeruginosa</i> UCBPP-PA14 (387)		CGCGCAGTACACTGCCCTGGCCGGCTGACGCGGCTGTTGCGC-----GC	
<i>P. aeruginosa</i> PA01 (387)		CGCGCAGTACACTGCCCTGGCCGGCTGACGCGGCTGTTGCGC-----GC	
<i>P. aeruginosa</i> PA7 (387)		TGCGCAGTACACTGCCCTGGTCGGTTGACGCGGCTGTTGCGC-----GC	
<i>P. putida</i> KT2440 (393)		TGCCCAGTATGCGGTGCTGAGCAACTCACCGGCACATCCGC-----AG	
<i>Y. pestis</i> CO92 (381)		CGTGCAATATCAACGACTGACTGAGATCAGTGCGGTTTTATTT-----GC	
<i>E. cloacae</i> 14 (381)		TGCCCAATATGAGAACTGTTGCTGTAAACGAAAAGTTAATC-----GG	
<i>E. cloacae</i> 14-M01 (286)		-----	
<i>E. cloacae</i> NCTC 9394 (381)		TGCCCAATATGAGAACTGTTGCTGTAAACGAAAAGTTAATC-----GG	
<i>E. cloacae</i> Kollektiv MS (381)		TGCCCAATATCAGAACTGTTGCTGTGACGGAAGTTTAGTG-----GG	
<i>E. cloacae</i> ATCC 13047 (381)		TGCACAGTACCAGCGCTTGCGGGATATCACCAAAAGCTCATC-----AG	
<i>E. cloacae</i> 029 (381)		TTCACAGTATCAACAGCTAGCGGCTCTGACCGCAACGTTATC-----GG	
<i>E. cloacae</i> sp. 638 (381)		TGCCCAGTATCAGGCACTGTGTGCGGTGACGCGAAAATTGATC-----GC	
<i>E. cloacae</i> SCF1 (381)		TGCCCAGTATCAGCACTGGCAGCTAACCGGCTGTTACG-----AC	
<i>K. pneumoniae</i> 342 (381)		TGCCCAGTACCAGCAGCTGGCGGCGGTGACGGAACTACTGATC-----AC	
<i>K. pneumoniae</i> MGH78578 (381)		CGCGCAGTACCAGCAGCTGGCGGCGGTGACGGATCTGCTGATC-----GC	
<i>K. pneumoniae</i> NTUH-K2044 (381)		CGCGCAGTACCAGCAGCTGGCGGCGGTGACGGATCTGCTGATC-----GC	
<i>Citrobacter rodentium</i> ICC168 (381)		TGCCCAATATCAACAGCTGGCGGCAATACCGCAACCTTGATT-----AC	
<i>S. Enteritidis</i> PT4 str. P125109 (381)		TGCCCAGTATCAGCAGCTAGCCGCCGTGACGCGCAGGCTTATC-----GC	
<i>S. Typhi</i> CT18 (381)		TGCCCAGTATCAGCAGCTAGCCGCCGTGACGCGCAGGCTTATC-----GC	
<i>S. Typhi</i> str. Ty2 (381)		TGCCCAGTATCAGCAGCTAGCCGCCGTGACGCGCAGGCTTATC-----GC	
<i>S. Paratyphi</i> A ATCC 9150 (381)		TGCCCAGTATCAGCAGCTAGCCGCCGTGACGCGCAGGCTTATC-----GC	
<i>S. Typhimurium</i> LT2 (381)		TGCCCAGTATCAGCAGCTAGCCGCCGTGACGCGCAGGCTTATC-----GC	
<i>E. coli</i> APEC 01 (381)		TGCCCAGTATCAACAGCTTGGCGGCTTACACGGGCACTGATT-----GA	
<i>E. coli</i> S88 (381)		TGCCCAGTATCAACAGCTTGGCGGCTTACACGGGCACTGATT-----GA	
<i>E. coli</i> UTI89 (381)		TGCCCAGTATCAACAGCTTGGCGGCTTACACGGGCACTGATT-----GA	
<i>E. coli</i> O127:H6 str. E2348/69 (381)		TGCCCAGTATCAACAGCTTGGCGGCTTACACGGGCACTGATT-----CA	
<i>E. coli</i> CFT073 (381)		TGCCCAGTATCAACAGCTTGGCGGCTTACGCGGGCACTGATT-----GA	
<i>E. coli</i> ED1a (381)		TGCCCAGTATCAACAGCTTGGCGGCTTACGCGGGCACTGATT-----GA	
<i>E. coli</i> IAI39 (381)		TGCCCAGTATCAACAGCTTGGCGGCTTACGCGGGCACTGATT-----GA	
<i>E. coli</i> SMS-3-5 (381)		TGCCCAGTATCAACAGCTTGGCGGCTTACGCGGGCACTGATT-----GA	
<i>E. coli</i> UMN026 (381)		TGCCCAGTATCAACAGCTTGGCGGCTTACGCGGGCACTGATT-----GA	
<i>E. coli</i> O157:H7 str. EC4115 (381)		TGCCCAGTATCAACAGCTTGGCGGCTTACGCGGGCACTGATT-----GA	
<i>E. coli</i> O157:H7 str. EDL933 (381)		TGCCCAGTATCAACAGCTTGGCGGCTTACGCGGGCACTGATT-----GA	
<i>E. coli</i> O157:H7 str. TW14359 (381)		TGCCCAGTATCAACAGCTTGGCGGCTTACGCGGGCACTGATT-----GA	
<i>E. coli</i> O55:H7 str. CB9615 (381)		TGCCCAGTATCAACAGCTTGGCGGCTTACGCGGGCACTGATT-----GA	
<i>E. coli</i> E24377A (381)		TGCCCAGTATCAACAGCTTGGCGGCTTACGCGGGCACTGATT-----GA	
<i>E. coli</i> 55989 (381)		TGCCCAGTATCAACAGCTTGGCGGCTTACGCGGGCACTGATT-----GA	
<i>E. coli</i> B str. REL606 (381)		TGCCCAGTATCAACAGCTTGGCGGCTTACGCGGGCACTGATT-----GA	
<i>E. coli</i> BW2952 (381)		TGCCCAGTATCAACAGCTTGGCGGCTTACGCGGGCACTGATT-----GA	
<i>E. coli</i> HS (381)		TGCCCAGTATCAACAGCTTGGCGGCTTACGCGGGCACTGATT-----GA	
<i>E. coli</i> IAI1 (381)		TGCCCAGTATCAACAGCTTGGCGGCTTACGCGGGCACTGATT-----GA	
<i>E. coli</i> K-12 DH10B (381)		TGCCCAGTATCAACAGCTTGGCGGCTTACGCGGGCACTGATT-----GA	
<i>E. coli</i> K-12 MG1655 (381)		TGCCCAGTATCAACAGCTTGGCGGCTTACGCGGGCACTGATT-----GA	
<i>E. coli</i> O103:H2 str. 12009 (381)		TGCCCAGTATCAACAGCTTGGCGGCTTACGCGGGCACTGATT-----GA	
<i>E. coli</i> O111:H- str. 11128 (381)		TGCCCAGTATCAACAGCTTGGCGGCTTACGCGGGCACTGATT-----GA	
<i>E. coli</i> O26:H11 str. 11368 (381)		TGCCCAGTATCAACAGCTTGGCGGCTTACGCGGGCACTGATT-----GA	

451 500

*A. baumannii* AYE (444) GGCTATCCGTGAAAT TAAA---AACCATAT TGCA GGGCATT CAGACATTG  
*A. baumannii* SDF (444) GGCTATCCGTGAAAT TAAA---AACCATAT TGCA GGGCATT CAGACATTG  
*Acinetobacter* sp. ADP1 (438) CACCTATCCGAAAAT TATG---CAGCATCTG GCA GGGCATT CTGATATCG  
*N. meningitidis* 053442 (444) CCCTACCG---CATCAC----GGCGG--TACGGGGCA CCAAGA CATCG  
*P. aeruginosa* LESB58 (432) GGCTTCCCGGCGATCACCCCGGACGCATCCA GGGCCACTGCGATATCG  
*P. aeruginosa* UCBPP-PA14 (432) GGCTTCCCGGGGATCACCCCGGACGCATCCA GGGCCACTGCGATATCG  
*P. aeruginosa* PA01 (432) GGCTTCCCGGGGATCACCCCGGACGCATCCA GGGCCACTGCGATATCG  
*P. aeruginosa* PA7 (432) GGCGTTCCCGGCGATCACCCCGGGCGGATCCAGGGCCACTGCGATATCG  
*P. putida* KT2440 (438) TGCTTGGCCAGCCATCGACCTGAACCCGCAT TCA GGGCCACAGCGACATTG  
*Y. pestis* CO92 (426) CCACTATCC---AATAACGGTAGAGCGGGTGGCTGGT CACAGT GAGATCG  
*E. cloacae* 14 (426) GCCTATCCCGCCAT TGA---GACAATAT TACAGGGCCACAGCGACATTG  
-----  
*E. cloacae* 14-M01 (286) -----  
*E. cloacae* NCTC 9394 (426) GCCTATCCCGCCAT TGA---GACAATAT TACAGGGCCACAGCGACATTG  
*E. cloacae* Kollektiv MS (426) GCTTTATCCCGCCAT TAAA---GACAACAT TACGGGGCACAGCGACATTG  
*E. cloacae* ATCC 13047 (426) GCTTTATCCCGCGAT TGA---GAGAACATGACGGGACACTGTGATATCG  
*E. cloacae* 029 (426) ACTTTACCCGGCCATCGCC---GACAATAT TACGGGCA CAGCGATATCG  
*E. cloacae* sp. 638 (426) CTGCTATCCGACAAT TTC---GACAATAT CACTGGGCATAGCGATATCG  
*E. cloacae* SCF1 (426) GGTTTACCCGGCGATG GCT---GACCATAT CACGGGGCACAGCGATATTG  
*K. pneumoniae* 342 (426) GATTTACCCGGCTATCGCC---GAAAACATCGCGGGCCACAGCGATATCG  
*K. pneumoniae* MGH78578 (426) GCTTTATCCGGCTATCGCC---GAAAACAT TCGGGCCACAGCGATATCG  
*K. pneumoniae* NTUH-K2044 (426) GCTTTATCCGGCTATCGCC---GAAAACAT TCGGGCCACAGCGATATCG  
*Citrobacter rodentium* ICC168 (426) ACATTTACCCGGCCAT TGC---GATAACA CACCGGACATTGTGATATTG  
*S. Enteritidis* PT4 str. P125109 (426) TTGCTATCCGGCGATCGCC---GACAATATGACCGGACACTGCAACATTG  
*S. Typhi* CT18 (426) TTGCTATCCGGCGATCGCC---GACAATATGACCGGACACTGCAACATTG  
*S. Typhi* str. Ty2 (426) TTGCTATCCGGCGATCGCC---GACAATATGACCGGACACTGCAACATTG  
*S. Paratyphi* A ATCC 9150 (426) TAGCTATCCGGCGATCGCC---GACAATATGACCGGACACTGCAACATTG  
*S. Typhimurium* LT2 (426) TAGCTATCCGGCGATCGCC---GACAATATGACCGGACACTGCAACATTG  
*E. coli* APEC O1 (426) TCGCTATCCGGATATCGCT---AATAACATGACGGGCCATTGTGATATTG  
*E. coli* S88 (426) TCGCTATCCGGATATCGCT---AATAACATGACGGGCCATTGTGATATTG  
*E. coli* UTI89 (426) TCGCTATCCGGATATCGCT---AATAACATGACGGGCCATTGTGATATTG  
*E. coli* O127:H6 str. E2348/69 (426) TCGCTATCCGGATATCGCT---AATAACATGACGGGCCATTGTGATATTG  
*E. coli* CFT073 (426) TCGCTATCCAGATATCGCT---AATAACATGACGGGCCATTGTGATATTG  
*E. coli* ED1a (426) TCGCTATCCAGATATCGCT---AATAACATGACGGGCCATTGTGATATTG  
*E. coli* IAI39 (426) TCGCTATCCAGATATCGCT---AATAACATGACGGGCCATTGTGATATTG  
*E. coli* SMS-3-5 (426) TCGCTATCCAGATATCGCT---AATAACATGACGGGCCATTGTGATATTG  
*E. coli* UMN026 (426) TCGCTATCCAGATATCGCT---AATAACATGACGGGCCATTGTGATATTG  
*E. coli* O157:H7 str. EC4115 (426) TTGCTATCCGGATATCGCT---AATAACATGACGGGCCATTGTGATATTG  
*E. coli* O157:H7 str. EDL933 (426) TTGCTATCCGGATATCGCT---AATAACATGACGGGCCATTGTGATATTG  
*E. coli* O157:H7 str. TW14359 (426) TTGCTATCCGGATATCGCT---AATAACATGACGGGCCATTGTGATATTG  
*E. coli* O55:H7 str. CB9615 (426) TTGCTATCCGGATATCGCT---AATAACATGACGGGCCATTGTGATATTG  
*E. coli* E24377A (426) TTGCTATCCGGATATCGCT---AAAAACATGACGGGCCATTGTGATATTG  
*E. coli* 55989 (426) TTGCTATCCGGATATCGCT---AAAAACATGACGGGCCATTGTGATATTG  
*E. coli* B str. REL606 (426) TTGCTATCCGGATATCGCT---AAAAACATGACGGGCCATTGTGATATTG  
*E. coli* BW2952 (426) TTGCTATCCGGATATCGCT---AAAAACATGACGGGCCATTGTGATATTG  
*E. coli* HS (426) TTGCTATCCGGATATCGCT---AAAAACATGACGGGCCATTGTGATATTG  
*E. coli* IAI1 (426) TTGCTATCCGGATATCGCT---AAAAACATGACGGGCCATTGTGATATTG  
*E. coli* K-12 DH10B (426) TTGCTATCCGGATATCGCT---AAAAACATGACGGGCCATTGTGATATTG  
*E. coli* K-12 MG1655 (426) TTGCTATCCGGATATCGCT---AAAAACATGACGGGCCATTGTGATATTG  
*E. coli* O103:H2 str. 12009 (426) TTGCTATCCGGATATCGCT---AAAAACATGACGGGCCATTGTGATATTG  
*E. coli* O111:H- str. 11128 (426) TTGCTATCCGGATATCGCT---AAAAACATGACGGGCCATTGTGATATTG  
*E. coli* O26:H11 str. 11368 (426) TTGCTATCCGGATATCGCT---AAAAACATGACGGGCCATTGTGATATTG

