

**Der Einfluss Plasmid-vermittelter
Chinolon-Resistenzmechanismen (PMQR)
auf die Entstehung klinischer
Fluorchinolon-Resistenz**

DISSERTATION

zur Erlangung des naturwissenschaftlichen Doktorgrades
an der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften
im Fachbereich Chemie der Universität Hamburg

Vorgelegt von

Hans-Peter Sfeir

- Hamburg 2018 -

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von April 2011 bis April 2015 unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Peter Heisig am Institut für Biochemie und Molekularbiologie (Abteilung Pharmazeutische Biologie und Mikrobiologie) im Fachbereich Chemie an der MIN-Fakultät der Universität Hamburg angefertigt.

Gutachter der Dissertation

1. Gutachter: Prof. Dr. P. Heisig
2. Gutachter: Prof. Dr. M. Kolbe

Disputation - Datum: Freitag 20. Juli 2018

Prüfungskommission

1. Vorsitz: Prof. Dr. P. Heisig
2. Stellv. Vorsitz: Prof. Dr. H. Tidow
3. Prof. Dr. S. Wicha

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.

Nürnberg, 29. Januar 2018

Hans-Peter Sfeir

Erklärung über frühere Promotionsversuche

Ich versichere, dass von mir, Hans-Peter Sfeir, 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.

Nürnberg, 29. Januar 2018

Hans-Peter Sfeir

Wer ein entferntes Ziel erreichen will, muss kleine Schritte machen.

Helmut Schmidt

für meine Eltern
für meine Brüder
für Gesa

Danksagung

Ich möchte mich ganz herzlich bei Prof. Dr. Peter Heisig für die Möglichkeit bedanken, diese Dissertation in seinem Arbeitskreis anfertigen zu können. Ferner bedanke ich mich für die freundliche und konstruktive Atmosphäre und die anhaltende fachliche Unterstützung und Motivation. Bei Dr. Anke Heisig möchte ich mich für ihre engagierte Mitbetreuung und die zahlreichen praktischen Hilfestellungen und Denkanstöße bedanken, sowie für die Hilfe bei den Sequenzierungen. Bei Antje Schnasse und Gudrun Melles bedanke ich mich für die Hilfe bei der Sequenzierung, bei der Betreuung der Praktika und für die vielen Ideen und Ratschläge, die zur erfolgreichen Durchführung von Experimenten beigetragen haben. Sabine Badziong danke ich für die Unterstützung bei allen verwaltungstechnischen und organisatorischen Angelegenheiten. Allen Mitgliedern des Arbeitskreises danke ich für die sehr freundliche, kollegiale Zusammenarbeit, die vielen konstruktiven Gespräche und die angenehme Atmosphäre, die ich in bester Erinnerung behalten werde. Sebastian Sfeir, Greta Gulbins, Philipp Hebel und Gesa Knaack danke ich für die Übernahme des Lektorats.

Bei allen Freunden und Verwandten, die mir dabei halfen alle Höhen und Tiefen der Promotion zu überstehen, möchte ich mich ebenfalls bedanken. Für die Unterstützung und stete Motivation während der gesamten Zeit der Promotion möchte ich mich bei meiner lieben Gesa Knaack bedanken. Überhaupt erst möglich wurde mein Werdegang durch die ununterbrochene Unterstützung meiner Eltern und Brüder in jeder Hinsicht und zu jeder Zeit. Dafür gilt ihnen mein ganz besonderer Dank. An dieser Stelle möchte ich auch Prof. Dr. Elisabeth Stahl für die stets motivierenden Worte danken.

Vielen Dank auch für die Chance meine Ergebnisse auf großen internationalen Konferenzen in Berlin, Rostock, Barcelona, Kopenhagen und Washington D.C. präsentieren zu dürfen, wofür ich auch der Niemann-Stiftung zu großem Dank verpflichtet bin. Auch möchte ich Herrn Philipp Hebel besonders für die Zusammenarbeit zur Kongress-Vorbereitung danken. Herrn Prof. Dr. M. Kolbe danke ich für die freundliche Übernahme des Zweitgutachtens. Meinen Prüfern bei meiner Disputation, Herrn Prof. Dr. Tidow und Herrn Prof. Dr. Wicha danke ich ebenso. Danke für die Möglichkeit Sarah-Franziska Stahl im Rahmen ihrer Bachelor-Arbeit zu betreuen. Danken möchte ich auch für die großartige Unterstützung durch die Wahlpflichtpraktikanten Kim-Christin Langer, Nils Terberger, Moritz Niemöller, Alina Schwarz, Nina Vogelhubert, Berta Corbera, Neele Mordhorst, Charlotte Doll, Jenny Liu und Monika Wienholz.

Inhaltsverzeichnis

Eidesstattliche Versicherung	V
Erklärung über frühere Promotionsversuche.....	V
Danksagung	IX
Inhaltsverzeichnis	X
1 Einleitung	15
1.1 Bakterien.....	17
1.2 Einteilung, Funktion und Bedeutung der Effluxpumpen.....	18
1.3 Quorum Sensing in gramnegativen Bakterien	21
1.4 DNA-Topologie und Topoisomerasen	24
1.5 Fluorchinolon-Antibiotika (FQ).....	27
1.5.1 Entwicklung der FQ.....	27
1.5.2 Wirkweise der FQ.....	29
1.6 MHK und MPC	33
1.6.1 MHK - Minimale Hemmkonzentration	33
1.6.2 MPC – mutant prevention concentration.....	33
1.6.3 MSW – mutant selection window	33
1.7 Resistenzmechanismen gegenüber (Fluor-)Chinolonen bei gramnegativen Bakterien.....	34
1.7.1 FQ Resistenz durch veränderte Zielstrukturen.....	35
1.7.2 Chromosomal vermittelte FQ-Resistenz.....	36
1.7.3 Plasmidbasierte FQ-Resistenz.....	37
1.8 Akkumulierung chromosomaler Fluorchinolon-Resistenzmutationen	40
1.9 Ausgangspunkt der Fragestellung	42
1.10 Ziel der Arbeit	43
1.10.1 Einfluss von Quorum Sensing auf die Ausbildung einer Fluorchinolon-Resistenz ..	43
1.10.2 Einfluss von plasmidkodierten und chromosomalen Resistenzmechanismen auf die Aktivität von Ciprofloxacin in isogenen <i>Escherichia coli</i> Isolaten	44
2 Material und Methoden	47
2.1 Material	47
2.1.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien	47
2.1.2 Kits.....	51
2.1.3 Software.....	52
2.1.4 Puffer und Lösungen.....	52
2.1.5 Nährmedien	55
2.1.6 Enzyme.....	55
2.1.7 Chemikalien (inkl. Antibiotika).....	57
2.1.8 Bakterienstämme.....	59

2.1.9	Plasmide	63
2.1.10	Oligonukleotide	64
2.1.11	Größenstandards für DNA-Gele	67
2.2	Methoden.....	68
2.2.1	Methoden der Mikrobiologie – Arbeiten mit Bakterien	68
2.2.1.14	Bestimmung der Generationszeit.....	77
2.2.2	Methoden der Molekularbiologie - Arbeiten mit DNA/RNA.....	79
2.2.3	Arbeiten mit Protein.....	99
3	Ergebnisse I - Untersuchungen zu <i>sdiA</i>	103
3.1.1	Sequenzierung <i>sdiA</i>	103
3.1.2	Pyrosequenzierung.....	106
3.1.3	Southern Blot.....	108
3.1.4	Quantitative Bestimmung der <i>sdiA</i> Expression.....	119
4	Ergebnisse II - Untersuchungen mit Qnr	121
4.1	Feinbestimmung der MHK von Ciprofloxacin und Einfluss von IPTG auf die MHK	122
4.2	Charakterisierung der Transformanden und <i>In-vitro</i> -Selektion von QnrA1 und QnrB1 in <i>E. coli</i> WT (GK571), <i>E. coli</i> WT-K (GK4041) und <i>E. coli</i> (GK573) MII	123
4.3	Einfluss der verwendeten Vektoren auf die <i>In-vitro</i> -Selektion.....	127
4.3.1	Isolierung der Plasmide aus den selektierten Mutanten	127
4.3.2	Fehlender Selektionsdruck führt bei <i>E. coli</i> MII zu Plasmidverlust - Vergleich MII und JM109	128
4.3.3	Fehlender Selektionsdruck führt bei <i>E. coli</i> WT zu Plasmidverlust – Untersuchung WT	130
4.4	Charakterisierung der Mutanten aus der <i>In-vitro</i> -Selektion von <i>E. coli</i> WT, WT-K und MII mit QnrA1, bzw. QnrB1	131
4.4.1	Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration (MHK) der selektierten Mutanten	133
4.4.2	Sequenzanalyse der Mutanten.....	134
4.4.3	<i>marR</i> -Deletion	139
4.5	Genomsequenzierung der selektierten Mutante MII pHPNE19-02.1 Nr. I 43.....	143
4.5.1	Sequenzierung von Δicd 7 bp bei MII pHPNE19-02.1 Nr. I 43.....	144
4.5.2	Δicd in weiteren selektierten Mutanten	147
4.6	Einfluss <i>icd</i> auf Entwicklung einer FQ-Resistenz	159
4.6.1	Charakterisierung <i>E. coli</i> -Stamm MII Δicd 7 bp pHPNE19-02.1.....	159
4.6.2	Komplementation von Δicd 7 bp mit dem Wildtyp-Allel aus <i>E. coli</i> WT (GK571) in <i>E. coli</i> MII pHPNE19-02.1 Nr. I 43	160
4.6.3	Einfluss Δicd 7 bp auf den Mutatoreffekt von <i>dnaQ905</i>	166
4.6.4	Einfluss verschiedener Qnr-Varianten.....	170
4.6.5	Δicd 7 bp in <i>E. coli</i> -Stamm WT und <i>E. coli</i> -Stamm MI	175
4.6.6	Generationszeitbestimmungen.....	192

4.6.7	Zusammenhang Effluxpumpen und Δicd 7 bp	195
5	Diskussion	231
5.1	Untersuchungen zu SdiA in WT, MIII und MIVa	232
5.2	Einfluss von plasmidkodierten und chromosomalen Resistenzmechanismen auf die Aktivität von Ciprofloxacin in isogenen <i>Escherichia coli</i> Isolaten	235
5.2.1	Vergleich der Plasmide pHPNE18-01 mit pHPNE18-01.1 und pHPNE19-02 mit pHPNE19-02.1	235
5.2.2	<i>In-vitro</i> -Selektion von QnrA1 und QnrB1 in <i>E. coli</i> WT (GK571), <i>E. coli</i> WT-K (GK4041) und <i>E. coli</i> (GK573) MII	236
5.3	Untersuchung der selektierten Mutanten nach Durchführung des Ciprofloxacin-Forward-Assays	240
5.3.1	Identifizierung der Ursache für die Zunahme der MHK von Ciprofloxacin	245
5.4	Einfluss Δicd auf Entwicklung einer FQ-Resistenz	249
5.4.1	Charakterisierung MII pHPNE19-02.1 Nr. I 43	249
5.4.2	Konstruktion von WT Δicd 7 bp	252
5.4.3	Auswirkungen von Δicd 7 bp auf den Stoffwechsel in <i>E. coli</i>	253
5.4.4	Metabolische Regulation in <i>E. coli</i>	257
5.4.5	Zusammenhang Stoffwechsel und Generationszeiten	258
5.4.6	Einfluss von Effluxpumpeninhibitor und –induktor auf die MHK von Fluorchinolonen für MII Δicd 7 bp	260
5.4.7	Verwendung von Reporterplasmiden zur Messungen der Luciferase-Aktivität	262
5.5	Fazit und Ausblick - Toxische metabolische Störungen können eine Efflux-vermittelte Antibiotika –Resistenz in gramnegativen Bakterien unterstützen	269
6	Zusammenfassung.....	275
7	Summary.....	278
8	Lebenslauf.....	281
9	Poster und Veröffentlichungen.....	282
10	Abkürzungsverzeichnis	283
11	Gefahrstoffverzeichnis	288
12	Tabellenverzeichnis	291
13	Abbildungsverzeichnis.....	296
14	Literaturverzeichnis.....	300
15	Anhänge.....	315
15.1	Übersicht der gesicherten Mutanten	315
15.2	Detaillierte Übersicht der MHK für selektierte Mutanten	316
15.2.1	Ergebnisse für WT	316

15.2.2	Ergebnisse für WT-K	317
15.2.3	Ergebnisse für MII.....	318
15.3	Untersuchung $\Delta marR175$ bp.....	319
15.3.1	Ergebnisse für WT pHPNE18-01.1, WT pHPNE19-02.1	319
15.3.2	Ergebnisse für WT pHPNE19-02.1 Nr. 1 2	320
15.3.3	WT-K pHPNE18-01.1, WT-K pHPNE19-02.1; WT-K pUC19	321
15.3.4	Ergebnisse Untersuchung <i>marR</i> -RFLP	322
15.4	Ergebnisse der Sequenzanalyse	328
15.4.1	Sequenzierung der QRDR bei WT-Mutanten	328
15.4.2	Ergebnisse der Sequenzanalyse für <i>E. coli</i> MII (GK573)	330
15.4.3	Ergebnisse MII pHPNE19.02.1 Nr. II 18	336
15.4.4	Ergebnisse MII pHPNE19-02.1 Nr. III 2	337
15.4.5	Ergebnisse MII pHPNE19-02.1 Nr. III 3	339
15.4.6	Ergebnisse MII pHPNE19-02.1 Nr. III 13	341
15.4.7	Ergebnisse MII pHPNE18-01.1 Nr. II 23	343
15.5	Ergebnisse der Luciferase-Messung / Rohdaten.....	346
15.5.1	Messung vom 04.06.2014	346
15.5.2	Messung vom 10.07.2014	348
15.5.3	Messung vom 15.07.2014	349
15.5.4	Messung vom 17.07.2014	351
15.5.5	Messung vom 14.08.2014	353

1 Einleitung

Mit der zufälligen Entdeckung durch ALEXANDER FLEMING, dass der Schimmelpilz *Penicillium notatum* ein Gift absonderte, das in der Umgebung des blaugrünen Schimmelpilzes keine Bakterienkolonien auf einer Agarplatte wachsen ließ, begann ab 1928 die Ära der Antibiotika. Das isolierte Gift wurde von FLEMING Penicillin genannt in Anlehnung an den Schimmelpilz. Noch zu Beginn des 20. Jahrhunderts betrug die durchschnittliche Lebenserwartung in Deutschland ca. 45 Jahre. Damals waren in Deutschland durch Bakterien ausgelöste Krankheiten, wie Tuberkulose, Cholera oder Geschlechtskrankheiten, wie Syphilis, die Haupttodesursache. Als britischer Arzt im Ersten Weltkrieg erlebte FLEMING bereits 1916, dass neben Waffengewalt auch bakterielle Erreger Todesursache für die Soldaten waren. Im Zweiten Weltkrieg begann der Siegeszug der Antibiotika und vielen Krankheiten wurde der tödliche Schrecken genommen. Schon 1940 vor Einsatz des Penicillins in der Praxis waren erste Resistenzen bekannt. In seiner Rede anlässlich der Nobelpreisverleihung 1945 prophezeite FLEMING die Gefahr, dass sich durch falsche Dosierung Mikroben nicht mehr abtöten lassen und sich Resistenzen gegenüber Antibiotika ausbilden können [1]–[3].

Der Begriff Antibiotikum wurde erstmalig durch SELMAN WAKSMAN erwähnt, dem Entdecker des Streptomycins. „Antibiotikum“ beschreibt die Verwendung, einen Effekt im Labor oder die Aktivität einer chemischen Verbindung [4]. Mit Antibiotika wird nicht eine bestimmte Wirkstoffklasse beschrieben, sondern jede Wirkstoffklasse, die Bakterienwachstum hemmen kann oder bakterizid wirkt, indem spezifisch eine Interaktion mit bakteriellen Zielstrukturen eingegangen wird. Durch übermäßige Anwendung kann ein Organismus auf ein Antibiotikum eine Resistenz entwickeln. Bakterien sind seit fast 3 Milliarden Jahren auf der Erde und zählen zu den ersten Lebewesen überhaupt. In dieser Zeit haben sie die Fähigkeit erworben und perfektioniert, sich schnell an wechselnde Umweltbedingungen anzupassen. Antibiotikaresistenzen stellen ein uraltes Phänomen dar, und sind fast so alt wie die Antibiotika und die Bakterien selbst, da Resistenzmechanismen den Antibiotika-produzierenden Organismus vor dem eigenen Gift schützen können (Tabelle 1-1) [5].

Tabelle 1-1 Historische Betrachtung der Resistenz - ein uraltes Phänomen

*: synthetisch hergestellt

Antibiotikum	Zulassung (USA)	Resistenzmeldung	Alter Resistenzgene (geschätzt)
Penicillin	1943 [5]	1940 [5]	2000 Mio. Jahre [6]
Streptomycin	1947 [7]	1947 [7]	610 Mio. Jahre [8]
Erythromycin	1952 [9]	1959 [10]	880 Mio. Jahre [8]
Methicillin	1959 [11]	1961 [11]	noch unbekannt
Nalidixinsäure*	1964 [12]	1966 [12]	noch unbekannt
Vancomycin	1972 [13]	1986 [13]	240 Mio. Jahre [8], [14]
Ciprofloxacin*	1987 [15]	1988 [15]	noch unbekannt
Linezolid*	2000 [16]	1999 [16]	noch unbekannt
Daptomycin	2003 [17]	2005 [17]	30 bis 80 Mio. Jahre [8], [14]

Insgesamt war die Zeit vom Ende der 1960er Jahre bis in die 1980er Jahre von einer stabilen Resistenzlage geprägt. Seit den 1990er Jahren nimmt jedoch die Zahl resistenter Keime stetig zu. Auch bei den synthetisch hergestellten Fluorchinolonen ist ein Anstieg zu sehen (Abbildung 1-1). Bei dieser synthetisch hergestellten Wirkstoffklasse hatten Bakterien vor klinischer Anwendung nicht die Möglichkeit in der Natur eine Resistenz zu entwickeln [5]. Daher war das Auftreten von Resistenzen bei Fluorchinolonen umso mehr eine Besonderheit. Lange Zeit wurde davon ausgegangen, dass sich bei Fluorchinolonen keine Resistenz aufgrund ihres synthetischen Ursprungs ausbilden kann. Mittlerweile sind verschiedene Veränderungen bekannt, die von veränderten Zielstrukturen bis zu übertragbaren plasmidkodierten Mechanismen reichen [18]. Die vorliegende Arbeit soll einen Beitrag zum Verständnis von Resistenzentwicklung im Zusammenhang mit plasmidcodierten Mechanismen (PMQR, plasmid mediated quinolone resistance) leisten.

In jüngeren Arbeiten wird die These postuliert, dass Millionen von Bakterienarten existieren müssen, und von denen ist bisher nur ein Bruchteil der Arten bekannt oder untersucht. So ist auch das Verständnis von Antibiotika noch nicht abschließend erforscht. Antibiotika scheinen für Bakterien nicht nur dazu zu dienen konkurrierende Organismen abzutöten, sondern scheinen eine weitere Rolle als mögliche Signalstoffe einzunehmen, was in dieser Arbeit auch untersucht werden soll [19], [20].

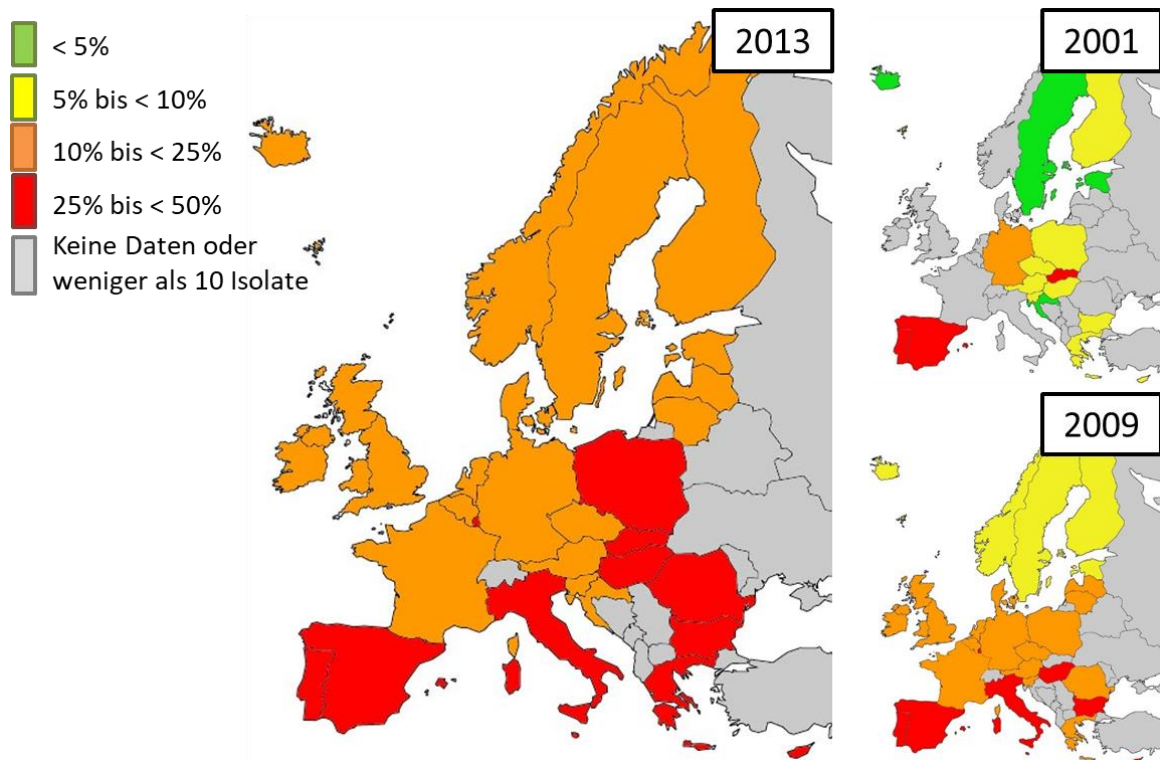


Abbildung 1-1 Fluorchinolon-Resistenzen; Grenzwerte (gemäß EUCAST) für die Jahre 2001, 2009 und 2013, modifiziert nach [21]–[24]

Seit dem Ende der 1990er Jahre treten vermehrt Fluorchinolon-Resistenzen auf. 2001 liegen nicht für alle Länder Daten vor, und die Resistenzen bei klinischen Isolaten sind im europäischen Raum teilweise noch unter 15 % zu finden. 2009 findet sich im Raum der europäischen Union kein Land mit einer Resistenzrate unter 5 %. 2013 sind mindestens 10 % aller klinischen Isolate bereits resistent auf Fluorchinolone. Besonders deutlich ist die Resistenzzunahme in den Ländern Skandinaviens und des Baltikums zu erkennen. Im Mittelmeerraum liegt bereits 2001 eine hohe Resistenzrate vor. Eine Fluorchinolon-Resistenz liegt vor, sobald eine MHK für Fluorchinolone für ein klinisches Isolat oberhalb des Grenzwerts (gemäß EUCAST) vorliegt [24].

1.1 Bakterien

Neben Eukaryoten und Archaeen bilden die Bakterien eine der drei wichtigsten Domänen zur Einteilung von Lebewesen [25]. Bakterien sind Prokaryoten und verfügen, wie die Archaeen, nicht über einen Zellkern mit einer Kernmembran, wie das bei Eukaryoten der Fall ist. Im Zytoplasma liegt die DNA auf wenig Raum konzentriert als Nucleoid (Kernäquivalent) vor. Das Erbgut besteht aus einem ringförmigen DNA-Molekül (*desoxyribnucleic acid*). Einzig die Ribosomen sind gemeinsame Zellorganellen von Bakterien und Eukaryoten. Funktionen anderer Zellorganellen der eukaryotischen Zellen übernehmen bei Prokaryoten Enzyme in der Plasmamembran. Bakterien werden unterteilt in gramnegative und grampositive Bakterien. Beim

Menschen ist der Darm von zahlreichen Bakterienarten besiedelt, zu denen auch Vertreter aus der Familie der Enterobacteriaceae zählen. Zur normalen Darmflora des Menschen gehören gramnegative Bakterien, wie *Escherichia coli* (*E. coli*). 1885 entdeckte der deutsch-österreichische Kinderarzt THEODOR ESCHERICH das Bakterium *E. coli* im Stuhl von gesunden Individuen und nannte es *Bacterium coli*. Zehn Jahre später wurde das Bakterium nach seinem Entdecker *Escherichia coli* (*E. coli*) benannt. *E. coli* ist peritrich begeißelt, besitzt Fimbrien, und ist ein fakultativ-anaerobes Stäbchenbakterium aus der Familie der Enterobacteriaceae (Enterobakterien) [25], [26].

Typischerweise wird der Gastrointestinaltrakt (GIT) eines neugeborenen Kindes innerhalb von Stunden nach der Geburt von *E. coli* besiedelt. Normalerweise koexistieren *E. coli* und der (menschliche) Wirt in guter Gesundheit miteinander und profitieren voneinander [26]. Durch Disposition durch den Patienten kann *E. coli* außerhalb des Darmes Eiterungen, Entzündungen sowie Harnwegsinfektionen hervorrufen. Andere Ursachen für eine Infektion kann eine vorliegende Immundefizienz oder eine Beschädigung der gastro-intestinalen Barrieren sein [25]–[27]. Unter stark geschädigten und schwer kranken Patienten spielt eine Infektion mit fakultativ pathogenen Enterobakterien eine wichtige Rolle [25]. Durch den Austausch von Erbinformationen mit anderen Spezies konnte *E. coli* Virulenz- und Pathogenitätsfaktoren erwerben. Damit war die Besiedlung neuer Nischen möglich und führte zum Aufkommen obligat pathogener Stämme [26], [27]. In Pathotypen werden definierte Kombinationen von Virulenz- und Pathogenitätsfaktoren zusammengefasst [26]–[29]. Je nach Art der durch *E. coli* ausgelösten Infektion ist eine angepasste Behandlung zu wählen. Für schwere Infektionen sollten Fluorchinolone (Ciprofloxacin, Levofloxacin) reserviert bleiben [27], [30]–[32].

1.2 Einteilung, Funktion und Bedeutung der Effluxpumpen

Anhand der notwendigen Energiequelle werden Effluxpumpen in zwei wesentliche Gruppen eingeteilt. Die ABC-Familie (*ATP-binding cassette*) benötigt ATP als Energiequelle. Für die Funktion der anderen Gruppe ist ein Protonengradient notwendig, der durch Zellmembranen ermöglicht wird. Es finden sich vier Untergruppen für Pumpen, die einen Protonengradienten benötigen. Hier wird zwischen MFS- (*major facilitator superfamily*), SMR- (*small multidrug resistance*), RND- (*resistance-nodulation-cell division*) und MATE-Pumpen (*multidrug and toxic*

compund extrusion) unterschieden. In gramnegativen Bakterien finden sich keine Effluxpumpen vom Typ der MATE- und SMR-Familie. Effluxpumpen in gramnegativen Bakterien sind aus mehreren Komponenten zusammengesetzt, da die zusätzliche äußere Membran vorliegt. Die in der inneren Membran verankerte Effluxpumpe (*inner membrane protein*) ist mit Membranfusionsproteinen (*membrane fusion protein*, MFP) und einem Proteinkanal in der äußeren Membran (*outer membrane protein channel*, OMP) fusioniert. In der äußeren Membran ist häufig das Membranprotein TolC zu finden (Abbildung 1-2) [33]. Neben der wichtigen Rolle der Ausschleusung giftiger Stoffwechselprodukte und bakterieller Toxine aus der Zelle, werden weitere Funktionen diskutiert, zum Beispiel die Zell-Zell-Kommunikation im Rahmen des *Quorum Sensings* (Abschnitt 1.3) [34]. Therapeutisch eingesetzte Antibiotika können als Substrat von Pumpen erkannt und ausgeschleust werden. Antibiotika selbst können giftige Toxine für das Bakterium sein und weisen ähnliche Strukturelemente zu Toxinen auf. Antibiotika besitzen amphiphile Eigenschaften und ionisierbare Gruppen. Diese Strukturelemente werden von MDR-Effluxpumpen erkannt. Mutationen in Regulatorgenen können zur Überexpression von Effluxpumpen führen, was Resistenzen auf bestimmte Antibiotika fördert. Als therapeutischer Ansatz werden Inhibitoren der Pumpen diskutiert. Aufgrund von Nebenwirkungen, wie zum Beispiel der zusätzlichen Inhibition von eukaryotischen Pumpen, besteht hier noch Forschungsbedarf [33]–[36].

In gramnegativen Bakterien sind besonders die Pumpen der RND-Superfamilie (englisch: *resistance-nodulation-cell division superfamily*) an der Ausbildung einer Resistenz beteiligt [37]. RND-Effluxpumpen können je nach Substrat in zwei verschiedene Unterfamilien eingeteilt werden. In hydrophobe und amphiphile Effluxpumpen (englisch: *hydrophobis and amphiphilic efflux RND*, HAE-RND) oder in Schwermetall-RND Effluxpumpen (englisch: *heavy metal efflux RND*, HME-RND) [38], [39]. In *E. coli* finden sich fünf Effluxpumpen aus der HAE-RND-Subfamilie: AcrAB, AcrAD, AcrEF, MdtAB und MdtEF und mit CusFBA findet sich nur ein Transporter aus der HME-RND-Subfamilie [39].

Ein Modellsystem für die RND-Effluxfamilie ist der Acridinresistenzkomplex (Acr) von *Escherichia coli*. Diese Pumpanordnung umfasst den Außenmembrankanal TolC, den Sekundärtransporter (RND) AcrB in der inneren Membran und das periplasmatische

Membranfusionsprotein (MFP) AcrA, das diese beiden integralen Membranproteine überbrückt (Abbildung 1-3).

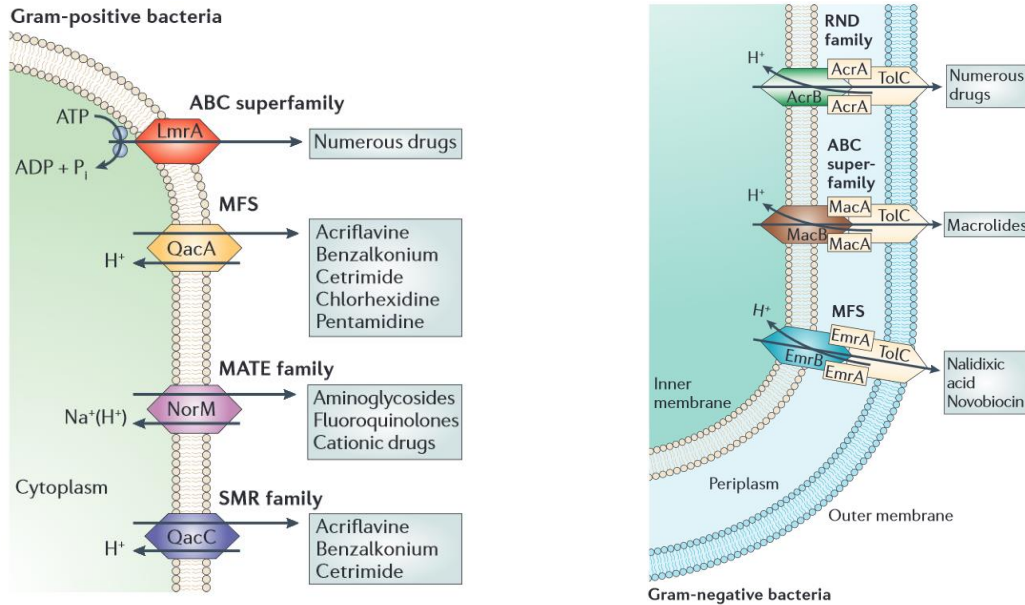


Abbildung 1-2 Schematische Darstellung von MDR (multidrug resistance)-Effluxpumpen bei grampositiven und gramnegativen Bakterien mitsamt Lokalisierung in der Membran, modifiziert nach [33]

Es wird in fünf Familien bei MDR-Effluxpumpen unterschieden: ABC-Superfamilie (*ATP-binding cassette superfamily*), MFS-Familie (*major facilitator superfamily*), MATE-Familie (*multidrug and toxic compound extrusion family*), RND-Familie (*resistance-nodulation-cell division family*). Typische Stellvertreter mitsamt Substraten sind für jede Familie gezeigt.

Das Gen *acrAB* liegt in einem Operon codiert vor und unterliegt der Kontrolle durch die Transkriptionsrepressoren *AcrR*, *AcrS* [40], [41]. Neben anderen Regulatoren beeinflusst auch *SdiA* die Expression von *acrAB* (Abbildung 1-15) [42]. Der Promotor *PacrAB* liegt innerhalb *acrO*. *tolC* ist in einem anderen Abschnitt des Bakterien-Chromosoms codiert [43]. *MarA*, *Rob* oder *SoxS* beeinflussen die Expression von *acrAB* und *tolC* [44]–[46]. Anhand von Kristallstrukturanalysen ist zu vermuten, dass sich *AcrAB-TolC* stöchiometrisch aus einem *AcrB*-Trimer, einem *AcrA*-Hexamer und einem *TolC*-Trimer (3 : 6 : 3) zusammensetzt [39], [47]–[49]. Bindestellen für Ciprofloxacin und für andere Substrate wurden bei *AcrB* in der zentralen Kavität der periplasmischen Seite an der transmembranären Domäne identifiziert [50]–[52]. Substrate können aus dem Periplasma über zwei Möglichkeiten in *AcrB* eindringen. Eine dritte Möglichkeit

besteht durch den Eintritt in die zentrale Kavität aus dem Cytosol (vergleiche Abbildung 1-3) [39], [51], [53], [54].

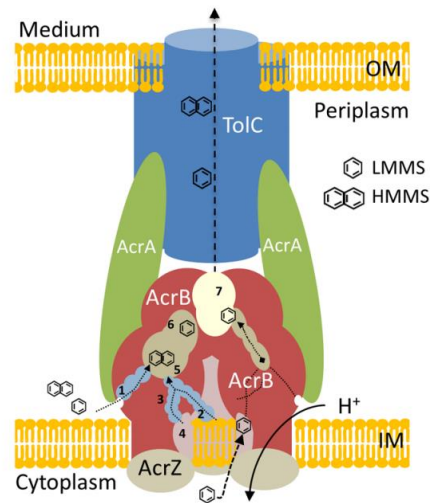


Abbildung 1-3 Modell zur Erklärung der Funktion des dreiteiligen AcrABZ-ToIC-Effluxsystems [39]

Die RND-Pumpe AcrB ist in rot dargestellt, das periplasmatische Adapterprotein AcrA ist grün dargestellt, die Pore in der Außenmembran TolC ist blau dargestellt. Das AcrZ-Protein ist in beige eingefärbt. OM: Außenmembran (*outer membrane*), IM: Innenmembran (*inner membrane*); LMMS: Substrate mit geringer Molekularmasse (*low molecular mass substrates*), HMMS: Substrate mit hoher Molekularmasse (*high molecular mass substrates*).

AcrEF-TolC gehört ebenfalls zum Acriflavin-Effluxsystem. RND *acrF* und MFP *acrE* liegen in einem Operon und beide Gene werden durch SdiA reguliert [42]. Aufgrund einer großen Homologie wird angenommen, dass sich AcrEF ähnlich zu AcrAB zusammensetzt und eine identische Funktion zu AcrAB zu besitzt [55]. Unter Laborbedingungen ist die *acrEF*-Expression sehr niedrig und eine Deletion von *acrEF* ändert nicht den *E. coli*-Resistenz-Phänotyp. In *acrB*-Mutanten konnte gezeigt werden, dass durch eine *acrEF*-Überexpression die Empfindlichkeit auf Fluorchinolone sinkt [39], [56]–[59]. Frühere Forschungsarbeiten sprechen AcrEF eine Funktion in der Ausschleusung des toxischen Stoffwechselprodukts Indol zu oder zeigten, dass AcrEF durch Ausschleusung von Produkten der Membran-Wiederverwertung (*membrane-recycling*) zur Aufrechterhaltung der Zellteilung beiträgt [56], [60].

1.3 Quorum Sensing in gramnegativen Bakterien

Bakterien sind in der Lage mittels chemischer Moleküle miteinander zu kommunizieren. Dieser Prozess wird als *Quorum Sensing* bezeichnet und wurde erstmal bei biolumineszenten

Bakterien *Vibrio fischeri* und *Vibrio harveyi* nachgewiesen. Beide Spezies besitzen im *luxCDABE*-Operon kodierte Enzyme, die der Luciferase des Glühwürmchens ähneln. Die Akkumulation von *Quorum-Sensing Signalen* (QSS oder Autoinducer) spiegelt die Zelldichte im Anzuchtmedium wieder. QSS sind durch die Zellmembran frei diffusionsfähig. Sobald ein Grenzwert (englisch: *Quorum*) überschritten wird, kann das QSS Transkriptionsfaktoren aktivieren, die die Expression verschiedener Gene aufregulieren (Abbildung 1-4).

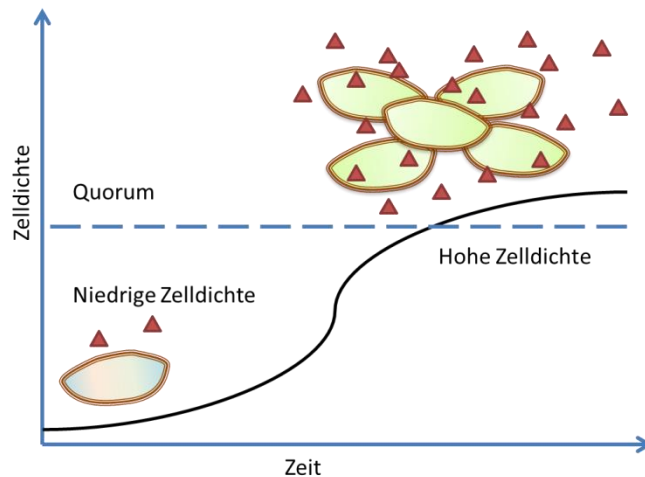


Abbildung 1-4 Bakteriellies Quorum Sensing, modifiziert nach [61]

Bei niedriger Zelldichte werden geringe Mengen an QSS extrudiert. Steigt die Zelldichte an, so werden mehr QSS abgegeben. Aber einem bestimmten Grenzwert können QSS Transkriptionsfaktoren aktivieren, und das Zellverhalten verändern, z.B. Zellen zum Leuchten bringen.

Bei *V. fischeri* und *V. harveyi* löst ein Überschreiten einer bestimmten Zelldichte eine Lichtemission als unmittelbare Antwort auf die Anreicherung abgesonderter QSS aus (Abbildung 1-5) [61]. In *V. fischeri* wird das *luxCDABE*-Operon (Luciferase-Operon) durch das LuxI/LuxR-Regulationssystem gesteuert. Homologe zu *luxI* und *luxR* konnten im Genom vieler Bakterien gefunden werden. Statt einer Luciferase-Aktivität kontrollieren die Enzyme dieser anderen LuxIR-Typ *Quorum-Sensing-Systeme* durch QSS in gramnegativen und grampositiven Spezies unterschiedliche physiologische Prozesse (Biolumineszenz, Expression von Virulenzfaktoren, Biofilmbildung, Eintritt in die stationäre Phase, Konjugation von Plasmid-DNA, Sporenbildung) [61], [62]. Bei gramnegativen Bakterien konnten verschiedene Klassen von QSS gefunden werden. Häufig sind in gramnegativen Bakterien niedermolekulare chemische Moleküle aus der Familie der N-Acyl-L-homoserin-lactone (AHL) als QSS zu finden [62]. AHL werden in der Zelle

durch AHL-Synthasen (LuxI-Homologe) gebildet und ins externe Milieu abgegeben. AHL können wieder in die Zelle eintreten und an Rezeptorproteine binden (LuxR-Homologe). Diese AHL-LuxR-Komplexe bilden Dimere oder Multimere und binden an spezifische Promotorregionen der DNA, welche *lux-Box* genannt werden, und können die Transkription bestimmter Zielgene aktivieren oder unterdrücken.

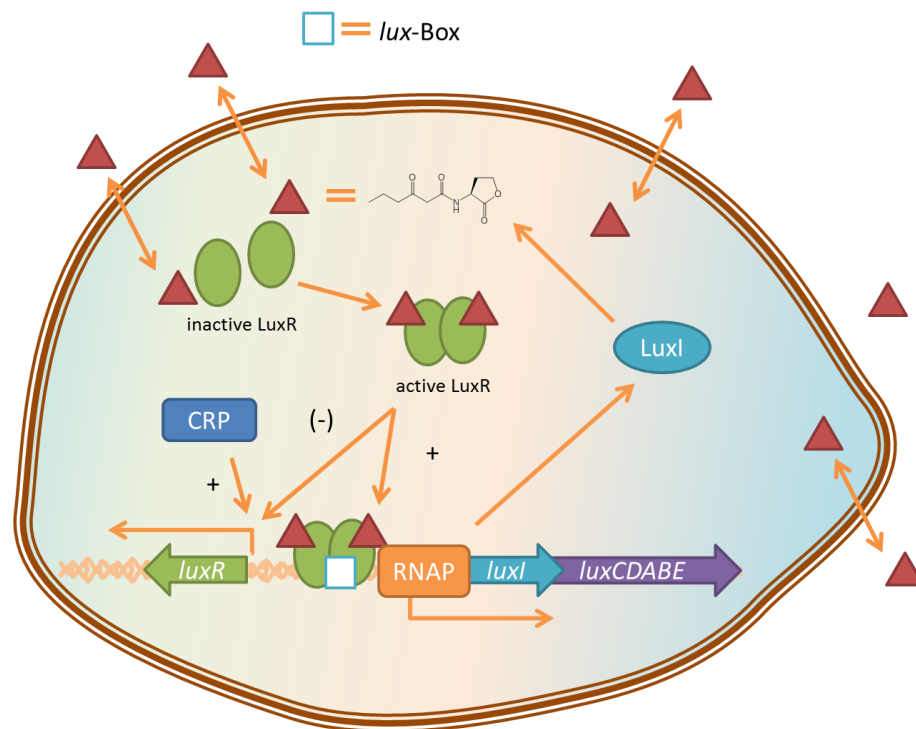


Abbildung 1-5 Quorum-sensing Modell in *P. fischeri*, modifiziert nach [63]

Bei niedriger Zelldichte wird das *luxICDABE* –Operon nur gering transkribiert. LuxI codiert für die AHL-Synthase. Bei Zunahme der Zelldichte binden vermehrt AHLs an den Transkriptionsaktivator LuxR. LuxR bindet an *Inverted-Repeat*-Sequenzen in der *lux-Box* und kommt in Kontakt mit der RNA-Polymerase und induziert die Expression von *luxICDABE*.

Spezies innerhalb der Gattung *Escherichia*, *Klebsiella*, *Salmonella* und *Shigella* besitzen keine LuxI-Homologe in ihrem Genom, so dass diese Bakterien keine AHLs synthetisieren können. Dafür ist das LuxR-Homolog SdiA (*suppressor of cell division inhibitor*) vorhanden. In *E. coli* setzt sich SdiA aus 241 Aminosäuren zusammen und kann QSS aus anderen Mikroorganismen binden und dadurch die Transkription in diesem nicht-AHL-produzierenden Bakterium beeinflussen [64]–[66]. Dieses Phänomen wird als *Eavesdropping* („Abhören“, „Lauschen“) bezeichnet und erklärt das Verhalten von Mikroorganismen, um auf QSS zu antworten, die nicht selbst produziert wurden [65], [67]. Als Beispiele hierfür konnten eine *acrAB*-Überexpression (siehe Abbildung 1-6) [68], [69], eine verstärkte Biofilmbildung [70] oder eine erhöhte Beständigkeit

gegenüber Säuren [71] beobachtet werden. Weitere Arbeiten zeigten, dass Indol in der Kommunikation zwischen einzelnen Zellen eine zentrale Rolle spielt und unter anderem die Ausbildung von Biofilmen beeinflussen kann [72]–[74].

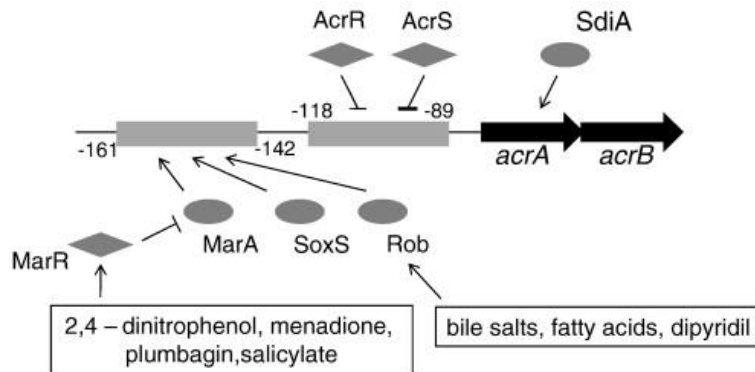


Abbildung 1-6 *acrAB*-Regulation in *E. coli* [75]

In *E. coli* sind mehrere Regulatoren, darunter MarA, Rob, SoxS und SdiA gemeinsam an der *acrAB*-Expression beteiligt. Als Reaktion auf *acrAB*-Inducer wird so indirekt die *acrAB*-Expression beeinflusst. MarR ist ein Repressor des *mar*-Operons (englisch: *multiple antibiotic resistance*). AcrR und AcrS sind Repressoren für die *acrAB*-Expression.

1.4 DNA-Topologie und Topoisomerasen

Das Chromosom in *Escherichia coli* ist ein einziges großes Doppelstrangmolekül mit mehr als 1000 μm Länge, das in einer Bakterienzelle untergebracht werden muss, die nicht länger als 1 bis 3 μm ist [76]. Durch die Abwandlung der Windungszahl der DNA-Helix (Superhelix) wird die DNA in eine kompakte Form gebracht (siehe Abbildung 1-7) [77]. An dieser quartären Faltung zur Volumenreduzierung sind mehrere Faktoren beteiligt: Eine hohe Konzentration an gelösten Substanzen im Cytoplasma, weitreichende DNA-Faltung in 50 bis 80 topologisch unabhängige Domänen, negatives DNA-Supercoiling und die Anwesenheit von DNA-biegenden Proteinen [76]. Um die starke Kondensation des Chromosoms für den essentiellen Zugang dieser Proteine zu den darin enthaltenen Informationen zu vereinbaren, bedarf es besonderer Proteine [27]. Bei *E. coli* sind diese Enzyme die (DNA-)Topoisomerasen. Unterscheiden sich DNA-Stränge allein in der Zahl ihrer Windungen, so werden diese als Topoisomere bezeichnet. Als Topoisomerasen werden Enzyme bezeichnet, die die Topologie der chromosomalen DNA (Windungszahl, englisch: *linking number*) der DNA verändern können [77]–[79] und damit in

die Replikation, Rekombination und Expression eingreifen [76]. Typ-I-Topoisomerasen schneiden einen DNA-Strang, während Typ-II-Topoisomerasen einen Schnitt des DNA-Doppelstrangs durchführen.

In *E. coli* sind zwei dieser Enzyme, die DNA-Gyrase und die später entdeckte Topoisomerase IV, die Zielstrukturen der Fluorchinolon-Antibiotika (siehe Abschnitt 1.5) [15], [76]. Nach WATSON und CRICK kreuzen sich die DNA-Stränge im Doppelstrang im relaxierten Zustand alle 10,5 Basenpaare [27], [80]. Sind für die Nukleinsäuresynthese Lesevorgänge an der DNA notwendig, so wird vom relaxierten Zustand abgewichen und es entsteht Torsionsspannung in der DNA. Eine Möglichkeit diese Spannung zu reduzieren, ist die Änderung der Konformation im dreidimensionalen Raum. So können Topoisomerasen ringförmige DNA in die Form einer Acht bringen.

Gyrase und Topoisomerase IV setzen sich aus jeweils zwei unterschiedlichen Untereinheiten zusammen und funktionieren als $\alpha_2\beta_2$ Heterotetramer. Die Gyrase ist ein Tetramer, das aus zwei A- und zwei B-Untereinheiten besteht, die durch die Gene *gyrA* und *gyrB* codiert werden. Im *E. coli*-Genom liegen beide Gene nicht benachbart vor [81]. Als einzige Typ II Topoisomerase kann die Gyrase aktiv negative Überspiralisierung (englisch: *negative supercoils*, siehe Abbildung 1-7) in die DNA einführen. Das passiert in Verbindung mit dem ω Protein (Typ I Topoisomerase), um die Packdichte der DNA Superhelix des bakteriellen Chromosoms zu erreichen. Die Gyrase entfernt die Torsionsspannung vor der Replikationsgabel oder bei Transkriptionsprozessen [78], [82]–[84]. In einem ATP-abhängigen Schritt wird DNA zunächst positiv überspiralisiert. Danach wird in eine Region der Doppelstrang-DNA ein Bruch eingeführt und der DNA-Bruch anschließend ligiert. Das intakte DNA-Segment wird als T-Segment bezeichnet und der DNA-Abschnitt, in den ein Doppelstrangbruch eingeführt wird, als G-Segment. In der Gyrase öffnet sich das DNA-*gate* und hier wird das T-Segment durchgeführt (Abbildung 1-8) [76]. Die freien 5'-Enden des G-Segments werden an einen Tyrosin-Rest an GyrA kovalent gebunden. Erst nachdem das T-Segment durch das DNA-*gate* geführt wurde, und nach dem Schließen des DNA-Bruchs im G-Segment wird die Überspiralisierung von positiv zu negativ geändert (Abbildung 1-7) [85]. In Gegenwart von ATP läuft dieser Prozess in Richtung negative Überspiralisierung. In Abwesenheit von ATP läuft der Prozess in die entgegengesetzte Richtung und die DNA wird wieder relaxiert. Dieser Prozess läuft nur sehr langsam ab [85]. Die Untereinheiten GyrB und ParE enthalten die ATPase- und

TOPRIM (Topoisomerase-Primase)-Domänen [86]. Die TOPRIM-Domäne bindet zweiwertige Metallionen, die bei DNA-Schnitt und -Ligation benötigt werden. Trotz einer hohen Homologie bei GyrA und ParC sind die C-Termini nicht gut konserviert. Dieser Teil des Enzyms ist in die Topologie-Erkennung involviert und bietet daher eine Erklärung dafür, warum nur die Gyrase eine Superspiralisierung in die DNA einführen kann [78], [82]–[84], [87]–[90].

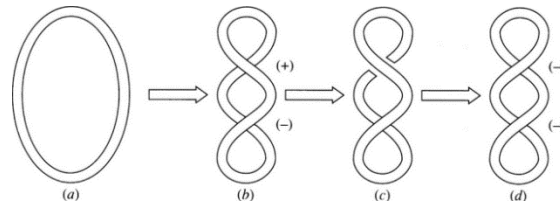


Abbildung 1-7 Mechanismus negative DNA-Überspiralisierung durch Gyrase [91]

In (a) ist relaxierte, zirkuläre DNA zu sehen, die in (b) für die Strangpassage gebogen wird. In (c) führt die Gyrase DNA-Doppelstrangbrüche ein, und fixiert die freien DNA-Enden. Ein intakter DNA Bereich wird durch den Strangbruch geführt und in (d) wieder ligit.

Die Topoisomerase IV ist ein Homolog der DNA Gyrase und setzt sich aus vier Untereinheiten zusammen, zwei ParC und zwei ParE und ähnelt im Reaktionsmechanismus der Gyrase. Die Hauptfunktion der Topoisomerase IV liegt in der Entfernung von Knoten, die im bakteriellen Chromosom beim Prozess der Replikation entstehen. Durch Decatenierung von Tochterchromosomen werden die Chromosomen auf die Tochterzellen aufgeteilt [76], [78], [82]–[84], [92].

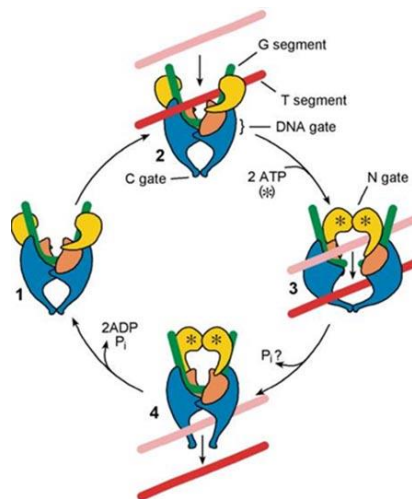


Abbildung 1-8 Schema DNA-Gyrase Superspiralisierungsprozess, modifiziert nach [93]

Verschiedene Domänen innerhalb des Proteins sind unterschiedlich eingefärbt; gelb: ATPase-Domäne (N-Terminus GyrB in prokaryotischen Enzymen), orange: C-Terminus der B-Untereinheit, blau: N-Terminus GyrA; C-Terminus GyrA nicht abgebildet.

1.5 Fluorchinolon-Antibiotika (FQ)

1.5.1 Entwicklung der FQ

Bei den (Fluor)chinolonen handelt es sich um vollsynthetisch hergestellte Substanzen, die sich von der Nalidixinsäure ableiten ab [84], [94], [95]. Bereits 1958 war beim Screening für 7-Chloroquinolon eine antibakterielle Wirkung beobachtet worden [94], [96]. Als Nalidixinsäure 1960 bei der kommerziellen Herstellung von Chloroquin entdeckt wurde, bewies auch diese Substanz antibakterielle Aktivität und war das erste vermarktete Chinolon [97]. In den 1960ern wurde Nalidixinsäure für unkomplizierte Harnwegsinfektionen, die durch Enterobakterien ausgelöst wurden, eingesetzt [84], [94], [95]. Die Chinolone blieben trotz weiterer Entwicklungen, wie z. B. Oxolinsäure, bis in die 1980er hinein eine selten verschriebene Wirkstoffklasse mit einem engen Wirkspektrum [84]. Den Durchbruch weg vom engen Wirkspektrum zum breiteren Einsatzbereich brachte die Kombination von verschiedenen Substituenten mit der Einführung von Norfloxacin 1978 als ersten Vertreter einer neuen (Fluor)Chinolon-Generation (Abbildung 1-9) [15].

Norfloxacin zeigte eine verbesserte Aktivität gegenüber der bakteriellen Topoisomerase II (Gyrase), penetrierte besser in grampositive Organismen und zeigte eine geeignetere Pharmakokinetik sowie -dynamik [84]. Neben einer Aktivität gegenüber Enterobacteriaceae und einer verbesserten Aktivität gegenüber wenigen grampositiven Erregern, war keine Wirksamkeit gegenüber atypischen Erregern vorhanden. Norfloxacin zeigte eine niedrige Serum- und Gewebekonzentration und war nicht für systemische Infektionen geeignet [98], [99]. Für Norfloxacin und den folgenden weiteren Chinoloncarbonsäuren lassen sich Struktur-Wirkungsbeziehungen ableiten (siehe Abbildung 1-10). Das gemeinsame Element ist eine 1-Alkyl-substituierte 4-Pyridon-3-carbonsäure, wodurch eine Wirksamkeit gegen die bakterielle Gyrase und Topoisomerase IV möglich ist [77].

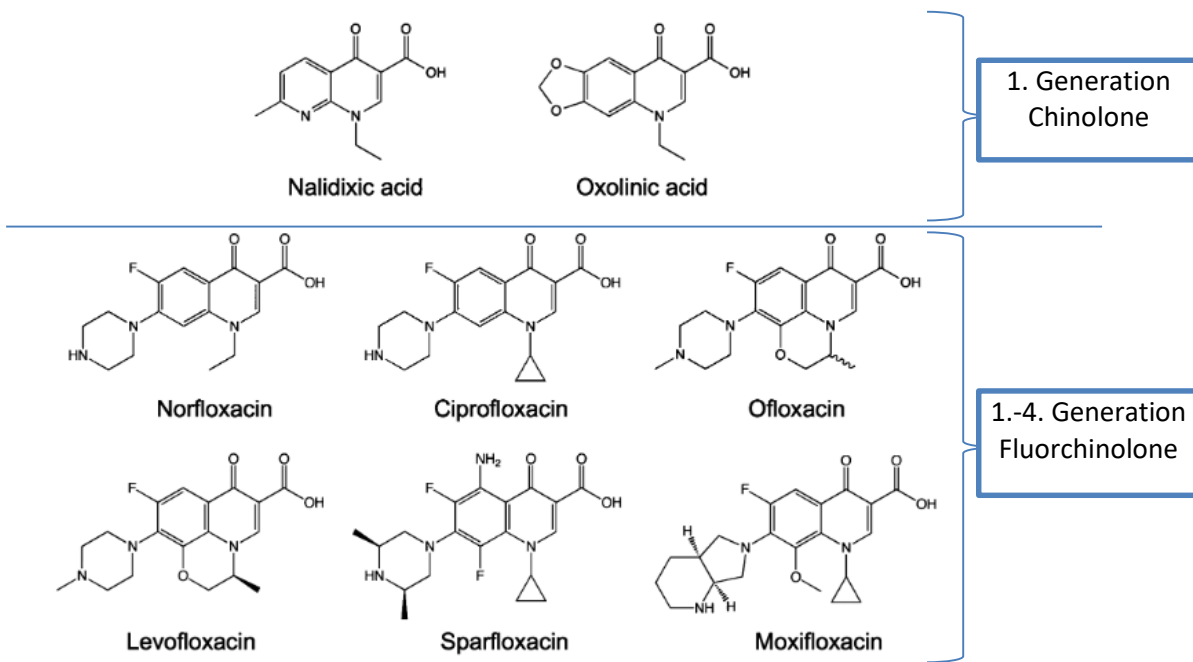


Abbildung 1-9 Übersicht verschiedener Chinolon-Strukturen, modifiziert nach [100]

Nalidixinsäure (englisch: *nalidixic acid*) und Oxolinsäure (englisch: *oxolinic acid*) sind die Vertreter der 1. Generation der Chinolone. Norfloxacin ist der wichtigste Vertreter der 2. Generation der Chinolone, bzw. 1. Generation Fluorchinolone. Ciprofloxacin und Ofloxacin sind Fluorchinolone der 2. Generation. Levofloxacin ist ein Fluorchinolon der 3. Generation und das L-Isomer vom Racemat Ofloxacin. Ein weiterer Vertreter der 3. Generation ist das 2001 vom Markt genommene Sparfloxacin. Moxifloxacin ist ein Fluorchinolon der 4. Generation [1, 4, 6, 7].

Mit der Einführung von Ciprofloxacin stand ab 1987 das erste Fluorchinolon für den klinischen Einsatz zur Verfügung, das auch außerhalb der Harnwege signifikante Aktivität zeigte [101]. Im Vergleich zu Norfloxacin zeigte Ciprofloxacin eine höhere Serum- und Gewebekonzentration und konnte oral oder intravenös verabreicht werden. Neben komplizierten Harnwegsinfekten waren auch Infektionen der Weichteile, sowie sexuell übertragbare Krankheiten mit Ciprofloxacin behandelbar [98], [99]. Vertreter der dritten Generation kamen in den 1990er Jahren erstmalig zum klinischen Einsatz. Levofloxacin (siehe Abbildung 1-9) ist aus dieser Gruppe der prominenteste Vertreter und seit 1998 in Deutschland verfügbar. Als L-Isomer ist es die aktive Form des Racemats Ofloxacin. Ein mit Ciprofloxacin vergleichbares Erregerspektrum konnte um Streptokokken erweitert werden. Die Elimination erfolgte vermehrt über die Leber [98], [99]. Anfang der 2000er Jahre kamen (Fluor)chinolone der vierten Generation wie Moxifloxacin (siehe Abbildung 1-9) zum Einsatz. Damit konnte die Wirkung gegenüber grampositiven Erregern und Anaerobiern erneut gesteigert werden. Halbwertszeiten über 10 h verbesserten die orale Bioverfügbarkeit [18], [104], [105].

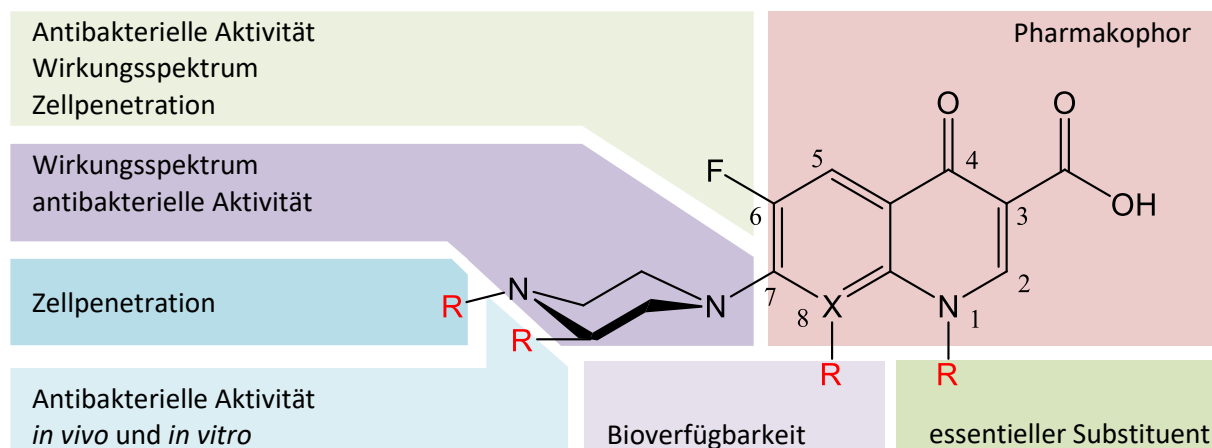


Abbildung 1-10 Struktur-Wirkungsbeziehungen bei Gyrasehemmern, modifiziert nach [77]

1.5.2 Wirkweise der FQ

Um ihre physiologische Funktion auszuüben, führen Gyrase und Topoisomerase IV Doppelstrangbrüche in das bakterielle Chromosom ein. Obwohl diese Enzyme essentiell für das Überleben der Zelle sind, steckt in diesen Enzymen zugleich das Potential das gesamte bakterielle Chromosom zu fragmentieren [78], [82]–[84], [90], [106]. Fluorchinolone nutzen das bakterizide Potential der Fragmentierung aus, greifen in die DNA-Replikation ein und stören diesen Prozess, indem Sie die Konzentration an Enzym-DNA *Cleavage Komplexen* (englisch: *cleavage complex*) erhöhen [76], [84], [106]–[110]. Die bakterizide Wirkung wird deutlich sobald die Serum-Konzentration ungefähr das 30-fache der minimalen Hemmkonzentration erreicht hat [111], [112]. Höhere Konzentrationen wirken sich auf die RNA- und Proteinbiosynthese aus, und reduzieren damit die bakterizide Wirkung [111]. Bei der Mehrheit der grampositiven Bakterien ist das erste Target die Topoisomerase IV, sekundär wird die Gyrase gestört. Bei gramnegativen Bakterien werden die Enzyme in entgegengesetzter Reihenfolge inhibiert [110]. Die Einteilung zwischen grampositiven und gramnegativen Organismen trifft nicht immer zu und ist Bestandteil anhaltender Debatten, so dass Spezies für Spezies analysiert werden muss [84], [113], [114].

Gyrase und Topoisomerase IV führen versetzte Einzelstrangbrüche über ihre Untereinheiten GyrA, bzw. ParC (*nicks*) in die DNA ein und bleiben kovalent an den 5'-Enden der geschnittenen DNA haften [115], [116]. Chinolone binden schnell an den Enzym-DNA-Komplex [107]. Vermutlich noch bevor der Schritt des DNA-Schnitts stattfindet. Die mutierte Gyrase kann nach

Mutation nicht mehr an DNA binden [117]. Das Chinolon bindet in Gyrase und Topoisomerase IV direkt am aktiven Zentrum, das auch für Strangbrüche und Ligation verantwortlich ist (*cleavage-ligation active site*) [84], [118]–[120]. Nach der Bindung des Chinolons kommt es zu einer Konformationsänderung des Enzyms. Darauf folgt ein thermodynamisch langsamer ablaufender Schritt. Das gebundene Chinolon blockiert die Fähigkeit der Gyrase und Topoisomerase IV die freien DNA-Enden wieder zu religieren. Der *Cleavage-Komplex* besteht aus bakterieller Topoisomerase, Chinolon und gebundener DNA mit freien 5'-Enden [25, 27]. Das Chinolon funktioniert als physikalischer Block der Ligation [107], [109], [122]. Die DNA-Fragmente sind an die GyrA oder ParC-Proteine kovalent gebunden [116]. Da mehrere DNA-Schnitte fixiert werden, und die resultierenden Fragmente kleiner als das gesamte Chromosom sind, geht die Nucleotid-Sequenz verloren [26, 28]. Als Konsequenz führt die Behandlung mit Chinolonen zu vielen *Cleavage-Komplexen* und zu DNA-Brüchen im gesamten bakteriellen Chromosom [107]. Es ist davon auszugehen, dass Chinolone im Bereich der Helix IV an GyrA oder ParC (Abbildung 1-11) nah an der *DNA-gate* Region der Gyrase binden [109]. Wird das Chinolon entfernt, kann die Topoisomerase den Schnitt wieder religieren [121], [123]. Die *Cleavage-Komplexe* allein sind nicht letal [107]. Gyrase und Topoisomerase scheinen die DNA-Struktur zu beeinflussen und Einzelstrangblasen zu bilden. Chinolone scheinen bevorzugt an Einzelstrang-DNA zu binden [95], [119], [122], [124].

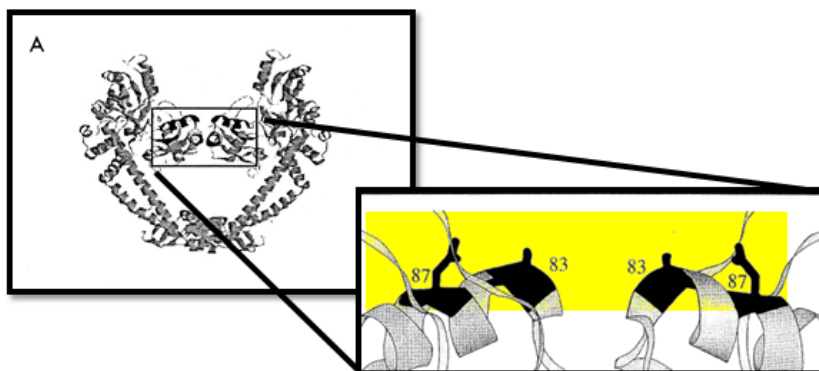


Abbildung 1-11 Gyrase mit den Hervorgehobenen Regionen der GyrA-Untereinheit, modifiziert nach [125]

Region um Helix IV ist zur Stabilisierung von *Cleavage-Komplexen* durch Chinolone wichtig.

Das Chinolon richtet sich zur Helix IV mit dem C7-Substituenten aus (vergleiche Abbildung 1-12 und Abbildung 1-13). Mutationen nahe dem N-Terminus können dafür sorgen, dass die Gyrase nicht mehr anfällig für Ciprofloxacin wird, während weiterhin eine Empfindlichkeit gegenüber Nalidixinsäure vorliegt. Nalidixinsäure besitzt keinen Ringssubstituenten an Position 7 [126].

Das Chinolon hält das DNA-*gate* im *Cleavage-Komplex* offen wahrscheinlich durch eine Bindung zur Helix IV in GyrA (ParC), Regionen von GyrB (ParE) und zur DNA. Die Konformationsänderungen der stabilisierten *Cleavage-Komplexe* mit der DNA sind reversibel sobald das Fluorchinolon nicht mehr vorliegt [107], [109]. Bestimmte Mutationen in Gyrase oder Topoisomerase IV vermitteln eine Fluorchinolon-Resistenz (FQ-Resistenz). Es ist zu vermuten zu, dass das Zusammenspiel von FQ und Protein eine wichtige Rolle bei der Stabilisierung des *Cleavage-Komplexes* spielt. Die häufigste mutierte Aminosäure im Zusammenhang mit FQ-Resistenz bei der Gyrase ist Ser83 in der A-Untereinheit (GyrA) und ein saurer Rest an Position 87 (Abbildung 1-13). In Topoisomerase IV finden sich an den ähnlichen Positionen auch Serin und eine saure Aminosäure (Asparaginsäure oder Glutaminsäure, Abbildung 1-11 und Abbildung 1-13) in der C-Untereinheit (ToIC) [84], [95], [125].

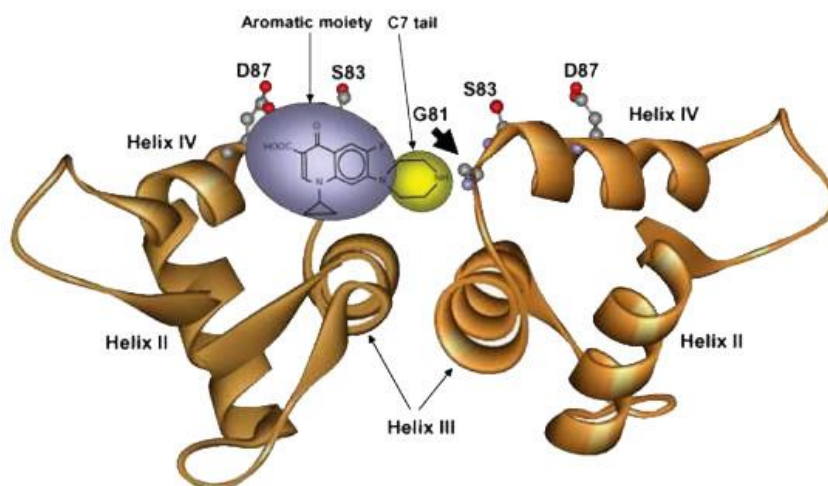


Abbildung 1-12 Helix IV FQ-Bindemodell innerhalb der *E. coli* Gyrase [109]

Die DNA-*gate* Region mit dem GyrA-GyrA-Dimer. Ciprofloxacin ist so gebunden, dass sich der C7-Substituent zu G81 einer GyrA-Untereinheit ausrichtet. Zur anderen GyrA-Untereinheit sind die Carboxyl- und Ketogruppe ausgerichtet und befinden sich nahe Position 83 und 87.

Fluorchinolone können zwischen bakteriellen und humanen Enzymen „unterscheiden“ (Abbildung 1-13) [84]. Veränderungen der Aminosäuren Ser und Glu/Aps im Zuge einer Mutation senken die Affinität des Chinolons zur Topoisomerase II deutlich. Für die Zelle kann das ein erster Schritt hin zur Resistenz gegenüber Fluorchinolonen bedeuten (Abschnitt 1.7) [84], [95]. Als Resultat des *Cleavage-Komplexes* kommt es zur Inhibition der Nukleinsäuresynthese. Für die DNA-Replikation kommt es innerhalb weniger Minuten zur Inhibition, wenn es sich um die Gyrase handelt. [107]. Treffen die Replikationsgabel (*replication fork*) oder andere Komplexe, die an der DNA entlangwandern, auf einen stabilisierten *Cleavage-Komplex*, so verwandelt sich

der Strangbruch in einen permanenten Bruch im bakteriellen Chromosom. Als Reaktion auf die DNA Strangbrüche setzen DNA-Reparatur Mechanismen, wie die SOS-Antwort (*SOS response*) ein. Die primäre Erklärung für die bakterizide Wirkung von Chinolonen liegt darin, dass die Zahl der Strangbrüche bei Behandlung mit Chinolonen zunimmt. Gleichzeitig können nicht mehr sämtliche Brüche durch Reparaturmechanismen ausgeglichen werden. Dieses Ungleichgewicht kann zum Tod der Zelle führen.

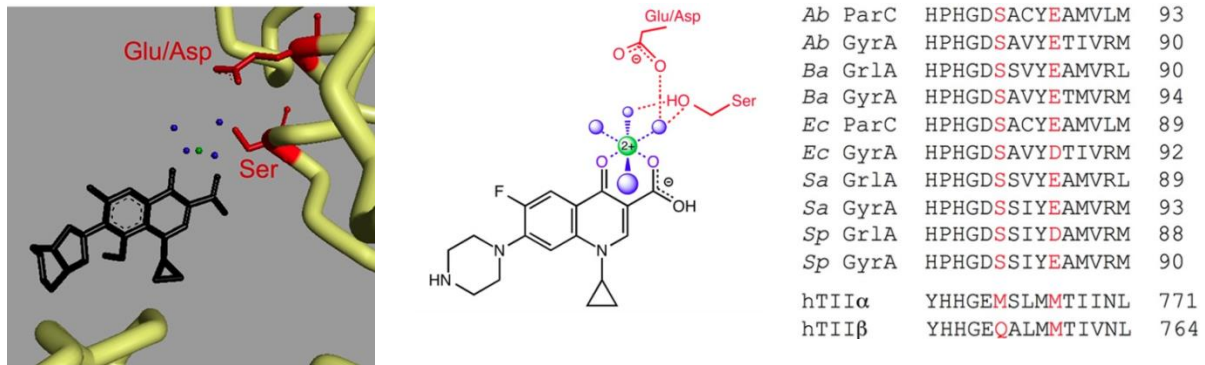


Abbildung 1-13 Bindung Chinolon zu Topoisomerase durch Wasser-Metallionenbrücke

Links: Modell mit Moxifloxacin stabilisierter *Cleavage Komplexes* einer Topoisomerase IV aus *A. baumannii*. Nicht-katalytisches Magnesiumion (grün), dass von den Ketogruppen in C3 und C4 des Chinolons und vier Wasser Molekülen (blau) chelatisiert wird. Magnesiumion verbindet Chinolon mit Enzym [84], [127]. Serin und Glutaminsäure/Asparaginsäure aus ParC oder GyrA (gelb und grün) bilden Wasserstoffbrückenbindungen zum Metallion [84], [127].

Mitte: Vereinfachtes Diagramm der Wasser-Metall Ionenbrücke, nur Interaktionen der Topoisomerase zu Ciprofloxacin sind gezeigt [84], [95].

Rechts: Sequenzvergleich der A Untereinheiten mit Hervorhebung von Serin und der sauren Aminosäure (Asparagin- und Glutaminsäure), die für die Wasser-Metall Ionenbindung wichtig sind. Aus den humanen Topoisomerasen II sind hTIIα und hTIIβ gezeigt, denen die wichtigen Aminosäuren fehlen [84]. Rot: Serin und die sauren Aminosäuren. Erkennbar ist die konservierte Region, die sich nicht in den humanen Topoisomerasen hTIIα und hTIIβ finden. Durch die fehlenden Aminosäuren kann es keine stabilisierten *Cleavage-Komplexe* bei Anwendung mit Fluorchinolonen bei humanen Topoisomerasen IIa geben; Ab: *A. baumannii*, Ba: *Bacillus anthracis*, Ec= *E. coli*, Sa= *Staphylococcus aureus*, Sp= *S. pneumoniae*.

1.6 MHK und MPC

Mit der minimalen Hemmkonzentration (*minimum inhibitory concentration*, MHK) lässt sich eine Aussage über die Potenz eines antimikrobiellen Wirkstoffs gegenüber eines Bakteriums treffen [128]. Von der minimalen Hemmkonzentration ist die MPC (*mutant prevention concentration*) abzugrenzen. Eine Verbindung von MHK zu MPC stellt das MSW (*mutant selection window*) her (Abschnitt 1.6.3).

1.6.1 MHK - Minimale Hemmkonzentration

Zur Bestimmung international vergleichbarer Werte der minimalen Hemmkonzentration (MHK) für eine bestimmte Substanz wird nach den Vorgaben des „National Committee for Clinical Laboratory Standards“ (NCCLS) vorgegangen. Die MHK ist die niedrigste Konzentration eines Antibiotikums, ab der kein Wachstum einer Kultur möglich ist. Es wurden in dieser Arbeit zwei Methoden zur Ermittlung der MHK verwendet: Mikrodilutionsverfahren und Agardilutionsverfahren (Abschnitt 2.2.1.12). Allgemein wird die MHK nur für ein bestimmtes Isolat angegeben [129].

1.6.2 MPC – mutant prevention concentration

Im Gegensatz zur MHK wird bei der MPC ein größeres Inokulum eingesetzt ($\geq 10^9$ KBE/ml), das der Keimzahl nahekommt, die bei Infektionen in Menschen oder Tieren vermutet wird. Die niedrigste Konzentration, die in einer dicht bewachsenen Bakterienkultur zur Wachstumshemmung der unsensibelsten Zelle (resistenten Zelle) führt, wird als MPC bezeichnet. Die MPC wird bei Mikroorganismen ermittelt, die bei der Bestimmung der MHK empfindlich auf die eingesetzte Substanz reagieren. Mit der Ermittlung der MPC und MHK der Substanz ist eine Vorhersage über die Wahrscheinlichkeit zur Ausbildung von Resistenzen möglich, wenn Bakterien in der Klinik der Substanz ausgesetzt sind [128].

1.6.3 MSW – mutant selection window

Mit MSW (*mutant selection window*) wird der Konzentrationsbereich zwischen MHK und MPC bezeichnet. In diesem Konzentrationsbereich kommt es zur Ausbildung von Mutationen, die

resistente Keime hervorbringen. Durch die Minimierung der Zeit in der die (Antibiotika-) Konzentration innerhalb des MSW liegt, lässt sich die Ausbildung von Resistenzen reduzieren. Die Grenzen des *mutant selection window* bilden die MHK und die MPC [128].

1.7 Resistenzmechanismen gegenüber (Fluor-)Chinolonen bei gramnegativen Bakterien

Die Ausbildung von Resistenzen unter bakteriellen Erregern gegenüber der Wirkstoffklasse der Fluorchinolone beschränkt ihren klinischen Einsatz zunehmend. Die Mechanismen der Resistenzentwicklung lassen sich in drei Gruppen einteilen (Abbildung 1-14): Veränderungen der Zielstruktur, Veränderungen der Effluxsysteme (chromosomal oder plasmidbasiert) oder durch die Anwesenheit weiterer Resistenzdeterminanten (plasmidbasiert) [18], [27], [84]. Infolge der Resistenzausbildung kommt es zu zellulären Veränderungen, die mehrere Mechanismen betreffen können. Resistenzmechanismen können akkumulieren und zu Stämmen führen, die hochresistent gegen FQ sind, so dass für eine klinische Resistenz das Zusammenspiel mehrerer Mutationen notwendig ist [15], [81], [84].

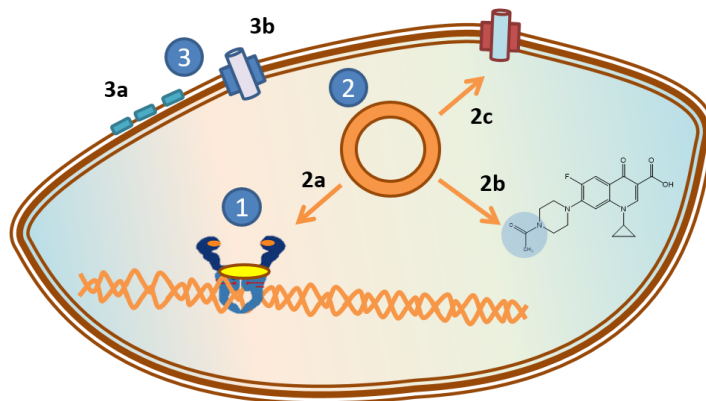


Abbildung 1-14 Resistenzmechanismen gegenüber (Fluor)chinolonen (FQ), modifiziert nach [84]

- (1) FQ-Resistenz durch Zielveränderung**
Mutation in Gyrase und Topoisomerase IV schwächen die Chinolon-Enzym-Interaktion.
- (2) Plasmidbasierte FQ-Resistenz**
(2a) Qnr-Proteine (gelb); **(2b)** Aac(6′)-Ib-cr acetyliert freien Stickstoff am C7-Substituenten bei Ciprofloxacin und Norfloxacin; **(2c)** Plasmidbasierte Effluxpumpen.
- (3) Chromosomal vermittelte FQ-Resistenz**
(3a) Reduzierte Porinexpression; **(3b)** Überexpression chromosomal codierter Effluxpumpen.

1.7.1 FQ Resistenz durch veränderte Zielstrukturen

Durch bestimmte Mutationen innerhalb Gyrase und der Topoisomerase IV wird am häufigsten eine Resistenz gegenüber FQ vermittelt [27], [84]. Eine Mutation dieser Typ II Topoisomerasen kann die Resistenz um den Faktor zehn steigern, bezogen auf die MHK von Fluorchinolonen für *E. coli*. Für die Ausbildung einer Hochresistenz (10 bis 100 fache Resistenzsteigerung) sind Mutationen in beiden Topoisomerasen notwendig [84], [106], [109], [130]. Gegenstand aktueller Diskussion ist die Frage, ob die primäre Zielstruktur bei gramnegativen Bakterien die Gyrase und bei grampositiven die Topoisomerase IV ist [84], [113], [114].

In Gegenwart von Fluorchinolonen treten Punktmutationen im Bereich der *quinolone resistance-determining region* (QRDR) auf. Innerhalb der Region zwischen den Codons 51 und 106 tritt eine Punktmutation innerhalb der Untereinheit A der Gyrase auf. Diese Region liegt in räumlicher Nähe zu Tyrosin an Aminosäure-Position (Tyr122), wo das 5'-Phosphatende der DNA im Rahmen des *Cleavage-Vorgangs* kurzzeitig fixiert wird [27], [109], [131]. Für die Gyrase in *E. coli* sind für eine FQ-Resistenz die Aminosäure Ser83 (>90%) und eine saure Aminosäure vier Positionen strangabwärts (Asp87 bei Gyrase in *E. coli*) involviert (Abbildung 1-13 rechts) [84], [132]. Bei *parC* findet sich die QRDR zwischen den Codons 63 und 102. Auch hier ist eine Nähe zu einem Tyrosinrest zu finden (Tyr120) [44], [127], [133]. Häufig sind auch Mutationen bei Ser84 und Glu88 zu finden [127]. Mit einer Mutation in der Nähe des Serin-Rests an Position 83 innerhalb der QRDR von GyrA (oder Ser84 bei ParC) geht die Fähigkeit verloren über Magnesiumionen eine Verbindung zum Fluorchinolon herzustellen [84]. Durch die Mutation des Serin-Restes in den Topoisomerasen wird die katalytische Funktion hingegen nicht eingeschränkt. Bei einer Mutation am sauren Rest an Position 87 (Asparaginsäure) kann die katalytische Funktion abnehmen. Die MHK von FQ wird bei einer Punktmutation am Codon für Ser83 höher als eine Punktmutation im Codon für Asp87 [27], [84], [95], [134], [135]. Für GyrB und ParE finden sich auch spezifische Domänen, die eine Chinolonresistenz verursachen können. Jedoch sind dort die Mutationen in klinischen Isolaten seltener anzutreffen als Mutationen in GyrA oder ParC [44].