	501	550
<i>A. baumannii</i> AYE (491)	CACCGGCGCGAAAAACCGATCCGGACCTTATTTTAAATGGCAGCAC-TT	
<i>A. baumannii</i> SDF (491)	CACCGGCGCGAAAAACCGATCCGGACCTTATTTTAAATGGCAGCAC-TT	
<i>Acinetobacter</i> sp. ADP1 (485)	CACCTGTGCGTAAAACTGATCCAGGCCATTTTTGACTGGCGTTAT-TT	
<i>N. meningitidis</i> 053442 (485)	GGCCAGCGCGAAAAACCGACCCCGGTCATTTTTCGACTGGCGGGGATA	
<i>P. aeruginosa</i> LESB58 (482)	CCCCGGAGCGCAAGACCGATCCCGCGAGGCTTTTCGACTGGTTGCC-TA	
<i>P. aeruginosa</i> UCBPP-PA14 (482)	CCCCGGAGCGCAAGACCGATCCCGCGAGGCTTTTCGACTGGTTGCC-TA	
<i>P. aeruginosa</i> PA01 (482)	CCCCGGAGCGCAAGACCGATCCCGCGAGGCTTTTCGACTGGTTGCC-TA	
<i>P. aeruginosa</i> PA7 (482)	CTCCGAGCGCAAGACCGACCCCGCGAGGCTTTCGACTGGCCGCG-TA	
<i>P. putida</i> KT2440 (488)	CCCCGAGCGCAAGACCGACCCCGCCCGGCTTTCGACTGGTTGCC-TA	
<i>Y. pestis</i> CO92 (473)	CACCGGGCGTAAAAACAGACCCAGGGCTGGCCTTTGATTGGTTTTTT-TA	
<i>E. cloacae</i> 14 (473)	CCCCGAAAGAAAAACCGACCCCGCCCGGCGTTTGACTGGTCCCGG-TT	
<i>E. cloacae</i> 14-M01 (286)	CCCCGAAAGAAAAACCGACCCCGCCCGGCGTTTGACTGGTCCCGG-TT	
<i>E. cloacae</i> NCTC 9394 (473)	CCCCGAAAGAAAAACCGACCCCGCCCGGCGTTTGACTGGTCCCGG-TT	
<i>E. cloacae</i> Kollektiv MS (473)	CCCCGAAAGAAAAACCGACCCCGCCCGGCGTTTGACTGGTCCCGG-TT	
<i>E. cloacae</i> ATCC 13047 (473)	CCCCGGCGCGAAAAACCGATCCCGGCTTGCCTTGCATTTGACTGGCCCGG-TT	
<i>E. cloacae</i> 029 (473)	CTCCGGCGAAGAAAAACCGATCCCGGCCCGCATTTGACTGGCCCGG-TT	
<i>E. cloacae</i> sp. 638 (473)	CGCCGGTGAAGAAAAACCGATCCAGGACCGGCTTTTGACTGGTCCAGG-TT	
<i>E. cloacae</i> SCF1 (473)	CCCCGAGCGAAAAACCGATCCCGGCCCGGCTTTTGACTGGCCCGG-TT	
<i>K. pneumoniae</i> 342 (473)	CGCCCGTGGCGAAAAACCGATCCAGGACCGGCTTTTGACTGGATAAAA-TT	
<i>K. pneumoniae</i> MGH78578 (473)	CGCCCGTGGCGAAAAACCGATCCAGGACCGGCTTTTGACTGGATAAAA-TA	
<i>K. pneumoniae</i> NTUH-K2044 (473)	CGCCCGTGGCGAAAAACCGATCCAGGACCGGCTTTTGACTGGATAAAA-TA	
<i>Citrobacter rodentium</i> ICC168 (473)	CGCCTGAGCGTAAGACCGACCCGGGCCAGCCTTTGACTGGACAAGG-TT	
<i>S. Enteritidis</i> PT4 str. P125109 (473)	CGCCTGACCGCAAAACGGACCCCTGGCCCTGGCTTTTGACTGGCCCGG-TT	
<i>S. Typhi</i> CT18 (473)	CGCCTGACCGCAAAACGGACCCCTGGCCCTGGCTTTTGACTGGCCCGG-TT	
<i>S. Typhi</i> str. Ty2 (473)	CGCCTGACCGCAAAACGGACCCCTGGCCCTGGCTTTTGACTGGCCCGG-TT	
<i>S. Paratyphi</i> A ATCC 9150 (473)	CGCCTGACCGCAAAACGGACCCCTGGCCCTGGCTTTTGACTGGCCCGG-TT	
<i>S. Typhimurium</i> LT2 (473)	CGCCTGACCGCAAAACGGACCCCTGGCCCTGGCTTTTGACTGGCCCGG-TT	
<i>E. coli</i> APEC O1 (473)	CGCCGGATCGGAAAACCGATCCCGGTCCTGCATTTGATGGGCACGG-TT	
<i>E. coli</i> S88 (473)	CGCCGGATCGGAAAACCGATCCCGGTCCTGCATTTGATGGGCACGG-TT	
<i>E. coli</i> UTI89 (473)	CGCCGGATCGGAAAACCGATCCCGGTCCTGCATTTGATGGGCACGG-TT	
<i>E. coli</i> O127:H6 str. E2348/69 (473)	CGCCGGATCGGAAAACCGATCCCGGTCCTGCATTTGATGGGCACGG-TT	
<i>E. coli</i> CFT073 (473)	CGCCGGATCGGAAAACCGATCCCGGTCCTGCATTTGATGGGCACGG-TT	
<i>E. coli</i> ED1a (473)	CGCCGGATCGGAAAACCGATCCCGGTCCTGCATTTGATGGGCACGG-TT	
<i>E. coli</i> IAI39 (473)	CGCCGGATCGGAAAACCGATCCCGGTCCTGCATTTGATGGGCACGG-TT	
<i>E. coli</i> SMS-3-5 (473)	CGCCGGATCGGAAAACCGATCCCGGTCCTGCATTTGATGGGCACGG-TT	
<i>E. coli</i> UMN026 (473)	CGCCGGATCGGAAAACCGATCCCGGTCCTGCATTTGATGGGCACGG-TT	
<i>E. coli</i> O157:H7 str. EC4115 (473)	CGCCGGATCGGAAAACCGATCCCGGTCCTGCATTTGATGGGCACGG-TT	
<i>E. coli</i> O157:H7 str. EDL933 (473)	CGCCGGATCGGAAAACCGATCCCGGTCCTGCATTTGATGGGCACGG-TT	
<i>E. coli</i> O157:H7 str. TW14359 (473)	CGCCGGATCGGAAAACCGATCCCGGTCCTGCATTTGATGGGCACGG-TT	
<i>E. coli</i> O55:H7 str. CB9615 (473)	CGCCGGATCGGAAAACCGATCCCGGTCCTGCATTTGATGGGCACGG-TT	
<i>E. coli</i> E24377A (473)	CGCCGGATCGGAAAACCGATCCCGGTCCTGCATTTGATGGGCACGG-TT	
<i>E. coli</i> 55989 (473)	CGCCGGATCGGAAAACCGATCCCGGTCCTGCATTTGATGGGCACGG-TT	
<i>E. coli</i> B str. REL606 (473)	CGCCGGATCGGAAAACCGATCCCGGTCCTGCATTTGATGGGCACGG-TT	
<i>E. coli</i> BW2952 (473)	CGCCGGATCGGAAAACCGATCCCGGTCCTGCATTTGATGGGCACGG-TT	
<i>E. coli</i> HS (473)	CGCCGGATCGGAAAACCGATCCCGGTCCTGCATTTGATGGGCACGG-TT	
<i>E. coli</i> IAI1 (473)	CGCCGGATCGGAAAACCGATCCCGGTCCTGCATTTGATGGGCACGG-TT	
<i>E. coli</i> K-12 DH10B (473)	CGCCGGATCGGAAAACCGATCCCGGTCCTGCATTTGATGGGCACGG-TT	
<i>E. coli</i> K-12 MG1655 (473)	CGCCGGATCGGAAAACCGATCCCGGTCCTGCATTTGATGGGCACGG-TT	
<i>E. coli</i> O103:H2 str. 12009 (473)	CGCCGGATCGGAAAACCGATCCCGGTCCTGCATTTGATGGGCACGG-TT	
<i>E. coli</i> O111:H- str. 11128 (473)	CGCCGGATCGGAAAACCGATCCCGGTCCTGCATTTGATGGGCACGG-TT	
<i>E. coli</i> O26:H11 str. 11368 (473)	CGCCGGATCGGAAAACCGATCCCGGTCCTGCATTTGATGGGCACGG-TT	

	551	600
<i>A. baumannii</i> AYE (540)	TAGCAGTTGTTAGCA-----CAGAAA	AAACTTGA-----
<i>A. baumannii</i> SDF (540)	TAGCAGTTGTTAGCA-----CAGAAA	AAACTTGA-----
<i>Acinetobacter</i> sp. ADP1 (534)	CCCCGACTGCTCG-A-----CTCAAAA	AAACTTGAATTTGGA
<i>N. meningitidis</i> 053442 (535)	CGGGGAAAGGGTTTCCCGTGGAC----	AGAAATGTCGTCTGA
<i>P. aeruginosa</i> LESB58 (531)	CCCG--CGGATTGACCGATTCC----	AAGGAGCAACATGA-----
<i>P. aeruginosa</i> UCBPP-PA14 (531)	CCCG--CGGATTGACCGATTCC----	AAGGAGCAACATGA-----
<i>P. aeruginosa</i> PA01 (531)	CCCG--CGGATTGACCGATTCC----	AAGGAGCAACATGA-----
<i>P. aeruginosa</i> PA7 (531)	CCGTG--CGGATTGACCGATTCC----	AAGGAGCAACATGA-----
<i>P. putida</i> KT2440 (537)	CCCC--AGGCGTTCAGCACAAC----	GAGGACAGGCATGA-----
<i>Y. pestis</i> CO92 (522)	TCAAC-AAAATTTAGC-----TAAATT	CTTGTATGA-----
<i>E. cloacae</i> 14 (522)	TCACGCCATGCTTACCACGTCGTCAGAT	AAGGAGTAAACATGA-----
<i>E. cloacae</i> 14-M01 (286)	TCACGCCATGCTTACCACGTCGTCAGAT	AAGGAGTAAACATGA-----
<i>E. cloacae</i> NCTC 9394 (522)	TCACGCCATGCTTACCACGTCGTCAGAT	AAGGAGTAAACATGA-----
<i>E. cloacae</i> Kollektiv MS (522)	TCACGCCATGCTTACCACGTCGTCAGAT	AAGGAGTAAACATGA-----
<i>E. cloacae</i> ATCC 13047 (522)	TCCCGCCATGCTTACCGGTCGTCAGAA	TA-----
<i>E. cloacae</i> 029 (522)	TCCCGCCATGCTCACCGGTCGTCAGAT	AAGGAGTAAACATGA-----
<i>E. cloacae</i> sp. 638 (522)	TCCCGCCATGCTTACCGGTCGTCAGAC	AAGGAGTAAACATGA-----
<i>E. cloacae</i> SCF1 (522)	TCCGTCACTGGTCCGGTTCGTCAGAT	AAGGAGCAACATGA-----
<i>K. pneumoniae</i> 342 (522)	CCGGCGCTACTCAGTGGCCGTCAGAT	AAGGAGACATCATGA-----
<i>K. pneumoniae</i> MGH78578 (522)	CCGTGGCTGCTCAGCGCCCGTCAGAA	AAGGAGACCTCATGA-----
<i>K. pneumoniae</i> NTUH-K2044 (522)	CCGTGGCTGCTCAGCGCCCGTCAGAA	AAGGAGACCTCATGA-----
<i>Citrobacter rodentium</i> ICC168 (522)	TCCCGCTCTGGTCAACCCCTCGTCAGAT	AAGGAGTAAACATGA-----
<i>S. Enteritidis</i> PT4 str. P125109 (522)	TCCCGCTTGGTAGCCCTCTCGTCGCAC	AAGGAGTAAACATGA-----
<i>S. Typhi</i> CT18 (522)	TCCCGCTTGGTAGCCCTCTCGTCGCAC	AAGGAGTAAACATGA-----
<i>S. Typhi</i> str. Ty2 (522)	TCCCGCTTGGTAGCCCTCTCGTCGCAC	AAGGAGTAAACATGA-----
<i>S. Paratyphi</i> A ATCC 9150 (522)	TCCCGCTTGGTAGCCCTCTCGTCGCAC	AAGGAGTAAACATGA-----
<i>S. Typhimurium</i> LT2 (522)	TCCCGCTTGGTAGCCCTCTCGTCGCAC	AAGGAGTAAACATGA-----
<i>E. coli</i> APEC O1 (522)	TCCGTGGCTGGTCAGC-----	AAGGAGCAACATGA-----
<i>E. coli</i> S88 (522)	TCCGTGGCTGGTCAGC-----	AAGGAGCAACATGA-----
<i>E. coli</i> UTI89 (522)	TCCGTGGCTGGTCAGC-----	AAGGAGCAACATGA-----
<i>E. coli</i> O127:H6 str. E2348/69 (522)	TCCGTGGCTGGTCAGC-----	AAGGAGCAACATGA-----
<i>E. coli</i> CFT073 (522)	TCCGTGGCTGGTCAGC-----	AAGGAGCAACATGA-----
<i>E. coli</i> ED1a (522)	TCCGTGGCTGGTCAGC-----	AAGGAGCAACATGA-----
<i>E. coli</i> IAI39 (522)	TCCGTGGCTGGTCAGC-----	AAGGAGCAACATGA-----
<i>E. coli</i> SMS-3-5 (522)	TCCGTGGCTGGTCAGC-----	AAGGAGCAACATGA-----
<i>E. coli</i> UMN026 (522)	TCCGTGGCTGGTCAGC-----	AAGGAGCAACATGA-----
<i>E. coli</i> O157:H7 str. EC4115 (522)	TCCGTGGCTGGTCAGC-----	AAGGAGCAACATGA-----
<i>E. coli</i> O157:H7 str. EDL933 (522)	TCCGTGGCTGGTCAGC-----	AAGGAGCAACATGA-----
<i>E. coli</i> O157:H7 str. TW14359 (522)	TCCGTGGCTGGTCAGC-----	AAGGAGCAACATGA-----
<i>E. coli</i> O55:H7 str. CB9615 (522)	TCCGTGGCTGGTCAGC-----	AAGGAGCAACATGA-----
<i>E. coli</i> E24377A (522)	TCCGTGGCTGGTCAGC-----	AAGGAGCAACATGA-----
<i>E. coli</i> 55989 (522)	TCCGTGGCTGGTCAGC-----	AAGGAGCAACATGA-----
<i>E. coli</i> B str. REL606 (522)	TCCGTGGCTGGTCAGC-----	AAGGAGCAACATGA-----
<i>E. coli</i> BW2952 (522)	TCCGTGGCTGGTCAGC-----	AAGGAGCAACATGA-----
<i>E. coli</i> HS (522)	TCCGTGGCTGGTCAGC-----	AAGGAGCAACATGA-----
<i>E. coli</i> IAI1 (522)	TCCGTGGCTGGTCAGC-----	AAGGAGCAACATGA-----
<i>E. coli</i> K-12 DH10B (522)	TCCGTGGCTGGTCAGC-----	AAGGAGCAACATGA-----
<i>E. coli</i> K-12 MG1655 (522)	TCCGTGGCTGGTCAGC-----	AAGGAGCAACATGA-----
<i>E. coli</i> O103:H2 str. 12009 (522)	TCCGTGGCTGGTCAGC-----	AAGGAGCAACATGA-----
<i>E. coli</i> O111:H- str. 11128 (522)	TCCGTGGCTGGTCAGC-----	AAGGAGCAACATGA-----
<i>E. coli</i> O26:H11 str. 11368 (522)	TCCGTGGCTGGTCAGC-----	AAGGAGCAACATGA-----

	601	621
<i>A. baumannii</i> AYE	(571)	-----
<i>A. baumannii</i> SDF	(571)	-----
<i>Acinetobacter</i> sp. ADP1	(571)	CATGATTTTCGCAACGAAATAA
<i>N. meningitidis</i> 053442	(574)	-----
<i>P. aeruginosa</i> LESB58	(568)	-----
<i>P. aeruginosa</i> UCBPP-PA14	(568)	-----
<i>P. aeruginosa</i> PA01	(568)	-----
<i>P. aeruginosa</i> PA7	(568)	-----
<i>P. putida</i> KT2440	(574)	-----
<i>Y. pestis</i> CO92	(553)	-----
<i>E. cloacae</i> 14	(565)	-----
<i>E. cloacae</i> 14-M01	(286)	-----
<i>E. cloacae</i> NCTC 9394	(565)	-----
<i>E. cloacae</i> Kollektiv MS	(565)	-----
<i>E. cloacae</i> ATCC 13047	(553)	-----
<i>E. cloacae</i> 029	(565)	-----
<i>E. cloacae</i> sp. 638	(565)	-----
<i>E. cloacae</i> SCF1	(565)	-----
<i>K. pneumoniae</i> 342	(565)	-----
<i>K. pneumoniae</i> MGH78578	(565)	-----
<i>K. pneumoniae</i> NTUH-K2044	(565)	-----
<i>Citrobacter rodentium</i> ICC168	(565)	-----
<i>S. Enteritidis</i> PT4 str. P125109	(565)	-----
<i>S. Typhi</i> CT18	(565)	-----
<i>S. Typhi</i> str. Ty2	(565)	-----
<i>S. Paratyphi</i> A ATCC 9150	(565)	-----
<i>S. Typhimurium</i> LT2	(565)	-----
<i>E. coli</i> APEC O1	(553)	-----
<i>E. coli</i> S88	(553)	-----
<i>E. coli</i> UTI89	(553)	-----
<i>E. coli</i> O127:H6 str. E2348/69	(553)	-----
<i>E. coli</i> CFT073	(553)	-----
<i>E. coli</i> ED1a	(553)	-----
<i>E. coli</i> IAI39	(553)	-----
<i>E. coli</i> SMS-3-5	(553)	-----
<i>E. coli</i> UMN026	(553)	-----
<i>E. coli</i> O157:H7 str. EC4115	(553)	-----
<i>E. coli</i> O157:H7 str. EDL933	(553)	-----
<i>E. coli</i> O157:H7 str. TW14359	(553)	-----
<i>E. coli</i> O55:H7 str. CB9615	(553)	-----
<i>E. coli</i> E24377A	(553)	-----
<i>E. coli</i> 55989	(553)	-----
<i>E. coli</i> B str. REL606	(553)	-----
<i>E. coli</i> BW2952	(553)	-----
<i>E. coli</i> HS	(553)	-----
<i>E. coli</i> IAI1	(553)	-----
<i>E. coli</i> K-12 DH10B	(553)	-----
<i>E. coli</i> K-12 MG1655	(553)	-----
<i>E. coli</i> O103:H2 str. 12009	(553)	-----
<i>E. coli</i> O111:H- str. 11128	(553)	-----
<i>E. coli</i> O26:H11 str. 11368	(553)	-----

Die folgenden Zeilen enthalten das resultierende Alignment der AmpD-Proteine.

```

1                                                                 50
A. baumannii AYE (1) MKQITPYEIDGGQLKG--ARQVPSPEFNENQRPAGTEIQMIVVHNIISLPPSQ
A. baumannii SDF (1) MKQITPYEIDGGQLKG--ARQVPSPEFNENQRPAGTEIQMIVVHNIISLPPSQ
Acinetobacter sp. ADP1 (1) --MKSHFQIKDGVLLG--AQQLSPEFNYNQRPENTEICLLIVVHNIISLPPSQ
N. meningitidis 053442 (1) MDNPATAPWQDGLQSQ--VRFHIPSPEFNFGPRSEKTEVSLVIVHNIISLPPFE
P. aeruginosa LESB58 (1) ----MHFDSVTGWVWR--GVFHCPSPFNENLRFQGDVAVSLLVIVHNIISLPPGQ
P. aeruginosa PA01 (1) ----MHFDSVTGWVWR--GVFHCPSPFNENLRFQGDVAVSLLVIVHNIISLPPGQ
P. aeruginosa UCBPP-PA14 (1) ----MHFDSVTGWVWR--GVFHCPSPFNENLRFQGDVAVSLLVIVHNIISLPPGQ
P. aeruginosa PA7 (1) ----MHFDSVTGWVWR--GVFHCPSPFNENLRFQGDVAVSLLVIVHNIISLPPGQ
P. putida KT2440 (1) ----MQLDYATGWFHGIGITHCPSPEFNFNARPEGESISLLVIVHNIISLPPAC
Y. pestis CO92 (1) -----MLLENGWLVG--VQVLSPEHFDLRFEGEMFSLIVVHNSISLPPSE
E. cloacae 14 (1) -----MLLENGWLVD--ARRVPSPHHDCRPEDEKFTLLVIVHNIISLPPGE
E. cloacae NCTC 9394 (1) -----MLLENGWLVD--ARRVPSPHHDCRPEDEKFTLLVIVHNIISLPPGE
E. cloacae Kollektiv MS (1) -----MLLENGWLVD--ARRVPSPHHDCRPEDEKFTLLVIVHNIISLPPGE
E. cloacae 029 (1) -----MLLENGWLVD--ARRVPSPHHDCRPEDEKFTLLVIVHNIISLPPGE
E. cloacae ATCC 13047 (1) -----MLLEDGWLVD--ARRVPSPHHDCRPEDEKFTLLVIVHNIISLPPGE
E. cloacae sp. 638 (1) -----MQLQNGWLVD--ARRVPSPHHDCRPEDEKFTLLVIVHNIISLPPGE
E. cloacae SCF1 (1) -----MQLNEGWLVD--ARRVPSPHHDCRPEDEKFTLLVIVHNIISLPPGE
K. pneumoniae 342 (1) -----MQLNEGWLVD--ARRVPSPHHDCRPEDEKFTLLVIVHNIISLPPGE
K. pneumoniae MGH78578 (1) -----MQLNKGWLVD--ARRVPSPHHDCRPEDEKFTLLVIVHNIISLPPGE
K. pneumoniae NTUH-K2044 (1) -----MQLNEGWLVD--ARRVPSPHHDCRPEDEKFTLLVIVHNIISLPPGE
Citrobacter rodentium ICC168 (1) -----MLLDKGVLAE--ARRVPSPHYDCRFDDEKFTLLVIVHNIISLPPGE
S. Enteritidis PT4 str. P125109 (1) -----MLPKKGWLVE--ARRVPSPHYDCRFDDEKFTLLVIVHNIISLPPGE
S. Typhi CT18 (1) -----MLPKKGWLVE--ARRVPSPHYDCRFDDEKFTLLVIVHNIISLPPGE
S. Typhi str. Ty2 (1) -----MLPKKGWLVE--ARRVPSPHYDCRFDDEKFTLLVIVHNIISLPPGE
S. Paratyphi A ATCC 9150 (1) -----MLPKKGWLVE--ARRVPSPHYDCRFDDEKFTLLVIVHNIISLPPGE
S. Typhimurium LT2 (1) -----MLPKKGWLVE--ARRVPSPHYDCRFDDEKFTLLVIVHNIISLPPGE
E. coli APEC 01 (1) -----MLLEQGWLIG--ARRVPSPHYDCRFDDEKFTLLVIVHNIISLPPGE
E. coli IAI39 (1) -----MLLEQGWLIG--ARRVPSPHYDCRFDDEKFTLLVIVHNIISLPPGE
E. coli S88 (1) -----MLLEQGWLIG--ARRVPSPHYDCRFDDEKFTLLVIVHNIISLPPGE
E. coli SMS-3-5 (1) -----MLLEQGWLIG--ARRVPSPHYDCRFDDEKFTLLVIVHNIISLPPGE
E. coli UTI89 (1) -----MLLEQGWLIG--ARRVPSPHYDCRFDDEKFTLLVIVHNIISLPPGE
E. coli O127:H6 str. E2348/69 (1) -----MLLEQGWLIG--ARRVPSPHYDCRFDDEKFTLLVIVHNIISLPPGE
E. coli CFT073 (1) -----MLLEQGWLIG--ARRVPSPHYDCRFDDEKFTLLVIVHNIISLPPGE
E. coli ED1a (1) -----MLLEQGWLIG--ARRVPSPHYDCRFDDEKFTLLVIVHNIISLPPGE
E. coli UMN026 (1) -----MLLEQGWLIG--ARRVPSPHYDCRFDDEKFTLLVIVHNIISLPPGE
E. coli O157:H7 str. EC4115 (1) -----MLLEQGWLIG--ARRVPSPHYDCRFDDEKFTLLVIVHNIISLPPGE
E. coli O157:H7 str. EDL933 (1) -----MLLEQGWLIG--ARRVPSPHYDCRFDDEKFTLLVIVHNIISLPPGE
E. coli O157:H7 str. TW14359 (1) -----MLLEQGWLIG--ARRVPSPHYDCRFDDEKFTLLVIVHNIISLPPGE
E. coli O55:H7 str. CB9615 (1) -----MLLEQGWLIG--ARRVPSPHYDCRFDDEKFTLLVIVHNIISLPPGE
E. coli 55989 (1) -----MLLEQGWLIG--ARRVPSPHYDCRFDDEKFTLLVIVHNIISLPPGE
E. coli B str. REL606 (1) -----MLLEQGWLIG--ARRVPSPHYDCRFDDEKFTLLVIVHNIISLPPGE
E. coli BW2952 (1) -----MLLEQGWLIG--ARRVPSPHYDCRFDDEKFTLLVIVHNIISLPPGE
E. coli E24377A (1) -----MLLEQGWLIG--ARRVPSPHYDCRFDDEKFTLLVIVHNIISLPPGE
E. coli HS (1) -----MLLEQGWLIG--ARRVPSPHYDCRFDDEKFTLLVIVHNIISLPPGE
E. coli IAI1 (1) -----MLLEQGWLIG--ARRVPSPHYDCRFDDEKFTLLVIVHNIISLPPGE
E. coli K-12 DH10B (1) -----MLLEQGWLIG--ARRVPSPHYDCRFDDEKFTLLVIVHNIISLPPGE
E. coli K-12 MG1655 (1) -----MLLEQGWLIG--ARRVPSPHYDCRFDDEKFTLLVIVHNIISLPPGE
E. coli O103:H2 str. 12009 (1) -----MLLEQGWLIG--ARRVPSPHYDCRFDDEKFTLLVIVHNIISLPPGE
E. coli O111:H- str. 11128 (1) -----MLLEQGWLIG--ARRVPSPHYDCRFDDEKFTLLVIVHNIISLPPGE
E. coli O26:H11 str. 11368 (1) -----MLLEQGWLIG--ARRVPSPHYDCRFDDEKFTLLVIVHNIISLPPGE