Folglich scheinen die oben genannten Mutationen innerhalb der QRDR bei GyrA/ParC und GyrB/ParE die Affinität von Fluorchinolonen zum Enzym-DNA-Komplex zu senken. Dadurch werden weniger *Cleavage-Komplexe* durch Fluorchinolone stabilisiert und die Gyrase, bzw. Topoisomerase IV wird weniger empfindlich auf Fluorchinolone [44].

1.7.2 Chromosomal vermittelte FQ-Resistenz

Durch zwei entgegengesetzt arbeitende Prozesse kann in der Bakterienzelle die Konzentration an Antibiotika reguliert werden. Durch Diffusionsprozesse an der Zellmembran können FQ aufgenommen und durch aktiven Transport über Effluxpumpen wieder entfernt werden (Abschnitt 1.2). Bei gramnegativen Spezies stellt die zusätzliche äußere Membran eine weitere Barriere für den Influx dar. Durch wassergefüllte Proteinkanäle, die als Porine bezeichnet werden, wird bei gramnegativen Bakterien ein Influx an der äußeren Membran möglich [84], [122], [136]. OmpF, ein weit verbreitetes Porin bei gramnegativen Bakterien, ist im Zusammenhang mit Fluorchinolon-Resistenz bei *E. coli* wichtig, da hierüber primär Fluorchinolone in die Zelle eintreten. Daneben finden sich in *E. coli* die unspezifischen Porine OmpC und PhoE [137]–[141].

Neben plasmidcodierten Effluxpumpen (Abschnitt 1.7.3.2) kann eine gesteigerte Expression chromosomal-codierter Effluxpumpen zu einer FQ-Resistenz führen (Abbildung 1-14). Ursache hierfür ist meist eine Mutation in Regulatorproteinen. Diese Mutation sorgt insgesamt für Veränderungen in Influx und Efflux und führt somit zur einer Ausprägung einer geringen Resistenz [84], [136], [142]–[144]. Als Zwitterion ist bei Fluorchinolonen zu erwarten, dass diese die äußere Membran über die Porine OmpF und OmpC passieren, tatsächlich führt eine Erniedrigung der Porinexpression bedingt durch Mutationen in Regulatorgenen zur Ausprägung einer Resistenz [145]. Durch Mutationen innerhalb des *mar*-Regulons (*multiple antibiotic resistance*, Abbildung 1-15) können in *E. coli* Influx und Efflux beeinflusst werden [15], [27], [110], [131], [144]. Das *marCRAB*-Operon besitzt die Operatorsequenz *marO*, einen Repressor MarR und einen Transkriptionsaktivator MarA. Die Funktion von MarB ist noch nicht eindeutig geklärt. Eine Mutation in MarR bedingt einen Wegfall der Kontrolle über die *marA* Expression. Als globaler Regulator beeinflusst MarA die Expression verschiedener Gene (ca. 60 Gene), die letztendlich an der Ausprägung eines Resistenzphänotyps beteiligt sind. Ein Mar-Phänotyp zeigt nicht nur Resistenz gegenüber Fluorchinolonen [18], [27], [145], [146].

In *E. coli* sind neben MarA noch die Homologe Rob und SoxS bekannt. Wie MarA binden Rob und SoxS an spezifische Motive der *mar*-Box. Rob und SoxS besitzen homologe Aminosäuresequenzen zu MarA. SoxS ist als Bestandteil des *soxRS*-Regulons bei der Zellantwort auf oxidativen Stress beteiligt. In Abbildung 1-15 ist schematisch die durch MarA, SoxS und Rob beeinflusste Expression von *acrAB* und *tolC* dargestellt. Bei *E. coli*-Stämmen mit

einer klinisch relevanten Fluorchinolon-Resistenz finden sich neben Targetmutationen zusätzlich Mutationen, die einen Mar-Phänotyp hervorrufen [44], [110], [147]. AcrAB ist eine MDR-Effluxpumpe des RND-Typs (*resistance-nodulation-division*) und die Gene sind im *acr*-Operon zusammen mit *acrR* und *acrO* organisiert (Abschnitt 1.2). Neben der Expression von *acrAB* und *tolC* nimmt MarA auch Einfluss auf die *micF* Expression. *micF* codiert für eine *antisense-RNA* in *E. coli*. Nach Translation der 93 nt großen *antisense-RNA* wird diese nicht weiter translatiert und bindet komplementär zum 5'-Ende des *ompF*-Transkripts. Die *ompF* Expression wird dereprimiert und es steht weniger OmpF zum Einbau in die äußere Zellmembran zur Verfügung [27], [140], [148].

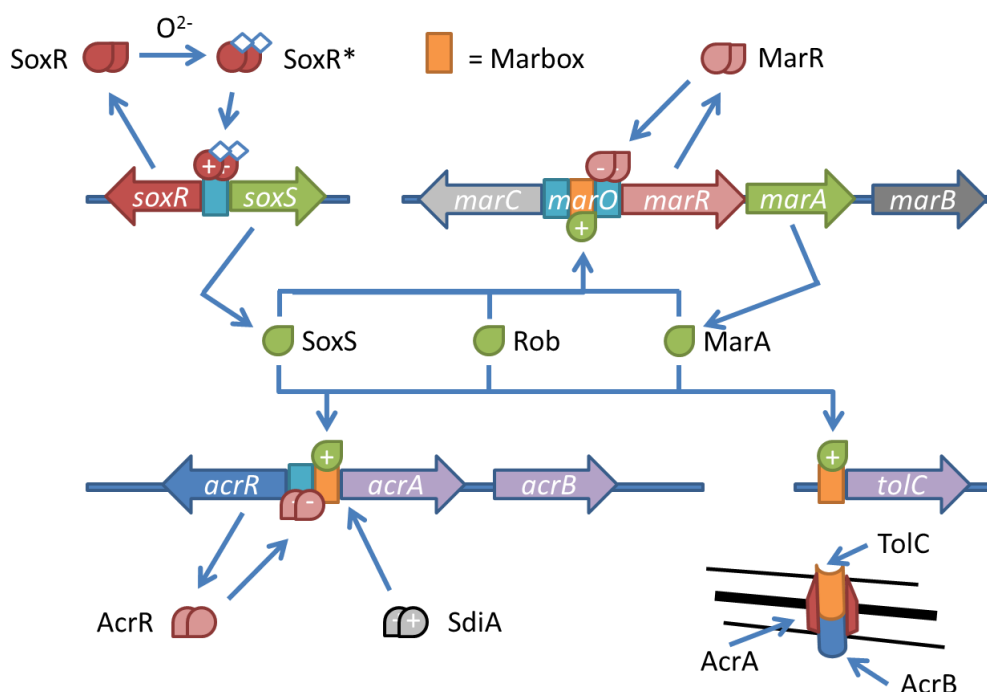


Abbildung 1-15 Schematische Darstellung der bekannten Regulationsmechanismen zur Expression von *acrAB* und *tolC* in *E. coli*, modifiziert nach [147]

1.7.3 Plasmidbasierte FQ-Resistenz

Bis in die späten 1990er war bei der Behandlung mit Fluorchinolonen davon auszugehen, dass Resistenzen nur seltene Ereignisse darstellen und nicht mit plasmidbasierten Resistenzen als Antwort auf die synthetisch hergestellten Fluorchinolon-Antibiotika zu rechnen war. In den letzten 15 Jahren wurde zunehmend von plasmidbasierter FQ-Resistenz (*plasmid-mediated*

quinolone resistance, PMQR) berichtet [143]. Derzeit sind mindestens drei Resistenzmechanismen bekannt: Enzymatische Modifikation von Fluorchinolonen, plasmidcodierte Effluxsysteme und Topoisomerase-Schutzproteine. Das erste Mal wurde von PMQR berichtet, als bei einem Porin-defizienten *K. pneumoniae*-Stamm nach Transformation mit dem Betalactam-Resistenz vermittelnden Plasmid pMG252 eine erhöhte MHK von Ciprofloxacin gemessen wurde [142]. Später wurde das für die MHK-Zunahme verantwortliche Gen als *qnrA1* bezeichnet, nachdem weitere Allele gefunden wurden. Eine weitere PMQR wurde bei Untersuchungen von *qnrA*-Plasmiden gefunden als bei Isolaten aus China es 2006 zur Entdeckung einer speziellen Aminoglykosid Acetyltransferase AAC(6′)-Ib-cr kam [149]. Als dritter Mechanismus wurden 2007 die plasmidbasierten Effluxpumpen QepA und OqxAB gefunden [44], [150], [151].

1.7.3.1 Enzymatische Modifikation von Fluorchinolonen

Die Aminoglykosid Acetyltransferase-Variante AAC(6′)-Ib-cr kann bifunktional neben Aminoglykosiden auch Fluorchinolone acetylieren, sofern sie eine Aminogruppe aufweisen. Bei Ciprofloxacin und Norfloxacin liegt im C7-Piperazinrest ein sekundäres Amin vor [18], [149], [152].

1.7.3.2 Plasmidcodierte Effluxsysteme

Die plasmidbasierte Effluxpumpe QepA gehört zur Major-Facilitator-Superfamilie (*major facilitator superfamily*, MFS) und senkt die Empfindlichkeit für hydrophile Fluorchinolone, besonders für Ciprofloxacin und Norfloxacin. Bisher sind zwei Varianten identifiziert, QepA1 und QepA2, welche bei bakteriellen Infektionen im Menschen gefunden wurden [84], [136], [151]. OqxAB ist eine Effluxpumpe der RND-Familie (*resistance-nodulation-cell division superfamily*) und wurde in einem mobilen Olaquinox-Resistenz-Plasmid entdeckt [44], [153], [154].

1.7.3.3 Topoisomerase-Schutzproteine - Qnr

Qnr-Gene codieren für Topoisomerase-Schutzproteine, die zur *pentapeptide-repeat Protein-familie* (PRP) gehören, und ungefähr aus 200 Aminosäuren bestehen [44], [84], [136]. Diese Proteine schützen die DNA Gyrase und Topoisomerase IV vor dem Zugriff durch Fluorchinolone. Ungefähr 100 Qnr-Varianten sind mittlerweile bekannt und werden in mindestens zehn verschiedene Unterfamilien (*qnrA*, *qnrB*, *qnrC*, *qnrD*, *qnrS*, *qnrAS*, *qnrSM*, *qnrVC*, *qnrVP* und

qnrVV) eingeteilt [44], [142], [155]–[161]. Anhand von Untersuchungen des Qnr-Homologs MfpA konnte ein Wirkprinzip für Qnr abgeleitet werden. MfpA liegt als Dimer (C-Terminus mit C-Terminus verknüpft) vor und ahmt mit einer rechtsdrehenden quadrilateralen β -Helix in Größe, Form und Elektrostatik die DNA B-Form nach (*DNA mimicry*) [109], [162], [163]. Ein Pentapeptid nimmt eine Seite der vierseitigen Windung in MfpA ein. Die Ähnlichkeit von QnrA zu MfpA ist in Abbildung 1-15 dargestellt. Wasserstoffbrückenbindungen zu benachbarten Windungen stabilisieren die β -Helix, die mit ihrer Größe in die Gyrase- und Topoisomerase IV-Tasche passt, die das G-Segment der DNA aufnimmt [162].

i^{-2} i^{-1} i i^{+1} i^{+2}	i^{-2} i^{-1} i i^{+1} i^{+2}	i^{-2} i^{-1} i i^{+1} i^{+2}	i^{-2} i^{-1} i i^{+1} i^{+2}		i^{-2} i^{-1} i i^{+1} i^{+2}	i^{-2} i^{-1} i i^{+1} i^{+2}	i^{-2} i^{-1} i i^{+1} i^{+2}	i^{-2} i^{-1} i i^{+1} i^{+2}	
MDIID	KVFQQ	EDFSR	QDLS D	20					
SRFRR	CRFYQ	CDFSH	CQLQD	40	QQWVD	CEFTG	RDFRD	EDLSR	21
AS FED	CSFIE	SGAVEG	CHFSY	61	LH TER	AMFSE	CDFSG	VNLAE	41
ADLRD	ASFKA	CRLSL	ANFSG	81	SQHRG	SAFRN	CTFER	TTLWH	61
ANCFG	IEFRE	CDLKG	ANFSR	101	STFAQ	CSMLG	SVFVA	CRLRP	81
ARFYN	QVSHK	MYFCS	AYISG	121	LTLDD	VDFTL	AVLGG	NDLRG	101
CNLAY	TNLSG	QCLEK	CELFE	141	LNLTG	CRLRE	TSLVD	TDLRK	121
NNWSN	ANLSG	ASLMG	SDLSR	161	CVLRG	ADLSG	ARTTG	ARLDD	141
GTFSR	DCWQQ	VNLRG	CDLTF	181	ADLRG	ATVDP	VLWRT	ASLVG	161
ADLDG	LDPRR	VNLEG	VKICA	201	ARVDV	DQAVA	FAAAH	GLCLA	181
WQQEQ	LLEPL	GVI VL	PD	218					
		QnrA					MfpA		

Abbildung 1-16 Pentapeptid Wiederholungen in QnrA1 und MfpA [164]

Die charakteristische Pentapeptid-Sequenz ist [A/C/S/T/V] [D/N] [L/F] [S/T/R] [G/R] und ist rot markiert. Der konservierte hydrophobe Rest in der Pentapeptidmitte ist mit „i“ benannt. N-terminale Reste zu i werden als i^{-1} und i^{-2} benannt und C-terminale Reste zu i als i^{+1} und i^{+2} .

In Abbildung 1-17 ist ein Modell zu sehen bestehend aus einem T-Segment-nachahmenden PRP (englisch: *pentapeptid-repeat protein*), das an einen Gyrase-DNA-Komplex gebunden ist. AhQnr, bzw. *Loop B*, interagiert mit dem DNA-Gyrase-Komplex. Durch Wechselwirkung an Regionen im Komplex, die auch für ein Fluorchinolon wichtig sind, wird der DNA-Gyrase-Komplex destabilisiert. Als Folge der Destabilisierung wird diskutiert, dass der Komplex auseinanderfällt, und vermutlich wird der Komplex neu gebildet. Fehlt die Schleife (*Loop B*) geht die Wirkung des Qnr verloren [165], [166]. QnrB1 besitzt zwei herausragende Schleifen mit acht und zwölf Aminosäuren (*Loop A* und *Loop B*), die für die Interaktion mit der Gyrase wichtig sind. Fehlt eine dieser Schleifen oder sind Aminosäuren ausgetauscht, wird die Gyrase-schützende Funktion herabgesetzt. In QnrB finden sich noch weitere wichtige Reste in den Pentapeptid-Positionen i und i^{-2} . Wird hier Alanin statt der ursprünglichen Aminosäure eingebaut, geht die

schützende Funktion verloren. Die schützende Funktion geht auch verloren, wenn am N-Terminus mehr als 10 Aminosäuren oder mindestens 3 Aminosäuren an der Dimerisierungsstelle (Abbildung 1-17) am C-Terminus fehlen [44], [166].

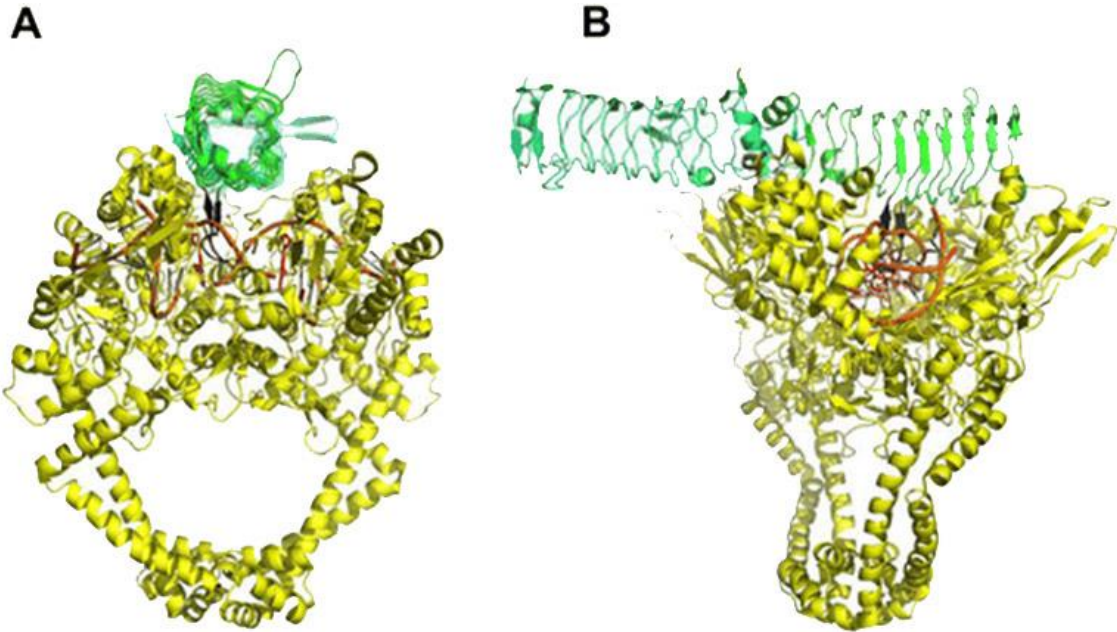


Abbildung 1-17 Mögliches Modell für die Interaktion von PRP (*pentapeptid-repeat protein*) mit protektivem Effekt gegenüber Chinolonen mit Gyrase [165]

Die Kristallstruktur für *S. aureus* DNA-Gyrase (GyrB27-A56, gelb) verbunden mit dem G-Segment der DNA (orange) und zwei Ciprofloxacin-Molekülen (rot). Die Kristallstruktur des PRP besteht aus zwei Untereinheiten (AhQnr-Dimer). Ein Monomer ist grün eingefärbt. Das zweite Monomer in cyan. In (A) ist AhQnr in Längsrichtung orientiert mit der DNA-Gyrase gezeigt. (B) AhQnr ist über dem G-Segment so angeordnet, damit das T-Segment der DNA imitiert werden kann, bevor es in das DNA-gate eintritt. Eine Schleife (*Loop B*, schwarz) ragt in das DNA-gate hinein und befindet sich in der Nähe der Bindungsstelle für Ciprofloxacin.

1.8 Akkumulierung chromosomaler Fluorchinolon-Resistenzmutationen

Angelehnt an den Arbeiten von HEISIG *et al.*, ist in Abbildung 1-18 ein Verlauf einer Resistenzentwicklung bei *E. coli* abgebildet [167]. Ausgehend von einem *E. coli* Wildtyp-Isolat WT (GK571), das aus der Stuhlflora einer mit Antibiotika unbehandelten Patientin gewonnen wurde, ging in den Arbeiten von HEISIG *et al.* (1994) aus einem ersten Selektionsschritt über einen Nalidixinsäure-Forward-Assay die Mutante MI (GK572) mit einer *gyrA*-Punktmutation im Codon 83 (Ser83Leu) hervor. In einem von MI ausgehenden anschließenden zweiten Selektionsschritt mit Ciprofloxacin wurde die Mutante MII (GK573) mit der zusätzlichen Deletion von

175 bp in *marR* selektiert (Abbildung 1-18) [167]. Die Zweitschritt-Mutante MII hat eine MHK von Ciprofloxacin von 2 µg/ml. Dieser Wert liegt oberhalb des Grenzwertes für Ciprofloxacin gemäß EUCAST und daher wird die Mutante MII als klinisch resistent bezeichnet. Mit dieser Mutante wurde ein weiterer Ciprofloxacin-Forward-Assay durchgeführt, der zur Mutante MIII (GK574) führte.

Mit den Selektionsschritten vom *E. coli* Wildtyp zur *E. coli*-Mutante MII in der Arbeit von HEISIG *et al.* (1994) kommt auf jeder Selektionsstufe eine Mutation hinzu. Die Sequenzierungen der Mutante MIII ergaben zwei zusätzliche Mutationen in den Zielstrukturen (*gyrA* Asp87Gly und *parC* Ser80Leu), so dass im Selektionsschritt von MII zu MIII zwei Mutationen gleichzeitig auftraten. In einem weiteren anschließenden Selektionsschritt wurde aus der Mutante MIII die Mutante MIVa selektiert. Die *E. coli*-Mutante MIVa wies keine zusätzlichen Mutationen innerhalb der Zielstrukturen und in *marR* im Vergleich zu MIII auf (nicht in Abbildung 1-18 gezeigt). Im Gegensatz zu MII besitzen die Mutanten MIII und MIVa eine kleinere Deletion von nur 74bp in *marR* [15], [27], [130], [167].

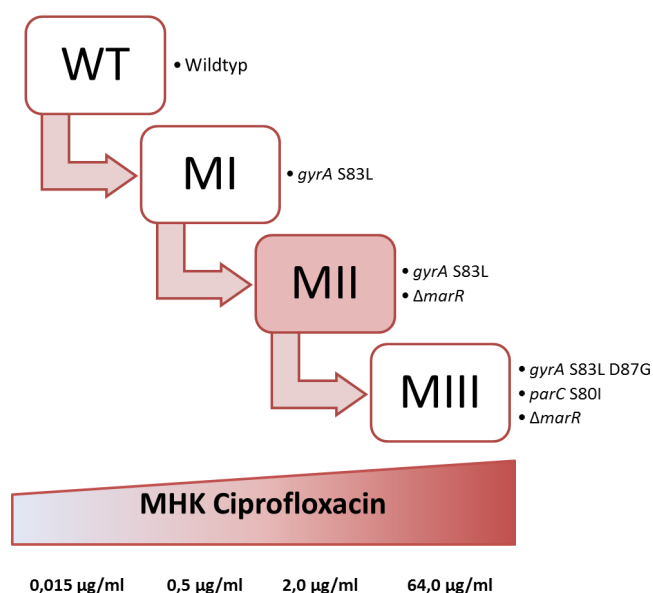


Abbildung 1-18 Akkumulation von Fluorchinolon-Resistenzmutationen am Beispiel der Entstehung von *E. coli* MIII beginnend mit *E. coli* WT, modifiziert nach [27].

1.9 Ausgangspunkt der Fragestellung

Ausgangspunkt für die Fragestellungen dieser Arbeit waren die Befunde an Labormutanten bei HEISIG *et al.* (1994) und klinischen Isolaten bei HEISIG *et al.* (1996) [81], [167], [168]. Aus den Ergebnissen dieser Arbeiten wurde abgeleitet, dass für die Ausprägung einer hochgradigen Fluorchinolon-Resistenz bei hochempfindlichen Spezies wie *Escherichia coli* eine Doppelmutation in der primären Zielstruktur Gyrase (GyrA) und mindestens eine Mutation in der sekundären Zielstruktur Topoisomerase IV (ParC) vorliegen musste [167], [168]. Der Selektionsschritt von der Mutante MII zu MIII war auffällig (vergleiche Abschnitt 1.8), da es bei diesem Schritt in einem einzigen Selektionsereignis zur gleichzeitigen Ausbildung von zwei Mutationen in GyrA und in ParC kam (Abschnitt 0) [168]. Dieser Schritt konnte im Rahmen vorangegangener Arbeiten mit einem analogen Vorgehen zu HEISIG *et al.* (1994) nicht wiederholt werden und stellt die Herausforderung für diese Arbeit dar [27], [167].

Der Selektionsschritt von der *E. coli* Mutante MIII hin zur Mutante MIVa ohne das Auftreten einer zusätzlichen neuen Mutation war Grundlage der ersten Fragestellung dieser Arbeit: Die Mutanten MIII und MIVa beherbergen die gleichen Mutationen in der QRDR von *gyrA* (S83L, D87G) und *parC* (S80I), und die gleiche *marR*-Deletion ($\Delta marR$ 74 bp) [167]. Für MIII beträgt die MHK von Ciprofloxacin 64 $\mu\text{g/ml}$. Für MIVa beträgt die MHK von Ciprofloxacin 128 $\mu\text{g/ml}$ [167]. Trotz gleicher Mutations-Akkumulation, unterscheidet sich die MHK von Ciprofloxacin um eine Stufe.

Ausgangspunkt der zweiten Fragestellung war der Selektionsschritt von der *E. coli* Mutante MII zur *E. coli* Mutante MIII. Die gleichzeitig auftretenden Mutationen bei diesem Selektionsschritt sind ungewöhnlich, weil die Mutationsrate bei *E. coli*-Stämmen für eine einzelne Mutation bei 10^{-5} bis 10^{-8} liegt und für die zwei gleichzeitigen Mutationen ergibt sich somit eine akkumulierte Mutationsrate von 10^{-10} bis 10^{-16} . Diese hohe Mutationsrate kann durch die fehlerhafte DNA-Reparatur der SOS-Antwort erklärt werden [15], [84], [169]. In der Literatur finden sich Hinweise, dass bei *E. coli*-Selektionsexperimenten, die als Endpunkt eine Ciprofloxacin-Resistenz (MHK > 4 $\mu\text{g/ml}$) vorsehen, unter Anwesenheit von bestimmten Faktoren, wie beispielsweise dem Gyraseschutzprotein QnrA1, die Ausbildung spontaner Mutationen 100 mal höher ausfällt [152, 158, 214, 292, 293].

1.10 Ziel der Arbeit

1.10.1 Einfluss von Quorum Sensing auf die Ausbildung einer Fluorchinolon-Resistenz

Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit soll der Einfluss des LuxR-Homologs SdiA in den *in vitro* selektierten Mutanten *E. coli* MIII (GK574) und *E. coli* MIVa (GK575) untersucht werden.

Für MIII und MIVa waren bereits die gleichen Mutationen *gyrA* Asp87Gly und *parC* Ser80Leu identifiziert worden, welche innerhalb der QRDR (*quinolone resistance-determining region*) liegen. Auch wurde die gleiche Deletion im Regulatorgen *marR* ($\Delta marR$ 74 bp) identifiziert, die zu einer Überexpression von *acrAB* und *tolC* führt. Jedoch fällt trotz identischer Mutationen die Expression der AcrA-Untereinheit der AcrAB-TolC-Effluxpumpe bei MIVa im Vergleich zu MIII höher aus, und die minimale Hemmkonzentration (MHK) des FQ-Antibiotikums Ciprofloxacin ist für MIVa um eine MHK-Stufe erhöht.

Im Rahmen der Zell-Zell-Kommunikation (englisch: *quorum-sensing*) in *E. coli*-Stämmen wurde für SdiA (*suppressor of cell division inhibitor*) ein Einfluss auf die Zellteilung und Ausdifferenzierung gezeigt, der konzentrationsabhängig auf äußere Faktoren ist (Abschnitt 1.3) [65], [66]. Viele Bakterienspezies verwenden N-Acyl-Homoserin-Lactone (AHL), um diese an Transkriptionsfaktoren zu binden, die schließlich zu einer Aktivierung oder Repression von Genen führen. *E. coli* kann nicht AHL selbst synthetisieren, besitzt jedoch AHL-Rezeptoren, wie das LuxR-Homolog SdiA [65]. SdiA ist imstande AHL, welche durch andere Mikroorganismen produziert wurden, zu binden und daraufhin die Transkription im nicht-AHL-produzierenden *E. coli* zu beeinflussen. Dieses Phänomen wird als *Eavesdropping* („Abhören“, „Lauschen“) bezeichnet und erklärt das Verhalten von Mikroorganismen, die ihr Verhalten beeinflussen, um auf nicht-selbst-produzierte Signale zu reagieren [67]. Als Beispiele hierfür konnte eine Überexpression von *acrAB* bei TAVÍO *et al.* (2010) und RAHMATI *et al.* (2002), eine verstärkte Biofilmbildung bei SUZUKI *et al.* (2002) oder eine erhöhte Beständigkeit gegenüber Säuren bei VAN HOUTD *et al.* (2006) gezeigt werden [68]–[71].

RAHMATI *et al.* (2002) finden bei Überexpression von *sdiA* eine Aufregulation der AcrAB-TolC-Effluxpumpe, die bei einer Fluorchinolon-Resistenz eine wesentliche Rolle einnimmt. Bei TAVÍO

et al. (2010) finden sich Ergebnisse zu klinischen Isolaten, die unter den Antibiotika Lomefloxacin (Fluorchinolone) und Ceftazidim (Cephalosporin) aufgezogen wurden. Spontane Mutanten zeigten eine deutliche *marA*- und *sdiA*-Überexpression im Vergleich zu den Ausgangsstämmen. Mit der *marA*- und *sdiA*-Überexpression ging die Überexpression bei *acrB* einher. Da *acrA* und *acrB* den gleichen Leserahmen besitzen, ist auch von einer Überexpression von *acrA* auszugehen [68], [69].

SdiA nimmt eine zentrale Rolle in der Regulation der Genexpression ein, so dass es Ziel im ersten Teil dieser Arbeit ist den Zusammenhang von SdiA und einer Multi-Drug-Resistance, bzw. Fluorchinolone-Resistenz, zu untersuchen und damit den Resistenz-Unterschied zwischen den *E. coli*-Mutanten MIVa und MIII zu erklären.

1.10.2 Einfluss von plasmidkodierten und chromosomalen Resistenzmechanismen auf die Aktivität von Ciprofloxacin in isogenen *Escherichia coli* Isolaten

Der Vorsatz im zweiten Teil dieser Arbeit liegt darin, den Einfluss der Topoisomerase-Schutzproteine QnrA1 und QnrB1 auf die Entwicklung einer FQ-Hochresistenz (oberhalb Grenzwerte gemäß EUCAST 2016) zu untersuchen.

Qnr gehören zu den plasmidkodierten Fluorchinolone-Resistenz-Mechanismen (PMQR, Abschnitt 1.7.3.3) und die Anwesenheit von Qnr allein bewirkt in *E. coli* noch keine Ausprägung einer FQ-Hochresistenz. Dennoch werden zunehmend bei hoch FQ-resistenten Isolaten Plasmid-codierte *qnr*-Gene detektiert. Dieser Einfluss soll in dieser Arbeit anhand von Selektionsexperimenten mit Qnr-transformierten *E. coli*-Stämmen untersucht werden. Für die Untersuchungen wird die *in vitro* selektierte, intermediäre Mutante *E. coli* MII (GK573) vorrangig als Ausgangsstamm verwendet. Diese Mutante trägt die bei *E. coli* häufigste *gyrA* Mutation (*gyrA* Ser83Leu) sowie eine *marR*-Deletionsmutation ($\Delta marR$ 175 bp). Zugleich soll auch die Art von Mutationen charakterisiert werden, die unter diesen Bedingungen in den selektierten Mutanten auftreten.

Im Zusammenhang mit PMQR wird eine Zunahme von resistenten Mutanten bei Selektionsdruck durch FQ diskutiert. Bei *E. coli*-Stamm J53 mit pMG252 (ein *qnrA1* enthaltendes natürliches Plasmid) stellt eine Ciprofloxacin-Konzentration von 1 µg/ml eine

Barriere für die Selektion von resistenten Mutanten dar. In Selektionsversuchen mit Fluorchinolon-Antibiotika mit *E. coli*-J53 und pMG252 wurden kaum Mutanten mit einer Mutation in *gyrA* oder *parC* selektiert, obwohl eine Förderung der Resistenzausbildung durch Qnr erwartet wurde. Diese erwarteten Mutationen sollten im Bereich der QRDR liegen [173]. Die Kombination mehrerer QRDR-Mutationen verbunden mit dem Ausfall des Repressors MarR (Abschnitt 1.7.2) führt zur Ausprägung einer hochgradigen Fluorchinolon-Resistenz und Überschreiten des Grenzwertes $> 4 \mu\text{g/ml}$ der MHK von Ciprofloxacin (oberhalb Grenzwerte gemäß EUCAST 2016). Die Ausbildung einer Mutation findet im Durchschnitt bei *E. coli* mit einer Mutationsfrequenz von 10^{-8} statt. Zum Erreichen einer klinisch relevanten Fluorchinolon-Resistenz ist eine akkumulierte Mutationsfrequenz zwischen 10^{-32} und 10^{-40} Voraussetzung, was als seltenes Ereignis eingeordnet werden kann.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien

Tabelle 2-1 Liste verwendeter Geräte und Verbrauchsmaterialien

Geräte / Verbrauchsmaterialien	Hersteller
Autoklav, Systec 3870 ELV	Systec GmbH, Münster, Deutschland
Autoklav, Systec Media prep®	Systec GmbH, Münster, Deutschland
Autoklav, Systec VX-95	Systec GmbH, Münster, Deutschland
Brutschrank, B12 Function line	Heraeus Holding GmbH, Hanau / Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich, Deutschland
Brutschrank, T6120	Heraeus Holding GmbH, Hanau / Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich, Deutschland
Brutschrank, B20 Function line	Heraeus Holding GmbH, Hanau / Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich, Deutschland
Brutschrank, B20 4 Function line	Heraeus Holding GmbH, Hanau / Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich, Deutschland
Einmalküvetten, 10 mm	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Einmalspritzen, Omnifix, 10 mL 5 mL	(VWR) Merck KGaA, Darmstadt; Deutschland
Einmalspritzen, 5 ml, 10 ml	B. Braun Biotech International GmbH, Melsungen, Deutschland
Elektroporationsgerät, GenePulser II und Pulse Controller II	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Elektroporationsküvetten, 2mm Electroporation Cuvette	Eurogentec Deutschland GmbH, Köln, Deutschland
Erlenmeyerkolben (V= 250 ml, 500 ml)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Feinwaage, Sartorius LA120S	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
Fluorometer, Qubit® II	Invitrogen / Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich, Deutschland
Fluorometer Assay Röhrchen, Qubit® Assay Tubes	Invitrogen / Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich, Deutschland
Gelelektrophoresekammer 100 ml, ComPhor Midi	Bioplastics BV, Landgraaf, Niederlande
Gelelektrophoresekammer 400 ml, ComPhor Mini	Bioplastics BV, Landgraaf, Niederlande
Gelelektrophoresekammer 50 ml, ComPhor Mt Maxi	Bioplastics BV, Landgraaf, Niederlande
Gelelektrophoresekammer, Peqlab ExW Revolution	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
Gelelektrophoresegerät, Bioanalyser 2100	Agilent Technologies, Santa Clara, Kalifornien, USA
Glasflaschen (V= 100 ml bis 1000 ml)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Glasperlen	Bastelbedarf, farbecht, Hamburg, Deutschland
Glasstäbe (steril)	Glasbläserei Universität Hamburg, Deutschland

Material und Methoden

Heizschrank, Tv29u	Memmert GmbH + Co. KG., Schwabach, Deutschland
Impföse	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Kryoröhrchen, Cryo Pure	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, Deutschland
Luminometer, Lucy 2	Anthos Labtec Instruments GmbH, Wals/Salzburg, Österreich
Magnetrührer MR3001	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach, Deutschland
Magnetrührer RCT basic IKAMAG® safety control	IKA®-Werke GmbH & CO. KG, Staufen, Deutschland
Microamp Fast 96 Well Reaction Plate	Applied Biosystems / Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich, Deutschland
Micronaut-Fertigplatten	Merlin Diagnostik, Bornheim-Hersel, Deutschland
Mikrotiterplatten, 96 well, U-Form	VWR Laborbedarf, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Mikrotiterplatten, Luminometer, MicroFOUR™	Dynatec Chantilly, USA
Mikrotiterplatten, Pyrosequencing™-Platten	Biotage AB, Uppsala, Schweden
Mikrowelle, CB1253	C. Bomann GmbH, Kempen, Deutschland
Multistep-Pipette, Labopette electronic 50-1000 µL, automatische Pipettierhilfe, 1-Kanal	Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG, Eberstadt, Deutschland
Multistep-Pipette, Labopette elektronik 50-1200 µL, automatische Pipettierhilfe, 8-Kanal	Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG, Eberstadt, Deutschland
Multistep-Pipette, Transferpette®-8, 5-50 µl, Pipettierhilfe, 8-Kanal	Brand GmbH + Co. KG, Wertheim, Deutschland
Nylonmembran, Nytran®, SPC, 0,45	Whatman®, über Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Parafilm „M“	über Peske GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Petrischalen, Petrischalen mit Nocken 92x16 mm	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, Deutschland
pH-Meter, inolab pH Lebel 1 + Elektrode	inolab Wissenschaftlich-Technische Werkstätten GmbH (WTW), Weilheim, Deutschland
Photometer, Varian Cary 50 Bio Spectrophotometer	Varian Inc. / Agilent Technologies, Santa Clara, USA
Photometer, Varian Cary 100 Spectrophotometer	Varian Inc. / Agilent Technologies, Santa Clara, USA
Photometriküvetten, Einmal-Küvetten	Brandt GmbH & Co KG, Wertheim, Deutschland
Pipette LabMate	Kinesis GmbH (ehemals Abimed GmbH), Langenfeld, Deutschland
Pipette, Pipetman® P10	Gilson Inc., Middleton, USA
Pipette, Pipetman® P100	Gilson Inc., Middleton, USA
Pipette, Pipetman® P1000	Gilson Inc., Middleton, USA
Pipette, Pipetman® P2	Gilson Inc., Middleton, USA
Pipettenspitzen, 10 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl, 5 ml	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, Deutschland
Pipettenspitzen Biosphere	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, Deutschland
Probenröhrchen + Schraubverschlüsse, CryoPure Tubes	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, Deutschland

Probenröhrchen 0,2 ml, Multiply® -Pro	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, Deutschland
Probenröhrchen 0,5 ml, Multiply® -Pro	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, Deutschland
Probenröhrchen 1,5 mL SafeSeal Micro Tubes	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, Deutschland
Probenröhrchen 15 mL	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, Deutschland
Probenröhrchen 2 mL SafeSeal Micro Tubes	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, Deutschland
Probenröhrchen 50 mL	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, Deutschland
Pulse Controller II	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Pyrosequenzierer, PSQ MA96	Biotage AB, Uppsala, Schweden
Reinstwasseranlage, Milli-Q RiOs™ 5	Millipore GmbH, Schwalbach, Deutschland
Reinstwasseranlage, Milli-Q Synthesis	Millipore GmbH, Schwalbach, Deutschland
Schüttelinkubator, Certomat® H	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Schüttelinkubator, C25 Incubator Shaker Classic Series	Eppendorf Vertrieb Deutschland GmbH, New Brunswick Scientific Produkte, Wesselin-Berzdorf, Deutschland
Sequenzierautomat, GenomeLab™ GeXP	Beckman Coulter GmbH, Krefeld, Deutschland
Sequenzierautomat, Ion Personal Genome Machine (PGM) System	Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich, Deutschland
Sequenzierchip, Ion 316/Ion 318™ Chip	Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich, Deutschland
Sequenzierzubereitung, Ion OneTouch™ ES	Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich, Deutschland
Sicherheitswerkbank, Heraguard®	Heraeus Holding GmbH, Hanau, Deutschland
Sicherheitswerkbank, Herasafe®	Heraeus Holding GmbH, Hanau, Deutschland
Spannungsgeber, Consort E122	Biozym Diagnostik GmbH, Hessisch Oldendorf, Deutschland
Spannungsgeber, Consort E 143	Biozym Diagnostik GmbH, Hessisch Oldendorf, Deutschland
Spannungsgeber, PowerPac1000	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Spannungsgeber, PS304 Power Supply	Biometra GmbH, Göttingen, Deutschland
Spectrophotometer, NanoDrop™ ND-1000	ThermoFisher Scientific, NanoDrop™ products, Wilmington, USA
Spectrophotometer, NanoDrop™ 2000	ThermoFisher Scientific, NanoDrop™ products, Wilmington, USA
Sterilfilter, Minisart 0,2 µg, 26 mm	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
Sterilwerkbank, Herasafe®	Heraeus Holding GmbH, Hanau / Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich, Deutschland
Thermocycler, Biometra T Gradient	Analytik Jena AG (Biometra), Jena, Deutschland
Thermocycler, Biometra T personal	Analytik Jena AG (Biometra), Jena, Deutschland
Thermocycler, Biometra T3	Analytik Jena AG (Biometra), Jena, Deutschland
Tischzentrifuge, GMC-060 Mini Centrifuge	Laboratory & Medical Supplies, Tokyo, Japan
Tischzentrifuge, MC 6 Centrifuge	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, Deutschland
Tischzentrifuge, Sprout™	Heathrow Scientific LLC, Nottingham, UK
Tischzentrifuge, C1301B-230V	Labnet International, Inc., Edison, USA
Tischzentrifuge, Spectrafuge Mini C1301T-230V	Labnet International, Inc., Edison, USA
Ultraschallbad Merck Eurolab N.V. USR 18	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Ultraschallstab mit Sonotrode, Sonopuls	BANDELIN electronic GmbH & Co KG, Berlin, Deutschland

Material und Methoden

Ultraschallscherer, Bioruptor® UCD-600 NGS Sonication System	Diagenode s.a. Belgium Europe, Seraing, Belgien
Vakuum Prep Workstation	Biotage AB, Uppsala, Schweden
Verschlussfolie für RT-PCR	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, Deutschland
Videodokumentationsanlage, BioDoc Analyze Ti5	Biometra GmbH, Göttingen, Deutschland
Videodokumentationsanlage, Biovision 1500/3M	Vilber Lourmat Deutschland GmbH, Eberhardzell, Deutschland
ViiA™7 qRT-PCR	Invitrogen / Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich, Deutschland
Vortexer, Vortex-Genie 2	Scientific Industries Inc. Bohemia, USA
Waage, Mettler AC100	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Waage, Kern PLJ 2100-2M	Kern & Sohn GmbH, Balingen-Frommern, Deutschland
Waage, Sartorius LA120S	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
Wasserbad, Julabo MWB	Julabo Labortechnik GmbH, Seelbach, Deutschland
Wasserbad Julabo Shake Temp SW 22	Julabo Labortechnik GmbH, Seelbach, Deutschland
Whatman® Papier, Gel Blot Paper, GB003	Whatman®, über Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Zentrifuge, Biofuge stratos/ fresco/ pico	Heraeus Holding GmbH, Hanau / Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich, Deutschland
Zentrifuge, Microfuge® 16	Beckman-Coulter GmbH, Krefeld, Deutschland
Zentrifuge, Minifuge T	Heraeus Holding GmbH, Hanau / Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich, Deutschland
Zentrifuge, Pico 11 Centrifuge	Heraeus Holding GmbH, Hanau / Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich, Deutschland
Zentrifuge, Pico 17 Centrifuge	Heraeus Holding GmbH, Hanau / Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich, Deutschland
Zentrifuge, Pico 21 Centrifuge	Heraeus Holding GmbH, Hanau / Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich, Deutschland
Zentrifuge, Scanspeed 1524M	LaboGene ApS, Lynge, Dänemark / LMS Consult GmbH & Co. KG, Ginsheim-Gustavsburg, Deutschland

2.1.2 Kits

Teilweise wurden einzelne Bestandteile aus Kits verwendet. Die Durchführung erfolgte gemäß Herstellerangaben (siehe jeweilige Handbücher). Weitere Informationen finden sich in Abschnitt 2.2.

Tabelle 2-2 Liste verwendete Kits

Name	Hersteller
PCR DIG Probe Synthesis Kit Cat No. 11 636 090 910	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
DIG DNA Labeling and Detection Kit	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
Agilent DNA 100 0Kit	Agilent Technologies, Santa Clara, USA
Agilent DNA 1000 Reagents	Agilent Technologies, Santa Clara, USA
Agilent DNA 7500 Kit	Agilent Technologies, Santa Clara, USA
Agilent DNA 750 Reagents	Agilent Technologies, Santa Clara, USA
Epicentre MasterPure Complete DNA and RNA Purification Kit	Epicentre (Illumina Company), Vertrieb durch Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, Deutschland
Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit for RT-qPCR	Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich, Deutschland
NucleoSpin® Extract II	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren, Deutschland
NucleoSpin® RNA Extract II	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren, Deutschland
DNeasy® Blood & Tissue Kit	QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland
Luciferase Assay System (Luciferase Assay Substrate, Luciferase Assay Puffer)	Promega Corporation, Madison, USA
Qiagen Plasmid Midi Kit	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
Qubit® dsDNA BR Assay Kit	Invitrogen / Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich, Deutschland
Qubit® RNA HS Assay Kit	Invitrogen / Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich, Deutschland
GenomeLab DTCS Quickstart Kit	Beckman-Coulter GmbH, Krefeld, Deutschland
Maxima® SYBR Green qPCR Mastermix, Rox provided	Fermentas / Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich, Deutschland
Maxima Reverse Transcriptase	Fermentas / Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich, Deutschland
Hi Yield® Plasmid Mini DNA-Kit	Süd-Laborbedarf GmbH, Gauting, Deutschland
Ion OneTouch™ 200 Template Kit v2 DL	Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich, Deutschland
NEBNext® Fast DNA Library Prep Set for Ion Torrent	New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main, Deutschland

2.1.3 Software

Tabelle 2-3 Liste verwendete Software

Name der Software	Hersteller
Torrent Variant Caller	Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich, Deutschland
Biodoc Analyze Ti5 Software	Biometra GmbH, Göttingen, Deutschland
Microsoft Office 2010	Microsoft Corporation, Redmond, USA
Adobe Acrobat	Adobe Systems Inc., San Jose, USA
Assay Design Software 1.0	Biotage AB, Uppsala, Schweden
Microsoft Windows 7	Microsoft Corporation, Redmond, USA
Nanodrop® ND-1000 V3.5.2	Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich, Deutschland
Varian Cary Win UV series	Varian Inc. / Agilent Technologies, Santa Clara, USA
Vector NTI Advance™ 11	Invitrogen / Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich, Deutschland
Zotero V4.0.28.3	George Mason University, Fairfax, USA
Office 2010	Microsoft Corporation, Redmond, USA
Agilent Bioanalyzer 2100 Software	Agilent Technologies, Santa Clara, USA
SnapGene	GSL Biotech LLC, Chicago, USA
Primerfox	Stephan Fuchs; Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald, Deutschland
Integrative Genomics Viewer	Broad Institute, Cambridge, USA

2.1.4 Puffer und Lösungen

Zusätzlich finden sich direkt im Abschnitt 2.2 weitere Puffer und Lösungen mitsamt Zusammensetzung und einer Herstellungsanweisung.

Tabelle 2-4 Liste der verwendeten Puffer und Lösungen

Eigenherst.: Eigenherstellung; mod. n.: modifiziert nach

Bezeichnung	Zusammensetzung / Herstellung	Bezugsquelle/ Literaturstelle
Ammonium-persulfat-Lösung	400 mg Ammonium-persulfat in 1 ml demineralisiertem Wasser lösen	Eigenherst.
1 x Annealing Buffer pH 7,6	2,42 g Tris(hydroxymethyl)-aminomethan und 0,43 g Magnesiumacetat-tetrahydrat in 900 ml demineralisiertem Wasser lösen, mit Eisessig pH auf 7,6 einstellen und mit demineralisiertem Wasser auf 1000 ml auffüllen	Eigenherst.
Beschwerer-lösung (DNA), (5x)	0,25 % Bromphenolblau, 0,25 % Xylencyanol, 20 % Ficoll-400	Eigenherst.
Beschwererlösung (RNA), (5x)	0,25 % Bromphenolblau, 0,25 % Xylencyanol, 15 % Polysucrose, 3 % Formamid, 7 M Urea, 150 µg/ml Ethidiumbromid	Eigenherst.
Binding-Buffer pH 7,6	1,21 g Tris(hydroxymethyl)-aminomethan, 117 g Natriumchlorid, 0,292 g Ethylendiamintetraessigsäure in 90 ml demineralisiertem Wasser lösen, mit Salzsäure	Eigenherst.

	pH auf 7,6 einstellen, 1 ml Polyoxyethylensorbitan-monolaurat (Tween 20) hinzugeben und mit demineralisiertem Wasser auf 1000 ml auffüllen	
Calcium-Chlorid-Lösung	3,68 g CaCl ₂ -Dihydrat in 100 ml demineralisiertem Wasser lösen	Eigenherst.
Cell Culture Lysis Reagent (1x), (CCLR)	25 mM Trisphosphat (pH-Wert = 7,8), 5 mM DDT, 2 mM CDTA, 10 % Glycerol, 1 % Triton X-100	Promega GmbH, Mannheim
Coomassie-Reagenz	5 mg <i>Coomassie Brilliant Blue G-250</i> in 2,5 ml Ethanol (96 %) lösen. Nach Zugabe von 5 mL o-Phosphorsäure (85 %) mit LiChrosolv-Wasser auf 50 mL auffüllen. Lagerung dunkel bei 4 °C	Eigenherst. nach [174]
dNTP-Mischung für PCR-Ansätze	Je 10 µl dATP, dCTP, dGTP und dTTP-Stamm-Lösung (100 mM) mischen und mit bidestilliertem Wasser auf 500 µL auffüllen	Eigenherst.
EB-Puffer (elution buffer)	10 mM Tris-HCl; auf pH 8,5 einstellen	Eigenherst., mod. n. [175]
0,5 M EDTA-Lösung pH 7,5	93,06 g Ethylendiamintetraessigsäure und ca. 40 g NaOH in 400 ml demineralisiertem Wasser lösen, pH mit 0,2 M Natriumhydroxid-Lösung auf 7,5 einstellen und mit demineralisiertem Wasser auf 500 ml auffüllen	Eigenherst.
Enzymatic-Lysis-Buffer	200 µl 2 M Tris-HCl-Lösung pH 7,5, 80 µl 0,5 M EDTA-Lösung pH 7,5 und 240 µl Triton® X-100-Lösung in 20 ml demineralisiertem Wasser lösen	Eigenherst.
Ethanol 70 %	58,9 g Ethanol 96 % mit 29,7 g demineralisiertem Wasser mischen	Eigenherst.
GTE-Puffer	50 mM Glucose, 25 mM Tris-HCl (pH-Wert = 8,0), 10m M EDTA in dH ₂ O, autoklavieren, bei 4 °C lagern	Eigenherst., mod. n. [175]
HiYield® Plasmid Mini DNA Kit	PD 1 -, PD 2 -, PD 3 -, W1-Puffer, Wasch-, Elutionspuffer, RNase A (50 mg/ml), PD Säule	Süd-Laborbedarf GmbH
Isotone Kochsalzlösung	9 g NaCl in 1 l Millipore®-Wasser, autoklavieren	Eigenherst.
K ₂ HPO ₄ / EDTA-Puffer, (Luciferase-Puffer)	1 M K ₂ HPO ₄ (pH-Wert = 7,8), 20 mM EDTA	Eigenherst. nach Promega GmbH, Mannheim, Deutschland
Luciferase Assay Reagent (LAR)	dem Verbraucher unbekannt	Promega GmbH, Mannheim, Deutschland
Lyse-Puffer	0,2 N NaOH, 1 % SDS in dH ₂ O, frisch ansetzen	Eigenherst., mod. n. [175]
Lysis-Mix (f. Luciferase-Messung)	200 µL CCLR (1 x), 50 µL Lysozym-Stammlösung (c = 5 µg/mL), 50 µL BSA-Stammlösung (c = 5 µg/mL)	Eigenherst., mod. n. Promega GmbH, Mannheim, Deutschland

Material und Methoden

3 M Natriumacetat-Lösung pH 4,6	40,8 g Natriumacetat-Trihydrat in 50 ml demineralisiertem Wasser lösen, mit Eisessig pH auf 4,6 einstellen und mit demineralisiertem Wasser auf 100 ml auffüllen	Eigenherst.
Natriumhydroxid-lösung, 0,2 M	8 g Natriumhydroxid in 1000 ml demineralisiertem Wasser lösen	Eigenherst.
Natriumhydroxid-lösung, 0,3 M	0,18 g NaOH-Plätzchen auf 15 ml dH ₂ O	Eigenherst.
Neutralisations-puffer	60 ml 5 M Kaliumacetatlösung, 11,5 ml Eisessig, 28,5 ml dH ₂ O, Lagerung bei Raumtemperatur	Eigenherst., mod. n. [175]
Novobiocin-Stammlösung	10 mg/ml in LiChrosolv-Wasser, steril-filtriert	Eigenherst.
Referenzlösung (für BRADFORD)	10 mg/ml BSA und Verdünnungen	Eigenherst. nach [174]
STE-Puffer	100 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA pH 8,0	Eigenherst.
TE-Puffer	150 mM Tris-HCl, 20 mM EDTA: auf pH 8,0 einstellen	Eigenherst.
T4 DNA Ligase Puffer (10x)	400 mM Tris-HCl, 100 mM MgCl ₂ , 100 mM DTT, 5 mM ATP (pH 7,8 bei Raumtemperatur, ca. 25 °C)	Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland
TAE-Puffer (50 x)	2 M Tris-Base, 50 mM EDTA, mit Essigsäure auf pH 8,0 einstellen	Eigenherst.
TFB1	0,5 g Kaliumacetat, 1 g MgCl ₂ , 0,75 g KCl, 1,6 ml 1 M CaCl ₂ und 17 ml Glycerin (87 %) ad 100 ml dH ₂ O	Eigenherst.
TFB2	0,1 g MOPS, 3,8 ml CaCl ₂ , 0,0375 g KCl und 8,5 ml Glycerin (87 %) ad 50 ml dH ₂ O	Eigenherst.
2 M Tris-HCl-Lösung pH 7,5	24,24 g Tris(hydroxymethyl)-aminomethan in 80 ml demineralisiertem Wasser lösen, mit Salzsäure auf pH 7,5 einstellen und mit demineralisiertem Wasser lösen auf 100 ml auffüllen	Eigenherst.
Washing-Buffer pH 7,6	1,21 g Tris(hydroxymethyl)-aminomethan in 900 ml demineralisiertem Wasser lösen, mit Eisessig pH auf 7,6 einstellen und mit demineralisiertem Wasser lösen auf 1000 ml auffüllen	Eigenherst.

2.1.5 Nährmedien

Es sind flüssige als auch solide Nährmedien verwendet worden. Handelte es sich um Fertigmedien, wurde den Herstellerangaben folgend das geforderte Medium abgewogen und mit einer vorgeschriebenen Menge H₂O dest. versetzt. Das Wasser stammt aus einer MilliPore-Anlage. Anschließend wurde das Medium gelöst und autoklaviert.

Tabelle 2-5 **Verwendete Nährmedien**

Medium	Zusammensetzung	Hersteller
Luria-Bertani (LB) Medium	nach Herstellerangaben	Carl Roth
SOB-Medium	0,5 % Hefeextrakt, 2 % Trypton, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl ₂ , 10 mM MgSO ₄	eigene Herstellung
SOC-Medium	0,5 % Hefeextrakt, 2 % Trypton, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl ₂ , 10 mM MgSO ₄ , 20 mM Glucose	eigene Herstellung
Standard NI Medium	nach Herstellerangaben	Carl Roth
Standard NI Agar	nach Herstellerangaben	Carl Roth
Müller-Hinton Bouillon	nach Herstellerangaben	Carl Roth

2.1.6 Enzyme

Tabelle 2-6 **Auflistung der verwendeten Enzyme**

Bezeichnung	Puffer / Beschreibung	Hersteller
Alkaline Phosphatase, FastAP™, Thermosensitiv	10 x FastAP™ Puffer	Fermentas / Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich, Deutschland
Antarktische Phosphatase	10 x Antarctic Phosphatase Reaction Buffer	New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main, Deutschland
<i>Bam</i> HI	FastDigest®, 10 x FastDigest® Buffer	Fermentas / Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich, Deutschland
<i>Bgl</i> II	FastDigest®, 10 x FastDigest® Buffer	Fermentas / Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich, Deutschland
<i>Dpn</i> I	FastDigest®, 10 x FastDigest® Buffer	Fermentas / Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich, Deutschland
<i>Dra</i> I	FastDigest®, 10 x FastDigest® Buffer	Fermentas / Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich, Deutschland
DreamTaq™ DNA Polymerase	10 x DreamTaq™ Buffer	Fermentas / Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich, Deutschland
<i>Eco</i> 31I (<i>Bsa</i> I)	FastDigest®, 10 x FastDigest® Buffer	Fermentas / Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich, Deutschland
<i>Eco</i> RI	FastDigest®, 10 x FastDigest® Buffer	Fermentas / Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich, Deutschland

Material und Methoden

<i>EcoRV</i>	FastDigest®, 10 x FastDigest® Buffer	Fermentas / Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich, Deutschland
Exonuklease I	<i>E. coli</i> , 10 x reaction Buffer for Exonuklease I	Fermentas / Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich, Deutschland
<i>HincII</i>	FastDigest®, 10 x FastDigest® Buffer	Fermentas / Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich, Deutschland
<i>HindIII</i>	10 x NE Buffer 2	New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main, Deutschland
<i>Hinfl</i>	FastDigest®, 10 x FastDigest® Buffer	Fermentas / Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich, Deutschland
Lysozym (100.000 U/mg)	-	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
<i>NheI</i>	FastDigest®, 10 x FastDigest® Buffer	Fermentas / Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich, Deutschland
<i>NdeI</i>	FastDigest®, 10 x FastDigest® Buffer	Fermentas / Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich, Deutschland
Phusion™ High-Fidelity DNA Polymerase	5 x HF Buffer, 5 x GC-Buffer	Finzymes / Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich, Deutschland
<i>PstI</i>	FastDigest®, 10 x FastDigest® Buffer	Fermentas / Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich, Deutschland
Quick Start Mix aus GenomeLab™ DTCS Quick Start Kit	Sequencing Reaction Buffer aus GenomeLab™ DTCS Quick Start Kit	Beckman Coulter GmbH, Krefeld, Deutschland
RNase A	-	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
rDNase, RNase-free (30 U/μl)	-	Macherey-Nagel, GmbH & Co. KG, Düren, Deutschland
RNase OUT™ (40 U/μl)	-	Invitrogen GmbH / Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich, Deutschland
RiboLock® RNase-Inhibitor	-	New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main, Deutschland
<i>SacII</i>	10x Puffer 3	Invitrogen GmbH / Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich, Deutschland
T4 DNA Ligase	10 x DNA Ligase Buffer	Fermentas / Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich, Deutschland
<i>XbaI</i>	FastDigest®, 10 x FastDigest® Buffer	Fermentas / Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich, Deutschland
<i>XhoI</i>	FastDigest®, 10 x FastDigest® Buffer	Fermentas / Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich, Deutschland

2.1.7 Chemikalien (inkl. Antibiotika)

Sofern verfügbar wurden Chemikalien in der höchsten verfügbaren Qualitätsstufe bezogen (p. a.: pro analysi; für analytische Zwecke). Die in Tabelle 2-7 aufgelisteten Antibiotika wurden vor der Verwendung in LiChrosolv-Wasser (Ampicillin, Ciprofloxacin, Kanamycin, Nalidixinsäure, Norfloxacin, Novobiocin, Oxacillin), Ethanol (Tetracyclin, Chloramphenicol) oder DMSO (Rifampicin) gelöst und steril filtriert.

Tabelle 2-7 Liste der verwendeten Chemikalien und Antibiotika

Chemikalie	Hersteller
Agar Agar	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Ammoniumchlorid	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Ampicillin-Natrium	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
LiChrosolv® Wasser	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Bacto™ Trypton	Becton Dickinson
Bovines Serumalbumin (BSA)	Serva
Bromphenolblau	Bio-Rad
Calciumchlorid-Dihydrat	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Chloramphenicol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Ciprofloxacin-HCl	Bayer
Desoxynukleosidtriphosphate (dNTPs)	Fermentas
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Carl Roth
Dimethylsulfoxid (DMSO)	New England Biolabs
di-Natriumhydrogenphosphat Dihydrat	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Erythromycin	Abbott GmbH & Co KG, Wiesbaden, Deutschland
Essigsäure konz.	Acros Organics
Ethanol 70 %	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Ethanol 99,8 %	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Ethidiumbromid 1 % in H ₂ O	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Ethylendiamin-Tetra-Acetat (EDTA)	Carl Roth
Formamid aq.	Beckman-Coulter
Glucose Monohydrat	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Glycerin 99,5 %	Carl Roth
Glycerin 87 %	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Glykogen	Fermentas
Granulierter Hefeextrakt	Carl Roth
IPTG	Carl Roth
Kaliumacetat	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Kaliumchlorid	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Kaliumhydroxid	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Kaliumiodid	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Kanamycin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
L-Arabinose	Fluka

Material und Methoden

Magnesiumchlorid Hexahydrat	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Magnesiumsulfat Heptahydrat	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
2-Mercaptoethanol	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
MOPS	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Natriumacetat	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Natriumchlorid	Carl Roth
Natriumdihydrogenphosphat Monohydrat	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Serva
Natriumhydrogencarbonat	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Natriumhydrogensulfat	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland k
Natriumhydroxid	Grüssing
Natriumsalicylat	Carl Roth
Nickelsulfat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Norfloxacin	Bayer AG, Leverkusen, Deutschland
Novobiocin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
NuSieve Agarose	BMA
Oxacillin-Natrium	InfectoPharm Arzneimittel und Consilium GmbH
PeqGold Universal Agarose	Peqlab
Phenylalanyl-Arginyl- β -Naphthylamid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Polysucrose	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Rifampicin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
RNase Away	Carl Roth
Roti-Phenol/-Chloroform/-Isoamylalkohol (25:24:1)	Carl Roth
Saccharose	Carl Roth
Salzsäure 37 %	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Tetracyclin-HCl	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Bio-Rad
Tris(hydroxymethyl)-Aminomethan (Tris-Base)	Carl Roth
Triton X-100	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Harnstoff	Carl Roth
X-Gal	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Xylencyanol	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland

2.1.8 Bakterienstämme

Tabelle 2-8 Liste der verwendeten Bakterienstämme

endA1 = Endonuklease I; **F'** = F-Plasmide vorhanden, enthält chromosomale Gene; **F**= trägt kein F-Plasmid; **gyrA96** = Mutation in der DNA-Gyrase, vermittelt Nalidixinsäure Resistenz; **hsdR17** = *hsd* kodiert für ein Typ I Restriktionsenzym, Funktion der Mutation unbekannt; **hsdR514** = führt zu einer effizienten Transformation von klonierter, unmethylierter DNA auf PCR-Amplifikationen; **lacI** = kodiert für den *lac*-Repressor; **laqZΔM15** = partielle Deletion des *lacZ*-Gens, diese erlaubt α-Komplementation des β-Galaktosidasegens, welche für Blau/Weiß Selektion relevant ist; **proAB** = erfordert Prolin; **recA1** = Reduziert das Vorkommen von Rekombination bei der Klonierung bzw. Transformation von DNA, die Zellen sind UV-Empfindlich und besitzen ein mangelhaftes DNA-Reparatursystem; **relA1** = erlaubt keine RNA-Synthese bei Nichtvorhandensein von Protein Synthese; **supE44** = oder *glnV*, kodiert für tRNA-Gln(CUG), Suppression des Amberstopcodons (UAG); **thi** = erfordert Thiamin; **traD36** = Eliminierung des Transferfaktor; **ΔaraBAD** = Arabinose nicht verstoffwechselnd; **ΔrahBAD** = Rhamnose nicht verstoffwechselnd; **ΔlacZ4787** = Lactose nicht verstoffwechselnd; **rph-1** = 1 bp Deletion für zu Frameshift der letzten 15 Codons, führt zu polaren Effekt auf *pyrE*, so dass es bei Anzucht auf Minimalmedium zu suboptimalen Pyrimidin-Level kommt; **ilvG** = Pseudogen in K-12 Stämmen, defektive K12 Allele führen zu einer „Valin-Resistenz“, der Stamm kann nicht mehr auf Valin wachsen, wenn Isoleucin fehlt; **rfb-50** = K12-Stämme besitzen eine raue Oberfläche, bedingt durch die Lipopolysaccharidstruktur und besitzt kein O-Antigen, durch ein IS5-Element am 3'-Ende von *rfb* kann der K12-Stamm sein O-Antigen wieder erlangen und eine „weiche“ Oberfläche ausbilden

Bezeichnung	GK-Nr.	Charakteristika	Referenz
<i>E. coli</i> MG1655	2110	K-12; F; λ ⁻ ; <i>ilvG</i> ⁻ ; <i>rfb-50</i> ; <i>rph-1</i>	[176], [177]
<i>E. coli</i> JM109	3154	<i>endA1</i> ; <i>recA1</i> ; <i>gyrA96</i> ; <i>thi</i> ; <i>hsdR17</i> des ; <i>relA1</i> ; <i>supE44</i> ; #(<i>lac-proAB</i>); [F' <i>traD36</i> , <i>proAB</i> , <i>laqlqZ#M15</i>]	Promega GmbH, Deutschland, [178]
<i>E. coli</i> BW25113	4052	<i>lacI</i> [*] <i>rrnB</i> _{T14} ; Δ <i>lacZ</i> _{WJ16} ; <i>hsdR514</i> ; Δ <i>araBAD</i> _{AH33} ; Δ <i>rahBAD</i> _{LD78} ; <i>rph-1</i> ; Δ(<i>araB-D</i>) ₅₆₇ ; Δ(<i>rhaD-B</i>) ₅₆₈ ; Δ <i>lacZ4787</i> (:: <i>rrnB-3</i>); <i>rph-1</i>	[179]
<i>E. coli</i> JW1122-2	4053	4052 + Δ <i>icd-724</i> :: <i>kan</i>	[179]
<i>E. coli</i> WT	571	Stuhlisolat eines gesunden Probanden, der nie FQ eingenommen hatte (Wildtyp)	[167]
<i>E. coli</i> WT pUC19	-	571 + pUC19	diese Arbeit
<i>E. coli</i> WT pUC19 Nr. 1	-	<i>in vitro</i> selektiert (aus <i>E. coli</i> WT pUC19 Cip _{0,125} μg/ml)	diese Arbeit
<i>E. coli</i> WT pUC19 Nr. 2	-	<i>in vitro</i> selektiert (aus <i>E. coli</i> WT pUC19 Cip _{0,125} μg/ml)	diese Arbeit
<i>E. coli</i> WT pUC19 Nr. 3	-	<i>in vitro</i> selektiert (aus <i>E. coli</i> WT pUC19 Cip _{0,125} μg/ml)	diese Arbeit
<i>E. coli</i> WT pUC19 Nr. 4	-	<i>in vitro</i> selektiert (aus <i>E. coli</i> WT pUC19 Cip _{0,125} μg/ml)	diese Arbeit
<i>E. coli</i> WT pUC19 Nr. 5	-	<i>in vitro</i> selektiert (aus <i>E. coli</i> WT pUC19 Cip _{0,125} μg/ml)	diese Arbeit
<i>E. coli</i> WT pUC19 Nr. 14	-	<i>in vitro</i> selektiert (aus <i>E. coli</i> WT pUC19 Cip _{0,125} μg/ml)	diese Arbeit
<i>E. coli</i> WT pUC19 Nr. 17	-	<i>in vitro</i> selektiert (aus <i>E. coli</i> WT pUC19 Cip _{0,125} μg/ml)	diese Arbeit
<i>E. coli</i> WT pHPNE19-02.1	-	571 + pUC19:: <i>qnrA</i> ΔpMG252 „ <i>E. coli</i> WT pHPNE19-02.1 (Nr.1)“	[18]

Material und Methoden

<i>E. coli</i> WT pHPNE19-02.1 Nr. 1 2	-	<i>in vitro</i> selektiert (aus <i>E. coli</i> WT pHPNE19-02.1 Cip _{1,4} µg/ml)	diese Arbeit
<i>E. coli</i> WT pHPNE19-02.1 Nr. 1 19	-	<i>in vitro</i> selektiert (aus <i>E. coli</i> WT pHPNE19-02.1 Cip _{1,4} µg/ml)	diese Arbeit
<i>E. coli</i> WT pHPNE19-02.1 Nr. 1 50	-	<i>in vitro</i> selektiert (aus <i>E. coli</i> WT pHPNE19-02.1 Cip _{1,4} µg/ml)	diese Arbeit
<i>E. coli</i> WT pHPNE19-02.1 Nr. 2 10	-	<i>in vitro</i> selektiert (aus <i>E. coli</i> WT pHPNE19-02.1 Cip _{1,4} µg/ml)	diese Arbeit
<i>E. coli</i> WT pHPNE19-02.1 Nr. 2 18	-	<i>in vitro</i> selektiert (aus <i>E. coli</i> WT pHPNE19-02.1 Cip _{1,4} µg/ml)	diese Arbeit
<i>E. coli</i> WT pHPNE19-02.1 Nr. 2 29	-	<i>in vitro</i> selektiert (aus <i>E. coli</i> WT pHPNE19-02.1 Cip _{1,4} µg/ml)	diese Arbeit
<i>E. coli</i> WT pHPNE18-01.1	-	571 + pUC18:: <i>qnrBΔlacZ</i> „ <i>E. coli</i> WT pHPNE18-01.1 (No.9)“	[18]
<i>E. coli</i> WT pHPNE18-01.1 Nr. 1 1	-	<i>in vitro</i> selektiert (aus <i>E. coli</i> WT pHPNE18-01.1 Cip _{0,48} µg/ml)	diese Arbeit
<i>E. coli</i> WT pHPNE18-01.1 Nr. 1 4	-	<i>in vitro</i> selektiert (aus <i>E. coli</i> WT pHPNE18-01.1 Cip _{0,48} µg/ml)	diese Arbeit
<i>E. coli</i> WT pHPNE18-01.1 Nr. 1 12	-	<i>in vitro</i> selektiert (aus <i>E. coli</i> WT pHPNE18-01.1 Cip _{0,48} µg/ml)	diese Arbeit
<i>E. coli</i> WT pHPNE18-01.1 Nr. 1 40	-	<i>in vitro</i> selektiert (aus <i>E. coli</i> WT pHPNE18-01.1 Cip _{0,48} µg/ml)	diese Arbeit
<i>E. coli</i> WT <i>Δicd</i> 7 bp (Nr. 7)	-	571 + <i>Δicd</i> 7 bp, <i>in vivo</i> Mutagenese, Kan ^r	diese Arbeit
<i>E. coli</i> WT <i>Δicd</i> 7 bp (Nr. 7) pHPNE19-02.1	-	<i>E. coli</i> WT <i>Δicd</i> 7 bp (Nr. 7) + pUC19:: <i>qnrAΔpMG252</i>	diese Arbeit
<i>E. coli</i> WT <i>Δicd</i> 7 bp (Nr. 7) pHPNE19-03.1	-	<i>E. coli</i> WT <i>Δicd</i> 7 bp (Nr. 7) + pUC19:: <i>qnrS1ΔlacZ</i>	diese Arbeit
<i>E. coli</i> WT <i>Δicd</i> 7 bp (Nr. 15)	-	571 + <i>Δicd</i> 7 bp, <i>in vivo</i> Mutagenese, Kan ^r	diese Arbeit
<i>E. coli</i> WT-K	4041	GyrB S464Y	[180]
<i>E. coli</i> WT-K pUC19	-	4041 + pUC19	diese Arbeit
<i>E. coli</i> WT-K pUC19 Nr. 5	-	<i>in vitro</i> selektiert (aus <i>E. coli</i> WT-K pUC19 Cip _{1,0} µg/ml)	diese Arbeit
<i>E. coli</i> WT-K pUC19 Nr. 6	-	<i>in vitro</i> selektiert (aus <i>E. coli</i> WT-K pUC19 Cip _{1,0} µg/ml)	diese Arbeit
<i>E. coli</i> WT-K pUC19 Nr. 9	-	<i>in vitro</i> selektiert (aus <i>E. coli</i> WT-K pUC19 Cip _{1,0} µg/ml)	diese Arbeit
<i>E. coli</i> WT-K pUC19 Nr. 11	-	<i>in vitro</i> selektiert (aus <i>E. coli</i> WT-K pUC19 Cip _{1,0} µg/ml)	diese Arbeit
<i>E. coli</i> WT-K pUC19 Nr. 14	-	<i>in vitro</i> selektiert (aus <i>E. coli</i> WT-K pUC19 Cip _{1,0} µg/ml)	diese Arbeit
<i>E. coli</i> WT-K pUC19 Nr. 19	-	<i>in vitro</i> selektiert (aus <i>E. coli</i> WT-K pUC19 Cip _{1,0} µg/ml)	diese Arbeit
<i>E. coli</i> WT-K pUC19 Nr. 33	-	<i>in vitro</i> selektiert (aus <i>E. coli</i> WT-K pUC19 Cip _{1,0} µg/ml)	diese Arbeit
<i>E. coli</i> WT-K pUC19 Nr. 45	-	<i>in vitro</i> selektiert (aus <i>E. coli</i> WT-K pUC19 Cip _{1,0} µg/ml)	diese Arbeit
<i>E. coli</i> WT-K pHPNE19-02.1	-	4041 + pUC19:: <i>qnrAΔpMG252</i>	diese Arbeit
<i>E. coli</i> WT-K pHPNE19-02.1 Nr. 2 3	-	<i>in vitro</i> selektiert (aus <i>E. coli</i> WT-K pHPNE19-02.1 Cip _{4,0} µg/ml)	diese Arbeit
<i>E. coli</i> WT-K pHPNE19-02.1 Nr. 2 18	-	<i>in vitro</i> selektiert (aus <i>E. coli</i> WT-K pHPNE19-02.1 Cip _{4,0} µg/ml)	diese Arbeit
<i>E. coli</i> WT-K pHPNE19-02.1 Nr. 2 24	-	<i>in vitro</i> selektiert (aus <i>E. coli</i> WT-K pHPNE19-02.1 Cip _{4,0} µg/ml)	diese Arbeit

<i>E. coli</i> WT-K pHPNE19-02.1 Nr. 2 34	-	<i>in vitro</i> selektiert (aus <i>E. coli</i> WT-K pHPNE19-02.1 Cip _{4,0} µg/ml)	diese Arbeit
<i>E. coli</i> WT-K pHPNE19-02.1 Nr. 2 35	-	<i>in vitro</i> selektiert (aus <i>E. coli</i> WT-K pHPNE19-02.1 Cip _{4,0} µg/ml)	diese Arbeit
<i>E. coli</i> WT-K pHPNE19-02.1 Nr. 2 37	-	<i>in vitro</i> selektiert (aus <i>E. coli</i> WT-K pHPNE19-02.1 Cip _{4,0} µg/ml)	diese Arbeit
<i>E. coli</i> WT-K pHPNE19-02.1 Nr. 2 44	-	<i>in vitro</i> selektiert (aus <i>E. coli</i> WT-K pHPNE19-02.1 Cip _{4,0} µg/ml)	diese Arbeit
<i>E. coli</i> WT-K pHPNE19-02.1 Nr. 2 45	-	<i>in vitro</i> selektiert (aus <i>E. coli</i> WT-K pHPNE19-02.1 Cip _{4,0} µg/ml)	diese Arbeit
<i>E. coli</i> WT-K pHPNE19-02.1 Nr. 3 21	-	<i>in vitro</i> selektiert (aus <i>E. coli</i> WT-K pHPNE19-02.1 Cip _{4,0} µg/ml)	diese Arbeit
<i>E. coli</i> WT-K pHPNE19-02.1 Nr. 3 22	-	<i>in vitro</i> selektiert (aus <i>E. coli</i> WT-K pHPNE19-02.1 Cip _{4,0} µg/ml)	diese Arbeit
<i>E. coli</i> WT-K pHPNE19-02.1 Nr. 3 27	-	<i>in vitro</i> selektiert (aus <i>E. coli</i> WT-K pHPNE19-02.1 Cip _{4,0} µg/ml)	diese Arbeit
<i>E. coli</i> WT-K pHPNE19-02.1 Nr. 3 28	-	<i>in vitro</i> selektiert (aus <i>E. coli</i> WT-K pHPNE19-02.1 Cip _{4,0} µg/ml)	diese Arbeit
<i>E. coli</i> WT-K pHPNE18-01.1	-	4041 + pUC18:: <i>qnrBΔlacZ</i>	diese Arbeit
<i>E. coli</i> WT-K pHPNE18-01.1 Nr. 1 1	-	<i>in vitro</i> selektiert (aus <i>E. coli</i> WT-K pHPNE18-01.1 Cip _{2,4} µg/ml)	diese Arbeit
<i>E. coli</i> WT-K pHPNE18-01.1 Nr. 1 8	-	<i>in vitro</i> selektiert (aus <i>E. coli</i> WT-K pHPNE18-01.1 Cip _{2,4} µg/ml)	diese Arbeit
<i>E. coli</i> WT-K pHPNE18-01.1 Nr. 1 19	-	<i>in vitro</i> selektiert (aus <i>E. coli</i> WT-K pHPNE18-01.1 Cip _{2,4} µg/ml)	diese Arbeit
<i>E. coli</i> WT-K pHPNE18-01.1 Nr. 1 23	-	<i>in vitro</i> selektiert (aus <i>E. coli</i> WT-K pHPNE18-01.1 Cip _{2,4} µg/ml)	diese Arbeit
<i>E. coli</i> WT-K pHPNE18-01.1 Nr. 1 26	-	<i>in vitro</i> selektiert (aus <i>E. coli</i> WT-K pHPNE18-01.1 Cip _{2,4} µg/ml)	diese Arbeit
<i>E. coli</i> WT-K pHPNE18-01.1 Nr. 1 27	-	<i>in vitro</i> selektiert (aus <i>E. coli</i> WT-K pHPNE18-01.1 Cip _{2,4} µg/ml)	diese Arbeit
<i>E. coli</i> WT-K pHPNE18-01.1 Nr. 2 4	-	<i>in vitro</i> selektiert (aus <i>E. coli</i> WT-K pHPNE18-01.1 Cip _{2,4} µg/ml)	diese Arbeit
<i>E. coli</i> MI	572	GyrA S83L (aus WT Nal ₁₂₈ µg/ml)	[167]
<i>E. coli</i> MII	573	GyrA S83L, <i>ΔmarR</i> 175 bp (aus MI Cip ₄ µg/ml)	[167]
<i>E. coli</i> MII pUC19	-	573 + pUC19	diese Arbeit
<i>E. coli</i> MII pUC19 Nr. 13	-	<i>in vitro</i> selektiert (aus <i>E. coli</i> MII pUC19 Cip _{9,6} µg/ml)	diese Arbeit
<i>E. coli</i> MII pUC19 Nr. 26	-	<i>in vitro</i> selektiert (aus <i>E. coli</i> MII pUC19 Cip _{9,6} µg/ml)	diese Arbeit
<i>E. coli</i> MII pHPNE19-02.1	-	573 + pUC19:: <i>qnrAΔpMG252</i>	diese Arbeit
<i>E. coli</i> MII pHPNE19-02.1 Nr. I 13 (1)	-	<i>in vitro</i> selektiert (aus <i>E. coli</i> MII pHPNE19-02.1 Cip _{28,8} µg/ml)	diese Arbeit
<i>E. coli</i> MII pHPNE19-02.1 Nr. I 20 (1)	-	<i>in vitro</i> selektiert (aus <i>E. coli</i> MII pHPNE19-02.1 Cip _{28,8} µg/ml)	diese Arbeit
<i>E. coli</i> MII pHPNE19-02.1 Nr. I 43 (1)	-	<i>in vitro</i> selektiert (aus <i>E. coli</i> MII pHPNE19-02.1 Cip _{28,8} µg/ml)	diese Arbeit
<i>E. coli</i> MII pHPNE19-02.1 Nr. II 21 (2)	-	siehe <i>E. coli</i> MII <i>Δicd</i> 7 bp pHPNE19-02.1 (MII pHPNE19-02.1 Nr. I 43) GK4087	diese Arbeit
<i>E. coli</i> MII pHPNE19-02.1 Nr. II 6 (2)	-	<i>in vitro</i> selektiert (aus <i>E. coli</i> MII pHPNE19-02.1 Cip _{28,8} µg/ml)	diese Arbeit
<i>E. coli</i> MII pHPNE19-02.1 Nr. III 13 (2)	-	<i>in vitro</i> selektiert (aus <i>E. coli</i> MII pHPNE19-02.1 Cip _{28,8} µg/ml)	diese Arbeit

Material und Methoden

<i>E. coli</i> MII pHPNE19-02.1 Nr. III 2 (2)	-	<i>in vitro</i> selektiert (aus <i>E. coli</i> MII pHPNE19-02.1 Cip _{28,8} µg/ml) lcd Y284X	diese Arbeit
<i>E. coli</i> MII pHPNE19-02.1 Nr. III 4 (2)	-	<i>in vitro</i> selektiert (aus <i>E. coli</i> MII pHPNE19-02.1 Cip _{28,8} µg/ml)	diese Arbeit
<i>E. coli</i> MII pHPNE18-01.1	-	573 + pUC18:: <i>qnrBΔlacZ</i>	diese Arbeit
<i>E. coli</i> MII pHPNE18-01.1 Nr. II 12 (1)	-	<i>in vitro</i> selektiert (aus <i>E. coli</i> MII pHPNE18-02.1 Cip _{16,0} µg/ml)	diese Arbeit
<i>E. coli</i> MII pHPNE18-01.1 Nr. II 18 (1)	-	<i>in vitro</i> selektiert (aus <i>E. coli</i> MII pHPNE18-02.1 Cip _{16,0} µg/ml) lcd Mutation vermutet	diese Arbeit
<i>E. coli</i> MII pHPNE18-01.1 Nr. II 42 (1)	-	<i>in vitro</i> selektiert (aus <i>E. coli</i> MII pHPNE18-02.1 Cip _{16,0} µg/ml)	diese Arbeit
<i>E. coli</i> MII pHPNE18-01.1 Nr. III 1 (2)	-	<i>in vitro</i> selektiert (aus <i>E. coli</i> MII pHPNE18-02.1 Cip _{16,0} µg/ml)	diese Arbeit
<i>E. coli</i> MII pHPNE18-01.1 Nr. III 10 (2)	-	<i>in vitro</i> selektiert (aus <i>E. coli</i> MII pHPNE18-02.1 Cip _{16,0} µg/ml)	diese Arbeit
<i>E. coli</i> MII pHPNE18-01.1 Nr. III 27 (2)	-	<i>in vitro</i> selektiert (aus <i>E. coli</i> MII pHPNE18-02.1 Cip _{16,0} µg/ml)	diese Arbeit
<i>E. coli</i> MII Δ <i>icd</i> 7 bp	4086	573 + Δ <i>icd</i> 7 bp; inkompatibel mit pBR322 (aus MII pHPNE19-02.1 Cip ₁₆ µg/ml)	diese Arbeit
<i>E. coli</i> MII Δ <i>icd</i> 7 bp pHPNE19-02.1 (MII pHPNE19-02.1 Nr. I 43)	4087	4086 + <i>qnrAΔpMG252</i>	diese Arbeit
<i>E. coli</i> MIII	574	GyrA S83L D87G, ParC S80I, Δ <i>marR</i> 74 bp (aus MII Cip ₁₆ µg/ml)	[167]
<i>E. coli</i> MIVa	575	GyrA S83L D87G, ParC S80I, Δ <i>marR</i> 74 bp (aus MII Cip ₁₆ µg/ml)	[167]
<i>E. coli</i> DH5α K12 pPHB331	2999	pPHB331	[181]
<i>E. coli</i> DH5α K12 pPHB333	3000	pPHB333	[181]
<i>E. coli</i> DH5α K12 pPHB335	3001	pPHB335	[181]
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	2278	DSM20044, StaEpi026, Merlin Code: 4-6	Merlin Technologies GmbH, Bornheim

2.1.9 Plasmide

Tabelle 2-9 Verwendete Vektoren und rekombinante Plasmide

pUUXYy-zz [p = Plasmid, **UU**: Name, Universität., z.B.: HP = Hamburg, Pharmazeutische Biologie, **XX**: Name des Wissenschaftlers, z.B. HP = Konstruiert von Hans-Peter Sfeir, **yy** = interne Nummer für Ausgangsvektoren (z.B. 18 für pUC18, 177 für pACYC177), **zz** = Projekt und laufende Nummer] – Das verwendete Schema gilt nicht für alle aufgelisteten Plasmide; **Amp^r** = Ampicillin-Resistenz; **Kan^r** = Kanamycin-Resistenz; **Tet^r** = Tetracyclin-Resistenz

Bezeichnung	Größe (bp)	Beschreibung	Referenz
pBR322	4362	Amp ^r ; Tet ^r	Invitrogen™, Karlsruhe
pPHB331	6400	<i>PacrAB::luc</i> in <i>PstI</i> -Schnittstelle; Tet ^r	[181]
pPHB333	6616	<i>PacrEF::luc</i> in <i>PstI</i> -Schnittstelle; Tet ^r	[181]
pPHB335	7805	pPHB331 mit Kan ^r (aus pKD4) in Tet ^r (disruptiert), <i>PacrAB::luc</i> in <i>PstI</i> -Schnittstelle;	[181]
pHPMP03-05	4700	pBR322 mit <i>dnaQ</i> -Fragment (-214 bis +912) aus <i>E. coli</i> M11 in <i>PstI</i> - und <i>Clal</i> -Schnittstelle	[27]
pHPMP03-06	4700	pBR322 mit <i>dnaQ</i> -Fragment (-214 bis +912) aus <i>E. coli</i> M11Q in <i>PstI</i> - und <i>Clal</i> -Schnittstelle	[27]
pACYC177	3941	Amp ^r ; Kan ^r	New England Biolabs, Ipswich, England
pHPHP177-01.1	4498	pACYC177 mit <i>icd</i> -Fragment aus <i>E. coli</i> WT (GK571) in <i>Bam</i> HI- und <i>Eco</i> RV-Schnittstellen; Kan ^r	diese Arbeit
pHPHP177-02.1	4194	pACYC177 mit <i>icd</i> -Fragment aus <i>E. coli</i> WT (GK571) mittels Rolling Circle; Amp ^r	diese Arbeit
pHPAR177-01.1	5980	pACYC177 mit <i>PacrAB::luc</i> aus pPHB331 in <i>PstI</i> -Schnittstelle; Kan ^r ; ursprünglich als pHPHP177-03.1 geplant	M. Sc. A. Reinhardt, 2014
pHPHP177-04.1	6196	pACYC177 mit <i>PacrEF::luc</i> aus pPHB333 in <i>PstI</i> -Schnittstelle, Kan ^r	diese Arbeit
pHPHP177-05.1	5649	<i>luc</i> ohne Promotor nach SSM-PCR von pHPAR177-01.1; Kan ^r	diese Arbeit
pKD4	3267	Amp ^r , Kan ^r	[182]
pKD46	6329	Amp ^r ; <i>repA101-ts</i> ; <i>araC-Parab</i> ; λ-Red Rekombinasesystem (<i>gam</i> , <i>bet</i> , <i>exo</i>)	[182]
pACBSCE	ca. 5500	Clm ^r , <i>I-SceI</i> , λ-Red Rekombinasesystem (<i>gam</i> , <i>bet</i> , <i>exo</i>)	[183]
pUC18	2686	Amp ^r , <i>lacZα</i>	Invitrogen™, Karlsruhe
pHPNE18-01	3373	pUC18:: <i>qnrB1</i> ; <i>qnrB1</i> aus GK 3110; Amp ^r	[18]
pHPNE18-01.1	3353	pUC18:: <i>qnrB1ΔlacZ</i> ; <i>lacZ</i> deletiert; Amp ^r	[18]
pUC19	2686	Amp ^r , <i>lacZα</i>	Invitrogen™, Karlsruhe
pHPNE19-02	3598	pUC19:: <i>qnrA1</i> ; <i>qnrA1</i> aus pMG252, mit eigenem Promotor kloniert; Amp ^r	[18]
pHPNE19-02.1	3375	pUC19:: <i>qnrA1ΔlacZ</i> ; <i>lacZ</i> deletiert; Amp ^r	[18]
pHPNE19-03.1	3326	pUC19:: <i>qnrS1ΔlacZ</i> ; <i>lacZ</i> deletiert; <i>qnrS1</i> aus pINF5; Amp ^r	[18]
pHPPH19-01.1	3440	pUC19:: <i>qnrD</i> ; <i>qnrD</i> aus p2007057; Amp ^r	M.Sc. P. HEBEL 2012

pHPPH19-02.1	3449	pUC19:: <i>qnrC</i> ; <i>qnrC</i> aus pHS11; Amp ^r	M.Sc. P. HEBEL 2012
pDOC-K	7233	Amp ^r , Kan ^r , <i>sacB</i> , FRT sites	[183]
pHPHPDOC-01.1	8613	pDOCK mit zwei <i>icd</i> -Fragmenten aus <i>E. coli</i> M11 Δ <i>icd</i> 7 bp (<i>icd</i> +587 bis +1385 in <i>Hind</i> III und <i>Bam</i> HI-Schnittstellen <i>upstream</i> Kan ^r , <i>icd</i> +1306 bis +1966 in <i>Xho</i> I und <i>Nhe</i> I-Schnittstellen <i>downstream</i> Kan ^r)	diese Arbeit
pBP591	9013	Gen ^r , Ami ^r , Kan ^r , Mob ⁺ , Tra ⁻ , <i>pbla-marR</i>	HÜLLEN & HEISIG 1998, [130]

2.1.10 Oligonukleotide

Die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma Invitrogen bezogen oder wurden im Arbeitskreis synthetisiert. Selbst konstruierte Oligonukleotide wurden in der Regel nach einheitlichen Nomenklatur-Regeln benannt: **(I)** Bezeichnung des zur Bindungsstelle nächstgelegenen Gens, **(II)** Position der Bindung, berechnet ausgehend vom Start des Strukturgens und **(III)** „fw“ für Bindung am Antisense-Strang oder „rv“ für Bindung am Sensestrang. Aus der Differenz der Bindungspositionen lässt sich die Fragmentgröße berechnen.