```

		51	100
<i>A. baumannii</i> AYE	(49)	FGGGYIEQFFQNKLDWSVHPYFQTIEGMQVSTHLLILRTGEVLQFVNFND	
<i>A. baumannii</i> SDF	(49)	FGGGYIEQFFQNKLDWSVHPYFQTIEGMQVSTHLLILRTGEVLQFVNFND	
<i>Acinetobacter</i> sp. ADP1	(47)	FGGGYIQQFFQNKLDWRLHPYFETIQGMQVSAHLLILRSGEVLCFVNFQD	
<i>N. meningitidis</i> 053442	(49)	YGTDAVEKLEFANRLDFDGHPPFFSLIHTLRVSSHFLIKRIDGEITQFVSCDN	
<i>P. aeruginosa</i> LESB58	(45)	FGTGKVOAFFQNRLLDFNEHPYFEEIRHLTVFAHFLIERDGAITQFVVSCHD	
<i>P. aeruginosa</i> PAO1	(45)	FCTGKVOAFFQNRLLDFNEHPYFEEIRHLTVSAHFLIERDGAITQFVVSCHD	
<i>P. aeruginosa</i> UCBPP-PA14	(45)	FGTGKVOAFFQNRLLDFNEHPYFEEIRHLTVSAHFLIERDGAITQFVVSCHD	
<i>P. aeruginosa</i> PA7	(45)	FGTGKVOAFFQNRLLDADEHPYFAEIRHLTVSAHFLIERDGGITQFVSLHD	
<i>P. putida</i> KT2440	(47)	FGTGKVOQFFQNRLLAFDEHPYFASINHLTVSAHLFVERDGAITQFVSLHD	
<i>Y. pestis</i> CO92	(43)	FGGPIIDQLEFGTLNADEHPYFASIVHLRVSASHCLIRRDGEIIVQYVFPDK	
<i>E. cloacae</i> 14	(43)	FGGPWIDALEFTGTIDFDAHPFFAEIAHLRVSASHCLIRRDGEIVQYVFPDK	
<i>E. cloacae</i> 14-M01	(43)	FGGPWIDALEFTGTIDFDAHPFFAEIAHLRVSASHCLIRRDGEIVQYVFPDK	
<i>E. cloacae</i> NCTC 9394	(43)	FGGPWIDALEFTGTIDFDAHPFFAEIAHLRVSASHCLIRRDGEIVQYVFPDK	
<i>E. cloacae</i> Kollektiv MS	(43)	FGGPWIDALEFTGTIDFDAHPFFAEIAHLRVSASHCLIRRDGEIVQYVFPDK	
<i>E. cloacae</i> 029	(43)	FGGPWIDALEFTGTIDFDAHPFFAEIAHLRVSASHCLIRRDGEIVQYVFPDK	
<i>E. cloacae</i> ATCC 13047	(43)	FGGPWIDALEFTGTIDFDAHPFFAEIAHLRVSASHCLIRRDGEIVQYVFPDK	
<i>E. cloacae</i> sp. 638	(43)	FGGPWIDALEFTGTIDFAHPFFAEIAHLRVSASHCLIRRDGEIVQYVFPDK	
<i>E. cloacae</i> SCF1	(43)	FGGPWIDALEFTGTIDFDAHPFFAEIAHLRVSASHCLIRRDGEIVQYVFPDK	
<i>K. pneumoniae</i> 342	(43)	FGGPWIDALEFTGTIDFAHPFFAEIAHLRVSASHCLIRRDGEIVQYVFPDK	
<i>K. pneumoniae</i> MGH78578	(43)	FGGPWIDALEFTGTIDFAHPFFAEIAHLRVSASHCLIRRDGEIVQYVFPDK	
<i>K. pneumoniae</i> NTUH-K2044	(43)	FGGPWIDALEFTGTIDFAHPFFAEIAHLRVSASHCLIRRDGEIVQYVFPDK	
<i>Citrobacter rodentium</i> ICC168	(43)	FGGPWIDALEFTGTIDFAHPFFAEIAHLRVSASHCLIRRDGEIVQYVFPDK	
<i>S. Enteritidis</i> PT4 str. P125109	(43)	FGGPWIDALEFTGTIDFAHPFFAEIAHLRVSASHCLIRRDGEIVQYVFPDK	
<i>S. Typhi</i> CT18	(43)	FGGPWIDALEFTGTIDFAHPFFAEIAHLRVSASHCLIRRDGEIVQYVFPDK	
<i>S. Typhi</i> str. Ty2	(43)	FGGPWIDALEFTGTIDFAHPFFAEIAHLRVSASHCLIRRDGEIVQYVFPDK	
<i>S. Paratyphi</i> A ATCC 9150	(43)	FGGPWIDALEFTGTIDFAHPFFAEIAHLRVSASHCLIRRDGEIVQYVFPDK	
<i>S. Typhimurium</i> LT2	(43)	FGGPWIDALEFTGTIDFAHPFFAEIAHLRVSASHCLIRRDGEIVQYVFPDK	
<i>E. coli</i> APEC O1	(43)	FGGPWIDALEFTGTIDFAHPFFAEIAHLRVSASHCLIRRDGEIVQYVFPDK	
<i>E. coli</i> IAI39	(43)	FGGPWIDALEFTGTIDFAHPFFAEIAHLRVSASHCLIRRDGEIVQYVFPDK	
<i>E. coli</i> S88	(43)	FGGPWIDALEFTGTIDFAHPFFAEIAHLRVSASHCLIRRDGEIVQYVFPDK	
<i>E. coli</i> SMS-3-5	(43)	FGGPWIDALEFTGTIDFAHPFFAEIAHLRVSASHCLIRRDGEIVQYVFPDK	
<i>E. coli</i> UTI89	(43)	FGGPWIDALEFTGTIDFAHPFFAEIAHLRVSASHCLIRRDGEIVQYVFPDK	
<i>E. coli</i> O127:H6 str. E2348/69	(43)	FGGPWIDALEFTGTIDFAHPFFAEIAHLRVSASHCLIRRDGEIVQYVFPDK	
<i>E. coli</i> CFT073	(43)	FGGPWIDALEFTGTIDFAHPFFAEIAHLRVSASHCLIRRDGEIVQYVFPDK	
<i>E. coli</i> ED1a	(43)	FGGPWIDALEFTGTIDFAHPFFAEIAHLRVSASHCLIRRDGEIVQYVFPDK	
<i>E. coli</i> UMNO26	(43)	FGGPWIDALEFTGTIDFAHPFFAEIAHLRVSASHCLIRRDGEIVQYVFPDK	
<i>E. coli</i> O157:H7 str. EC4115	(43)	FGGPWIDALEFTGTIDFAHPFFAEIAHLRVSASHCLIRRDGEIVQYVFPDK	
<i>E. coli</i> O157:H7 str. EDL933	(43)	FGGPWIDALEFTGTIDFAHPFFAEIAHLRVSASHCLIRRDGEIVQYVFPDK	
<i>E. coli</i> O157:H7 str. TW14359	(43)	FGGPWIDALEFTGTIDFAHPFFAEIAHLRVSASHCLIRRDGEIVQYVFPDK	
<i>E. coli</i> O55:H7 str. CB9615	(43)	FGGPWIDALEFTGTIDFAHPFFAEIAHLRVSASHCLIRRDGEIVQYVFPDK	
<i>E. coli</i> 55989	(43)	FGGPWIDALEFTGTIDFAHPFFAEIAHLRVSASHCLIRRDGEIVQYVFPDK	
<i>E. coli</i> B str. REL606	(43)	FGGPWIDALEFTGTIDFAHPFFAEIAHLRVSASHCLIRRDGEIVQYVFPDK	
<i>E. coli</i> BW2952	(43)	FGGPWIDALEFTGTIDFAHPFFAEIAHLRVSASHCLIRRDGEIVQYVFPDK	
<i>E. coli</i> E24377A	(43)	FGGPWIDALEFTGTIDFAHPFFAEIAHLRVSASHCLIRRDGEIVQYVFPDK	
<i>E. coli</i> HS	(43)	FGGPWIDALEFTGTIDFAHPFFAEIAHLRVSASHCLIRRDGEIVQYVFPDK	
<i>E. coli</i> IAI1	(43)	FGGPWIDALEFTGTIDFAHPFFAEIAHLRVSASHCLIRRDGEIVQYVFPDK	
<i>E. coli</i> K-12 DH10B	(43)	FGGPWIDALEFTGTIDFAHPFFAEIAHLRVSASHCLIRRDGEIVQYVFPDK	
<i>E. coli</i> K-12 MG1655	(43)	FGGPWIDALEFTGTIDFAHPFFAEIAHLRVSASHCLIRRDGEIVQYVFPDK	
<i>E. coli</i> O103:H2 str. 12009	(43)	FGGPWIDALEFTGTIDFAHPFFAEIAHLRVSASHCLIRRDGEIVQYVFPDK	
<i>E. coli</i> O111:H- str. 11128	(43)	FGGPWIDALEFTGTIDFAHPFFAEIAHLRVSASHCLIRRDGEIVQYVFPDK	
<i>E. coli</i> O26:H11 str. 11368	(43)	FGGPWIDALEFTGTIDFAHPFFAEIAHLRVSASHCLIRRDGEIVQYVFPDK	