Tabelle 2-10 Oligonukleotide für real time quantitative PCR *sdiA*

Verwendung	Bezeichnung	Sequenz (5' – 3')	Referenz
<i>sdiA</i>	<i>sdiA</i> _[GK571_RT-PCR_5-1]_+480	AAGTCTGATGGCTCTGATGC	diese Arbeit
<i>sdiA</i>	<i>sdiA</i> _[GK571_RT-PCR_3-1]_+575	TGCTGATGTCTTACCTCCG	diese Arbeit
Haushaltsgen	<i>cysG</i> _+932_fw-RT	GCGAAGAGCTGGAAACACTGTG	[5]
Haushaltsgen	<i>cysG</i> _+1019_rv-RT	GAATAGGCAGAGCAACCAGAAGC	[5]

Tabelle 2-11 Oligonukleotide für weitere Fragestellungen mit *sdiA*

Verwendung	Bezeichnung	Sequenz (5' – 3')	Referenz
Nachweis	<i>sdiA</i> _[<i>sdiA</i> 5-1]_5'_-438_EcoK12	AAGTCTGAACACCATCC	diese Arbeit
Nachweis	<i>sdiA</i> _[<i>sdiA</i> 3-1]_3' _+848_EcoK12	GGTTTCGTCTTCGATCAG	diese Arbeit
Nachweis	<i>sdiA</i> _[<i>sdiA</i> -3-1]_3' _+350_EcoK12	AATACTGAGTGACACCGC	diese Arbeit
Cycle-Sequencing	<i>sdiA</i> _[<i>sdiA</i> 5-1]_5' _+350_EcoK12	GCGGTGTCAGTATT	diese Arbeit
Pyrosequenzierung	<i>sdiA</i> _[5-1]_5' _+516_WT	AGTGATGACGCCAGAGATGA	diese Arbeit
	<i>sdiA</i> _[<i>sdiA</i> -5-1]_5' _+517_EcoK12	GTGATGACGCCAGAGATGAA	diese Arbeit
	<i>sdiA</i> _[3-1]_3' _+673_EcoK12 biotin	Biotin*GCAACCTGGGTCTTATTT GG	diese Arbeit
DIG-Sonde	<i>sdiA</i> _5-1_+266_fw	GTCAGGGCCATTTAATGTGG	diese Arbeit
	<i>sdiA</i> _3-1_+419_rv	AAGAATGGGTATTTTCGCGCG	diese Arbeit
	<i>sdiA</i> _[<i>sdiA</i> 5-1]_5' _+295_EcoK12	TTATTCAGCGAAGCACAGCC	diese Arbeit
	<i>sdiA</i> _[<i>sdiA</i> 3-1]_3' _+673_EcoK12	GCAACCTGGGTCTTATTTGG	diese Arbeit

Tabelle 2-12 Oligonukleotide zur QRDR-Sequenzierung der Gyrase und Topoisomerase IV und zur Detektion einer *marR*-Deletion in *E. coli*

Verwendung	Bezeichnung	Sequenz (5' – 3')	Referenz
Nachweis	<i>gyrA3</i> -1	GGAATTTGGTTGGCATGACGTCCGGA	A. Schnasse
Nachweis	<i>gyrA5</i> -1	CCGAATTCGGGATACAGTAGAGGGATAGC	A. Schnasse
Nachweis	<i>parC</i> _[<i>parC S</i>]_5'_+138	GTATGCGATGTCTGAACTGGGCCTG	[168]
Nachweis	<i>parC</i> _[<i>parC U</i>]_3'_+373	ACCGGGATTCGGTGTAAACGCATTGC	[168]
Nachweis	<i>parC</i> _[<i>parC5</i> -1]_5'_-26	GCGAATAAGTTGAGGAATCAG	[168]
Nachweis	<i>parC</i> _[<i>parC3</i> -1]_3'_+392	AGCTCGGAATATTTTCGACAAC	[168]
Nachweis	<i>parC</i> _[<i>parC6/PC6</i>]_5'_-168	CAGCAAAGAGTTGTATATCAAGGC	[168]
Nachweis	<i>parC</i> _[<i>parC5/PC5</i>]_3'_+773	GGCAATGCGCTGATAACCACCG	[168]
Nachweis	<i>gyrB</i> _[<i>gyrB7</i>]_5'_+1059_EcoK12	GAACGAACTGCTGGCAGAATACC	[168]
Nachweis	<i>gyrB</i> _[<i>gyrB8</i>]_3'_+1846_EcoK12	TCAACGTCGGCTGATAGATAAGC	[168]
Nachweis	<i>parE</i> _[PARET]_5'_+1189_EcoK12	TTGCTGGCAAACCTGGCTGATTGT	[168]
Nachweis	<i>parE</i> _[<i>parE RT</i> 1679R]_3'_+1679_EcoK12	ACGTTTCGGCTTGCCTTTCTTG	[168]
Nachweis	<i>marR</i> _+7_for	AGTACCAGCGATCTGTTCAA	A. Schnasse
Nachweis	<i>marA</i> _+42_rev	ATGAATGGTAATAGCGTCAGT	A. Schnasse
Nachweis	<i>marR</i> _-101_for	CCGATTTAGCAAACCGTGGCATC	A. Schnasse

Tabelle 2-13 Oligonukleotide für Klonierungen mit *icd*

Verwendung	Bezeichnung	Sequenz (5' – 3')	Referenz
Rolling Circle pHPHP177-02.1	<i>icd</i> _[5-1]_-261_pACYC177Amp	TCCGCTAGCGCTGAGGTCTGCCT CGTGAAGAAGGTGTTGCAGCTG AATCGCTTAACCTGG	diese Arbeit
	<i>icd</i> _[3-1]_+1398_pACYC177Amp	GATGCGGTTAGCTTTTACCCCTG CATCTTTGAGCGCTGAGGTGATC GTGGTAAAGACTGG	diese Arbeit
	pACYC177:: <i>icdA</i> _[5-1]_keinKanR	TGTTTTGATATCTACGATAATCCA GTCTTTACCAGATCACCTCAGC GCTCAAAGATGC	diese Arbeit
	pACYC177:: <i>icdA</i> _[3-1]_keinKanR	AAACTTCTTTAGAAATCACCAG GTAAAGCGATTACAGTGCAACAC CTTCTCACGAGGC	diese Arbeit
Sequenzierung pHPHP177-02.1	pHPHP177_02_I_fw_sequenz	ACATATTCTGCTGACGCACC	diese Arbeit
	pHPHP177-02_I_rv_sequenz	TCTACACCGATTCCATCACC	diese Arbeit
	pHPHP177-02_II_fw_sequenz	GTTCAGAGTTTGGTGATGCG	diese Arbeit
	pHPHP177-02_II_rv_sequenz	TTCAGCTTTGCTTCTCTGTCTG	diese Arbeit
Klonierung pHPHP177-01.1	<i>icd</i> _[5-1]_-261_CFT073_BamHI	TAGCAGTGGGATCCAGCTGAATC GCTTAACCTGG	diese Arbeit
	<i>icd</i> _[3-1]_+1398_CFT073_Eco31I	GCTGATACCGCGAGACCTGATCG TGGTAAAGACTGG	diese Arbeit
Klonierung pHPHPDOC- 01.1 <i>Gene</i> <i>Doctoring</i>	<i>icdA</i> _[5_1]_+581_p_dock	ACAGGGTAATCGATGAATTCAAG CTTGGATCCCGGTACCGCGGTA TCGGTATTAAGCCG	diese Arbeit
	<i>icdA</i> _[3_1]_+1618_p_dock	TCATTACCCTGTTATCCCTACTAG TCGACGCTAGCATATGCGTCACA CTACCTCTCAAGC	diese Arbeit
	p-dock_SOEing_5_1	CTGGTCTCCTCTGTTTGCTTGAGA GGTAGTGTGACGCATATGCTAGC GTCGACTAGTAGG	diese Arbeit

	p-docK_SOEng_3_1	GTTTGGTGCCTTCTCCGAACAC GGCTTAATACCGATACCGCGGTA CCCGGGATCCAAGC	diese Arbeit
	icd_5_587_CFT073_Klonierung_pdocK_EcoRI_HindIII	ATCGATGAATTCAAGCTTTCCGGT ATTAAGCCGTGTTCG	diese Arbeit
	icdA_3_1385_CFT073_pDocK_Klonierung_BamHI	CCGGGATCCTGGTAAAGACTGG ATTATCG	diese Arbeit
	icdA_5_+1386_CFT073_pDocK_Klonierung_XhoI	TATCTCGAGCTCCGATCATCATTG TATCGGTCCG	diese Arbeit
	icdA_3_1966_CFT073_pDocK_Klonierung_NheI	CGACGCTAGCATATCCGCCAGGA TTTAACCCAGC	diese Arbeit
Klonierung pPHP177-05.1	blap_acrA_luc_fw_5648_pACYC177_rolling_circle	ATGTTTTTGGCGTCTTCCATCAGC AATGGCAACAACGTTGCG	diese Arbeit
	blao_acrA_luc_rw_5619_pACYC177_rolling_circle	TGCCATTGCTGATGGAAGACGCC AAAAACATAAAGAAAGGC	diese Arbeit

Tabelle 2-14 Primer zur ortsspezifischen Mutagenese nach Datsenko und Wanner [182]

Verwendung	Bezeichnung	Sequenz (5' – 3')	Referenz
SOEng-PCR	icdA_[5-1]_Klonierung fw	TAGCAGTGGGATCCAGCTGAATC GCTTAACCTGG	diese Arbeit
	icdA_[5-1]_+581	GCGGTATCGGTATTAAGCCG	diese Arbeit
	icdA_[3-1]_+1618	CGTCACACTACCTCTCAAGC	diese Arbeit
	pKD4_[5-1]_+3266_SOEng_icdA	GCTGCGATAATCCAGTCTTTACC ACGATCAGCAGATTGCAGCATT CAGC	diese Arbeit
	icdA_[3-1]_+1391_SOEng_vor_Kan	TCGCTCAAGACGTGTAATGCTGC AATCTGCTGATCGTGGTAAAGAC TGG	diese Arbeit
	icdA_[5-1]_+1362_SOEng_nach_Kan	AACTAAGGAGGATATTCATATGG ACCATGGGCTGCGATAATCCAGT CTTTACC	diese Arbeit
	icdA_[5-1]_+1400_SOEng_nach_Kan	AACTAAGGAGGATATTCATATGG ACCATGGTCCGGTCCGTCATTTTT CTGG	diese Arbeit
	pKD4_[3-1]_+1514_SOEng_icdA	GGTCATAAATCCAGAAAAATGAC CGACCGACCATGGTCCATATGAA TATCCTCC	diese Arbeit

Tabelle 2-15 Oligonukleotide zum Nachweis von Δicd 7 bp

Verwendung	Bezeichnung	Sequenz (5' – 3')	Referenz
Sequenzierung	icd_[5-1]_-565_CFT073 (fw 0)	TTAAGGTTAGGCCATTGGGC	diese Arbeit
Sequenzierung	icd_[5-1]_-306_CFT073 (fw 1)	ATTGAACAGGATCACACGCG	diese Arbeit
Sequenzierung	icd_[3-1]_+119_CFT073 (rv 1a)	TCTACACCGATTCCATCACC	diese Arbeit
Sequenzierung	icd_[3-1]_+602_CFT073 (rv 1b)	CACGGCTTAATACCGATACC	diese Arbeit
Sequenzierung	icd_[3-1]_+934_CFT073 (rv 1c)	CGTCAGAAATGTAGTACCCG	diese Arbeit
Nachweis Δicd 7 bp	icd_[5-1]_+491_CFT073 (fw 2)	AATGGAAAGCAGACTCTGC	diese Arbeit
Sequenzierung	icd_[3-1]_+1398_CFT073 (rv 2)	TGATCGTGGTAAAGACTGG	diese Arbeit
Nachweis Δicd 7 bp	icd_[3-1]_+353(+838!)_CFT073 (rv 2a)	CGTCTTTAATGACGATCTC	diese Arbeit
Nachweis Δicd 7 bp	icdA_[5-1]_+800_Deletion	AAAACCCGAATACCGGCACG	diese Arbeit
Nachweis Δicd 7 bp	icdA_[3-1]_+1691_Deletion	GTCATAGGTTACGGTCTTGG	diese Arbeit
Sequenzierung	icdA_fw_3131_CFT073	AATGTGCAACATGTCGTCCC	diese Arbeit
Sequenzierung	icdA_rv_3583_CFT073	TAAGACCCAACCTCTATCGG	diese Arbeit

2.1.11 Größenstandards für DNA-Gele

Tabelle 2-16 Übersicht der Verwendeten Größenstandards für DNA-Gele

Name	Hersteller
100 bp DNA Ladder RTU (Ready-to-Use)	GeneDirex
100bp DNA Ladder	Promega
1kb DNA Ladder RTU (Ready-to-Use)	GeneDirex
2-log DNA Ladder	NEB
FastRuler™ High Range DNA Ladder, ready-to-use	Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich, Deutschland
GeneRuler™ 100bp Plus DNA Ladder	Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich, Deutschland
GeneRuler™ 1kb DNA Ladder	Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich, Deutschland
GeneRuler™ 1kb Plus DNA Ladder	Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich, Deutschland
MassRuler™ High Range DNA Ladder, ready-to-use	Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich, Deutschland
O'GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder, ready-to-use	Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich, Deutschland
O'GeneRuler™ 1 kb Plus DNA Ladder, ready-to-use	Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich, Deutschland
O'GeneRuler™ 100bp Plus DNA Ladder, ready-to-use	Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich, Deutschland
Quick Load 100bp DNA Ladder	NEB
Quick Load 1kb DNA Ladder	NEB

2.2 Methoden

2.2.1 Methoden der Mikrobiologie – Arbeiten mit Bakterien

Bei mikrobiologischen Tätigkeiten ist es essentiell, dass stets mit sterilen Materialien und Nährlösungen gearbeitet wurde. Mindestens in unmittelbarer Nähe zu einer Bunsenbrennerflamme wurde gearbeitet, um alle Arbeiten unter sterilen Bedingungen durchzuführen.

2.2.1.1 Picken von Kolonien, Überimpfen, Dreiösenausstrich

Unter sterilen Bedingungen wurden Kolonien von Nährböden gepickt. Meist wurden diese Kulturen am Tag zuvor ausgestrichen. Als Werkzeug wurden sterile Glasstäbe oder sterile Pipettenspitzen verwendet, um die Kolonie aufzunehmen. Wurde gewünscht, dass die gepickte Kolonie auf einen neuen Nährboden überimpft wurde, so wurde mittels des Prinzips des Dreiösenausstrichs (Abbildung 2-1) vorgegangen [184] oder nur mit der Spitze des Glasstabs oder der Pipettenspitze der frische Nährboden berührt.

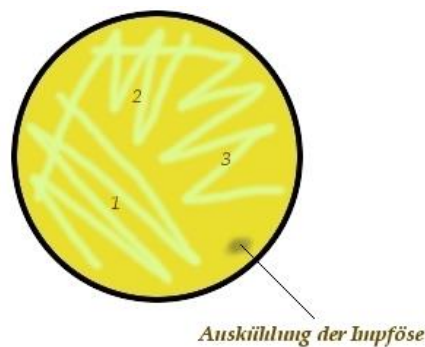


Abbildung 2-1 Dreiösenausstrich [184]

Die einzelnen Ausstriche wurden mit jeweils neuen, sterilen Glasstäben vorgenommen. Die Technik dient primär dem Vereinzeln von Kolonien

Wurde ein Beimpfen eines flüssigen Nährmediums notwendig, so konnte das durch Eintauchen des Glasstabs oder der Pipettenspitze in das Medium erfolgen. Hierbei wurde das Werkzeug leicht hin und her bewegt. Auch war denkbar eine flüssige Kultur mit der Pipette aufzunehmen und in ein neues flüssiges Medium das aufgenommene Medium wieder abzugeben. Hierbei wurde vermieden, dass die Pipettenspitze mit dem neuen Medium in Kontakt kam.

2.2.1.2 50er Platte

In der Arbeitsgruppe wurde eine Schablone verwendet, um eine Beimpfung von 50 Kolonien auf einer Agarplatte durchzuführen. Die Schablone wurde unter die mit Agar gefüllte Plattenhälfte positioniert und als Orientierung verwendet (Abbildung 2-2).

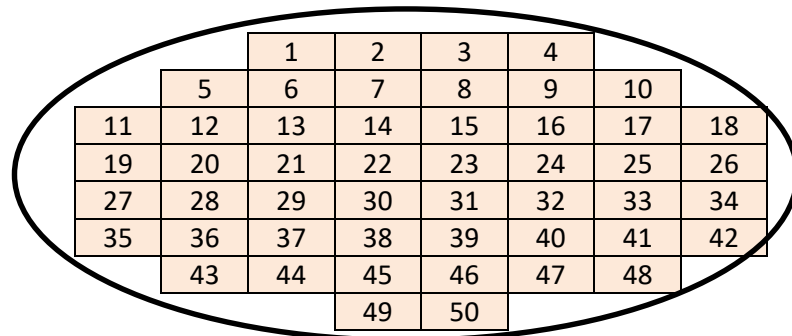


Abbildung 2-2 Schema 50er-Platte (eigene Darstellung)

2.2.1.3 Herstellung und Verwendung von Dauerkulturen

Sollten Kulturen dauerhaft konserviert werden, so wurde eine Glycerinkultur angelegt. Hierbei ist zu beachten, dass ein Frostschutzmittel (Glycerin) hinzugegeben wurde, damit Eiskristalle nicht die Zellwand der Bakterien zerstörten. In Cryoröhrchen wurden auf Glasbastelperlen Bakterien aufbewahrt, die auf den Perlen einen dünnen Biofilm ausbildeten. Um eine Glycerinkultur herzustellen war es notwendig die gewünschte Kolonie mit einem sterilen Gegenstand (Glasstab oder Pipettenspitze) vom Nährboden aufzunehmen und in das vorbereitete Cryoröhrchen zu transferieren. Die Kultur wurde für mindestens 30 min stehen gelassen, damit sich die Bakterien im Medium auf die Glasperlen absetzen konnten und dort einen Biofilm bildeten. Überstehende Kulturlösung wurde mit einer Pipette abgenommen, und das Röhrchen wurde verschlossen bei -80°C eingefroren. Um die eingefrorene Kultur wieder zu kultivieren wurde die Glycerinkultur aus dem Gefrierschrank entnommen, geöffnet und mit einer sterilen Impföse oder mit einem sterilen Platendraht wurde eine Glasperle aus der Kultur entnommen und auf einem Nährboden ausgestrichen. Statt in Cryoröhrchen wurden Dauerkulturen auch in Mikrotiterplatten angelegt, und die Kavitäten der Platte dicht mit Parafilm und Klebeband verschlossen.

2.2.1.4 Stammhaltung

Aus einer Glycerinkultur wurde eine Glasperle mit einer sterilen Einmalimpföse oder mit einer abgeflamten Platinimpföse auf einer Agarplatte ohne Selektionsmedium durch einen Dreiö-senausstrich ausgestrichen und bei 30 °C oder 37 °C über im Nacht im Brutschrank inkubiert. Nach 18-24 h wurde die bewachsene Platte aus dem Brutschrank entnommen und gegebenfalls wurde eine einzelne Kolonie ausgeinzelt oder auf einer Agarplatte mit einem Selektionsantibiotikum ausgestrichen und erneut inkubiert. Die Platten wurden bei 4 °C für höchstens 8 Wochen aufbewahrt und nachfolgend verworfen.

2.2.1.5 Agarplatten und Medienherstellung

Zur Herstellung wurden die Bedingungen des Herstellers befolgt.

2.2.1.6 Herstellung von Übernachtkulturen

Übernachtkulturen (ÜNK) wurden abends angesetzt, über Nacht inkubiert und am nachfolgenden Tag verwendet. In dieser Arbeit ist unter ÜNK eine Kultur gemeint, die in 3 mL LB-Medium mit einem Aluminiumdeckel verschlossen inkubiert wurde. Jeweils wurde mit einer Kolonie eines Bakteriums die ÜNK beimpft. Über Nacht wurde im Schüttelinkubator bei 37° C inkubiert und eine Schüttelfrequenz von 130 U/ min verwendet.

2.2.1.7 Herstellung von Calciumchlorid-kompetenten *E. coli* Zellen

Grundlage für diese Methode sind die Arbeiten aus 1977 von MORRISON [185] und aus 1983 von HANNAHAN [186]. Für diese Methode war eine allgemeine Angabe zur erforderlichen Menge an kompetenten Zellen vorher erforderlich, um das Volumen der Übernachtkultur abzuschätzen: Um 2,5 mL kompetente Zellen herzustellen, wurde 1 mL ÜNK benötigt. Pro Transformationsansatz bzw. Kontrolle mit Calciumchlorid-kompetenten Zellen wurden 200 µL kompetente Zellen verwendet. Von einer Übernachtkultur, die möglichst von einer frisch ausgestrichenen Platte stammte, wurde eine 1:100 Verdünnung in LB-Medium angesetzt. So wurden in einem Erlenmeyerkolben mit 250 ml bis 300 ml Volumen 49,5 ml LB-Medium vorgelegt und mit 0,5 ml der Übernachtkultur beimpft. Das Volumen des Erlenmeyerkolbens sollte wenigstens das Fünffache des Volumens an Medium betragen. Die Verdünnung wurde bei 37°C

bis zum Erreichen der mittleren exponentiellen Wachstumsphase bei 130 rpm geschüttelt. Für den *E. coli*-Stamm JM109 lag die exponentielle Wachstumsphase bei einer OD₆₀₀ von ca. 0,5 vor. Diese pünktliche Ernte der Zellen bei dieser OD war wichtig, denn höhere ODs führten zu einer geringeren Kompetenz der Zellen. Alle folgenden Schritte werden auf Eis bzw., bei 4 °C durchgeführt. Die Kultur wurde in eiskalte vorgekühlte Falcons gefüllt und 10 Minuten auf Eis gestellt, um die Kulturen auf 0 °C abzukühlen und das Wachstum zu verlangsamen. Nach dem Abkühlen wurde die Kultur bei 3000 g (gemäß SAMBROOK [187]) und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Falcon auf den Kopf gestellt, bis sämtliche Flüssigkeit ausgelaufen war, so dass nur ein Zellpellet übrig war. Das Zellpellet wurde in einem Zehntel des Ausgangsvolumens mit eiskaltem TFB1 durch Vortexen auf niedriger Stufe resuspendiert. Das Falcon wurde wieder 10 min auf Eis gestellt und anschließend für 15 min bei 3000 g und 4 °C zentrifugiert. Erneut wurde der Überstand verworfen und das Pellet wurde mit TFB2-Puffer in 1/40 des Ausgangsvolumens resuspendiert und 10 min auf Eis gestellt. Anschließend wurde die Suspension zu 200 µl in vorgekühlte 0,5 ml-Reaktionsgefäße verteilt und bei -80 °C eingefroren. Der Puffer war vor der ersten Verwendung zu autoklavieren und danach bei 8 °C zu lagern.

Tabelle 2-17 TFB1 100ml Ansatz

Reagenz	Volumen / Einwaage
Kaliumacetat	0,5 g
MgCl ₂	1 g
KCl	0,75 g
CaCl ₂	1,6 ml
Glycerin 87 %	17 ml
H ₂ O	ad 100 ml
auf pH 5,8 einstellen	

Tabelle 2-18 Zusammensetzung TFB2 50 ml Ansatz

Reagenz	Volumen / Einwaage
MOPS	0,1 g
CaCl ₂	3,8 ml (1 M)
KCl	0,0375 g
Glycerin 87 %	8,5 ml
H ₂ O	ad 50 ml

2.2.1.8 Transformation von Plasmid-DNA in Calciumchlorid-kompetente *E. coli* Zellen, Transformation nach HANNAHAN, Hitzeschock-Methode

Für die Transformation nach Hitzeschock-Methode, wurden die mittels CaCl_2 -Methode hergestellten, chemisch kompetenten Zellen (vergleiche 2.2.1.7) verwendet [186], [187]. Ein Aliquot der kompetenten Zellen wurde aufgetaut und wurden 50 bis 100 ng an Plasmid-DNA wurden hinzugefügt. Anschließend folgte eine Inkubation von 30 bis 120 min. Negativ geladene DNA näherte sich den positiv geladenen Calciumionen in der Zellmembran an. Nach der Inkubation auf Eis wurde für einen Hitzeschritt für 2 min bei 42 °C durchgeführt. Danach wurde bis zum nächsten Schritt auf Eis gelagert. Der Transformationsansatz wurde in 1 ml SOC-Medium pipettiert und für 45 min bei 37 °C und 130 rpm inkubiert. Bei diesem Schritt hatte der Transformand nun die Zeit das aufgenommene Plasmid zu vervielfältigen und durch Proteinbiosynthese mögliche Resistenzfaktoren auszubilden. Von dieser Zellsuspension wurden 25 bis 150 μl auf antibiotikahaltigen LB-Agarplatten ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Parallel wurde durch Transformation mit pBR322 oder pUC19 die Transformationskompetenz der Zellen bestimmt. Ein Ausstreichen auf antibiotikafreiem LB-Agar war eine Kontrolle für die Lebensfähigkeit der Zellen. Auch wurde ein Aliquot der kompetenten Zellen nicht mit Plasmid-DNA behandelt und als Kontrolle der Selektivität verwendet. Ein weiteres Aliquot wurde zur Bestimmung der Lebenskeimzahl verwendet (siehe 2.2.1.13).

2.2.1.8.1 Übersicht der Kontrollen

Eine KBE-Bestimmung der kompetenten Zellen ohne Antibiotikum (siehe 2.2.1.13) wurde zur Überprüfung durchgeführt, ob die Zellen lebensfähig sind. Die KBE-Bestimmung der kompetenten Zellen mit Antibiotikum, zur Prüfung, ob die Agarplatten intakt, bzw. die kompetenten Zellen nicht mit resistenten Bakterien kontaminiert sind. Ausplattieren des SOC-Mediums auf Platten ohne Antibiotikum zur Prüfung auf Kontamination. Kompetente Zellen + linearisiertes Plasmid zur Prüfung der Vollständigkeit der Restriktion und Prüfung, ob das Plasmid religieren kann. Kompetente Zellen + Ausgangsplasmid zur Berechnung der Transformationseffizienz auf Antibiotika-haltigem Agar-Platten.

2.2.1.8.2 Transformationseffizienz

Ein Maß für die Effizienz mit der sich ein Plasmid transformieren lässt, wird durch die Transformationseffizienz ausgedrückt, welche durch (Gl. 1) definiert werden kann:

$$\text{Transformationseffizienz} = \frac{\text{Anzahl der Transformanden}}{\mu\text{g eingesetzte DNA}} \quad (\text{Gl. 1})$$

2.2.1.9 Herstellung von elektrokompetenten Zellen

Aus einer ÜNK wurde eine 1:100 Verdünnung in 50 ml SOB-Medium angefertigt und diese bei 37 °C und 130 rpm bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 bis 0,6 inkubiert. Die Kultur wurde geerntet und in vorgekühlte Falcons überführt. Anschließend wurde die Kultur 30 min auf Eis gelagert, bevor Sie für 12 min bei 5500 rpm und 4 °C zentrifugiert wurde. Nach diesem Schritt wurde der Überstand verworfen und das verbliebene Pellet wurde mit einem Zehntel des Ausgangsvolumens mit sterilem, eiskaltem dH₂O resuspendiert. Anschließend wurde erneut für 12 min bei 5500 rpm und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und mit 1/25 des Ausgangsvolumens mit sterilem, eiskaltem dH₂O versetzt, um das Pellet zu resuspendieren. Erneut wurde für 12 min bei 5500 rpm und 4 °C zentrifugiert und der Überstand verworfen. Dieser Schritt war zu wiederholen. Der verbliebende Pellet wurde in einem Hundertstel des Ausgangsvolumens versetzt und resuspendiert. Die Suspension wurde zu 50 µl aliquotiert und bis zur weiteren Benutzung auf Eis gelagert. Bei der finalen Aufnahme des Pellets in dH₂O konnte zusätzlich 15%ig Glycerin zugegeben werden, wenn die Zellen bei 80 °C zur weiteren Verwendung gelagert werden sollten. Nach diesen Schritten lag eine weitgehend salzfreie Suspension vor, da sonst Kurzschlüsse bei der Elektroporation auftreten konnten.

2.2.1.10 Transformation von Plasmid-DNA in elektrokompetenten Zellen

10 bis 50 ng an Plasmid-DNA wurden mit einem Aliquot elektrokompetenter Zellen versetzt und 10 min auf Eis inkubiert. In vorgekühlte Elektroporationsküvetten (2 mm Elektrodenabstand) wurde der Ansatz überführt. Die Elektroporationsküvetten wurden maximal 2 x nach Reinigung und Autoklavieren wiederverwendet. Für 4 bis 5 ms wurde eine eingestellte Span-

nung von 2,5 kV für die Elektroporation verwendet. Weitere Einstellungen waren eine elektrische Kapazität von 25 μ F und einen Widerstand von 200 Ω . Die Suspension wurde in der Elektroporationsküvette mit 1 ml SOC-Medium versetzt und auf- und ab pipettiert. Anschließend wurde das gemischte Medium in ein steriles Reagenzglas überführt und 30 bis 45 min bei permissiver Temperatur inkubiert. Verschiedene Volumina wurden auf antibiotikahaltigem LB-Agar ausgestrichen.

2.2.1.11 Plasmid Curing

Unter Ausnutzung der Eigenschaft, dass die verwendeten *E. coli*-Stämme mit einem isogenen Stammhintergrund zu *E. coli* WT (GK571) nach mehreren Wachstumszyklen dazu tendieren spätere Bakteriengenerationen hervorbringen, die nicht mehr über die Plasmide verfügen, ließen sich Stämme selektieren, die nicht mehr das Plasmid der Parentalgeneration enthielten (vergleiche Kapitel 4.3.2). Für diese Arbeit wurden Stämme mit Plasmiden, die auf dem Klonierungsvektor pUC19, bzw. pUC18 aufbauten, über drei Passagen auf LB-Agarplatten ausgestrichen. Die Klonierungsvektoren pUC19 und pUC18 vermitteln über eine TEM-1 Betalactamase eine Resistenz gegenüber Betalactam-Antibiotika, wie z.B.: Ampicillin. Nach drei Passagen war kein Wachstum mehr auf Selektiv-Agarplatten mit Ampicillin möglich. So konnte aus *E. coli*-Stamm MII Δ icd 7 bp pHPNE19-02.1 der *E. coli*-Stamm MII Δ icd 7 bp erhalten werden, der noch Δ icd 7 bp enthielt, aber nicht mehr auf Selektiv-Agarplatten mit Ampicillin angezogen werden konnte, da das Plasmid nicht mehr vorhanden war.

2.2.1.12 Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration

2.2.1.12.1 Mikrodilutionsverfahren (Bouillondilutionsverfahren)

Beim Mikrodilutionsverfahren wurde eine Mikrotiterplatte mit 96 Vertiefungen verwendet. Hier wurde die Substanz als geometrische Verdünnungsreihe mit dem Faktor 2 in Müller-Hinton-Bouillon eingebracht. Jeweils 50 μ L wurden in jede Vertiefung pipettiert. Als Lebendkontrolle wurde für jedes Bakterium noch eine Kavität allein mit Bouillon gefüllt.

Von einer frischen ÜNK, unabhängig ob Flüssigkultur oder Agar-Nährboden wird auf eine optische Dichte (McFarland 0,5) eine eingestellte Bakteriensuspension in isotonischer Kochsalz erzeugt. Dafür wird die Kultur unter sterilen Bedingungen in eine 0,9%ige (m/V) Natriumchlorid-Lösung (NaCl) eingebracht, mittels Vortexen suspendiert und dann zu 1 mL im

Photometer vermessen. Ein McFarland-Standard von 0,5 bedeutet, dass eine Konzentration von ca. 10^8 KBE/mL vorliegt [188]. Statt mit dem Photometer kann der McFarland-Standard 0,5 auch über eine gesättigte BaSO_4 Lösung durch ein Suspendieren der Bakterienkultur in isotonischer Kochsalzlösung erreicht werden. 50 μL dieser Suspension wurden mit 4,95 mL MH-Medium versetzt und jeweils 50 μL davon wurden in die Kavitäten pipettiert. Durch die weitere Verdünnung wurde eine Konzentration von ca. 10^5 -Bakterienzellen erhalten und musste zeitnah innerhalb von ca. 30 min zum Beimpfen der Mikrotiterplatte verwendet werden. Neben der Lebenskontrolle durch die Kavität ohne Substanz war es auch notwendig eine Wachstumskontrolle in Form eines bereits charakterisierten Stammes mitzuführen. Zu den bereits vorliegenden 50 μL wurden in die Kavitäten 50 μL der eingestellten Bakteriensuspension gegeben. Hierbei war im Voraus zu beachten, dass die vorliegende Antibiotikakonzentration doppelt so hoch gewählt wird, wie sie zum Schluss gewünscht war. Durch die 1:1-Verdünnung stellte sich nach dem Beladen der Mikrotiterplatte die gewünschte Antibiotikakonzentration ein. Die beimpften Mikrotiterplatten wurden mit einer Klebefolie steril verschlossen oder durch eine an der Unterseite desinfizierten Mikrotiterplatte abgedeckt, und bei 37°C im Brutschrank für 18 h bis 24 h inkubiert. Nach frühestens 18 h wurden die Platten aus dem Brutschrank entnommen und ausgewertet. Als minimale Hemmkonzentration wurde die Vertiefung angesehen, die kein Wachstum mehr zeigte.

2.2.1.12.2 *Feinbestimmung*

Bei der Feinbestimmung wurde ähnlich zur Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration durch das Mikrodilutionsverfahren (2.2.1.12.1) vorgegangen. Der einzige Unterschied lag darin, dass statt einer geometrischen Verdünnungsreihe der zu untersuchenden Substanz bei diesem Verfahren in konstanten Abständen die Konzentration des Antibiotikums erhöht wurde. So konnte eine genaue Konzentration ermittelt werden, die zur Hemmung des Bakterienwachstums führt. Besonders für die Vorbereitung der Selektionsversuche in Abschnitt 3 wurde dieses Verfahren eingesetzt.

2.2.1.12.3 *Agardilutionsverfahren*

Eine Kolonie wurde von einer Agaroseplatte mit einem sterilen Glasstab gepickt und eine Kavität einer 96er Mikrotiterplatte überführt. Die Hälfte der Kavitäten der Mikrotiterplatte

wurde zuvor mit 100 µl MH-Bouillon gefüllt. Die fertig beimpfte Mikrotiterplatte wurde für 18 h bei 37°C im Brutschrank zur Inkubation gelagert. Bei den weiteren Schritten wurde ein 48-zähliger Replikator verwendet, welcher eine gleichzeitige Bearbeitung von 48 Kulturen ermöglichte. Zum Sterilisieren wurde der Replikator in reinen Ethanol gestellt und kurz hin und her bewegt. Anschließend wurde an einer Flamme das anhaftende Ethanol entzündet. Am nächsten Tag wurde die zweite Hälfte der Mikrotiterplatte mit 100 µl 0,9iger NaCl-Lösung gefüllt und ein steriler Replikator wurde kurz in die bewachsene Kultur getaucht und dann direkt in die NaCl-Lösung gesenkt. Am Replikator haftete an jedem Zahn jeweils ca. 1 µl der gewachsenen Kultur. Nach kurzem schütteln des Replikators wurde dieser angehoben. In der Kavität mit Kochsalz lag nun eine ca. 1:100 Verdünnung der Kultur vor. Der Replikator wurde erneut sterilisiert, dann wieder in die Kochsalzlösung gestellt, und anschließend wurden die verschiedenen LB-Agarplatten mit den unterschiedlichen Konzentrationen beimpft. Nach Inkubation über Nacht und bei 37 °C wurde am folgenden Tag die minimale Hemmkonzentration ermittelt. Auch hier galt, dass als minimale Hemmkonzentration die Vertiefung gewählt wurde, bzw. die Konzentration gewählt, die kein Wachstum mehr zeigte. Zu beachten war, dass diese Methode Schwankungen unterlag und um eine MHK-Stufe das Ergebnis schwanken konnte.

2.2.1.13 Bestimmung der Keimzahl

2.2.1.13.1 Photometrische Näherung

Die optische Dichte wurde bei 600 nm gemessen. Nach MCFARLAND entsprach eine $OD_{600\text{ nm}}$ 0,25 circa $3 \cdot 10^8$ Bakterienzellen/ml und eine $OD_{600\text{ nm}}$ 0,5 entsprach circa $6 \cdot 10^8$ Bakterienzellen/ml [188]. Diese Methode lieferte eine grobe Orientierung, zusätzlich war zu beachten, dass der lineare Messbereich eines Photometers aufgrund des Lambert Beer'schen Gesetzes begrenzt war und bei einer Messung der optischen Dichte auch tote Keime erfasst wurden.

2.2.1.13.2 Bestimmung der Lebendkeimzahl (KBE, Kolonie bildenden Einheiten)

Eine geometrische Verdünnungsreihe wurde hergestellt, in der die Probe stufenweise 1:10 bis zu einer Verdünnung von 10^{-9} verdünnt wurde. Einer Bakteriensuspension wurden 500 µl entnommen und mit 4,5 ml isotonischer Kochsalzlösung durch leichtes Vortexen vermischt. Das war die erste Verdünnungsstufe mit 10^{-1} . Dieser Vorgang wurde nun wiederholt, um eine Ver-

dünnung von 10^{-2} zu erhalten. Dieses Vorgehen wurde fortgeführt bis sämtliche Verdünnungsstufen erhalten wurden. Anschließend wurden auf LB-Agar-Platten 50 μ l der Verdünnungen 10^{-2} bis 10^{-9} mit einem sterilen Glasstab ausgestrichen. Die Platten wurden über Nacht bei 37 °C im Brutschrank inkubiert und am folgenden Tag wurden die gewachsenen Kolonien ausgezählt. Die Verdünnungsstufe bei der noch die einzelnen Kolonien zu erkennen waren, wurde zur Berechnung der KBE herangezogen. Die KBE berechnete sich nach (Gl. 2) [187].

$$\frac{KBE}{ml} = \frac{\text{Anzahl der Kolonien}}{\text{Verdünnungsstufe} \times \text{aufgetragenes Volumen (ml)}} \quad (\text{Gl. 2})$$

2.2.1.14 Bestimmung der Generationszeit

Zur Ermittlung der Generationszeit war für den zu untersuchenden Stamm eine ÜNK mit 3 ml LB-Bouillon anzusetzen. Am folgenden Tag (nach ca. 12-18 h) wurde die ÜNK 1:100 in ein Gesamtvolumen von 100 ml LB-Medium verdünnt. Die Suspension wurde bei 37 °C und 130 rpm unter Schütteln inkubiert. Alle 20 min oder 30 min wurde je ein Milliliter der Suspension entnommen und photometrisch vermessen (OD_{550nm}). Anhand der optischen Dichte wurden die Verdünnung zur Bestimmung der Lebendkeimzahl (siehe Abschnitt 2.2.1.13) gewählt. Anschließend wurden die LB-Agarplatten bei 37°C für 18 h inkubiert. Nach Auftragen des log KBE/ml gegen die Zeit (t), ließ sich für den Bereich der exponentiellen Wachstumsphase eine Regressionsgerade berechnen und aus dem Anstieg der Regressionsgerade (m) ließ sich die Generationszeit (g) nach (Gl. 3) ermitteln.

$$\text{Generationszeit } g = \left(\frac{\log KBE_{t_2} - \log KBE_{t_1}}{t_2 - t_1} \right)^{-1} \log 2 \quad (\text{Gl. 3})$$

2.2.1.15 Ciprofloxacin-Forwardassay

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

Mit einer Kolonie einer frisch ausgestrichenen Kultur wurden 50 ml SOB-Medium beimpft und zusätzlich wurde eine Ampicillin Konzentration von 100 μ g/ml eingestellt. Als ÜNK wurde diese

Kultur im Glaskolben bei 37 °C und 130 rpm für 18 h inkubiert. Die gewachsene Kultur wurde in ein Falcon überführt und für fünf Minuten bei 2000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet wurde in 2,5 ml wieder suspendiert. Auf diese 1:20 Einengung wurde in den Wiederholungsversuchen verzichtet, da sich bedingt durch das SOB-Medium bereits hohe KBE ergaben. 50 µl dieser (1:20 eingeeengten) Kultur wurde auf 8x MHK Ciprofloxacin LB-Agar-Platten ausgestrichen. Nach 24 h und nach 48 h wurden die Kolonien gezählt und einzelne Kolonien auf neue 8x MHK Ciprofloxacin LB-Agar-Platten überimpft. Mittels einer Schablone, die unter die Agarplatte beim Auftragen platziert wurde, konnten so 48 Kolonien auf einer Platte sortiert aufgetragen werden. Diese Platte wurde bei 37°C für 18 h im Brutschrank inkubiert. Am Folgetag wurden die wieder gewachsenen Kolonien auf einzelnen Platten ausgestrichen, gleichzeitig wurden ÜNK Kulturen in 3 ml LB-Medium angesetzt, um am nächsten Tag eine MHK-Bestimmung durchzuführen. Auch bat sich an ein Agardilutionsverfahren durchzuführen, um schnell viele Kolonien auf ihre MHK von Fluorchinolonen zu untersuchen.

2.2.1.16 Nummerierung der selektierten Mutanten

Die unterschiedlichen selektierten Mutanten wurden nummeriert. Zuerst wurde die Mutante nach dem Ausgangsstamm benannt, beispielweise MII pHPNE19-02.1. Je nach Position der Mutante auf der 50er Platte (LB-Agarplatte mit einem Raster für 50 verschiedene Kolonien) aus Schritt 4 in Tabelle 4-4 wurde die Mutante mit einer Zahl von 1-50 nummeriert (MII pHPNE19-02.1 **Nr. 43**). Da teilweise mehrere dieser 50er-Platten in einem Zwischenschritt verwendet wurden, kam vor die Zahl eine zusätzliche römische Zahl hinzu (z.B. MII pHPNE19-02.1 Nr. I 43). Nicht alle Mutanten auf den 50er-Platten wurden gesichert. Bei WT-K wurde statt mit römischen Zahlen mit arabischen Zahlen nummeriert (z.B. WT-K pHPNE19-02.1 1 Nr. 2 45). Wurde eine Wiederholung des Selektionsversuchs durchgeführt, so wurde noch vor die Nummerierung der 50er-Platte eine weitere Zahl eingefügt (z.B. WT pHPNE19-02.1 1 Nr. I 2). Bei den Kontrollansätzen mit pUC19 wurde nur eine einzige 50er-Platte verwendet. Bei WT, WT-K und MII wurden jeweils zwei Selektionsversuche durchgeführt. Bei MII entfällt die Nummerierung für den Selektionsversuch anders aus. Hier wurde in Klammern hinter die Positionsnummer der 50er-Platte die Nummer des Selektionsversuchs aufgeführt. Im weiteren Verlauf wurde auf diese Nummer bei MII verzichtet. Daher fehlt hier die Nummerierung für

verschiedene Selektionsversuche. Auch wurden diese Versuche nicht wiederholt, so dass sich nur Nummerierungen mit einer Zahl von 1-50 ergeben (z.B. WT pUC19 **Nr. 3**).

2.2.1.17 Bestimmung der Mutationsfrequenz

Aufbauend auf der Methode der *In-vitro*-Selektion resistenter Keime in Kapitel 2.2.1.14, konnte die Mutationsfrequenz bestimmt werden. Parallel zum Ausstreichen auf Antibiotikahaltigen LB-Agarplatten wurde eine KBE (siehe Kap. 2.2.1.9) der (eingeeengten) Bakterien-suspension bestimmt. Nach der ersten Nacht wurden die Kolonien der KBE-Bestimmung ausgezählt. Nach der ersten Passage auf Antibiotikahaltigen LB-Agarplatten wurden die Mutanten gezählt. Die Mutationsrate wurde nach (Gl. 4) berechnet.

$$\text{Mutationsfrequenz} = \frac{\text{Mutanten}(ml)}{\text{KBE}(ml)} \quad (\text{Gl. 4})$$

2.2.2 Methoden der Molekularbiologie - Arbeiten mit DNA/RNA

2.2.2.1 Isolierung von Nukleinsäuren

2.2.2.1.1 Isolierung von RNA (Nucleospin® RNA II Kit)

Für die Isolierung wurde die Anleitung des Nucleospin RNA II Kits (Mini Prep) befolgt [189].

2.2.2.1.2 Isolierung von Gesamt-DNA mittels Kochmethode

Genomische DNA ließ sich schnell mittels Kochmethode isolieren. Hierzu wurden drei Kolonien von einer am Vortag ausgestrichenen Agarplatte mit einem sterilen Glasstab gepickt und in 100 µl Wasser eingerührt, bzw. resuspendiert. Anschließend wurde der Ansatz bei 100° C für 15 min in einem Thermocycler inkubiert und danach auf Raumtemperatur runtergekühlt. In einer Zentrifuge wurde der Überstand bei 13.000 rpm für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein frisches Reaktionsgefäß überführt. Darin befand sich genomische DNA.

2.2.2.1.3 *Isolierung von genomischer-DNA*

Zur Isolierung von RNA-freier genomischer-DNA (gDNA) wurde das DNeasy® Blood & Tissue Kit von Qiagen [190] und das MasterPure™ Complete DNA and RNA Purification Kit von Epicentre [191] verwendet. Den jeweiligen Anleitungen entsprechend wurde die Isolierung durchgeführt.

2.2.2.1.4 *Isolierung von Plasmid-DNA durch alkalische Lyse*

3 mL ÜNK (in reichem Medium: LB, YT oder TB) wurden angesetzt und bei Bedarf wurde ein Antibiotikum zur Selektion zugegeben. Bei 37° C wurde für ca. 18 h über Nacht bei 130 rpm geschüttelt. Das Volumen des verwendeten Gefäßes muss mindestens viermal größer sein als das Volumen der angesetzten Bakterienkultur. Das Gefäß war so zu verschließen, dass ein Sauerstoffaustausch möglich ist. Schütteln bei 130 rpm musste eine ausreichende Belüftung der Kultur erlauben. Am folgenden Tag wurden 1,5 bis 3 mL der ÜNK in ein 2 mL Reaktionsgefäß überführt und bei 5000 g für 3 min und bei 4° C abzentrifugiert. Der Überstand wurde restlos abgenommen und verworfen. Das Zellpellet sollte so trocken wie möglich für die weitere Verwendung sein. In 100 µl eiskaltem GTE-Puffer wurde das Pellet vollständig resuspendiert. Nach dem Vortexen wurden 200 µl Lysepuffer (frisch hergestellt) zugegeben. Es wurde sofort 5x geschüttelt und nicht gevortext. Die Probe wurde nun für 1 min auf Eis gestellt. Nach der Inkubation bei RT oder auf Eis wurden 150 µl eiskalter Neutralisationspuffer zum Ansatz gegeben und sofort gevortext. Danach wurde die Probe 3 bis 5 min auf Eis inkubiert. Zelltrümmer und chromosomale DNA wurden abzentrifugiert (15.000 rpm, 5 min, 4° C). 400 µl des Überstandes wurden vorsichtig in ein neues 1,5 mL Eppendorf-Gefäß überführt.

2.2.2.1.4.1 *Optional: Phenol-Chloroform-Extraktion*

Die DNA-Lösung wurde mit einem Volumen Phenol/Chloroform/ Isoamylalkohol (25:24:1 v/v) versetzt und geschüttelt. Für 5 min und 13.000 rpm wurde zentrifugiert. Durch Phenol wurden Proteine denaturiert und sammelten sich in der unteren, organischen Phase an, in der oberen Phase (wässrig) befand sich die DNA. Die obere Phase wurde in ein frisches Reaktionsgefäß überführt. Zugabe von 800µl 100 % Ethanol p.a. oder 400 µl Isopropanol p.a., der Ansatz wurde durch Vortexen vermischt und anschließend 2 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die

Plasmid-DNA wurde abzentrifugiert (20.000 rpm, 25 min, 4°C) und vorsichtig wurde der Überstand abgesaugt. Das (nicht sichtbare) Pellet wurde mit 1 mL 70 % Ethanol p.a. gewaschen. Zurückgewinnen des Pellets durch Zentrifugation (20.000 rpm, 5 min) und erneutes vorsichtiges Absaugen des Überstands und Trocknen der Plasmid-DNA bei 37° C und für 20 min. Das Pellet wurde in 30-100 µl 1:10 verdünnten EB-Puffer aufgelöst und zur weiteren Verwendung bei -20° C gelagert.

2.2.2.1.4.2 RNase A Verdau - Elimination RNA via Ribonuclease A from DNA

Tabelle 2-19 Volumenbeispiele für RNase A Verdau

Nr.	Reagenz	30 µL	40 µl	50 µl	100 µl
1	RNase A (10 mg/ ml)	0,8 µl	1 µl	1,25 µl	2,5 µl
2	EtOH 100 %	37,5 µl	50 µl	62,5 µl	125 µl
3	NaCl 5 M	1,5 µl	2 µl	2,5 µl	5 µl
4	EtOH 70 %	240 µl	320 µl	400 µl	800 µl

Beispiel (30 µl Ansatz) zur Durchführung: 0,8 µl RNase A (10 mg/ ml) zu 30 µl DNA-Lösung geben, fünfmal invertieren und für 30 min bei 37° C inkubieren. 1,5 µl NaCl (5 M) und 37,5 µl EtOH 100 % zugeben, Tube mehrmals invertieren und anschließend für 5 min bei 13.000 rpm zentrifugieren. Den Überstand verwerfen, das Pellet zweimal mit 240 µl EtOH 70 % waschen (zentrifugieren für 1 min bei 13.000 rpm jeweils). Überstand verwerfen und restlichen Ethanol vorsichtig mit einer Pipette entfernen, das Pellet trocknen lassen. Pellet wird weißlich durchsichtig, wenn es vorher sichtbar war. DNA in 30 µl TE (1:10) im Wasserbad bei 60° C für 10-60 min eluieren.

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

Lysepuffer: Zur Herstellung von 1 ml Lysepuffer wurden 200 µl 1 M NaOH (0,2 M), 100 µl 10 % SDS (1 %) und 700 µl dH₂O gemischt. Der Lysepuffer ist vor jeder Verwendung frisch anzusetzen.

Neutralisationspuffer (pH 4,8): Zur Herstellung von Neutralisationspuffer werden 60 ml 5 M Kaliumacetatlosung mit 11,5 ml Eisessig und 28,5 ml dH₂O vermischt und der Puffer ist bei Raumtemperatur aufzubewahren.

2.2.2.1.5 Isolierung von Plasmid-DNA durch das Hi Yield® Plasmid Mini Kit

War eine besonders reine Plasmidisolierung notwendig, wurde auf das Hi Yield® Plasmid Mini Kit der Firma Südlabor Cat. No. HYPD100 (2012) [192] verwendet. Dem *User Manual* folgend [192] wurde die Isolierung durchgeführt.

2.2.2.2 Reinigung und Konzentrierung von DNA mit Nucleospin® Extract II Kit

Das Nucleospin® Extract II Kit wurde zur Aufreinigung und Konzentrierung von PCR-Produkten verwendet. Hierbei wurden die Anweisungen des Herstellers in der Bedienungsanleitung befolgt [193]. Gleiches gilt für die Extraktion von PCR-Fragmenten nach einer Agarose-Gelelektrophorese.

2.2.2.3 Polymerase Kettenreaktion PCR

Mit der 1983 durch KARY MULLIS entwickelten Polymerase-Kettenreaktion (englisch: *polymerase chain reaction*, PCR) wurde die Möglichkeit geschaffen DNA zu amplifizieren ausgehend von wenig Ausgangsmaterial (Abbildung 2-3) [194].

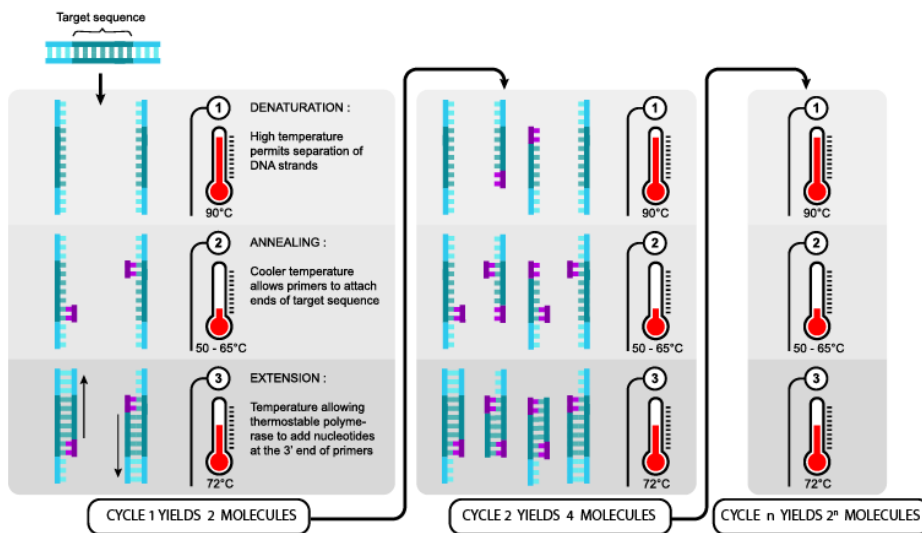


Abbildung 2-3 Theoretisches Prinzip der Polymerase-Kettenreaktion [195]

① **Denaturierung** (*Denaturation*) Ausgangspunkt sind zwei einzelsträngige DNA-Moleküle, die durch Erhitzen auf 90 °C (Denaturierung) erhalten werden. ② **Primeranlagerung** (*Annealing*) nach Abkühlen auf 50 bis 65 °C lagern sich Primer an die Enden der Zielsequenz an. ③ **Verlängerung** (*Extension*) Bei 72 °C kann verwendete thermostabile Polymerase Nucleotide beginnend an den 3'-Enden der Primer Nucleotide hinzufügen. Δ Die ersten Verlängerungsprodukte (türkisblau) sind länger als die späteren Endprodukte, fallen nach mehreren Zyklen gering an. Ab Ende zweiter Zyklus liegen 4 DNA-Moleküle vor. Nach n-Zyklen ergeben sich $2^{(n-1)}$ Endprodukte [196].

Tabelle 2-20 Vergleich der verwendeten thermostabilen Polymerasen

Eigenschaft	Dream Taq®-Polymerase	Phusion®-Polymerase
Synthesegeschwindigkeit	1000-2000 bp/min	2000-4000 bp/min
Denaturierungstemperatur	95 °C	98 °C
5'-3'-Exonuklease (<i>proofreading</i>)	negativ	positiv
A-Überhang	positiv	negativ

2.2.2.3.1 *Primer-Design*

Für die Planung der sequenzspezifischen Primer wurde im Rahmen dieser Arbeit mit der Software Vector NTI® gearbeitet. Zur stabilen Binden und an die Template-DNA wurde darauf geachtet, dass mindestens die letzten beiden Basen am 3'-Ende Oligonukleotide G oder C waren. Auch wurde beachtet, dass der GC-Gehalt der konstruierten Primer möglichst bei 50% lag (45% bis 60%). Durch Softwareeinstellungen war es möglich innerhalb einer bekannten Sequenz zu erkennen, ob die Primer auch bei niedriger Affinität gezielt am gewünschten Sequenzbereich eine Bindung eingehen.

2.2.2.3.2 *Standard-PCR-Ansatz*

Ein Standard-Reaktionsansatz für eine DreamTaq-PCR mit dem passenden Zeitschema ist in Tabelle 2-21 und Tabelle 2-22 zu finden. Die Annealingtemperatur für einen bestimmten Primer ließ sich durch Berechnung der Schmelztemperatur des Primers und einer Subtraktion von 5 °C ermitteln. Die Formel zur Ermittlung der Schmelztemperatur orientierte sich an der (4+2)-Regel (Gl. 5) [187]. Jedes Cytosin und Guanin wird 4 gezählt. Jedes Adenin und Thymin wurde mit 2 gezählt. Bei unterschiedlichen Annealing-Temperaturen der Primer war die niedrigere Temperatur von beiden zu wählen, bzw. wurde über eine Gradienten-PCR (2.2.2.3.3.1) die ideale Annealing-Temperatur experimentell ermittelt.

$$T_m = (\text{Anzahl der Basen } A + T) \times 2 + (\text{Anzahl der Basen } C + G) \times 4 \quad (\text{Gl. 5})$$

Für einen Standard-PCR-Ansatz wurden bis auf die Template-DNA sämtliche Bestandteile in einen Master-Mix gegeben, dieser wurde durch Vortexen gemischt und anschließend auf 200 µl Reaktionsgefäße verteilt, dann wurde die fehlende Template-DNA hinzugefügt und erneut durch Vortexen gemischt und mit der Tischzentrifuge abzentrifugiert.

Tabelle 2-21 Standard Reaktionsansatz DreamTaq™PCR

Reaktionsansatz	25 µl Ansatz (Menge in µl)
10 x DreamTaq™Puffer	2,5
2 mM dNTPs (Mix)	2,5
Forward Primer (10 pmol/µl)	0,5
Reverse Primer (10 pmol/µl)	0,5
DreamTaq™ DNA Polymerase	0,125
DNA-Template	0,8 – 1
dH ₂ O (LiChrosolv™ Merck®)	ad 25 µl

Tabelle 2-22 Standard-PCR-Programm

Schritt	Temperatur	Dauer	Zyklen
Initial Denaturierung	95 °C	5 min	1 x
Denaturierung	95 °C	1 min	
Primer-Annealing	50-70 °C	30 s	30 x
Elongation	72 °C	60 s/kb	
Finale Elongation	72 °C	5 – 10 min	1 x

2.2.2.3.2.1 dNTP-Mix

Einzelne dNTPs (dATP, dTTP, dGTP, dCTP) wurden zu einer Endkonzentration von 2 mM mit dH₂O (LiChrosolv™ Merck®) vermischt. Nach dem Aliquotieren in Reaktionsgefäße wurden diese bei -20 °C aufbewahrt.

2.2.2.3.3 Anwendungen der Polymerase-Kettenreaktion

2.2.2.3.3.1 Gradienten-PCR

Bei Primerpaaren mit unterschiedlichen Annealingtemperaturen oder bei neuen Primerpaaren war die Gradienten-PCR notwendig, um die geeignete Annealingtemperatur für den entsprechenden PCR-Ansatz zu ermitteln. Dazu wurde eine 50 µl – 120 µl Master-Mix angesetzt, der bereits die Template-DNA enthielt. Jeweils 10 µl wurden auf 200 µl Reaktionsgefäße verteilt. Für eine Gradienten-PCR war ein Thermocycler geeignet, bei dem sich ein Temperaturgradient (z.B. Biometra T Gradient) programmieren ließ. In der Gradienten-PCR wurde statt einer festen Annealing-Temperatur ein Temperaturgradient eingeführt.

2.2.2.3.3.2 Amplifizierung von Fragmenten zur Klonierung

Für Fragestellungen, die einer Klonierung bedurften, musste das benötigte DNA-Fragment möglichst fehlerfrei amplifiziert werden. Hierzu wurde die 3'-5' Exonukleasefunktion der Phusion™ High-Fidelity DNA Polymerase (*Pfu*-DNA-Polymerase aus *Pyrococcus furiosus*) ausgenutzt. Verglichen mit der DreamTaq™-DNA-Polymerase aus *Thermus aquaticus* war die Fehlerrate 50-mal niedriger.

Tabelle 2-23 Zusammensetzung Phusion-PCR-Ansatz

Reaktionsansatz	50 µl Ansatz (Menge in µl)
5 x DreamTaq™ Puffer	10
2 mM dNTPs (Mix)	5
Forward Primer (10 pmol/µl)	0,5
Reverse Primer (10 pmol/µl)	0,5
Phusion™ High-Fidelity DNA Polymerase	0,5
DNA-Template	0,8 – 1
dH ₂ O (LiChrosolv™ Merck®)	ad 50 µl

Tabelle 2-24 Phusion-PCR-Programm

Schritt	Temperatur	Dauer	Zyklen
Initial Denaturierung	98 °C	5 min	1 x
Denaturierung	98 °C	30 s	
Primer-Annealing	T _a °C + 3 °C	30 s	30 x
Elongation	72 °C	15 - 30 s/kb	
Finale Elongation	72 °C	5 – 10 min	1 x

2.2.2.3.3.3 ARMS-PCR zum Nachweis einer spezifischen Mutation

Die ARMS-PCR (englisch: Amplification Rerfractory Mutation System) wurde 1989 von NEWTON *et al.* [197] entwickelt und lässt die Aussagen über Sequenzeigenschaften zu. Durch das Design der verwendeten Primer konnten spezifische Punktmutationen identifiziert werden. Lag eine Punktmutation vor, so konnte das 3'-Ende eines der beiden Primer exakt an die Position binden. Die drittletzte Base des Primers war so gestaltet, dass eine Fehlpaarung stattfand, und damit die Bindung geschwächt war. Als Duplex-PCR konzipiert lässt sich mit dieser Methode ein Bandenmuster erkennen, das Aussagen über die Sequenz erlaubt.

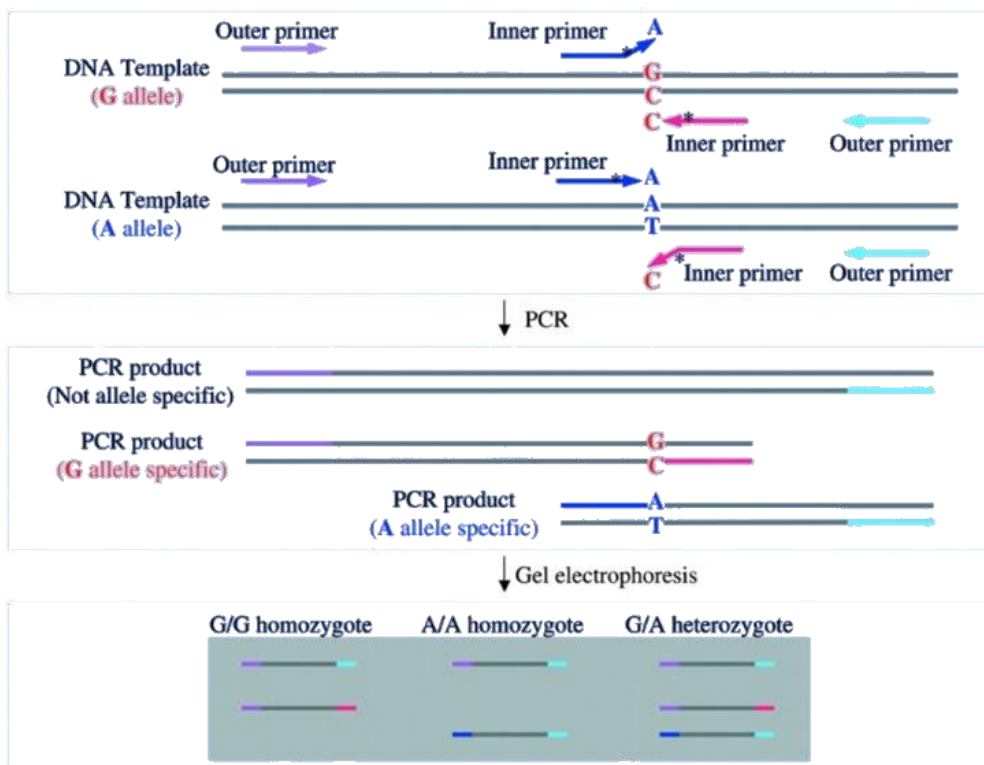


Abbildung 2-4 Prinzip der klassischen ARMS-PCR [198]

Beispiel Identifizierung einer G/A-Heterozygoten und Verwendung einer Duplex-PCR mit vier unterschiedlichen Primern

2.2.2.3.3.4 SOEing-PCR (gene Splicing by Overlap Extension PCR)

Durch die Konstruktion von Primern, die einen komplementären Bereich zu einem anderen DNA-Fragment enthalten, ließen sich mittels der SOEing-PCR zwei DNA-Fragmente im Rahmen einer PCR-Anwendung miteinander fusionieren. Einer SOEing-PCR gingen zwei Standard-PCRs voraus (siehe 2.2.2.3.2 und 2.2.2.3.3.2). Nach Reinigung der amplifizierten Fragmente, wurden

die Fragmente in einen neuen PCR-Ansatz zusammengeführt. Nach der initialen Denaturierung im Thermocycler banden homologe Bereiche aneinander, und es bildete sich ein Zwischenprodukt mit zwei freien 3'-OH-Enden. Hierfür wurden 7-10 Zyklen vorgesehen. Anschließend wurden die Außenprimer für das Fusionsprodukt aus den Vorbereitungs-PCR zugegeben, was zur exponentiellen Amplifikation des Fusionsprodukts führte und weitere 20 bis 25 Zyklen wurden verwendet. Das Fusionsprodukt wurde durch Agaroseelektrophorese auf seine Größe untersucht und aus dem Gel extrahiert. Über die Außenprimer konnten Schnittstellen eingeführt werden, welche eine spätere Klonierung beispielsweise in einen Vektor zulassen [199].

2.2.2.3.4 Reverse Transkription

In dieser Arbeit wurde das Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit for RT-qPCR von Thermo Fisher Scientific verwendet [200]. Es galten die gleichen Arbeitsbedingungen wie bei der Isolierung von RNA (vergleiche Abschnitt 2.2.2.1.1). Vorgehen nach Herstellervorgaben.

2.2.2.3.5 Real-time quantitative PCR

Nach Isolierung von Gesamt-RNA wurde die hierin enthaltene mRNA in cDNA umgeschrieben und als Template für eine *real-time quantitative PCR* verwendet [27]. Es wurde ein fertiger Master-Mix verwendet (SYBR® Green PCR Master Mix) (Tabelle 2-25 und Tabelle 2-26), der für die PCR alle notwendigen Komponenten enthält.

Tabelle 2-25 Zusammensetzung Reaktionsansatz für *real-time quantitative PCR* [201]

Reaktionsansatz	25 µl Ansatz (Menge in µl)
SYBR® Green Mix, no ROx	12,5
Forward Primer (10 pmol/µl)	3,75 pmol
Reverse Primer (10 pmol/µl)	3,75 pmol
ROX (5 µM) 10 x diluted	0,025
Template cDNA 1:10 dil.	2,5
Wasser (Nuclease frei)	ad 25,0

Tabelle 2-26 Temperatur- und Zeitprofil für einen *real-time quantitative PCR*-Ansatz [201]

Schritt	Temperatur	Dauer	Zyklen
Initiale Denaturierung	95 °C	10 min	1 x
Denaturierung	95 °C	15 s	
Primer-Annealing	58 °C	30 s	40 x
Elongation	72 °C	30 s	

cDNA wurde 1:10 in RNase-freiem Wasser verdünnt. Als weiterer Bestandteil wurde ROX (6-Carboxy-X-Rhodamin) ergänzt, das als interner Kalibrierungsfarbstoff diente. Die benötigte Anzahl der PCR-Zyklen wurde C_T -Wert genannt (englisch: cycle of threshold) und entsprach dem Zeitpunkt bzw. dem Zyklus der PCR, in dem sich das Fluoreszenzsignal gerade deutlich vom Hintergrund unterschied. Ermittelte Werte für das zu untersuchende Gen mussten auf ein Housekeeping-Gen, bzw. Referenzgen (in dieser Arbeit *cysG*-Referenz) bezogen werden. Grundlage dieser Berechnung war die Tatsache, dass in jedem Zyklus die zur Verfügung stehende Menge an dsDNA verdoppelt wurde (siehe Abschnitt 2.2.2.3). Wuch der C_T -Wert um eine Einheit ab, so lag ein Expressionsunterschied um den Faktor zwei vor. Mithilfe der $\Delta\Delta C_T$ -Methode (Gl. 6) konnten die Ergebnisse in Abschnitt 3.1.4 ermittelt werden [202].

$$\text{Relative Genexpression} = \frac{2^{\Delta C_T(\text{Targetgen})}}{2^{\Delta C_T(\text{Referenzgen})}} \quad \text{Ratio} = 2^{-\Delta\Delta C_T} \quad (\text{Gl. 6})$$

Neben einer Negativkontrolle (NTC), bei der cDNA fehlte, wurde eine *no amplification* Kontrolle (NAC) (siehe Abschnitt 2.2.2.3.4) [27]. Abschließend wurde nach der *real-time quantitative PCR* eine Schmelzkurvenanalyse der Produkte durchgeführt [27].

2.2.2.3.5.1 Haushaltsgen *cysG*

Für *cysG* wurde und eine Annealing-Temperatur von 63 °C gewählt [27].

Tabelle 2-27 Zusammensetzung Gradient mit den Primern für *real-time quantitative PCR*

Reaktionsansatz	150 µl Ansatz (Menge in µl)
10x DreamTaq Buffer	15,0
dNTP Mix (2mM)	15,0
Forward Primer (10 pmol/µl)	3,0
Reverse Primer (10 pmol/µl)	3,0
D-Taq (5u/µl)	0,75
Template DNA	3,0
Wasser (Nuclease frei)	ad 150,0

Tabelle 2-28 *cysG*-Amplifikation PCR-Programm

Schritt	Temperatur	Dauer	Zyklen
Initiale Denaturierung	95 °C	5 min	1 x
Denaturierung	95 °C	1 min	30 x
Primer-Annealing	54 - 70 °C	45 s	

Elongation	72°C	30 s	
Finale Elongation	72 °C	5 min	1 x

2.2.2.4 Auftrennung von DNA - Agarose-Gelelektrophorese

Für 0,5 x wurde 50 x TAE-Puffer 1:100 verdünnt. Nach Abkühlen auf ca. 50 °C wird Ethidiumbromid bis zu einer endgültigen Konzentration von 0,1 µg/mL zugegeben und in die vorbereitete Apparatur gegossen. Mittels einer Dokumentationsanlage wurde unter Verwendung von UV-Licht der entsprechenden Wellenlänge das Gel betrachtet und eine Aussage über die Fragmentgröße getroffen. Es wurde DNA Gel Loading Dye (6x) [203] oder eine selbst gemischte Beschwererlösung verwendet. Hierzu wurden Bromphenolblau und Xylencyanol mit 15 % Polysucrose-Lösung vermischt, so dass die Farbstoffe in einer Endkonzentration von 0,25 % vorlagen.

50 x TAE-Puffer: Tris-Acetat (Tris-Base) wurde zu einer Endkonzentration von 2 M (242,3 g) mit EDTA (18,6 g) zu einer Endkonzentration von 50 mM in 700 ml dH₂O vermischt und mit Eisessig (100% Essigsäure) auf einen pH 8,0 eingestellt. Danach wurde auf 1 l mit dH₂O aufgefüllt.

2.2.2.5 Enzymatische Behandlung von DNA

2.2.2.5.1 Restriktionsverdau von DNA

Als DNA-Polymerase wurde die Phusion™ High-Fidelity DNA Polymerase verwendet (Tabelle 2-20). Die Ligation wurde mit T4-Ligase (Fermentas / Thermo Fisher Scientific) gemäß Herstellerangaben durchgeführt. Nach der Amplifikation wurde das Produkt mit dem Nucleo-Spin® Extract II Kit (2.2.2.2) gereinigt. Danach folgte der Verdau mit den gewünschten Restriktionsenzymen (2.2.2.5.1). Parallel zum Verdau der PCR-Produkte wurde das Plasmid mit den gleichen Restriktionsenzymen fragmentiert, bzw. linearisiert und mit alkalischer Phosphatase dephosphoryliert. Um die genaue Konzentration von Vektor und Insert zu ermitteln wurde im Nanodrop-Spectrophotometer vermessen (2.2.2.6.2). In einem molaren Verhältnis von 1 zu 3 (Vektor zu Insert) wurde die Ligation angesetzt und für 16 h bei 16 °C inkubiert. Nach der Ligation wurde der Ligationsansatz in *E. coli* JM109 transformiert (0) und auf den geeigneten Agarplatten mit Selektionsantibiotikum ausgestrichen.

2.2.2.5.2 Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus

Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus (englisch: Restriction Fragment Length Polymorphism, RFLP) ist eine Methode zur Ermittlung des genetischen Fingerabdrucks. Dabei werden DNA-Fragmente durch Restriktionsenzyme geschnitten und mithilfe einer Gelelektrophorese ihrer Länge nach geordnet, wodurch zwei verschiedene DNA-Proben miteinander verglichen werden können [204].

2.2.2.5.2.1 *gyrA*

Für den Nachweis wurde ein modifizierter PCR-RFLP-Assay verwendet, um die Punktmutation in *gyrA* (S83L) in *E. coli*-Stämmen darzustellen. Durch die Punktmutation geht eine Schnittstelle für das Restriktionsenzym *Hin*fl verloren. Während die Wildtypsequenz in *gyrA* zwei Schnittstellen aufweist, findet sich nach *gyrA* (Ser – 83 – Leucin) nur noch eine Schnittstelle. Das PCR-Fragment wurde mit den Primern *gyrA*_5-1 und *gyrA*_3-1 amplifiziert und anschließend mit *Hin*fl fragmentiert. Nach Auftrennung in der Gelelektrophorese konnte anhand des Bandenmusters im Gel unterschieden werden, ob eine Punktmutation in *gyrA* vorlag.