	101	150
<i>A. baumannii</i> AYE	(99)	RAWHAGRSSYLAKVECNDSIGIELEGSDDLPEEDVQYEVLTDTVTAIRQ
<i>A. baumannii</i> SDF	(99)	RAWHAGRSSYLAKIECNDSIGIELEGSDDLPEEDLQYEVLTDTVTAIRQ
<i>Acinetobacter</i> sp. ADP1	(97)	RAWHAGRSSYLGGQVECNDSIGIELEGSDDLPEEDIQYERLSEVTLQLLQH
<i>N. meningitidis</i> 053442	(99)	MAWHAGVSSFRGREKCNDFSIGIELEGCDFEPFTEAQYRSLEALDLDAICR
<i>P. aeruginosa</i> LESB58	(95)	RAWHAGVSCFDGREACNDFSIGIELEGTDTPEYTDQY TALAGLFRLLRA
<i>P. aeruginosa</i> PA01	(95)	RAWHAGVSCFDGREACNDFSIGIELEGTDTPEYTDQY TALAGLFRLLRA
<i>P. aeruginosa</i> UCBPP-PA14	(95)	RAWHAGVSCFDGREACNDFSIGIELEGTDTPEYTDQY TALAGLFRLLRA
<i>P. aeruginosa</i> PA7	(95)	RAWHAGVSCFDGREACNDFSIGIELEGTDTPEYTDQY TALVGLFRLLRA
<i>P. putida</i> KT2440	(97)	RAWHAGVSSFDGREKCNDFSIGIELEGTDDLPTDQYAVLEQLFRHRS
<i>Y. pestis</i> CO92	(93)	RAWHAGVSVFAGRERCNDFSIGIELEGTDLPEFIPVQYQRTEISAVLFA
<i>E. cloacae</i> 14	(93)	RAWHAGVSMYQGRERCNDFSIGIELEGTDTTPYTDQYERLVAVTQTLLIG
<i>E. cloacae</i> 14-M01	(93)	RA-----
<i>E. cloacae</i> NCTC 9394	(93)	RAWHAGVSMYQGRERCNDFSIGIELEGTDTTSYTDQYERLVAVTQTLLIG
<i>E. cloacae</i> Kollektiv MS	(93)	RAWHAGVSMYQGRERCNDFSIGIELEGTDTTPYTDQYERLVAVTQTLLIG
<i>E. cloacae</i> 029	(93)	RAWHAGVSMYHGRERCNDFSIGIELEGTDTTPYTDQYQYQLAAVTRLLIG
<i>E. cloacae</i> ATCC 13047	(93)	RAWHAGVSMYQGRERCNDFSIGIELEGTDTTPYTDQYQRLADITQTLLIR
<i>E. cloacae</i> sp. 638	(93)	RAWHAGVSSYCGREKCNDFSIGIELEGTDTTPYTDQYQALCAVTRKLLIA
<i>E. cloacae</i> SCF1	(93)	RAWHAGVSCYDGRERCNDFSIGIELEGTDTLAYTDQYQQLAAVTRLLTT
<i>K. pneumoniae</i> 342	(93)	RAWHAGVSCYQGRERCNDFSIGIELEGTDTLAYTDQYQQLAAVTELLIA
<i>K. pneumoniae</i> MGH78578	(93)	RAWHAGVSCYQGRERCNDFSIGIELEGTDTLAYTDQYRQLAAVTDLLIA
<i>K. pneumoniae</i> NTUH-K2044	(93)	RAWHAGVSCYQGRERCNDFSIGIELEGTDTLAYTDQYRQLAAVTDLLIA
<i>Citrobacter rodentium</i> ICC168	(93)	RAWHAGVSHYRGRERCNDFSIGIELEGTDTLAYTDQYQQLAAVTRLLIT
<i>S. Enteritidis</i> PT4 str. P125109	(93)	RAWHAGVSNYQGRERCNDFSIGIELEGTDTLAYTDQYQQLAAVTRLLIA
<i>S. Typhi</i> CT18	(93)	RAWHAGVSNYQGRERCNDFSIGIELEGTDTLAYTDQYQQLAAVTRLLIA
<i>S. Typhi</i> str. Ty2	(93)	RAWHAGVSNYQGRERCNDFSIGIELEGTDTLAYTDQYQQLAAVTRLLIA
<i>S. Paratyphi</i> A ATCC 9150	(93)	RAWHAGVSNYQGRERCNDFSIGIELEGTDTLAYTDQYQQLAAVTRLLIA
<i>S. Typhimurium</i> LT2	(93)	RAWHAGVSNYQGRERCNDFSIGIELEGTDTLAYTDQYQQLAAVTRLLIA
<i>E. coli</i> APEC O1	(93)	RAWHAGVSOYQGRERCNDFSIGIELEGTDTLAYTDQYQQLAAVTRALI
<i>E. coli</i> IA139	(93)	RAWHAGVSOYQGRERCNDFSIGIELEGTDTLAYTDQYQQLAAVTRALI
<i>E. coli</i> S88	(93)	RAWHAGVSOYQGRERCNDFSIGIELEGTDTLAYTDQYQQLAAVTRALI
<i>E. coli</i> SMS-3-5	(93)	RAWHAGVSOYQGRERCNDFSIGIELEGTDTLAYTDQYQQLAAVTRALI
<i>E. coli</i> UTI89	(93)	RAWHAGVSOYQGRERCNDFSIGIELEGTDTLAYTDQYQQLAAVTRALI
<i>E. coli</i> O127:H6 str. E2348/69	(93)	RAWHAGVSOYQGRERCNDFSIGIELEGTDTLAYTDQYQQLAAVTRALIH
<i>E. coli</i> CFT073	(93)	RAWHAGVSOYQGRERCNDFSIGIELEGTDTLAYTDQYQQLAAVTRALI
<i>E. coli</i> ED1a	(93)	RAWHAGVSOYQGRERCNDFSIGIELEGTDTLAYTDQYQQLAAVTRALI
<i>E. coli</i> UMN026	(93)	RAWHAGVSOYQGRERCNDFSIGIELEGTDTLAYTDQYQQLAAVTRALI
<i>E. coli</i> O157:H7 str. EC4115	(93)	RAWHAGVSOYQGRERCNDFSIGIELEGTDTLAYTDQYQQLAAVTRALI
<i>E. coli</i> O157:H7 str. EDL933	(93)	RAWHAGVSOYQGRERCNDFSIGIELEGTDTLAYTDQYQQLAAVTRALI
<i>E. coli</i> O157:H7 str. TW14359	(93)	RAWHAGVSOYQGRERCNDFSIGIELEGTDTLAYTDQYQQLAAVTRALI
<i>E. coli</i> O55:H7 str. CB9615	(93)	RAWHAGVSOYQGRERCNDFSIGIELEGTDTLAYTDQYQQLAAVTRALI
<i>E. coli</i> 55989	(93)	RAWHAGVSOYQGRERCNDFSIGIELEGTDTLAYTDQYQQLAAVTRALI
<i>E. coli</i> B str. REL606	(93)	RAWHAGVSOYQGRERCNDFSIGIELEGTDTLAYTDQYQQLAAVTRALI
<i>E. coli</i> BW2952	(93)	RAWHAGVSOYQGRERCNDFSIGIELEGTDTLAYTDQYQQLAAVTRALI
<i>E. coli</i> E24377A	(93)	RAWHAGVSOYQGRERCNDFSIGIELEGTDTLAYTDQYQQLAAVTRALI
<i>E. coli</i> HS	(93)	RAWHAGVSOYQGRERCNDFSIGIELEGTDTLAYTDQYQQLAAVTRALI
<i>E. coli</i> IA11	(93)	RAWHAGVSOYQGRERCNDFSIGIELEGTDTLAYTDQYQQLAAVTRALI
<i>E. coli</i> K-12 DH10B	(93)	RAWHAGVSOYQGRERCNDFSIGIELEGTDTLAYTDQYQQLAAVTRALI
<i>E. coli</i> K-12 MG1655	(93)	RAWHAGVSOYQGRERCNDFSIGIELEGTDTLAYTDQYQQLAAVTRALI
<i>E. coli</i> O103:H2 str. 12009	(93)	RAWHAGVSOYQGRERCNDFSIGIELEGTDTLAYTDQYQQLAAVTRALI
<i>E. coli</i> O111:H- str. 11128	(93)	RAWHAGVSOYQGRERCNDFSIGIELEGTDTLAYTDQYQQLAAVTRALI
<i>E. coli</i> O26:H11 str. 11368	(93)	RAWHAGVSOYQGRERCNDFSIGIELEGTDTLAYTDQYQQLAAVTRALI

	151	201
<i>A. baumannii</i> AYE	(149) AYPEIKNH--TAGHSDIAPGRKTDPGPYFKWQHFRQLLAQKKT-----	
<i>A. baumannii</i> SDF	(149) AYPEIKNH--TAGHSDIAPGRKTDPGPYFKWQHFRQLLAQKKT-----	
<i>Acinetobacter</i> sp. ADP1	(147) TYPKIQMH--TAGHSDIAPVRKTDPGPFDFDWRVFRRLIDSKKIEFGHDFATK	
<i>N. meningitidis</i> 053442	(149) RYPITA---VTGHQDIAPSRKTDPGHFDFWRIRGKGFVDRNAV-----	
<i>P. aeruginosa</i> LESB58	(145) AFPATTPERTQGHCDIAPERKTDPGPAFDWLRFRAGLTDLSKEET-----	
<i>P. aeruginosa</i> PA01	(145) AFPGITPERIQGHCDIAPERKTDPGPAFDWLRFRAGLTDLSKEET-----	
<i>P. aeruginosa</i> UCBPP-PA14	(145) AFPGITPERIQGHCDIAPERKTDPGPAFDWLRFRAGLTDLSKEET-----	
<i>P. aeruginosa</i> PA7	(145) AFPATTRGRQGHCDIAPQRKTDPGPAFDWLRFRAGLTDLSKEET-----	
<i>P. putida</i> KT2440	(147) AWPATDLNRQGHSDIAPQRKTDPGPAFDWLRFRAGLTDLSKEET-----	
<i>Y. pestis</i> CO92	(143) HYPITVER--VAGHSDIAPGRKTDPGPAFDWLRFRAGLTDLSKEET-----	
<i>E. cloacae</i> 14	(143) RYPATADN--ITGHSDIAPERKTDPGPAFDWLRFRAGLTDLSKEET-----	
<i>E. cloacae</i> 14-M01	(95) -----	
<i>E. cloacae</i> NCTC 9394	(143) RYPATADN--ITGHSDIAPERKTDPGPAFDWLRFRAGLTDLSKEET-----	
<i>E. cloacae</i> Kollektiv MS	(143) LYPATKDN--ITGHSDIAPERKTDPGPAFDWLRFRAGLTDLSKEET-----	
<i>E. cloacae</i> 029	(143) LYPATADN--ITGHSDIAPARKTDPGPAFDWLRFRAGLTDLSKEET-----	
<i>E. cloacae</i> ATCC 13047	(143) LYPATADN--ITGHSDIAPARKTDPGPAFDWLRFRAGLTDLSKEET-----	
<i>E. cloacae</i> sp. 638	(143) CYPATSDN--ITGHSDIAPVRKTDPGPAFDWLRFRAGLTDLSKEET-----	
<i>E. cloacae</i> SCF1	(143) VYPAMADH--ITGHSDIAPERKTDPGPAFDWLRFRAGLTDLSKEET-----	
<i>K. pneumoniae</i> 342	(143) IYPATADN--ITGHSDIAPVRKTDPGPAFDWLRFRAGLTDLSKEET-----	
<i>K. pneumoniae</i> MGH78578	(143) LYPATADN--ITGHSDIAPVRKTDPGPAFDWLRFRAGLTDLSKEET-----	
<i>K. pneumoniae</i> NTUH-K2044	(143) LYPATADN--ITGHSDIAPVRKTDPGPAFDWLRFRAGLTDLSKEET-----	
<i>Citrobacter rodentium</i> ICC168	(143) HYPATADN--ITGHSDIAPERKTDPGPAFDWLRFRAGLTDLSKEET-----	
<i>S. Enteritidis</i> str. PT4 P125109	(143) CYPATADN--ITGHSDIAPDRKTDPGPAFDWLRFRAGLTDLSKEET-----	
<i>S. Typhi</i> CT18	(143) CYPATADN--ITGHSDIAPDRKTDPGPAFDWLRFRAGLTDLSKEET-----	
<i>S. Typhi</i> str. Ty2	(143) CYPATADN--ITGHSDIAPDRKTDPGPAFDWLRFRAGLTDLSKEET-----	
<i>S. Paratyphi</i> A ATCC 9150	(143) SYPATADN--ITGHSDIAPDRKTDPGPAFDWLRFRAGLTDLSKEET-----	
<i>S. Typhimurium</i> LT2	(143) SYPATADN--ITGHSDIAPDRKTDPGPAFDWLRFRAGLTDLSKEET-----	
<i>E. coli</i> APEC 01	(143) RYPDIANN--ITGHSDIAPDRKTDPGPAFDWLRFRAGLTDLSKEET-----	
<i>E. coli</i> IAI39	(143) RYPDIANN--ITGHSDIAPDRKTDPGPAFDWLRFRAGLTDLSKEET-----	
<i>E. coli</i> S88	(143) RYPDIANN--ITGHSDIAPDRKTDPGPAFDWLRFRAGLTDLSKEET-----	
<i>E. coli</i> SMS-3-5	(143) RYPDIANN--ITGHSDIAPDRKTDPGPAFDWLRFRAGLTDLSKEET-----	
<i>E. coli</i> UTI89	(143) RYPDIANN--ITGHSDIAPDRKTDPGPAFDWLRFRAGLTDLSKEET-----	
<i>E. coli</i> O127:H6 str. E2348/69	(143) RYPDIANN--ITGHSDIAPDRKTDPGPAFDWLRFRAGLTDLSKEET-----	
<i>E. coli</i> CFT073	(143) RYPDIANN--ITGHSDIAPDRKTDPGPAFDWLRFRAGLTDLSKEET-----	
<i>E. coli</i> ED1a	(143) RYPDIANN--ITGHSDIAPDRKTDPGPAFDWLRFRAGLTDLSKEET-----	
<i>E. coli</i> UMN026	(143) RYPDIANN--ITGHSDIAPDRKTDPGPAFDWLRFRAGLTDLSKEET-----	
<i>E. coli</i> O157:H7 str. EC4115	(143) CYPDIANN--ITGHSDIAPDRKTDPGPAFDWLRFRAGLTDLSKEET-----	
<i>E. coli</i> O157:H7 str. EDL933	(143) CYPDIANN--ITGHSDIAPDRKTDPGPAFDWLRFRAGLTDLSKEET-----	
<i>E. coli</i> O157:H7 str. TW14359	(143) CYPDIANN--ITGHSDIAPDRKTDPGPAFDWLRFRAGLTDLSKEET-----	
<i>E. coli</i> O55:H7 str. CB9615	(143) CYPDIANN--ITGHSDIAPDRKTDPGPAFDWLRFRAGLTDLSKEET-----	
<i>E. coli</i> 55989	(143) CYPDIANN--ITGHSDIAPDRKTDPGPAFDWLRFRAGLTDLSKEET-----	
<i>E. coli</i> B str. REL606	(143) CYPDIANN--ITGHSDIAPDRKTDPGPAFDWLRFRAGLTDLSKEET-----	
<i>E. coli</i> BW2952	(143) CYPDIANN--ITGHSDIAPDRKTDPGPAFDWLRFRAGLTDLSKEET-----	
<i>E. coli</i> E24377A	(143) CYPDIANN--ITGHSDIAPDRKTDPGPAFDWLRFRAGLTDLSKEET-----	
<i>E. coli</i> HS	(143) CYPDIANN--ITGHSDIAPDRKTDPGPAFDWLRFRAGLTDLSKEET-----	
<i>E. coli</i> IAI1	(143) CYPDIANN--ITGHSDIAPDRKTDPGPAFDWLRFRAGLTDLSKEET-----	
<i>E. coli</i> K-12 DH10B	(143) CYPDIANN--ITGHSDIAPDRKTDPGPAFDWLRFRAGLTDLSKEET-----	
<i>E. coli</i> K-12 MG1655	(143) CYPDIANN--ITGHSDIAPDRKTDPGPAFDWLRFRAGLTDLSKEET-----	
<i>E. coli</i> O103:H2 str. 12009	(143) CYPDIANN--ITGHSDIAPDRKTDPGPAFDWLRFRAGLTDLSKEET-----	
<i>E. coli</i> O111:H- str. 11128	(143) CYPDIANN--ITGHSDIAPDRKTDPGPAFDWLRFRAGLTDLSKEET-----	
<i>E. coli</i> O26:H11 str. 11368	(143) CYPDIANN--ITGHSDIAPDRKTDPGPAFDWLRFRAGLTDLSKEET-----	