2.2.2.5.2.1.1 PCR-Bedingungen

Tabelle 2-29 Reaktionsansatz DreamTaq™ PCR

Reaktionsansatz	25 µl Ansatz (Menge in µl)
10 x DreamTaq™ Puffer	2,5
2 mM dNTPs (Mix)	2,5
Forward Primer (10 pmol/µl)	0,5
Reverse Primer (10 pmol/µl)	0,5
DreamTaq™ DNA Polymerase	0,125
DNA-Template	0,4 – 1,0
dH ₂ O (LiChrosolv™ Merck®)	ad 25 µl

Tabelle 2-30 Standard PCR-Programm

Schritt	Temperatur	Dauer	Zyklen
Initial Denaturierung	95 °C	5 min	1 x
Denaturierung	95 °C	1 min	
Primer-Annealing	55 °C	45 s	30 x
Elongation	72 °C	1 min	
Finale Elongation	72 °C	5 min	1 x

2.2.2.5.2.1.2 Bedingungen für den Restriktionsverdau

Tabelle 2-31 Standardansatz für Verdau zur Untersuchung von RFLP von *gyrA* (S83L)

Reagenz	Volumen
<i>HinfI</i> FastDigest	0,5 µl
10 x FastDigest Green Buffer	2 µl
Template-DNA	5-10 µl
Wasser	ad 20 µl

Tabelle 2-32 Programmvorgaben zum Restriktionsverdau mit *HinfI*

Schritt	Zeit	Temperatur
Verdau	1 h	37 °C
Inaktivierung	20 min	65 °C

2.2.2.5.2.2 *marR*

Unter Ausnutzung von RFLP wurde nach möglichen Deletionen oder Insertionen in *marR* gesucht. Als Primer der PCR dienten *marR*_₋₁₀₁_for und *marA*_₊₄₂_rev. Das daraus erhaltene Produkt hatte eine Größe von 592 bp. Das Fragment wurde mit dem Restriktionsenzym *Sau3A1* (FastDigest), welches an drei Positionen in der DNA schneidet, fragmentiert. Die daraus erhaltenen Fragmente hatten die Längen 60 bp, 116 bp, 150 bp und 266 bp und ließen sich mittels Agarosegelelektrophorese auftrennen. Jede Abweichung von diesem Bandenmuster

war ein Indikator für eine Deletion oder Insertion in *marR*. Es wurden selektierte Mutanten aus *E. coli* WT auf die Deletion in *marR* hin untersucht.

Tabelle 2-33 Fragmentgrößen nach Amplifikation eines 592 bp PCR-Fragment mit den Primern *marR*__{-101_for} und *marA*__{+42_rev} und mit/ohne Verdau mit *Sau3A1*

WT unverdaut	CFT073 <i>Sau3A1</i>	WT <i>Sau3A1</i>
592 bp	266 bp	266 bp
	150 bp	150 bp
	116 bp	116 bp
	60 bp	60 bp

2.2.2.5.2.2.1 PCR-Bedingungen

Tabelle 2-34 Reaktionsansatz DreamTaq™ PCR

Reaktionsansatz	12 µl Ansatz (Menge in µl)
10 x DreamTaq™ Puffer	1,2
2 mM dNTPs (Mix)	1,2
Forward Primer (10 pmol/µl)	0,2
Reverse Primer (10 pmol/µl)	0,2
DreamTaq™ DNA Polymerase	0,1
DNA-Template	0,4 – 1,0
dH ₂ O (LiChrosolv™ Merck®)	ad 12 µl

Tabelle 2-35 Standard PCR-Programm

Schritt	Temperatur	Dauer	Zyklen
Initial Denaturierung	95 °C	5 min	1 x
Denaturierung	95 °C	1 min	
Primer-Annealing	58 °C	30 s	30 x
Elongation	72 °C	45 s	
Finale Elongation	72 °C	5 min	1 x

2.2.2.5.2.2.2 Bedingungen für den Restriktionsverdau

Tabelle 2-36 Standardansatz für Verdau zur Untersuchung von RFLP von *marR*

Reagenz	Volumen
<i>Sau3A1</i> FastDigest	0,1 µl
10 x FastDigest Green Buffer	1,5 µl
Template-DNA	4-10 µl
Wasser	ad 15 µl

Tabelle 2-37 Programmvorgaben zum Restriktionsverdau mit *Sau3A1*

Schritt	Zeit	Temperatur
Verdau	30 min	37 °C
Inaktivierung	20 min	65 °C

2.2.2.6 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

2.2.2.6.1 Abschätzung im Gel

Nur Banden ähnlicher Laufstrecke eigneten sich für eine Konzentrationsabschätzung. Die Abschätzung war nur möglich, wenn man die vorgegebene Mengen an DNA-Größenmarker und Beschwerer für Marker und Probe verwendete [205], [206].

2.2.2.6.2 NanoDrop™ 1000 Spectrophotometer

In dieser Arbeit wurde das NanoDrop™-System zur Messung von dsDNA, RNA und einzelsträngigen Oligonukleotiden verwendet. Zur Messung wurde 1 µl einer Probe auf dem Ende des faseroptischen Kabels (Empfangsfaser englisch: *receiving fibre*), pipettiert. Ein zweites optisches Kabel (Quellfaser, englisch: *source fiber*) wurde mit der flüssigen Probe durch Senken des Kopfes in Kontakt gebracht. Eine gepulste Xenon-Blitzlampe diente als Lichtquelle und ein Spektrometer mit einem linearen CCD-Array wurde verwendet, um das Licht nach Passieren durch die Probe zu untersuchen. Die Messung der Probe wurde durch die PC-Software gesteuert und die Daten wurden auf dem PC protokolliert [207]. Die Konzentrationsermittlung der vermessenen Probe wurde mittels des Lambert Beer'schen Gesetzes (Gl. 7) ermittelt.

$$E_{\lambda} = \lg\left(\frac{I_0}{I_1}\right) = \varepsilon_{\lambda} \times c \times d \quad (\text{Gl. 7})$$

Lambert Beer'sches Gesetz

I_1 : Intensität des transmittierten Lichtes (Einheit: W/m^2), I_0 : Intensität des einfallenden (eingestrahelten) Lichtes (Einheit: W/m^2), E_{λ} : Extinktion des Materials für Licht der Wellenlänge λ , ε_{λ} : dekadischer Extinktionskoeffizient bei der Wellenlänge λ (Einheit m^2/mol), c : Konzentration (Einheit mol/L), d : Schichtdicke (Einheit m)

2.2.2.6.3 Qubit® 2.0 Fluorometer

Vor der ersten Messung war das Qubit® 2.0 Fluorometer gemäß Handbuch und den vorgegebenen Standards zu kalibrieren [208], [209]. Mit dem geeigneten Sample Kit wurde im Anschluss die DNA oder RNA-Probe vorbereitet. Nach dem Ansetzen der Proben für die Messung war eine zweiminütige Inkubationszeit einzuhalten. Zur Messung wurden mitgelieferte 0,5 ml-Reaktionsgefäße verwendet. In dieser Arbeit wurde das Qubit® dsDNA BR (*Broad-Range*) Assay Kit verwendet [208].

2.2.2.6.4 *BioAnalyzer 2100*

Vorgegangen wurde nach dem Benutzerhandbuch für den *Agilent 2100 BioAnalyzer* von *Agilent Technologies* [210]. Zur Messung wurde das *Agilent High Sensitivity DNA Kit* verwendet. Zusätzlich wurde noch eine Chip-Ladestation benötigt. Die Auswertung wurde mit der *2100 Expert Software* durchgeführt [210].

2.2.2.7 **Sequenzierung von DNA**

2.2.2.7.1 *Sequenzierung von PCR-Fragmenten nach SANGER*

Zur Sequenzierung wurde der Beckman Coulter GenomeLab™ GeXP Genetic Analysis System DNA-Sequencer [211], basierend auf der von SANGER *et al.* entwickelten Kettenabbruchverfahren [212], mitsamt der in der Bedienungsanleitung geforderten Puffern eingesetzt. Zur Aufreinigung wurden die Enzyme Exonuklease I und Alkalische Phosphatase (FastAP) verwendet. Zur Durchführung des Cycle Sequencing wurde eine Mischung aus Quick Start Mix und Sequencing Reaction Buffer verwendet. Im Quickstart Mix waren neben Polymerase und Puffer noch die zur Strangabbruchmethode wichtigen Nukleotide mit dem jeweiligen Farbstoff enthalten. Die Sequenzierung wurde gemäß Protokoll von Beckman-Coulter durchgeführt [211].

2.2.2.7.2 *Sequenzierung von PCR-Fragment per Pyrosequenzierung*

Für die Pyrosequenzierung kam das PSQ™96MA System zum Einsatz, bestehend aus dem PSQ 96MA-Instrument, bestimmter SNP- (*single nucleotide polymorphism*) und SQA- (*sequence analysis*) Software und Reagenzkits. Bei der Pyrosequenzierung wird unter Ausnutzung einer Enzymkaskade ein Lichtblitz durch den Einbau eines Nukleotids erzeugt. Insgesamt sind vier Enzyme für diese Reaktion notwendig: DNA-Polymerase, Sulfurylase, Luciferase, Apyrase. Die Sequenzierung wurde nach Herstellerangaben durchgeführt [213], [214]. Die verwendeten Reagenzien sind in Tabelle 2-38 zu finden.

Tabelle 2-38 Zusammensetzung Reagenzien für die Pyrosequenzierung

Name	Herstellung
PBS	0,02 g KCl, 0,02 g KH ₂ PO ₄ , 0,115 g Na ₂ HPO ₄ und 0,8 g NaCl in 80 ml Aqua dem. lösen, pH auf 7,4 einstellen und mit Aqua dem. ad 100 ml auffüllen
1 x Annealing Buffer pH 7,6	0,605 g Tris und 0,11 g Mg-Acetat·4 H ₂ O in 200 ml Aqua dem. lösen und mit Essigsäure auf pH von 7,6 einstellen, mit Aqua dem. ad 250 ml auffüllen
Binding Buffer pH 7,6	0,3025 g Tris, 29,25 g NaCl und 0,073 g EDTA in 200 ml Aqua dem. lösen, pH mit HCl auf 7,6 einstellen, 0,25 ml Tween 20 zufügen, mit Aqua dem. ad 250 ml auffüllen
Washing Buffer pH 7,6	1,21 g Tris in 900 ml Aqua dem. lösen, mit Essigsäure auf pH 7,6 einstellen
02 N NaOH	8,0 g NaOH in 950 ml Aqua dem. lösen, dann ad 1000 ml auffüllen
Ethanol 70 %	700 ml Ethanol 96 % (vergällt) mit 300 ml Aqua dem. mischen, hier wird keine Rücksicht auf Verdünnungsfehler bei Ethanol genommen

Das Pyrosequenzierung zur-Analyse des SNPs erfolgte nach Hersteller-Protokoll nach der im Institut vorliegenden Beschreibung „Biochemische Untersuchungsmethoden einschließlich klinische Chemie“ SS 2013, A-IV Genotypisierung von CYP1A2 mit Pyrosequencing“ [214]. Der BBMM (*Binding Buffer-Beads-Mastermix*) wurde in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß zubereitet [214].

2.2.2.7.3 *Next Generation Sequencing (NGS)*

Zur Genomsequenzierung wurde das Ion PGM™ System der Marke Ion Torrent™ von Life Technologies verwendet. Die Sequenzierung wurde mit dem Ion316™ V2 Chip durchgeführt. Genomische RNA-freie DNA (gDNA) wurde mit dem DNeasy® Blood & Tissue Kit isoliert. Mithilfe des Bioruptor® UCD-600 NGS Sonication System von Diagenode [215], [216] wurde die gDNA durch Ultraschall geschert. Mit dem NEBNext® Fast DNA Library Prep Set for Ion Torrent™ [217] wurden die Enden der DNA-Fragmente repariert. Zur Gelextraktion wurde das Nucleospin® Extract II Kit verwendet. Für die PCR Amplifikation der Adapter-ligierten DNA wurde mit dem NEBNext High Fidelity Kit gearbeitet [217]. Zur Aufreinigung kam das AMPure XP Kit zum Einsatz. Die Behandlung des Templates wurde mit dem Ion OneTouch™ System durchgeführt und gemäß Protokoll für das Ion OneTouch™ 200 Template Kit v2 DL vorgegangen. Eine frische Library, Ion OneTouch™ Enzyme Mix und Ion Sphere™ Particles (ISPs) wurden gemäß Protokoll vorbereitet. Mit dem Ion OneTouch™ ES wurden die Template-positiven ISPs angereichert. Die ermittelte Genomsequenz wurde mit dem Genom des *E. coli*-Stammes CFT073 im Broad Institute IGV Viewer verglichen [218], [219].

2.2.2.8 Southern Blot

In dieser Arbeit wurde der Southern Blot gemäß *DIG Application Manual for Filter Hybridization* der Roche Diagnostics GmbH durchgeführt [220]. Zur Herstellung einer Digoxigenin-Markierten Sonde wurde das PCR DIG Probe Synthesis Kit von Roche Life Science (Cat No. 11 636 090 910) verwendet.

2.2.2.9 Recombineering

Recombineering setzt sich aus den englischen Begriffen „*recombinogenic*“ und „*engineering*“ zusammen und basiert auf der homologen Rekombination in *E. coli*-Stämmen.

2.2.2.9.1 Recombineering mit zwei oder mehr PCR-Produkten

pHPHP177-02.1 ließ sich aus zwei PCR-Produkten durch *In-vivo*-Rekombination in JM109 klonieren. Primer mit homologen Überhängen waren notwendig (Abbildung 2-5).



Abbildung 2-5 Positionen für Primer beim Recombineering (eigene Darstellung)

Forward- als auch der Reverse-Primer besitzen homologe Sequenzen zur Template-DNA (blau).

Zwei PCR-Produkte wurden mit der Phusion DNA Polymerase amplifiziert (2.2.2.3.3.2) und ein Teil des Ansatzes wurde mittels Auftrennung im Agarosegel begutachtet. Anschließend wurde der PCR-Ansatz mit Vektor-Template einem *DpnI*-Verdau unterzogen, um Template-DNA aus dem Ansatz zu entfernen. In einem zweiten Ansatz wurde zur Kontrolle die gleiche Vektor-Template-Menge mit *DpnI* verdaut. Nach dem Verdau wurden CaCl_2 -kompetene *E. coli* JM109-Zellen mit Insert und Vektor im Verhältnis 3:1 transformiert.

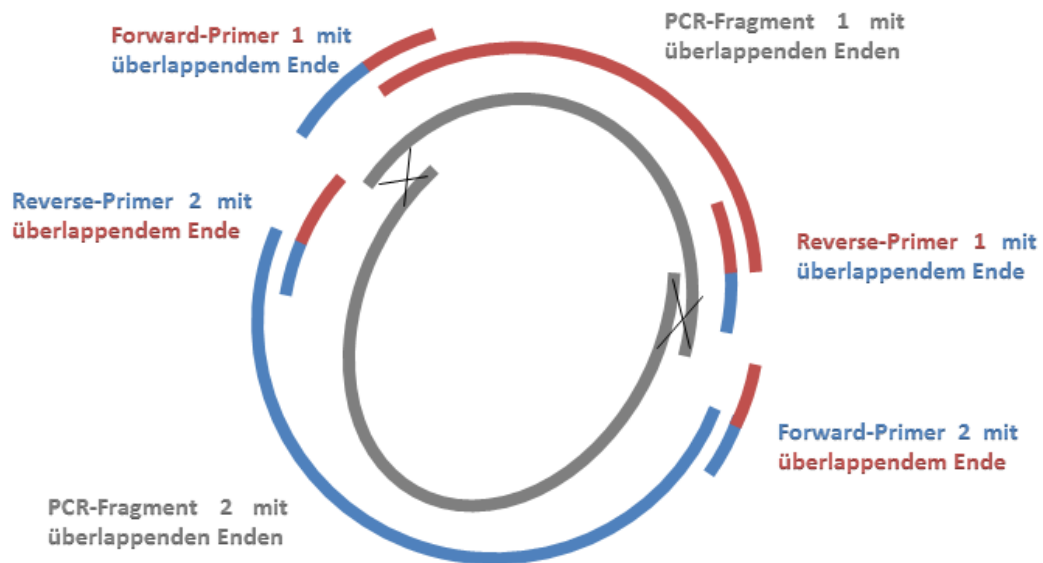


Abbildung 2-6 Schema für Recombineering mit zwei PCR-Produkten (eigene Darstellung)

Zwei PCR-Produkte mit homologen Überhängen werden mittels Recombineering miteinander verbunden. Jeweils zwei Primerpaare wurden eingesetzt, um an zwei PCR-Fragmenten die überlappenden Enden einzuführen. Denkbar ist auch die Verwendung von nur einem Primerpaar.

2.2.2.9.2 Ortsspezifische Mutagenese

2.2.2.9.2.1 Homologe Rekombination *in vitro* nach DATSENKO und WANNER [182]

Zur Rekombination wird hier das Rekombinationssystem der Bakteriophage λ genutzt [182], [221]. In *E. coli* wurden Teile des Rekombinationssystems mittels Vektoren (pKD46) eingeführt und dort in der Zelle exprimiert, so dass sich ein Hyperrekombinations-Phänotyp bildete [27]. Unter Arabinose-Induktion wird das λ -Rekombinationssystem auf pKD46 aktiv und erlaubt eine Umgehung der *E. coli*-Regulationssysteme. Unter Kontrolle eines Arabinose-induzierbaren Promoters wurden die Bakteriophagengene *gam*, *bet* und *exo* in pKD46 mit temperatursensitiven *ori* (*origin of replication*) exprimiert [222]. Gam bindet als Homodimer an RecBCD und hemmt dessen Funktion, so dass die λ -DNA vor dem Abbau geschützt wird. Exo ist eine 5'-3'-Exonuklease und generiert als Trimer einzelsträngige 3'-Überhänge. Bet bindet als Rekombinase an einzelsträngige DNA und bewirkt eine Renaturierung komplementärer Bereiche und damit den Strangaustausch, welcher in der gezielten Veränderung des Chromosoms resultiert [27]. Die Methode wurde gemäß den Vorgaben aus der Original-Veröffentlichung durchgeführt [182].

2.2.2.9.2.2 *Homologe Rekombination in vitro mittels Gene Doctoring [183]*

Beim *Gene Doctoring* wird die lineare DNA, welche als Target für die Rekombination dient, erst *in vivo* durch Verdau des Donorplasmids pDOC-K erzeugt. Die in das Chromosom einzubauende DNA (H1 und H2), wurde in pDOC-K mittels Recombineering kloniert. Das Donorplasmid trägt neben einer Ampicillinresistenz noch das Gen *sacB*, welches für die Levansucrase kodiert, ein Enzym, isoliert aus *Bacillus subtilis*, dass für *E. coli* in Anwesenheit von Saccharose letal wirkt. Dieses Gen dient als weiteres Selektionsmerkmal. Nach Konstruktion wird der zu verändernde Stamm mit dem Donorplasmid zusammen mit einem Rekombinationsplasmid (pACBSCE) transformiert. Das Rekombinationsplasmid trägt die Gene für die homologe Rekombination, eine Chloramphenicolkassette sowie das Gen für die Meganuclease I-SceI und eine Schnittstelle hierfür. Bei den Genen der homologen Rekombination handelt es sich um die λ -Red-Gene *gam*, *exo* und *bet*. Das Grundprinzip des *Gene Doctorings* ist in Abbildung 2-7 dargestellt. Die homologe Rekombination wurde gemäß Original-Publikation und der Arbeit von Dr. M. PETSCHULIES durchgeführt [27], [183].

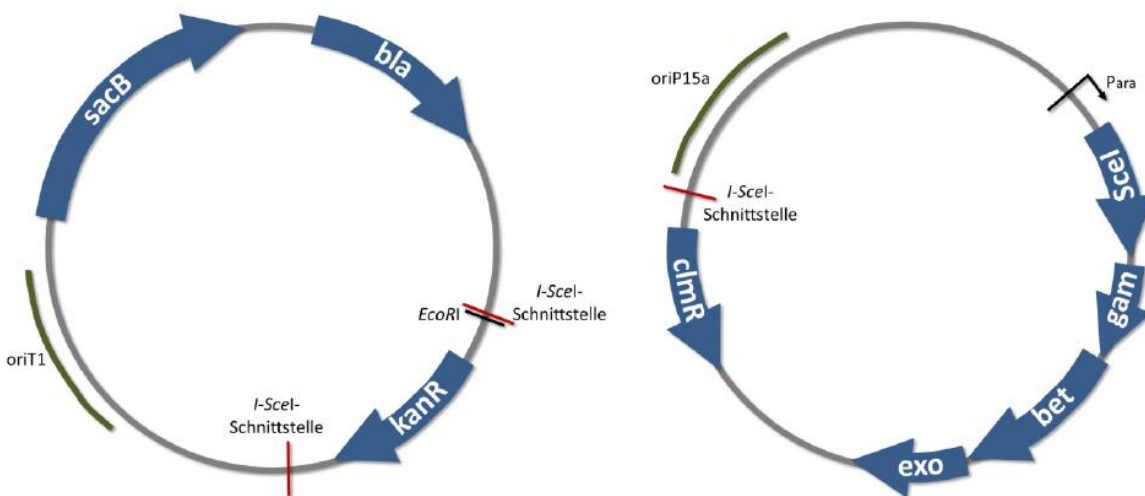


Abbildung 2-7 Schematische Plasmidkarten von pDOC-K (links) und pACBSCE (rechts) [27]

ori: origin of replication; *gam*, *bet*, *exo*: Gene des λ -Red Rekombinationssystems; *sacB*: Gen für die Levansucrase; *Para*: Arabinose-induzierbarer Promotor; *bla*: Betalactamase, *kanR*: Kanamycinresistenzkassette.

2.2.3 Arbeiten mit Protein

2.2.3.1 Bestimmung der Gesamtproteinmenge

Die Bestimmung der Proteingesamtmenge der zu untersuchenden Lösung erfolgte nach BRADFORD [174]. Zur Auswertung der Absorptionsmessung war die Geradengleichung einer Standardkurve notwendig. Hierfür wurde eine Standardverdünnungsreihe sowohl vom BSA, als auch vom Lysozym in 0,3 M NaOH angesetzt und zur Erstellung der Kalibriergeraden vermessen. Lösungen in den Konzentrationen 31,3 µg/ml, 62,5 µg/ml, 125 µg/ml, 250 µg/ml und 500 µg/ml wurden hergestellt und dreifach vermessen.

2.2.3.2 Messung der Luciferaseaktivität am Luminometer Lucy 2



Als Reportergen wird ein *luc*-Gen, das aus *Photinus pyralis*, einem Vertreter der Familie der Leuchtkäfer stammt und für das Enzym Luciferase kodiert, verwendet. Luciferase oxidiert das Substrat Luciferin in Anwesenheit von ATP, Mg²⁺ und O₂ zu Oxyluciferin. Bei dieser Reaktion wird Energie in Form von Licht ($h \cdot \nu$) freigesetzt (Gl. 8) [223]. Die Expression des *luc*-Gen ist direkt mit dem Ablesen des Promotors des zu untersuchenden Gens gekoppelt. Bei einer Promotorexpression kommt es auch zur Expression des *luc*-Gens. Damit verbunden wird Licht freigesetzt und lässt sich mittels der verwendeten Apparatur messen. Eine hohe Lichtintensität bedeutet eine hohe Luciferase-Aktivität, die sich auf die Expression des Promotors direkt zurückführen lässt (Abbildung 2-8).

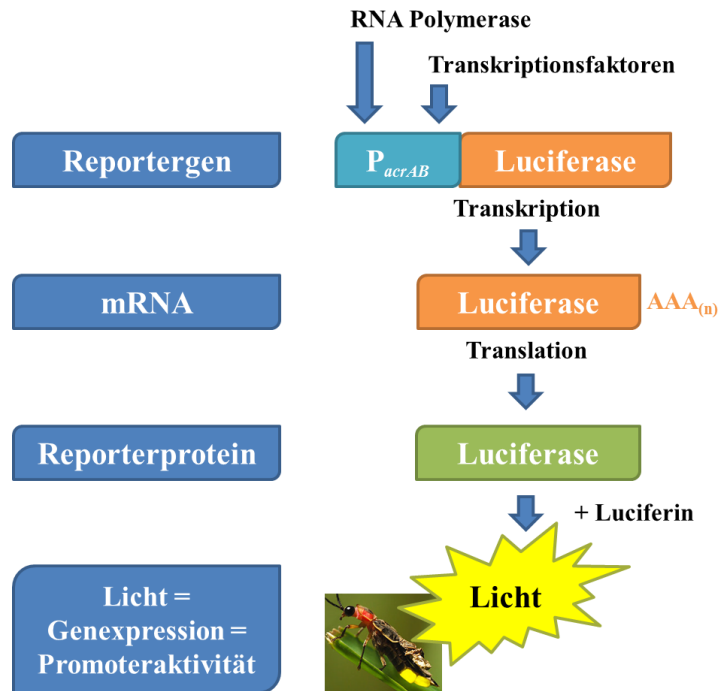


Abbildung 2-8 Prinzip eines Luciferase-Reporterassays (eigene Darstellung)

Die Durchführung des Luciferase-Assays, bzw. die Bestimmung der Luciferase-Aktivität erfolgte mit dem „Luciferase Assay System“ der Firma Promega GmbH und wurde nach den Herstellerangaben und nach den Angaben von Dr. M. ABU MRAHEIL vorgegangen [223], [224]. Zur Messung der Luciferase-Aktivität wurde der Luminometer Lucy 2 der Anthos Labtec Instruments GmbH eingesetzt.

2.2.3.2.1 Statistische Auswertung der Luciferase-Aktivitäten

Pro Stamm und Messreihe wurde aus drei Messwerten der Luciferase-Aktivität ein Mittelwert ermittelt. Aus den Messwerten weiterer Messungen, wurde erneut ein Mittelwert ermittelt. Aus mindestens zwei Messwerten wurde die relative Standardabweichung berechnet. Lag die relative Standardabweichung unter 20 % konnten alle Messwerte zur Bildung des Mittelwertes genutzt werden. Bei der Bradford-Bestimmung (gemäß Abschnitt 2.2.3.1) der Gesamtproteinmenge sind drei Messwerte ermittelt worden, die in die Ermittlung des Mittelwerts eingeflossen sind.

2.2.3.2.2 *Berechnung des RLU/OD-Quotienten*

Der Quotient resultierte aus dem Bezug der RLU-Werte auf die OD_{550nm} bei der die Proben entnommen wurden. Der erhaltene Quotient RLU/OD_{550nm} wurde anschließend zu anderen Proben aus der gleichen Messreihe in Bezug gesetzt. Dies war entweder ein Bezug auf WT oder auf MII, welcher auf 100 % gesetzt wurde. Wurden die Einflüsse von Antibiotika untersucht, so wurde die Probe ohne Zugabe auf 100 % gesetzt. Der berechnete Wert beschreibt somit die Veränderung in der Expression von *acrAB*, bzw. *acrEF* im Vergleich zum Ausgangszustand.

2.2.3.2.3 *Berechnung des RLU/KBE-Quotienten*

Zu Beginn der Luciferase-Messungen wurde vergleichsweise noch der Quotient aus RLU und KBE ermittelt. Hierbei wurde ein Quotient aus RLU-Wert bezogen auf die KBE/mL bzw. KBE/90 µL bezogen. Das Volumen auf das sich die KBE bezieht war nicht von Bedeutung, da letztendlich RLU/KBE %-Quotienten betrachtet wurden, die relative Werte zueinander darstellen. Bei der gleichen OD_{550nm} für die Bestimmung des Proteingehaltes wurden die Proben für die KBE-Bestimmung entnommen.

2.2.3.2.4 *Berechnung des RLU/Proteingehalt-Quotienten*

Die ermittelte Proteinmenge wurde auf ein Volumen von 90 µL berechnet. Da dieses Volumen bei der Messung der Luciferase-Aktivität verwendet wurde, ist das Volumen zu vernachlässigen, da nur die relativen Werte betrachtet wurden.

3 Ergebnisse I - Untersuchungen zu *sdiA*

Im ersten Teil dieser Arbeit wurden für *sdiA* (englisch: *suppressor of cell division inhibitor*) die Sequenz und die Expression in den *in vitro* selektierten *E. coli*-Mutanten MIII und *E. coli* MIVa untersucht [167]. Die Mutante MIVa wurde ausgehend von MIII selektiert. Ausgangspunkt für die Untersuchung war die Fragestellung, warum sich trotz identischer QRDR-Mutationen und *marR*-Deletion, die *in vitro* selektierten *E. coli* Mutanten MIII und MIVa phänotypisch in der MHK von Fluorchinolonen unterscheiden [167].

SdiA ist ein *E. coli* -Protein, das die Zellteilung und Ausdifferenzierung beeinflusst und konzentrationsabhängig auf äußere Faktoren reagiert (Abschnitt 1.10.1) [65], [66]. Dieses Phänomen ist eine Form des *Quorum Sensings* (Abschnitt 1.3) [65]. Bei TAVÍO *et al.* (2010) und RAHMATI *et al.* (2002) finden sich Hinweise auf einen Einfluss auf die *acrAB* Expression durch SdiA [68], [69]. In diesem Zusammenhang sollte bedingt durch SdiA eine mögliche Erklärung für den MHK-Unterschied in MIII und MIVa untersucht werden, nachdem bereits in der vorangegangenen Arbeit bei Dr. B. ARNTJEN (2011) ein Unterschied in der *acrA* Expression zwischen MIII und MIVa gezeigt werden konnte [225].

Aus den Arbeiten von HEISIG *et al.* (1994) lagen die Mutanten *E. coli* MIII und MIVa vor [167]. In beiden Mutanten wurden die gleichen Mutationen in der QRDR von *gyrA* (S83L, D87G) und *parC* (S80I) sowie die gleiche *marR*-Deletion gefunden. Trotz gleicher Akkumulation von Mutationen fiel die MHK von Ciprofloxacin unterschiedlich aus (eine MHK-Stufe). Für MIII betrug die MHK von Ciprofloxacin 64 µg/ml. Für MIVa betrug die MHK von Ciprofloxacin 128 µg/ml [167]. Im Rahmen einer Erklärung für diesen Unterschied wurden für *sdiA* die Gensequenz und die Expression in MIII und MIVa untersucht.

3.1.1 Sequenzierung *sdiA*

Im ersten Versuchsansatz wurden die *sdiA*-Sequenzen der *E. coli* Mutanten MIII (GK574) und MIVa (GK575) mit der Wildtyp-Sequenz aus *E. coli* WT (GK571) verglichen (Tabelle 3-1). Für die Sequenzierung wurde mit den Primern *sdiA*_[*sdiA* 5-1]_5' -438_EcoK12 und *sdiA*_[*sdiA* 3-1]_3' +848_EcoK12 ein ca. 1300 bp großes Amplicon erzeugt (Abschnitt 2.2.2.3). Die Primer *sdiA*_[*sdiA* 5-1]_5' +350_EcoK12 und *sdiA*_[*sdiA* 3-1]_3' +848_EcoK12 wurden für das Cycle-Sequencing eingesetzt.

Tabelle 3-1 Vergleich der zu untersuchenden Mutanten

Daten von HEISIG *et al.* mit Ergebnissen von Dr. B. ARNTJEN (2011) ergänzt [167], [168], [225].

	WT	MIII	MIVa
GK-Nr.	571	574	575
marR	Wildtyp	<i>marR</i> Δ74bp	<i>marR</i> Δ74bp
MHK Cip (µg/ml)	0,015	64	128
MHK Nor (µg/ml)	0,125	256	512
gyrA	Wildtyp	<i>gyrA</i> S83L, D87G	<i>gyrA</i> S83L, D87G
parC	Wildtyp	<i>parC</i> S80I	<i>parC</i> S80I
Generationszeit	20 min	30 min	54 min
marA Expression	1-fach	67-fach erhöht	122-fach erhöht
acrA Expression	1-fach	5-fach erhöht	13-fach erhöht

Bei zwei voneinander unabhängigen *sdiA*-Sequenzierungen fand sich bei GK574 eine mögliche Thymin-Baseninsertion, die durch Frameshift zum verfrühten Translationsstop geführt hätte (Tabelle 3-2). Anlass zu dieser Vermutung war ein Signal im Chromatogramm bei MIII und MIVa (Abbildung 3-1). Die Unterschiede fanden sich in *sdiA* an Position +583 bp (Tabelle 3-2).

Tabelle 3-2 Vergleich der Ergebnisse der ersten Sequenzierung (eigene Darstellung)

Für MIII (GK574) und MIVa (GK575) taucht ein Basenaustausch auf (roter Kreis).

GK571 <i>sdiA</i> rv +848 110728 geändert 110803 (c)	337	ACGGCGGAAGGTTAGTACATCAGC
GK571 <i>sdiA</i> rv +848 110830 geändert 110831 (c)	361	ACGGCGGAAGGTAAG-ACATCAGC
GK571 <i>sdiA</i> +350 fw 110914	188	ACGGCGGAAGGTAAG-ACATCAGC
GK571 <i>sdiA</i> rv +848 110914 110915 (c)	352	ACGGCGGAAGGTAAG-ACATCAGC
GK574 <i>sdiA</i> contig 110912	965	ACGGCGGAAGGTTAG-ACATCAGC
GK575 <i>sdiA</i> contig 110912	966	ACGGCGGAAGGTTAG-ACATCAGC

Eine erneute Sequenzierung war notwendig, da für MIII und MIVa ein möglicher Basenaustausch vorlag (Chromatogramme der ersten Sequenzierung), bzw. zwei überlagerte Signale/Artefakte zu sehen waren (Abbildung 3-1). Für die Wiederholung wurden neue Kulturen ausgehend von der Dauerkultur angezogen (Abschnitt 2.2.1.1). Nach 18 h Inkubation wurde je eine einzelne Kolonie für MIII und MIVa auf einer Agarplatte erneut ausgestrichen, so dass alle Kolonien nach 18 h Inkubation einer identischen Ausgangskolonie abstammten. Jeweils drei Kolonien wurden ausgewählt und DNA mittels Kochmethode isoliert (Abschnitt 2.2.2.1.1).

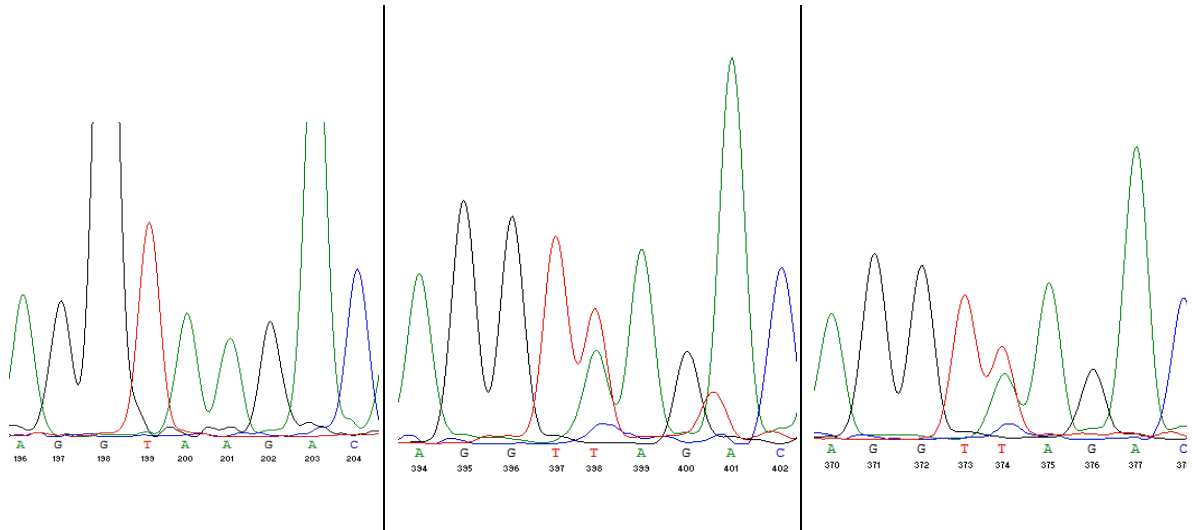


Abbildung 3-1 Auszug der Chromatogramme von Position +583 bp der Sequenzierungen von *sdiA* für *E. coli* WT (links), MIII (mitte) und MIVa (rechts) (eigene Darstellung)

Statt der erwarteten WT-Sequenz AGGTAAGAC ergibt die Sequenzierung bei MIII und MIVa die Sequenz AGGTTAGAC.

Die Wiederholung der Sequenzierung zeigte keine Thymin-Baseninsertion bei MIII und MIVa (Tabelle 3-3). Vermutet wurde, dass die Überlagerung zweier Signale ein Artefakt darstellte, welches beim Sequenzieren mit dem BECKMANN-Sequencer entstand und zu einem falsch-positiven Ergebnis führte. Um die Artefakt-Theorie zu bestätigen wurden eine Pyrosequencing-Untersuchung und ein Southern-Blot durchgeführt (Abschnitt 3.1.2 und Abschnitt 3.1.3).

Tabelle 3-3 Sequenzalignment für WT (GK571), MIII (GK574 und MIVa (GK575) (eigene Darstellung)

Die Ergebnisse der zweiten Sequenzierung haben den Appendix „110923“ (23.09.2011). In der 1. Zeile ist das Ergebnis der ersten Sequenzierung von MIVa (GK575) zum Vergleich. In der 5. Zeile ist die Sequenz für MG1655 gezeigt („NC_000913“). In der Wiederholung ist bei WT (GK571), MIII (GK574) und MIVa (575) ein Adenosin an der zuvor diskutierten Stelle detektiert worden (Markierung Kreis).

GK575 <i>sdiA</i> rv +848 110728 geändert 110818 (c)	353	TGAAATGGACGGCGGAAGGTTAGACATCAG
GK575 <i>sdiA</i> fw +350 110923	141	TGAAATGGACGGCGGAAGGTAAGACATCAG
GK571 <i>sdiA</i> contig 110923	959	TGAAATGGACGGCGGAAGGTAAGACATCAG
GK574 <i>sdiA</i> fw +350 110923	160	TGAAATGGACGGCGGAAGGTAAGACATCAG
NC_000913	707	TGAGGTTGGACGGCGGAAGGTAAGACATCAG

3.1.1.1 Aminosäure-Alignment

Auf Grundlage der Sequenzen mit der Thymin-Insertion bei MIII und MIVa zeigte ein Aminosäure-Alignment (Tabelle 3-4), dass bei MIII und MIVa an Position 195 ein Stoppcodon zu einem Strangabbruch führte. Zum Vergleich wurde die Sequenz für den Ausgangsstamm *E. coli*

WT (GK571) und für *E. coli* MG1655 („sdiA alleine NC_000913“) betrachtet. Die Sequenz für MG1655 war bei NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) hinterlegt [226].

Tabelle 3-4 Aminosäure-Sequenz-Alignment für sdiA in *E. coli* WT, MIII und MIVa

Aminosäure-Sequenzvergleich von SdiA für *E. coli* WT (GK571), *E. coli* MIII (GK574) und *E. coli* MIVa (GK575). Die Aminosäuresequenz wird mit SdiA von *E. coli* K12 MG1655 (NC_000913) verglichen. Gezeigt werden die Auswirkungen möglicher Mutationen in MIII und MIVa, die zu einem verfrühten Stoppcodon innerhalb sdiA führen. Das Stoppcodon ist an Position +195 zu sehen („-“). Gelb unterlegt sind homologe Sequenzen aller vier Stämme. Homologe Sequenzen, die bei 3 von 4 Sequenzen zu finden sind, sind blau unterlegt. Grün: Sequenz einmalig im jeweiligen Stamm; keine Homologie zu einem der anderen Stämme.

		1	50
Translation of GK571 sdiA	(1)	MQD	TFSSWLR
Translation of GK574 sdiA	(1)	MQD	TFSSWLR
Translation of GK575 sdiA	(1)	MQD	TFSSWLR
sdiA alleineNC_000913	(1)	MQD	TFSSWLR
		51	100
Translation of GK571 WT sdiA	(51)	PFTRPKVAFY	TNYPE
Translation of GK574 sdiA	(51)	PFTRPKVAFY	TNYPE
Translation of GK575 sdiA	(51)	PFTRPKVAFY	TNYPE
sdiA alleineNC_000913	(51)	PFTRPKVAFY	TNYPE
		101	150
Translation of GK571 WT sdiA	(101)	SEAQPLWEA	ARAHGLRRGVTQYLMLP
Translation of GK574 sdiA	(101)	SEAQPLWEA	ARAHGLRRGVTQYLMLP
Translation of GK575 sdiA	(101)	SEAQPLWEA	ARAHGLRRGVTQYLMLP
sdiA alleineNC_000913	(101)	SEAQPLWEA	ARAHGLRRGVTQYLMLP
		151	200
Translation of GK571 WT sdiA	(151)	QLKMQLLVRE	SLMALMRLNDEIVMTPEMNF
Translation of GK574 sdiA	(151)	QLKMQLLVRE	SLMALMRLNDEIVMTPEMNF
Translation of GK575 sdiA	(151)	QLKMQLLVRE	SLMALMRLNDEIVMTPEMNF
sdiA alleineNC_000913	(151)	QLKMQLLVRE	SLMALMRLNDEIVMTPEMNF
		201	241
Translation of GK571 WT sdiA	(201)	AMILSISENT	VNFHQKNMOKKINAPNKTQVAC
Translation of GK574 sdiA	(200)	AMILSISENT	VNFHQKNMOKKINAPNKTQVAC
Translation of GK575 sdiA	(200)	AMILSISENT	VNFHQKNMOKKINAPNKTQVAC
sdiA alleineNC_000913	(201)	AMILSISENT	VNFHQKNMOKKINAPNKTQVAC

3.1.2 Pyrosequenzierung

In der vorangegangenen Sequenzierung nach Sanger wurde keine eindeutige Sequenz für die *E. coli*-Mutanten MIII und MIVa an Position sdiA +583 bp ermittelt, so dass mittels Pyrosequenzierung der SNP (englisch: *single nucleotide polymorphism*) an dieser Position untersucht wurde. Ziel war die Aufklärung, ob sdiA mehrfach chromosomal vorlag, und daher unterschiedliche Sequenzen ermitteln wurden.

3.1.2.1 Software-Analyse der SNPs und Primerwahl

Mithilfe der PyroMark Assay Design Software [227] wurde anhand der Sequenzabschnitte ein Sequenzierprimer gestaltet, der 3 Basen vor dem vermuteten SNP endet. Ein Biotinprimer wurde auf Grundlage der MG1655-Sequenz erstellt. Da die Basensequenz für WT (GK571), MIII (GK574) und MIVa (GK575) sich in einer Base zu MG1655 unterschied (vergleiche Tabelle 3-5),

wich der vorliegende Primer an Position 9 in der Sequenz ab (Guanin statt Cytosin). Dennoch war die Bindung zum komplementären Sequenzbereich gegeben.

Tabelle 3-5 Biotinprimer Unterschied in einer Base zwischen *E. coli*-Stamm MG1655 und *E. coli* WT.

Die betroffene Base ist gelb unterlegt. In MG1655 lag an der markierten Position ein Guanin vor, im Gegensatz zu Cytosin in der WT-Sequenz.

sdiA_[3-1]_3'+673_EcoK12 biotinylated	GCAACCTGGGTCTTATTTGG
sdiA_[3-1]_3'+673_WT	GCAACCTGCGTCTTATTCGG

3.1.2.2 Amplifikation des zu untersuchenden *sdiA*-Abschnitts

Für die Amplifizierung des 157 bp großen Fragments mittels PCR wurden die Primer *sdiA*_[5-1]_5'+516_WT und *sdiA*_[3-1]_3'+673_EcoK12 biotinylated verwendet (Abbildung 3-2).

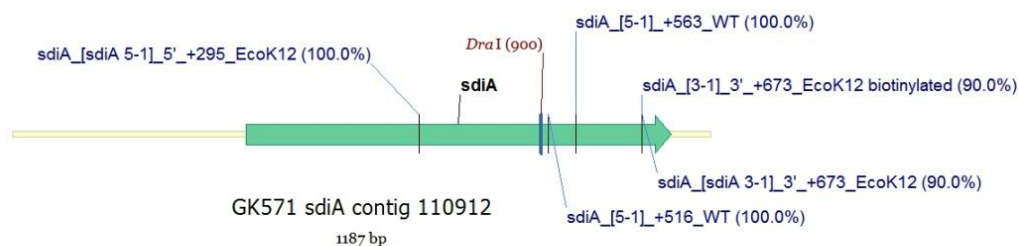


Abbildung 3-2 Bereich *sdiA* mit den verwendeten Primern für die Pyrosequenzierung, (eigene Darstellung)

Die Primer *sdiA*_[5-1]_5'+516_WT und *sdiA*_[3-1]_3'+673_EcoK12 wurden zur vorgeschalteten PCR für das Pyrosequencing verwendet. Beim Pyrosequencing selbst kam der Primer *sdiA*_[5-1]_5'+563_WT zum Einsatz. Zusätzlich ist der biotinfreie Primer *sdiA*_[3-1]_3'+673_EcoK12 zu sehen, der bei Vorversuchen zum Pyrosequencing eingesetzt wurde.

Auch sind die Primer zur Amplifikation einer 378 bp großen Sonde für einen Southern Blot zur *sdiA*-Detektion gezeigt (weitere Informationen in Abschnitt 3.1.3). Das erzeugte Amplicon enthielt eine Restriktionsschnittstelle für *Dra*I. Hierfür wurden die Primer *sdiA*_[sdiA 5-1]_5'+295_EcoK12 und *sdiA*_[sdiA 3-1]_3'+673_EcoK12 verwendet.

3.1.2.3 Ergebnisse der Pyrosequenzierung

Die Ergebnisse der Pyrosequenzierung (Abbildung 3-3) lieferten keinen Hinweis auf einen vorliegenden SNP. Die Sequenzen in WT, MIII und MIVa unterschieden sich nicht. Die Sequenz an Position *sdiA* +583 bp wies hier Adenin (statt Thymin) auf. Durch die Pyrosequenzierung

ließ sich die vermutete Sequenz (GTTAGACA) nicht bestätigen, sondern entsprach bei MIII und MIVa der Wildtyp-Sequenz (GTAAGACA). Die Sequenzierung beantwortete nicht die Frage, ob mehrere Genkopien vorlagen, daher wurde ein Southern Blot durchgeführt. Auch die Frage, wie die Analyse der Rohdaten in der Software erfolgte, und ob Minoritäten innerhalb der Software berücksichtigt wurden, und weiter behandelt wurden, wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht beantwortet.

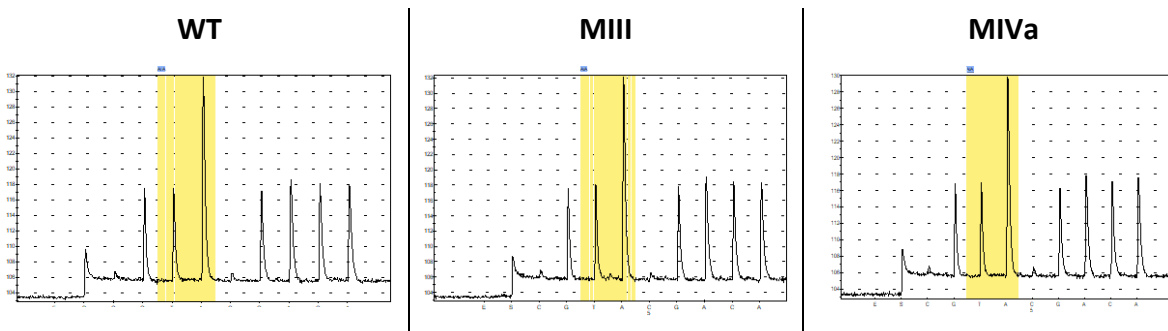


Abbildung 3-3 Pyrosequenzierung für WT, MIII und MIVa

Im gelb markierten Bereich ist bei WT, MIII und MIVa aufgrund des Signal-Musters zu erkennen, dass die gleiche Sequenz vorliegen muss (GTAAGACA). Das erste Signal von links im gelben Bereich ist nur halb so groß, wie das zweite Signal von rechts im gelben Bereich. Beim ersten Signal ist zu folgern, dass eine Base Thymin eingebaut wurde. Anschließend wird zweimal Adenin eingebaut, weshalb das Signal doppelt so groß ausfällt.

3.1.3 Southern Blot

Ergänzend zu der Sanger-Sequenzierung und der Pyrosequenzierung war ein Southern Blot zur Bestätigung notwendig, dass nicht mehrere Genkopien in den *E. coli*-Stämmen WT, MIII und MIVa vorlagen. Nach der Isolierung chromosomaler DNA, sollte mit einer markierten Sonde der Nachweis erbracht werden. Zielführend sollte die Strategie sein, dass innerhalb von *sdiA* nach Restriktionsverdau nur einmal geschnitten wurde. Für n *sdiA*-Kopien erschienen so $n+1$ Banden nach anschließender Detektion auf einer Membran (Abbildung 3-4).

Der Southern Blot wurde nach der in Abschnitt 2.2.2.8 beschriebenen Methode gemäß des *DIG Application Manual for Filter Hybridization* der Roche Diagnostics GmbH durchgeführt [220]. Zur Herstellung einer Digoxigenin-markierten Sonde wurde das PCR DIG Probe Synthesis Kit von Roche Life Science (Cat No. 11 636 090 910) verwendet. Grundlage der Strategie war die Verwendung von Digoxigenin markierter DNA [220], [228].

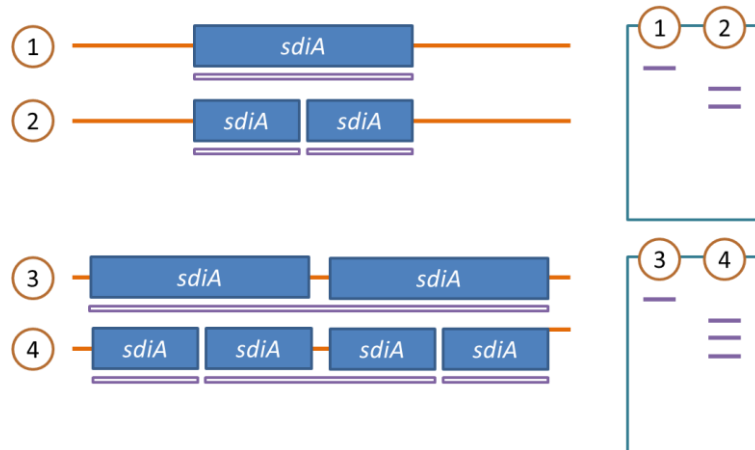


Abbildung 3-4 Konzept Nachweis mehrerer *sdiA*-Gene in WT, MIII und MIVa (eigene Darstellung)

Schritt 1 und 3: Im unverdauten Zustand ist bei Nachweis durch markierte DNA nicht zu erkennen, ob ein *sdiA*-Gen oder n-fach *sdiA*-Gene vorliegen; Schritt 2 und 4: Nach Restriktionsverdau mit *DraI* sind nach der Nachweisreaktion $n+1$ Banden auf der Membran zu sehen.

3.1.3.1 Vorversuche

3.1.3.1.1 DIG-11-dUTP markierte Sonde zur Detektion von *sdiA*

Für die Amplifikation der 378 bp großen Sonde zur *sdiA*-Detektion wurden die Primer *sdiA*_[*sdiA* 5-1]_5'_+295_EcoK12 und *sdiA*_[*sdiA* 3-1]_3'_+673_EcoK12 verwendet (Abbildung 3-5). Für die Amplifikation wurde DNA aus *E. coli* MG1655 GK-Nr. 2110 verwendet, die mittels Kochmethode isoliert wurde (Abschnitt 2.2.2.1.1). Mit einem eingesetzten Template-Volumen von 0,5 µl auf 25 µl-Ansatz wurde die Herstellung einer DIG-markierten Sonde durchgeführt. Die PCR-Bedingungen entsprachen den Bedingungen aus den Voruntersuchungen. Die geeignete Hybridisierungstemperatur wurde nach der in Abschnitt 2.2.2.8 beschriebenen Methode berechnet und im weiteren Verlauf verwendet.

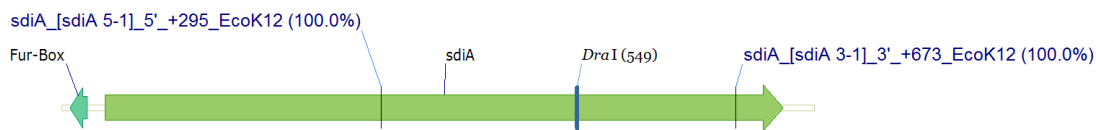


Abbildung 3-5 Positionen der Primer innerhalb *sdiA* (eigene Darstellung)

Zusätzlich sind die Primer zur Amplifikation einer 378 bp großen Sonde zur *sdiA*-Detektion gezeigt (hierzu finden sich weitere Informationen in Abschnitt 3.5.4). Das erzeugte Amplicon enthielt eine Restriktionsschnittstelle für *DraI*. Hierfür wurden die Primer *sdiA*_[sdiA 5-1]_5'+295_EcoK12 und *sdiA*_[sdiA 3-1]_3'+673_EcoK12 verwendet.

In der Agarose-Gelelektrophorese wanderte die Sonde bedingt durch den DIG-11-dUTP-Einbau langsamer als die unmarkierte Sonde (Abbildung 3-6). In Spur 4 war weniger DNA zu erkennen im Vergleich zu Spur 5, welche eine unmarkierte Sonde aus einer vorangegangenen PCR enthielt. Die Negativkontrolle (NTC) wies keine Verunreinigung auf. Eine Abschätzung der Sondenkonzentration in Spur 1 mithilfe des Größenmarkers ließ eine Konzentration von ca. 12 – 14 ng/μl (60 – 70 ng/5 μl) vermuten (Abbildung 3-6).

Um eine ausreichende Sondenmenge in den Southern Blot einzusetzen, war eine Konzentrationsbestimmung der Sonde notwendig. Hierzu wurde - ergänzend zur Möglichkeit anhand einer Bandenintensität im Agarosegel (siehe Abschnitt 2.2.2.6.1) die Konzentration abzuschätzen - mittels Qubit® Fluorometer die Konzentration bestimmt (vergleiche Abschnitt 2.2.2.6.3).

Mit den Primern *sdiA*_[sdiA 5-1]_5'-438_EcoK12 und *sdiA*_[sdiA 3-1]_3'+848_EcoK12 wurde ein 1286 bp langes DNA-Fragment mit *sdiA* amplifiziert, das für die Ermittlung der Detektionsgröße und später als Positivkontrolle im Southern Blot benötigt wurde.

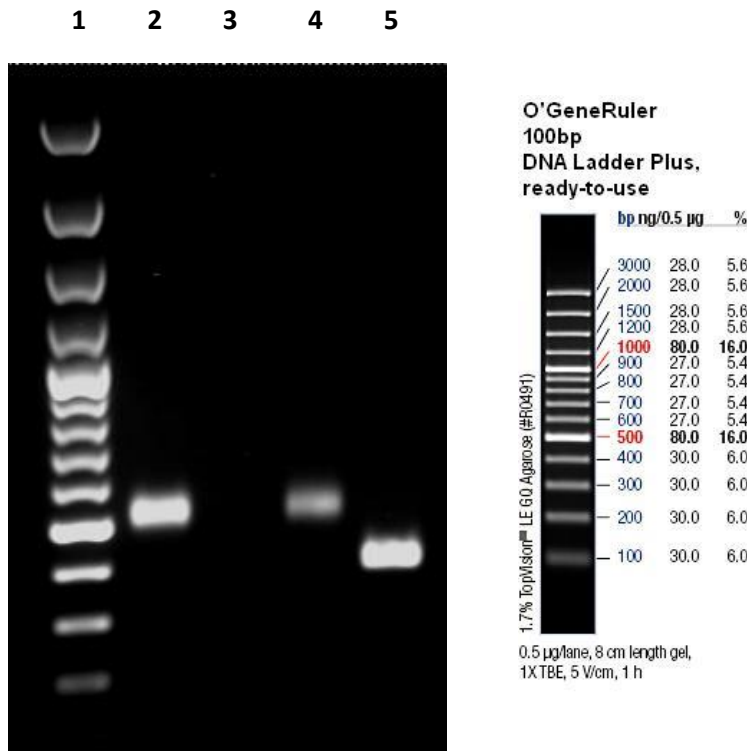


Abbildung 3-6 Gelbild *sdia* DIG-11-dUTP-Sonde; 13.04.2012

TAE-Agarosegel, 1,0%, 1-fach E-Puffer, 100 V; Ethidiumbromidfärbung

Spur 1: DNA-Größenmarker 5 µl; Spur 2: MG1655 Sonde *sdia*-DIG-11-dUTP 5 µl;

Spur 3: MG1655 Sonde *sdia*-DIG-11-dUTP 5 µl NTC;

Spur 4: MG1655 Sonde *sdia*-DIG-11-dUTP älterer Ansatz, weniger Polymerase verwendet;

Spur 5: MG1655 Sonde *sdia* ohne DIG-11-dUTP 0,5 µl

3.1.3.1.2 Vorversuch Southern Blot Ermittlung der Detektionsgrenze

Dem Protokoll aus Abschnitt 2.2.2.8 folgend wurde ein Vorversuch für den Southern Blot mit- samt Ermittlung der Detektionsgrenze durchgeführt. Unter Detektionsgrenze war die kleinste DNA-Masse gemeint, die im Rahmen dieser Methode nachgewiesen werden konnte. Anhand der ermittelten Masse konnte im weiteren Verlauf abgeschätzt werden, wieviel an DNA min- destens einzusetzen war. Zuerst wurde eine Agarose-Gelelektrophorese mit dem PCR-Produkt für WT durchgeführt. Hierbei wurde eine Verdünnungsreihe aufgetragen. Gleichzeitig wurde mit dem verwendeten Fragment, die Tauglichkeit als Positivkontrolle getestet. Mit Ethidium- bromid waren DNA-Mengen unter 1-2 ng nicht sichtbar (Abbildung 3-7). Es bestand die Gefahr der Fehlinpretation, dass Probenmaterial nicht aufgetragen wurde.

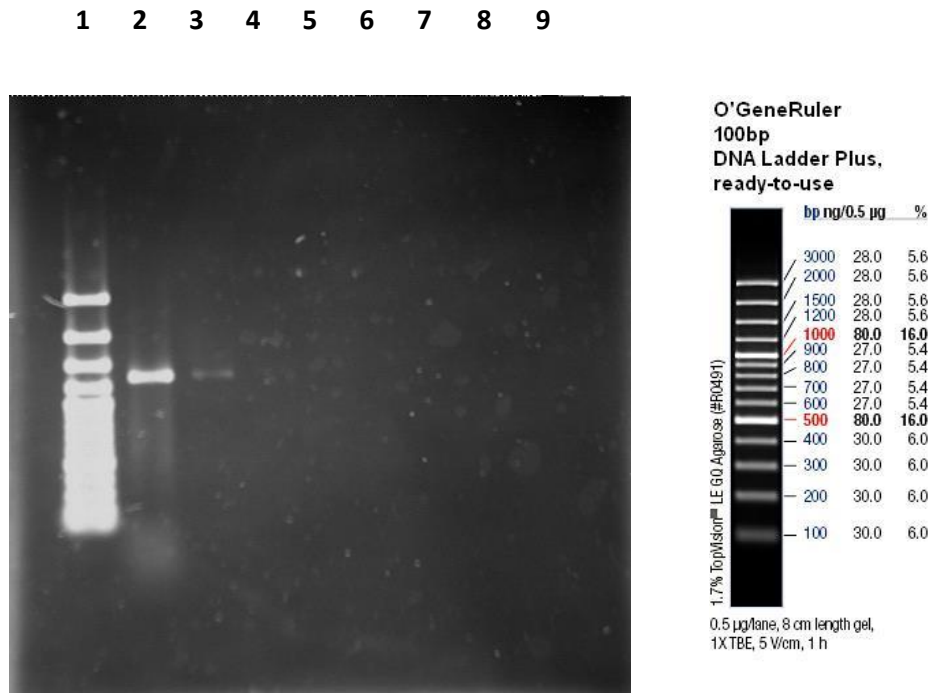


Abbildung 3-7 Ermittlung Detektionsgrenze der *sdIA*-DIG-11-dUTP-Sonde.

TAE-Agarosegel, 1,0%, 1-fach E-Puffer, 100 V; Ethidiumbromidfärbung

Spur 1: Größenmarker 100 bp 5 µl; Spur 2 bis Spur 9 abnehmende DNA-Mengen des gleichen *sdIA*-PCR-Produkts, das eine Konzentration von 3,55 ng/µl hat.

Spur 2: 1/1 17,75 ng; Spur 3: 1/10 1,775 ng; Spur 4: 1/20 887,5 ng; Spur 5: 1/60 333 pg;

Spur 6: 1/100 200 pg; Spur 7: 1/100 200 pg; Spur 8: 1/200 88,75 pg; Spur 9: 1/400 44,375 pg

In 20 ml Hybridisierungspuffer wurden 7 µl behandelte Sonde zugegeben. 10 ml dieses Puffers wurden für die Detektion in diesem Vorversuch verwendet. Eine Konzentrationsbestimmung mit dem BioAnalyzer® (vergleiche Abschnitt 2.2.2.6.4) ergab eine Konzentration von 8 ng/µl, so dass insgesamt 28 ng an Sonde für diesen Versuch verwendet wurden.

Nach einer Hybridisierung mit der ermittelten Hybridisierungstemperatur von 43 °C (siehe Abschnitt 2.2.2.8) konnte eine Detektionsgrenze von ca. 80 pg DNA ermittelt werden. Die Membran wurde für 45 min bei 80 °C im Heizofen erhitzt („gebacken“), um die Detektion sichtbar zu machen. In Spur 8 in Abbildung 3-8 war bei 88 pg noch eine Bande zu erkennen. In Spur 9 war bei ca. 45 pg DNA noch eine Bande schwach sichtbar. Mit diesem Ergebnis ließ sich für die Durchführung der Southern Blots die einzusetzende DNA-Menge für eine Detektion ermitteln. Mit einer Masse von 28 ng Sonde ließen sich mindestens 50 pg DNA und dementsprechend 50 pg *sdIA* detektieren (Abbildung 3-8).

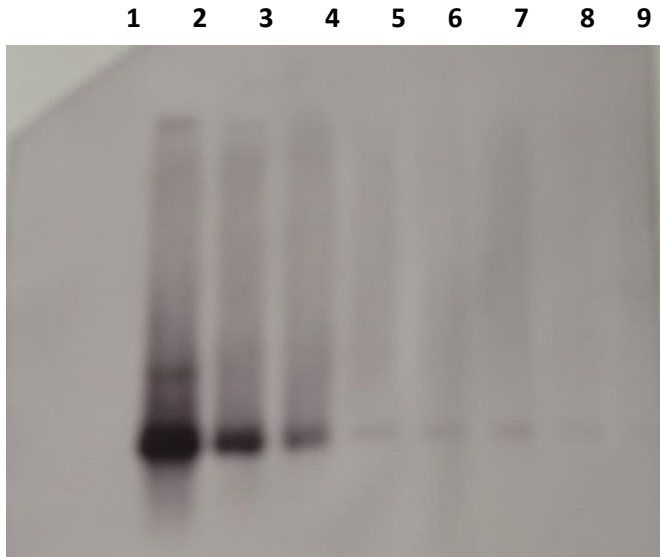


Abbildung 3-8 Ergebnis Detektionsgrenze der *sdiA*-DIG-11-dUTP-Sonde.

Spur 1: Größenmarker 100 bp 5 μ l (nach Detektion nicht zu sehen); Spur 2 bis Spur 9 abnehmende DNA-Mengen des gleichen *sdiA*-PCR-Produkts, das eine Konzentration von 3,55 ng/ μ l hat;
 Spur 2: 1/1 17,75 ng; Spur 3: 1/10 1,775 ng; Spur 4: 1/20 887,5 pg; Spur 5: 1/60 333 pg;
 Spur 6: 1/100 200 pg; Spur 7: 1/100 200 pg; Spur 8: 1/200 88,75 pg; Spur 9: 1/400 44,375 pg

Das *Epicentre MasterPure Complete DNA and RNA Purification Kit* wurde zur DNA-Isolierung aus den *E. coli*-Stämmen WT, MIII und MIVa verwendet [191]. Für jeden *E. coli*-Stamm wurden mehrere Isolierungen gemacht, um ausreichend Material für Vorversuche und zusätzliche Versuchsdurchläufe zu erhalten. Die Konzentration wurde mit dem NanoDrop™-Spektrometer ermittelt (vergleiche Abschnitt 2.2.2.6.2).

3.1.3.1.3 Berechnung der einzusetzenden DNA-Menge

Als Vorbereitung zur notwendigen Sondenmenge, um *sdiA* zu detektieren, war die Menge an *sdiA* innerhalb der *E. coli*-Gesamt-DNA zu berechnen. Diese Menge bezog sich auf die Gesamt-DNA, die aus einer ÜNK gewonnen wurde. Bei *E. coli* war von einem ca. $4,65 \cdot 10^6$ bp im gesamten Genom auszugehen. In 1 ml einer ÜNK fanden sich nach ca. 18 h Inkubation bei 37 °C und 130 rpm ca. $5 \cdot 10^9$ Einheiten/ml.

Ausgehend von einem einzigen *sdiA*-Gen innerhalb des bakteriellen Chromosoms lagen in der isolierten DNA $5 \cdot 10^9$ *sdiA*-Gene in 1 ml ÜNK vor. In *E. coli* besaß *sdiA* eine Größe von 723 bp. Insgesamt war in einem Isolat aus 1 ml ÜNK $3,615 \cdot 10^{12}$ bp/ml für *sdiA* zu erwarten (n *sdiA* x *sdiA* bp x n Einheiten).

Für das Molekulargewicht von 1 bp wurde von einem mittleren Wert von 660 g/Mol ausgegangen. 1 Mol enthielt $6,022 * 10^{23}$ Moleküle. Für *sdiA* lagen in 1 ml ÜNK $6,003 * 10^{-12}$ mol vor ($\frac{3,615 * 10^{12}}{6,022 * 10^{23}} = 6,003 * 10^{-12}$ mol in 1 ml). Diese Menge hatte ein Gewicht von ca. 3,9 ng ($6,003 * 10^{-12}$ mol * 660 g/mol = $3,962 * 10^{-9}$ g). Da 3 ml ÜNK verwendet wurden, ergab sich eine Masse von 1,189 ng an *sdiA*. Das entsprach der maximalen Ausbeute die theoretisch zu erreichen war, wenn nur eine Genkopie vorlag.

Aus der Ermittlung der Detektionsgrenze war bekannt, dass mit ca. 4 ng an eingesetzter Sonde mindestens 50 pg des *sdiA* enthaltenden PCR-Produkts detektiert wurden. Mit dieser Information konnte die einzusetzende Menge an Gesamt-DNA für den Southern-Blot ermittelt werden. Das resultierende Amplicon hatte eine Gesamtlänge von 1303 bp, davon gehörten 723 bp zum *sdiA*-Gen. In 50 pg Amplicon lagen ca. 27,7 pg an *sdiA*-Gen vor.

Ausgehend von einem DNA-Doppelstrang, betrug das Molekulargewicht für das PCR-Fragment 806.567 g/mol ($2 * 403.283,5$ g/mol; mit der Software VectorNTI® ermittelt). *sdiA* hatte ein Molekulargewicht von 223.948,9 g/mol (mit VectorNTI ermittelt). In 50 pg lagen $6,19 * 10^{-17}$ mol PCR-Fragment, bzw. *sdiA* vor. Diese Stoffmenge wurde mindestens zur Detektion benötigt. Aus Stoffmenge und Molekulargewicht ergab sich eine Masse von 13,8 pg. *sdiA* machte im *E. coli*-Genom 0,0175 % aus. Daraus ergab sich eine einzusetzende Gesamt-DNA-Masse von ca. 88 ng (Gl. 9).

$$\frac{13,8 * 10^{-12} \text{ g}}{0,0157 \%} = 87,898 \text{ ng} \quad (\text{Gl. 9})$$

Für die Isolate, deren Konzentration ermittelt wurde, waren für ca. 88 ng insgesamt 0,2 bis 0,3 µl einzusetzen, um die notwendige Menge an *sdiA* zu erhalten. Für den Southern Blot wurden 3 µl an chromosomaler DNA eingesetzt. Damit wurde das Zehnfache an notwendiger DNA-Menge eingesetzt. Hierdurch sollte eine Detektion gewährleistet werden.

3.1.3.1.4 Restriktionsverdau der Isolate

Als Vorbereitung zur Überprüfung, ob mehrere *sdiA*-Kopien im Chromosom vorlagen, wurde die gesamte DNA einem Restriktionsverdau unterzogen (vergleiche Abbildung 3-4). Das Rest-

riktionsenzym sollte einmal innerhalb *sdiA* schneiden und der Schnitt sollte im Bindungsbe- reich der DIG-Sonde liegen. Hierzu wurden mittels der Software *VectorNTI*[®] Restriktions- enzyme gesucht, die möglichst mittig in *sdiA* schneiden. Für den Verdau wurde *DraI* [229] aus- gewählt (siehe Abbildung 3-5). Das Enzym schneidet einmal innerhalb *sdiA* in der Region der Sonde. Die Fragmente hatten nach dem Schnitt glatte Enden (*blunt ends*), so dass die Möglich- keit zur Religation reduziert war. Nach Isolierung von DNA aus WT, MIII und MIVa wurde diese DNA mit *DraI* behandelt. Der Erfolg des Restriktionsverdau der verschiedenen Isolate wurde mittels Gelelektrophorese kontrolliert. Für mögliche Versuchswiederholungen wurden jeweils zwei Ansätze mit FastDigest *DraI* fragmentiert.

Um die genaue Zeit der Auftrennung der DNA zu ermitteln, wurde ein Gel in der gleichen Kam- mer und in der gleichen Größe verwendet, wie auch für den eigentlichen Southern Blot vorge- sehen. Für die Gelelektrophorese wurde die Kammer *Peqlab ExW Revolution* verwendet. Bei einer Spannung von 110 V wurde für 5,5 Stunden DNA aufgetrennt. Für das Gel wurden 300 ml TAE-1 x-Puffer mit 3,2 g Agarose eingesetzt. Anschließend wurden weitere 100 ml TAE-1 x-Puf- fer zugefügt, nachdem die Temperatur abgesunken war. Nach 5,5 Stunden wurde das Gel im Ethidiumbromid-Bad gefärbt, um später DNA unter UV-Bestrahlung sichtbar zu machen.

3.1.3.1.5 *Positiv- und Negativ-Kontrolle*

Zur Bestätigung, dass die eingesetzte Sonde nur an *sdiA* band, wurden zwei Kontrollen einge- plant. Als Positivkontrolle wurde das Fragment verwendet, das schon bei der Ermittlung der Detektionsgrenze benutzt wurde.

Als Negativkontrolle wurde über BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) u.a. *Staphy- lococcus epidermidis* (GK2278) ermittelt. Zur Isolation von DNA wurde eine Kultur der Deut- schen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH mit der DMS No.: 20044 (<https://www.dsmz.de/catalogues/details/culture/DSM-20044.html>) verwendet. Aus einer frischen ÜNK wurde mit dem chromosomale DNA isoliert. Als weitere Kontrolle wurde DNA aus *E. coli* WT (GK571) vorbereitet. Die Konzentration wurde mittels Qubit[®] Fluorometer und Nanodrop[™] Spectrophotometer (nur GK2278). Mit FastDigest *EcoRI* wurden die Kontrollen fragmentiert. Im Gegensatz dazu wurden die Proben mit FastDigest *DraI* fragmentiert. Auf die Inaktivierung wurde verzichtet. Der DNA-Größenmarker konnte als weitere Negativkontrolle

verwendet werden, da hier auch DNA frei von *sdiA* vorlag. Als Kontrollansatz wurde im Agarosegel die Positivkontrolle aus drei Komponenten beladen: DNA-Beschwererlösung, *sdiA*-Amplicon und *sdiA*-Sonde.

3.1.3.1.6 Erwartete Fragmentgrößen

Durch das bei NCBI hinterlegte Genom von *E. coli str. K12 substr. MG1655* [230] ließen sich die Fragmentgrößen nach Verdau mit *DraI* oder *EcoRI* *in silico* ermitteln, die durch Detektion mit einer DIG-markierten Sonde sichtbar wurden (Abbildung 3-9, Abbildung 3-10).



Abbildung 3-9 Schnittstellen für das Restriktionsenzym FastDigest *DraI* im Sequenzbereich bei *sdiA* (eigene Darstellung)

Innerhalb eines Sequenzbereichs von 6302 bp schneidet *DraI* dreimal. Davon einmal innerhalb *sdiA*. Im Southern Blot ist bei Detektion von *sdiA* mit zwei Banden zu rechnen.

Durch den Restriktionsverdau mit *DraI* entstanden zwei Fragmente (ca. 1655 bp und 4641 bp). Beide Fragmente enthielten *sdiA*-Sequenzbereiche. Bei Restriktionsverdau mit *EcoRI* entstand ein ca. 10.441 bp großes Fragment, das *sdiA* enthielt.

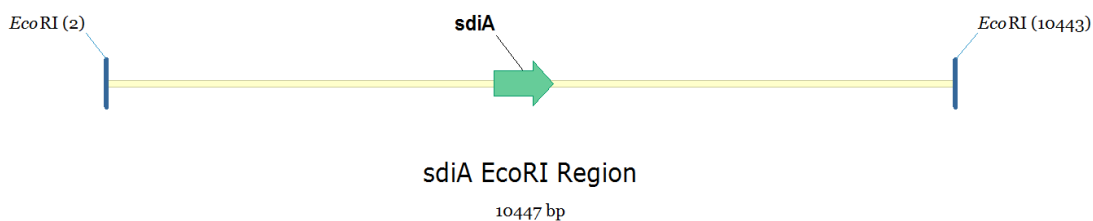


Abbildung 3-10 Schnittstellen für das Restriktionsenzym FastDigest *EcoRI* im Sequenzbereich bei *sdiA* (eigene Darstellung)

Erst nach 10.441 bp schneidet *EcoRI* ein zweites Mal. Innerhalb dieses Fragments ist *sdiA* lokalisiert und wird nicht fragmentiert. Für den Southern Blot ist nach Fragmentierung mit *EcoRI* nur eine Bande für *sdiA* zu sehen.

3.1.3.2 Durchführung Southern Blot

Nachdem eine Detektionsgrenze von ca. 30-50 pg ermittelt war, wurde DNA aus Isolierungen mit dem *Epicentre-Kit* verwendet. Ein 0,75 %-iges Ethidiumbromid-freies 400 g Gel wurde in einem horizontalen Gelsystem mit integrierter Pufferumwälzung gegossen (*Peqlab Perfect-Blue Maxi ExW Revolution* [231]). Bei 120 V wurde für 5,5 Stunden eine Agarosegelelektrophorese angesetzt. Jeweils zwei Taschen wurden am Gelkamm mit Klebeband zu einer großen Tasche zusammengefügt.

3.1.3.3 Ergebnisse des Southern Blots

In Abbildung 3-11 ist das Ergebnis der vorgeordneten Agarosegelelektrophorese zum Southern Blots zu sehen. Die Banden in den Spuren 2 bis 5 fallen durch die breiteren Geltaschen auf. In den Spuren 2 bis 4 wurden jeweils zwei Banden durch die Sonde detektiert. Hier wurde chromosomale DNA aufgetragen, die mit FastDigest *DraI* fragmentiert wurde. In Spur 5 war nur eine Bande zu sehen. Hier wurde chromosomale DNA aufgetragen, die mit *EcoRI* fragmentiert wurde. In Spur 6 und 7 waren keine Banden zu sehen. Als Negativkontrolle war bei *S. epidermidis* (GK2278) keine Bande zu erwarten. Der DNA-Größenmarker in Spur 7 zeigte keine Banden nach Detektion mit der Sonde. In Spur 1 waren mehrere Banden zu sehen. Neben dem 1286 bp *sdiA*-PCR-Fragment und der 378 bp langen DIG-Sonde waren weitere Banden zu sehen. Hier waren Nebenprodukte aus den PCR zu vermuten, die sonst mit Ethidiumbromid nicht sichtbar waren.

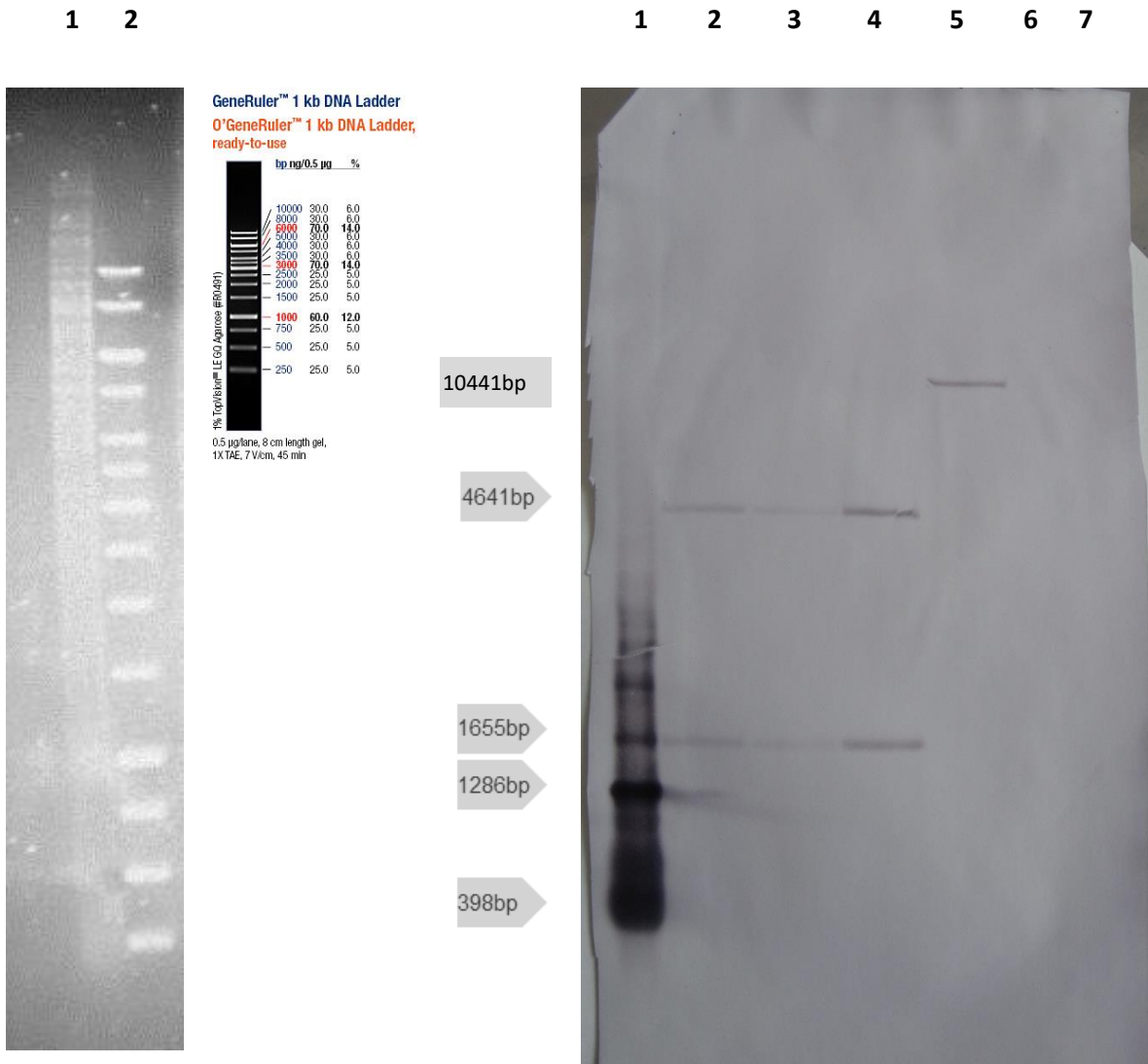


Abbildung 3-11 **linke Gelhälfte: Verlaufs kontrolle nach Färbung mit Ethidiumbromid;**
rechte Gelhälfte: Southern Blot Membran nach Detektion

Links

TAE-Agarosegel, 1,0%, 1-fach E-Puffer, 100 V; Ethidiumbromidfärbung;
 Spur 1: Kit MIVa 72 2 3 µl Restriktionsansatz ; Spur 2: 1 kb DNA Größenmarker 2 µl

Rechts

Spur 1: 2 µl *sdiA*-PCR; Spur 2: Spur 2: Kit WT 2 45 µl Verdau *DraI*;
 Spur 3: Kit MIII 1 45 µl Verdau *DraI*; Spur 4: Kit MIVa 72 2 45 µl Verdau *DraI*;
 Spur 5: Kit WT 50 µl *EcoRI*; Spur 6: S. Epidermidis GK2278 50 µL *EcoRI*;
 Spur 7: 1 kb DNA Größenmarker 3 µl

3.1.4 Quantitative Bestimmung der *sdiA* Expression

Durch den Southern Blot wurde keine veränderte *sdiA*-Kopienzahl in den *E. coli*-Mutanten MIII (GK574) und MIVa (GK575) gefunden. Im folgenden Experiment wurde untersucht, ob die *sdiA* Expression bei *E. coli* MIVa im Vergleich zu WT und MIII erhöht war, als eine erste mögliche Erklärung der erhöhten *acrA*-Expression in MIVa (vergleiche Abschnitt 1.10.1).

3.1.4.1 Primerauswahl und Haushaltsgen

Für die Bestimmung der *sdiA* Expression wurde ein Primerpaar mit einem Amplicon im hinteren *sdiA*-Genbereich gewählt. Bei der Primerwahl waren Vorgaben zu berücksichtigen: Die Primer sollten einen GC-Gehalt von 30-60 % besitzen und nicht länger als 18-30 Nucleotide sein. Das Amplicon sollte eine Länge von 70 - 150 bp haben. Die optimale Schmelztemperatur T_m sollte bei 60 °C liegen. Eine Differenz der T_m der einzelnen Primer sollte nicht mehr als 2 °C überschreiten und maximal 2 G/C sollten unter den letzten 5 Nucleotiden des 3'-Primerendes vorliegen. Verwendet wurden die Primer *sdiA*_[GK571_RT-PCR_5-1]_+480 und *sdiA*_[GK571_RT-PCR_3-1]_+575 die ein Amplicon von 115 bp bildeten. Zusätzlich waren Primer für ein Haushaltsgen (englisch: *housekeeping gene*) auszuwählen. Hier wurde *cysG* als Haushaltsgen verwendet. *cysG* kodiert für das Gen der Sirohäm-Synthase, wird konstitutiv exprimiert, und in der Literatur als Referenzgen für *real-time quantitative PCR* bei *E. coli* empfohlen [27], [232]. Für *cysG* wurden die Primer *cysG*_+932_fw-RT und *cysG*_+1019_rv-RT mit einem Amplicon von 88 bp verwendet.

3.1.4.2 Quantitative Bestimmung der *sdiA* Expression

Eine Untersuchung der *sdiA* Expression wurde als Ergänzung zur Kontrolle auf mehrere chromosomale *sdiA*-Genkopien in MIII und MIVa durchgeführt. Da SdiA eine zentrale Rolle in der Regulation von Gen Expressionen einnimmt, war es Ziel des Projekts den Zusammenhang von *sdiA*/SdiA, AcrAB und einer damit verbundenen Multi-Drug-Resistance (MDR) zu untersuchen. Die Bestimmung wurde nach der in Abschnitt 2.2.2.3.5 beschriebenen Methode durchgeführt. In der Literatur wurden bei ähnlichen *sdiA*-Untersuchungen unterschiedliche Temperaturen verwendet [68], [69], [225], daher sollte in diesem Versuch parallel mit zwei Ansätzen gearbeitet werden. Die verwendete mRNA wurde bei $OD_{600\text{ nm}} 0,4$ und $0,7$ geerntet. Die verwendeten Normierungs- und Validierungsmethoden sind in Kapitel 2.2.2.3.5 beschrieben und werden in

Abschnitt 5.1 diskutiert. Die optimalen PCR-Bedingungen sind in Kapitel 3.1.4.1 erwähnt. Abweichend von den Vorversuchen für *cysG* wurde für beide Primer die gleiche Annealing-Temperatur von 60 °C gewählt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3-12 zusammen gefasst.

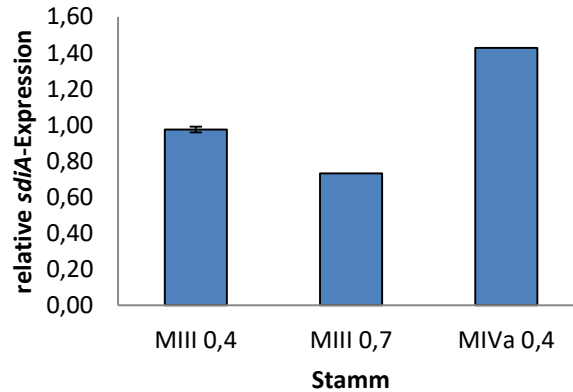


Abbildung 3-12 Ergebnisse der quantitativen Bestimmung der relativen *sdiA* Expression in Bezug auf die *sdiA*-Expression in WT.

Vergleich *sdiA* Expression der *E. coli*-Stämme MIII ($OD_{600\text{ nm}} 0,4$ und $0,7$) und MIVa ($OD_{600\text{ nm}} 0,4$) bezogen auf den Wert von *E. coli* WT ($OD_{600\text{ nm}} 0,7$). Ergebnisse gezeigt als relative *sdiA* Expression.

Die Ergebnisse der quantitativen Bestimmung der *sdiA* Expression wurden in Relation zur Expression von *E. coli* WT $OD_{600\text{ nm}} 0,7$ betrachtet. Die relative *sdiA* Expression für *E. coli* WT bei $OD_{600\text{ nm}} 0,7$ betrug 1,0. Die Expression von *sdiA* in *E. coli* MIII war zum Messpunkt $OD_{600\text{ nm}} 0,4$ vergleichbar mit dem Bezugsstamm *E. coli* WT. Bei Messpunkt $OD_{600\text{ nm}} 0,7$ war die Expression erniedrigt. Diese Erniedrigung bei MIII war statistisch signifikant. Die Messung wurde jeweils zweimal durchgeführt, daher war die Aussagekraft der Ergebnisse begrenzt. Bei *E. coli* MIVa war die Expression von *sdiA* beim Messpunkt $OD_{600\text{ nm}} 0,7$ um 42 % erhöht im Vergleich zum Bezugsstamm *E. coli* WT (1,0). Bei gleicher chromosomaler *sdiA*-Kopienzahl (Southern-Blot in Abschnitt 3.1.3.3) schien im Unterschied zu MIII die *sdiA* Expression durch einen weiteren Faktor beeinflusst zu werden. Mögliche Ursachen der Standardabweichungen und der unterschiedlichen Expressionen werden in Abschnitt 5.1 diskutiert.

4 Ergebnisse II - Untersuchungen mit Qnr

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde der Einfluss der Topoisomerase-Schutzproteine QnrA1 und QnrB1 (Abschnitt 1.7.3.3) auf die Entwicklung einer hochgradigen Fluorchinolon-Resistenz untersucht. Die Anwesenheit von QnrA1 und QnrB1 allein in einem *E. coli*-Stamm sorgt nicht für die Ausbildung einer klinisch relevanten Fluorchinolon-Resistenz. Der Effekt durch Qnr allein ist sehr gering und bringt bei FQ-empfindlichen Stämmen nur eine Steigerung der minimalen Hemmkonzentration (MHK) von ein bis zwei Stufen. Nachdem die MHK von Ciprofloxacin für die verwendeten *E. coli*-Stämme in einer präziseren Konzentrationsabstufung (nicht nach EUCAST-Standard, Tabelle 4-1) ermittelt worden war, wurde ein Ciprofloxacin-Forward-Assay (Selektionsexperiment mit Ciprofloxacin, Abschnitt 2.2.1.15) durchgeführt, und mögliche Mutanten auf eine Erhöhung der MHK von Ciprofloxacin hin untersucht [24].

Tabelle 4-1 Vergleich der MHK von Ciprofloxacin (Cip); Verwendung unterschiedlicher Plasmide

Stamm	MHK von Cip ($\mu\text{g/ml}$)	
	präzise Konzentration	EUCAST
MII	1,2	2
+ pUC19	1,2	2
+ pHPNE19-02	3,4 – 3,6	4
+ pHPNE19-02.1	3,4 – 3,6	4
+ pHPNE18-01	1,8 – 2	4
+ pHPNE18-01.1	1,8 - 2	4

Für den Ciprofloxacin-Forward-Assay war ein Selektiv-Agar notwendig mit einer Konzentration oberhalb der MHK von Ciprofloxacin und unterhalb der MPC von Ciprofloxacin (Abschnitt 1.6). Ausgehend von der präzisen Ermittlung der MHK von Ciprofloxacin, wurde hierfür eine ÜNK auf 8-fache MHK von Ciprofloxacin-Agar ausgestrichen und bei 37 °C für 24 h inkubiert. Aus vorangegangenen Arbeiten war bekannt, dass sich eine 6- bis 8-fache Konzentration zur Selektion mit Ciprofloxacin eignete [18], [27], [167], [233]. Mutanten, die auf den Selektionsplatten gefunden wurden, wurden durch erneutes Überimpfen auf Ciprofloxacin-Agar ausgeeinzelt und weiter untersucht.

Als Kontrolle wurden zusätzlich Ciprofloxacin-Forward-Assays mit dem *E. coli*-Wildtyp WT und *E. coli* WT-K (GK4041) durchgeführt (Abschnitt 4.2). Aus der Arbeit von Dr. B. KÖRBER-IRRGANG stammte die Mutante WT-K [180], wo bei einem Wildtyp WT Stammhintergrund eine Mutation in *gyrB* (*gyrBS464Y*) vorliegt. Diese Mutante war als Vergleich zu *E. coli* WT und zur *E. coli*-

Mutante MII interessant, da sich *gyrBS464Y* außerhalb der QRDR (*quinolone resistance-determining region*) der primären Zielstruktur GyrA liegt und außerhalb der QRDR von GyrB (Abschnitt 1.7). Der Aminosäureaustausch außerhalb der QRDR von GyrB stellte eine Erweiterung dieser Region dar [180]. Als weitere Kontrolle wurden Ciprofloxacin-Forward-Assays bei WT, WT-K und MII - transformiert mit dem resistenzfreien Vektor pUC19 – durchgeführt.

4.1 Feinbestimmung der MHK von Ciprofloxacin und Einfluss von IPTG auf die MHK

Aus der Arbeit von Dr. N. HILSBURG-EMRICH [18] lagen Plasmide mit PMQR (*plasmid mediated (fluoro)quinolone resistance*) Genen vor, die auf den Vektoren pUC18 und pUC19 basierten und den Promotor *Plac* besaßen. Transformanden der *E. coli*-Mutante MII mit den Plasmiden pHPNE19-02 und pHPNE18-01 wurden direkt verwendet. Mit den Plasmiden pHPNE19-02.1 und pHPNE18-02.1, bei denen *lacZ* deletiert war, wurde die *E. coli*-Mutante MII jeweils transformiert (vergleiche Abschnitt 2.2.1.8). Vor dem eigentlichen Versuch (Abschnitt 4.2) wurde eine Feinbestimmung (Abschnitt 2.2.1.12.2) der MHK von Ciprofloxacin durchgeführt. Ausgehend von 0,4 µg/ml wurde die Ciprofloxacin-Konzentration in 0,2 µg-Schritten erhöht. Messungen erfolgten mit und ohne Induktion des *lac*-Operons durch 1 mM IPTG (Tabelle 4-2).

Tabelle 4-2 Vergleich der MHK von Ciprofloxacin (Cip); Verwendung unterschiedlicher Plasmide

Plasmid	MHK von Cip (µg/ml)	
	-IPTG	+IPTG
MII	1,2	1,2
+ pUC19	1,2	1,2
+ pHPNE19-02	3,4 – 3,6	3,4 – 3,6
+ pHPNE19-02.1	3,4 – 3,6	3,4 – 3,6
+ pHPNE18-01	1,8 – 2	1,8 – 2
+ pHPNE18-01.1	1,8 - 2	1,8 – 2

Durch Induktion mit IPTG resultierte keine Zunahme der MHK von Ciprofloxacin. Phänotypisch schien die niedrige Expression bei Abwesenheit von IPTG ausreichend zu sein, um die gleiche MHK von Ciprofloxacin zu erreichen. Ein Unterschied der MHK zwischen Transformanden mit Plasmid pHPNE18-01 oder pHPNE18-01.1, bzw. mit pHPNE19-02 oder pHPNE19-02.1 war nicht festzustellen. Die ermittelten MHK von Ciprofloxacin bestätigten die Ergebnisse aus der Arbeit von Dr. N. HILSBURG-EMRICH [18]. Für den Ciprofloxacin-Forward-Assay wurde jeweils die 4-fache

oder 8-fache Konzentration der MHK von Ciprofloxacin für die LB-Agarplatten verwendet. Transformanden mit den Plasmiden pHPNE18-01.1 und pHPNE19-02.1 wurden für die Ciprofloxacin-Forward-Assays verwendet.

4.2 Charakterisierung der Transformanden und *In-vitro*-Selektion von QnrA1 und QnrB1 in *E. coli* WT (GK571), *E. coli* WT-K (GK4041) und *E. coli* (GK573) MII

Neben der Feinbestimmung der MHK von Ciprofloxacin wurden für den Ciprofloxacin-Forward-Assay die MHKs von verschiedenen Antibiotika für die Transformanden durch Mikrodilutionsverfahren ermittelt (gemäß Abschnitt 2.2.1.12.1). In Tabelle 4-3 ist eine Übersicht der MHK von verschiedenen Antibiotika vor Durchführung der Selektionsversuche gezeigt. Hierfür wurde *E. coli* MII (GK573) mit pHPNE19-02.1 (QnrA1) und pHPNE18-01.1 (QnrB1) transformiert. Als Kontrolle wurde MII zusätzlich mit pUC19 transformiert.

Für die Stämme WT und WT-K (Abschnitt 1.10) wurde analog vorgegangen. Für WT wurden aus den Arbeiten von Dr. N. HILSBERG-EMRICH die Transformanden *E. coli* WT pHPNE19-02.1 (Nr. 1) 571 + qnrAΔpMG252 und *E. coli* WT pHPNE18-01.1 (No. 9) 571 + qnrBΔlacZ genutzt [18].

Nach der Feinbestimmung und der Charakterisierung der Transformanden, wurde die *in-vitro*-Selektion gemäß Kapitel 2.2.1.15 durchgeführt (Tabelle 4-4). Eine Erklärung zu 50er-Platten findet sich in Abschnitt 2.2.1.2. Die Abbildung 4-1

Tabelle 4-3 MHK von verschiedenen Antibiotika vor Selektionsversuch

Stamm	MHK ($\mu\text{g/ml}$)			
	Ciprofloxacin	Nalidixinsäure	Tetracyclin	Chloramphenicol
WT	0,015	4 - 8	0,5	4
+ pHPNE19-02.1	0,25	32	0,5	4
+ pHPNE18-01.1	0,12	16 - 32	0,5	4
+ pUC19	0,015	4 - 8	0,5	4
WT-K	0,125	16 - 32	0,5	8
+ pHPNE19-02.1	0,6	128	0,5	8
+ pHPNE18-01.1	0,3 - 0,5	32 - 64	0,5	8
+ pUC19	0,125	16 - 32	0,5	8
MII	2	4.096	2	16
+ pHPNE19-02.1	4	4.096	2	16
+ pHPNE18-01.1	2	4.096	2	16
+ pUC19	2	4.096	2	16

Tabelle 4-4 Ablauf Selektionsversuch am Beispiel von MII pHPNE18-01.1 und MII pHPNE19-02.1

Nr.	Aufgabe	Beschreibung
1	Ansetzen einer Übernachtskultur	100 $\mu\text{g/ml}$ Ampicillin in SOB-Medium
2	Einengen	20:1 einengen
3	48 h auf Cip-LB-Agar	Eingeengte Kultur auf 8x MHK Cip LB-Agar ausplattiert
4	50 er Platte	Sortieren der Kolonien
5	MHK I (Agardilutionsverfahren)	Identifikation von Mutanten mit hoher MHK von Ciprofloxacin
6	MHK II (Microdilutionsverfahren)	Bestimmung der genauen MHK von Ciprofloxacin und weiteren Antibiotika gemäß EUCAST

Nach Durchführung der Ciprofloxacin-Forward-Assays wurden einzelne Mutanten zur Bestimmung der MHK von Ciprofloxacin gesichert (Abschnitt 2.2.1.12.1). Ausgewählt wurden Mutanten mit unterschiedlich erhöhten MHK von Ciprofloxacin (Übersicht Tabelle 15-1). Die Mutanten wurden gemäß Abschnitt 2.2.1.16 nummeriert. Zusätzlich wurden sämtliche LB-Agarplatten mit Kolonien von 50 verschiedenen Mutanten (siehe Abschnitt 2.2.1.2) als Dauerkulturen in einer Mikrotiterplatte gesichert. Allerdings war dadurch nur einmalig die Möglichkeit gegeben die Kultur nach dem Auftauen zu kultivieren. Neben der Sicherung der Mutanten wurden diese während einer MHK-Bestimmung per Agardilutionsmethode auf LB-Selektiv-Agarplatten geimpft. Die Selektiv-Agarplatten enthielten die bis zu 1Tabelle 4-5).

Tabelle 4-5 Schema der einzusetzenden Ciprofloxacin-Konzentration anhand der Ergebnisse der Feinbestimmung für die Stämme WT, WT-K und MII mit Qnr

Für MII pHPNE19-02.1 ergab sich beispielsweise eine Konzentration von 28,8 µg/ml und für MII pHPNE18-01.1 eine Konzentration von 16 µg/ml; [Cip]: Konzentration Ciprofloxacin.

Stamm	MHK Cip (µg/ml)	[Cip] 4x MHK (µg/ml)	[Cip] 8x MHK (µg/ml)
WT	0,015		
+ pHPNE18-01.1	0,06	0,24	0,48
+ pHPNE19-02.1	0,175	0,7	1,4
+ pUC19	0,015	0,06	0,125
WT-K	0,125		
+ pHPNE18-01.1	0,3	1,2	2,4
+ pHPNE19-02.1	0,5	2	4,0
+ pUC19	0,125	0,5	1,0
MII	1,2		
+ pHPNE18-01.1	2		16
+ pHPNE19-02.1	3,6		28,8
+ pUC19	1,2		9,6

Bei der Wiederholung der Selektionsversuche wurde auf das Einengen der Übernachtskultur vor dem Ausstreichen auf Selektionsplatten verzichtet (Schritt 2 in Tabelle 4-4). Grund hierfür war ein starkes Wachstum auf den Agarplatten, die eine Auswertung oder Sicherung einzelner Kolonien nicht erlaubten. Für die Auswertung der Mutationsrate wurde dieser veränderte Verdünnungsschritt bei den Wiederholungen berücksichtigt. Für die Kontrolle MII pUC19, sowie für die Untersuchungen bei *E. coli* WT und *E. coli* WT-K wurden in Schritt 3 in Tabelle 4-4 zwei verschiedene Agarplatten verwendet. Neben Platten mit achtfacher MHK wurden Platten mit einer vierfachen MHK von Ciprofloxacin verwendet. Bei MII pHPNE19-02.1 und MII pHPNE18-01.1 wurden keine Selektionsplatten mit vierfacher MHK verwendet, da zu starkes Wachstum erneut keine Auswertung zuließ.

In Abbildung 4-1 sind die Ergebnisse der Mutationsraten nach 48 h und bei 8-facher MHK von Ciprofloxacin dargestellt. Bei Anwesenheit von Qnr zeigte die Bestimmung der Mutationsrate der *E. coli*-Stämme WT, WT-K und MII eine höhere Mutationsrate im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollen mit pUC19. Im Vergleich zu QnrA1 waren die Mutationsraten mit QnrB1 höher. Insgesamt fällt die MHK von Ciprofloxacin bei selektierten Mutanten aus den QnrA1-Ansätzen höher aus als bei Ansätzen mit QnrB1 mit dem gleichen Stammhintergrund (vergleiche Tabelle 15-1).

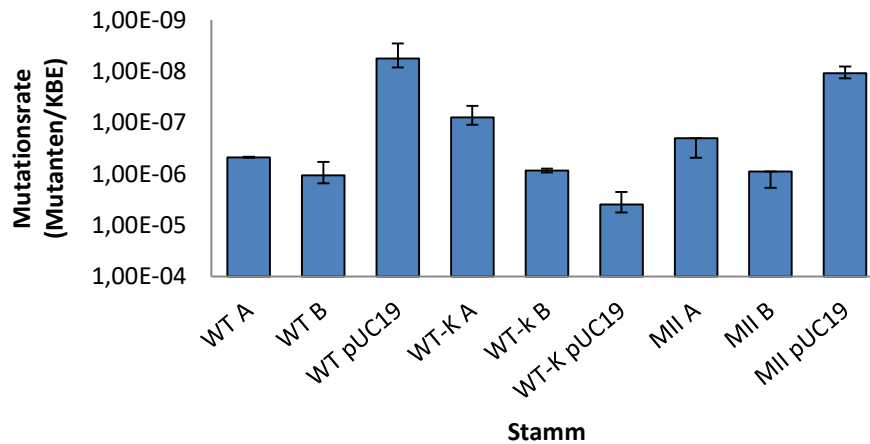


Abbildung 4-1 Mittelwerte der Mutationsraten nach 48 h bei 8-fach MHK von Ciprofloxacin (gilt nicht für WT *qnrB1* und WT-K pUC19)

A: pHPNE19-02.1 (*qnrA1*); B: pHPNE18-01.1 (*qnrB1*); Mittelwerte der Mutationsraten aus den Ciprofloxacin-Forward-Assays mit Standardabweichung bei 8-facher MHK; Mutationsrate bestimmt als Zahl der Mutanten im Verhältnis zur Anzahl der gesamten Zellen (als KBE). Bei WT pHPNE18-01.1 wurde die 16-fache MHK verwendet. Bei WT-K pUC19 wurde die 4-fache MHK verwendet.

Bei WT pHPNE18-01.1 konnten Ansätze mit der 8-fachen MHK von Ciprofloxacin nicht verwendet werden, da ein Bakterienrasen auf den Selektiv-Agarplatten eine Auswertung unmöglich machte. Daher wurde die 16-fache MHK von Ciprofloxacin verwendet, um einzelne Kolonien auswerten zu können. Bei WT-K pUC19 konnten Selektionsexperimente nur mit der 4-fachen MHK von Ciprofloxacin ausgewertet werden. Bei 8-facher MHK war kein Wachstum auf den Selektiv-Agarplatten zu sehen. Die Vergleichbarkeit der Ergebnisse bei WT-K pUC19 mit WT-K pHPNE19-02.1 und WT-K pHPNE18-01.1 ist nur eingeschränkt möglich und ist bei 8-facher MHK von Ciprofloxacin auf einem Niveau wie bei WT pUC19 und MII pUC19 zu erwarten gewesen. In Tabelle 4-6 sind die eingesetzten Selektionskonzentrationen von Ciprofloxacin für die verwendeten Stämmen zu sehen.

Die durch erneutes Ausstreichen gereinigten und als Glycerinkultur gesicherten Stämme wurden charakterisiert. Parallel wurde der Einfluss der verwendeten Vektoren untersucht, um auszuschließen, dass die ermittelten Ergebnisse sich durch eine Veränderung der Plasmide erklären ließen (Abschnitt 4.3).

Tabelle 4-6 Eingesetzte Selektionskonzentrationen für die verwendeten Stämme

Stamm	x-fach MHK	[Ciprofloxacin] ($\mu\text{g/ml}$)
WT pHPNE19-02.1	8x	1,4
WT pHPNE18-01.1	16x	0,96
WT pUC19	8x	0,125
WT-K pHPNE19-02.1	8x	4,0
WT-K pHPNE18-01.1	8x	2,4
WT-K pUC19	4x	0,5
MII pHPNE19-02.1	8x	16
MII pHPNE18-01.1	8x	28,8
MII pUC19	8x	9,6

4.3 Einfluss der verwendeten Vektoren auf die *In-vitro*-Selektion

Durch Untersuchung der Plasmide der selektierten Mutanten sollte bestätigt werden, dass die Ergebnisse der *In-vitro*-Selektion (Ciprofloxacin-Forward-Assay, Abschnitt 4.2) nicht durch die verwendeten Vektoren beeinflusst wurden. Anlass für diese Untersuchung gab die Beobachtung, dass selektierte Mutanten nach Passage auf LB-Agarplatten und anschließendem Ausstreichen auf LB-Agar mit Ampicillin ($50 \mu\text{g/ml}$) nicht wuchsen. Auch war nach Ausstreichen dieser Mutanten auf Ciprofloxacin LB-Agar (4-fache oder 8-fache MHK des Ausgangsstammes) kein Wachstum zu beobachten. Die Vermutung war, dass die selektierten Mutanten ihre Vektoren verloren sobald der Selektionsdruck wegfiel. Nach einer Plasmidisolierung aus selektierten Mutanten und der anschließenden Transformation vektorfreier CaCl_2 -kompetenter *E. coli* MII-Zellen (Abschnitt 4.3.1), wurden diese Transformanden untersucht. Zusätzlich wurden die *E. coli* WT Stämme auf ein ähnliches Verhalten überprüft.

4.3.1 Isolierung der Plasmide aus den selektierten Mutanten

Die Plasmide aus zwei selektierten Mutanten des *In-vitro*-Selektionsexperiments mit *E. coli* MII pHPNE19-02.1 (QnrA1) und aus einem selektierten Mutanten mit pHPNE18-01.1 (QnrB1) wurden isoliert und zur Transformation von CaCl_2 -kompetenten *E. coli* MII-Zellen (GK573) verwendet (gemäß Abschnitt 2.2.1.7).

Es wurden folgende Mutanten für eine Plasmid-Präparation ausgewählt:

- MII pHPNE19-02.1 Nr. I 43
- MII pHPNE19-02.1 Nr. II 21
- MII pHPNE18-01.1 Nr. II 19

Mit den isolierten Plasmiden wurden CaCl₂-kompetente *E. coli* MII-Zellen transformiert. Bei der Bestimmung der MHK von Ciprofloxacin für die Transformanden mit den Plasmiden aus den selektierten Mutanten wurden Werte ermittelt, die den Werten vor Durchführung des Selektionsversuches entsprachen (Tabelle 4-7). Mit den Plasmiden pHPNE19-02.1 aus Nr. I 43 und aus Nr. II 21 ergab sich eine MHK von Ciprofloxacin für den Ausgangsstamm MII von 4 µg/ml, was dem Wert vor Durchführung des Selektionsexperiments entsprach (vergleiche Tabelle 4-3). Die MHK von Ciprofloxacin für die untersuchten Mutanten lag bei 16 µg/ml bzw. 32 µg/ml. Nach Transformation des Ausgangsstammes MII mit dem Plasmid aus MII pHPNE18-01.1 Nr. II 19 ergab sich eine MHK von Ciprofloxacin von 2 µg/ml. Das entsprach der MHK von Ciprofloxacin für den Ausgangsstamm MII pHPNE18-01.1. Die MHK von Ciprofloxacin für die Mutante MII pHPNE18.01.1 Nr. II 19 lag bei 16 µg/ml.

Tabelle 4-7 Bestimmung der MHK von Ciprofloxacin (µg/ml) nach Selektion und nach Plasmidisolierung und anschließender Transformation von MII

Stamm	MHK in (µg/ml)		
	MHK	nach Transformation	nach Selektion
MII	2		
+ pHPNE19-02.1		4	
+ pHPNE19-02.1 Nr. I 43		4	16
+ pHPNE19-02.1 Nr. II 21		4	32
+ pHPNE18-01.1		2	
+ pHPNE18-01.1 Nr. II 19		2	16

4.3.2 Fehlender Selektionsdruck führt bei *E. coli* MII zu Plasmidverlust - Vergleich MII und JM109

Die Vermutung, dass *E. coli* WT und Stämme mit einem isogenen Stammhintergrund dazu neigen Plasmide zu verlieren, falls auf diese nicht selektiert wurde, sollte im Rahmen einer weiteren Versuchsreihe untersucht werden. Hierzu wurde versucht Plasmide mittels *Plasmid Curing* (siehe Abschnitt 2.2.1.11) aus den Transformanden zu eliminieren. Zur Untersuchung, ob *E. coli* MII oder WT den Vektor pUC19 bei Abwesenheit des zur Selektion verwendeten Antibiotikums Ampicillin verloren, wurde im ersten Versuchsansatz eine Kultur über drei Tage hinweg alle 24h in frisches LB-Medium überimpft. Hierbei wurde die Kultur des Vortages in frischem 50 ml LB-Medium 1:100 verdünnt.

Es wurde parallel ein Ansatz mit $\frac{1}{4}$ der MHK von Ciprofloxacin für MII [0,25 µg/ml] und ein Ansatz ohne Ciprofloxacin jeweils über drei Tage mit dem transformierten Stamm MII angezogen. Nach drei Tagen wurde die KBE ermittelt und die Kultur zusätzlich auf LB-Agarplatten mit Ampicillin (50 µg/ml) ausgestrichen.

Ciprofloxacin wurde in subinhibitorischer Konzentration zugegeben, um eine SOS-Antwort zu induzieren und eine Stressantwort auszulösen (vergleiche Abschnitt 1.7.3.3), die möglicherweise zum Plasmidverlust führen sollte. Über den gesamten Versuchszeitraum wurden die Kulturen bei 37 °C und 130 rpm im Schüttelinkubator angezogen. Als Kontrollansatz wurde *E. coli* K12 JM109 ohne Antibiotikum über drei Tage im LB-Medium bei gleichen Wachstumsbedingungen angezogen. Der Sicherheitsstamm *E. coli* K12 JM109 gibt eingeführte Plasmide bei fehlendem Selektionsdruck nicht ab [234].

Abbildung 4-2 zeigt eine Zusammenfassung der Ergebnisse dieser Untersuchung. Der Versuch wurde einmal wiederholt. Im ersten Durchgang wurde MII pUC19 alleine betrachtet. Für beide Ansätze (mit oder ohne Zusatz von Ciprofloxacin) fällt das Ergebnis gleich aus. Beide Kulturen wachsen nach drei Tagen auf LB-Agarplatten. Auf LB-Selektiv-Agarplatten mit Ampicillin [50 µg/ml] ist kein Wachstum festzustellen.

In einem zweiten Versuchsdurchgang wurde MII pUC19 jeweils einmal mit und einmal ohne Ciprofloxacin angezogen. Zusätzlich wurde *E. coli* K12 JM109 pUC19 angezogen. Bei diesem Stamm wurde auf die Zugabe von Ciprofloxacin verzichtet. Nach drei Passagen und 72 h fand bei JM109 pUC19 noch ein Wachstum auf LB-Selektiv-Agarplatten mit Ampicillin [50 µg/ml] statt. Wie im ersten Versuch war im zweiten Durchgang bei MII, unabhängig ob mit oder ohne Ciprofloxacin-Zusatz angezogen wurde, kein Wachstum auf Ampicillin-LB-Agar zu sehen. Der *E. coli* Stamm MII (GK573) schien bei Abwesenheit von Selektionsantibiotikum im Anzuchtmedium den Vektor pUC19 zu verlieren.

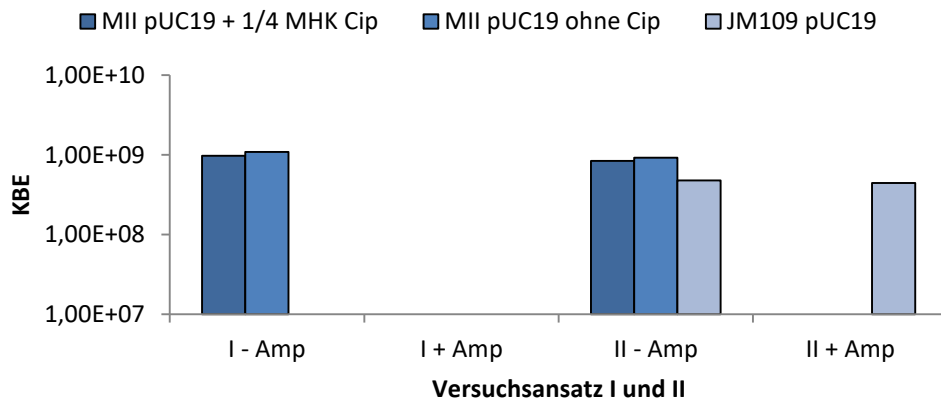


Abbildung 4-2 Untersuchung auf Plasmidverlust bei fehlendem Selektionsdruck

- Amp: Keine Anzucht auf LB-Agarplatten mit Ampicillin; + Amp: Anzucht auf LB-Agarplatten Ampicillin (50 µg/ml); + ¼ MHK Cip: Zusatz von ¼ der MHK von Ciprofloxacin bei Anzucht über drei Tage

E. coli JM109 wurde nur in Versuchsansatz II betrachtet. In Versuchsansatz I war nach mehreren Passagen kein Wachstum auf Ampicillin-Selektivagar zu sehen. In Versuchsansatz II zeigte sich das gleiche Ergebnis. In Versuchsansatz II wuchs JM109 auf Selektivagar nach mehreren Passagen.

4.3.3 Fehlender Selektionsdruck führt bei *E. coli* WT zu Plasmidverlust – Untersuchung WT

Ähnlich zu den Versuchen mit MII in Abschnitt 4.3.2 wurde auch *E. coli* WT untersucht (Abbildung 4-3). Ein Ansatz mit pUC19 wurde über drei Passagen alle 24 h in frisches LB-Medium übertragen. Eine Inkubation fand bei 37 °C und 130 rpm im Schüttelinkubator statt. Wie bei *E. coli* MII wurde auch bei diesem Versuch ¼ der MHK von Ciprofloxacin in einem Ansatz zugegeben. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4-3 zu finden. Für WT pUC19 ohne Ciprofloxacin ließ sich nach 24 h keine KBE ermitteln, da keine einzelnen Kolonien ausgewertet werden konnten. Hier lagen nur Werte nach 48 h und 72 h vor. Mit jeweils 10 µl der angewachsenen Kultur vom Vortag wurde alle 24 h 10 ml frisches LB-Medium beimpft. ¼ MHK von Ciprofloxacin entsprach bei WT einer Konzentration von $3,75 \cdot 10^{-3}$ µg/ml. Bereits nach der ersten Passage nach 24 h war auf Ampicillin-LB-Agarplatten kein Wachstum bei beiden Kulturen (WT pUC19 mit Cip, WT pUC19 ohne Cip) zu sehen. Die gleiche Beobachtung wurde nach der zweiten und dritten Passage gemacht. Bei beiden verwendeten Kulturen hatte innerhalb 24 h bereits der Plasmidverlust stattgefunden. Im Gegensatz zu JM109 verlor *E. coli* WT bei fehlendem Selektionsdruck durch Antibiotika die Plasmide.

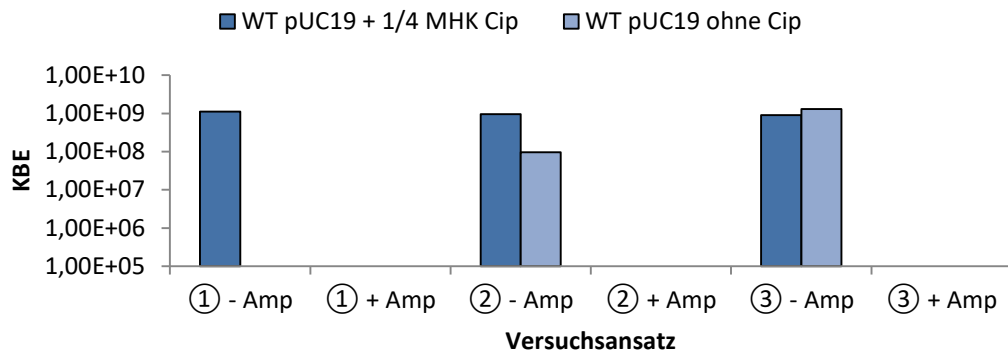


Abbildung 4-3 Untersuchung auf Plasmidverlust bei fehlendem Selektionsdruck bei WT

①, ②, ③: Bestimmung der Lebendkeimzahl nach 24 h, 48 h, bzw. 72 h Inkubation; -Amp: Keine Anzucht auf Ampicillin-LB-Agarplatten +Amp: Anzucht auf Ampicillin-LB-Agarplatten; + ¼ MHK Cip: Zusatz von ¼ der MHK von Ciprofloxacin bei Anzucht über drei Tage

Nachdem die Zunahme der MHK von Ciprofloxacin nach Forward-Assay nicht durch das Plasmid erklärt werden konnte, war die Ursache woanders zu suchen. Hierzu wurden im nächsten Schritt die selektierten Mutanten näher charakterisiert.

4.4 Charakterisierung der Mutanten aus der *In-vitro*-Selektion von *E. coli* WT, WT-K und MII mit QnrA1, bzw. QnrB1

Bei der Durchführung des Ciprofloxacin-Forward-Assays mit *E. coli* WT (GK571), *E. coli* WT-K (GK4041) und *E. coli* MII (GK573) mit pHPNE19-02.1 (*qnrA1*), pHPNE18-01.1 (*qnrB1*) oder pUC19 (Abschnitt 4.2), wurde jeweils die 4- bzw. 8-fachen Konzentration der zuvor ermittelten exakten MHK von Ciprofloxacin (Abschnitt 4.1) verwendet. Anschließend wurden die Mutanten weiter charakterisiert.

In der Arbeit von Dr. N. HILSBERG-EMRICH wurde bei einem Ciprofloxacin-Forward-Assay bei *E. coli* WT mit der Qnr-Variante QnrS1 keine Mutation in *gyrA* in Codon 82 und 83 gefunden [18]. Hierzu wurde zum Screening ein *HinfI*-RFLP ausgenutzt (Abschnitt 2.2.2.5.2.1). Dieser RFLP detektierte Mutationen an den Codons 82 und 83, konnte jedoch nicht zwischen beiden Codons unterscheiden. Statt einer Mutation in *gyrA* konnte bei ca. 50 % der untersuchten Stämme eine größere *marR*-Deletion detektiert werden, welche nicht näher charakterisiert wurde [18]. Aufbauend auf diesem Vorgehen wurden auch die Stämme untersucht, die aus der vorliegenden Arbeit hervorgegangen waren. Hierzu wurde eine Sequenzanalyse für *gyrA*,

parC, *gyrB* (nicht bei WT) und *parE* durchgeführt. Bei WT-K wurde die QRDR von *gyrA* sequenziert.

Auch wurde eine Bestimmung der MHK von verschiedenen Antibiotika durchgeführt und die Mutanten wurden auf eine Deletion in *marR* hin untersucht (Abschnitt 2.2.2.5.2.2), jedoch nicht bei *E. coli* MII, da hier bereits eine *marR*-Deletion vorlag. Die QRDR von *gyrA* und *parC* wurde durch Cycle-Sequencing analysiert. Weitere Veränderungen in den selektierten Mutanten wurden mittels *HinfI*-RFLP mit dem *gyrA*-Amplicon der Primer *gyrA_3-1* und *gyrA_5-1* generiert, und ein *marR*-Amplicon wurde zur Fragmentgrößenanalyse durch die Primer *marR_3R4* und *marR_5R4* (Abschnitt 4.4.3.1) amplifiziert [18]. Eine 175 bp Deletion konnte in *marR* ($\Delta marR$ 175 bp) elektrophoretisch anhand der Fragmentgrößen nachgewiesen werden. Alternativ lieferte ein RFLP mit *Sau3A1* Hinweise auf Fragmentgrößenveränderungen aufgrund von Deletionen, bzw. Insertionen im *marR*-PCR-Fragment. Eine Zusammenfassung der Ergebnisse findet sich in Tabelle 4-8. Detaillierte Ergebnisse finden sich in den nächsten Abschnitten.

Tabelle 4-8 Zusammenfassung der Ergebnisse der gesicherten selektierten Stämme

n. u.: „nicht untersucht“; RFLP: Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus

Stamm	(n)	SANGER-Sequenzierung				RFLP	
		<i>gyrA</i>	<i>gyrB</i>	<i>parC</i>	<i>parE</i>	<i>gyrA</i> 82/83	$\Delta marR$
WT							
+ pHPNE19-02.1	11	-	n. u.	-	-	n. u.	1
+ pHPNE18-01.1	10	-	n. u.	-	-	n. u.	-
+ pUC19	7	n. u.	n. u.	n. u.	n. u.	1(+1)	2
WT-K							
+ pHPNE19-02.1	8	-	n. u.	n. u.	n. u.	n. u.	2
+ pHPNE18-01.1	11	-	n. u.	n. u.	n. u.	n. u.	2
+ pUC19	7	n. u.	n. u.	n. u.	n. u.	-	2
MII							
+pHPNE19-02.1	14	-	-	-	-		
+ pHPNE18-01.1	6	-	-	-	-		
+ pUC19		n. u.	n. u.	n. u.	n. u.		

Bei den selektierten Mutanten aus Ansätzen mit Qnr konnten keine zusätzlichen Mutationen innerhalb der QRDR nachgewiesen werden. Bei WT konnten durch RFLP zwei selektierte Mutanten mit pUC19 identifiziert werden, die eine Mutation in *gyrA* in Codons 82 oder 83 besaßen. Durch Bandenmuster Vergleiche zur definierten Mutante MII ließ sich vermuten, dass es sich bei der selektierten Mutante WT pUC19 Nr. 14 um die Mutation *gyrAS83L* handelt (Abschnitt 4.4.2.3). Ein abweichendes Bandenmuster fand sich bei der selektierten Mutante WT

pUC19 Nr. 17. Hier war durch eine Mutation eine zusätzliche *Hinfi*-Schnittstelle innerhalb des amplifizierten Bereichs entstanden.

4.4.1 Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration (MHK) der selektierten Mutanten

Als Beweis, dass ein Ciprofloxacin-Forward-Assay zu Mutanten mit einer niedrigeren Ciprofloxacin-Empfindlichkeit führt, wurden zusätzlich zu den QRDR und *marR* Sequenz-Analysen (Abschnitt 4.4.3) die MHK von verschiedenen Antibiotika ermittelt. Zum Vergleich diente die MHK für die Transformanden vor Durchführung des Ciprofloxacin-Forward-Assays und der jeweilige vektorfreie Ausgangsstamm. In Abschnitt 15.2 ist eine detaillierte Übersicht der MHKs von vier Antibiotika für die (in Cryoröhrchen gesicherten) selektierten Mutanten zu finden.

Neben Ciprofloxacin wurden die MHKs von Nalidixinsäure, Tetracyclin und Chloramphenicol untersucht. Die MHKs von Ciprofloxacin und Nalidixinsäure sollten Hinweise auf Mutationen innerhalb der Gyrase und Topoisomerase IV geben. Tetracyclin und Chloramphenicol gaben Hinweise darauf, ob Mutationen im Zusammenhang mit Efflux, oder ob bei den Mutanten Veränderungen in der Proteinbiosynthese vorlagen, als weiterer Hinweis auf Mutationen außerhalb der QRDR.

Die ermittelten MHKs von Ciprofloxacin waren bei allen selektierten Mutanten im Vergleich zum Zustand vor Selektion erhöht (Tabelle 4-9). Die Zunahme lag im Bereich von zwei bis vier MHK-Stufen. Die MHK von Ciprofloxacin für selektierte Mutanten von *E. coli* MII mit pHPNE19-02.1 lag bei 8 µg/ml bis 32 µg/ml. Für MII pHPNE18-02.1 wurde eine MHK von Ciprofloxacin von 8 µg/ml bis 16 µg/ml ermittelt. Die Zunahme bei MII pUC19 lag bei einer MHK-Stufe. In dieser Dimension lag auch die Zunahme der MHK von Ciprofloxacin bei WT-K pUC19. Bei WT pUC19 lag die Zunahme bei 4 MHK-Stufen. Die höchsten MHKs von Ciprofloxacin waren für Mutanten mit pHPNE19-02.1 mindestens eine MHK-Stufe höher als bei Mutanten mit pHPN18-01.1. Dieses Ergebnis war bei WT, WT-K und MII zu sehen.

Ein ähnliches Bild zeigte die Zunahme bei der MHK von Nalidixinsäure. Hier fanden sich Zunahmen im Bereich von zwei bis vier MHK-Stufen. Bei WT pUC19 fanden sich spontane Mutanten mit Zunahmen von vier bis sechs MHK-Stufen. Bei WT-K pUC19 und MII fiel diese Zunahme niedrig aus. Bei WT-K pUC19 betrug die Zunahme eine MHK-Stufe. Bei MII pUC19 war die MHK unverändert.

Für Tetracyclin und Chloramphenicol fanden sich keine Änderungen bei WT und MII. Bei WT-K nahm die MHK von Tetracyclin und Chloramphenicol um ein bis zwei Stufen zu.

Tabelle 4-9 Zusammenfassung der Ergebnisse der Ermittlung der MHK

- Sel: Zustand vor Selektionsversuch, + Sel: Zustand nach Selektionsversuch

Stamm (n)	MIC ($\mu\text{g/ml}$)			
	Ciprofloxacin		Nalidixinsäure	
	- Sel	+ Sel	- Sel	+ Sel
WT	0.016		4 - 8	
+ pHPNE19-02.1 (42)	0,25	0,2 - 1,4	32	64 - 256
+ pHPNE18-01.1 (29)	0,12	0,4 - 1,2	16 - 32	32 - 64
+ pUC19 (7)	0,015	0,2	4 - 8	128 - 512
WT-K	0,125		16 - 32	
+ pHPNE19-02.1 (12)	0,6	1 - 4	128	128 - 512
+ pHPNE18-01.1 (11)	0,4	1 - 2	32 - 64	64 - 256
+ pUC19 (8)	0,125	0,125 - 0,25	16 - 32	32 - 64
MII	2		4.096	
+ pHPNE19-02.1 (36)	4	8 - 32	4.096	>4.096
+ pHPNE18-01.1 (56)	2	8 - 16	4.096	>4.096
+ pUC19 (7)	2	2 - 4	4.096	4.096
	Tetracyclin		Chloramphenicol	
	- Sel	+ Sel	- Sel	+ Sel
WT	0.5		4 - 8	
+ pHPNE19-02.1 (42)	0,5	0,5 - 2	8	8 - 16
+ pHPNE18-01.1 (29)	0,5	0,5 - 2	8	8
+ pUC19 (7)	0,5	0,5 - 1	8	8
WT-K	0,5		8	
+ pHPNE19-02.1 (12)	0,5	1 - 2	8	8 - 32
+ pHPNE18-01.1 (11)	0,5	1 - 2	8	8 - 32
+ pUC19 (8)	0,5	1 - 2	8	8 - 16
MII	2		4	
+ pHPNE19-02.1 (36)	2	2 - 4	16	16
+ pHPNE18-01.1 (56)	2	2 - 4	16	16 - 32
+ pUC19 (7)	2	2	16	16

4.4.2 Sequenzanalyse der Mutanten

Fluorchinolone (FQ) interagieren mit Gyrase und Topoisomerase IV innerhalb bestimmter Regionen der Untereinheit GyrA, bzw. ParC (Abschnitt 1.7). Durch Mutationen innerhalb der *quinolone resistance-determining region* (QRDR) nimmt bei Fluorchinolon-resistenten Mutanten die Empfindlichkeit gegenüber FQ ab. Bei *E. coli* tritt zuerst eine Mutation innerhalb *gyrA* auf; häufig ein Basenaustausch, der zur Mutation *gyrAS83L* führt, und die Empfindlichkeit der Gyrase für Fluorchinolone absenkt (Abschnitt 1.8) [15], [84], [131].

Die Sequenzierung der QRDR wurde nach Abschnitt 2.2.2.7.1 durchgeführt. Ziel war es molekulargenetische Aussagen treffen zu können, die die Zunahme der MHK von Ciprofloxacin für die selektierten *E. coli*-Mutanten erklären. Zuerst wurde die QRDR bei *gyrA* und *parC* sequenziert, da beide Gene für die primären Zielstrukturen bei *E. coli* codieren und diese für die Ausbildung einer klinisch relevanten Resistenz zwingend mutiert sein mussten [5], [90], [142]. Die ermittelten Sequenzen wurden mit Sequenzen für *E. coli* MIIQ (MII DnaQ T15I E220D) verglichen, da dieser Stamm auch vom *E. coli* WT (GK571) abstammt, und dieselben Zielstrukturmutationen wie *E. coli* MII (GK573) besaß [27]. Zusätzlich wurden die Sequenzen mit *E. coli* CFT073 (NCBI Referenznummer NC_004431.1) verglichen, da aus Genomsequenzierungen eine Verwandtschaft von *E. coli* WT zu *E. coli* CFT073 aufgedeckt wurde.

Zur Sequenzierung der QRDR in *gyrA* wurde ein ca. 530 bp Amplicon mit den Primern *gyrA*_5-1 und *gyrA*3-1 amplifiziert. Für Untersuchungen an *gyrB* wurden die Primer *gyr*_[*gyrB*7]_5'_+1059_EcoK12 und *gyrB*_[*gyrB*8]_3'_+1846_EcoK12 zur Amplifikation eines 788 bp Amplicons verwendet. Für das Fragment zur Sequenzierung der QRDR innerhalb *parC* wurde mit den Primern *parC*5_1 und *parC*3_1 ein ca. 420 bp Amplicon amplifiziert. Für die Sequenzierung des Bereichs in *parE* wurde ein ca. 491 bp Amplicon mit dem Primerpaar *parE*_[*PARET*]_5'_+1189_EcoK12 und *parE*_[*parE* RT 1679R]_3'_+1679_EcoK12 amplifiziert. Die Ergebnisse der SANGER-Sequenzierung sind in Tabelle 4-10 einzusehen. Die ermittelten Sequenzen finden sich in den folgenden Kapiteln (4.4.2.1 und 4.4.2.2). Durch die Sequenzierung wurde keine zusätzliche Mutation gefunden.

Tabelle 4-10 Ergebnisse der SANGER-Sequenzierung der QRDR

n. u.: nicht untersucht; QRDR: *quinolone resistance-determining regions*;
„-“: keine zusätzliche Mutation gefunden

Stamm (n)	Zusätzliche Mutationen in QRDR			
	<i>gyrA</i>	<i>gyrB</i>	<i>parC</i>	<i>parE</i>
WT				
+ pHPNE19-02.1 (11)	-	n. u.	-	-
+ pHPNE18-01.1 (10)	-	n. u.	-	-
MII				
+ pHPNE19-02.1 (9)	-	-	-	-
+ pHPNE18-01.1 (6)	-	-	-	-

4.4.2.1 Ergebnisse der Sequenzanalyse für *E. coli* WT (GK571)

Bei Mutanten aus dem Selektionsansatz mit *E. coli* WT pHPNE19-02.1 und WT pHPNE18-01.1 wurden in der QRDR keine zusätzlichen Mutationen im Vergleich zum Ausgangsstamm gefunden. Damit war die Zunahme der MHK von Ciprofloxacin aus Abschnitt 4.4.1 nicht zu erklären. Bekannt war, dass QnrA1 alleine in WT für eine begrenzte Abnahme der Fluorchinolon-Empfindlichkeit sorgte, jedoch stieg in Kombination mit beispielsweise einer Punktmutation in *gyrA* die Fluorchinolon-Resistenz knapp an den Grenzwert heran [172].

Für WT wurden die QRDR in *gyrA* und *parC* sequenziert. Zusätzlich wurde noch *parE* sequenziert. Innerhalb der QRDR von *gyrA* befand sich an Position 248 bp eine Mutation bei MII, bzw. MIIQ (*gyrAS83L*). Diese Mutation war bei den Mutanten aus dem Selektionsexperiment trotz Zunahme der MHK für Ciprofloxacin (Abschnitt 4.4.1) nicht zu finden. Nachdem für *gyrA*, *parC* und *parE* kein Mutant mit einer veränderten Zielstruktur innerhalb der QRDR zu finden war, wurde auf die Sequenzanalyse für *gyrB* verzichtet, da hier die Wahrscheinlichkeit für eine Mutation am geringsten war [15], [84], [131]. In Abschnitt 15.4.1 sind die Ergebnisse der Sequenzanalysen aufgeführt.

4.4.2.2 Ergebnisse der Sequenzanalyse für *E. coli* MII (GK573)

Die Zunahme der MHK von Ciprofloxacin für *E. coli* MII ließ sich nicht durch eine Mutation innerhalb der Zielstrukturen erklären. Bei Anwesenheit von QnrA1 (pHPNE19-02.1) oder QnrB1 (pHPNE18-01.1) fand sich bei den selektierten MII-Mutanten neben der Punktmutation des Ausgangsstammes *E. coli* MII (*gyrA* S83L) keine zusätzliche Mutation innerhalb der QRDR von *gyrA*. Bei der Zunahme der MHK war eine zusätzliche Mutation in *gyrA* in Codon 87 erwartet worden. Für eine Ausprägung einer klinisch relevanten FQ-Resistenz (MHK Cip ≥ 4 $\mu\text{g/ml}$) war bisher angenommen wird, dass zwingend zwei *gyrA*-Mutationen und eine *parC*-Mutation notwendig sind [168]. In einer vorangegangenen Arbeit mit *E. coli* MII als Ausgangsstamm wurde für die selektierte Mutante *E. coli* MIIQ eine stumme Mutation bei *parE* in Position 1674 bp (CCA \rightarrow CCG; Prolin) gefunden. In *parC* fanden sich bei *E. coli* MIIQ zwei weitere Abweichungen zu MII und CFT073 an den Basenpaarpositionen 372 bp (CGG \rightarrow CGT, Arginin) und 387 bp (TCC \rightarrow TCT, Serin). Detaillierte Ergebnisse sind in Abschnitt 15.4.2 einzusehen.

4.4.2.3 Untersuchung von WT pUC19 und WT-K pUC19 auf die Anwesenheit von *gyrAS83L* mittels RFLP

Voraussetzung für eine verringerte Empfindlichkeit gegenüber FQ war bei WT eine Mutation in *gyrA*. Mittels RFLP (gemäß Abschnitt 2.2.2.5.2.1) sollte die Mutation *gyrAS83L* im Rahmen der Charakterisierung der selektierten Mutanten aus den Kontrollgruppen *E. coli* WT pUC19 und *E. coli* WT-K pUC19 untersucht werden. Tabelle 4-11 zeigt die zu erwartenden Fragmentgrößen nach Restriktion mit *HinfI*.

Tabelle 4-11 Fragmentgrößen nach Amplifikation eines 526 bp PCR-Fragment mit den Primern *gyrA_5-1* und *gyrA_3-1* und mit/ohne anschließendem Verdau mit *HinfI*

WT unfragmentiert	MG1655 <i>HinfI</i>	WT <i>HinfI</i>	MII <i>HinfI</i>
526 bp	276 bp	276 bp	375 bp
	148 bp	148 bp	148 bp
	99 bp	99 bp	
	3 bp (off the gel)	3 bp (off the gel)	3 bp (off the gel)

4.4.2.3.1 Ergebnisse für *gyrA* bei WT pUC19 und WT-K pUC19

Durch die Mutation *gyrAS83L* geht eine Schnittstelle für *HinfI* verloren. In den Mutanten WT pUC19 Nr 14 und WT pUC19 Nr. 17 wurde die Mutation *gyrAS83L* anhand des veränderten Restriktionsmusters gefunden (Tabelle 4-12). In Abbildung 4-4 und Abbildung 4-5 sind die Ergebnisse der Gelelektrophorese mitsamt den Kontrollen zu sehen.

Tabelle 4-12 Ergebnisse des RFLP tabellarisch zusammengefasst

Dargestellt ist die Variante, die entweder *gyrA*-WT oder *gyrAS83L* (blau unterlegt) entspricht.

Nr.	Spezies	Isolation	Variante
1	<i>E. coli</i> WT	pUC19 Nr. 1	<i>gyrA</i> -WT
2	<i>E. coli</i> WT	pUC19 Nr. 2	<i>gyrA</i> -WT
3	<i>E. coli</i> WT	pUC19 Nr. 3	<i>gyrA</i> -WT
4	<i>E. coli</i> WT	pUC19 Nr. 4	<i>gyrA</i> -WT
5	<i>E. coli</i> WT	pUC19 Nr. 5	<i>gyrA</i> -WT
6	<i>E. coli</i> WT	pUC19 Nr. 14	<i>gyrA</i> -S83L
7	<i>E. coli</i> WT	pUC19 Nr. 17	<i>gyrA</i> -S83L
8	<i>E. coli</i> WT-K	pUC19 Nr. 6	<i>gyrA</i> -WT
9	<i>E. coli</i> WT-K	pUC19 Nr. 9	<i>gyrA</i> -WT
10	<i>E. coli</i> WT-K	pUC19 Nr.14	<i>gyrA</i> -WT
11	<i>E. coli</i> WT-K	pUC19 Nr. 11	<i>gyrA</i> -WT
12	<i>E. coli</i> WT-K	pUC19 Nr. 45	<i>gyrA</i> -WT
13	<i>E. coli</i> WT-K	pUC19 Nr. 33	<i>gyrA</i> -WT

In Abbildung 4-4 sind neben vier Kontrollen (*E. coli* WT, MI, MII und MIII) noch vier weitere Ansätze für Mutanten aus dem Selektionsexperiment mit WT pUC19 und Ciprofloxacin zu sehen. In Spur 9 wurde die DNA-freie Kontrolle aufgetragen. Für keine WT-Mutante wurde hier ein abweichendes Bandenmuster gefunden.

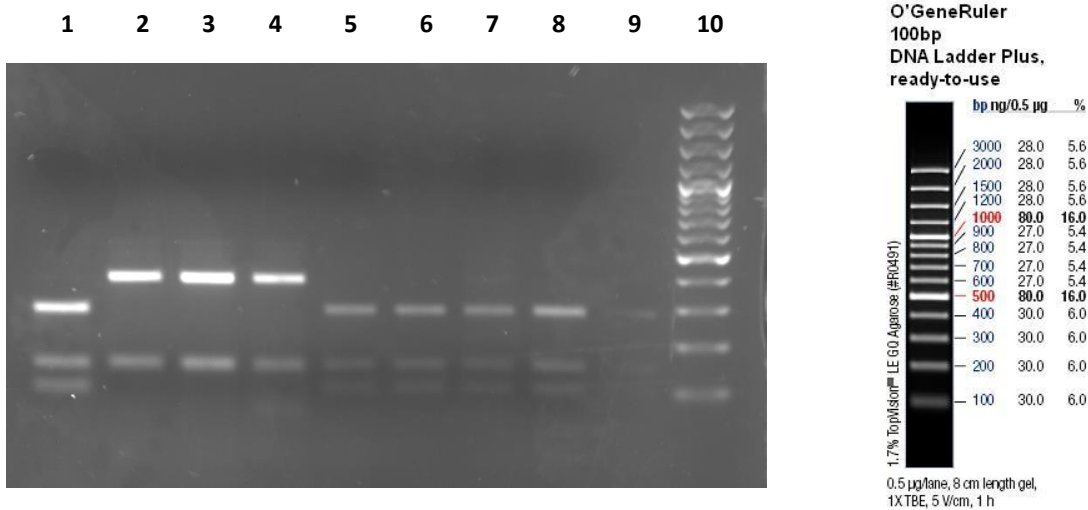


Abbildung 4-4 Agarosegel mit aufgetragener DNA nach Restriktionsverdau mit *HinfI*

TAE-Agarosegel, 1,5%, 1-fach E-Puffer, 70 V; Ethidiumbromidfärbung

Spur 1: Kontrolle 1 *E. coli* WT; Spur 2: Kontrolle 2 *E. coli* MI; Spur 3: Kontrolle 3 *E. coli* MII;
 Spur 4: Kontrolle 4: *E. coli* MIII; Spur 5: WT pUC19 Nr. 1; Spur 6: WT pUC19 Nr. 2;
 Spur 7: WT pUC19 Nr. 3; Spur 8: WT pUC19 Nr. 4; Spur 9: NTC; Spur 10: Größenmarker

Bei Abbildung 4-5 weisen nicht alle Proben die typischen drei Banden für *gyrA*-WT auf. In Spur 7 und Spur 9 weicht das Bandenmuster ab. In Spur 9 ähnelt das Bandenmuster bei WT pUC19 Nr. 14 dem Bandenmuster der Mutanten MI, MII oder MIII. Hier scheint die Mutation *gyrAS83L* vorzuliegen. In Spur 7 ist eine zusätzliche vierte Bande zu erkennen.

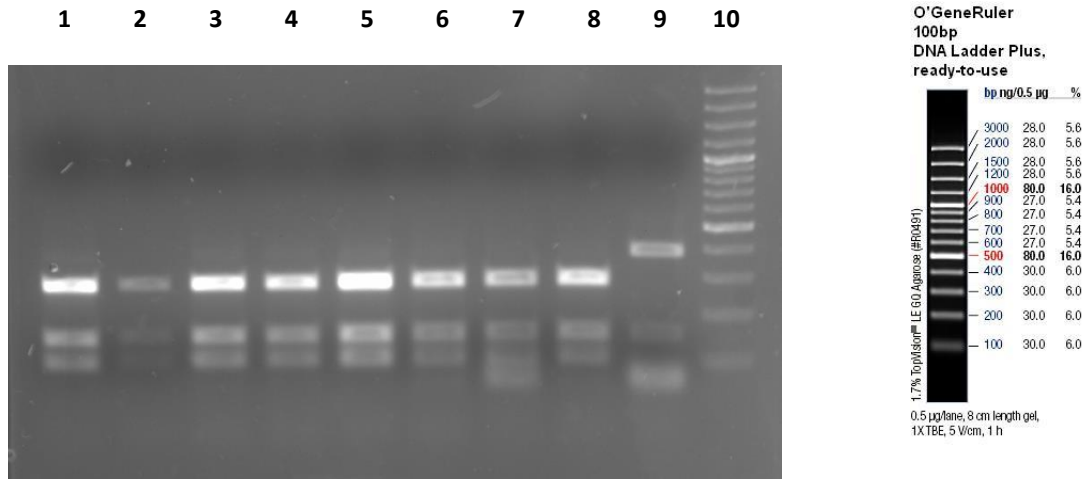


Abbildung 4-5 Agarosegel mit aufgetragener DNA nach Restriktionsverdau mit *Hinfi*

TAE-Agarosegel, 1,5%, 1-fach E-Puffer, 70 V; Ethidiumbromidfärbung

Spur 1: WT pUC19 Nr. 5; Spur 2: WT-K pUC19 Nr 6; Spur 3: WT-K pUC19 Nr. 9;
Spur 4: WT-K pUC19 Nr. 14; Spur 5: WT-K pUC19 Nr. 11; Spur 6: WT-K pUC19 Nr. 45;
Spur 7: WT pUC19 Nr. 17; Spur 8: WT-K pUC19 Nr. 33; Spur 9: WT pUC19 Nr. 14;
Spur 10: Größenmarker

4.4.3 *marR*-Deletion

Nicht nur Mutationen in der QRDR sind für die Ausbildung einer Fluorchinolon-Resistenz relevant. Durch Mutationen innerhalb des Mar-Regulons (*multiple antibiotic resistance*, Abbildung 1-15) werden bei *E. coli* der Influx und Efflux beeinflusst, was sich auf die FQ-Empfindlichkeit auswirkt [27], [110], [131]. Daher wurden *E. coli*-Mutanten der Ciprofloxacin-Forward-Assays für WT und WT-K zusätzlich zu den QRDR auch auf Veränderungen innerhalb *marR* untersucht. Für die selektierten Mutanten der MII-Versuchsreihen wurden keine Untersuchungen durchgeführt, da bei MII bereits eine Deletion innerhalb *marR* zu Beginn des Experiments vorlag [130], [167]. Neben einer Ausnutzung des Restriktionsfragmentpolymorphismus (RFLP) wurde in Abschnitt 4.4.3.2 noch auf $\Delta marR$ 175 bp mittels PCR hin untersucht.

4.4.3.1 Nachweis einer *marR*-Deletion durch Ausnutzung von RFLP

Es wurden 54 *E. coli* Mutanten untersucht. Zusätzlich wurde zum Vergleich eine DNA-freie Kontrolle, ein *E. coli*-Stamm der Mutationsstufe MIII und ein *E. coli*-Stamm mit einer Deletion von vier Basenpaaren aufgetragen. Es wurde ein Restriktionsverdau mit *Sau3A1* durchgeführt

(Tabelle 4-13). Detaillierte Ergebnisse finden sich im Anhang in Abschnitt 15.2. Mit dieser Methode wurden bei *E. coli* WT drei Mutanten und bei *E. coli* WT-K sechs Mutanten (jeweils zwei Mutanten bei QnrA1, QnrB1 und pUC19) identifiziert. Genauer wurden die Mutationen im Rahmen dieser Arbeit nicht charakterisiert.

Tabelle 4-13 Übersicht Ergebnisse der Untersuchung *marR*-Deletion

Stamm	Anzahl (n)	verändertes Bandenmuster
WT		
+ pHPNE18-01.1 (<i>qnrB1</i>)	10	-
+ pHPNE19-02.1 (<i>qnrA1</i>)	11	1
+ pUC19	7	2
WT-K		
+ pHPNE18-01.1 (<i>qnrB1</i>)	11	2
+ pHPNE19-02.1 (<i>qnrA1</i>)	8	2
+ pUC19	6	2
Gesamt	54	9

4.4.3.2 Untersuchung Δ *marR* 175 bp

Ergänzend zur RFLP-Untersuchung bei WT pUC19 und WT-K pUC19 wurden die Mutanten WT pHPNE18-01.1, WT pHPNE19-02.1, WT-K pHPNE18-01.1 und WT-K pHPNE19-02.1 auf eine *marR*-Deletion hin untersucht. Mittels PCR wurde mit den Primern *marR*_+7_for und *marA*_+43_rev ein Fragment amplifiziert, das bei einem Wildtyp-Allel 484 bp lang ausfiel. Jede Abweichung von dieser Länge war ein Hinweis auf eine Deletion, bzw. eine Mutation. So wurde beispielsweise bei *E. coli* MII bedingt durch die *marR*-Deletion von 175 bp ein Fragment von 309 bp Länge statt 484 bp amplifiziert.

4.4.3.2.1 Ergebnisse für WT pHPNE18-01.1, WT pHPNE19-02.1

Die Ergebnisse für WT pHPNE18-01.1, WT pHPNE19-02.1 finden sich im Anhang in Abschnitt 15.3.1 (Abbildung 15-1). Bei WT A1 Nr. 1 | 2 tauchten zwei Banden auf (Spur 1 in Abbildung 15-1; obere Hälfte). Hier schienen zwei Allele zwei verschiedene Produkte zu erzeugen. Dieser Stamm wird im folgenden Abschnitt 4.4.3.2.2 genauer untersucht.

4.4.3.2.2 *Ergebnisse für WT pHPNE19-02.1 Nr. 1 | 2*

Bei *E. coli* WT pHPNE19-02.1 Nr. 1 | 2 ergab eine Amplifikation mit den Primern marR_+7_for und marA_+42_rev zwei unterschiedlich große Produkte, die als Doppelbande im Agarosegel zu sehen waren (Abbildung 15-1). Neben dem erwarteten Produkt mit 484 bp Länge fand sich ein kleineres Produkt. Zwei Produkte deuteten auf eine Mischkultur hin. Zur Erklärung wurde die Kultur frisch auf einer LB-Agarplatte ausgestrichen und bei 37 °C für 18 h inkubiert. Am Folgetag wurden 23 einzelne Kolonien gepickt und hieraus wurde jeweils DNA isoliert (gemäß Abschnitt 2.2.2.1.1), erneut eine PCR durchgeführt und die Produkte im Agarosegel aufgetrennt. Im Anhang findet sich in Abschnitt 15.3.2 das passende Gelbild (Abbildung 15-2). Bei einer Kolonie (Nr. 18) fand sich ein im Vergleich zum Wildtyp-Allel verkleinertes Produkt. Hier schien eine Deletion in marR vorzuliegen. Bei Ansatz Nr. 21 wurde kein Produkt amplifiziert.

4.4.3.2.3 *Sequenzanalyse marR Deletion bei WT-Klon WT pHPNE19-02.1 Nr. 1 | 2 Nr. 17 und Nr. 18*

Bei *E. coli* WT pHPNE19-02.1 Nr. 1 | 2 wurde mittels SANGER-Sequenzierung (Abschnitt 2.2.2.7.1) die Größe der Deletion ermittelt. Für die Sequenzierung wurden zwei Kolonien (Nr. 17 und Nr. 18) nach Auseinzelung ausgewählt (vergleiche Abschnitt 4.4.3.2.2). Für Kolonie Nr. 18 sollte der Umfang der Deletion bestimmt werden. Kolonie Nr. 17 wurde als Positivkontrolle verwendet, da hier das Wildtyp-Allel vorlag. Für die Sequenzierung wurde mit den Primern marR_+7_for und marA_+42_rev ein Amplicon generiert und diese Primer wurden verwendet, um aus zwei Richtungen zu sequenzieren (Tabelle 4-14). Bei Ansatz Nr. 18 fand sich eine Deletion von 104 bp innerhalb *marR*.

Tabelle 4-14 Sequenzen von *marR* für WT pHPNE19-02.1 Nr. 1 | 2 17 (WT A1 | 2 17 fw und rv) und WT pHPNE19-02.1 Nr. 1 | 2 18 (WT A1 | 2 18 fw und rv)

grün: GTG Startcodon für *marR*, orange: Stoppcodon für *marR*;

gelb: homologe Sequenzen bei allen untersuchten Mutanten und bei CFT073;

blau: homologe Sequenzabschnitte bei der Mehrzahl der untersuchten Sequenzen

		976		1050
CFT073	<i>marR</i>	(976)	CCTGGGCAATATTATCCCTGCAACTAATTACTTGCCAGGGCAACTAATCTGAAAAGTACCAGCGATCTGTTCAA	
WT A1 I2 17 fw		(1)	-----	
WT A1 I2 17 rv		(1)	-----	
WT A1 I2 18 fw		(1)	-----	
WT A1 I2 18 rv		(1)	-----CCAGCGATCTGTTCAA	
		1051		1125
CFT073	<i>marR</i>	(1051)	TGAAAATTATTCCATTGGGTCTCTTAATCCATATGGTTAATCAGAAGAAAGATCGCCTGCTTAACGAGTATCTGTC	
WT A1 I2 17 fw		(1)	-----GCTTAATCCATATGGTTAATCAGAAGAAAGATCGCCTGCTTAACGAGTATCTGTC	
WT A1 I2 17 rv		(1)	-----ATTATTCCATTGGGTCTCTTAATCCATATGGTTAATCAGAAGAAAGATCGCCTGCTTAACGAGTATCTGTC	
WT A1 I2 18 fw		(1)	-----CTTAATCCATATGGTTAATCAGAAGAAAGATCGCCTGCTTAACGAGTATCTGTC	
WT A1 I2 18 rv		(17)	TGAAAATTATTCCATTGGGTCTCTTAATCCATATGGTTAATCAGAAGAAAGATCGCCTGCTTAACGAGTATCTGTC	
		1126		1200
CFT073	<i>marR</i>	(1126)	TCCGCTGGATATTACCGCGGCACAGTTTAAGGTGCTCTGCTCTATCCGCTGCGCGCGTGTATTACTCCGGTTGA	
WT A1 I2 17 fw		(56)	TCCGCTGGATATTACCGCGGCACAGTTTAAGGTGCTCTGCTCTATCCGCTGCGCGCGTGTATTACTCCGGTTGA	
WT A1 I2 17 rv		(71)	TCCGCTGGATATTACCGCGGCACAGTTTAAGGTGCTCTGCTCTATCCGCTGCGCGCGTGTATTACTCCGGTTGA	
WT A1 I2 18 fw		(55)	TCCGCTGGATATTACCGCGGCACAGTTTAAGGTGCTCTGCTCTATCCGCTG-----	
WT A1 I2 18 rv		(92)	TCCGCTGGATATTACCGCGGCACAGTTTAAGGTGCTCTGCTCTATCCGCTG-----	
		1201		1275
CFT073	<i>marR</i>	(1201)	ACTGAAAAAGTGTGTGCGGTGACCTGGGGGCACTGACCCGTATGCTGGATCGCCTGGTCTGTAAAGGCTGGGT	
WT A1 I2 17 fw		(131)	ACTGAAAAAGTGTGTGCGGTGACCTGGGGGCACTGACCCGTATGCTGGATCGCCTGGTCTGTAAAGGCTGGGT	
WT A1 I2 17 rv		(146)	ACTGAAAAAGTGTGTGCGGTGACCTGGGGGCACTGACCCGTATGCTGGATCGCCTGGTCTGTAAAGGCTGGGT	
WT A1 I2 18 fw		(106)	-----	
WT A1 I2 18 rv		(143)	-----	
		1276		1350
CFT073	<i>marR</i>	(1276)	GGAAAGGTTGCCGAACCCGAATGATAAGCGCGGCGTACTGGTAAAACCTACCACCAGCGGCGCGGCAATATGTGA	
WT A1 I2 17 fw		(206)	GGAAAGGTTGCCGAACCCGAATGATAAGCGCGGCGTACTGGTAAAACCTACCACCAGCGGCGCGGCAATATGTGA	
WT A1 I2 17 rv		(221)	GGAAAGGTTGCCGAACCCGAATGATAAGCGCGGCGTACTGGTAAAACCTACCACCAGCGGCGCGGCAATATGTGA	
WT A1 I2 18 fw		(106)	-----GTTGCCGAACCCGAATGATAAGCGCGGCGTACTGGTAAAACCTACCACCAGCGGCGCGGCAATATGTGA	
WT A1 I2 18 rv		(143)	-----GTTGCCGAACCCGAATGATAAGCGCGGCGTACTGGTAAAACCTACCACCAGCGGCGCGGCAATATGTGA	
		1351		1425
CFT073	<i>marR</i>	(1351)	ACAATGCCATCAATTAGTTGGCCAGGACCTGCATCAAGAATTAACAAAAACCTGACGGCGGACGAAGTGGCAAC	
WT A1 I2 17 fw		(281)	ACAATGCCATCAATTAGTTGGCCAGGACCTGCATCAAGAATTAACAAAAACCTGACGGCGGACGAAGTGGCAAC	
WT A1 I2 17 rv		(296)	ACAATGCCATCAATTAGTTGGCCAGGACCTGCATCAAGAATTAACAAAAACCTGACGGCGGACGAAGTGGCAAC	
WT A1 I2 18 fw		(175)	ACAATGCCATCAATTAGTTGGCCAGGACCTGCATCAAGAATTAACAAAAACCTGACGGCGGACGAAGTGGCAAC	
WT A1 I2 18 rv		(212)	ACAATGCCATCAATTAGTTGGCCAGGACCTGCATCAAGAATTAACAAAAACCTGACGGCGGACGAAGTGGCAAC	
		1426		1500
CFT073	<i>marR</i>	(1426)	ACTTGAGCATTGCTTAAGAAAGTCCFGCCGTAACGAAAAAGAGGTAATGACGATGTCCAGACGCAATACTGAC	
WT A1 I2 17 fw		(356)	ACTTGAGCATTGCTTAAGAAAGTCCFGCCGTAACGAAAAAGAGGTAATGACGATGTCCAGACGCAATACTGAC	
WT A1 I2 17 rv		(371)	ACTTGAGCATTGCTTAAGAAAGTCCFGCCGTAACGAAAAAGAGGTAATGACGATGTCCAGACGCAATACTGAC	
WT A1 I2 18 fw		(250)	ACTTGAGCATTGCTTAAGAAAGTCCFGCCGTAACGAAAAAGAGGTAATGACGATGTCCAGAC-----	
WT A1 I2 18 rv		(287)	ACTTGAGCATTGCTTAAGAAAGTCCFGCCGTAACGAAAAAGAGGTA-----	

4.4.3.2.4 Ergebnisse für WT pUC19

Die Ergebnisse für WT pUC19 sind in Abbildung 4-6 sehen. Für die untersuchten Mutanten fanden sich in der Kohorte WT pUC19 nach Selektionsdruck mit Ciprofloxacin keine $\Delta marR$ -Mutanten. In den Spuren 2 und 3 sind keine Banden zu sehen. Die Bande in der Negativkontrolle (NTC) in Spur 10 ließ sich dadurch erklären, dass statt nur in Spur 12 zusätzlich in Spur 10 Probenmaterial eingefüllt wurde.

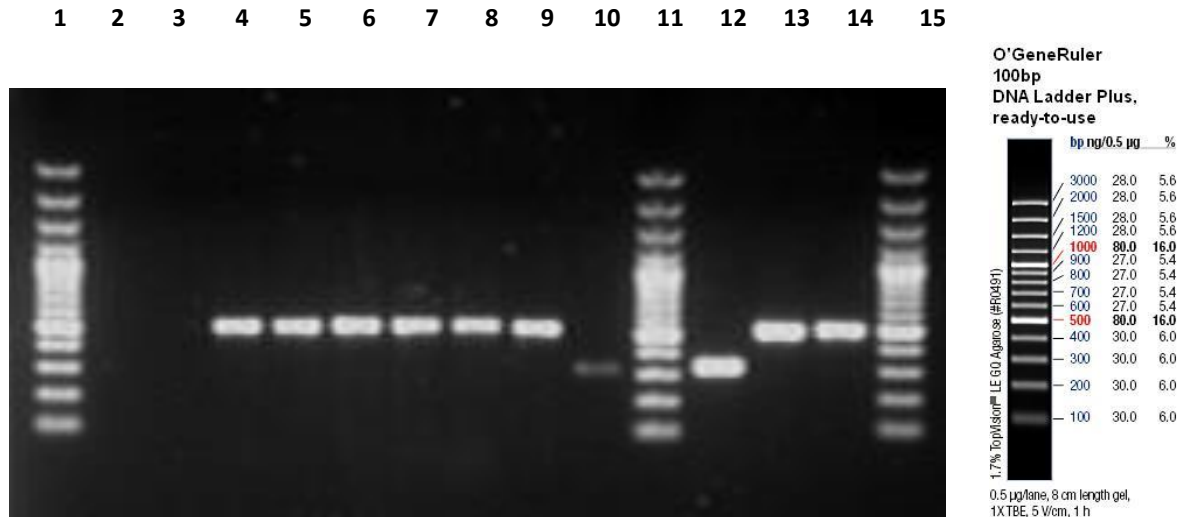


Abbildung 4-6 Agarosegel *marR*-PCR für WT pUC19 Klone

TAE-Agarosegel, 1,0%, 1-fach E-Puffer, 100 V; Ethidiumbromidfärbung; A: pHPNE19-02.1

Spur 1: DNA-Größenmarker; Spur 2: WT pUC19 Nr. 1; Spur 3: WT pUC19 Nr. 1;
 Spur 4: WT pUC19 Nr. 2; Spur 5: WT pUC19 Nr. 3; Spur 6: WT pUC19 Nr. 4;
 Spur 7: WT pUC19 Nr. 5; Spur 8: WT pUC19 Nr. 14; Spur 9: WT pUC19 Nr. 17;
 Spur 10: NTC; Spur 11: DNA-Größenmarker; Spur 12: MII; Spur 13: WT;
 Spur 14: WT A Nr. 1 | 2 | 6; Spur 15: DNA-Größenmarker

4.4.3.2.5 Ergebnisse für WT-K pHPNE18-01.1, WT-K pHPNE19-02.1; WT-K pUC19

Unter den WT-K Mutanten des Ciprofloxacin-Forward-Assays fand sich mit WT-K pHPNE18-01.1 Nr. 2 22 eine Mutante, die eine Doppelbande nach Amplifikation eines Fragments mit den Primern *marR*_{+7_for} und *marA*_{+43_rev} lieferte. Im Anhang findet sich das passende Gelbild in Abschnitt 15.3.3 in Abbildung 15-3. Ähnlich zu WT pHPNE19-02.1 Nr. 1 | 2 lag hier eine Deletion in *marR* vor.

4.5 Genomsequenzierung der selektierten Mutante MII pHPNE19-02.1 Nr. | 43

Unter Anwesenheit von QnrA1 oder QnrB1 wurden nach Durchführung des Ciprofloxacin-Forward-Assays mit *E. coli* MII mit den bekannten Mutationen (*gyrA* Mutation und *marR*-Deletion) keine zusätzlichen spontanen Mutationen innerhalb der QRDR gefunden. Das zeigten die Ergebnisse der Sequenzierung der QRDR in selektierten Mutanten mit *E. coli* MII mit pHPNE18-01.1. bzw. pHPNE19-02.

Nachdem keine zusätzlichen Mutationen innerhalb der QRDR zu finden waren, wurde als nächster Schritt eine Sequenzierung des kompletten Genoms bei einer selektierten Mutante durchgeführt, da eine chromosomale Mutation als Ursache für die Zunahme der MHK von Ciprofloxacin vermutet wurde.

Die Genomsequenzierung wurde mittels Next Generation Sequencing (NGS) durchgeführt (Abschnitt 2.2.2.7.2). Zum Einsatz kam das Ion PGM™ System der Marke Ion Torrent® von Thermo Fisher Scientific [235]. Die Ergebnisse der Genomsequenzierung werden in den Abschnitten 5.3 und 5.4 diskutiert.

Für die Genomsequenzierung wurde die selektierte Mutante MII pHPNE19-02.1 Nr. I 43 verwendet. Diese Mutante hatte eine MHK von Ciprofloxacin mit 8 – 16 µg/ml. Die MHK lag ein bis zwei Stufen über dem Grenzwert für Ciprofloxacin gemäß EUCAST [24].

Die Genomsequenzierung bei MII + pHPNE19-02.1 Nr. I 43 (A I 43) deckte eine 7 bp-Deletion im Gen der Isocitratdehydrogenase (*icd*) auf. Nach Auswertung der Sequenzdaten mit dem Torrent Variant Caller Plugin [236] und mit der CLC Bio-Software [237] fanden sich keine weiteren relevanten Veränderungen im *E. coli*-Genom verglichen mit dem Ausgangsstamm MII (GK573).

Die Deletion von 7 bp in *icd* von Basenpaarposition +818 bis +824 führte zu einem Frameshift, was zu einem frühzeitigen Stoppcodon an Aminosäureposition +278 führte. Die Deletion sollte in Stamm MII in Kombination mit *qnrA1* (pHPNE19-02.1) zu einer geringeren Empfindlichkeit gegenüber Fluorchinolonen und einer MHK von Ciprofloxacin von 8 µg/ml führen.

Ob die Zunahme der MHK von Ciprofloxacin sich allein aus der Mutation Δicd 7 bp und der Anwesenheit von QnrA1 in der Zelle erklären ließ, da keine weiteren Veränderungen im Vergleich zum Ausgangsstamm in der Zelle vorlagen, war in den folgenden Versuchen zu zeigen. Im Genom von *E. coli* MII pHPNE19-02.1 Nr. I 43 wurde die Deletion an Position 1.396.835 bis 1.396.841 gefunden. Neben dieser Mutation fanden sich keine weiteren Mutationen im Vergleich zu CFT073 und zum Ausgangsstamm MII.

4.5.1 Sequenzierung von Δicd 7 bp bei MII pHPNE19-02.1 Nr. I 43

Ergänzend zur Genomsequenzierung wurde eine SANGER-Sequenzierung durchgeführt (Abschnitt 2.2.2.7.1), um die gefundene Deletion zu bestätigen. Für die PCR-Amplifikation wurden

die Primerpaare *icd*_[5-1]_-306_CFT073 mit *icd*_[3-1]_+602_CFT073 und *icd*_[5-1]_+491_CFT073 mit *icd*_[3-1]_+1398_CFT073 verwendet.

Beide Primerpaare generierten ein Amplicon mit ca. 900 bp Länge, das den Sequenzabschnitt mit der vermuteten Deletion enthielt. Jedes PCR-Produkt wurde aus zwei Leserichtungen sequenziert, so dass die Sequenzdaten doppel abgesichert waren. Verglichen wurde mit der Sequenz von *E. coli* CFT073 (NCBI Referenznummer NC_004431.1). In Tabelle 4-15 ist das Ergebnis der Sequenzierung zusammengefasst.