### 9.3 Anhang III: Sequenz von *bla*<sub>OXA-48</sub> in *K. pneumoniae* Va22038

```

1
TGTGTAGGA TATTGGCTTC GCGCATCTTG TTGTCCAAGT GTAGTTTTTA GCGAAACCAT TTGATCATGC AACAAAGATGC GCTTCCACCC TAATTTGATG
ACAACATCCT ATAACCGAAG CGCGTAGAAC AACAGGTTCA CATCAAAAAT CGCTTTGGTA AACTAGTACG TTGTTCTACG CGAAGGTGGG ATTAACCTAC
- tnpA
101
ATTTATTGT AAATCATCAG GGGATTCTTC AGTATATTGC ATTAAGCAAG GGGACGTTAT GCGTGTATTA GCCTTATCGG CTGTGTTTTT GGTGGCATCG
TAAATAAACA TTTAGTAGTC CCCTAAGAAG TCATATAAAG TAATTCGTTT CCCTGCAATA CGCACATAAT CGGAATAGCC GACACAAAAA CCACCGTAGC
201
ATTATCGGAA TGCCTGCGGT AGCAAAGGAA TGGCAAGAAA ACAAAGTTG GAATGCTCAC TTTACTGAAC ATAAATCACA GGGCGTAGTT GTGCTCTGGA
TAATAGCCTT ACGGACGCCA TCGTTTCCTT ACCGTTCTTT TGTTTTCAAC CTACGAGTGT AAATGACTTG TATTTAGTGT CCCGCATCAA CACGAGACCT
301
ATGAGAATAA GCAGCAAGGA TTTACCAATA ATCTTAAACG GCGCAACCAA GCATTTTTCAC CCGCATCTAC CTTTTAAAAT CCCAATAGCT TGATCGCCCT
TACTCTTATT CGTCGTTCCT AAATGGTTAT TAGAATTGTC CCGCTTGGTT CGTAAAAATG GCGGTAGATG GAAATTTTAA GGGTTATCGA ACTAGCGGGA
401
CGATTTGGGC GTGGTTAAGG ATGAACACCA AGTCTTTAAG TGGGATGGAC AGACGCGCGA TATCGCCACT TGGAAATCGG ATCATAATCT AATCACCGCG
GCTAAACCCG CACCAATTCC TACTTGTGGT TCAGAAATTC ACCCTACCTG TCTGCGCGCT ATAGCGGTGA ACCTTAGCCG TAGTATTAGA TTAGTGGCCG
501
ATGAAATATT CAGTTGTGCC TGTATTATCA GAATTTGCC GCAAATTTGG CGAGGCACGT ATGAGCAAGA TGCTACATGC TTTGATTAT GGTAAATGAGG
TACTTTTATA GTCAACACGG ACAAAATAGT CTTAAACGGG CGGTTAACC GCTCCGTGCA TACTCGTTCT ACGATGTACG AAAGCTAATA CCATTACTCC
601
ACATTTGGG CAATGTAGAC AGTTCTGGC TCGACGGTGG TATTCGAATT TCGGCCACGG AGCAAATCAG CTTTTTAA GAAGCTGTATC ACAATAAGTT
TGTAAGCCC GTTACATCTG TCAAAGACCG AGCTGCCACC ATAAGCTTAA AGCCGGTGCC TCGTTTAGTC GAAAAATTCT TTCGACATAG TGTATTCAA
701
ACACGTATCG GAGCGCAGCG AGCGTATTGT CAAACAAGCC ATGCTGACCG AAGCCAATGG TGACTATATT ATTCGGGCTA AAACCTGGATA CTCGACTAGA
TGTGCATAGC CTCGCGTCGG TCGCATAACA GTTTGTTCCG TACGACTGCC TTCGGTTACC ACTGATATAA TAAGCCCGAT TTTGACCTAT GAGCTGATCT
801
ATCGAACCTA AGATTGGCTG GTGGGTGCGT TGGGTTGAAC TTGATGATAA TGTGTGTTT TTTGCGATGA ATATGGATAT GCCCACATCG GATGGTTTTG
TAGCTTGAT TCTAACCAC CACCCAGCCA ACCCAACTTG AACTACTATT ACACACCAA AAACGCTACT TATACCTATA CGGGTGTAGC CTACCAAAATC
901
GGCTGCGCCA AGCCATCACA AAAGAAGTGC TCAAACAGGA AAAAATTATT CCCTAGAAGT GGTAGCGCG TATTTGTGTG AAATAGCCGT CATATAAGCT
CCGACGCGGT TCGGTAGTGT TTTCTTACG AGTTTGTCTT TTTTAAATAA GGGATCTTCA CCAATCGCGC ATAAACACAC TTTATCGGCA GTATATTGCA
1001
GTAAAGATAT ATGGACAAAA TGCTCGATGC TCGATGC
CATTCTATA TACCTGTTTT ACGAGCTACG AGCTACG
C-Insertion
1037

```

### 9.4 Anhang IV: *ompK*-Sequenzen

Die im Folgenden aufgeführten Sequenzen der Gene *ompK35* und *ompK36* von *K. pneumoniae* Va22038 sind kombiniert mit denjenigen von *K. pneumoniae* NVT2001. Dieser Stamm wurde hinsichtlich seiner Poringene von Tsai et al. sequenziert (*ompK35*: GenBank-ID GU461278 und *ompK36*: GenBank-ID GU461279) und mit den betreffenden homologen Genen *ompF* und *ompC* von *E. coli* K-12 MG1655 verglichen [195]. Dadurch konnten die für *E. coli* stromaufwärts der Poringene liegenden, definierten Bereiche (das *micF*-Gen stromaufwärts von *ompK36*, integration host factors, Ribosom-Bindestellen, -35- und -10-Promotorbereiche sowie OmpR-Bindestellen) auf *K. pneumoniae* übertragen werden. Darüber hinaus haben Tsai et al. putative Terminatorsequenzen direkt stromabwärts der Poringene identifiziert. Der Vergleich von *K. pneumoniae* NVT2001 und *K. pneumoniae* Va22038 soll Gemeinsamkeiten und Unterschiede verdeutlichen.

Sequenz von *ompK35*:

		1		75
K. pneum. NVT2001	(1)	<u>TGTTACGCACTGTTTCGGTGC</u>	ATCCTGGTGATGTAGATCGCACTTTATGTTTCATAACAGAGCAAAAATGGCTGATA	
K. pneum. Va22038	(1)	<u>TGTTACGCACTGTTTCGGTGC</u>	ATCCTGGTGATGTAGATCGCACTTTATGTTTCATAACAGAGCAAAAATGGCTGATA	
		F4		
		76		150
K. pneum. NVT2001	(76)	AATTTGCTCATTTTTTGACCTTTACCCGCACATCTTGCAAAGACAGAGACTGAATAAAAAAGAATACGAATTC	AAT	
K. pneum. Va22038	(76)	AATTTGCTCATTTTTTGACCTTTACCCGCACATCTTGCAAAGACAGAGACTGAATAAAAAAGAATACGAATTC	AAT	
		151		225
K. pneum. NVT2001	(151)	ACACAAAAATGAACGAATTGCCGCTTAGCCAAATTAATCATAAAT	<u>AATTCATATAGATA</u>	GATAAGTAATCGCGTTT
K. pneum. Va22038	(151)	ACACAAAAATGAACGAATTGCCGCTTAGCCAAATTAATCATAAAT	<u>AATTCATATAGATA</u>	GATAAGTAATCGCGTTT
			IHF	
		226		300
K. pneum. NVT2001	(226)	TCCCTTATCCGGTGAACGGAATTTTGATTAAGTTCACAAAGTTC	<u>TACACATTTAGTTACATGAT</u>	TTT
K. pneum. Va22038	(226)	<u>TCCCTTAT</u>	<u>TCCGGTGAACGGAATTTTGATTAAGTTCACAAAGTTC</u>	<u>TACACATTTAGTTACATGAT</u>
			F1	
		301		375
K. pneum. NVT2001	(301)	<u>TCGTTTTGTTACTCATA</u>	<u>TGAGATATTCGTAGCATT</u>	<u>CCGGCTAGCGAAACGTTGTGCGGGATGGAAGATGCCT</u>
K. pneum. Va22038	(301)	<u>TCGTTTTGTTACTCA</u>	<u>TGAGATATTCGTAGCATT</u>	<u>CCGGCTAGCGAAACGTTGTGCGGGATGGAAGATGCCT</u>
		F2	F3	-35
				-10
		376		450
K. pneum. NVT2001	(376)	TCAGACACCAAACCTCTCATCAATGGTCTCTGTAAGTTTTTATTGACAGA	ACTTATTGACGGCAGTGGCACGTTGTTTC	
K. pneum. Va22038	(337)	TCAGACACCAAACCTCTCATCAATGGTCTCTGTAAGTTTTTATTGACAGA	ACTTATTGACGGCAGTGGCACGTTGTTTC	
		451		525
K. pneum. NVT2001	(451)	ATATAAAAAATATTAATGAGGGTAATAAATA	<u>ATGATGAAGCGCAATATTTCTGGCAGTGGTGATCCCTGCCTGCT</u>	
K. pneum. Va22038	(412)	ATATAAAAAATATTAATGAGGGTAATAAATA	<u>ATGATGAAGCGCAATATTTCTGGCAGTGGTGATCCCTGCCTGCT</u>	
		526	rbS	600
K. pneum. NVT2001	(526)	<u>GGTAGCCGGTGCAGCCACGTCGAGAAATCTATAACAAAACGGCAACAACTGGACTTCTATGGA</u>	<u>AAAAATGGT</u>	
K. pneum. Va22038	(487)	<u>GGTAGCCGGTGCAGCCACGTCGAGAAATCTATAACAAAACGGCAACAACTGGACTTCTATGGA</u>	<u>AAAAATGGT</u>	
		601		675
K. pneum. NVT2001	(601)	<u>CGGCGACGACGTCGGACCAATGGCGACACCAGCAGCGACGATACCACCTATGCCG</u>	<u>TATCGGCCGAAAGG</u>	
K. pneum. Va22038	(562)	<u>CGGCGACGACGTCGGACCAATGGCGACACCAGCAGCGACGATACCACCTATGCCG</u>	<u>TATCGGCCGAAAGG</u>	
		676		750
K. pneum. NVT2001	(676)	<u>CGAAACTCAGATTAACGATCAGCTGATCGGCTACGGCCAGTGGGAATACAACATGGACGCGTCCAATGTTGAAGG</u>		
K. pneum. Va22038	(637)	<u>CGAAACTCAGATTAACGATCAGCTGATCGGCTACGGCCAGTGGGAATACAACATGGACGCGTCCAATGTTGAAGG</u>		
		751		825
K. pneum. NVT2001	(751)	<u>TTCCAGACCACAAAACCCGCTGGCGTTCCGGCCGTAAGCGGGCGAATACCGTTTCAATCGACTATGGCCG</u>		
K. pneum. Va22038	(712)	<u>TTCCAGACCACAAAACCCGCTGGCGTTCCGGCCGTAAGCGGGCGAATACCGTTTCAATCGACTATGGCCG</u>		
		826		900
K. pneum. NVT2001	(826)	<u>TAACTACGGCCGATCTACGACGTCGAAGCGGCAACCGATATGCTGGTGAATGGGCGGTGACGGCTGGAAC</u>	<u>TA</u>	
K. pneum. Va22038	(787)	<u>TAACTACGGCCGATCTACGACGTCGAAGCGGCAACCGATATGCTGGTGAATGGGCGGTGACGGCTGGAAC</u>	<u>TA</u>	
		901		975
K. pneum. NVT2001	(901)	<u>CACCGACAACACTACATGACCGGTCGTACCAACGGCGTCGCAACCTACCGTAACTCCGACTTCTTCGGTCTGGT</u>	<u>TGA</u>	
K. pneum. Va22038	(862)	<u>CACCGACAACACTACATGACCGGTCGTACCAACGGCGTCGCAACCTACCGTAACTCCGACTTCTTCGGTCTGGT</u>	<u>TGA</u>	
		976		1050
K. pneum. NVT2001	(976)	<u>CGGTCTGAGCTTCGCGCTGCAGTACAGGGTAAAAACGACCACGACCGTGCATTCGCAAGCAGAATGGCGACGG</u>		
K. pneum. Va22038	(937)	<u>CGGTCTGAGCTTCGCGCTGCAGTACAGGGTAAAAACGACCACGACCGTGCATTCGCAAGCAGAATGGCGACGG</u>		
		1051		1125
K. pneum. NVT2001	(1051)	<u>CTTCAGCACCGCAGCCACCTACGCGTTCGACAACGGTATCGCACTGTCTGCAGGCTACTCCAGCTTAACCGTAG</u>		
K. pneum. Va22038	(1012)	<u>CTTCAGCACCGCAGCCACCTACGCGTTCGACAACGGTATCGCACTGTCTGCAGGCTACTCCAGCTTAACCGTAG</u>		
		1126		1200
K. pneum. NVT2001	(1126)	<u>CGTCGATCAGAAAGCTGACGGCAATGGCGACAAGCCGAAAGCTGGGCGACCTCTGCAAAATATGACGCTAACAA</u>		
K. pneum. Va22038	(1087)	<u>CGTCGATCAGAAAGCTGACGGCAATGGCGACAAGCCGAAAGCTGGGCGACCTCTGCAAAATATGACGCTAACAA</u>		
		1201		1275
K. pneum. NVT2001	(1201)	<u>CATCTATGCGGCCGTCATGTACTCCAGACTTACAACATGACTCCGGAAGAAGATAACCACTTCGCGCGTAA</u>	<u>AAAC</u>	
K. pneum. Va22038	(1162)	<u>CATCTATGCGGCCGTCATGTACTCCAGACTTACAACATGACTCCGGAAGAAGATAACCACTTCGCGCGTAA</u>	<u>AAAC</u>	
		1276		1350
K. pneum. NVT2001	(1276)	<u>TCAGAACTTTGAAGCAGTTGTACAGTATCAGTTTGACTTCGGCCTGCGTCCGTCATCGGCTACGTACAGACCAA</u>		
K. pneum. Va22038	(1237)	<u>TCAGAACTTTGAAGCAGTTGTACAGTATCAGTTTGACTTCGGCCTGCGTCCGTCATCGGCTACGTACAGACCAA</u>		
		1351		1425
K. pneum. NVT2001	(1351)	<u>AGGCAAGGACCTGCAGTCCGCTGCTGGCTTCTCCGGCGCGATGCGGATCTGGTTAAATACATCGAAGTGGGTAC</u>		
K. pneum. Va22038	(1312)	<u>AGGCAAGGACCTGCAGTCCGCTGCTGGCTTCTCCGGCGCGATGCGGATCTGGTTAAATACATCGAAGTGGGTAC</u>		
		1426		1500
K. pneum. NVT2001	(1426)	<u>CTGGTACTACTTTAACAAGAACATGAACGCTACGCTGCGTATAAATTCACCAGCTGGACGACAACGATTACAC</u>		
K. pneum. Va22038	(1387)	<u>CTGGTACTACTTTAACAAGAACATGAACGCTACGCTGCGTATAAATTCACCAGCTGGACGACAACGATTACAC</u>		
		1501		1575
K. pneum. NVT2001	(1501)	<u>CAAAGCGGCTGGTGTGCCACTGACGACCAAGCGGCGGTTGGTATCGTTTACCAGTTCTAA</u>	<u>TCTGCAGTACACCC</u>	
K. pneum. Va22038	(1462)	<u>CAAAGCGGCTGGTGTGCCACTGACGACCAAGCGGCGGTTGGTATCGTTTACCAGTTCTAA</u>	<u>TCTGCAGTACACCC</u>	
		1576		1628
K. pneum. NVT2001	(1576)	C TTCGTGATATGCCTTCAAAGCAGGACTTCGGTCCCTGCTTTTCTGTATTTCGTG		
K. pneum. Va22038	(1537)	C TTCGTGATATGCCTTCAAAGCAGGACTTCGGTCCCTGCTTTTCTGTATTTCGTG		
			put. Terminator	