Tabelle 4-15 Ergebnis der SANGER-Sequenzierung in MII Δ *icd* 7 bp pHPNE19-02.1

A: pHPNE19-02.1; Vergleich eines *icd*-Sequenzausschnitts aus CFT073 (NCBI Referenznummer NC_004431.1) mit zwei Sequenzen von MII pHPNE19 02.1 Nr. I 43. Blau unterlegt sind homologe Bereiche, die sich bei allen drei Sequenzen finden lassen. 7 bp (AAGAGAT) fehlen bei MII pHPNE19 02.1 Nr. I 43. Aus zwei Leserichtungen (fw: forward; rv: reverse) wurde Δ *icd* detektiert.

```

CFT073 icd (793) 1426 AAAGTTAAAAACCCGAATACCGGCA AAGAGAT CGTCATTAAAGACGTGATTGCTGATGCATTTCCTGCAACAGATC 1500
I43 icd fw2 (266) AAAGTTAAAAACCCGAATACCGGCA ----- CGTCATTAAAGACGTGATTGCTGATGCATTTCCTGCAACAGATC
I43 icd rv2 (100) AAAGTTAAAAACCCGAATACCGGCA ----- CGTCATTAAAGACGTGATTGCTGATGCATTTCCTGCAACAGATC
    
```

Mit einer zweiten SANGER-Sequenzierung wurde aus zwei verschiedenen Fragmenten die Deletion von 7 bp bestätigt (Tabelle 4-16). Die Auswirkungen der Mutation Δ *icd* 7 bp werden in Abschnitt 5.4.3 diskutiert. Zusätzlich fand sich in der Terminatorsequenz eine Insertion von 12 bp (TTTCCCCAAAAC) im Vergleich zur Sequenz von *E. coli* CFT073. Nach den Ergebnissen der Sequenzierungen wurde in weiteren Mutanten nach einer Deletion in *icd* gesucht.

Tabelle 4-16 Ergebnisse der Sequenzierung *icd* und Umgebung.

orange: Startcodon ATG für *icd*; grün: Stopcodon TAA für *icd*; violett: Insertion 12 bp; Verglichen wird die *icd*-Sequenz in CFT073 (NCBI Referenznummer NC_004431.1) mit der *icd*-Sequenz in MII pHPNE19-02.1 Nr. I 43 (A: pHPNE19-02.1). Neben dem *icd*-Gen werden noch Bereiche vor und nach dem *icd*-Gen verglichen. blau unterlegt sind homologe Sequenzabschnitte von CFT073 und MII pHPNE19-02.1 Nr. I 43, weiß unterlegt sind Abschnitte mit Sequenzunterschieden zwischen CFT073 und MII pHPNE19-02.1 Nr. I 43. Bei MII pHPNE19-02.1 Nr. I 43 liegen zu jedem Sequenzabschnitte Daten aus zwei Leserichtungen vor (fw: *forward*; rv: *reverse*).

```

CFT073 icd Region (601) 601 CGAGCAAACCAGTAGCGCTCGAAGGAGAGGTGAATGGAAAGTAAAGTAGTTGTCCGGCACAAGGCAAGAAGATC 675
CFT073 icd (1) ----- ATGSAAGTAAAGTAGTTGTCCGGCACAAGGCAAGAAGATC
MII A Nr. I43 icd fw 1 (239) CGAGCAAACCAGTAGCGCTCGAAGGAGAGGTGAATGGAAAGTAAAGTAGTTGTCCGGCACAAGGCAAGAAGATC
MII A Nr. I43 icd rv 1 (6) CGAGCAAACCAGTAGCGCTCGAAGGAGAGGTGAATGGAAAGTAAAGTAGTTGTCCGGCACAAGGCAAGAAGATC
MII A Nr. I43 icd fw 2 (1) -----
MII A Nr. I43 icd rv 2 (1) -----

CFT073 icd Region (676) 676 ACCCTGCAAAACGGCAAACCTCAACGTTCCCTGAAAATCCGATTATCCCTTACATTGAAGGTGATGGAATCGGTGTA 750
CFT073 icd (43) ACCCTGCAAAACGGCAAACCTCAACGTTCCCTGAAAATCCGATTATCCCTTACATTGAAGGTGATGGAATCGGTGTA
MII A Nr. I43 icd fw 1 (314) ACCCTGCAAAACGGCAA -----
MII A Nr. I43 icd rv 1 (81) ACCCTGCAAAACGGCAAACCTCAACGTTCCCTGAAAATCCGATTATCCCTTACATTGAAGGTGATGGAATCGGTGTA
MII A Nr. I43 icd fw 2 (1) -----
MII A Nr. I43 icd rv 2 (1) -----

CFT073 icd Region (751) 751 GATGTAACCCAGCCATGCTGAAAGTGGTTCGACGCTGCAGTCGAGAAAGCCTATAAAGGCGAGCGTAAAATCTCC 825
CFT073 icd (118) GATGTAACCCAGCCATGCTGAAAGTGGTTCGACGCTGCAGTCGAGAAAGCCTATAAAGGCGAGCGTAAAATCTCC
MII A Nr. I43 icd fw 1 (331) -----
MII A Nr. I43 icd rv 1 (156) GATGTAACCCAGCCATGCTGAAAGTGGTTCGACGCTGCAGTCGAGAAAGCCTATAAAGGCGAGCGTAAAATCTCC
MII A Nr. I43 icd fw 2 (1) -----
    
```

Ergebnisse II - Untersuchungen mit Qnr

MII A Nr. I43 icd rv 2	(1)	-----	900
		826	
CFT073 icd Region	(826)	TGGATGGAAATTTACACCGGTGAAAAATCCACACAGGTTTATGGTCAGGACGCTCGGTTGCCTGCTGAAACCCCTT	
CFT073 icd	(193)	TGGATGGAAATTTACACCGGTGAAAAATCCACACAGGTTTATGGTCAGGACGCTCGGTTGCCTGCTGAAACCCCTT	
MII A Nr. I43 icd fw 1	(331)	-----	
MII A Nr. I43 icd rv 1	(231)	TGGATGGAAATTTACACCGGTGAAAAATCCACACAGGTTTATGGTCAGGACGCTCGGTTGCCTGCTGAAACCCCTT	
MII A Nr. I43 icd fw 2	(1)	-----	
MII A Nr. I43 icd rv 2	(1)	-----	
		901	975
CFT073 icd Region	(901)	GATCTGATTTCGTGAATATCGCGTTGCCATTAAAGGCCCGCTGACCACTCCGGTTGGTGGCGGTATTTCGCTCTCTG	
CFT073 icd	(268)	GATCTGATTTCGTGAATATCGCGTTGCCATTAAAGGCCCGCTGACCACTCCGGTTGGTGGCGGTATTTCGCTCTCTG	
MII A Nr. I43 icd fw 1	(331)	-----	
MII A Nr. I43 icd rv 1	(306)	GATCTGATTTCGTGAATATCGCGTTGCCATTAAAGGCCCGCTGACCACTCCGGTTGGTGGCGGTATTTCGCTCTCTG	
MII A Nr. I43 icd fw 2	(1)	-----	
MII A Nr. I43 icd rv 2	(1)	-----	
		976	1050
CFT073 icd Region	(976)	AACGTTGCCCTGCGCCAGGAACCTGGATCTCTACATCTGCCTGCGTCCGGTACGTTACTATCAGGGCACTCCAAGC	
CFT073 icd	(343)	AACGTTGCCCTGCGCCAGGAACCTGGATCTCTACATCTGCCTGCGTCCGGTACGTTACTATCAGGGCACTCCAAGC	
MII A Nr. I43 icd fw 1	(331)	-----	
MII A Nr. I43 icd rv 1	(381)	AACGTTGCCCTGCGCCAGGAACCTGGATCTCTACATCTGCCTGCGTCCGGTACGTTACTATCAGGGCACTCCAAGC	
MII A Nr. I43 icd fw 2	(1)	-----	
MII A Nr. I43 icd rv 2	(1)	-----	
		1051	1125
CFT073 icd Region	(1051)	CCGGTTAAACACCCCTGAACCTGACCGATATGGTTATCTTCCGTGAAAACCTCGGAAGACATTTATGCGGGTATCGAA	
CFT073 icd	(418)	CCGGTTAAACACCCCTGAACCTGACCGATATGGTTATCTTCCGTGAAAACCTCGGAAGACATTTATGCGGGTATCGAA	
MII A Nr. I43 icd fw 1	(331)	-----	
MII A Nr. I43 icd rv 1	(456)	CCGGTTAAACACCCCTGAACCTGACCGATATGGTTATCTTCCGTGAAAACCTCGGAAGACATTTATGCGGGTATCGAA	
MII A Nr. I43 icd fw 2	(1)	-----	
MII A Nr. I43 icd rv 2	(1)	-----	
		1126	1200
CFT073 icd Region	(1126)	TGGAAAGCAGACTCTGCCGACGCTGAGAAAGTATTAAATTCCTGCGTGAAGAGATGGCGTGAAGAAAATTCGC	
CFT073 icd	(493)	TGGAAAGCAGACTCTGCCGACGCTGAGAAAGTATTAAATTCCTGCGTGAAGAGATGGCGTGAAGAAAATTCGC	
MII A Nr. I43 icd fw 1	(331)	-----	
MII A Nr. I43 icd rv 1	(531)	TGGAAAGCAGACTCTGCCGACGCTGAGAAAGTATTAAATTCCTGCGTGAAGAGATGGCGTGAAGAAAATTCGC	
MII A Nr. I43 icd fw 2	(1)	-----TAAATTCCTGCGTGAAGAGATGGCGTGAAGAAAATTCGC	
MII A Nr. I43 icd rv 2	(1)	-----	
		1201	1275
CFT073 icd Region	(1201)	TTCCCGGAACATTGCGGTATCGGTATTAAGCCGTGTTCCGGAAGAAGGCACCAACCGTCTGGTTTCGTCAGCGATC	
CFT073 icd	(568)	TTCCCGGAACATTGCGGTATCGGTATTAAGCCGTGTTCCGGAAGAAGGCACCAACCGTCTGGTTTCGTCAGCGATC	
MII A Nr. I43 icd fw 1	(331)	-----	
MII A Nr. I43 icd rv 1	(600)	-----	
MII A Nr. I43 icd fw 2	(41)	TTCCCGGAACATTGCGGTATCGGTATTAAGCCGTGTTCCGGAAGAAGGCACCAACCGTCTGGTTTCGTCAGCGATC	
MII A Nr. I43 icd rv 2	(1)	-----	
		1276	1350
CFT073 icd Region	(1276)	GAATACGCAATTGCTAACGATCGTGACTCTGTGACCCCTGGTCACAAAGGCAACATCATGAAGTTCACCGAAGGC	
CFT073 icd	(643)	GAATACGCAATTGCTAACGATCGTGACTCTGTGACCCCTGGTCACAAAGGCAACATCATGAAGTTCACCGAAGGC	
MII A Nr. I43 icd fw 1	(331)	-----	
MII A Nr. I43 icd rv 1	(600)	-----	
MII A Nr. I43 icd fw 2	(116)	GAATACGCAATTGCTAACGATCGTGACTCTGTGACCCCTGGTCACAAAGGCAACATCATGAAGTTCACCGAAGGC	
MII A Nr. I43 icd rv 2	(1)	-----ACATCATGAAGTTCACCGAAGGC	
		1351	1425
CFT073 icd Region	(1351)	CGGTTAAAGACTGGGGCTACCAACTGGCGCGTGAAGAATTTGGCGGTGAAGTTCGACGCGCGCCCGTGGCTG	
CFT073 icd	(718)	CGGTTAAAGACTGGGGCTACCAACTGGCGCGTGAAGAATTTGGCGGTGAAGTTCGACGCGCGCCCGTGGCTG	
MII A Nr. I43 icd fw 1	(331)	-----	
MII A Nr. I43 icd rv 1	(600)	-----	
MII A Nr. I43 icd fw 2	(191)	CGGTTAAAGACTGGGGCTACCAACTGGCGCGTGAAGAATTTGGCGGTGAAGTTCGACGCGCGCCCGTGGCTG	
MII A Nr. I43 icd rv 2	(25)	CGGTTAAAGACTGGGGCTACCAACTGGCGCGTGAAGAATTTGGCGGTGAAGTTCGACGCGCGCCCGTGGCTG	
		1426	1500
CFT073 icd Region	(1426)	AAAGTTAAAAACCCGAATACCGGCAAGAGATCGTCATTAAAGACGTTGTTGCTGATGCATTCTGCAACAGATC	
CFT073 icd	(793)	AAAGTTAAAAACCCGAATACCGGCAAGAGATCGTCATTAAAGACGTTGTTGCTGATGCATTCTGCAACAGATC	
MII A Nr. I43 icd fw 1	(331)	-----	
MII A Nr. I43 icd rv 1	(600)	-----	
MII A Nr. I43 icd fw 2	(266)	AAAGTTAAAAACCCGAATACCGGCA-----CGTCATTAAAGACGTTGTTGCTGATGCATTCTGCAACAGATC	
MII A Nr. I43 icd rv 2	(100)	AAAGTTAAAAACCCGAATACCGGCA-----CGTCATTAAAGACGTTGTTGCTGATGCATTCTGCAACAGATC	
		1501	1575
CFT073 icd Region	(1501)	CTGCTGCGTCCGGCTGAATATGATGTTATCGCCTGTATGAACCTGAACGGTGACTACATTTCTGACGCCCTGGCA	
CFT073 icd	(868)	CTGCTGCGTCCGGCTGAATATGATGTTATCGCCTGTATGAACCTGAACGGTGACTACATTTCTGACGCCCTGGCA	
MII A Nr. I43 icd fw 1	(331)	-----	
MII A Nr. I43 icd rv 1	(600)	-----	
MII A Nr. I43 icd fw 2	(334)	CTGCTGCGTCCGGCTGAATATGATGTTATCGCCTGTATGAACCTGAACGGTGACTACATTTCTGACGCCCTGGCA	
MII A Nr. I43 icd rv 2	(168)	CTGCTGCGTCCGGCTGAATATGATGTTATCGCCTGTATGAACCTGAACGGTGACTACATTTCTGACGCCCTGGCA	
		1576	1650
CFT073 icd Region	(1576)	GCGCAGGTTGGTGGTATCGGTATCGCCCTGGCGCAAAACATCGGTGACGAATGCGCCCTGTTTGAAGCCACCCAC	
CFT073 icd	(943)	GCGCAGGTTGGTGGTATCGGTATCGCCCTGGCGCAAAACATCGGTGACGAATGCGCCCTGTTTGAAGCCACCCAC	
MII A Nr. I43 icd fw 1	(331)	-----	
MII A Nr. I43 icd rv 1	(600)	-----	
MII A Nr. I43 icd fw 2	(409)	GCGCAGGTTGGTGGTATCGGTATCGCCCTGGCGCAAAACATCGGTGACGAATGCGCCCTGTTTGAAGCCACCCAC	
MII A Nr. I43 icd rv 2	(243)	GCGCAGGTTGGTGGTATCGGTATCGCCCTGGCGCAAAACATCGGTGACGAATGCGCCCTGTTTGAAGCCACCCAC	
		1651	1725
CFT073 icd Region	(1651)	GGTACTGCGCCGAAATATGCCGGACAGGACAAAGTAAACCCAGGCTCTATTATCTCTCCGCTGAGATGATGCTG	
CFT073 icd	(1018)	GGTACTGCGCCGAAATATGCCGGACAGGACAAAGTAAACCCAGGCTCTATTATCTCTCCGCTGAGATGATGCTG	
MII A Nr. I43 icd fw 1	(331)	-----	
MII A Nr. I43 icd rv 1	(600)	-----	
MII A Nr. I43 icd fw 2	(484)	GGTACTGCGCCGAAATATGCCGGACAGGACAAAGTAAACCCAGGCTCTATTATCTCTCCGCTGAGATGATGCTG	
MII A Nr. I43 icd rv 2	(318)	GGTACTGCGCCGAAATATGCCGGACAGGACAAAGTAAACCCAGGCTCTATTATCTCTCCGCTGAGATGATGCTG	
		1726	1800
CFT073 icd Region	(1726)	CGCCATATGGCTGGACTGAAGCGGAGACCTGATTGTTAAAGGTATGGAAGGCGCAATCAATGCGAAGACCGGTA	

CFT073 <i>icd</i>	(1093)	CGCCATATGGGCTGGACTGAAGCCGCAAGACCTGATTGTTAAAGGTATGGAAGGCGCAATCAATCGGAAGACCGTA
MII A Nr. I43 <i>icd</i> fw 1	(331)	-----
MII A Nr. I43 <i>icd</i> rv 1	(600)	-----
MII A Nr. I43 <i>icd</i> fw 2	(559)	CGCCATATGGGCTGGACTGAAGCGGCTGACCTGATTGTTAAAGGTATGGAAGGCGCAATCAACGCCAAGACCGTA
MII A Nr. I43 <i>icd</i> rv 2	(393)	CGCCATATGGGCTGGACTGAAGCGGCTGACCTGATTGTTAAAGGTATGGAAGGCGCAATCAACGCCAAGACCGTA
	1801	1875
CFT073 <i>icd</i> Region	(1801)	ACCTATGACTTCGAACGCTCTGATGGAAGGCGCTAAAGCTGCTGAAATGTTTCAGAGTTTGGTGATCCGATCATCAAG
CFT073 <i>icd</i>	(1168)	ACCTATGACTTCGAACGCTCTGATGGAAGGCGCTAAAGCTGCTGAAATGTTTCAGAGTTTGGTGATCCGATCATCAAG
MII A Nr. I43 <i>icd</i> fw 1	(331)	-----
MII A Nr. I43 <i>icd</i> rv 1	(600)	-----
MII A Nr. I43 <i>icd</i> fw 2	(634)	ACCTATGACTTCGAACGCTCTGATGGAAGGCGCTAAAGCTGCTGAAATGTTTCAGAGTTTGGTGATCCGATCATCAAG
MII A Nr. I43 <i>icd</i> rv 2	(468)	ACCTATGACTTCGAACGCTCTGATGGAAGGCGCTAAAGCTGCTGAAATGTTTCAGAGTTTGGTGATCCGATCATCAAG
	1876	1950
CFT073 <i>icd</i> Region	(1876)	AATATGTAATCACTACATGTGTTAAATATGTAACGGGCGTATAACACGCCCGTTGTTTTATGATGATGTAATAAT
CFT073 <i>icd</i>	(1243)	AATATGTAAT-----
MII A Nr. I43 <i>icd</i> fw 1	(331)	-----
MII A Nr. I43 <i>icd</i> rv 1	(600)	-----
MII A Nr. I43 <i>icd</i> fw 2	(709)	AATATGTAATCACTACATGTGTTAAATATGTAACGGGCGTATAACACGCCCGTTGTTTTATGATGATGTAATAAT
MII A Nr. I43 <i>icd</i> rv 2	(543)	AATATGTAATCACTACATGTGTTAAATATGTAACGGGCGTATAACACGCCCGTTGTTTTATGATGATGTAATAAT
	1951	2025
CFT073 <i>icd</i> Region	(1951)	CTTCCCAAAC-----CCTTCCCAAACCTGGCTATTTTCTATGCTGTTTGTATCTACGATAATC
CFT073 <i>icd</i>	(1252)	-----
MII A Nr. I43 <i>icd</i> fw 1	(331)	-----
MII A Nr. I43 <i>icd</i> rv 1	(600)	-----
MII A Nr. I43 <i>icd</i> fw 2	(784)	CTTCCCAAAC-----
MII A Nr. I43 <i>icd</i> rv 2	(618)	CTTCCCAAACCTTCCCAAACCTTCCCAAACCTGGCTATTTTCTATGCTG-----

4.5.2 *Δicd* in weiteren selektierten Mutanten

Durch wiederholte Sequenzierung von MII pHNE19-02.1 Nr. I 43 wurde eine 7 bp-Deletion in *icd* bestätigt. Hieraus leitete sich die Frage ab, ob noch weitere Mutanten aus dem MII-Selektionsversuch eine ähnliche, bzw. die gleiche Mutation besaßen. Mit einem Screening nach *Δicd* 7 bp sollte die Frage beantwortet werden, ob eine Mutation in *icd* im Zusammenhang mit Qnr regelmäßig auftrat oder ein zufälliges Ereignis darstellte.

Eine ARMS-PCR wurde zum Nachweis für *Δicd* 7 bp verwendet. Es wurden die Primer *icd*_[5-1]_+491_CFT073 und *icd*_[3-1]_+353_CFT073 verwendet, die zu einem Amplicon von 348 bp führten (Abbildung 4-7). Bei MII pHNE19-02.1 Nr. I 43 und bei WT *Δicd* 7 bp konnten die gleichen Primer eingesetzt werden. Primer *icd*_[3-1]_+353_CFT073 entsprach der Wildtypsequenz. Lag eine Mutation im untersuchten Bereich vor, so resultierte daraus kein PCR-Produkt, da bei *Δicd* 7 bp, wie sie bei MII *Δicd* 7 bp pHNE19-02.1 (Nr. I 43) vorlag, der Reverse-Primer keine Bindungssequenz „fand“.

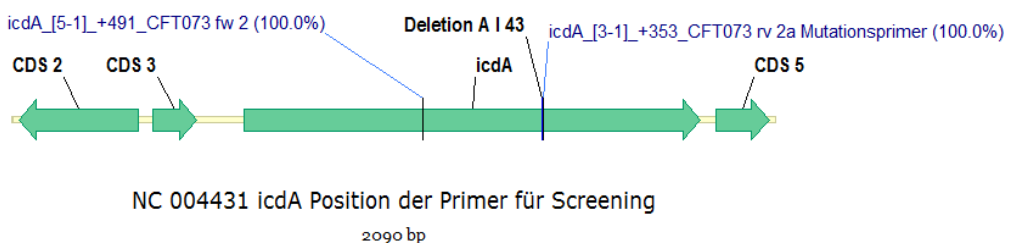


Abbildung 4-7 Position der Primer für ARMS-PCR (eigene Darstellung)

Mit den verwendeten Primern *icd*_[5-1]_+491_CFT073 und *icd*_[3-1]_+353_CFT073 wurde mittels ARMS-PCR *Δicd* 7 bp nachgewiesen.

Insgesamt wurden 98 Mutanten aus der *In-vitro*-Selektion von *E. coli* WT, WT-K- und MII auf eine 7 bp Deletion in *icd* untersucht. In Abbildung 4-8 ist ein Test Ansatz zu sehen. In Spur 5 und Spur 11 finden sich keine Banden, da zweimal MII pHPNE19-02.1 Nr. I 43 aufgetragen wurde. In Spur 5 wurde Gesamt-DNA nach Kochmethode (Abschnitt 2.2.2.1.2) und in Spur 11 wurde Gesamt-DNA nach Verwendung des DNeasy®-Kits (Abschnitt 2.2.2.1) aufgetragen.

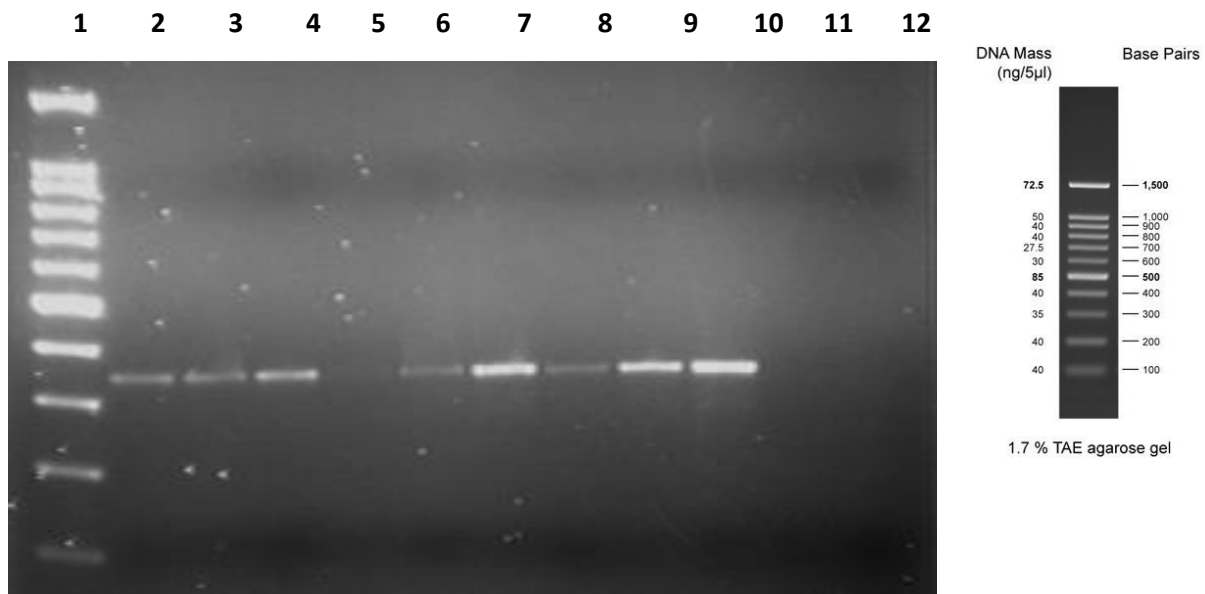


Abbildung 4-8 Agarose-Gelelektrophorese zum Testen der ARMS-PCR

TAE-Agarosegel, 1,0%, 1-fach E-Puffer, 100 V; Ethidiumbromidfärbung; jeweils 5 µl DNA, bzw. DNA-Größenmarker aufgetragen; A: pHPNE19-02.1 (*qnrA1*); B: pHPNE18-01.1 (*qnrB1*)

Spur 1: DNA-Größenmarker; Spur 2: MII A Nr. I 20; Spur 3: MII A Nr. III 21; Spur 4: MII A Nr. II 21; Spur 5: MII A Nr. I 43; Spur 6: MII A Nr. II 29; Spur 7: MII A Nr. III 9; Spur 8: MII B Nr. II 19; Spur 9: MII B Nr. I 6; Spur 10: MII; Spur 11: MII A Nr. I 43 DNeasy Kit; Spur 12: NTC

Nachdem die Funktion der ARMS-PCR überprüft war, wurden zuerst die Mutanten aus dem MII-Selektionsexperiment untersucht. In Abbildung 4-9 ist das Ergebnis der Agarose-Gelelektrophorese zu sehen. Bei MII pHPNE19-02.1 Nr. I 43 und bei vier weiteren Mutanten ließ sich kein Amplicon generieren. Die in der Bildunterschrift blau markierten Stämme finden sich in den oberen Spuren 1, 7, 8 und in der unteren Spur 9. In Tabelle 4-17 sind die auffälligen Mutanten aufgelistet.

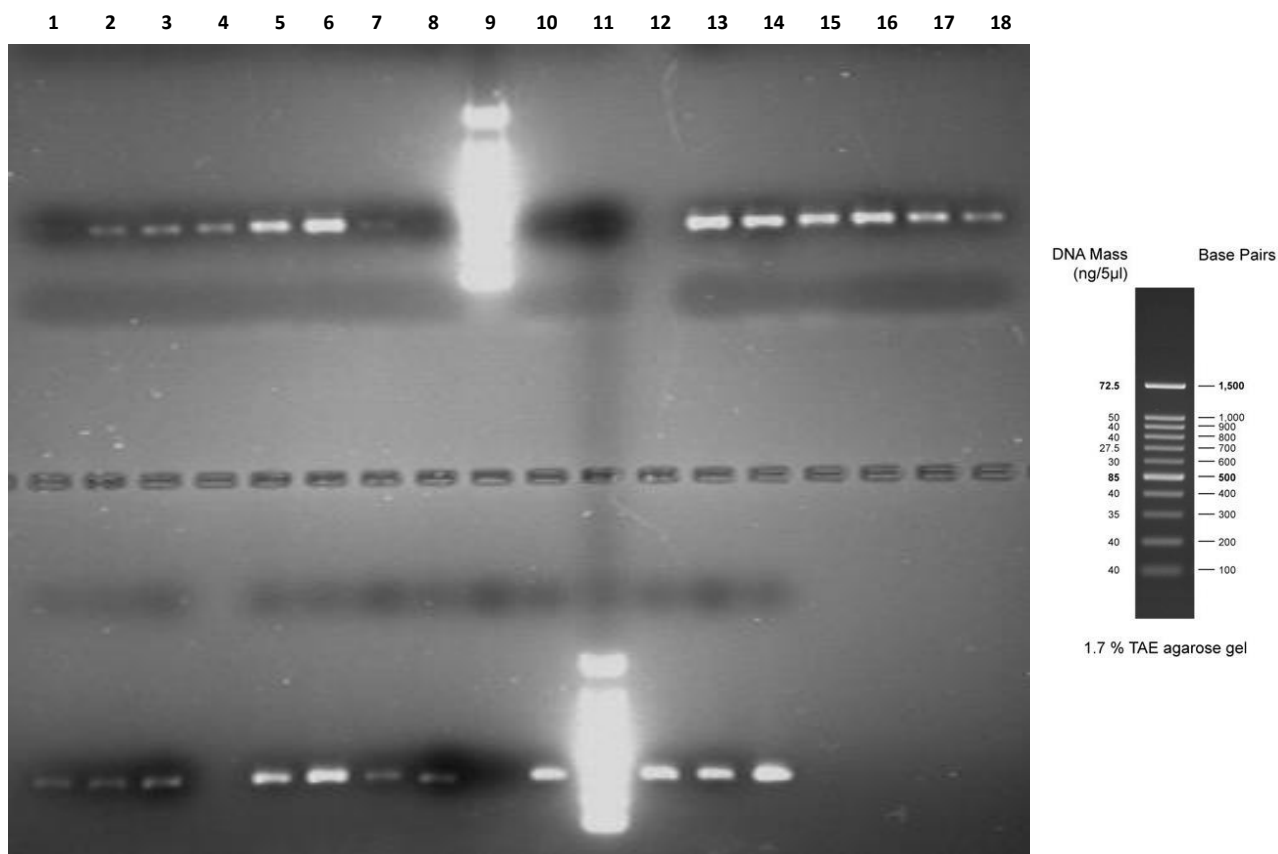


Abbildung 4-9 ARMS-PCR für Δicd 7 bp bei Mutanten MII pHPNE18-01.1 und MII pHPNE19-02.1

TAE-Agarosegel, 1,0%, 1-fach E-Puffer, 120 V; Ethidiumbromidfärbung; A: pHPNE19-02.1; B: pHPNE18-01.1; jeweils 5 μ l DNA oder Größenmarker wurden aufgetragen.

oben

Spur 1: MII A Nr. III 2; Spur 2: MII A Nr. III 4; Spur 3: MII A Nr. II 18; Spur 4: MII A Nr. I 46;
 Spur 5: MII A Nr. III 10; Spur 6: MII A Nr. III 11; Spur 7: MII A Nr. III 3; Spur 8: II A Nr. III 13;
 Spur 9: DNA-Größenmarker; Spur 10: MII A Nr. I 43; Spur 11: NTC; Spur 12: unbenutzt;
 Spur 13: MII A Nr. I 50; Spur 14: MII A Nr. II m.u.; Spur 15: MII A Nr. I 34; Spur 16: MII A Nr. II u.;
 Spur 17: MII A Nr. I 13; Spur 18: MII A Nr. II 6

unten

Spur 1: MII B Nr. II 6; Spur 2: MII B Nr. II 19; Spur 3: MII B Nr. II 23; Spur 4: unbenutzt;
 Spur 5: MII B Nr. II 42; Spur 6: MII B Nr. II 27; Spur 7: MII B Nr. III 14; Spur 8: MII B Nr. I38;
 Spur 9: MII B Nr. II 18; Spur 10: MII B Nr. III 1; Spur 11: DNA-Größenmarker; Spur 12: MII B III 10;
 Spur 13: MII B Nr. II 12; Spur 14: MII B Nr. II 40

Tabelle 4-17 Selektierte Mutanten mit Verdacht auf Δicd

Cip: Ciprofloxacin; MHK: minimale Hemmkonzentration

QnrA1	MHK Cip (μ g/ml)	QnrB1	MHK Cip (μ g/ml)
MII pHPNE19-02.1 Nr. III 2	16	MII pHPNE18-01.1 Nr. II 18	8
MII pHPNE19-02.1 Nr. III 3	16		
MII pHPNE19-02.1 Nr. III 13	16		
(MII pHPNE19-02.1 Nr. I 43)	8		

Zur Bestätigung wurde für die vier Mutanten die ARMS-PCR wiederholt und für die Agarose-Gelelektrophorese 7 µl statt 5 µl an PCR-Produkt eingesetzt. In Abbildung 4-10 ist das Ergebnis der Wiederholung zu sehen. In den Spuren 8 bis 10 war schwach ein Produkt zu erkennen, das dem Amplicon in der erwarteten Größe von circa 350 bp entsprach. Es wurde keine Negativkontrolle (NTC) und keine Positivkontrolle aufgetragen. In Spur 11 war bei MII pHPNE18-01.1 Nr. II 18 kein Produkt zu erkennen. Die Spuren 2 bis 7 und Spur 12 betreffen eine andere Fragestellung. Die Ergebnisse der Sequenzanalyse finden sich in 15.4.2.

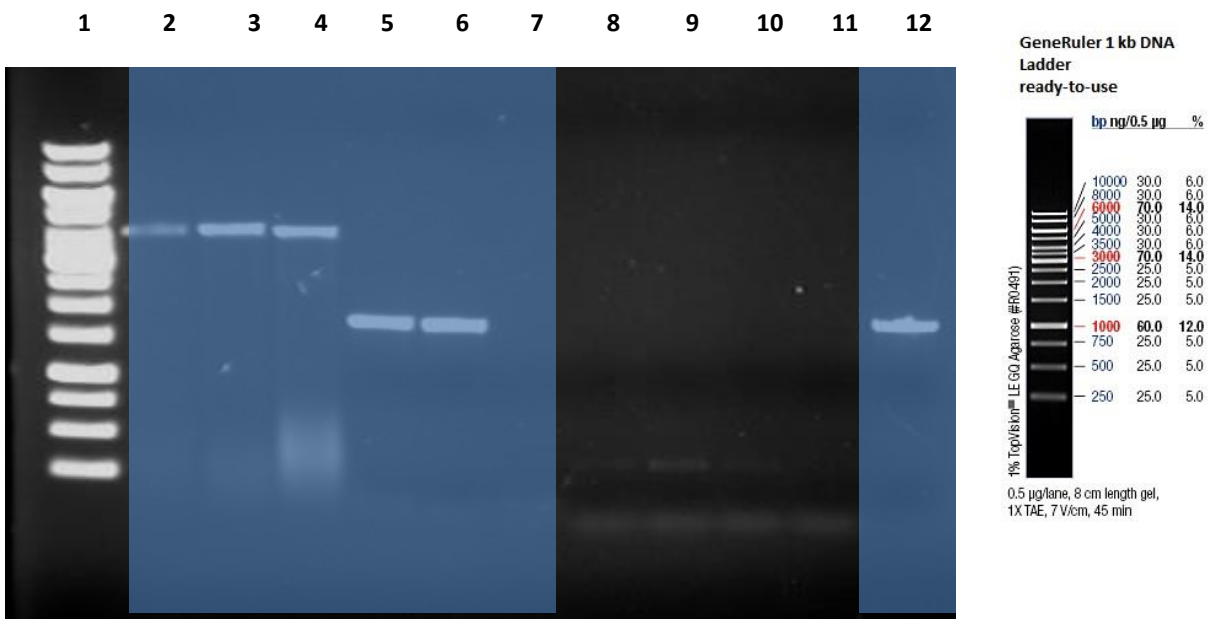


Abbildung 4-10 Wiederholung der ARMS-PCR und mehr aufgetragenes PCR-Produkt

TAE-Agarosegel, 1,0%, 1-fach E-Puffer, 100 V; Ethidiumbromidfärbung; A: pHPNE19-02.1; B: pHPNE18-01.1; Spuren 2 bis 7 und 12 waren für diese Fragestellung nicht relevant.

Spur 1: DNA-Größenmarker; Spur 8: MII A Nr. III 2; Spur 9: MII A Nr. III 3; Spur 10: MII A Nr. III 13; Spur 11: MII B Nr. II 18

Tabelle 4-18 Zusammenfassung der Ergebnisse der Sequenzierung von *icdA*

	Mutanten	(n)	Δicd	Gefundene Mutanten
WT	+ pHPNE18-01.1	11	-	-
	+ pHPNE19-02.1	14	-	-
	+ pUC19	7	-	-
WT-K	+ pHPNE18-01.1	11	-	-
	+ pHPNE19-02.1	8	-	-
	+ pUC19	7	-	-
MII	+ pHPNE18-01.1	20	+	1
	+ pHPNE19-02.1	14	+	3+1
	+I pUC19	6	-	-
Total		98		4+1

4.5.2.1 Sequenzanalyse von *icd* in weiteren Mutanten

Zur Bestätigung der Deletion in *icd* wurde eine Sequenzierung in den vier gefundenen Mutanten durchgeführt (vergleiche Tabelle 4-18). Hierzu wurde analog zur Untersuchung von MII pHPNE19-02.1 Nr. I 43 vorgegangen (Abschnitt 4.5.1). Für die Sequenzierung wurde ein *icd*-Fragment mitsamt Promotor- und Terminator-Sequenzen amplifiziert. Jedes Amplicon sollte aus zwei Richtungen sequenziert werden, so dass für jeden Sequenzabschnitt eine doppelte Absicherung vorlag.

In Abbildung 4-11 sind jeweils die beiden Produkte dieser PCR zu sehen. Bei MII pHPNE18-01.1 Nr. II 18 wurden die beiden Amplicons nicht erhalten, wie in der oberen und unteren Spur 6 in Abbildung 4-11 zu sehen. Statt einem Amplicon mit circa 900 bp war ein Produkt von 500 bp in der oberen Spur 6 zu erkennen. In der unteren Spur 6 war ein Fragment zwischen 250 bp und 500 bp zu erkennen. Daher ließ sich für die Mutante keine Sequenz ermitteln. Zu *E. coli* MII pHPNE18-01.1 Nr. II 18 finden sich weitere Ergebnisse in Abschnitt 4.5.2.2.

Neben den Mutanten MII pHPNE19-02.1 Nr. III 2; MII pHPNE18-01.1 Nr. II 18; MII pHPNE19-02.1 Nr. III 3 und MII pHPNE19-02.1 Nr. III 13 wurden zur Kontrolle die Mutanten MII pHPNE19-02.1 Nr. II 18 und MII pHPNE18-01.1 Nr. II 23 sequenziert.

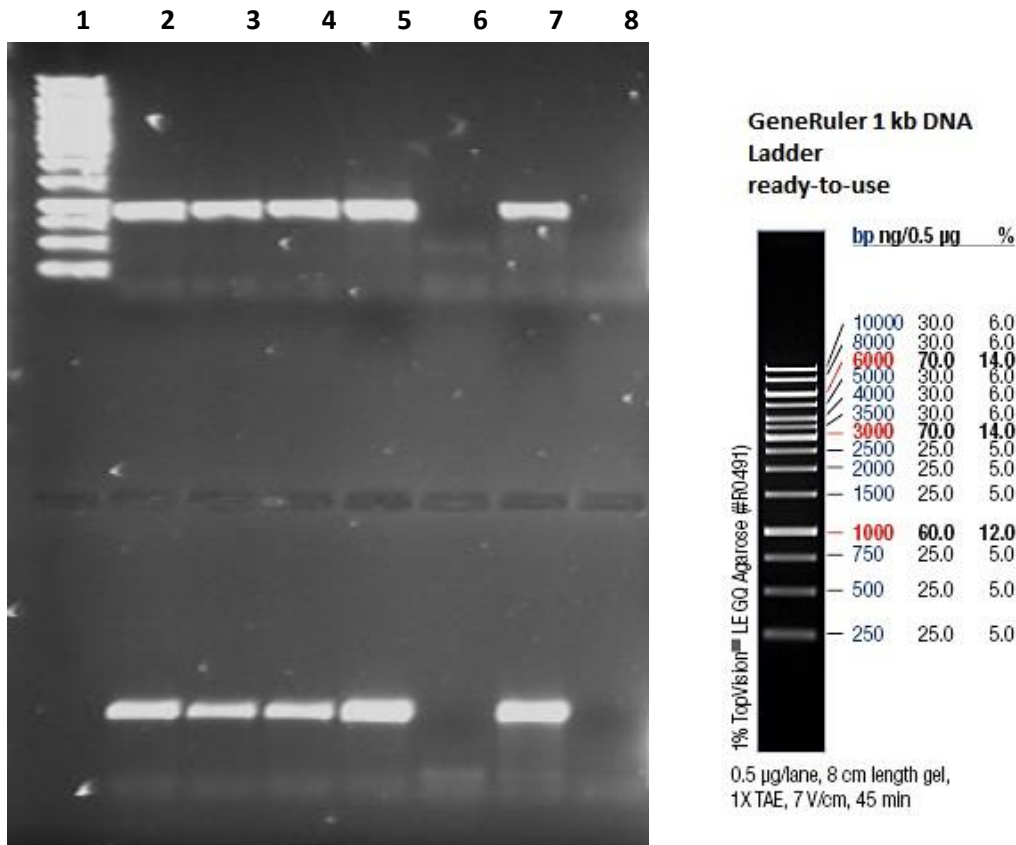


Abbildung 4-11 Vorbereitung für SANGER-Sequenzierung von *icd*

TAE-Agarosegel, 1,0%, 1-fach E-Puffer, 130 V; Ethidiumbromidfärbung;

A: pHPNE19-02.1; B: pHPNE18-01.1; 5 µl DNA oder DNA-Größenmarker aufgetragen.

oben (Verwendete Primer *icd*_[5-1]_-306_CFT073 mit *icd*_[3-1]_+602_CFT073)

Spur 1: DNA-Größenmarker; Spur 2: MII A Nr. III 2; Spur 3: MII A Nr. III 3; Spur 4: MII A Nr. III 13;

Spur 5: MII A Nr. II 18; Spur 6: MII B Nr. II 18; Spur 7: MII B Nr. II 23; Spur 8: NTC PCR oben

unten (Verwendete Primer *icd*_[5-1]_+491_CFT073 mit *icd*_[3-1]_+1398_CFT073)

Spur 2: MII A Nr. III 2; Spur 3: MII A Nr. III 3; Spur 4: MII A Nr. III 13; Spur 5: MII A Nr. II 18;

Spur 6: MII B Nr. II 18; Spur 7: MII B Nr. II 23; Spur 8: NTC PCR oben

In Tabelle 4-19 ist eine Zusammenfassung der Sequenzierungen zu finden. Die detaillierten Ergebnisse der Sequenzanalyse sind in Abschnitt 15.4 gezeigt. Die ermittelten Sequenzen wurden mit der Sequenz für MII pHPNE19-02.1 Nr. I 43 verglichen. Zusätzlich wurden die Sequenzen mit einer verfügbaren Sequenz von *E. coli* CFT073 (NCBI Referenznummer NC_004431.1) verglichen. Durch den gemeinsamen Ausgangsstamm *E. coli* MII lag eine Homologie der Sequenzen vor. Eine weitere *icd*-Mutante, die gefunden wurde, war MII pHPNE19-02.1 Nr. III 2. In *icdA* lag hier an Position 284 vom Startcodon aus beginnend (Position 918 in Tabelle 4-19) ein Basenaustausch von TAT zu TAG vor, wodurch es zu einem Stoppcodon kam, da statt der Aminosäure Tyrosin ein Transkriptionsstop codiert war.

Eine weitere Auffälligkeit fand sich bei der Positivkontrolle MII B Nr. II 23. Hier fand sich eine stille Mutation in *icd* an Position 1863 (Tabelle 4-19).

Bei MII pHNE19-02.1 Nr. II 18 konnte ein Bereich von 117 Basen nicht sequenziert werden (grauer Bereich in Tabelle 4-19). Diese Sequenz wurde mit Sequenzinformationen von MII pHNE19-02.1 Nr. I 43 aufgefüllt, um die restlichen Sequenzbereiche vergleichen zu können. Stamm MII pHNE19-02.1 Nr. II18 ist nicht zu verwechseln mit Stamm MII pHNE18-01.1 Nr. II 18, für den kein Amplicon erhalten wurde.

Bei den beiden Positivkontrollen sowie bei allen untersuchten Mutanten fand sich bei der Sequenzanalyse eine Insertion von 11 Basen im *icd*-Terminator. Eine 7 bp-Deletion wie bei MII pHNE19-02.1 Nr. I 43 fand sich bei keiner untersuchten Mutante.

Tabelle 4-19 *icd*-Sequenzalignment der untersuchten Mutanten im Vergleich zu CFT073

orange: Startcodon ATG *icd*; grün: Stopcodon TAA *icd*; grau: aufgefüllter Sequenzbereich bei MII B Nr. II 23; bei mehreren Mutanten wurde die Sequenz für *icd* mittels SANGER-Sequenzierung ermittelt.

		301		375
CFT073 <i>icd</i> Region	(301)	GAAC TCGGAAGAACATCGTAGGGTTTATGAACAGGATCACACGCGTGGGCTGGTTTTTCAG	GTTTACCGCTGGT	
MII A Nr. I43	(1)	-----	GTTTTTCGCTCGGT	
MII A Nr. II18	(1)	-----	GTTTTTCGCTCGGT	
MII A Nr. III2	(1)	-----	-----	T
MII A Nr. III3	(1)	-----	-----	GGT
MII A Nr. III13	(1)	-----	GTTTTTCGCTCGGT	
MII B Nr. II23	(1)	-----	GTTTTTCGCTCGGT	
		376		450
CFT073 <i>icd</i> Region	(376)	AGAACGTTGCGAGCTGAATCGCTTAACCTGGTGATTCTAAAAGAAGTTTTTGCATGGTATTTTCAGAGATTAT		
MII A Nr. I43	(14)	AGAACGTTGCGAGCTGAATCGCTTAACCTGGTGATTCTAAAAGAAGTTTTTGCATGGTATTTTCAGAGATTAT		
MII A Nr. II18	(14)	AGAACGTTGCGAGCTGAATCGCTTAACCTGGTGATTCTAAAAGAAGTTTTTGCATGGTATTTTCAGAGATTAT		
MII A Nr. III2	(2)	AGAACGTTGCGAGCTGAATCGCTTAACCTGGTGATTCTAAAAGAAGTTTTTGCATGGTATTTTCAGAGATTAT		
MII A Nr. III3	(4)	AGAACGTTGCGAGCTGAATCGCTTAACCTGGTGATTCTAAAAGAAGTTTTTGCATGGTATTTTCAGAGATTAT		
MII A Nr. III13	(14)	AGAACGTTGCGAGCTGAATCGCTTAACCTGGTGATTCTAAAAGAAGTTTTTGCATGGTATTTTCAGAGATTAT		
MII B Nr. II23	(15)	AGAACGTTGCGAGCTGAATCGCTTAACCTGGTGATTCTAAAAGAAGTTTTTGCATGGTATTTTCAGAGATTAT		
		451		525
CFT073 <i>icd</i> Region	(451)	GAATTGCCGCATTATAGCCTAATAACGCGCATCTTTCATGACGGCAAACAATAGGGTAGTATTGACAAGCCAATT		
MII A Nr. I43	(89)	GAATTGCCGCATTATAGCCTAATAACGCGCATCTTTCATGACGGCAAACAATAGGGTAGTATTGACAAGCCAATT		
MII A Nr. II18	(89)	GAATTGCCGCATTATAGCCTAATAACGCGCATCTTTCATGACGGCAAACAATAGGGTAGTATTGACAAGCCAATT		
MII A Nr. III2	(77)	GAATTGCCGCATTATAGCCTAATAACGCGCATCTTTCATGACGGCAAACAATAGGGTAGTATTGACAAGCCAATT		
MII A Nr. III3	(79)	GAATTGCCGCATTATAGCCTAATAACGCGCATCTTTCATGACGGCAAACAATAGGGTAGTATTGACAAGCCAATT		
MII A Nr. III13	(89)	GAATTGCCGCATTATAGCCTAATAACGCGCATCTTTCATGACGGCAAACAATAGGGTAGTATTGACAAGCCAATT		
MII B Nr. II23	(90)	GAATTGCCGCATTATAGCCTAATAACGCGCATCTTTCATGACGGCAAACAATAGGGTAGTATTGACAAGCCAATT		
		526		600
CFT073 <i>icd</i> Region	(526)	ACAAATCATTAAACAAAAATTGCTCTAAAGCATCCCGTATCGCAGGACGCAAACGCATATGCAACGTTGGTGGTAGA		
MII A Nr. I43	(164)	ACAAATCATTAAACAAAAATTGCTCTAAAGCATCCCGTATCGCAGGACGCAAACGCATATGCAACGTTGGTGGTAGA		
MII A Nr. II18	(164)	ACAAATCATTAAACAAAAATTGCTCTAAAGCATCCCGTATCGCAGGACGCAAACGCATATGCAACGTTGGTGGTAGA		
MII A Nr. III2	(152)	ACAAATCATTAAACAAAAATTGCTCTAAAGCATCCCGTATCGCAGGACGCAAACGCATATGCAACGTTGGTGGTAGA		
MII A Nr. III3	(154)	ACAAATCATTAAACAAAAATTGCTCTAAAGCATCCCGTATCGCAGGACGCAAACGCATATGCAACGTTGGTGGTAGA		
MII A Nr. III13	(164)	ACAAATCATTAAACAAAAATTGCTCTAAAGCATCCCGTATCGCAGGACGCAAACGCATATGCAACGTTGGTGGTAGA		
MII B Nr. II23	(165)	ACAAATCATTAAACAAAAATTGCTCTAAAGCATCCCGTATCGCAGGACGCAAACGCATATGCAACGTTGGTGGTAGA		
		601		675
CFT073 <i>icd</i> Region	(601)	CGAGCAAACCAGTAGCGCTCGAAGGAGAGGTGAATGAAAAGTAAAGTAGTTGTTCCGGCACAAGGCAAGAAGATC		
MII A Nr. I43	(239)	CGAGCAAACCAGTAGCGCTCGAAGGAGAGGTGAATGAAAAGTAAAGTAGTTGTTCCGGCACAAGGCAAGAAGATC		
MII A Nr. II18	(239)	CGAGCAAACCAGTAGCGCTCGAAGGAGAGGTGAATGAAAAGTAAAGTAGTTGTTCCGGCACAAGGCAAGAAGATC		
MII A Nr. III2	(227)	CGAGCAAACCAGTAGCGCTCGAAGGAGAGGTGAATGAAAAGTAAAGTAGTTGTTCCGGCACAAGGCAAGAAGATC		
MII A Nr. III3	(229)	CGAGCAAACCAGTAGCGCTCGAAGGAGAGGTGAATGAAAAGTAAAGTAGTTGTTCCGGCACAAGGCAAGAAGATC		
MII A Nr. III13	(239)	CGAGCAAACCAGTAGCGCTCGAAGGAGAGGTGAATGAAAAGTAAAGTAGTTGTTCCGGCACAAGGCAAGAAGATC		
MII B Nr. II23	(240)	CGAGCAAACCAGTAGCGCTCGAAGGAGAGGTGAATGAAAAGTAAAGTAGTTGTTCCGGCACAAGGCAAGAAGATC		
		676		750
CFT073 <i>icd</i> Region	(676)	ACCTTGCAAACGGCAAACCTCAACGTTCCCTGAAAATCCGATTATCCCTTACATTGAAGGTGATGGAATCGGTGTA		
MII A Nr. I43	(314)	ACCTTGCAAACGGCAAACCTCAACGTTCCCTGAAAATCCGATTATCCCTTACATTGAAGGTGATGGAATCGGTGTA		
MII A Nr. II18	(314)	ACCTTGCAAACGGCAAACCTCAACGTTCCCTGAAAATCCGATTATCCCTTACATTGAAGGTGATGGAATCGGTGTA		
MII A Nr. III2	(302)	ACCTTGCAAACGGCAAACCTCAACGTTCCCTGAAAATCCGATTATCCCTTACATTGAAGGTGATGGAATCGGTGTA		
MII A Nr. III3	(304)	ACCTTGCAAACGGCAAACCTCAACGTTCCCTGAAAATCCGATTATCCCTTACATTGAAGGTGATGGAATCGGTGTA		
MII A Nr. III13	(314)	ACCTTGCAAACGGCAAACCTCAACGTTCCCTGAAAATCCGATTATCCCTTACATTGAAGGTGATGGAATCGGTGTA		
MII B Nr. II23	(315)	ACCTTGCAAACGGCAAACCTCAACGTTCCCTGAAAATCCGATTATCCCTTACATTGAAGGTGATGGAATCGGTGTA		
		751		825
CFT073 <i>icd</i> Region	(751)	GATGTAACCCAGCCATGCTGAAAGTGGTGCAGCTGCAGTGCAGAAAGCCTATAAAGGCGAGCGTAAAATCTCC		

MII A Nr. I43	(389)	GATGTAACCCAGCCATGCTGAAAGTGGTCGACGCTGCAGTCGAGAAAGCCTATAAAGGCAGCGTAAAAATCTCC	
MII A Nr. II18	(389)	GATGTAACCCAGCCATGCTGAAAGTGGTCGACGCTGCAGTCGAGAAAGCCTATAAAGGCAGCGTAAAAATCTCC	
MII A Nr. II12	(377)	GATGTAACCCAGCCATGCTGAAAGTGGTCGACGCTGCAGTCGAGAAAGCCTATAAAGGCAGCGTAAAAATCTCC	
MII A Nr. III3	(379)	GATGTAACCCAGCCATGCTGAAAGTGGTCGACGCTGCAGTCGAGAAAGCCTATAAAGGCAGCGTAAAAATCTCC	
MII A Nr. III13	(389)	GATGTAACCCAGCCATGCTGAAAGTGGTCGACGCTGCAGTCGAGAAAGCCTATAAAGGCAGCGTAAAAATCTCC	
MII B Nr. II23	(390)	GATGTAACCCAGCCATGCTGAAAGTGGTCGACGCTGCAGTCGAGAAAGCCTATAAAGGCAGCGTAAAAATCTCC	
		826	900
CFT073 icd Region	(826)	TGGATGGAAATTTACACCGGTGAAAAATCCACACAGGTTTATGGTCAGGACGCTCGGTTGCCTGCTGAAACCCCTT	
MII A Nr. I43	(464)	TGGATGGAAATTTACACCGGTGAAAAATCCACACAGGTTTATGGTCAGGACGCTCGGTTGCCTGCTGAAACCCCTT	
MII A Nr. II18	(464)	TGGATGGAAATTTACACCGGTGAAAAATCCACACAGGTTTATGGTCAGGACGCTCGGTTGCCTGCTGAAACCCCTT	
MII A Nr. II12	(452)	TGGATGGAAATTTACACCGGTGAAAAATCCACACAGGTTTATGGTCAGGACGCTCGGTTGCCTGCTGAAACCCCTT	
MII A Nr. III3	(454)	TGGATGGAAATTTACACCGGTGAAAAATCCACACAGGTTTATGGTCAGGACGCTCGGTTGCCTGCTGAAACCCCTT	
MII A Nr. III13	(464)	TGGATGGAAATTTACACCGGTGAAAAATCCACACAGGTTTATGGTCAGGACGCTCGGTTGCCTGCTGAAACCCCTT	
MII B Nr. II23	(465)	TGGATGGAAATTTACACCGGTGAAAAATCCACACAGGTTTATGGTCAGGACGCTCGGTTGCCTGCTGAAACCCCTT	
		901	975
CFT073 icd Region	(901)	GATCTGATTTCGTAATAATCGCGTTGCCATTAAGGCCCGCTGACCACTCCGGTTGGTGGCGGTATTCGCTCTCTG	
MII A Nr. I43	(539)	GATCTGATTTCGTAATAATCGCGTTGCCATTAAGGCCCGCTGACCACTCCGGTTGGTGGCGGTATTCGCTCTCTG	
MII A Nr. II18	(539)	GATCTGATTTCGTAATAATCGCGTTGCCATTAAGGCCCGCTGACCACTCCGGTTGGTGGCGGTATTCGCTCTCTG	
MII A Nr. III2	(527)	GATCTGATTTCGTAATAATCGCGTTGCCATTAAGGCCCGCTGACCACTCCGGTTGGTGGCGGTATTCGCTCTCTG	
MII A Nr. III3	(529)	GATCTGATTTCGTAATAATCGCGTTGCCATTAAGGCCCGCTGACCACTCCGGTTGGTGGCGGTATTCGCTCTCTG	
MII A Nr. III13	(539)	GATCTGATTTCGTAATAATCGCGTTGCCATTAAGGCCCGCTGACCACTCCGGTTGGTGGCGGTATTCGCTCTCTG	
MII B Nr. II23	(540)	GATCTGATTTCGTAATAATCGCGTTGCCATTAAGGCCCGCTGACCACTCCGGTTGGTGGCGGTATTCGCTCTCTG	
		976	1050
CFT073 icd Region	(976)	AACTGGCCCTGCGCCAGGAAGTGGATCTCTACATCTGCCTGCGTCCGGTACGTTACTATCAGGGCACTCCAAGC	
MII A Nr. I43	(614)	AACTGGCCCTGCGCCAGGAAGTGGATCTCTACATCTGCCTGCGTCCGGTACGTTACTATCAGGGCACTCCAAGC	
MII A Nr. II18	(614)	AACTGGCCCTGCGCCAGGAAGTGGATCTCTACATCTGCCTGCGTCCGGTACGTTACTATCAGGGCACTCCAAGC	
MII A Nr. III2	(602)	AACTGGCCCTGCGCCAGGAAGTGGATCTCTACATCTGCCTGCGTCCGGTACGTTACTATCAGGGCACTCCAAGC	
MII A Nr. III3	(604)	AACTGGCCCTGCGCCAGGAAGTGGATCTCTACATCTGCCTGCGTCCGGTACGTTACTATCAGGGCACTCCAAGC	
MII A Nr. III13	(614)	AACTGGCCCTGCGCCAGGAAGTGGATCTCTACATCTGCCTGCGTCCGGTACGTTACTATCAGGGCACTCCAAGC	
MII B Nr. II23	(615)	AACTGGCCCTGCGCCAGGAAGTGGATCTCTACATCTGCCTGCGTCCGGTACGTTACTATCAGGGCACTCCAAGC	
		1051	1125
CFT073 icd Region	(1051)	CCGGTTAAACACCCCTGAAGTACCGGATGATGGTTATCTTCCGTGAAAGTCCGGAAGACATTTATGCGGGTATCGAA	
MII A Nr. I43	(689)	CCGGTTAAACACCCCTGAAGTACCGGATGATGGTTATCTTCCGTGAAAGTCCGGAAGACATTTATGCGGGTATCGAA	
MII A Nr. II18	(689)	CCGGTTAAACACCCCTGAAGTACCGGATGATGGTTATCTTCCGTGAAAGTCCGGAAGACATTTATGCGGGTATCGAA	
MII A Nr. III2	(677)	CCGGTTAAACACCCCTGAAGTACCGGATGATGGTTATCTTCCGTGAAAGTCCGGAAGACATTTATGCGGGTATCGAA	
MII A Nr. III3	(679)	CCGGTTAAACACCCCTGAAGTACCGGATGATGGTTATCTTCCGTGAAAGTCCGGAAGACATTTATGCGGGTATCGAA	
MII A Nr. III13	(689)	CCGGTTAAACACCCCTGAAGTACCGGATGATGGTTATCTTCCGTGAAAGTCCGGAAGACATTTATGCGGGTATCGAA	
MII B Nr. II23	(690)	CCGGTTAAACACCCCTGAAGTACCGGATGATGGTTATCTTCCGTGAAAGTCCGGAAGACATTTATGCGGGTATCGAA	
		1126	1200
CFT073 icd Region	(1126)	TGGAAAGCAGACTCTGCCGACGCTGAGAAAGTGAATAAATTCCTGCGTGAAGAGATGGGCGTGAAGAAAATTCGC	
MII A Nr. I43	(764)	TGGAAAGCAGACTCTGCCGACGCTGAGAAAGTGAATAAATTCCTGCGTGAAGAGATGGGCGTGAAGAAAATTCGC	
MII A Nr. II18	(764)	TGGAAAGCAGACTCTGCCGACGCTGAGAAAGTGAATAAATTCCTGCGTGAAGAGATGGGCGTGAAGAAAATTCGC	
MII A Nr. III2	(752)	TGGAAAGCAGACTCTGCCGACGCTGAGAAAGTGAATAAATTCCTGCGTGAAGAGATGGGCGTGAAGAAAATTCGC	
MII A Nr. III3	(754)	TGGAAAGCAGACTCTGCCGACGCTGAGAAAGTGAATAAATTCCTGCGTGAAGAGATGGGCGTGAAGAAAATTCGC	
MII A Nr. III13	(764)	TGGAAAGCAGACTCTGCCGACGCTGAGAAAGTGAATAAATTCCTGCGTGAAGAGATGGGCGTGAAGAAAATTCGC	
MII B Nr. II23	(765)	TGGAAAGCAGACTCTGCCGACGCTGAGAAAGTGAATAAATTCCTGCGTGAAGAGATGGGCGTGAAGAAAATTCGC	
		1201	1275
CFT073 icd Region	(1201)	TTCCCGGAACATTGCGGTATCGGTATTAAGCCGTGTTTCGGAAGAAGGCACCAAACGCTCGGTTCTGTCAGCGGATC	
MII A Nr. I43	(839)	TTCCCGGAACATTGCGGTATCGGTATTAAGCCGTGTTTCGGAAGAAGGCACCAAACGCTCGGTTCTGTCAGCGGATC	
MII A Nr. II18	(839)	TTCCCGGAACATTGCGGTATCGGTATTAAGCCGTGTTTCGGAAGAAGGCACCAAACGCTCGGTTCTGTCAGCGGATC	
MII A Nr. III2	(827)	TTCCCGGAACATTGCGGTATCGGTATTAAGCCGTGTTTCGGAAGAAGGCACCAAACGCTCGGTTCTGTCAGCGGATC	
MII A Nr. III3	(829)	TTCCCGGAACATTGCGGTATCGGTATTAAGCCGTGTTTCGGAAGAAGGCACCAAACGCTCGGTTCTGTCAGCGGATC	
MII A Nr. III13	(839)	TTCCCGGAACATTGCGGTATCGGTATTAAGCCGTGTTTCGGAAGAAGGCACCAAACGCTCGGTTCTGTCAGCGGATC	
MII B Nr. II23	(840)	TTCCCGGAACATTGCGGTATCGGTATTAAGCCGTGTTTCGGAAGAAGGCACCAAACGCTCGGTTCTGTCAGCGGATC	
		1276	1350
CFT073 icd Region	(1276)	GAATACGCAATTGCTAACGATCGTGACTCTGTGACCCTGGTGCACAAAGGCAACATCATGAAGTTCACCGAAGGC	
MII A Nr. I43	(914)	GAATACGCAATTGCTAACGATCGTGACTCTGTGACCCTGGTGCACAAAGGCAACATCATGAAGTTCACCGAAGGC	
MII A Nr. II18	(914)	GAATACGCAATTGCTAACGATCGTGACTCTGTGACCCTGGTGCACAAAGGCAACATCATGAAGTTCACCGAAGGC	
MII A Nr. III2	(902)	GAATACGCAATTGCTAACGATCGTGACTCTGTGACCCTGGTGCACAAAGGCAACATCATGAAGTTCACCGAAGGC	
MII A Nr. III3	(904)	GAATACGCAATTGCTAACGATCGTGACTCTGTGACCCTGGTGCACAAAGGCAACATCATGAAGTTCACCGAAGGC	
MII A Nr. III13	(914)	GAATACGCAATTGCTAACGATCGTGACTCTGTGACCCTGGTGCACAAAGGCAACATCATGAAGTTCACCGAAGGC	
MII B Nr. II23	(915)	GAATACGCAATTGCTAACGATCGTGACTCTGTGACCCTGGTGCACAAAGGCAACATCATGAAGTTCACCGAAGGC	
		1351	1425
CFT073 icd Region	(1351)	CGGTTTAAAGACTGGGGCTACCACTGGCCGCTGAAGAATTTGGCCGTGAAGTGCAGCGGCGCCCGTGGCTG	
MII A Nr. I43	(989)	CGGTTTAAAGACTGGGGCTACCACTGGCCGCTGAAGAATTTGGCCGTGAAGTGCAGCGGCGCCCGTGGCTG	
MII A Nr. II18	(989)	CGGTTTAAAGACTGGGGCTACCACTGGCCGCTGAAGAATTTGGCCGTGAAGTGCAGCGGCGCCCGTGGCTG	
MII A Nr. III2	(977)	CGGTTTAAAGACTGGGGCTACCACTGGCCGCTGAAGAATTTGGCCGTGAAGTGCAGCGGCGCCCGTGGCTG	
MII A Nr. III3	(979)	CGGTTTAAAGACTGGGGCTACCACTGGCCGCTGAAGAATTTGGCCGTGAAGTGCAGCGGCGCCCGTGGCTG	
MII A Nr. III13	(989)	CGGTTTAAAGACTGGGGCTACCACTGGCCGCTGAAGAATTTGGCCGTGAAGTGCAGCGGCGCCCGTGGCTG	
MII B Nr. II23	(990)	CGGTTTAAAGACTGGGGCTACCACTGGCCGCTGAAGAATTTGGCCGTGAAGTGCAGCGGCGCCCGTGGCTG	
		1426	1500
CFT073 icd Region	(1426)	AAAGTTAAAAACCCGAATACCGGCAAAAGAGATCGTCATTAAGACGCTGATTGCTGATGCATTCTGCAACAGATC	
MII A Nr. I43	(1064)	AAAGTTAAAAACCCGAATACCGGCAAAAGAGATCGTCATTAAGACGCTGATTGCTGATGCATTCTGCAACAGATC	
MII A Nr. II18	(1064)	AAAGTTAAAAACCCGAATACCGGCAAAAGAGATCGTCATTAAGACGCTGATTGCTGATGCATTCTGCAACAGATC	
MII A Nr. III2	(1052)	AAAGTTAAAAACCCGAATACCGGCAAAAGAGATCGTCATTAAGACGCTGATTGCTGATGCATTCTGCAACAGATC	
MII A Nr. III3	(1054)	AAAGTTAAAAACCCGAATACCGGCAAAAGAGATCGTCATTAAGACGCTGATTGCTGATGCATTCTGCAACAGATC	
MII A Nr. III13	(1064)	AAAGTTAAAAACCCGAATACCGGCAAAAGAGATCGTCATTAAGACGCTGATTGCTGATGCATTCTGCAACAGATC	
MII B Nr. II23	(1065)	AAAGTTAAAAACCCGAATACCGGCAAAAGAGATCGTCATTAAGACGCTGATTGCTGATGCATTCTGCAACAGATC	
		1501	1575
CFT073 icd Region	(1501)	CTGCTCGCTCCGGCTGAATATGATGTTATCGCCTGTATGAACCTGAACGGTGACTACATTTCTGACGCCCTGGCA	
MII A Nr. I43	(1132)	CTGCTCGCTCCGGCTGAATATGATGTTATCGCCTGTATGAACCTGAACGGTGACTACATTTCTGACGCCCTGGCA	
MII A Nr. II18	(1139)	CTGCTCGCTCCGGCTGAATATGATGTTATCGCCTGTATGAACCTGAACGGTGACTACATTTCTGACGCCCTGGCA	
MII A Nr. III2	(1127)	CTGCTCGCTCCGGCTGAATATGATGTTATCGCCTGTATGAACCTGAACGGTGACTACATTTCTGACGCCCTGGCA	
MII A Nr. III3	(1129)	CTGCTCGCTCCGGCTGAATATGATGTTATCGCCTGTATGAACCTGAACGGTGACTACATTTCTGACGCCCTGGCA	
MII A Nr. III13	(1139)	CTGCTCGCTCCGGCTGAATATGATGTTATCGCCTGTATGAACCTGAACGGTGACTACATTTCTGACGCCCTGGCA	
MII B Nr. II23	(1140)	CTGCTCGCTCCGGCTGAATATGATGTTATCGCCTGTATGAACCTGAACGGTGACTACATTTCTGACGCCCTGGCA	

		1576		1650
CFT073 <i>icd</i> Region	(1576)	GCGCAGGTTGGTGGTATCGGTATCGCCCTGGCGCAAACATCGGTGACGAATGCGCCCTGTTTGAAGCCACCCAC		
MII A Nr. I43	(1207)	GCGCAGGTTGGTGGTATCGGTATCGCCCTGGCGCAAACATCGGTGACGAATGCGCCCTGTTTGAAGCCACCCAC		
MII A Nr. III18	(1214)	GCGCAGGTTGGTGGTATCGGTATCGCCCTGGCGCAAACATCGGTGACGAATGCGCCCTGTTTGAAGCCACCCAC		
MII A Nr. III2	(1202)	GCGCAGGTTGGTGGTATCGGTATCGCCCTGGCGCAAACATCGGTGACGAATGCGCCCTGTTTGAAGCCACCCAC		
MII A Nr. III3	(1204)	GCGCAGGTTGGTGGTATCGGTATCGCCCTGGCGCAAACATCGGTGACGAATGCGCCCTGTTTGAAGCCACCCAC		
MII A Nr. III13	(1214)	GCGCAGGTTGGTGGTATCGGTATCGCCCTGGCGCAAACATCGGTGACGAATGCGCCCTGTTTGAAGCCACCCAC		
MII B Nr. II23	(1215)	GCGCAGGTTGGTGGTATCGGTATCGCCCTGGCGCAAACATCGGTGACGAATGCGCCCTGTTTGAAGCCACCCAC		
		1651		1725
CFT073 <i>icd</i> Region	(1651)	GGTACTGCGCCGAAATATGCCGGACAGGACAAAGTAAACCCAGGCTCTATTATTCTCTCCGCTGAGATGATGCTG		
MII A Nr. I43	(1282)	GGTACTGCGCCGAAATATGCCGGACAGGACAAAGTAAACCCAGGCTCTATTATTCTCTCCGCTGAGATGATGCTG		
MII A Nr. III18	(1289)	GGTACTGCGCCGAAATATGCCGGACAGGACAAAGTAAACCCAGGCTCTATTATTCTCTCCGCTGAGATGATGCTG		
MII A Nr. III2	(1277)	GGTACTGCGCCGAAATATGCCGGACAGGACAAAGTAAACCCAGGCTCTATTATTCTCTCCGCTGAGATGATGCTG		
MII A Nr. III3	(1279)	GGTACTGCGCCGAAATATGCCGGACAGGACAAAGTAAACCCAGGCTCTATTATTCTCTCCGCTGAGATGATGCTG		
MII A Nr. III13	(1289)	GGTACTGCGCCGAAATATGCCGGACAGGACAAAGTAAACCCAGGCTCTATTATTCTCTCCGCTGAGATGATGCTG		
MII B Nr. II23	(1290)	GGTACTGCGCCGAAATATGCCGGACAGGACAAAGTAAACCCAGGCTCTATTATTCTCTCCGCTGAGATGATGCTG		
		1726		1800
CFT073 <i>icd</i> Region	(1726)	CGCCATATGGGCTGGACTGAAGCGCGTAGACCTGATTGTTAAAGGTATGGAAGGCGCAATCAATGCCAAGACCCGTA		
MII A Nr. I43	(1357)	CGCCATATGGGCTGGACTGAAGCGCGTAGACCTGATTGTTAAAGGTATGGAAGGCGCAATCAATGCCAAGACCCGTA		
MII A Nr. III18	(1364)	CGCCATATGGGCTGGACTGAAGCGCGTAGACCTGATTGTTAAAGGTATGGAAGGCGCAATCAATGCCAAGACCCGTA		
MII A Nr. III2	(1352)	CGCCATATGGGCTGGACTGAAGCGCGTAGACCTGATTGTTAAAGGTATGGAAGGCGCAATCAATGCCAAGACCCGTA		
MII A Nr. III3	(1354)	CGCCATATGGGCTGGACTGAAGCGCGTAGACCTGATTGTTAAAGGTATGGAAGGCGCAATCAATGCCAAGACCCGTA		
MII A Nr. III13	(1364)	CGCCATATGGGCTGGACTGAAGCGCGTAGACCTGATTGTTAAAGGTATGGAAGGCGCAATCAATGCCAAGACCCGTA		
MII B Nr. II23	(1365)	CGCCATATGGGCTGGACTGAAGCGCGTAGACCTGATTGTTAAAGGTATGGAAGGCGCAATCAATGCCAAGACCCGTA		
		1801		1875
CFT073 <i>icd</i> Region	(1801)	ACCTATGACTTCGAACGCTCTGATGGAAGGCGCTAAAGCTGCTGAAATGTTTCAGAGTTTGGTGATGCGATCATCAAG		
MII A Nr. I43	(1432)	ACCTATGACTTCGAACGCTCTGATGGAAGGCGCTAAAGCTGCTGAAATGTTTCAGAGTTTGGTGACGCGATCATCAAG		
MII A Nr. III18	(1439)	ACCTATGACTTCGAACGCTCTGATGGAAGGCGCTAAAGCTGCTGAAATGTTTCAGAGTTTGGTGACGCGATCATCAAG		
MII A Nr. III2	(1427)	ACCTATGACTTCGAACGCTCTGATGGAAGGCGCTAAAGCTGCTGAAATGTTTCAGAGTTTGGTGACGCGATCATCAAG		
MII A Nr. III3	(1429)	ACCTATGACTTCGAACGCTCTGATGGAAGGCGCTAAAGCTGCTGAAATGTTTCAGAGTTTGGTGACGCGATCATCAAG		
MII A Nr. III13	(1439)	ACCTATGACTTCGAACGCTCTGATGGAAGGCGCTAAAGCTGCTGAAATGTTTCAGAGTTTGGTGACGCGATCATCAAG		
MII B Nr. II23	(1440)	ACCTATGACTTCGAACGCTCTGATGGAAGGCGCTAAAGCTGCTGAAATGTTTCAGAGTTTGGTGATGCGATCATCAAG		
		1876		1950
CFT073 <i>icd</i> Region	(1876)	AATATGTAATCACTACATGTGTTAAATATTGTAACGGGCGTATAACACGCCCGTTGTTTTATGATGATGTAATAAT		
MII A Nr. I43	(1507)	AATATGTAATCACTACATGTGTTAAATATTGTAACGGGCGTATAACACGCCCGTTGTTTTATGATGATGTAATAAT		
MII A Nr. III18	(1514)	AATATGTAATCACTACATGTGTTAAATATTGTAACGGGCGTATAACACGCCCGTTGTTTTATGATGATGTAATAAT		
MII A Nr. III2	(1502)	AATATGTAATCACTACATGTGTTAAATATTGTAACGGGCGTATAACACGCCCGTTGTTTTATGATGATGTAATAAT		
MII A Nr. III3	(1504)	AATATGTAATCACTACATGTGTTAAATATTGTAACGGGCGTATAACACGCCCGTTGTTTTATGATGATGTAATAAT		
MII A Nr. III13	(1514)	AATATGTAATCACTACATGTGTTAAATATTGTAACGGGCGTATAACACGCCCGTTGTTTTATGATGATGTAATAAT		
MII B Nr. II23	(1515)	AATATGTAATCACTACATGTGTTAAATATTGTAACGGGCGTATAACACGCCCGTTGTTTTATGATGATGTAATAAT		
		1951		2025
CFT073 <i>icd</i> Region	(1951)	CTTCCCAAAC-----CCTCCCAAACGGCTATTTTCTATGCTGTTTGTATCTACGATAAATC		
MII A Nr. I43	(1582)	CTTCCCAAACCTTCCCAAACCTTCCCAAACGGCTATTTTCTATGCTG-----		
MII A Nr. III18	(1589)	CTTCCCAAACCTTCCCAAACCTTCCCAAACGGCTATTTTCTATGCTG-----		
MII A Nr. III2	(1577)	CTTCCCAAACCTTCCCAAACCTTCCCAAAC-----		
MII A Nr. III3	(1579)	CTTCCCAAACCTTCCCAAACCTTCCCAAACGGCTATTT-----		
MII A Nr. III13	(1589)	CTTCCCAAACCTTCCCAAACCTTCCCAAACGGCTATTT-----		
MII B Nr. II23	(1590)	CTTCCCAAACCTTCCCAAACCTTCCCAAACGGCTATTTCTATGCT-----		

4.5.2.2 Versuch *icd*-Amplicon bei MII pHNE18-01.1 Nr. II 18 zu erhalten

Im Rahmen der Suche nach weiteren *Δicd*-Mutanten fiel MII pHNE18-01.1 Nr. II 18 auf. Für diese Mutante ließ sich für eine Sequenzanalyse kein Amplicon innerhalb *icd* erzeugen, und somit keine Sequenz für *icd* abbilden. Als Kontrolle wurde eine *gyrA*- und *marR*-PCR durchgeführt. Hierfür ergab sich bei Verwendung der gleichen DNA (isoliert nach Kochmethode aus 2.2.2.1.2) ein Amplicon, das zur positiven Sequenzierung von *gyrA* und *marR* verwendet wurde. Es war auszuschließen, dass das verwendete Material zur Amplifikation fehlerhaft war. Diese Mutante besaß eine größere Deletion im Bereich um *icd*. Eine PCR mit Primerpaaren, die fast 2000 bp abdeckten, lieferte keine Produkte.

Eine Übersicht der verwendeten Primer gibt Abbildung 4-12, und in Tabelle 4-20 sind die vermuteten Fragmentgrößen nach Restriktionsverdau mit *DraI* oder *BamHI* mit *EcoRV* aufgelistet.

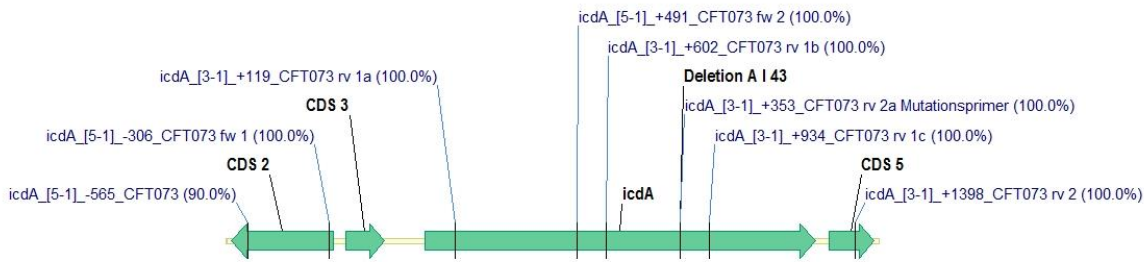


Abbildung 4-12 Region *icd* in CFT073(NCBI Referenznummer NC_004431.1 (eigene Darstellung)

Übersicht der Primer für die *icd*-Sequenzierung. Insgesamt wurden 8 verschiedene Primer zur Erzeugung eines Amplicons eingesetzt. Es konnte kein Amplicon innerhalb des abgebildeten Bereiches erzeugt werden.

Nachdem bei der ARMS-PCR die Kombination der Primer *icd*_[5-1]_+491_CFT073 und *icd*_[3-1]_+838_CFT073 nicht das erwartete Amplicon von ungefähr 350 bp Länge ergab (Abbildung 4-9), wurden zwei PCRs mit anderen Primerpaaren angesetzt, die unabhängig von Δicd 7 bp ein Produkt ergeben sollten. Die Primer *icd*_[5-1]_-306_CFT073 und *icd*_[3-1]_+602_CFT073 wurden verwendet. Ein ca. 900 bp Fragment ließ sich damit nicht bei MII pHPNE18-01.1 Nr. II 18 amplifizieren. Mit den Primern *icd*_[5-1]_+491_CFT073 und *icd*_[3-1]_+1398_CFT073 ließ sich auch kein Amplicon von ca. 900 bp erhalten. In beiden Fällen waren bei den Positivkontrollen Banden zu sehen (Abbildung 4-11; obere Hälfte).

Tabelle 4-20 Übersicht verwendete Primerpaare für Amplifikation von Sequenzbereichen bei *icd* bei MII pHPNE18-01.1 Nr. II 18 („Nr. II 18“); in chronologischer Reihenfolge

Nr.	Amplicon bei Nr. II 18	Forward-Primer	Reverse-Primer	Amplicon
1		<i>icd</i> _[5-1]_+491_CFT073	<i>icd</i> _[3-1]_+838_CFT073	347 bp
2		<i>icd</i> _[5-1]_-306_CFT073	<i>icd</i> _[3-1]_+602_CFT073	908 bp
3		<i>icd</i> _[5-1]_+491_CFT073	<i>icd</i> _[3-1]_+1398_CFT073	907 bp
4		<i>icd</i> _[5-1]_-306_CFT073	<i>icd</i> _[3-1]_+934_CFT073	1240 bp
5	+	<i>marR</i> _+7_for	<i>marA</i> _+42_rev	309 bp
6		<i>icd</i> _[5-1]_-306_CFT073	<i>icd</i> _[3-1]_+1398_CFT073	1700 bp
7		<i>icd</i> _[5-1]_-565_CFT073	<i>icd</i> _[3-1]_+1398_CFT073	1963 bp

In einem zweiten Ansatz wurde ein Primerpaar verwendet, das außerhalb des *icd*-Strukturgens an die DNA bindet. Mit den Primern *icd*_[5-1]_-306_CFT073 und *icd*_[3-1]_+934_CFT073 ergab sich bei Nr. II 18 kein Amplicon. Die Positivkontrolle ergab ein Amplicon von 1240 bp. Für MII pHPNE18-01.1 Nr. II 18 ergab sich ein kleineres Fragment, das im Gelbild schwach zu sehen

war (Abbildung 4-11 untere Hälfte). Der Verdacht einer Translokation wurde mit einem Ansatz untersucht, für den ein Primerpaar mit Bindungsstellen innerhalb der Sequenz für *icd* verwendet wurde. Mit den Primern *icd*_[5-1]_-306_CFT073 und *icd*_[3-1]_+934_CFT073 wurde nicht das erwartete 450 bp Produkt erhalten (Abbildung 4-13).

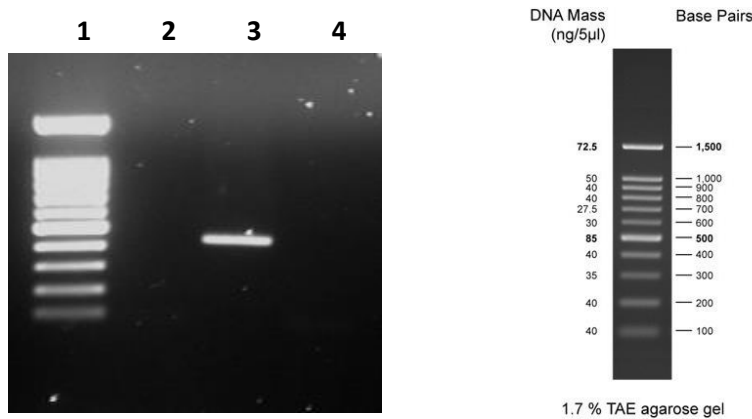


Abbildung 4-13 PCR mit Primern mit Bindungsstellen innerhalb *icd*

TAE-Agarosegel, 1,0%, 1-fach E-Puffer, 100 V; Ethidiumbromidfärbung; Amplicon-Volumen: 5 µl
 Spur 1: DNA-Größenmarker; Spur 2: MII pHPNE18-01.1 Nr. II 18;
 Spur 3: MII pHPNE19-02.1 Nr. I 43; Spur 4: NTC

Bei MII pHPNE18-01.1 Nr. II 18 wurde die QRDR in *gyrA*, *gyrB*, *parC* und *parE* sequenziert. Die Daten hierzu finden sich in Abschnitt 4.4.2.2. Hier zeigten sich keine Auffälligkeiten. Auch ein Nachweis der *marR*-Deletion konnte mittels RFLP erbracht werden, und in Abbildung 4-14 sind die Produkte dieser PCR zu sehen. Für den Nachweis der *marR*-Deletion als auch für die Sequenzierung der QRDR wurde die gleiche DNA verwendet, wie bei den PCR zur Sequenzier-Vorbereitung. Die DNA wurde mittels Kochmethode gewonnen (Abschnitt 2.2.2.1.2).

Mit der nachgewiesenen Mutation *gyrAS83L* und der Deletion $\Delta marR$ 175 bp ließ sich der untersuchte Stamm MII pHPNE18-01.1 Nr. II 18 in einen *E. coli* MII Stammhintergrund einordnen. So ließ sich ausschließen, dass es sich um eine Kontamination handelte.

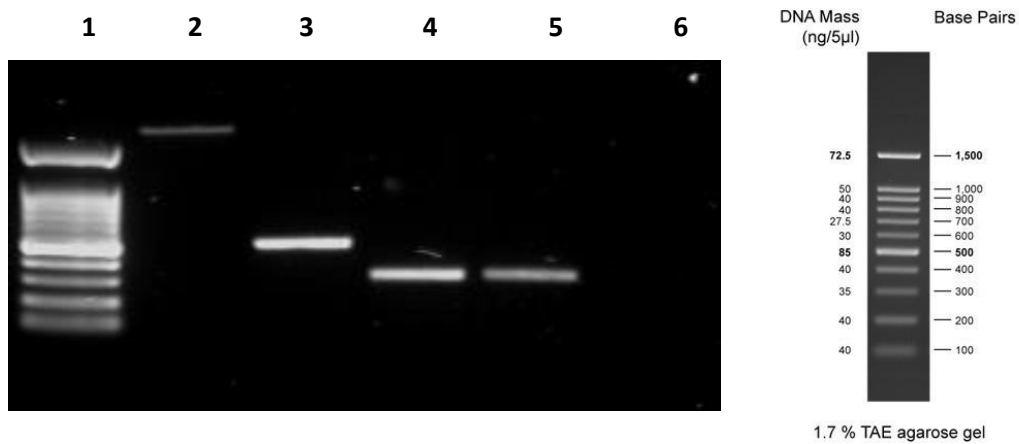


Abbildung 4-14 Agarosebild zum PCR-Nachweis für $\Delta marR$ 175 bp

TAE-Agarosegel, 1,0%, 1-fach E-Puffer, 120 V; Ethidiumbromidfärbung; Fragment bei MII und MII pHPNE18-01.1 Nr. II 18 läuft niedrig; Nachweis mit Primern marR_+7_for und marA_+42_rev; Spur 1: DNA-Größenmarker; Spur 3: WT; Spur 4: MII; Spur 5: MII pHPNE18-01.1 Nr. II 18; Spur 6: NTC; Spur 2: Probe für Fragestellung nicht relevant

Nach den ersten PCR folgten zwei Amplifikationen mit Fragmentgrößen von 1700 bp und 2000 bp Länge. In Abbildung 4-15 sind links vom DNA-Größenmarker aus die Primer *icd*_[5-1]_-565_CFT073 und *icd*_[3-1]_+1398_CFT073 zur Amplifikation verwendet worden. Rechts vom DNA-Größenmarker wurden die Primer *icd*_[5-1]_-306_CFT073 und *icd*_[3-1]_+1398_CFT073 verwendet (vergleiche Abbildung 4-12).

Erneut ließ sich für MII pHPNE18-01.1 Nr. II 18 kein Amplicon in beiden Ansätzen zeigen. Für MII als Positivkontrolle wurden die erwarteten Fragmentgrößen erhalten. Für MII pHPNE18-01.1 Nr. II 18 wurden keine weiteren PCR zur Amplifizierung *icd*-naher Bereiche durchgeführt.

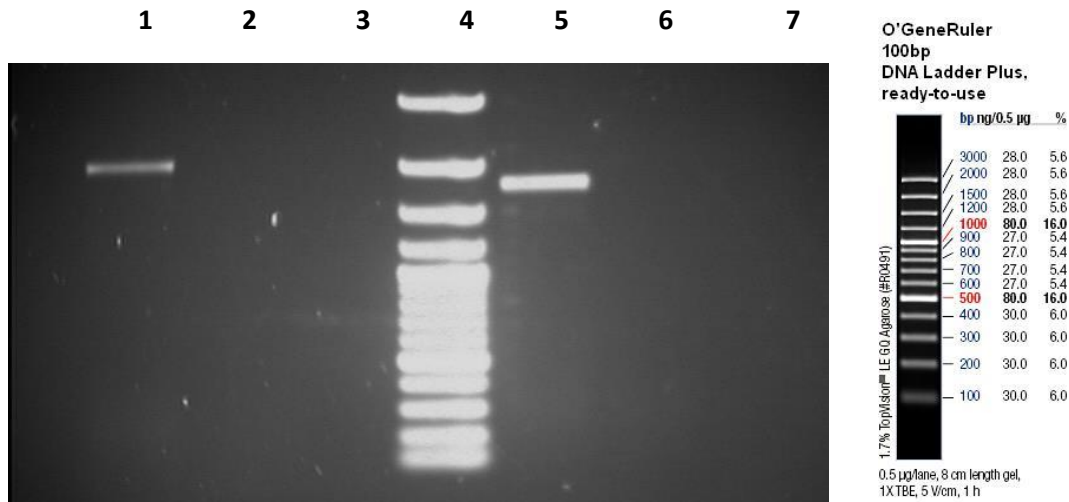


Abbildung 4-15 Ansatz zum Nachweis eines Amplicons im Bereich *icd* bei MII pHPNE18-01.1 Nr. II 18

TAE-Agarosegel, 1,0%, 1-fach E-Puffer, 100 V; Ethidiumbromidfärbung

Fragmentgröße erwartet für Spur 1 und Spur 2 circa 2000 bp.

Fragmentgröße erwartet für Spur 5 und Spur 6 circa 1700 bp

Spur 1: MII; Spur 2: MII pHPNE18-01.1 Nr. II 18; Spur 3: NTC; Spur 4: DNA-Größenmarker;

Spur 5: MII; Spur 6: MII pHPNE18-01.1 Nr. II 18; Spur 7: NTC

4.6 Einfluss *icd* auf Entwicklung einer FQ-Resistenz

Bei der der Genomsequenzierung von MII pHPNE19-02.1 Nr. I 43 (MII Δicd 7 bp pHPNE19-02.1) fand sich als Veränderung zum Ausgangstamm MII eine Deletion von sieben Basenpaaren im Gen der Isocitratdehydrogenase (*icd*). Für die weiteren Versuche wurde *E. coli*-Stamm MII pHPNE19-02.1 Nr. I 43 als MII Δicd 7 bp pHPNE19-02.1 bezeichnet. Um Δicd 7 bp isoliert betrachten zu können, wurde bei MII Δicd 7 bp pHPNE19-02.1 mittels *Plasmid Curing* das Plasmid pHPNE19-02.1 eliminiert (Abschnitt 2.2.1.11), und fortan der plasmidfreie Stamm als MII Δicd 7 bp bezeichnet.

4.6.1 Charakterisierung *E. coli*-Stamm MII Δicd 7 bp pHPNE19-02.1

In den folgenden Schritten wurde der Einfluss dieser 7 bp-Deletion in *icd* auf die Entwicklung einer Fluorchinolon-Resistenz (FQ-Resistenz) untersucht. Neben phänotypischen Merkmalen wie MHK und Generationszeit wurde auch ein Zusammenhang zwischen defektem *icd*-Gen und erhöhter Expression von Efflux-Genen untersucht.

Einen Überblick über die MHK von verschiedenen Antibiotika lieferte das Micronaut®-System. Bei Verwendung der Micronaut-S-Testplatte konnte die MHK von 12 verschiedenen Antibiotika parallel bestimmt werden. Bedingt durch den Klonierungsvektor pUC19 für pHPNE19-02.1 lag in MII $\Delta icd 7$ bp pHPNE19-02.1 noch die TEM-1 Betalactamase vor, so dass die MHK von Betalactam-Antibiotika hoch war. Die MHK von Ciprofloxacin und weiteren Fluorchinolon-Antibiotika war höher als 8 µg/ml und damit höher als bei den Ausgangsstämmen MII pHPNE19-02.1 und MII (Tabelle 4-21). Bei MII $\Delta icd 7$ bp pHPNE19-02.1 war im Vergleich zu MII pHPNE19-02.1 die MHK von Tetracyclin um eine Stufe erhöht.

Tabelle 4-21 Ergebnisse Micronaut-S bei MII $\Delta icd 7$ bp pHPNE19-02.1 (Nr. I 43) im Vergleich zu MII

MHK AI43: MHK für MII pHPNE19-02.1 Nr. I 43; MHK MII: MHK für MII; n.d.: nicht detektiert

Nr.	Antibiotikaklasse	Antibiotikum	MHK AI43 (µg/ml)	MHK MII (µg/ml)
1	Betalactam	Ampicillin	>64	n.d.
2	Betalactam	Mezlocillin	>128	n.d.
3	Betalactam	Piperacillin	>128	n.d.
4	Betalactam	Cefazolin	>32	n.d.
5	Aminoglykosid	Gentamicin	≤0,5	≤0,5
6	Trimethoprim+ Sulfonamid	Cotrimoxazol	2	n.d.
7	Tetracyclin	Tetracyclin	4	2
8	Fluorchinolon	Ofloxacin	>8	4
9	Fluorchinolon	Norfloxacin	>8	4
10	Fluorchinolon	Ciprofloxacin	>8	2 – 4
11	Fluorchinolon	Levofloxacin	>8	n.d.
12	Fluorchinolon	Moxifloxacin	>8	n.d.

4.6.2 Komplementation von $\Delta icd 7$ bp mit dem Wildtyp-Allel aus *E. coli* WT (GK571) in *E. coli* MII pHPNE19-02.1 Nr. I 43

Ziel der Komplementation war der Beweis, dass die MHK-Zunahme von Fluorchinolonen für MII $\Delta icd 7$ bp pHPNE19-02.1 (Abschnitt 4.6.1) durch $\Delta icd 7$ bp verursacht wurde. Durch Zugabe des plasmidbasierten Wildtyp-Allels sollte die 7 bp-Deletion komplementiert werden. Als phänotypisches Merkmal sollte die MHK von Fluorchinolonen beobachtet werden und zeigen, welcher Genlocus sich dominant verhielt. Hierfür waren die beiden Plasmide pPHPH177-01.1 und pPHPH177-02.1 basierend auf dem Klonierungsvektor pACYC177 zu konstruieren. pACYC177 wurde als Klonierungsvektor ausgewählt, da dieser über einen p15A ori (origin of replication) verfügt, und dieser dem Vektor erlaubt stabil in Zellen zu existieren, die bereits ein Plasmid wie pBR322 oder pUC19 (beide ColE1-Gruppe) enthielten [238]. pHPNE19-02.1 mit

qnrA1 enthielt als Grundlage den Klonierungsvektor pUC19. Daher war als Klonierungsvektor pBR322 für die Konstruktion eines Komplementationsplasmids nicht verwendbar. Beide Plasmide konnten nicht in einer Zelle koexistieren. Für die Fragestellungen im Rahmen der Komplementationsversuche waren zwei Plasmide mit unterschiedlichen Resistenzgenen zu konstruieren. pHPHP177-01.1 besaß ein Gen für eine Aminoglykosidphosphatase und pHPHP177.02.1 ein Gen für die Betalactamase TEM-1. Beide Resistenzfaktoren waren im Klonierungsvektor pACYC177 enthalten und jeweils einer der Resistenzfaktoren wurde durch die Sequenz für *icd* (WT) ersetzt. Als Vorbereitung wurde MII Δicd 7 bp pHPNE19-02.1 durch *Plasmid Curing* (Abschnitt 2.2.1.11) vom Vektor befreit. Anschließend wurde dieser vektorfreie Stamm zusammen mit MII für die Transformation vorbereitet (gemäß Abschnitt 2.2.1.9).

4.6.2.1 Klonierung des Komplementationsplasmids pHPHP177-01.1

Mittels PCR und der Phusion High-Fidelity DNA Polymerase wurde ein 1661 bp großes Fragment von *icd* (WT) und den dazugehörigen Promotor- und Terminator-Bereichen amplifiziert. Wichtig war, dass das Gen aus dem isogenen Stammhintergrund aus *E. coli* WT stammte, da dieses Allel auch zu Beginn des Selektionsexperiments in MII vorlag.

Die verwendeten Primer für die Amplifikation waren *icd*_[5-1]_-261_CFT073_BamHI und *icd*_[3-1]_+1398_CFT073_Eco31I. Die PCR ergab ein Amplicon, das sich nach Restriktion mit *Bam*HI und *Eco*31I in pACYC177 einfügen ließ (Abbildung 4-16).

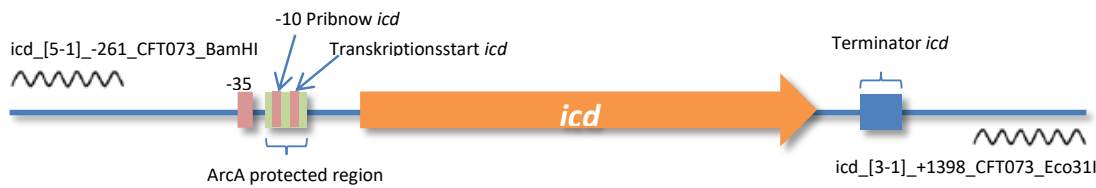


Abbildung 4-16 *icd*-Fragment für die Klonierung in pACYC177 (eigene Darstellung)

Schematische Darstellung des gewünschten Amplicons. Gewellte Linie: Primerbindungsstellen; AcrA protected region: Die *icd*-Transkription wird durch AcrA als Repressor der Transkription durch Bindung und teilweise Besetzung des *icd*-Promotor reguliert [239]. Neben dem Strukturgen und der Promotorregion enthielt das Amplicon noch die Terminator-Sequenz (Terminator-*icd*).

Zur Konstruktion des Plasmids pPHP177-01.1 wurden der Klonierungsvektor pACYC177 und Insert (Abbildung 4-16) mit den Restriktionsenzymen *Bam*HI und *Eco*31I behandelt. Das Gen für die Betalactamase TEM-1 in pACYC177 (Abbildung 4-17) wurde durch Restriktionsverdau vor der Klonierung größtenteils entfernt. Daher stand im Rahmen des Screenings nach positiven Transformanden nur die Verwendung von Kanamycin als Selektionsantibiotikum zur Verfügung, bzw. über eine Negativ-Selektion auf Ampicillin konnten die möglichen Transformanden überprüft werden.

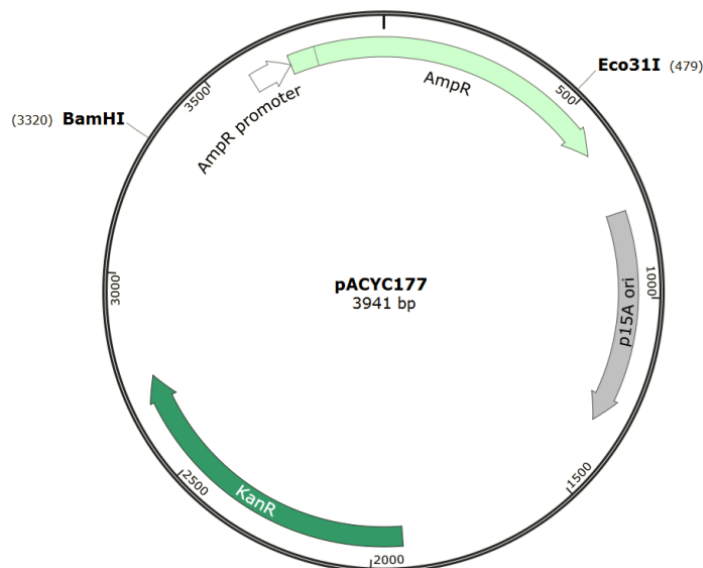


Abbildung 4-17 Vektorkarte für pACYC177 (eigene Darstellung)

Schnittstellen für *Bam*HI und *Eco*31I zur Klonierung des *icd*-Wildtyp-Allels gezeigt. AmpR und AmpR promoter: Abkürzungen für Betalactamase TEM-1 aus pACYC177. KanR: Kanamycinresistenzgen (Bakterielle Aminophosphotransferase); p15A ori: Replikationsursprung (*origin of replication*).

Zur Charakterisierung wurde der fertige Vektor (Abbildung 4-18) anhand seines Restriktionsmusters identifiziert, da nach Restriktion mit *DraI* oder *BamHI* gemeinsam mit *EcoRV* Bandenmuster lieferten, die eindeutig dem gewünschten Vektor zuzuordnen waren. pACYC177 besaß keine Schnittstelle für *EcoRV*. Diese Schnittstelle konnte nur vom Insert stammen, das dazu erfolgreich kloniert werden musste.

In Tabelle 4-22 sind die vermuteten Fragmentgrößen nach Restriktionsverdau mit *DraI* oder *BamHI* mit *EcoRV* aufgelistet. Bei *DraI* ergaben sich drei Fragmente. Das kleinste Fragment mit 19 bp war für eine Agarose-Gelelektrophorese zu vernachlässigen, da es schnell wanderte und nicht im Gel sichtbar war. In Abbildung 4-19 ist das Ergebnis des Restriktionsverdaus mit *DraI* für pHPHP177-01.1 zu sehen. In der Agarose-Gelelektrophorese (Abbildung 4-19) waren die Banden in der Größenordnung zu sehen, wie berechnet. Das kleinste Fragment mit 19 bp bei *DraI* war nicht im Gel sichtbar. Das untersuchte Plasmid wurde durch die Bandenmuster als pHPHP177-01.1 identifiziert.

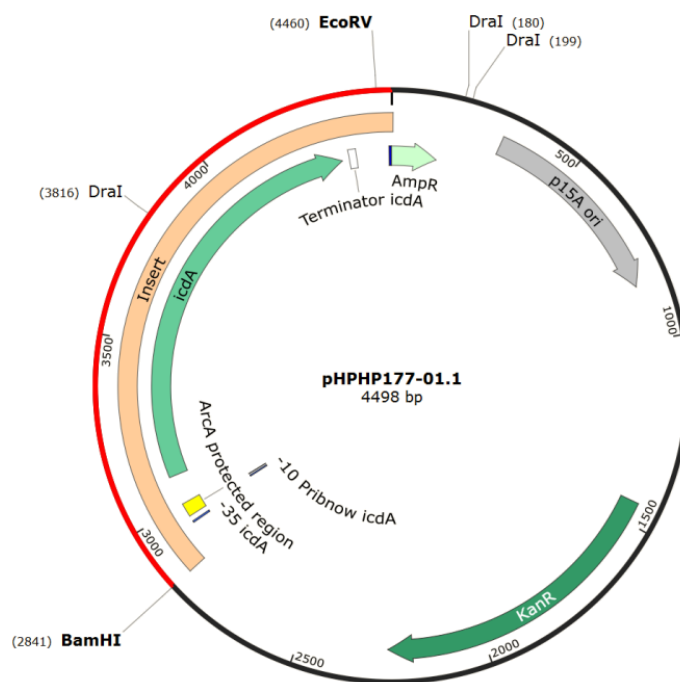


Abbildung 4-18 Vektorkarte den Endvektor HPHP177-01.1 (eigene Darstellung)

Das fertige Plasmid setzt sich aus pACYC177 und einem Insert (rotbraun hervorgehoben) zusammen. Die Restriktionsschnittstellen für *EcoRV*, *DraI* und *BamHI* zur Charakterisierung und Klonierung sind abgebildet.

Tabelle 4-22 Erwartete Fragmentgrößen nach Restriktionsverdau für pHPHP177-01.1

Plasmid	pHPHP177-01.1	pHPHP177-01.1 + <i>DraI</i>	pHPHP177-01.1 + <i>Bam</i> HI + <i>Eco</i> RV
	4498 bp	3617 bp	2879 bp
Fragmentgröße		862 bp 19 bp	1619 bp

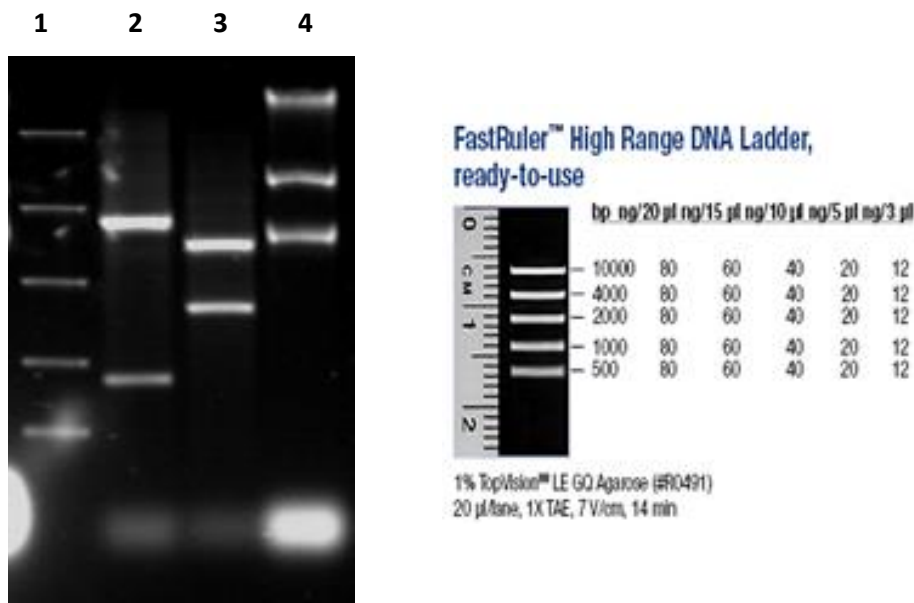


Abbildung 4-19 Agarosegelelektrophorese zur Identifikation von pHPHP177-01.1

Nach unterschiedlichen Ansätzen konnte durch Restriktionsverdau pHPHP177-01.1 identifiziert werden. In den Spuren 2 bis 4 läuft ganz unten die überspiralisierte Form (*supercoiled*) des Plasmids und erscheint als grünlisch, weiße Wolke.

TAE-Agarosegel, 1,0%, 1-fach E-Puffer, 120 V; Ethidiumbromidfärbung
 Spur 1: FastRuler™ High Range DNA Ladder; Spur 2: pHPHP177-01.1 + *DraI*;
 Spur 3: pHPHP177.01.1 + *Eco*RV/*Bam*HI; Spur 4: pHPHP177-01.1 unfragmentiert
 (drei Banden zu sehen, da verschiedene Formen des Plasmids).

4.6.2.2 Klonierung pHPHP177-02.1

Mit pHPHP177-01.1 stand ein Komplementationsplasmid mit *icd* aus *E. coli* WT und einem Gen für eine Kanamycinresistenz zur Verfügung. Durch den p15A ori war pHPHP177-01.1 mit pHPNE19-02.1 (*Plac::qnrA1*) kompatibel, da pHPNE19-02.1 einen ori aus einer anderen Inkompatibilitätsgruppe besaß (pMB1-Derivat) [238]. Gleichzeitig war es möglich mit zwei Selektionsantibiotika beide Plasmide im *E. coli*-Stamm WT und in Stämmen mit einem isogenen Stammhintergrund zu halten. Für eine *marR*-Komplementation in MII stand das Plasmid pBP591 zur Verfügung [81]. Dieses Plasmid besaß auch eine Kanamycinresistenz, so dass für

die Versuche zur *icd*-Komplementation ein weiteres Plasmid ohne Kanamycinresistenz zu konstruieren war. Daher wurde das Plasmid pHPHP177-02.1 konstruiert, das als Grundlage auch den Vektor pACYC177 besaß und die Betalactamase exprimierte [240].

Für die Konstruktion des Komplementationsplasmids pHPHP177-02.1 wurde eine Methode des *Recombineerings* verwendet (Abschnitt 2.2.2.9.1). Ausgehend vom *E. coli*-Stamm WT wurde mit den Primern *icd*_[5-1]_-261_pACYC177Amp und *icd*_[3-1]_+1398_pACYC177Amp ein ca. 1700 bp großes Fragment amplifiziert. Durch die PCR wurde das Fragment an den Enden um homologe Sequenzen zu pACYC177 erweitert. Parallel dazu wurde ausgehend von einer verdünnten pACYC177-Lösung eine zweite PCR durchgeführt. Mit den Primern pACYC177::*icd*_[5-1]_keinKanR und pACYC177::*icd*_[3-1]_keinKanR wurde ein ca. 2600 bp großes Fragment amplifiziert, das durch die PCR homologe Bereiche zum *icd*-Fragment besaß (vergleiche Abbildung 4-20). Für das weitere Vorgehen wurde gemäß Abschnitt 2.2.2.9.1 vorgegangen. Zur Selektion positiver Transformanden wurde Ampicillin-Selektiv-Agar verwendet. Mit den Primerpaaren pHPHP177_02_I_fw_sequenz/ pHPHP177-02_I_rv_sequenz und pHPHP177-02_II_fw_sequenz/ pHPHP177-02_II_rv_sequenz wurde per Sequenzierung die homologe Rekombination bestätigt.

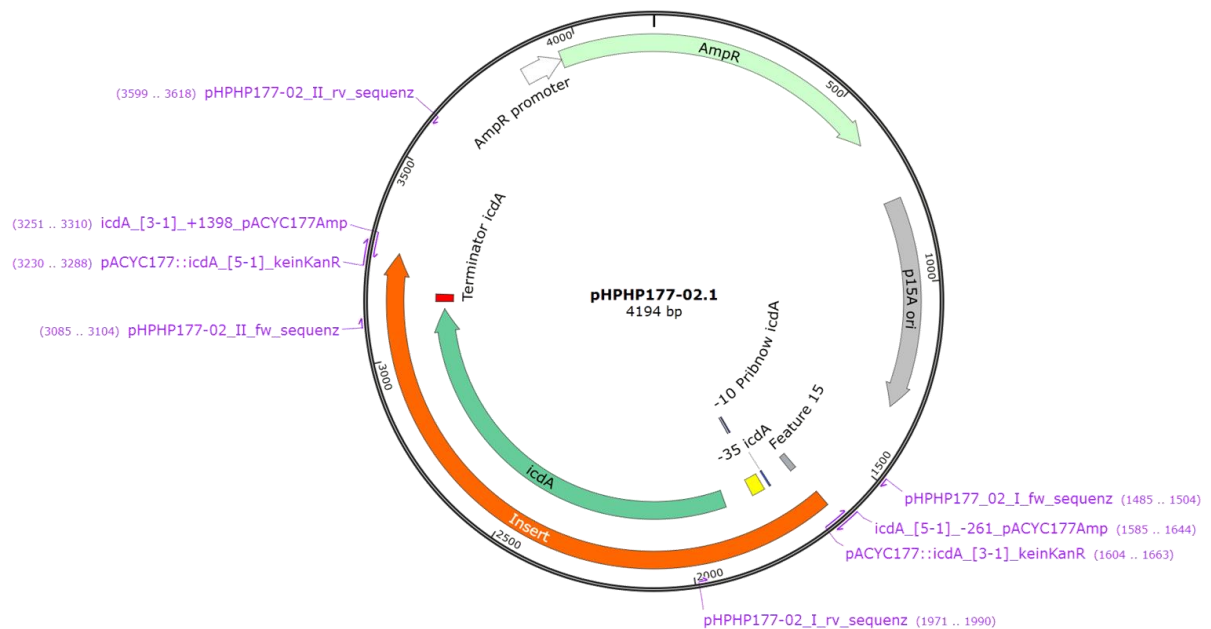


Abbildung 4-20 Vektorkarte von pHPHP177-02.1 (eigene Darstellung)

Violett: Primer für Recombineering und für die Sequenzierung; orange: Insert, innerhalb des Inserts finden sich neben dem *icd*-Strukturgen noch die dazugehörigen regulatorischen Bereiche. In pHPHP177-02.1 ist kein Kanamycinresistenzgen vorhanden. Betalactamase wird durch Amp^r (+ Amp^r-Promoter) codiert. Replikationsursprung grau markiert (p15A ori; *origin of replication*).

4.6.2.3 Ergebnisse der Komplementation von Δicd 7 bp

Die Stämme MII und MII pHPNE19-02.1 Nr. 1 43 (MII Δicd 7 bp pHPNE19-02.1) wurden mit den Plasmiden aus Tabelle 4-23 transformiert (Abschnitt 2.2.1.10). Danach wurde die MHK von Ciprofloxacin und von Norfloxacin für alle Transformanden ermittelt. Die MHK von Levofloxacin und Tetracyclin wurde nicht für alle Transformanden ermittelt. Die Ergebnisse der Komplementation für Icd und MarR mit plasmid-codierten Allelen aus *E. coli* WT (GK571) sind in Tabelle 4-23 aufgelistet. Bei MII bewirkte die Komplementation von MarR eine Abnahme der MHK von Ciprofloxacin von 2 $\mu\text{g/ml}$ auf 1 $\mu\text{g/ml}$. Bei MII Δicd 7 bp änderte sich die MHK von Ciprofloxacin nicht. Eine Komplementation von Icd bei MII Δicd 7 bp bewirkte keine Veränderung der MHK von Ciprofloxacin. Bei MII Δicd 7 bp pHPNE19-02.1 wurde eine Abnahme der MHK von Ciprofloxacin um 1 bis 2 MHK-Stufen durch Komplementation von Icd erreicht. Keine MHK von Ciprofloxacin wurde auf Niveau von MII oder MII Δicd 7 bp ermittelt. Bei den ermittelten MHKs von Norfloxacin fanden sich Parallelen zu den MHK von Ciprofloxacin.

Tabelle 4-23 MHK der Komplementationsversuche

n. d.: nicht detektiert; Cip: Ciprofloxacin; Nor: Norfloxacin; Levo: Levofloxacin; Tet: Tetracyclin

Stamm	MHK [$\mu\text{g/ml}$]			
	Cip	Nor	Levo	Tet
MII	2	4	2	2
+ pUC19	2	4	2	2 - 4
+ pBP591	1	2	n. d.	n. d.
+ pHPNE19-02.1	4	4	4 - 8	2 - 4
MII Δicd 7 bp	2	4	4 - 8	4
+ pBP591	2	2 - 4	n. d.	n. d.
+ pHPHP177-01.1	1 - 2	2 - 4	n. d.	2 - 4
+ pHPHP177-02.1	2	2	n. d.	n. d.
+ pHPNE19-02.1	8 - 16	8 - 16	16 - 32	4
+ pHPNE19-02.1 + pHPHP177-01.1	4 - 8	4 - 8	4 - 8	2 - 4

4.6.3 Einfluss Δicd 7 bp auf den Mutatoreffekt von *dnaQ905*

In jüngeren Arbeiten wird ein direkter Link zwischen zentralen Stoffwechselprozessen und DNA-Replikationsprozessen in *E. coli* diskutiert [241]–[243]. Während die Stoffwechselprozesse die Zelle mit Energie versorgen und Vorstufen für weitere biosynthetische Prozesse liefern, sind Replikationsprozesse Verbraucher von Energie und sichern die Integrität des gene-

tischen Materials ab. Diese wichtige Korrelation wurde sichtbar in Experimenten mit Mutatorphänotypen, die sich durch Mutationen in zentralen Stoffwechselprozessen hemmen ließen, so dass die Mutationsrate wieder auf Niveau vor Induktion des Mutators sank.

MACIAG *et al.* (2012) zeigten, dass in *E. coli* der Mutatorphänotyp *dnaQ49* durch Δicd -aufgehoben wurde. Durch eine Komplementation durch ein Plasmid mit dem *icd*-Wildtyp-Allel, ließ sich der Mutatorphänotyp wieder zeigen, jedoch in geringerem Umfang und nur in Gegenwart von Arabinose als primärer Kohlenstoffquelle [242].

Aus den Arbeiten von Dr. MARCO PETSCHULIES (2014) standen Plasmide mit *dnaQ*-Allelen zur Verfügung. Diese enthielten den dominanten Mutatorphänotyp *dnaQ905* [*dnaQ* (*mutD*) T151 E220D] aus *E. coli*-Stamm K12 CSH116 [244], welcher zuvor in *E. coli* Stamm MIIQ eingeführt wurde. Durch die Mutation war die Proofreading-Funktion der Polymerase III beeinträchtigt und führte zum vermehrten Einbau von Mutationen im bakteriellen Chromosom. Dieser Mutatorphänotyp zeigte sich auch, wenn ein Stamm mit *icd*-Wildtyp-Allel mit einem *dnaQ905*-Plasmid transformiert wurde. Die Plasmide wurden pHPMP03-05 (pBR322 mit *dnaQ* [-214 bis +912] aus *E. coli* MII) und pHPMP03-06 (pBR322 mit *dnaQ905* [-214 bis +912] aus *E. coli* MIIQ, bzw. *E. coli*-Stamm K12 CSH116) benannt.

4.6.3.1 *E. coli*-Stamm MII Δicd 7 bp und *dnaQ95*

Aus den Erkenntnissen bei Dr. MARCO PETSCHULIES [5] und MACIAG *et al.* [301] ließ sich die Frage ableiten, ob die *icd*-Mutation in MII Δicd 7 bp einen Einfluss auf das dominante Mutatorallel *dnaQ995* [303] besaß. MACIAG *et al.* zeigten, dass Doppelmutanten mit dem rezessiven Mutatorallel *dnaQ49* und einer Stoffwechsellmutation (z.B. Δicd) keinerlei Mutatorphänotyp zeigen und eine Mutationsrate auf Wildtypniveau besaßen [301]. Zur Beantwortung der oben gestellten Frage wurde MII *icd* 7 bp mit den Plasmiden pHPMP03-05 und pHPMP03-06 transformiert, und die Mutationsrate wurde bestimmt.

4.6.3.1.1 *Vorversuche*

Tabelle 4-24 gibt eine Übersicht der Ergebnisse der Ermittlung der MHK von Rifampicin für die einzelnen untersuchten Stämme und den entsprechenden Kombinationen mit Plasmiden.

Tabelle 4-24 MHK der einzelnen Stämme für Rifampicin

Stamm	MHK [$\mu\text{g/ml}$]
MII	16
MII pBP591	16
MII pHPMP03-05	16
MII pHPMP03-06	16
MII Δicd 7 bp	32
MII Δicd 7 bp pBP591	32
MII Δicd 7 bp pHPMP03-05	32
MII Δicd 7 bp pHPMP03-05 pHPHP177-01.1	16
MII Δicd 7 bp pHPMP03-06	32
MII Δicd 7 bp pHPMP03-06 pHPHP177-01.1	16

4.6.3.1.2 *Bestimmung der Mutationsrate*

Die Werte der Mutationsraten (Abschnitt 2.2.1.17) wurden mit Rifampicin LB-Agarplatten ermittelt, die die vierfache und achtfache MHK von Rifampicin für MII pHPMP03-05, bzw. für MII pHPMP03-06 enthielten. Bei MACIAG *et al.* wurde die Mutationsrate bei 30 °C bestimmt. Eine Temperatur von 30 °C wurde auch in der vorliegenden Arbeit eingestellt. Als Inokulum wurden jeweils 50 μl auf die LB-Agarplatten ausgestrichen. Die Ergebnisse der Doppelbestimmung der Mutationsrate sind in Abbildung 4-21 und in Abbildung 4-22 zu sehen.

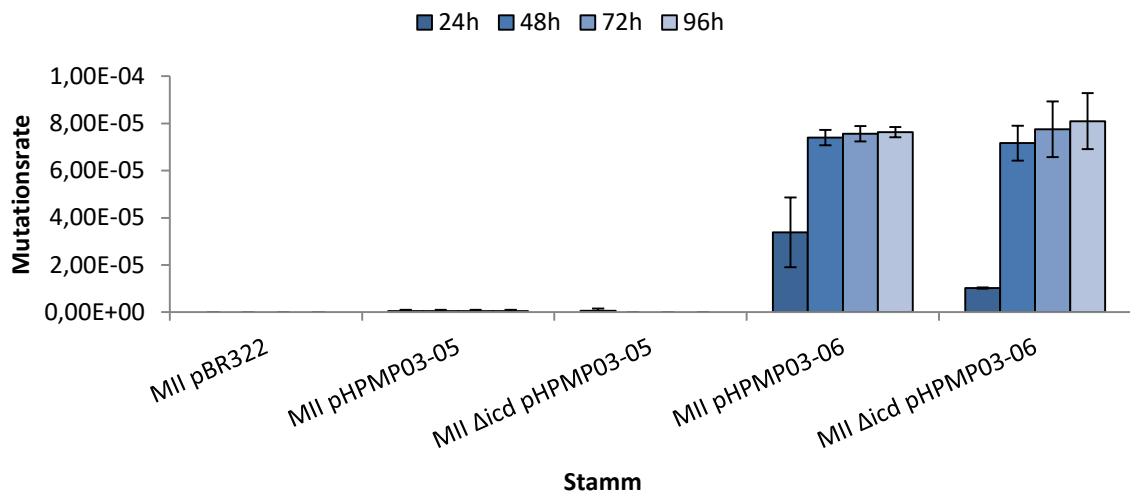


Abbildung 4-21 Ergebnisse des Rifampicin-Forwardassays (64 µg/ml) für MII und MII Δicd 7 bp

Die Mutationsrate wurde bei 30°C und mit Rifampicin (64µg/ml) nach 24 h, 48 h, 72 h und 96 h ermittelt. pHPME03-05 enthält *dnaQ* aus MII, pHPME03-06 enthält *dnaQ* aus MIIQ [27]

Bei einer Rifampicin-Konzentration von 64 µg/ml und bei 30 °C Inkubations-Temperatur befand sich die Mutationsrate der *E. coli*-Stämme mit pHPMP03-06 auf Mutatorniveau im Bereich von $1/10^5$ (Abbildung 4-21). Das dominante Mutator-Allel aus *E. coli* MIIQ (*dnaQ905*) ließ sich nicht durch Δicd 7 bp beeinflussen. Es war kein Unterschied in der Mutationsrate bei MII und MII Δicd 7 bp festzustellen. Analog zu den Beobachtungen von MACIAG *et al.* wurde eine reduzierte Mutationsrate bei MII Δicd 7 bp pHPMP03-06 erwartet.

Abbildung 4-22 zeigt das Ergebnis der Mutationsratenbestimmung bei 30°C und 128 µg/ml. Das MIIQ-Allel verhielt sich dominant in Ansätzen mit *icd*-Deletion. Bei 128 µg/ml war eine leichte Steigerung der Mutationsrate in MII zu sehen. Ein Effekt durch Δicd 7 bp war schwach, da die Mutationsrate trotz Deletion im Bereich von 10^{-5} lag. Die Mutationsrate in MII lag im gleichen Bereich wie bei MII Δicd 7 bp. Bei Selektion auf Rifampicin ging von Δicd 7 bp allein in MII Δicd 7 bp pHPMP03-05 keine Zunahme der Mutationsrate aus. Der Einfluss von Δicd 7 bp auf die Mutationsrate wird in Abschnitt 5.4.1 diskutiert.

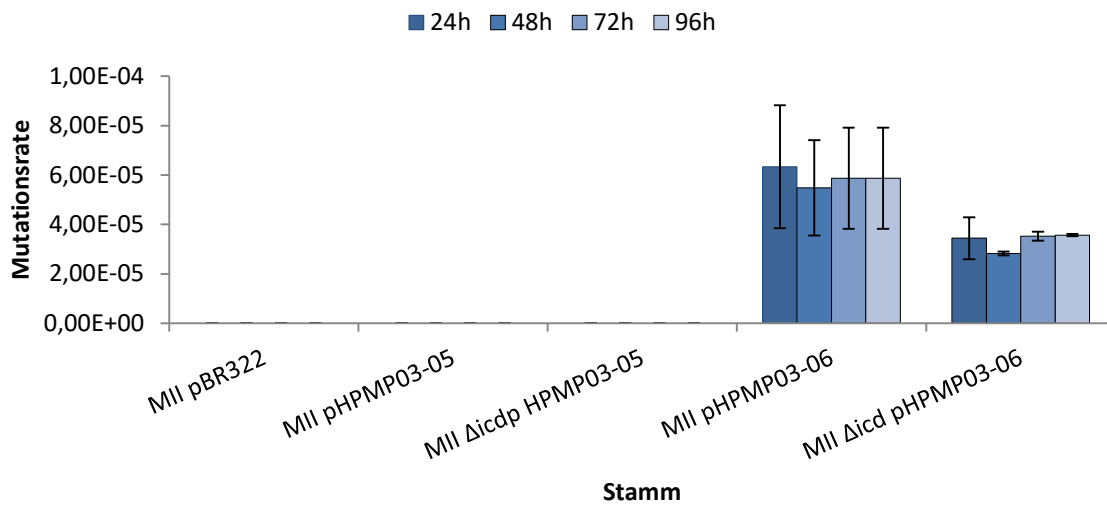


Abbildung 4-22 Ergebnisse des Rifampicin-Forwardassays (128 µg/ml) für MII und MII Δicd 7 bp

Die Mutationsrate wurde bei 30°C und mit Rifampicin (128µg/ml) nach 24 h, 48 h, 72 h und 96 h ermittelt. pHPME03-05 enthält *dnaQ* aus MII, pHPME03-06 enthält *dnaQ* aus MIIQ [27]

4.6.4 Einfluss verschiedener Qnr-Varianten

E. coli-Stamm MII Δicd 7 bp pHPNE19-02.1 war eine selektierte Mutante, die durch die Kombination von QnrA1 und Δicd 7 bp eine höhere MHK von Fluorchinolonen im Vergleich zum Ausgangsstamm MII pHPNE19-02.1 besaß. Aus den bisherigen Erkenntnissen stellte sich die Frage, ob sich erhöhte MHKs von Fluorchinolonen auch mit anderen Qnr-Varianten (Tabelle 4-25) in Kombination mit Δicd 7 bp ermitteln ließen.

Tabelle 4-25 Verwendete Qnr-Varianten und die dazugehörigen Vektoren

Qnr	Vektor	Klonierungsvektor
QnrA1	pHPNE19-02.1	pCU19
QnrB1	pHPNE18-01.1	pUC18
QnrC	pHPPH19-02.1	pUC19
QnrD	pHPPH19-01.1	pUC19
QnrS1	pHPNE19-03.1	pUC19

E. coli-Stamm MII Δicd 7 bp wurde per Plasmid-Curing (Abschnitt 2.2.1.11) aus MII Δicd 7 bp pHPNE19-02.1 gewonnen und mit *qnr*-Vektoren transformiert, welche aus den Arbeiten von Dr. N. HILSBURG-EMRICH [18] und von M.Sc. HEBEL (2012) stammten (Abbildung 4-23).

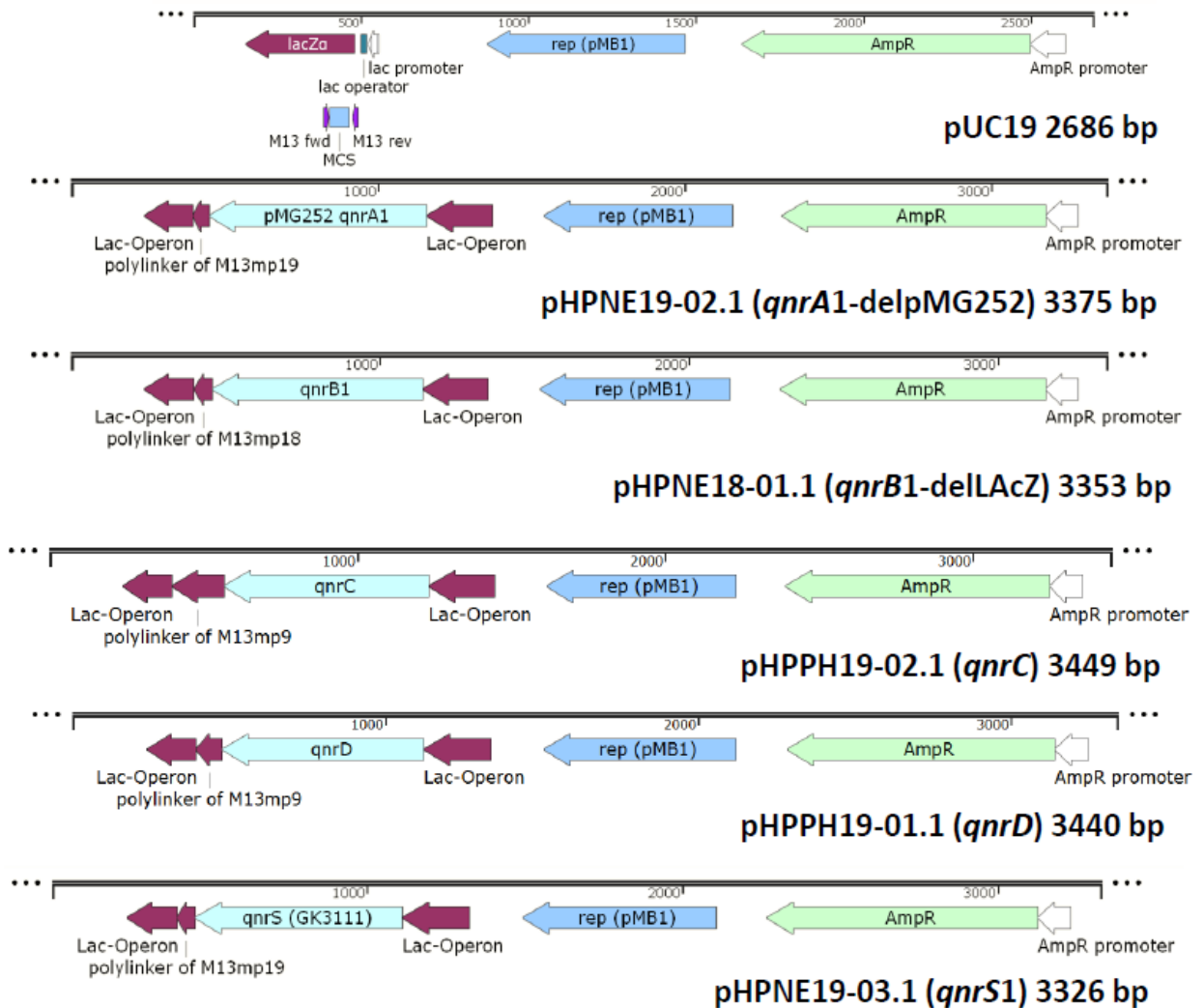


Abbildung 4-23 pUC19 und Vektoren mit *qnr*-Genen (basierend auf pUC18/pUC19) (eigene Darstellung)

Aus den Arbeiten von Dr. N. HILSBERG-EMRICH [113] und M.Sc. PHILIPP HEBEL (2012) lagen fünf Vektoren mit unterschiedlichen *qnr*-Genen vor. In die MCS (Multiple Cloning Site) wurden die *qnr*-Gene kloniert. Zum Vergleich ist pUC19 mitabgebildet.

4.6.4.1 MHK von Fluorchinolonen für WT mit verschiedenen Qnr-Varianten

In Abbildung 4-24 ist die MHK von Ciprofloxacin für *E. coli* WT mit verschiedenen Qnr-Plasmiden gezeigt. Bei der Anzucht und für die Bestimmung der MHK wurde auf eine Induktion durch IPTG verzichtet, da dies in vorangegangenen Versuchen keinerlei Auswirkung auf den MHK-Phänotyp hatte (vergleiche Abschnitt 3.1.3.3). Den größten Zuwachs der MHK von Ciprofloxacin machen QnrA1 und QnrS1 aus. Bei QnrB1 und QnrC befanden sich die MHK auf gleichem Niveau. Verglichen mit WT war eine Zunahme der MHK bei QnrA1 um 4 MHK-Stufen höher und bei QnrS1 um 5 MHK-Stufen erhöht.

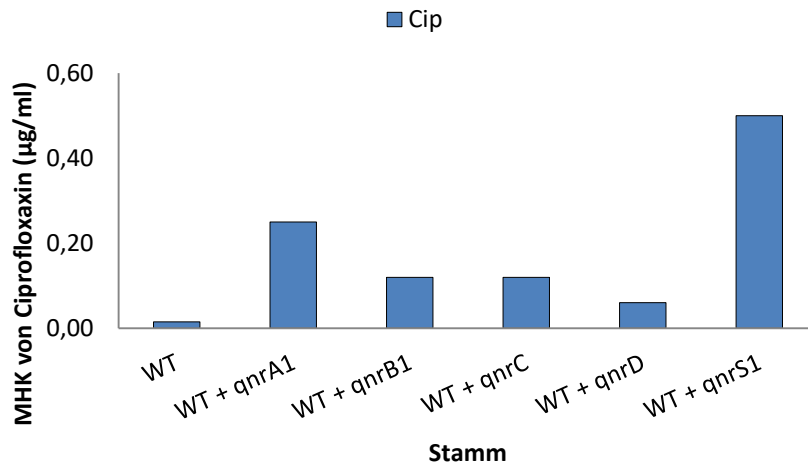


Abbildung 4-24 MHK von Ciprofloxacin für WT mit und ohne Qnr-Plasmide

qnrA1: pHPNE19-02.1; *qnrB1*: pHPNE18-01.1; *qnrC*: pHPPH19-02.1; *qnrD*: pHPPH19-01.1; *qnrS1*: pHPNE19-03.1; Cip: Ciprofloxacin

4.6.4.2 MHK von Ciprofloxacin und Norfloxacin MII und MII Δicd 7 bp mit Qnr-Plasmiden

Mit den Plasmiden aus Tabelle 4-25 wurden die MHK ermittelt. Neben den Mutationen in Typ II Topoisomerasen schien auch Δicd 7 bp die Fluorchinolon-Resistenz zu beeinflussen und die MHK von Ciprofloxacin und Norfloxacin zu erhöhen, denn sobald eine Kombination aus Δicd 7 bp und Topoisomerase-Schutzproteine Qnr vorlag, war eine Erhöhung der MHK festzustellen. Besonders deutlich war die Zunahme QnrA1 oder QnrS1. Für QnrB1, QnrC und QnrD1 ließ sich auch eine Erhöhung der MHK feststellen. Diese Qnr-Varianten vermitteln eine geringere MHK-Zunahme verglichen mit QnrA1 und QnrS1.

Verglichen mit dem jeweiligen Vergleichsstamm MII mit einem *qnr*-Gen fiel auf, dass die Zunahme der MHK durch Δicd und *qnr* bei Norfloxacin um den Faktor 3 bis 4 betrug (siehe Abbildung 4-25). Die MHK von Ciprofloxacin war verglichen mit der MHK von Norfloxacin halb so hoch. Bei QnrS1 ließ sich für MII und MII Δicd 7 bp zwischen der MHK von Norfloxacin und von Ciprofloxacin kein Unterschied feststellen.

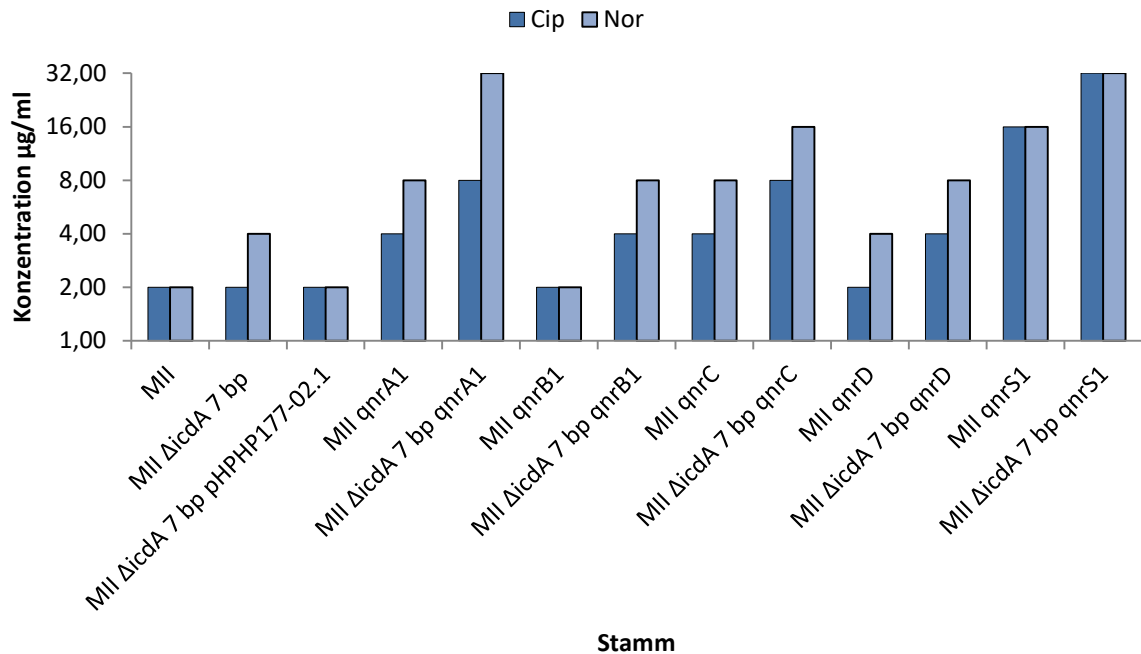


Abbildung 4-25 Ergebnisse MHK von Ciprofloxacin für MII oder MII Δ icd 7 bp nach Transformation mit verschiedenen Qnr-Plasmiden.

Cip: Ciprofloxacin; Nor: Norfloxacin. pPHP177-02.1: *icd*-WT; *qnrA1*: pHPNE19-02.1; *qnrB1*: pHPNE18-01.1; *qnrC*: pHPH19-02.1; *qnrD*: pHPH19-01.1; *qnrS1*: pHPNE19-03.1

4.6.4.3 Untersuchungen an weiteren Mutanten mit verschiedenen Qnr-Varianten

Analog zum Vorgehen bei MII Δ icd 7 bp pHPNE19-02.1 (Abschnitt 4.6.4.1 und Abschnitt 4.6.4.2) wurden vier weitere Mutanten gewählt (Tabelle 4-26), und nach drei Passagen auf antibiotikafreien LB-Agarplatten konnte für diese Stämme kein Wachstum auf Ampicillin-LB-Agarplatten festgestellt werden (*Plasmid-curing*; Abschnitt 2.2.1.11).

Tabelle 4-26 Weitere Mutanten aus Selektionsversuchen

<i>E. coli</i> -Stamm	MHK Ciprofloxacin (µg/ml)
MII pHPNE19-02.1 Nr. II 21	16
MII pHPNE19-02.1 Nr. III 13	16
MII pHPNE18-01.1 Nr. II 18	4
MII pHPNE18-01.1 Nr. III 27	8

Für die verwendeten Mutanten lag kein sequenziertes Genom vor. Jedoch war bekannt, dass sich in der QRDR keine zusätzliche Mutation befand (Abschnitt 4.4.2.2). Bei MII pHPNE18-01.1 Nr. II 18 wurde ein Fehlen von *icd* vermutet (siehe hierzu Abschnitt 4.5.2.2). Diese Stämme

wurden mit den Plasmiden aus Tabelle 4-25 transformiert. Teilweise lagen Kombinationen bereits aus den Ciprofloxacin-Forward-Assays vor (Abschnitt 4.3).

Nach Transformation der Mutanten mit den Qnr-Plasmiden (Tabelle 4-25 und Abbildung 4-23) wurden die MHK von Ciprofloxacin und Norfloxacin per Mikrodilutionsverfahren ermittelt (Abschnitt 2.2.1.12.1). Zur Anzucht wurde Ampicillin zugegeben (Abschnitt 4.3.2). Auf eine Induktion mit IPTG wurde verzichtet (vergleiche Abschnitt 4.1). Die Zunahme der MHK von Ciprofloxacin und Norfloxacin war bei QnrA1 (pHPNE19-02.1) und QnrS1 (pHPNE19-03.1) am größten. Bei QnrB1, QnrC und QnrD war die MHK-Zunahme vergleichbar. (Tabelle 4-27 und Tabelle 4-28).

Tabelle 4-27 MHK von Ciprofloxacin verschiedene MII-Mutanten.

MHK in $\mu\text{g/ml}$; A: pHPNE19-02.1 (*qnrA1*); B: pHPNE18-01.1 (*qnrB1*); mit Blau unterlegt sind die Kombinationen, die nach dem Selektionsversuch vorlagen und hier war der Ausgangspunkt für das Plasmid Curing; für Vektoren mit Qnr siehe Tabelle 4-25.

Stamm	MHK Ciprofloxacin ($\mu\text{g/ml}$)						
	no vector	pUC19	QnrA1	QnrB1	QnrC	QnrD	QnrS1
WT	0,015	0,015	0,25	0,125	0,125	0,03	0,5
MII	2	2	4	2	2	1	8
MII A Nr. I 43	2	2	16	8	8	4	16
MII A Nr. II 21	2	2	16	2	2	1	16
MII A Nr. III 13	2	2	16	2	2	2	16
MII B Nr. II 18	2	2	4	4	2	2	16
MII B Nr. III 27	2	2	8	8	2	2	8

Tabelle 4-28 MHK von Norfloxacin bei versch. MII-Mutanten.

MHK in $\mu\text{g/ml}$; mit Blau unterlegt sind die Kombinationen, die nach dem Selektionsversuch vorlagen und hier war der Ausgangspunkt für das Plasmid Curing; für Vektoren mit Qnr siehe Tabelle 4-25.

Stamm	MHK Norfloxacin ($\mu\text{g/ml}$)						
	no vector	pUC19	QnrA1	QnrB1	QnrC	QnrD	QnrS1
WT	0,064	0,064	1	0,25	2	0,125	1
MII	2	2	4	4	8	4	16
MII A Nr. I 43	4	4	32	8	8	8	32
MII A Nr. II 21	2	2	32	4	8	4	16
MII A Nr. III 13	2	2	16	4	8	4	32
MII B Nr. II 18	2	2	8	8	8	4	16
MII B Nr. III 27	2	2	8	8	8	4	16

4.6.5 Δicd 7 bp in *E. coli*-Stamm WT und *E. coli*-Stamm MII

Mit den bisherigen Ergebnissen aus Abschnitt 4.6 kam die Vermutung auf, dass Δicd 7 bp einen Einfluß auf die Antibiotikaresistenz hat. Die Deletion von 7 bp in *icd* an Basenpaarposition +818 bis +824 führte zu einem Frameshift, der in einem frühzeitigen Stoppcodon an Aminosäureposition +278 resultierte. Diese Deletion führte in Stamm MII in Kombination mit *qnrA1* (pHPNE19-02.1) zu einer geringeren Empfindlichkeit gegenüber Fluorchinolonen. Die MHK von Ciprofloxacin für MII Δicd 7 bp pHPNE19-02.1 lag bei 8 µg/ml. Die Zweitschritt-Mutante *E. coli* MII stammte von einem Wildtyp-Isolat nach Selektionsschritten mit Nalidixinsäure und Ciprofloxacin ab (Abschnitt 1.10.1) [167]. Für weitere Untersuchungen zum Einfluss von Δicd auf die Ausbildung einer Fluorchinolon-Resistenz war es notwendig die 7 bp-Deletion in *icd* in einem zu MII isogenen Stammhintergrund isoliert von den Einflüssen einer *gyrA*-Mutation und einer *marR*-Deletion zu betrachten. Ziel des Versuchs war daher das intakte *icd*-Allel in WT durch das Δicd 7 bp Allel aus MII Δicd 7 bp pHPNE19-02.1 (AI43) mittels ortsspezifischer Mutagenese (siehe Kapitel 2.2.2.9.2) chromosomal zu ersetzen.

4.6.5.1 Ortsspezifische Mutagenese in WT

Nach ortsspezifischer Mutagenese in WT sollte trotz veränderter *icd*-Sequenz der Open-Reading-Frame der Umgebung erhalten bleiben.

4.6.5.1.1 Vorversuch

Vor erfolgreicher Einführung einer positiven ortsspezifischen Mutagenese durch die *Gene Doctoring*-Methode [183], wurde zuerst die Methode nach DATSENKO und WANNER ausprobiert [182], die zu keinem positiven Ergebnis führte. In diesem Abschnitt werden kurz der erste Lösungsansatz und der anschließende Strategiewechsel erläutert.

Mittels SOEing (siehe Abschnitt 2.2.2.9) wurde ein lineares DNA-Fragment erzeugt, mit dem der Stamm WT transformiert wurde. Unter Ausnutzung des λ -Red Rekombinationssystems sollte das Fragment in das Bakterienchromosom integriert werden (vergleiche 2.2.2.9.2.1). Eine Ortsspezifität der Rekombination sollte durch homologe DNA-Bereiche erfolgen. Das verwendete DNA-Fragment war 2547 bp lang und wurde aus drei Einzelfragmenten mittels SOEing in einem Amplifikations-Schritt hergestellt. Als Konstruktionsgrundlage wurden die Da-

ten aus der Genomsequenzierung von *E. coli* MII Δcd 7 bp pHPNE19-02.1 verwendet (Abschnitt 4.5) und mit Sequenzdaten aus *E. coli* CFT073 ergänzt. Über einen einzigen Schritt sollte durch Ausnutzung von zwei SOEing-Amplicons ein großes Fragment generiert werden (Abbildung 4-26). Die Strategie war ein mittleres Fragment am 5'-Ende mit einem Fragment zu verknüpfen und parallel am 3'-Ende des mittleren Fragments ein weiteres Fragment anzuknüpfen. Nach wiederholter Durchführung wurden keine Mutanten erhalten, die auf Kanamycin wuchsen. Als Ursache wurde vermutet, dass das falsche SOEing-Amplicon isoliert worden war, und damit weitergearbeitet wurde. Mittels Restriktionsverdau wurde jedoch das verwendete Fragment als gewünschtes Amplicon identifiziert.

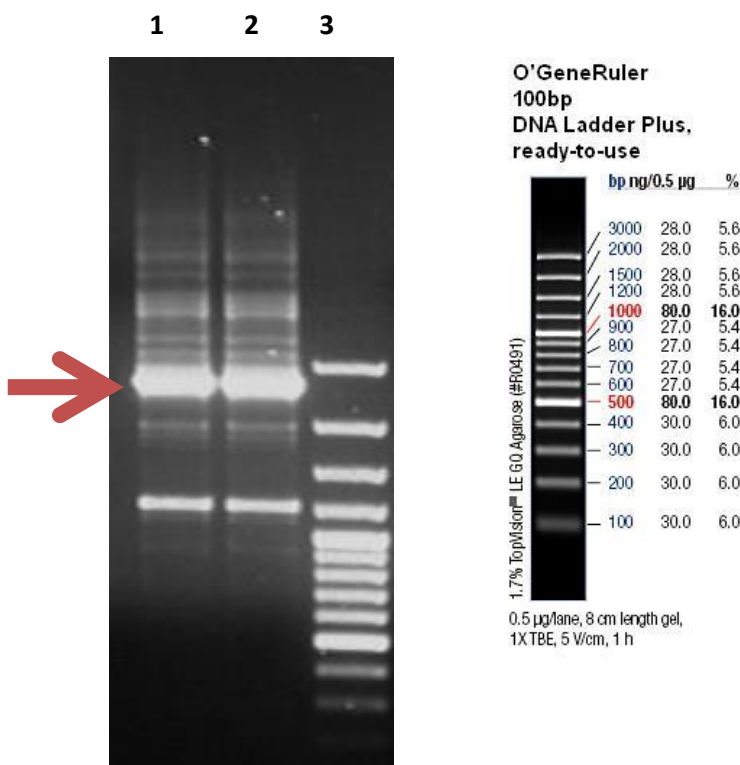


Abbildung 4-26 Ergebnis Gelelektrophorese der SOEing-PCR mit drei Fragmenten

TAE-Agarosegel, 1,0%, 1-fach E-Puffer, 120 V; Ethidiumbromidfärbung; jeweils 3 µl aufgetragen; Spur 1 und 2 zeigen zwei parallele Ansätze SOEing-Fragment; Spur 3: DNA-Größenmarker

In Abbildung 4-26 ist das vermeintliche Amplicon der SOEing-PCR auf einem Agarose-Gel hervorgehoben (Pfeil). Mehrere Banden erschwerten die Isolierung des richtigen Produkts aus dem Agarosegel. Trotz Bemühungen die PCR-Bedingungen so zu optimieren, dass nur eine einzige Produktbande nach Auftrennung in der Agarose-Gelelektrophorese zu sehen war, waren wiederholt mehrere Banden, bzw. mehrere Produkte als Ergebnis der SOEing-PCR zu finden.

4.6.5.1.2 *Gene Doctoring*

Da die Methode nach DATSENKO und WANNER [182] keinen Erfolg brachte, wurde die Methode des *Gene Doctoring*s von LEE *et al.* [183] verwendet (Abschnitt 4.6.5.1.2.1) [245]. Aus der Arbeit von DR. M. PETSCHULIES war bekannt, dass diese Methode den größten Erfolg bei Verwendung von homologen Bereichen mit mindestens 500 bp versprach [27].

4.6.5.1.2.1 *Konstruktion des Templateplasmids pPHPDOC-01.1*

Für das *Gene Doctoring* war zuerst ein Templateplasmid zu klonieren. Für die Konstruktion wurden ein 826 bp (799 bp plus Restriktionsschnittstellen) und ein 636 bp (581 bp plus Restriktionsschnittstellen) Fragment mit der Phusion®-Polymerase amplifiziert (Tabelle 4-29, Abbildung 4-27, Abbildung 4-28).

Tabelle 4-29 **Verwendete Primer für *Gene Doctoring***

Fragment	Primer
826 bp-großes Fragment zur Klonierung innerhalb der <i>multiple cloning site I</i>	icdA_5_+587_CFT073_Klonierung_pdock_HindIII icdA_3_1385_CFT073_pDocK_Klonierung_BamHI
636 bp-großes Fragment zur Klonierung innerhalb der <i>multiple cloning site II</i>	icdA_5_+1386_CFT073_pDocK_Klonierung_XhoI icdA_3_1966_CFT073_pDocK_Klonierung_NheI

Das größere Fragment (826 bp) wurde nach Restriktion mit *EcoRI* (FastDigest) und *BamHI* (FastDigest) nach der in Abschnitt 2.2.2.2 beschriebenen Methode gereinigt, und mit dem mit *EcoRI* und *BamHI* geschnittenen Vektor pDOC-K ligiert [183]. Durch die MCS I (*multiple cloning site I*) besaß pDOC-K die gewünschten Schnittstellen für die Klonierung. Nach erfolgreicher Transformation von JM109 mittels Elektroporation (gemäß Abschnitt 2.2.1.10) und Identifikation durch Ausstreichen auf Ampicillin-LB-Agar und mittels Restriktionsverdau, wurde der neue Vektor mit *NheI* und *XhoI* geschnitten. Gleichzeitig wurde das kleinere Fragment (636 bp) mit *NheI* und *XhoI* geschnitten. Nach der Restriktion wurden der linearisierte Vektor und das Fragment miteinander ligiert, und JM109 wurde mit dem nun klonierten Vektor pPHPDOC-01.1 (Abbildung 4-31) transformiert. Nach Ausstreichen auf LB-Ampicillin-Agar und Plasmidisolierung, wurde mittels Restriktionsverdau das Plasmid identifiziert. Durch die Verwendung von jeweils zwei Restriktionsenzymen war die Richtung des eingebauten Inserts vorgegeben (Abbildung 4-29). Nach erfolgreicher Klonierung wurde der *E. coli*-Stamm WT (GK571) mit pPHPDOC-01.1 und pACBSCE transformiert.

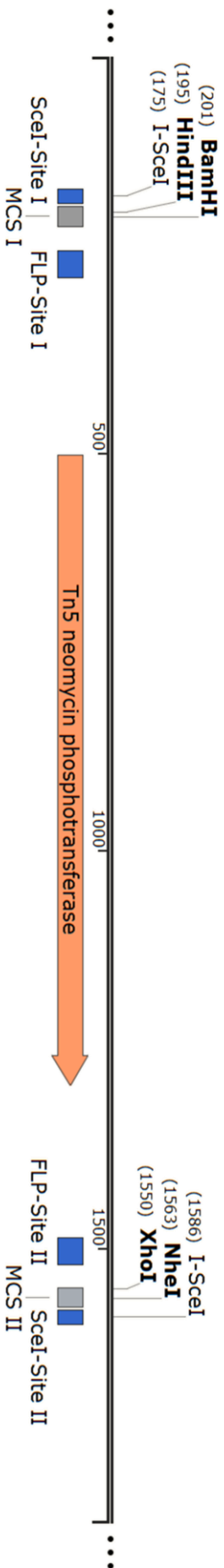


Abbildung 4-27 Ausschnitt Vektorkarte pDOC-K (eigene Darstellung)

Zu sehen sind die Restriktionsschnittstellen für *HindIII*, *BamHI*, *NheI* und *XhoI*. Die Meganuclease I-SceI schneidet *in vivo* innerhalb der I-SceI-Erkennungssequenzen aus pDOC-K ein lineares Fragment aus.

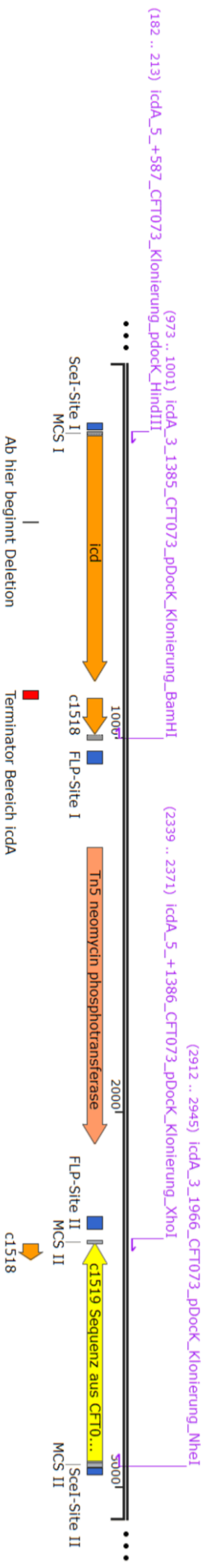


Abbildung 4-28 Ausschnitt Vektorkarte pPHPDOC-01.1 (eigene Darstellung)

Zu sehen mit den verwendeten Primern zur Amplifikation der beiden Inserts.

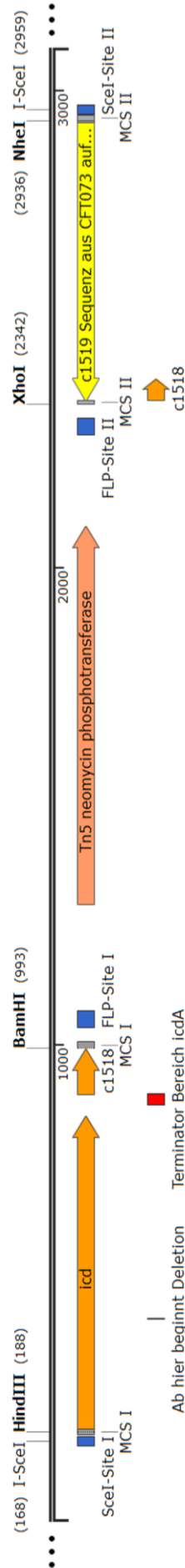


Abbildung 4-29 Ausschnitt Vektorkarte pPHPDOC-01.1 (eigene Darstellung)

Innerhalb der MCS I konnte mit *HindIII* und *BamHI* ein Fragment in pDOC-K hinter der I-SceI-Site I kloniert werden. Mit *XhoI* und *NheI* wurde innerhalb der MCS II ein weiteres Fragment in pDOC-K kloniert. Der resultierende Vektor wurde nach beiden Klonierungen als pPHPDOC-01.1 bezeichnet. Die Flippase-Erkennungssequenzen (FLP-Site I und FLP-Site II) und die Meganuclease-Restriktionsschnittstellen (SceI-Site I und Sce-Site II) blieben nach der Klonierung unverändert. Nach Insertion sind jeweils zwei Reste der MCS zu erkennen (MCS I und MCS II).

Das *Gene Doctoring* wurde zur homologen Rekombination bei *E. coli* WT (GK571) durchgeführt. Zuerst wurde der Stamm mit dem Rekombinationsplasmid pACBSCE transformiert (gemäß Abschnitt 2.2.2.9.2.2). Mit pPHPDOC-01.1 wurde anschließend per Elektroporation WT pACBSCE transformiert. Nach Induktion bei WT pACBSCE pPHPDOC-01.1 wurden Saccharose-unempfindliche Kolonien auf frische LB-Kanamycin-Agarplatten überimpft (n=36). Durch die Verwendung von zwei homologen Bereichen, die jeweils länger als 500 bp waren, konnte die Zahl an positiven Rekombinanten gesteigert werden, und die Zahl an zu kontrollierenden Kolonien fiel niedrig aus im Vergleich zu anderen Methoden.

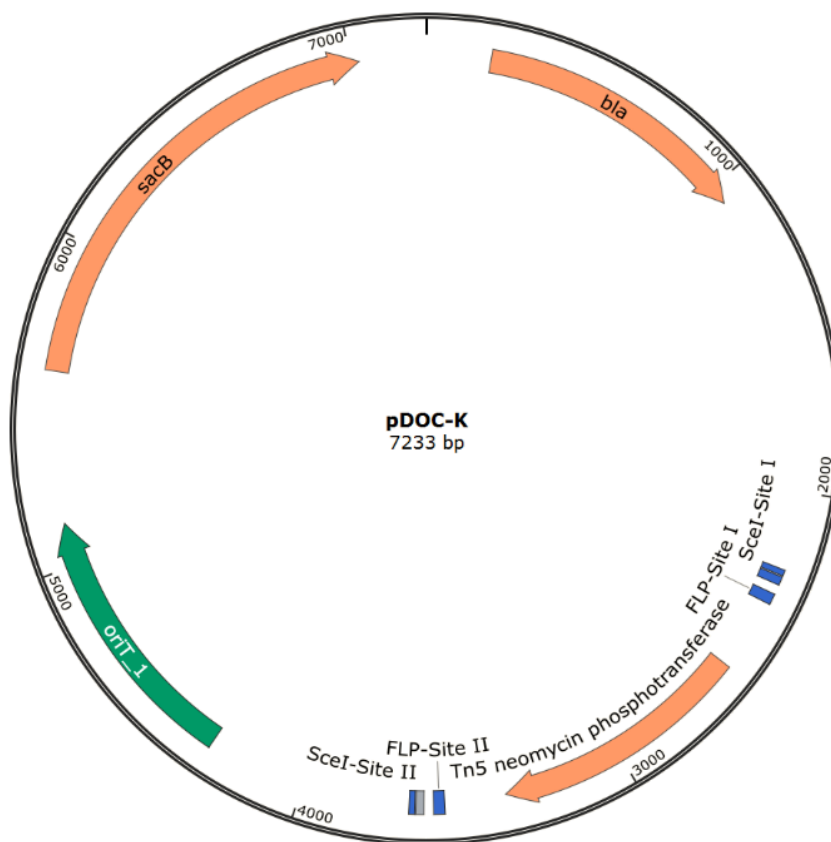


Abbildung 4-30 Vektorkarte von pDOC-K (eigene Darstellung)

Zu sehen sind die Schnittstellen für die Meganuclease I-SceI (Sce-Site I und Sce-Site II) und die jeweiligen Flippase-Erkennungsregionen (FLP-Site I und FLP-Site II).

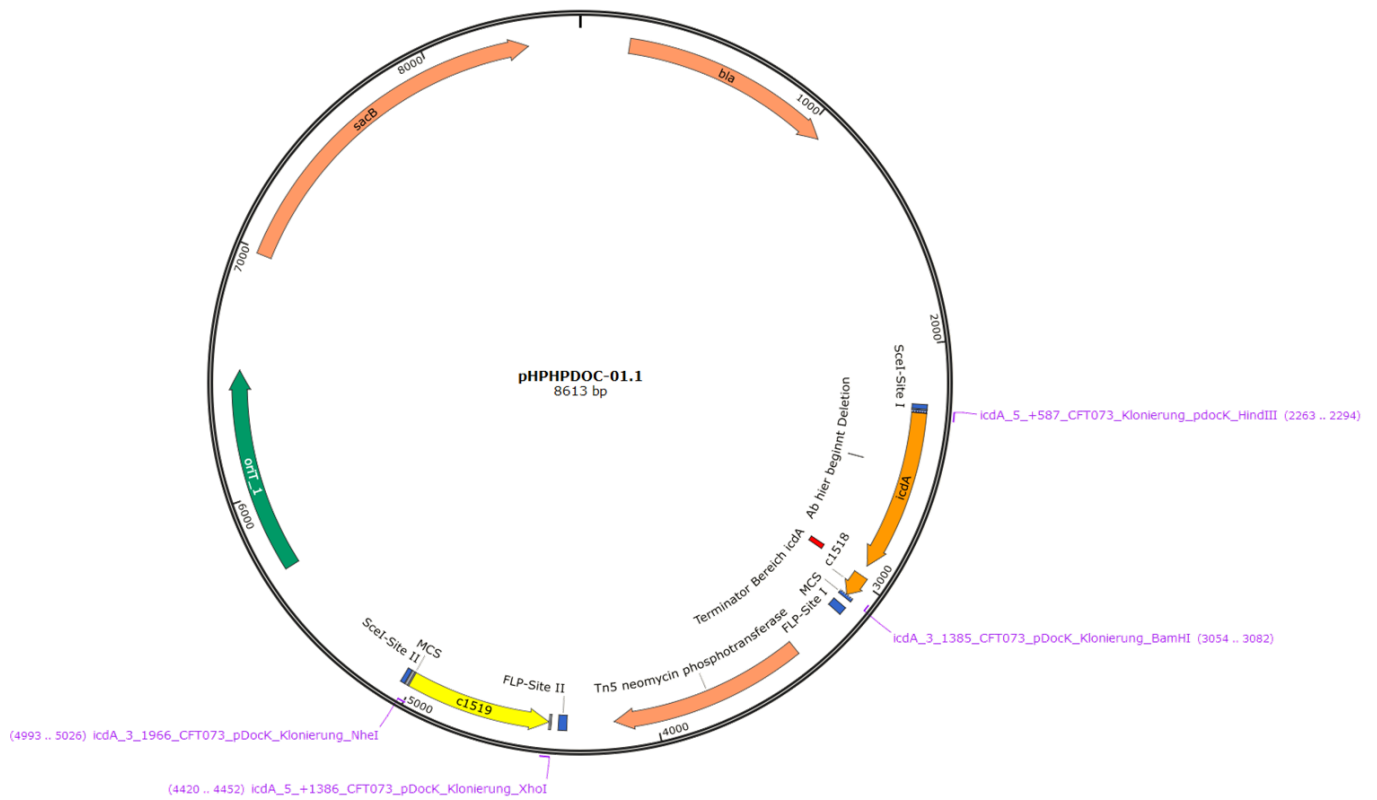


Abbildung 4-31 Vektorkarte pPHPDOC-01.1 (eigene Darstellung)

Neben dem Vektor sind die verwendeten Primer und die jeweilige Position zu sehen. Die Inserts (gelb und orange) wurden nach Restriktion durch die Meganuclease I-SceI eingefügt.

4.6.5.1.3 Screening nach positiven Rekombinanten

Beim Betrachten der erhaltenen Kolonien nach 18 h wurden phänotypisch zwei Morphologien deutlich. Neben Kolonien mit der dem *E. coli*-Stamm WT ähnelnden Morphologie, waren kleinere, „stecknadelkopfgroße“ Kolonien zu finden. 18 große Kolonien und 18 kleine Kolonien wurden überimpft.

Zur schnellen Überprüfung der Rekombinanten, bzw. auf Δicd 7 bp, wurde eine ARMS-PCR (Abschnitt 0) mit den Primern *icd*_[5-1]_+491_CFT073 fw 2 und *icd*_[3-1]_+353_CFT073 rv 2a (+838!) durchgeführt. Bei Ausbleiben eines PCR-Produkts war sichergestellt, dass eine Deletion in *icd* vorlag. In Abbildung 4-32 sind die Ergebnisse der Untersuchung von 16 Kolonien zu sehen. Als Negativkontrolle diente MII Δicd 7 bp und als Positivkontrolle wurde MII verwendet. In den Spuren 6 bis 17 wurden ausschließlich Produkte aufgetragen, die mit DNA aus kleinen Kolonien erzeugt wurden. Hier waren keine Banden zu sehen, was auf eine Deletion in *icd* hinwies. Zur endgültigen Aussage wurde eine Sequenzierung durchgeführt.