Sequenz von *ompK36*:

		1		75
K. pneum. NVT2001	(1)	GTAAGAAGGGT	AAAAAAAAACCGGATGCGAGGCATCCGGTTGAAATAGGGGTAACAGACATTCAGAACTGAATG	
K. pneum. Va22038	(1)	GTAAGAAGGGT	AAAAAAAAACCGGATGCGAGGCATCCGGTTGAAATAGGGGTAACAGACATTCAGAACTGAATG	
			<i>micF</i>	
		76		150
K. pneum. NVT2001	(76)	ACGGTAATAAATAAAGTTAATGATGATAGC	GACTCTTATTTTAGCCACCAATGAACATTTTGTTTTACCATTTCAG	
K. pneum. Va22038	(76)	ACGGTAATAAATAAAGTTAATGATGATAGC	GACTCTTATTTTAGCCACCAATGATCATTTTGTTTTACCATTTCAG	
			-10	-35
		151		225
K. pneum. NVT2001	(151)	TGCTATAGATATGTTGTCGTC	TATCACFTTGATTATAAAAGGTAAATATTTTTTTTGTGATTAGTGCATATTT	
K. pneum. Va22038	(151)	TGCTATAGATATG	TGTCGTC TATCACFTTGATTATAAAAGGTAAATATTTTTTTTGTGATTAGTGCATATTT	
			IHF	
		226		300
K. pneum. NVT2001	(226)	CCCTGACCATTTTGC	GGTGAAAAAGTTC	CGCTGAA
K. pneum. Va22038	(226)	CCCTGACCATTTTGC	GGTGAAAAAGTTC	CGCTGAA
			C1	C2
		301		375
K. pneum. NVT2001	(301)	TTAGAAGTTTTAGTATCATAT	CTTGTGGAT	TATCTGCATTTTGCAGCACAAATGAAATAGCCGACTGATTA--
K. pneum. Va22038	(301)	TTAGAAGTTTTAGTATCATAT	CTTGTGGAT	TATCTGCATTTTGCAGCACAAATGAAATAGCCGACTGATTA
			C3	-35
			-10	DR
		376		450
K. pneum. NVT2001	(374)	TAATGACTCCAATT	TACTGATAGT	TTTTATGTTTCAGATAGTGCCCGATGACTTTGTTCATGCAGCTCCACCGATT
K. pneum. Va22038	(376)	TAATGACTCCAATT	TACTGATAGT	TTTTATGTTTCAGATAGTGCCCGATGACTTTGTTCATGCAGCTCCACCGATT
			IRR	
		451		525
K. pneum. NVT2001	(374)	TTGAGAACGACAGGAC	TTCC	TGCCAGCCTTGCCAGATGCTGTCTCAGATTCAGGTTGTGTCGCTCAATTCGCT
K. pneum. Va22038	(451)	TTGAGAACGACAGGAC	TTCC	TGCCAGCCTTGCCAGATGCTGTCTCAGATTCAGGTTGTGTCGCTCAATTCGCT
				526
				600
K. pneum. NVT2001	(374)	GCGTGAACGCTTACT	GATGACGTGCAGTTTTCCCTTCAGACGTGACTCATA	CATCGGCCAGCCGTC
K. pneum. Va22038	(526)	GCGTGAACGCTTACT	GATGACGTGCAGTTTTCCCTTCAGACGTGACTCATA	CATCGGCCAGCCGTC
				601
				675
K. pneum. NVT2001	(374)	ATACCACCACGT	CAAAA	ACTGACAGCAGGCTCAGAAGACGCTCCAGTGTGGCCATAGT
K. pneum. Va22038	(601)	ATACCACCACGT	CAAAA	ACTGACAGCAGGCTCAGAAGACGCTCCAGTGTGGCCATAGT
				676
				750
K. pneum. NVT2001	(374)	GGGCTACCACCGCC	TGCGTAT	CTCTGCATACGCGTAAACAGCCAGCCTGACGTGATTTTGCACCGACGTAGC
K. pneum. Va22038	(676)	GGGCTACCACCGCC	TGCGTAT	CTCTGCATACGCGTAAACAGCCAGCCTGACGTGATTTTGCACCGACGTAGC
				751
				825
K. pneum. NVT2001	(374)	CCCATTGCTCGT	CATCTCCG	CACAGCAATGACATCACTGCCCGCTGTATCCGGGAGGTTACTGACTGCGGCC
K. pneum. Va22038	(751)	CCCATTGCTCGT	CATCTCCG	CACAGCAATGACATCACTGCCCGCTGTATCCGGGAGGTTACTGACTGCGGCC
				826
				900
K. pneum. NVT2001	(374)	TGAGTTTTTAAAT	GGCGCAA	AATGGTGTGAGGCCACGCCATTAGTCGTGCGGTGGCACGGCAACCGACGCC
K. pneum. Va22038	(826)	TGAGTTTTTAAAT	GGCGCAA	AATGGTGTGAGGCCACGCCATTAGTCGTGCGGTGGCACGGCAACCGACGCC
				901
				975
K. pneum. NVT2001	(374)	GTTTCATAGCCAT	TATCAATG	ATTTTCTGGTGTATCCGGGCTGAGAAGCGGCATAAGTGAAGGTGAGCTGCCATGT
K. pneum. Va22038	(901)	GTTTCATAGCCAT	TATCAATG	ATTTTCTGGTGTATCCGGGCTGAGAAGCGGCATAAGTGAAGGTGAGCTGCCATGT
				976
				1050
K. pneum. NVT2001	(374)	TTTACGGCAGT	GAGAGC	AGAGATAACGTTGATGCCCGGCTGACTTTTGCATTACGCATCACGCCTTCAGTAGC
K. pneum. Va22038	(976)	TTTACGGCAGT	GAGAGC	AGAGATAACGTTGATGCCCGGCTGACTTTTGCATTACGCATCACGCCTTCAGTAGC
				1051
				1125
K. pneum. NVT2001	(374)	GGAACAGGAGG	GACAGC	AGGAGACTGAAGCCACGGGAGCACCTCAAAAACACCATTATACACTAAATCAGCA
K. pneum. Va22038	(1051)	GGAACAGGAGG	GACAGC	AGGAGACTGAAGCCACGGGAGCACCTCAAAAACACCATTATACACTAAATCAGCA
				1126
				1200
K. pneum. NVT2001	(374)	GAAGGTAAT	CAGTAAG	CAGTGGCATAATAAAAGGCATATAACAACAGA
K. pneum. Va22038	(1126)	AGTTGGTAGCAT	CACC	GACTGATTGAAGGTAATCAGTAAGCAGTGGCATAATAAAAGGCATATAACAACAGA
			IRL	DR
				1201
				1275
K. pneum. NVT2001	(424)	GGTTAATAAC	ATGAAAGT	TAAAGTACTGTCCCTCCTGGTACCGGCTCTGCTGGTAGCAGGCGCAGCAATGCGG
K. pneum. Va22038	(1201)	GGTTAATAAC	ATGAAAGT	TAAAGTACTGTCCCTCCTGGTACCGGCTCTGCTGGTAGCAGGCGCAGCAATGCGG
				1276
				1350
K. pneum. NVT2001	(499)	CTGAAATTTATA	CAAAAG	CGGCAAAATTAGACCTGTACGGTAAAATTGACGGTCTGCACACTTCTCTGACG
K. pneum. Va22038	(1276)	CTGAAATTTATA	CAAAAG	CGGCAAAATTAGACCTGTACGGTAAAATTGACGGTCTGCACACTTCTCTGACG
				1351
				1425
K. pneum. NVT2001	(574)	ACAAGAGCGT	CGACGG	CACAGCCTACATGCGTGTAGGCGTGAAAGGCCGAAACCCAGATCAACGACCGCTGA
K. pneum. Va22038	(1351)	ACAAGAGCGT	CGACGG	CACAGCCTACATGCGTGTAGGCGTGAAAGGCCGAAACCCAGATCAACGACCGCTGA
				1426
				1500
K. pneum. NVT2001	(649)	CCGGTTACGGCC	AGTGGGA	TACAACGTTTCAGGCGAACCAACTGAAAGCTCCAGCGATCAGGCATGGACTCGTC
K. pneum. Va22038	(1426)	CCGGTTACGGCC	AGTGGGA	TACAACGTTTCAGGCGAACCAACTGAAAGCTCCAGCGATCAGGCATGGACTCGTC
				1501
				1575
K. pneum. NVT2001	(724)	TGGCATTCGC	AGGCTGAA	ATTTGGCGACGGGCTCTTTTCGACTACGGTTCGTAACACGGCGTAGTATACGACG
K. pneum. Va22038	(1501)	TGGCATTCGC	AGGCTGAA	ATTTGGCGACGGGCTCTTTTCGACTACGGTTCGTAACACGGCGTAGTATACGACG
				1576
				1650
K. pneum. NVT2001	(799)	TAACGTCCTGG	ACGACTT	CGCCGAAATTCGGCGGACACCTACGGTTCGACAACCTTCTGACGTC
K. pneum. Va22038	(1576)	TAACGTCCTGG	ACGACTT	CGCCGAAATTCGGCGGACACCTACGGTTCGACAACCTTCTGACGTC
				1651
				1725
K. pneum. NVT2001	(874)	CTAACGGCGT	TGCAAC	TACCGTAACTCTGATTTCTTCGGTCTGGTTCAGCGGCTGAACTTTGCTCTGCAGTATC
K. pneum. Va22038	(1651)	CTAACGGCGT	TGCAAC	TACCGTAACTCTGATTTCTTCGGTCTGGTTCAGCGGCTGAACTTTGCTCTGCAGTATC
				1726
				1800
K. pneum. NVT2001	(949)	AGGGTAAAA	ACGGCAG	CGCTCAGCGGCAAGGCGGACCAACAACGGTCTGGTGGAGCAACAGAACGGCGACG
K. pneum. Va22038	(1726)	AGGGTAAAA	ACGGCAG	CGCTCAGCGGCAAGGCGGACCAACAACGGTCTGGTGGAGCAACAGAACGGCGACG

			1801		1875
K. pneum.	NVT2001	(1024)	GCTTCGGCACCTCTCTGACCTACGATATTTGGGATGGCATCAGCGCTGGTTTCGGTACTCTCACTCCAAACGTA		
K. pneum.	Va22038	(1801)	GCTTCGGCACCTCTCTGACCTACGATATTTGGGATGGCATCAGCGCTGGTTTCGGTACTCTCACTCCAAACGTA		
			1876		1950
K. pneum.	NVT2001	(1099)	CCGACGAGCAGAATAGTGTTCGGCACTGGGTCGTGGCGACAACGCTGAAACCTACACCGCGGTCTGAAATACG		
K. pneum.	Va22038	(1876)	CCGACGAGCAGAATAGTGTTCGGCACTGGGTCGTGGCGACAACGCTGAAACCTACACCGCGGTCTGAAATACG		
			1951		2025
K. pneum.	NVT2001	(1174)	ACGCCAACCAATCTACCTGGCCTCTCAGTACACCCAGACCTACAACGCAACTCGCGCCGGTTCCCTGGGCTTTG		
K. pneum.	Va22038	(1951)	ACGCCAACCAATCTACCTGGCCTCTCAGTACACCCAGACCTACAACGCAACTCGCGCCGGTTCCCTGGGCTTTG		
			2026		2100
K. pneum.	NVT2001	(1249)	CAAACAAGCGCAGAACTTCGAAGTGGTGTCTCAGTACACGTTTCGACTTCGGTCTCGGTCCGTCTGGCTTACC		
K. pneum.	Va22038	(2026)	CAAACAAGCGCAGAACTTCGAAGTGGTGTCTCAGTACACGTTTCGACTTCGGTCTCGGTCCGTCTGGCTTACC		
			2101		2175
K. pneum.	NVT2001	(1324)	TGCAGTCTAAAGGTAAGGATCTGAGCGCGGCTACGGCGACCAGGACATCCTGAAATATGTTGACGTTGGCGCGA		
K. pneum.	Va22038	(2101)	TGCAGTCTAAAGGTAAGGATCTGAGCGCGGCTACGGCGACCAGGACATCCTGAAATATGTTGACGTTGGCGCGA		
			2176		2250
K. pneum.	NVT2001	(1399)	CCTACTACTTCAACAAAAACATGTCCACCTATGTTGACTACAAAATCAACCTGCTGGACGACAACAGCTTCACCC		
K. pneum.	Va22038	(2176)	CCTACTACTTCAACAAAAACATGTCCACCTATGTTGACTACAAAATCAACCTGCTGGACGACAACAGCTTCACCC		
			2251		2325
K. pneum.	NVT2001	(1474)	GCAACGCCGGTATCTTACCAGCAGCTGGTTGCACTGGCCCTGGTTTACCAGTTCTAA	GTTGCAAGCTGCATAA	
K. pneum.	Va22038	(2251)	GCAACGCCGGTATCTTACCAGCAGCTGGTTGCACTGGCCCTGGTTTACCAGTTCTAA	GTTGCAAGCTGCATAA	
			2326		2400
K. pneum.	NVT2001	(1549)	CAAAAAGCGCCTCTGGCGCTTTTT	TTATGTCCGGTTAACCTCGCTGGTATACTCTTGTGCGCCCTGGTAAGAG	
K. pneum.	Va22038	(2326)	CAAAAAGCGCCTCTGGCGCTTTTT	TTATGTCCGGTTAACCTCGCTGGTATACTCTTGTGCGCCCTGGTAAGAG	
			put. Terminator		
			2401		
K. pneum.	NVT2001	(1624)	GAGCCTCG		
K. pneum.	Va22038	(2401)	GAGCCTCG		

Da die bei *K. pneumoniae* Va22038 stromaufwärts von *ompK36* liegende, 768 bp lange Insertionssequenz ISKpn14 zum Teil überlappende Informationen innerhalb ihrer Sequenz enthält, ist diese hier noch einmal separat aufgeführt und um entsprechende Stellen und ihren komplementären Strang ergänzt.

1	GGTAATGACT	CCAATTTACT	GATAGTGT	TATGTTTACA	TAGTGC	CCCGA	TGACTTTG	ATGCAGCT	CCCGATTT	AGAACG	AGCAG	GGACTTC	100
	CCATTACTGA	GGTTAAATGA	CTATACAAA	ATACAAGTCT	ATCACGGCT	ACTGAAACAG	TACGTCGAGG	TGGCTAAAAC	TCTTGCTGTC	CCTGAAGGAC			
101	CCAGCCTTG	CCAGATGCTG	TCTCAGATTC	AGGTTGTGTC	GCTCAATTCG	CTGCGTGTA	CGCTTACTGA	TGACGTGCAG	TTTTCCCTTC	AGACGTGACT			200
	GGGTCGGAAC	GGTCTACGAC	AGAGTCTAAG	TCCAACACAG	CGAGTTAAGC	GAGCGACATT	GCGAATGACT	ACTGCACGTC	AAAAGGGAAG	TCTGCACCTGA			
201	CATACATCGG	CCAGCCGTCC	GTCATCCATA	CCACCACGTC	AAAAACTGAC	AGCAGGCTCA	GAAGACGCTC	CAGTGTGGCC	ATAGTGC	GTTC	CACCGAAAAC		300
	GTATGTAGCC	GGTCGGCAGG	CAGTAGGTAT	GGTGTGCAG	TTTTTGACTG	TCGTCCGAGT	CTTCTGCGAG	GTCACACCGG	TATCACGCAA	GTGGCTTTTG			
301	GTGGGCTACC	ACCGCCCTGC	GATCCTGTGC	ATACGCGTAA	AACAGCCAGC	GCTGACGTGA	TTTTGCACCG	ACGTAGCCCC	ATTGCTCGTC	CATCTCCGCA			400
	CACCCGATGG	TGGCGGGACG	CATAGGACAG	TATGCGCATT	TTGTGCGTGC	CGACTGCACT	AAAACGTGGC	TGCATCGGGG	TAACGAGCAG	GTAGAGCGCT			
						<i>insB</i>							
401	CAGACAATGA	CATCACTGCC	CGGCTGTATC	CGGGAGGTTA	CTGACTGCGG	CCTGAGTTTT	TAAATGGCG	CAAAATGGTG	TTGAGGCCCA	CGCCCATTAG			500
	GTCTGTACT	GTAGTGACGG	GCCGACATAG	GCCCTCCAAT	GACTGACGCC	GGACTCAAAA	AATTTACCGC	GTTTACCAC	AACTCCGGT	GCGGGTAATC			
501	TCGTGCGGTG	GCACGGCAAC	CGACGCCGTT	CATAGCCATA	TCAATGATTT	TCTGGTGTGT	ACCGGGCTGA	GAAGCGGCAT	AAGTGAAGGT	GAGCTGCCAT			600
	AGCACGCCAC	CGTCCGTTG	GCTGCGGCAA	GTATCGGTAT	AGTTACTAAA	AGACCACACA	TGGCCCGACT	CCTCGCCGTA	TTCACCTCCA	CTCGACGGTA			
						<i>insA</i>							
601	GTTTTACCGC	AGTGAGAGCA	GAGATAACGT	TGATGCCCGG	CAGTACTTTT	GCCATTACGC	ATCACGCCTT	CAGTAGCGGA	ACAGGAGGGA	CAGCAGACGG			700
	CAAAATGCCG	TCACTCTCGT	CTCTATTGCA	ACTACGGGCC	GTCATGAAA	CGGTAATGCG	TAGTGC	GGA	GTCATCGCCT	TGTCCTCCT	GTCGTCTGCC		
701	AGACTGAAGC	CACGGGAGCA	CCTCAAAAAC	ACCATTATAC	ACTAAATCAG	CAAGTTGGTA	GTCATCACC						
	CTGACTTCG	GTGCCCTCGT	GGAGTTTTTG	TGGTAATATG	TGATTTAGTC	GTTCAACCAT	CGTAGTGG						
						-35 -							768
						- pIRL							

---

## 10 Rechtliche Hinweise

Im Folgenden sind rechtliche Hinweise bezüglich in dieser Arbeit aus fremden Werken entliehenen oder adaptierten Abbildungen aufgeführt.

Abbildung 1–13, Abbildung 1–15, ein Teil der Abbildung 1–18 und Abbildung 3–4 entstammen Werken, die bei der Nature Publishing Group veröffentlicht wurden. Ein rechtlicher Hinweis ist in dieser Arbeit direkt bei diesen Abbildungen eingefügt. Gleiches gilt für Abbildung 1–16, welche aus einem bei McGraw-Hill publizierten Buch entnommen wurde, Abbildung 1–19, die von einem bei der Oxford University Press veröffentlichten Werk adaptiert wurde, sowie Abbildung 3–3, die einer bei Springer herausgegebenen Publikation entstammt.

Ein weiterer Teil der Abbildung 1–18, ein Teil der Abbildung 1–31 und Abbildung 5–4 entstammen Werken, die bei der American Society for Biochemistry and Molecular Biology (ASBMB) veröffentlicht wurden. Die ASBMB gewährt freie Nutzung einschließlich einer Adaption ihrer Inhalte für die Verwendung in einer Dissertation ohne gesonderte Genehmigung.

Die Verwendung von Abbildung 3–2, Abbildung 5–1 und Abbildung 5–2 erfolgte mit freundlicher Genehmigung des Unternehmens bioMérieux.

Bezüglich anderer, entliehener und / oder adaptierter Abbildungen gelten die folgenden Hinweise.

- Abbildung 1–17 Amended with permission of the American Society for Microbiology: Microbiology and Molecular Biology Reviews (1998) 62:181-203, Copyright 1998.
- Abbildung 1–20 Reprinted from Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembrane Vol. 1778, Waldemar Vollmer, Ute Bertsche: Murein (peptidoglycan) structure, architecture and biosynthesis in *Escherichia coli*, Pages 1714-1734, Copyright 2008, with permission from Elsevier.
- Abbildung 1–21 Reproduced with permission of the American Society for Microbiology: Journal of Bacteriology (2005) 187:3643-3649, DOI: 10.1128/JB.187.11.3643-3649.2005, Copyright 2005.
- Abbildung 1–23 Adapted with permission from Journal of the American Chemical Society Vol. 125, Mijoon Lee et al.: A Mechanism-Based Inhibitor Targeting the DD-Transpeptidase Activity of Bacterial Penicillin-Binding Proteins, Pages 16322-16326. Copyright 2003 American Chemical Society.
- Abbildung 1–25 Reprinted from Current Opinion in Structural Biology Vol. 18, Satoshi Murakami: Multidrug efflux transporter, AcrB - the pumping mechanism, Pages 459-465, Copyright 2008, with permission from Elsevier.
- Abbildung 1–27 Reproduced with permission of the American Society for Microbiology: Clinical Microbiology Reviews (2010) 23:160-201, DOI: 10.1128/CMR.00037-09, Copyright 2010.
-

- Abbildung 1–28 Reproduced with permission of the American Society for Microbiology: Antimicrobial Agents and Chemotherapy (2012) - from an article published ahead of print, DOI: 10.1128/AAC.00035-12, Copyright 2012.
- Abbildung 1–29 Reproduced with permission of the American Society for Microbiology: Antimicrobial Agents and Chemotherapy (2008) 52:2950-2954, DOI: 10.1128/AAC.01672-07, Copyright 2008.
- Abbildung 1–30 Reproduced with permission of the American Society for Microbiology: Antimicrobial Agents and Chemotherapy (1995) 39:185-191, DOI: 10.1128/AAC.39.1.185, Copyright 1995.
- ein Teil der  
Abbildung 1–31 Adapted with permission of John Wiley and Sons: Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica (APMIS) Vol. 118:1-36, „β-lactam antibiotics: from antibiotic resistance and bacteriology“. I hereby acknowledge the authors Kok-Fai Kong, Lisa Schneper and Kalai Mathee for the kind permission. © 2009 The Authors Journal Compilation © 2009 APMIS
- Abbildung 1–33 Reprinted from The Lancet Infectious Diseases Vol. 9, Patrice Nordmann, Gaelle Cuzon, Thierry Naas: The real threat of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing bacteria, Pages 228-236, Copyright 2009, with permission from Elsevier.
- Abbildung 5–3 Reproduced with permission of the American Society for Microbiology: Antimicrobial Agents and Chemotherapy (2010) 54:320-327, DOI: 10.1128/AAC.00783-09, Copyright 2010.

Ferner möchte ich einigen korrespondierenden Autoren von Publikationen danken, die mir neben dem jeweiligen Herausgeber freundlicherweise ebenfalls ihre Erlaubnis zur Verwendung von enthaltenen Bildmaterialien für Abbildungen in dieser Dissertation gegeben haben.

Im Einzelnen möchte ich mich bedanken bei James T. Park (Referenz [24] / Abbildung 1–21), Robert A. Bonomo (Referenz [14] / Abbildung 1–27), Gian Maria Rossolini (Referenz [104] / Abbildung 1–28), Patrice Nordmann (Referenz [103] / Abbildung 1–29), Paul H. Roy (Referenz [106] / Abbildung 1–30), Teresa M. Coque (Referenz [202] / Abbildung 5–3), sowie (falls zutreffend) bei den weiteren Coautoren der entsprechenden Publikationen.

## Lebenslauf

entfällt aus datenschutzrechtlichen Gründen

Publikationen:

◆ Kongresspräsentationen:

- 10/2010: Jahrestagung der Paul-Ehrlich-Gesellschaft (PEG); Bonn  
Posterbeitrag „Molekulare Charakterisierung eines Carbapenem-resistenten, *bla*<sub>OXA-48</sub> exprimierenden *Klebsiella pneumoniae* Isolates in Deutschland“
- 04/2010: European Congress on Clinical Microbiology and Infectious Diseases, (ECCMID); Wien  
Posterbeitrag „Molecular characterization of the first carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolate Va22038 expressing *bla*<sub>OXA-48</sub>  $\beta$ -lactamase in Germany“