Ein fehlendes Produkt nach Amplifikation konnte auch auf einen Fehler bei der Vorbereitung der Amplifikation hindeuten. Zur weiteren Kontrolle wurde eine PCR zum Vorliegen von *marR* durchgeführt, um sicherzustellen, dass die verwendete DNA intakt war, wurde mit Produkten aus *E. coli* WT und *E. coli* MII verglichen. Mit den Primern *marR*_+7_for und *marA*_+42_rev wurde ein Amplicon mit einer Länge von 484 bp für WT und ein Amplicon mit 309 bp Länge für MII und MII-Derivate generiert. Das Ergebnis zur anschließenden Agarose-Gelelektrophorese ist in Abbildung 4-33 zu sehen. Es sind nicht alle untersuchten Proben abgebildet, da bei allen Proben als Ergebnis eine Bande auf Höhe von *marR* aus dem Wildtyp zu sehen war. Für alle Kolonien, die eine kleine Morphologie aufwiesen, wurde eine Deletion in *icd* gefunden, und das Amplicon für *marR* zeigte die für *E. coli* WT erwartete Länge.

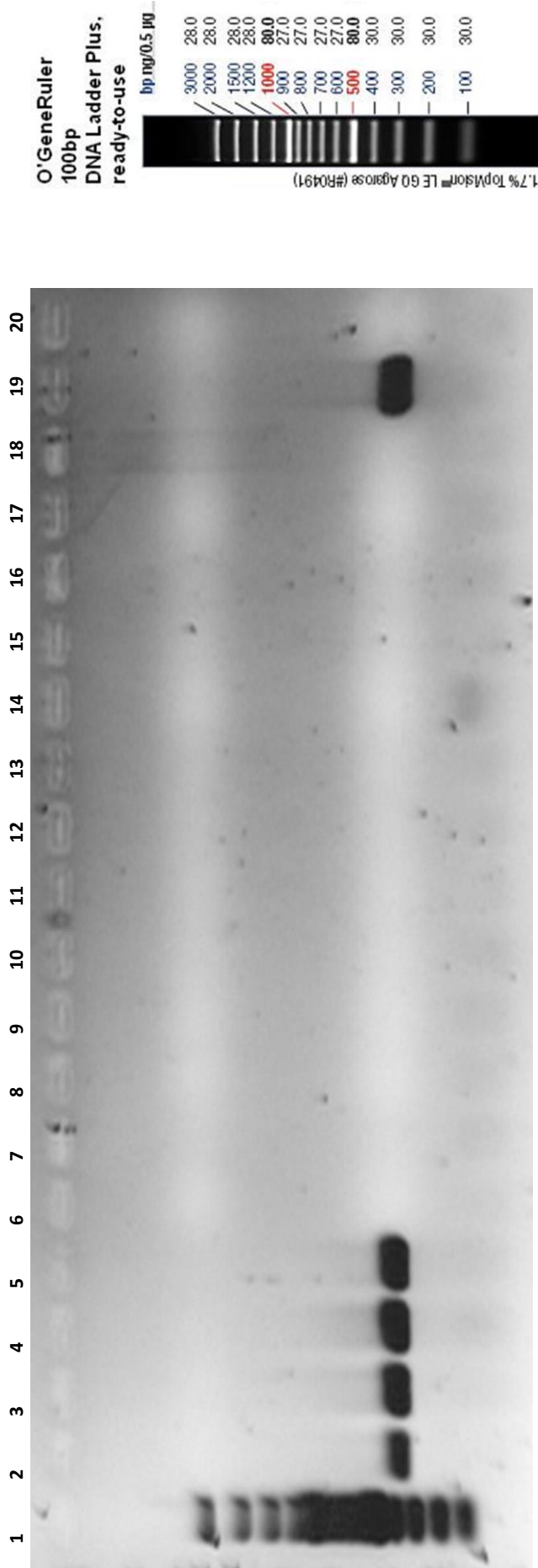


Abbildung 4-32 Agarosegelelektrophorese mit Produkten einer *icd* ARMS-PCR, Farben invertiert

In jeder Tasche wurden je 5 µl aufgetragen. Auch wurde vom Größenmarker 5 µl aufgetragen. ARMS-PCR zur Identifikation einer 7 bp Deletion in *icd* nach durchgeführtem *Gene Doctoring*.

TAE-Agarosegel, 1,0%, 1-fach E-Puffer, 100 V; Ethidiumbromidfärbung

Spur 1: DNA-Größenmarker; Spur 2: III9; Spur 3: III10; Spur 4: III11; Spur 5: III12; Spur 6: IV7; Spur 7: IV8; Spur 8: IV9; Spur 9: IV10; Spur 10: IV11;

Spur 11: IV12; Spur 12: IV13; Spur 13: IV14; Spur 14: IV15; Spur 15: IV16; Spur 16: IV17; Spur 17: IV18; Spur 18: MIIIΔ (Negativkontrolle);

Spur 19: MII (Positivkontrolle); Spur 20: NTC; Spuren 2 bis 5: große Kolonien; Spuren 6 bis 17: kleine Kolonien

Die abschließende Kontrolle, ob Δicd 7 bp an der richtigen Stelle eingeführt wurde, lieferte die SANGER-Sequenzierung. Hierzu wurden die Übergänge sequenziert, die die homologen Sequenzabschnitte enthielten. In Abbildung 4-34 ist eine Übersicht des Sequenzabschnittes zu sehen. Tabelle 4-30 zeigt den vorderen Bereich und Tabelle 4-31 den hinteren homologen Bereich im Detail. Für die Sequenzierung wurde von sechs Rekombinanten, die morphologisch kleine Kolonien zeigten, DNA für die Sequenzierung aufbereitet (Abschnitt 2.2.2.7.1). Für die Sequenzierung des Übergangs in der *icd*-Region wurden die Primer *icd_5-1_+491_CFT073* und *icd_3-1_+934_CFT073* genutzt. Zur Sequenzierung des Übergangs am 3'-Ende wurden die Primer *icd_fw_3131_CFT073* und *icd_rv_3583_CFT073* benutzt

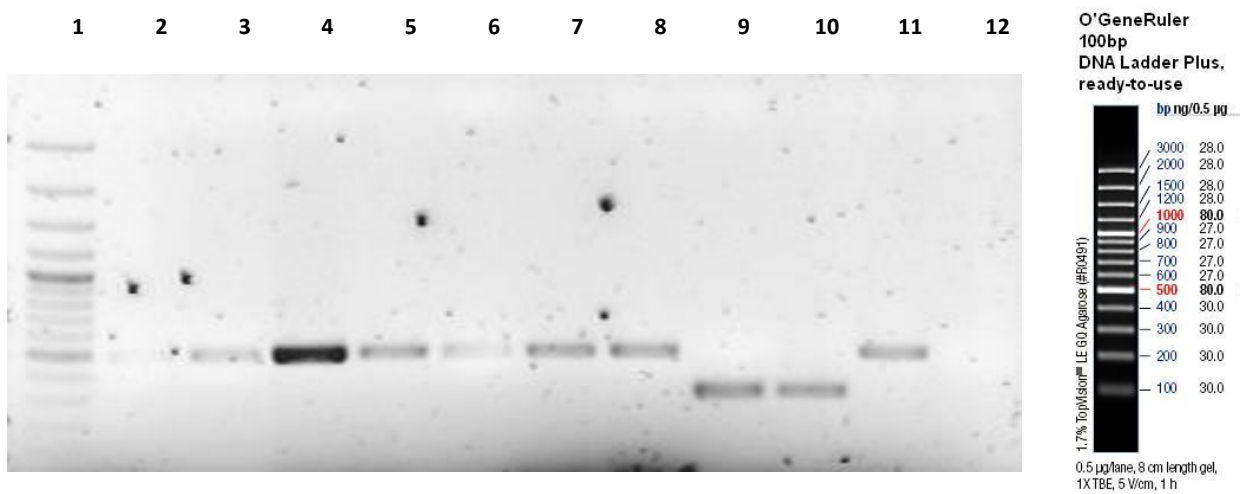


Abbildung 4-33 UV-Aufnahme einer Agarosegelelektrophorese zum Nachweis einer *marR*-Deletion

Aufgetragene DNA Spuren 2 bis 12 je 5 μ l. Vom DNA-Größenmarker wurden nur 2 μ l aufgetragen.

TAE-Agarosegel, 1,0%, 1-fach E-Puffer, 100 V; Ethidiumbromidfärbung

Spur 1: DNA-Größenmarker; Spur 2: IV12; Spur 3: IV13; Spur 4: IV14; Spur 5: IV15; Spur 6: IV16;

Spur 7: IV17; Spur 8: IV18; Spur 9: MII Δ ; Spur 10: MII; Spur 11: WT; Spur 12: NTC

Tabelle 4-30 und Tabelle 4-31 zeigen, dass bei allen untersuchten Rekombinanten die Übergänge nach homologer Rekombination korrekt aussehen, und bestätigen die vorigen Ergebnisse. Als Dauerkultur wurden die Rekombinanten *E. coli* WT Δicd 7 bp Nr. IV 7 und Nr. IV 15 gesichert (Abschnitt 2.2.1.3).

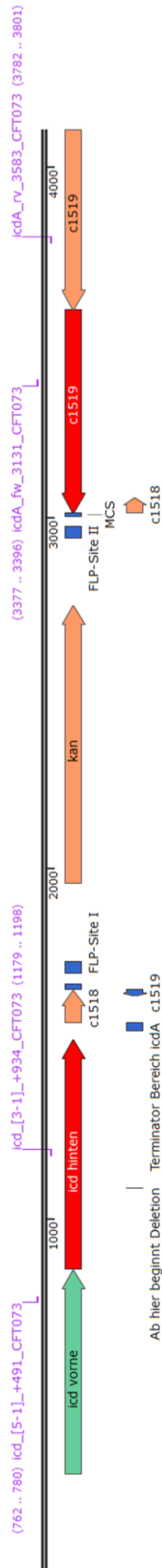


Abbildung 4-34 WT Δicd 7 bp mit KanR nach Gene Doctoring (eigene Darstellung)

Zustand nach erfolgreicher ortsspezifischer Mutagenese; keine I-SceI Schnittstellen sind vorhanden. Nach homologer Rekombination liegen Übergänge von Inserts zu Chromosom ohne Narbensequenz vor. rot: Sequenzabschnitt von *icd* und *c1519*, die durch ortsspezifische Mutagenese eingeführt wurden.

Tabelle 4-30 Sequenzalignment des Übergangs in 5'-Richtung vor der Kanamycin-Resistenzkassette nach Homologer Rekombination durch das Gene Doctoring

Zu sehen ist die 7 bp-Deletion bei den Rekombinanten. CFT073 *icd*: Referenzsequenz aus CFT073, WT delta: E.coli WT Beispielsequenz. Im Falle einer erfolgreichen Rekombination; II25, II26, IV7, IV15, IV16 interne Bezeichnung von Rekombinanten

CFT073 <i>icd</i>	(530)	AATTCCTTGGCGTGAAGAAGATGGGCGGTGAAGAAATTCGCTTCCCGGAACATTCGGGTAATCGGTAATTAAGCCGCTTCCGGAAGAAAGGCAACCAAAACGTCTGGT	1	100
WT delta	(801)	AATTCCTTGGCGTGAAGAAGATGGGCGGTGAAGAAATTCGCTTCCCGGAACATTCGGGTAATCGGTAATTAAGCCGCTTCCGGAAGAAAGGCAACCAAAACGTCTGGT		
II25	(1)	-----CCTGGCGTGAAGAAGATGGGCGGTGAAGAAATTCGCTTCCCGGAACATTCGGGTAATCGGTAATTAAGCCGCTTCCGGAAGAAAGGCAACCAAAACGTCTGGT		
II26	(1)	-----CCTGGCGTGAAGAAGATGGGCGGTGAAGAAATTCGCTTCCCGGAACATTCGGGTAATCGGTAATTAAGCCGCTTCCGGAAGAAAGGCAACCAAAACGTCTGGT		
IV7	(1)	-----CCTGGCGTGAAGAAGATGGGCGGTGAAGAAATTCGCTTCCCGGAACATTCGGGTAATCGGTAATTAAGCCGCTTCCGGAAGAAAGGCAACCAAAACGTCTGGT		
IV15	(1)	-----CCTGGCGTGAAGAAGATGGGCGGTGAAGAAATTCGCTTCCCGGAACATTCGGGTAATCGGTAATTAAGCCGCTTCCGGAAGAAAGGCAACCAAAACGTCTGGT		
IV16	(1)	-----CCTGGCGTGAAGAAGATGGGCGGTGAAGAAATTCGCTTCCCGGAACATTCGGGTAATCGGTAATTAAGCCGCTTCCGGAAGAAAGGCAACCAAAACGTCTGGT		
CFT073 <i>icd</i>	(630)	TGCTGCAGCGCATCGAATACGCAATTTGCTAACGATTCGTGACTGTGACCCCTGGTTCACAAAGGCAACATCATGAAGTTCAACCGAAGGCGCGTTTAAAGAC	200	200
WT delta	(901)	TCGTCAGCGCATCGAATACGCAATTTGCTAACGATTCGTGACTGTGACCCCTGGTTCACAAAGGCAACATCATGAAGTTCAACCGAAGGCGCGTTTAAAGAC		
II25	(97)	TCGTCAGCGCATCGAATACGCAATTTGCTAACGATTCGTGACTGTGACCCCTGGTTCACAAAGGCAACATCATGAAGTTCAACCGAAGGCGCGTTTAAAGAC		
II26	(97)	TCGTCAGCGCATCGAATACGCAATTTGCTAACGATTCGTGACTGTGACCCCTGGTTCACAAAGGCAACATCATGAAGTTCAACCGAAGGCGCGTTTAAAGAC		
IV7	(97)	TCGTCAGCGCATCGAATACGCAATTTGCTAACGATTCGTGACTGTGACCCCTGGTTCACAAAGGCAACATCATGAAGTTCAACCGAAGGCGCGTTTAAAGAC		
IV15	(97)	TCGTCAGCGCATCGAATACGCAATTTGCTAACGATTCGTGACTGTGACCCCTGGTTCACAAAGGCAACATCATGAAGTTCAACCGAAGGCGCGTTTAAAGAC		
IV16	(97)	TCGTCAGCGCATCGAATACGCAATTTGCTAACGATTCGTGACTGTGACCCCTGGTTCACAAAGGCAACATCATGAAGTTCAACCGAAGGCGCGTTTAAAGAC		
CFT073 <i>icd</i>	(730)	TGGGGCTAACCACTTGGCGCGTGAAGAATTTGGCGGTGAACCTGATCGACGGCGCCCGCTGGCTGAAGAAAGTTAAAAACCCGAAATACCGGCAAAAGATCGTCA	201	300
WT delta	(1001)	TGGGGCTAACCACTTGGCGCGTGAAGAATTTGGCGGTGAACCTGATCGACGGCGCCCGCTGGCTGAAGAAAGTTAAAAACCCGAAATACCGGCAAAAGATCGTCA		
II25	(197)	TGGGGCTAACCACTTGGCGCGTGAAGAATTTGGCGGTGAACCTGATCGACGGCGCCCGCTGGCTGAAGAAAGTTAAAAACCCGAAATACCGGCAAAAGATCGTCA		
II26	(197)	TGGGGCTAACCACTTGGCGCGTGAAGAATTTGGCGGTGAACCTGATCGACGGCGCCCGCTGGCTGAAGAAAGTTAAAAACCCGAAATACCGGCAAAAGATCGTCA		
IV7	(197)	TGGGGCTAACCACTTGGCGCGTGAAGAATTTGGCGGTGAACCTGATCGACGGCGCCCGCTGGCTGAAGAAAGTTAAAAACCCGAAATACCGGCAAAAGATCGTCA		
IV15	(197)	TGGGGCTAACCACTTGGCGCGTGAAGAATTTGGCGGTGAACCTGATCGACGGCGCCCGCTGGCTGAAGAAAGTTAAAAACCCGAAATACCGGCAAAAGATCGTCA		
IV16	(197)	TGGGGCTAACCACTTGGCGCGTGAAGAATTTGGCGGTGAACCTGATCGACGGCGCCCGCTGGCTGAAGAAAGTTAAAAACCCGAAATACCGGCAAAAGATCGTCA		
CFT073 <i>icd</i>	(830)	TTAAAGACGTGATTTGCTGATGCAATTCCTGCAACAGATTCCTGCTCCGCTGGCTGAATATGATGTTATCGCCGTATGAACCGAATCGGCTGACTACAATTC	301	400
WT delta	(1094)	TTAAAGACGTGATTTGCTGATGCAATTCCTGCAACAGATTCCTGCTCCGCTGGCTGAATATGATGTTATCGCCGTATGAACCGAATCGGCTGACTACAATTC		
II25	(290)	TTAAAGACGTGATTTGCTGATGCAATTCCTGCAACAGATTCCTGCTCCGCTGGCTGAATATGATGTTATCGCCGTATGAACCGAATCGGCTGACTACAATTC		
II26	(290)	TTAAAGACGTGATTTGCTGATGCAATTCCTGCAACAGATTCCTGCTCCGCTGGCTGAATATGATGTTATCGCCGTATGAACCGAATCGGCTGACTACAATTC		
IV7	(290)	TTAAAGACGTGATTTGCTGATGCAATTCCTGCAACAGATTCCTGCTCCGCTGGCTGAATATGATGTTATCGCCGTATGAACCGAATCGGCTGACTACAATTC		
IV15	(290)	TTAAAGACGTGATTTGCTGATGCAATTCCTGCAACAGATTCCTGCTCCGCTGGCTGAATATGATGTTATCGCCGTATGAACCGAATCGGCTGACTACAATTC		
IV16	(290)	TTAAAGACGTGATTTGCTGATGCAATTCCTGCAACAGATTCCTGCTCCGCTGGCTGAATATGATGTTATCGCCGTATGAACCGAATCGGCTGACTACAATTC		

Tabelle 4-31 Sequenzalignment des Übergangs in 3'-Richtung nach der Kanamycin-Resistenzkassette nach Homologer Rekombination durch das Gene Doctoring.

Zu sehen ist die 7 bp-Deletion bei den Rekombinanten. CFT073 icd: Referenzsequenz aus CFT073, WT delta: *E. coli* WT Beispielsequenz. Im Falle einer erfolgreichen Rekombination; II25, II26, IV7, IV15, IV16 interne Bezeichnung von Rekombinanten.

CFT073	(3428)	3428	GCCATAACGGTTGTCACGTGACAAAGAGCAAGTAGCATCCGGCATTTTAAATAGGGCTGCCCTGCTTACGGCTCAAAATATTGCCATTTCCGGCAGT	3527
IV7	(13)		GCCATAACGGTTGTCACGTGACAAAGAGCAAGTAGCATCCGGCATTTTAAATAGGGCTGCCCTGCTTACGGCTCAAAATATTGCCATTTCCGGCAGT	
IV8	(13)		GCCATAACGGTTGTCACGTGACAAAGAGCAAGTAGCATCCGGCATTTTAAATAGGGCTGCCCTGCTTACGGCTCAAAATATTGCCATTTCCGGCAGT	
IV16	(13)		GCCATAACGGTTGTCACGTGACAAAGAGCAAGTAGCATCCGGCATTTTAAATAGGGCTGCCCTGCTTACGGCTCAAAATATTGCCATTTCCGGCAGT	
IV15	(1)		GCCATAACGGTTGTCACGTGACAAAGAGCAAGTAGCATCCGGCATTTTAAATAGGGCTGCCCTGCTTACGGCTCAAAATATTGCCATTTCCGGCAGT	
II26	(13)		GCCATAACGGTTGTCACGTGACAAAGAGCAAGTAGCATCCGGCATTTTAAATAGGGCTGCCCTGCTTACGGCTCAAAATATTGCCATTTCCGGCAGT	
II25	(13)		GCCATAACGGTTGTCACGTGACAAAGAGCAAGTAGCATCCGGCATTTTAAATAGGGCTGCCCTGCTTACGGCTCAAAATATTGCCATTTCCGGCAGT	
CFT073	(3528)	3528	GATTAATCTTTGGCGGTTTACTCGATTTCCGGGTTGTTTTGTTGCCITGGCTTAAATCTGGCGGAACATGCTCTGCCGTGTTGCTTCTTTGAAGA	3627
IV7	(113)		GATTAATCTTTGGCGGTTTACTCGATTTCCGGGTTGTTTTGTTGCCITGGCTTAAATCTGGCGGAACATGCTCTGCCGTGTTGCTTCTTTGAAGA	
IV8	(113)		GATTAATCTTTGGCGGTTTACTCGATTTCCGGGTTGTTTTGTTGCCITGGCTTAAATCTGGCGGAACATGCTCTGCCGTGTTGCTTCTTTGAAGA	
IV16	(113)		GATTAATCTTTGGCGGTTTACTCGATTTCCGGGTTGTTTTGTTGCCITGGCTTAAATCTGGCGGAACATGCTCTGCCGTGTTGCTTCTTTGAAGA	
IV15	(101)		GATTAATCTTTGGCGGTTTACTCGATTTCCGGGTTGTTTTGTTGCCITGGCTTAAATCTGGCGGAACATGCTCTGCCGTGTTGCTTCTTTGAAGA	
II26	(113)		GATTAATCTTTGGCGGTTTACTCGATTTCCGGGTTGTTTTGTTGCCITGGCTTAAATCTGGCGGAACATGCTCTGCCGTGTTGCTTCTTTGAAGA	
II25	(113)		GATTAATCTTTGGCGGTTTACTCGATTTCCGGGTTGTTTTGTTGCCITGGCTTAAATCTGGCGGAACATGCTCTGCCGTGTTGCTTCTTTGAAGA	
CFT073	(3628)	3628	CGTCCGATCAACACCAATTCACGACITTCGGCCATCCCTGTTATGACCTTCAGCCTTTACAGCATCAATTAATTTCCGGCAATCAAGTCCGGTAAATCCCTT	3727
IV7	(213)		CGTCCGATCAACACCAATTCACGACITTCGGCCATCCCTGTTATGACCTTCAGCCTTTACAGCATCAATTAATTTCCGGCAATCAAGTCCGGTAAATCCCTT	
IV8	(213)		CGTCCGATCAACACCAATTCACGACITTCGGCCATCCCTGTTATGACCTTCAGCCTTTACAGCATCAATTAATTTCCGGCAATCAAGTCCGGTAAATCCCTT	
IV16	(213)		CGTCCGATCAACACCAATTCACGACITTCGGCCATCCCTGTTATGACCTTCAGCCTTTACAGCATCAATTAATTTCCGGCAATCAAGTCCGGTAAATCCCTT	
IV15	(201)		CGTCCGATCAACACCAATTCACGACITTCGGCCATCCCTGTTATGACCTTCAGCCTTTACAGCATCAATTAATTTCCGGCAATCAAGTCCGGTAAATCCCTT	
II26	(213)		CGTCCGATCAACACCAATTCACGACITTCGGCCATCCCTGTTATGACCTTCAGCCTTTACAGCATCAATTAATTTCCGGCAATCAAGTCCGGTAAATCCCTT	
II25	(213)		CGTCCGATCAACACCAATTCACGACITTCGGCCATCCCTGTTATGACCTTCAGCCTTTACAGCATCAATTAATTTCCGGCAATCAAGTCCGGTAAATCCCTT	
CFT073	(3728)	3728	GAGGTGTTGCAATCCCAATGCTCACGGAAAAGACGAAATGGGTTTGGCTTTTCCCGATAGGAGTTGG	3795
IV7	(313)		GAGGTGTTGCAATCCCAATGCTCACGGAAAAGACGAAATGGGTTTGGCTTTTCCCGATAGGAGTTGG	
IV8	(313)		GAGGTGTTGCAATCCCAATGCTCACGGAAAAGACGAAATGGGTTTGGCTTTTCCCGATAGGAGTTGG	
IV16	(313)		GAGGTGTTGCAATCCCAATGCTCACGGAAAAGACGAAATGGGTTTGGCTTTTCCCGATAGGAGTTGG	
IV15	(301)		GAGGTGTTGCAATCCCAATGCTCACGGAAAAGACGAAATGGGTTTGGCTTTTCCCGATAGGAGTTGG	
II26	(313)		GAGGTGTTGCAATCCCAATGCTCACGGAAAAGACGAAATGGGTTTGGCTTTTCCCGATAGGAGTTGG	
II25	(313)		GAGGTGTTGCAATCCCAATGCTCACGGAAAAGACGAAATGGGTTTGGCTTTTCCCGATAGGAGTTGG	

4.6.5.2 Eigenschaften *E. coli*-Stamm WT Δicd 7 bp

Nach erfolgreicher ortsspezifischer Mutagenese in *E. coli*-Stamm WT (Abschnitt 4.6.5.1) und Bestätigung von Δicd 7 bp durch Sequenzierung, wurde der neue Stamm WT Δicd 7 bp phänotypisch charakterisiert. Neben einer Generationszeitbestimmung (Abschnitt 4.6.6) und dem Einfluss des Effluxinduktors Natriumsalicylat (Abschnitt 4.6.7.2) wurde die MHK von Fluorchinolonen (Abschnitt 4.6.5.2.1) ermittelt.

4.6.5.2.1 MHK von Fluorchinolonen für WT Δicd 7 bp

Für *E. coli* WT Δicd 7 bp wurden die MHK von Fluorchinolonen mit dem Ausgangsstamm *E. coli* WT verglichen. Als weiterer Vergleich wurden aus der KEIO-Collection die *E. coli*-K12-Stämme BW25113 und JW1122-2 betrachtet. Beide Stämme besitzen zueinander einen isogenen Stammhintergrund. JW1122-2 besitzt eine zusätzliche *icd*-Knockout-Mutation. In *E. coli*-Stamm JW1122 wurde *icd* durch homologe Rekombination gegen eine Kanamycin-Resistenzkassette ausgetauscht [179]. Diese zwei Stämme wurden analog zu *E. coli* WT und *E. coli* WT Δicd 7 bp mit den Plasmiden pUC19 und pHPNE19-02.1 [18] transformiert (gemäß Abschnitt 2.2.1.7). Die Transformanden mit pUC19 sollten zeigen, dass die MHK-Zunahme von Fluorchinolonen allein aus der Anwesenheit von QnrA1 resultierte, welches nur in Plasmid pHPNE19-02.1 codiert war (*qnrA1*) und nicht in pUC19.

In Tabelle 4-32 finden sich die Ergebnisse der Stämme WT, WT Δicd 7 bp, BW25113 und JW1122-2. Für die Stämme WT und WT Δicd 7 bp wurde eine MHK von Ciprofloxacin von 0,25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ermittelt. Auch die Kontrollstämme BW25113 und JW1122-2 hatten in Kombination mit QnrA1 eine MHK von Ciprofloxacin von 0,25 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Bei Norfloxacin wurde für WT Δicd 7 bp eine höhere MHK als in den übrigen Stämmen mit QnrA1 ermittelt. Die Wildtypstämme WT und BW25113 besaßen die gleiche MHK von Norfloxacin bei 0,063 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Bei JW1122-2 und WT Δicd 7 bp fanden sich Unterschiede. Bei JW1122-2 ohne QnrA1 die MHK von Norfloxacin bei 0,063 $\mu\text{g}/\text{ml}$ auf Wildtyp-Niveau. Bei WT Δicd 7 bp war die MHK von Norfloxacin erhöht und lag bei 0,125 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Ob mit oder ohne Mutation in *icd*, so blieb die MHK von Tetracyclin auf dem Niveau von 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$. WT Δicd 7 bp mit QnrA1 zeigte keinen Unterschied in der MHK von Ciprofloxacin im Vergleich zu WT mit QnrA1.

Tabelle 4-32 Ergebnisse MHK von Ciprofloxacin (Cip), Norfloxacin (Nor), Tetracyclin (Tet)für WT Δicd 7 bp im Vergleich zu weiteren *E. coli* Stämmen; Blau unterlegt *E. coli*-Stamm WT Δicd 7 bp

Stamm	MHK [$\mu\text{g/ml}$]		
	Cip	Nor	Tet
WT	0,008	0,063	2
+ pUC19	0,008	0,063	2
+ pHPNE19-02.1	0,25	1	2
WT Δicd 7 bp	0,031	0,125	4
+ pUC19	0,031	0,125	2
+ pHPNE19-02.1	0,25	1 - 2	2
BW15113	0,004 – 0,008	0,03 – 0,063	1
+ pUC19	0,008	0,03 – 0,063	0,5
+ pHPNE19-02.1	0,25	1	0,5
JW1122-2	0,008	0,063	1 - 2
+ pUC19	0,008	0,063	1
+ pHPNE19-02.1	0,25	1	1

4.6.5.3 In-vitro-Selektion einer *E. coli* MI Δicd 7 bp Mutante mit Agarplatten

Ziel des Selektionsversuchs war es ausgehend von *E. coli* WT Δicd 7 bp über einen Ciprofloxacin-Forward-Assay zur Einschrittmutante *E. coli* MI Δicd 7 bp zu gelangen. Neben dem Rekombinanten *E. coli*-Stamm WT Δicd 7 bp war der Stamm MI Δicd 7 bp notwendig, um den Einfluss einer 7 bp-Deletion in *icd* in einem isogenen Stammhintergrund zu *E. coli* MII Δicd 7 bp untersuchen zu können. Die Eigenschaften von *E. coli* MII Δicd 7 bp und WT Δicd 7 bp sollten mit der neuen Mutante verglichen werden, um den Einfluss von Δicd 7 bp im Zusammenspiel mit *gyrAS83L* unabhängig von $\Delta marR$ zu zeigen.

Eine Selektion sollte über ein Ciprofloxacin-Forward-Assay erfolgen (Abschnitt 2.2.1.15). Tabelle 4-33

E. coli WT Δicd 7 bp diente als Ausgangsstamm zur Selektion von *E. coli* MI Δicd 7 bp. Für die Selektion wurde ein Kolben mit 50 ml LB-Medium mit WT Δicd 7 bp IV7 beimpft als ÜNK für 18 h bei 37 °C inkubiert. 50 μl 1:10 Verdünnung der ÜNK wurden auf LB-Agarplatten, die Ciprofloxacin in einer Konzentration von 0,24 $\mu\text{g/ml}$ enthielten, ausgestrichen und bei 37 °C erneut für 18 h über Nacht inkubiert. Anschließend wurden 48 Kolonien auf Selektiv-Agarplatten mit Ciprofloxacin [0,24 $\mu\text{g/ml}$] überimpft und diese für 18 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die MHK von Ciprofloxacin für die selektierten Mutanten ermittelt.

Tabelle 4-33 Übersicht MHK von verschiedenen Antibiotika für WT, WT Δicd 7 bp, MI, MII und MII Δicd 7 bp

Die Daten für MI wurden den Daten von HEISIG *et al.* (1994) entnommen [167]. Blau unterlegt sind die Werte für WT Δicd 7 bp und MI. Beide Stämme geben eine Orientierung, in welcher Nähe die MHKs von den untersuchten Antibiotika für MI Δicd 7 bp zu erwarten sind.

Stamm	MHK [$\mu\text{g/ml}$]			
	Ciprofloxacin	Norfloxacin	Nalidixinsäure	Chloramphenicol
WT	0,008	0,063	4	4
WT Δicd 7 bp	0,032	0,125	16	8
MI [167]	0,5	1	512	16
MI	2	4	4096	16
MI Δicd 7 bp	2	4	4096	16

4.6.5.3.1 Bestimmung der MHK

Am Folgetag wurde per Microdilutionsverfahren (Abschnitt 2.2.1.12.1) die MHK von Ciprofloxacin, Norfloxacin und Chloramphenicol ermittelt. Bei einer Zunahme der MHK von Fluorchinolonen sollte ein erster Hinweis auf eine Mutation in *gyrA* gefunden werden. Bei der Bestimmung der MHK von Ciprofloxacin wurden Konzentrationen von 0,125 $\mu\text{g/ml}$ bis 0,25 $\mu\text{g/ml}$ ermittelt. Die Ergebnisse der MHK-Bestimmung sind in Tabelle 4-34 zu finden.

4.6.5.3.2 Restriktionslängenpolymorphismus

Der *E. coli*-Stamm MI hat eine MHK von Ciprofloxacin von 0,5 $\mu\text{g/ml}$. Als schnelle Untersuchung wurde ein RFLP ausgenutzt, um innerhalb der QRDR die Mutation in *gyrA* (S83L) zu finden (vergleiche Abschnitt 4.4.2.3). Eine Sequenzierung nach SANGER wurde nicht durchgeführt. Somit konnte nicht ausgeschlossen werden, dass neben *gyrA* (S83L) noch andere Punktmutationen in *gyrA* vorlagen. Die Ergebnisse des RFLP sind in Tabelle 4-34 abgebildet. In keinem selektierten Mutanten ließ sich *gyrA* S83L per RFLP ermitteln. Eine weitere Untersuchung, bzw. Selektion wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht durchgeführt.

Tabelle 4-34 Ergebnisse Ermittlung MHK nach Selektionsexperiment in µg/ml

Cip: Ciprofloxacin; Nor: Norfloxacin; Clm: Chloramphenicol)

Ausgangsstamm	Konzentration der Selektion	Kolonie	MHK Cip	MHK Nor	MHK Clm	RFLP <i>gyrA</i> (S83L)
WT Δicd 7 bp	8x MHK Cip (0,24 µg/ml)	1	0,125	0,5	16	negativ
WT Δicd 7 bp	8x MHK Cip (0,24 µg/ml)	2	0,25	0,5	8	negativ
WT Δicd 7 bp	8x MHK Cip (0,24 µg/ml)	3	0,25	0,5	8	negativ
WT Δicd 7 bp	8x MHK Cip (0,24 µg/ml)	4	0,25	0,5	8	negativ
WT Δicd 7 bp	8x MHK Cip (0,24 µg/ml)	5	0,25	0,5 - 1	8	negativ
WT Δicd 7 bp	8x MHK Cip (0,24 µg/ml)	6	0,25	0,5	16	negativ
WT Δicd 7 bp	8x MHK Cip (0,24 µg/ml)	7	0,25	0,5	8	negativ
WT Δicd 7 bp	8x MHK Cip (0,24 µg/ml)	8	0,25	0,5	8	negativ
WT Δicd 7 bp	8x MHK Cip (0,24 µg/ml)	9	0,25	0,5	8	negativ
WT Δicd 7 bp	8x MHK Cip (0,24 µg/ml)	10	0,25	0,5	8	negativ
WT Δicd 7 bp	8x MHK Cip (0,24 µg/ml)	11	0,25	0,5	16	negativ
WT Δicd 7 bp	8x MHK Cip (0,24 µg/ml)	12	0,25	0,5	16	negativ
WT Δicd 7 bp	8x MHK Cip (0,24 µg/ml)	13	0,25	0,5	16	negativ
WT Δicd 7 bp	8x MHK Cip (0,24 µg/ml)	14	0,125	0,5	16	negativ
WT Δicd 7 bp	8x MHK Cip (0,24 µg/ml)	15	0,125	0,5	16	negativ
WT Δicd 7 bp	8x MHK Cip (0,24 µg/ml)	16	0,125	0,5	16	negativ
WT Δicd 7 bp	8x MHK Cip (0,24 µg/ml)	17	0,125	0,5	16	negativ
WT Δicd 7 bp	8x MHK Cip (0,24 µg/ml)	18	0,25	0,5	16	negativ
WT Δicd 7 bp	8x MHK Cip (0,24 µg/ml)	19	0,25	0,5	16	negativ
WT Δicd 7 bp	8x MHK Cip (0,24 µg/ml)	20	0,25	0,5	16	negativ
WT Δicd 7 bp	8x MHK Cip (0,24 µg/ml)	21	0,25	0,5	8	negativ
WT Δicd 7 bp	8x MHK Cip (0,24 µg/ml)	22	0,25	0,5	16	negativ
WT Δicd 7 bp	8x MHK Cip (0,24 µg/ml)	23	0,25	0,5	8	negativ
WT Δicd 7 bp	8x MHK Cip (0,24 µg/ml)	24	0,25	0,5	16	negativ
WT Δicd 7 bp	8x MHK Cip	25	0,25	0,5	16	negativ

Ergebnisse II - Untersuchungen mit Qnr

	(0,24 µg/ml)					
WT Δicd 7 bp	8x MHK Cip (0,24 µg/ml)	26	0,25	0,5	16	negativ
WT Δicd 7 bp	8x MHK Cip (0,24 µg/ml)	27	0,25	0,5	16	negativ
WT Δicd 7 bp	8x MHK Cip (0,24 µg/ml)	28	0,25	0,5	8	negativ
WT Δicd 7 bp	8x MHK Cip (0,24 µg/ml)	29	0,25	0,5	8	negativ
WT Δicd 7 bp	8x MHK Cip (0,24 µg/ml)	30	0,25	0,5	16	negativ
WT Δicd 7 bp	8x MHK Cip (0,24 µg/ml)	31	0,25	0,5	8	negativ
WT Δicd 7 bp	8x MHK Cip (0,24 µg/ml)	32	0,25	0,5	16	negativ
WT Δicd 7 bp	8x MHK Cip (0,24 µg/ml)	33	0,25	0,5	16	negativ
WT Δicd 7 bp	8x MHK Cip (0,24 µg/ml)	34	0,25	0,5	8	negativ
WT Δicd 7 bp	8x MHK Cip (0,24 µg/ml)	35	0,25	0,5	16	negativ
WT Δicd 7 bp	8x MHK Cip (0,24 µg/ml)	36	0,25	0,5	16	negativ
WT Δicd 7 bp	8x MHK Cip (0,24 µg/ml)	37	0,25	0,5	16	negativ
WT Δicd 7 bp	8x MHK Cip (0,24 µg/ml)	38	0,25	0,5 - 1	8	negativ
WT Δicd 7 bp	8x MHK Cip (0,24 µg/ml)	39	0,125	0,5	8	negativ
WT Δicd 7 bp	8x MHK Cip (0,24 µg/ml)	40	0,125	0,5	8	negativ
WT Δicd 7 bp	8x MHK Cip (0,24 µg/ml)	41	0,25	0,5	8	negativ
WT Δicd 7 bp	8x MHK Cip (0,24 µg/ml)	42	0,25	0,5	16	negativ
WT Δicd 7 bp	8x MHK Cip (0,24 µg/ml)	43	0,25	0,5	8	negativ
WT Δicd 7 bp	8x MHK Cip (0,24 µg/ml)	44	0,125	0,5	8	negativ
WT Δicd 7 bp	8x MHK Cip (0,24 µg/ml)	45	0,25	0,5	16	negativ
WT Δicd 7 bp	8x MHK Cip (0,24 µg/ml)	46	0,25	0,5	8	negativ
WT Δicd 7 bp	8x MHK Cip (0,24 µg/ml)	47	0,25	0,5	8	negativ
WT Δicd 7 bp	8x MHK Cip (0,24 µg/ml)	48	0,25	0,5	8	negativ

4.6.6 Generationszeitbestimmungen

Die Bestimmung der Generationszeit sollte eine Aussage über die Fitness der selektierten MII-Mutanten (aus Abschnitt 4.2) erlauben [225]. Unter aeroben Bedingungen (LB-Medium, 37 °C)

war zu zeigen, wie sich die Fitness unter Einfluss von Δicd 7 bp veränderte. Als Referenz wurden die Stämme WT und MII verwendet. Bereits aus früheren Arbeiten war für die *E. coli*-Mutanten MIII und MIVa bekannt, dass diese über eine verlängerte Generationszeit verfügten und sich phänotypisch deutlich von Kolonien der Stämme WT, MI und MII unterschieden [167]. Ähnliche Morphologien konnten bei MII Δicd 7 bp und WT Δicd 7 bp beobachtet werden. Zur weiteren Orientierung wurden die *E. coli*-Stämme BW25113 (GK4052) und JW1122-2 (GK4053) aus der KEIO-Collection betrachtet. JW1122-2 ist ein K12 Stamm mit einem Gen-Knockout durch eine Insertion einer Kanamycinresistenzkassette anstatt *icd*. BW25113 ist der isogene WT-Stammhintergrund zu JW1122-2 [179].

4.6.6.1 Ergebnisse der Generationszeitbestimmung

Die Generationszeit für MII Δicd 7 bp pHPNE19-02.1 war bei Anzucht mit Ampicillin (50 µg/ml) erhöht (Abbildung 4-35). Bei Anzucht mit Ampicillin lag die Generationszeit im Mittel bei ca. 43 min. Wurde bei der Anzucht auf Ampicillin verzichtet, so sank die Generationszeit auf ca. 31 min. Ähnlich war die Zeit für den plasmidfreien Stamm MII Δicd 7 bp. Zu vermuten war, dass die betrachteten *E. coli*-Stämme mit einem Wildtyp-Stammhintergrund (GK571) bei Ausbleiben des Selektionsdrucks nicht benötigte, plasmidbasierte Resistenzfaktoren verloren (vergleiche Abschnitt 4.3.2). Für den *E. coli*-Wildtyp WT konnte eine Generationszeit von ca. 20 min ermittelt werden. Für den Stamm MII wurde eine Generationszeit von ca. 24 min gemessen. Durch die Komplementation von $\Delta marR$ 175 bp in MII mit dem Wildtyp-Allel (pBP591) blieb die Generationszeit für MII auf einem vergleichbaren Niveau. Dieses Ergebnis fand sich auch in älteren Arbeiten [130].

Nach Einbringen von Δicd 7 bp in WT über homologe Rekombination (Abschnitt 4.6.5.1) konnte ein Vergleich der Generationszeit zu WT gezogen werden. Unabhängig von der Anwesenheit eines Selektionsantibiotikums wurde eine Generationszeit von ca. 35 min für WT *icd* 7 bp ermittelt (Abbildung 4-35). Hier lag die Kanamycinresistenz chromosomal kodiert vor, so dass kein Einfluss durch Plasmidverlust messbar war. WT Δicd 7 bp und MII Δicd 7 bp hatten Generationszeiten auf dem gleichen Niveau. Eine Komplementation von *icd* in MII Δicd 7 bp mit pPHP177-01.1 bewirkte eine Reduzierung der Generationszeit wieder auf einem Niveau ähnlich zu MII. Eine MarR-Komplementation mit pBP591 führte in MII Δicd 7 bp zu einer Erhöhung der Generationszeit auf 39 min. Bei der Anzucht wurden Ampicillin

(50 µg/ml) und Kanamycin (25 µg/ml) verwendet. Zum Vergleich wurden aus der KEIO-Kollektion die isogenen *E. coli*-Stämme BW25113 und JW1122-2 vermessen [179]. BW25113 besaß eine Generationszeit vergleichbar zu WT. Der Knockout von *icd* in JW1122-2 bewirkte eine Zunahme der Generationszeit auf 24 min. Damit war die Generationszeit so hoch, wie in MII und niedriger als in WT Δicd 7 bp oder MII Δicd 7 bp (Abbildung 4-35).

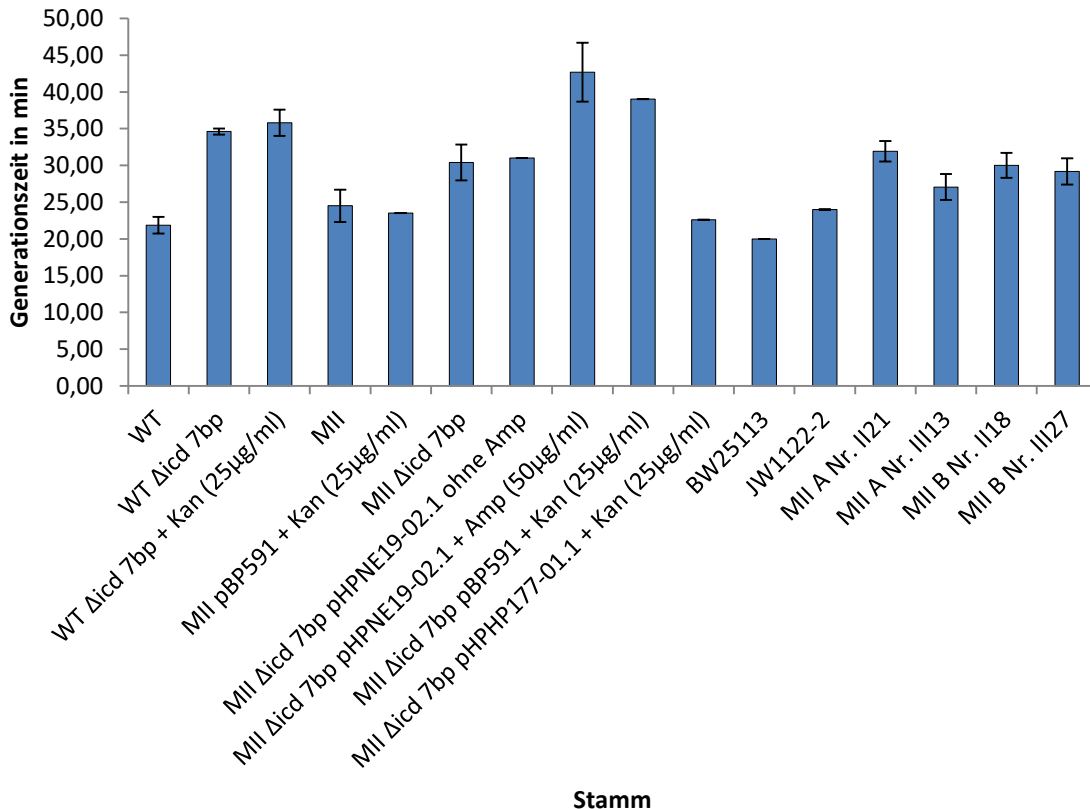


Abbildung 4-35 Übersicht Ergebnisse der Generationsbestimmung

Generationszeit in Minuten (min); Kan: Kanamycin (25 µg/ml); Amp: Ampicillin (50 µg/ml); A: pHPNE19-02,1 (*qnrA1*); B: pHPNE18-01.1 (*qnrB1*). Zur Komplementation von Δicd 7 bp wurde pPHP177-01.1 verwendet (*icd* WT-Allel). Für die Komplementation von $\Delta marR$ wurde pBP591 (*marR* WT-Allel) benutzt.

Die Mutanten MII A Nr. II 21, MII A Nr. III 13, MII B Nr. II 18, MII B Nr. III 27 sind selektierte Mutanten aus dem Ciprofloxacin-Forward-Assay. Die Generationszeit wurde nach *plasmid curing* bestimmt. Die Buchstaben A oder B geben an, ob die Mutante aus einem Selektionsexperiment mit pHPNE19-02.1 (A) oder pHPNE18-01.1 (B) entstammt.

Die selektierten Mutanten MII pHPNE19-02.1 Nr. II 21, MII pHPNE19-02.1 Nr. III 13, MII pHPNE18-01.1 Nr. II 18 und MII pHPNE18-01.1 Nr. III 27 lagen nach Durchführung des *plasmid curings* (Abschnitt 2.2.1.11) ohne Plasmid vor. Daher die Bezeichnung MII A Nr. II 21, MII A Nr. III 13, MII B Nr. II 18 und MII B Nr. III 27, um die Verwechslung zu den selektierten Mutanten

mit Plasmid auszuschließen. Der Buchstabe A oder B gab an, ob die selektierte, plasmidfreie Mutante aus einem Ciprofloxacin-Forward-Assay mit pHPNE19-02.1 (A) oder pHPNE18-01.1 (B) entstammt. Für die plasmidfreien Mutanten wurde eine Generationszeit von ca. 27 min bis ca. 30 min bestimmt. Diese Generationszeiten waren vergleichbar zur plasmidfreien Mutante MII Δicd 7 bp und lagen höher als bei der Zweischnittmutante MII (ca. 24 min).

4.6.7 Zusammenhang Effluxpumpen und Δicd 7 bp

Durch Genomsequenzierung und Komplementation wurde deutlich, dass in MII Δicd 7 bp pHPNE19-02.1 allein Δicd 7 bp für eine Zunahme der MHK von Fluorchinolonen verantwortlich war. Unter Berücksichtigung der Daten von HELLING *et al.* (1971, 1976, 2002) und RUIZ *et al.* (2013) fanden sich Hinweise, die einen Zusammenhang zwischen (Fluor)chinolon-Resistenz und Stoffwechsellmutanten, wie zum Beispiel *E. coli* Δicd , herstellten [34], [246]–[248].

Bekannt war, dass Fluorchinolon-resistente *E. coli*-Mutanten oder Mutanten anderer gramnegativer oder grampositiver Spezies, die unter Laborbedingungen selektiert werden, Mutationen in den Untereinheiten der beiden Topoisomerasen (*gyrA*, *gyrB*, *parC* und *parE*) aufweisen. In Kombination mit weiteren Mutationen oder Resistenzfaktoren wurden verschiedene Stufen einer Fluorchinolon-Resistenz erreicht (vergleiche Abschnitt 1.8). Die Auswirkungen von Mutationen außerhalb der Topoisomerase-Gene können zu einer Aktivierung der Effluxpumpen führen [84]. Durch einen erhöhten Abtransport werden keine toxischen Fluorchinolon-Konzentrationen innerhalb der Zelle erreicht. In *E. coli*-Stämmen und anderen Enterobacteriaceae scheint der AcrAB-TolC-Komplex (Abschnitt 1.2), die wichtigste Pumpe zu sein, die intrinsische Resistenz gegen natürlich vorkommende toxische Substanzen vermittelt [52], [249].

Multi-drug resistance (MDR) Effluxpumpen vom Typ RND; wie AcrAB-TolC, sind in vielen multiresistenten klinischen Isolaten diverser enterobakterieller Spezies (über)aktiv. Erhöhter Efflux wird als eine Ursache für einen MDR-Phänotyp angesehen, wobei das Substratspektrum der Effluxpumpe breit ist und Antibiotika verschiedener Wirkstoffklassen, darunter auch Fluorchinolone, verstärkt aus der Zelle heraustransportiert werden. Die Expression von *acrA* und *acrB* wird durch drei Signalwege, die MarAB, SoxRS und RobA enthalten, beeinflusst (vergleiche Abschnitt 1.7.2) [250]. Neben Mutationen innerhalb dieser drei Signalwege werden Mutationen gefunden, die in biosynthetischen Signalwegen einen Block auslösen, und damit indi-

rekt die *acrAB* Expression induzieren. HELLING *et al.* (2002) zeigten bei *E. coli icd*-Mutanten anhand der Akkumulation von Citrat und Isocitrat - Zwischenprodukte vor dem Icd-Block - eine Induktion zur Ausbildung von Effluxmechanismen, die zur Ausschleusung von Metaboliten aus der Zelle führt und vor Vergiftung bewahrt (*Toxic Waste Disposal*) [34]. Bei vier Stoffwechsel-Mutanten (*icd*, *purB*, *cysH* und *metE*) wurde für eine Nalidixinsäure-Resistenz eine (notwendige) Überexpression von *acrAB* und *tolC* gezeigt. Zusätzlich mussten mindestens zwei der drei Signalwege intakt sein. Gleichzeitig konnte kein Einfluss der EmrAB-TolC-Pumpe gezeigt werden [34]. Bei LEVY *et al.* (2013) findet sich eine Bestätigung dieser Ergebnisse: Auch wenn andere Effluxpumpen in der Zelle vorhanden sind, nimmt die AcrAB-TolC-Effluxpumpe die Hauptrolle beim Ausschleusen zellulärer Metabolite aus verschiedenen Stoffwechselprozessen ein [248].

Mit den folgenden Versuchen sollte untersucht werden, in welchem möglichen Zusammenhang die Expression von *acrAB-tolC* und Δicd 7 bp stehen. Neben einer Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration von Fluorchinolonen unter Einfluss von Induktion oder Hemmung, wurde in einem Luciferase-Aktivitätsassay indirekt die Aktivität der AcrAB-TolC-Effluxpumpe untersucht, um den Einfluss der Effluxpumpe sichtbar zu machen.

Eine Abschätzung des Anteils der erhöhten Effluxaktivität an der Antibiotikaempfindlichkeit sollte mittels Bouillondilutionsmethode (gemäß Abschnitt 2.2.1.12.1) in Anwesenheit unterschiedlicher Konzentrationen der zu testenden Antibiotika alleine und unter Zusatz eines Effluxpumpeninhibitors vorgenommen werden (Abschnitt 4.6.7.1). Dabei sollte auch ein möglicher Einfluss von bekannten Induktoren des *mar*-Regulons, wie Natrium-Salicylat, was in einer erhöhten Expression von *acrAB* resultiert, einbezogen werden (Abschnitt 4.6.7.2). Für eine genauere und spezifische Analyse des Expressionsstatus bekannter Effluxpumpen wurde die Aktivität der Promotoren *PacrAB* und *PacrEF*, die jeweils mit dem *luc*-Gen für Luciferase von *Photinus pyralis* (Glühwürmchen) fusioniert waren, quantitativ bestimmt (Abschnitt 4.6.7.3).

4.6.7.1 Einfluss Effluxpumpeninhibitor auf die MHK von Fluorchinolonen

Im Rahmen dieser Versuchsreihe wurde der Einfluss des Effluxpumpeninhibitors Phe-Arg b-Naphthyl-amid Dihydrochlorid (PA β N) auf die Empfindlichkeit gegenüber Fluorchinolonen untersucht. Durch die Bestimmung der MHK von Fluorchinolonen für bestimmte *E. coli* Stämme unter Zugabe von PA β N ließen sich Beobachtungen machen, wie hoch der Anteil des Efflux bei der Empfindlichkeit auf Fluorchinolone war. Zusätzlich konnte im isogenen

Stammhintergrund der *E. coli*-Stämme MII und MII $\Delta icd 7$ bp der Einfluss von $\Delta icd 7$ bp betrachtet werden. Aus dem Selektionsexperiment in Abschnitt 4.2 mit MII pHPNE19-02.1 war durch eine spontane Mutation die selektierte Mutante MII pHPNE19-02.1 Nr. I 43 hervor gegangen. Durch Genomsequenzierung konnte hier ermittelt werden, dass sich dieser Stamm in $\Delta icd 7$ bp vom Ausgangstamm MII pHPNE19-02.1 unterschied (Abschnitt 4.5), und somit die beobachtete MHK-Veränderung allein auf die Deletion zurückzuführen war.

Zunächst wurde die MHK von PA β N für die *E. coli* Stämme MII, MII $\Delta icd 7$ bp, MII $\Delta icd 7$ bp pHPNE19-02.1 und MII $\Delta icd 7$ bp pHPHP177-02.1 ermittelt. Als MHK von PA β N wurde eine Konzentration von 512 μ g/ml für alle Stämme ermittelt. Darauf basierend wurde eine Konzentration von PA β N von 64 μ g/ml entsprechend 1/8 der ermittelten MHK in den folgenden Versuchen verwendet (Tabelle 4-35). Die MHK-Bestimmung erfolgte per Mikrodilutionsverfahren (siehe Abschnitt 2.2.1.12.1). Der *E. coli*-Stamm MII $\Delta icd 7$ bp mit und ohne QnrA1 zeigte eine MHK für Tetracyclin, die eine Stufe höher war als beim Ausgangstamm MII (Tabelle 4-35Tabelle 4-36).

Tabelle 4-35 MHK von verschiedenen Antibiotika in An- und Abwesenheit des Effluxpumpeninhibitors (EPI) PA β N für den Ausgangstamm MII und MII $\Delta icd 7$ bp

n. d.: nicht detektiert; Cip: Ciprofloxacin; Nor. Norfloxacin; Levo: Levofloxacin; Tet: Tetracyclin; PA β N: Phenylalaninarginyl- β -naphthylamid; 1/8 PA β N: 1/8 der MHK von PA β N entsprechen 64 μ g/ml

Stamm	Cip	Cip + 1/8 PA β N	Nor	Nor + 1/8 PA β N	Levo	Tet
MII	1 - 2	0,2	2	0,5	n. d.	2
+ pUC19	2	0,2	2	0,5	n. d.	2
MII $\Delta icd 7$ bp	2	0,4	4 - 8	1	2	4
+ pHPHP177-02.1	1 - 2	0,2	2	0,5	2 - 4	4
+ pHPNE19-02.1 (AI43)	8 - 16	n. d.	32	4 - 8	16	4

Die Untersuchung zeigte, dass nach Zugabe von PA β N bei Stämmen mit Δicd , die MHK von Ciprofloxacin oder Norfloxacin nicht auf das gleiche Niveau für MII ohne $\Delta icd 7$ bp zurück fiel (Tabelle 4-35). Die Deletion $\Delta icd 7$ bp schien einen Einfluss auf die Effluxpumpe zu haben. Bei Zugabe von PA β N war die MHK von Norfloxacin für MII $\Delta icd 7$ bp eine MHK-Stufe höher als für MII. Bei Anwesenheit von QnrA1 (Plasmid pHPNE19-02.1) in MII $\Delta icd 7$ bp lag die MHK von Norfloxacin mit PA β N bei 4 - 8 μ g/ml, was drei MHK-Stufen höher war als für MII oder für MII $\Delta icd 7$ bp.

Zusätzlich wurde die MHK von Tetracyclin bestimmt. Durch COHEN *et al.* (1989) wurde der MAR-Phänotyp (englisch: multiple antibiotic resistant) in Verbindung mit einer Induktion durch

Tetracyclin gebracht [138]. Bei der Anzucht von *E. coli* auf LB-Selektiv-Agar mit niedriger Tetracyclin-Konzentration (oder Chloramphenicol) fanden sich spontane Mutanten mit einer erniedrigten Empfindlichkeit gegenüber Fluorchinolonen. Diese Mutanten fanden sich fast 1000-fach häufiger, als bei Selektion auf Norfloxacin. Da Tetracyclinresistenz auch in Verbindung mit einer Überaktivität der Effluxpumpe AcrAB vermittelt wurde, war diese MHK von Tetracyclin ein guter Indikator für erhöhte Effluxaktivität. Gleichzeitig wurde eine Kreuz-Resistenz gegen Fluorchinolone bedingt durch die erhöhte Effluxaktivität diskutiert, die zu einer erniedrigten Antibiotikakonzentration innerhalb der Zelle führte (Tabelle 4-35). Die gemachten Befunde ließen sich auch für andere Qnr-Varianten zeigen (Tabelle 4-36).

Tabelle 4-36 MHK von Ciprofloxacin und Norfloxacin für MII Δicd 7 bp mit verschiedenen Qnr-Varianten

PA β N: Effluxpumpeninhibitor Phe-Arg b-Naphthyl-amid Dihydrochlorid;
1/8 PA β N: 64 μ g/ml (1/8 MHK von PA β N)

Stamm	MHK (μ g/ml)		
	Ciprofloxacin	Norfloxacin	Norfloxacin + 1/8 PA β N
MII Δicd 7 bp	2	8	0,5
+ pHPNE19-02.1 (<i>qnrA1</i>)	16	32	4 - 8
+ pHPNE18-01.1 (<i>qnrB1</i>)	8	8	0,5
+ pHPPH19-02.1 (<i>qnrC</i>)	8	16	4
+ pHPPH19-01.1 (<i>qnrD</i>)	3	8	0,5
+ pHPNE19-03.1 (<i>qnrS1</i>)	16 - 32	32	16

4.6.7.2 Einfluss des Induktors Natriumsalicylat

Wird Natriumsalicylat zu einer Mutante mit *gyrAS83L* gegeben, lässt sich eine MHK von Ciprofloxacin ermitteln, die auch bei klinisch resistenten *In-vitro*-Isolaten mit zusätzlichen Deletionen im *mar*-Operon neben *gyrAS83L* gefunden werden. Natriumsalicylat kann besonders mit MarR interagieren und so die Expression von *acrAB* induzieren (Abschnitt 1.7.2). Durch Bindung von Salicylsäure-Molekülen an den Repressor MarR wird dessen Bindung an DNA-Bindestellen im *marO*-Gen gestört. Hieraus resultiert eine Zunahme der *marA* Expression, und weitere Gene werden in der Folge vermehrt exprimiert. Durch Zunahme der *acrAB*-Expression resultiert indirekt der MDR-Phänotyp. Neben einem *mar*-abhängigen Einfluss von Salicylat werden noch weitere Mechanismen diskutiert, die Bestandteil aktueller Untersuchung sind [34], [138], [145], [181], [248], [251], [252].

Unter Zugabe des Induktors Natriumsalicylat (1160 µg/ml) wurden Empfindlichkeitsbestimmungen durchgeführt. Aus Vorarbeiten von Dr. N. MATTHIESSEN, war bekannt, dass sich die Aktivität für *PacrAB* in MII trotz Deletion in *marR* steigern ließ [181]. Daraus ergab sich für diese Arbeit die Frage, ob die *acrAB*-Expression durch Δicd 7 bp gesteigert wurde, wenn MarR in *E. coli*-Stamm MII bedingt durch $\Delta marR$ 175 bp ausfiel. Hier lieferte die Arbeit von Dr. N. MATTHIESSEN einen weiteren Hinweis [181]. Die Aktivität für Promotor *PacrAB* war durch die Zugabe von Salicylat weiter steigerbar (siehe Tabelle 4-37).

Tabelle 4-37 Daten Dr. N. MATTHIESSEN (2007) [181]

Stamm	RLU/OD %	RLU/Proteinmenge %
WT	100	100
MII	300 ± 43	279 ± 26
MII + Salicylat	537 ± 83	351 ± 15

Die *E. coli* Stämme MII, MII Δicd 7 bp, MII Δicd 7 bp pHPNE19-02.1 wurden als Kontrollen bei der Messung mitgeführt. Da bereits bekannt war, dass die verwendeten Wildtyp-Derivate bei Abwesenheit von Selektionsantibiotika Plasmide verloren (vergleiche Abschnitt 4.3.2), wurde als weiterer Vergleich eine Messreihe mit Ampicillin durchgeführt. Analog zur Messung in Abschnitt 4.6.7.1 mit PAßN wurde auch bei den Ergebnissen mit Natriumsalicylat in diesem Abschnitt die Empfindlichkeit für Tetracyclin ermittelt. Bei Anwesenheit von Salicylat ließ sich eine Erhöhung der MHK von Ciprofloxacin, Norfloxacin und Tetracyclin bei allen untersuchten Stämmen feststellen. Die Ergebnisse der Messung mit Induktor sind in Tabelle 4-38 zusammengefasst.

Für MII und MII Δicd 7 bp befand sich ohne Zugabe von Salicylat die MHK von drei Antibiotika auf gleichem Niveau. Wurde Salicylat zugegeben, ließ sich eine Steigerung um eine MHK-Stufe für MII messen. Kam Δicd 7 bp hinzu, so war im Vergleich zu MII ohne Salicylat eine Steigerung von zwei MHK-Stufen zu messen. Für WT ließ sich durch die Zugabe von Salicylat eine Steigerung von zwei MHK-Stufen erreichen. Bei Anwesenheit von Δicd 7 bp lag die MHK von Ciprofloxacin bei 0,031 µg/ml und für Norfloxacin bei 0,125 µg/ml. Für Ciprofloxacin konnte durch Induktion die MHK um eine Stufe gesteigert werden. Bei Norfloxacin war eine Steigerung von drei Stufen zu sehen. War in WT neben Δicd 7 bp noch eine Qnr-Variante vorhanden, ließ sich nach Induktion mit Salicylat kein Unterschied zu WT Δicd 7 bp in Bezug auf die MHK feststellen.

Tabelle 4-38 Ergebnisse der MHK-Bestimmung mit und ohne Induktion durch Natriumsalicylat

Amp: Ampicillin (50 µg/ml); Sal: Salicylat (1160 µg/ml); A1: pHPNE19-02.1; B1: pHPNE18-02.1; Δ: *Δicd 7 bp*

Stamm	Ciprofloxacin				Norfloxacin				Tetracyclin			
	mit Amp		ohne Amp		mit Amp		ohne Amp		mit Amp		ohne Amp	
	ohne Sal	mit Sal	ohne Sal	mit Sal	ohne Sal	mit Sal	ohne Sal	mit Sal	ohne Sal	mit Sal	ohne Sal	mit Sal
WT			0,008 (0,016)	0,031			0,063	0,25			2	4
WT A1	0,25 (0,5)	1	0,25 (0,5)	1	1	4	1 (2)	4	1	2 (4)	1 (2)	2
WT Δ			0,031	0,063			0,125	1			4	8
WT Δ A1	0,25 (0,5)	1	0,25 (0,5)	1	1	4	1 (2)	4 (8)	1 (2)	2	2	2
WT Δ S1	0,5	2	0,500	1	2	8	2	8	1 (2)	2 (4)	1 (2)	2
WT-K			0,063 (0,125)	0,25			0,5	2			2	4
WT-K A1	1	2 (4)	1,000	2	2 (4)	8 (16)	2 (4)	8 (16)	1 (2)	4 (8)	1 (2)	2 (4)
MI			0,250	0,5			0,5	2 (4)			2	4
MI I			1	2			4	8			2	4
MI I A1	4	8	4	4	8	32	4	32	1	1	2	4
MI I Δ			1	4			4	16			2	8
MI I Δ A1	8	16	8	32	16	64	16	32	2	4	4	8

4.6.7.3 Luciferase-Assay

Teile der nachfolgend gezeigten Ergebnisse wurden unter Mitwirkung von B.Sc. S.-F. STAHL im Rahmen einer Bachelorarbeit ermittelt.

Die Reporterplasmide pPHB331, pPHB333 und pPHB335 sollten für die Untersuchungen zur Expression von *acrAB* verwendet werden, und eine Erklärung für die Zunahme der MHK von Ciprofloxacin bei MII $\Delta icd 7$ bp pHPNE19-02.1 geben [181]. Eine Transformation mit diesen Plasmiden gelang nicht. Diese Versuche werden in den folgenden Abschnitten beschrieben. Anschließend wird die Klonierung neuer Plasmide beschrieben, die erfolgreich verwendet wurden. Die Ergebnisse der Luciferase-Assays finden sich in den nächsten Abschnitten. Die Rohdaten zu den einzelnen Luciferase-Messungen finden sich in Abschnitt 15.5.

4.6.7.3.1 Erste Transformation

Die *E. coli*-Stämme MII (GK573) und MII $\Delta icd 7$ bp wurden mit dem Plasmid pPHB335 transformiert. Das Reporterplasmid pPHB331 wurde nicht verwendet, da es eine Tetracyclinresistenz vermittelte, die durch die *MarR*-Deletion in MII-Stämmen bereits vorlag. Es wurde ein Luciferase-Assay (Abschnitt 2.2.3.2) mit einer frischen ÜNK (Abschnitt 2.2.1.6) der *E. coli*-Stämme MII (GK573), MII pPHB335 und MII $\Delta icd 7$ bp durchgeführt. Hier wurde die ÜNK ohne die Zugabe eines Selektionsantibiotikums verdünnt. Jeder Stamm wurde dreimal in einer Messreihe à drei Messungen vermessen, so dass pro Stamm neun Messwerte erhalten wurden (Abbildung 4-36). In *E. coli*-Stamm MII (GK573) war kein Plasmid und damit auch kein *luc*-Gen vorhanden, da keine Luciferase-Aktivität zu sehen war. MII pPHB335 zeigte eine Luciferase-Aktivität, die mit der Zeit abnahm. Die ermittelten Daten entsprachen den Ergebnissen bei Dr. ABU MRAHEIL [224]. Mit der Zeit nahm die Konzentration an LAR ab und führte zur Abnahme der Lichtfreisetzung. Hier lag die Herausforderung die nachfolgenden Messungen der unterschiedlichen Messreihen und Stämme möglichst zum gleichen Zeitpunkt nach LAR-Zugabe durchzuführen. Eine kurze Zeitspanne zwischen der Zugabe des LAR zur ersten Probe und der Zugabe zur letzten Probe der Messreihe waren bei den nachfolgenden Messungen wichtig. Verdächtig war, dass für MII $\Delta icd 7$ bp pPHB335 keine Aktivität zu sehen war. pPHB335 war zuvor mittels Restriktion und Gelelektrophorese charakterisiert worden und die Transformation des *E. coli*-Stammes MII führte zu einer Luciferase-Aktivität, so dass davon auszugehen war, dass das verwendete Plasmid intakt war.

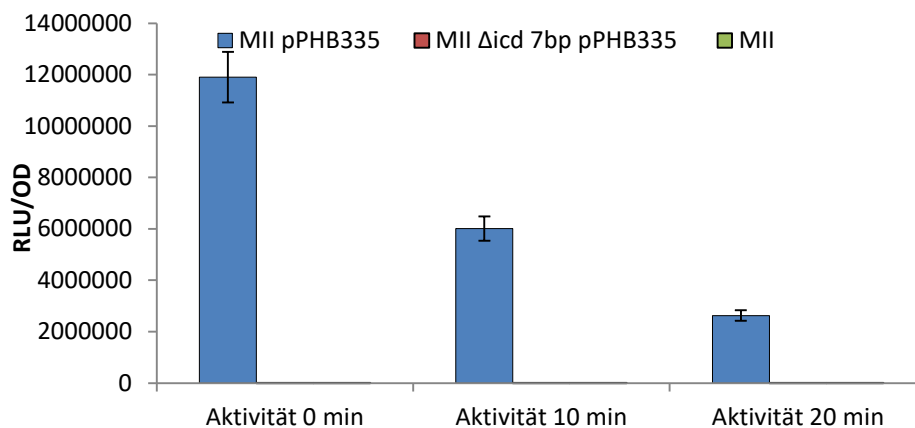


Abbildung 4-36 Luciferase-Aktivität-Messung der *E. coli*-Stämme MII (GK573), MII pPHB335 und MIIΔ pPHB335

Dargestellt sind die jeweiligen spezifischen RLU/OD-Quotienten, die aus den Mittelwerten gebildet wurden; es wurde zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach der Zugabe der LAR gemessen, was auch im Diagramm zu sehen ist. Für MII Δicd 7 bp pPHB335 ist keine Aktivität zu sehen.

In der Annahme, dass *E. coli* MII Δicd 7 bp das Plasmid wieder verloren hatte, wurde zur Bestätigung eine frische ÜNK ausgehend von der GK dieses Stammes in Kanamycin-Selektiv-LB-Medium angesetzt. Bei fehlendem Plasmid sollte kein Wachstum stattfinden. Nach 18 h Inkubation bei 37 °C und 130 rpm war kein Wachstum für diesen Ansatz festzustellen. Als Kontrolle wurde im Anschluss eine Plasmid-Isolierung (nach Abschnitt 2.2.2.1.5) durchgeführt und kein Plasmid aus dem Transformanden für MII Δicd 7 bp pPHB335 wurde isoliert. Eine Kontamination der Agarplatten, des Mediums oder der kompetenten Zellen konnte anhand der durchgeführten Kontrollen ausgeschlossen werden (siehe Abschnitt 2.2.1.8.1). Alle vorliegenden Glycerinkulturen des Stammes MII Δicd 7 bp wurden anschließend ausgestrichen und in Bezug auf Unterschiede im Phänotyp der Kolonien begutachtet. Keine Unterschiede waren hier zu erkennen. Für das weitere Vorgehen, war es notwendig die Transformation von *E. coli*-Stamm MII Δicd 7 bp mit pPHB335 zu wiederholen. Das vorherige Wachstum auf Kanamycin-LB-Agarplatten beim ersten Transformationsdurchgang könnte durch ein zu großes Inokulum erklärt werden. Bei Verwendung eines zu großen Inokulums war das Wachstum von Bakterien auf bereits abgestorbenen Bakterienzellen möglich. Abgestorbene Zellen bildeten eine Schicht, die den Kontakt zum Antibiotikum im Selektiv-Agar verhinderte [27].

4.6.7.3.2 Zweite Transformation

Bei der Wiederholung wurden die *E. coli*-Stämme JM109, MII Δicd 7 bp und MII Δicd 7 bp PHPNE19-02.1 per Hitzeschock-Methode mit dem Plasmid pPHB335 transformiert. Für *E. coli*-Stamm JM109 wurden Transformanden erhalten, während bei *E. coli*-Stamm MII Δicd 7 bp PHPNE19-02.1 keine Transformanden zu finden waren. Bei *E. coli*-Stamm MII Δicd 7 bp war erneut ein Rasenwachstum zu sehen. Zur Kontrolle wurde eine ÜNK in Kanamycin-haltigem Medium angesetzt. Hier war ein Wachstum zu erkennen. Nach einer Plasmidisolierung (siehe Abschnitt 2.2.2.1.4) der Rasenkultur und einem Restriktionsverdau (siehe Abschnitt 2.2.2.5.1) mit *Bam*HI und anschließender Agarosegelelektrophorese der ungeschnittenen und geschnittenen Plasmide waren keine Plasmid-Fragmente sichtbar (Abbildung 4-37).

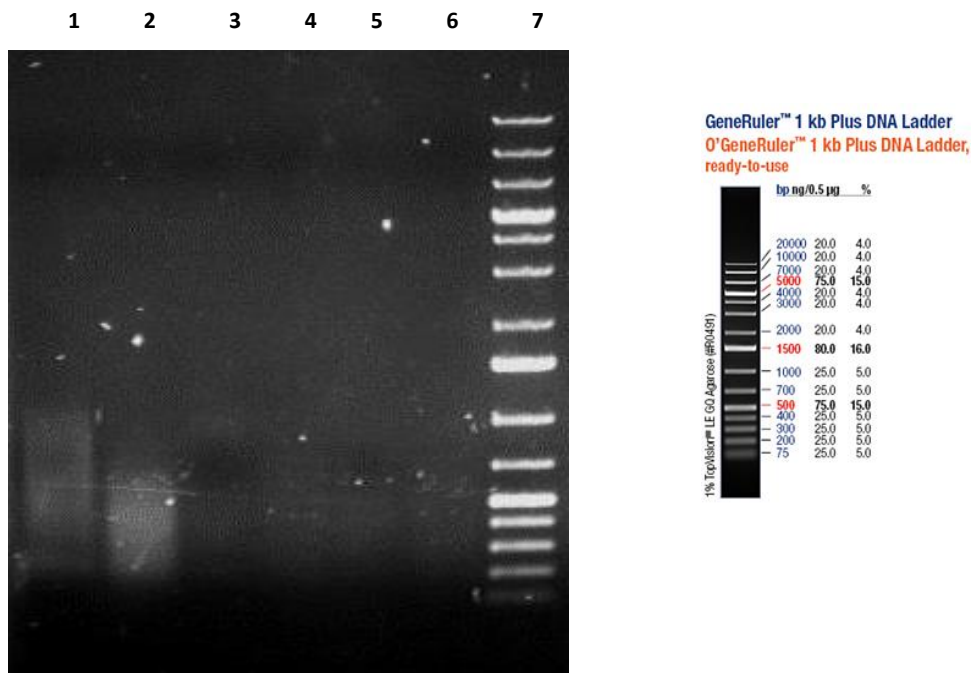


Abbildung 4-37 Restriktionsprodukte der Plasmidisolierung von pPHB335 aus MII Δicd 7 bp

TAE-Agarosegel, 1,0%, 1-fach E-Puffer, 100 V; Ethidiumbromidfärbung

Restriktionsprodukte neben ungeschnittenen Plasmiden; T1: Transformand Nr. 1, T2: Transformand Nr. 2, T3: Transformand Nr. 3; unv: unverdaut; verd: verdaut.

Spur 1: T1 unv. 3 µl; Spur 2: T1 verd. 20 µl; Spur 3: T2 unv. 3 µl; Spur 4: T2 verd. 20 µl;
 Spur 5: T3 unv. 3 µl; Spur 6: T3 verd. 20 µl; Spur 7: DNA-Größenmarker 3 µl

4.6.7.3.3 Prüfung Ausgangsplasmide

Zur Prüfung wurde ein Restriktionsverdau der drei Plasmide (pPHB331, pPHB333, pPHB335) durchgeführt. In Tabelle 4-39 sind die erwartenden Fragmentgrößen nach Restriktionsverdau mit *Bam*HI und *Xho*I zu finden. Abbildung 4-38 zeigt die gelelektrophoretischer Auftrennung.

Tabelle 4-39 Erwartete Fragmentgrößen der Plasmide pPHB331, pPHB333 und pPHB335 nach Verdau mit *Bam*HI und *Xho*I

Stamm GK / Vektor	Vektorgroße [bp]	Fragmente			
3001 / pPHB331	6400		3552	2848	
3000 / pPHB333	6616				
2999 / pPHB335	7805	6400	3552	2848	1405

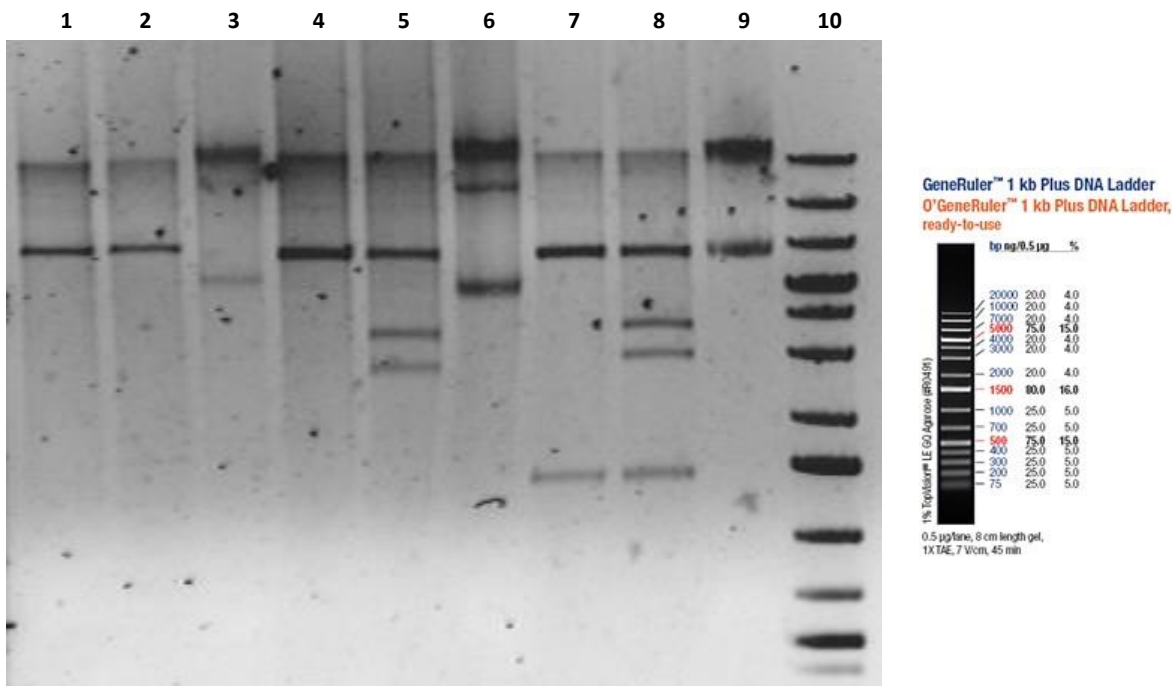


Abbildung 4-38 Plasmidfragmenten nach Restriktionsverdau mit *Bam*HI und *Xho*I

TAE-Agarosegel, 1,5%, 1-fach E-Puffer, 70 V; Ethidiumbromidfärbung; Farben invertiert

Gelelektrophoretische Auftrennung der Plasmidfragmente von pPHB331, pPHB333, pPHB335 nach Verdau mit *Bam*HI und mit *Xho*I (20 μl Ansatz wurden insgesamt jeweils aufgetragen; 3 μl der Plasmidisolierung wurden im Restriktionsansatz verwendet; Ladder: Größenmarker 3 μl).

Spur 1: pPHB333 mit *Bam*HI; Spur 2: pPHB333 mit *Bam*HI und *Xho*I; Spur 3: pPHB333;
 Spur 4: pPHB331 mit *Bam*HI; Spur 5: pPHB331 mit *Bam*HI und *Xho*I; Spur 6: pPHB331;
 Spur 7: pPHB335 mit *Bam*HI; Spur 8: pPHB335 mit *Bam*HI und *Xho*I; Spur 9: pPHB335;
 Spur 10: DNA-Größenmarker

4.6.7.3.4 *Dritte Transformation*

Es wurde eine dritte Transformation durchgeführt. Im Gegensatz zu den ersten beiden Versuchen wurde eine Elektroporation (Abschnitte 2.2.1.9 und 2.2.1.10) zur Transformation verwendet. MII Δicd 7 bp wurde jeweils mit pPHB331, pPHB333 oder pPHB335 transformiert. Die Transformation blieb erfolglos und dieser Versuchsansatz nicht mehr weiterverfolgt.

4.6.7.3.5 *pACYC177 als Klonierungsvektor*

MIII Δicd 7 bp wurde durch mehrmaliges Passagieren aus *E. coli*-Stamm MIIII Δicd 7 bp pHPNE19-02.1 (AI43) erhalten (siehe Abschnitt 2.2.1.11). Zu vermuten war, dass ein Artefakt des *qnrA1*-Plasmids im Stamm erhalten blieb, dessen ORI-Sequenzen für eine Inkompatibilität verantwortlich waren. pUC19 war als Klonierungsvektor für pHPNE19-02.1 verwendet worden. Dieser Vektor kann nicht mit dem Vektor pBR322 in einer Zelle vorliegen, da beide den gleichen ori besitzen. Für pPHB331, pPHB333, pPHB335 wurde pBR322 als Klonierungsvektor verwendet [253] [254] [255]. Die genaue Ursache wurde nicht im Rahmen dieser Arbeit geklärt.

Da aus den Komplementationsversuchen (siehe Abschnitt 4.6.1) bekannt war, dass sich pACYC177 [240] als Klonierungsvektor für MIIII Δicd 7 bp eignete, wurde in diesen das Reportergen *PacrAB::luc* aus pPHB331 kloniert (MSc. A. REINHARDT, pHPAR177-01.1). pACYC177 besitzt einen p15A-Replikationsursprung (ORI) und Resistenzfaktoren für Kanamycin und Betalactame [240]. Für weitere Fragestellungen wurden ein Kontrollplasmid mit *PacrEF::luc* (pHPHP177-04.1) und ein Plasmid mit *luc* ohne Promotor (pHPHP177-05.1) kloniert.

4.6.7.3.6 *Klonierung pHPHP177-04.1*

In der Literatur wird beschrieben, dass für den Efflux von Fluorchinolonen in *Escherichia coli* hauptsächlich die zur RND-Superfamilie gehörende AcrAB/TolC-Effluxpumpe verantwortlich ist [34][248]. Wegen ihrer Homologie zur AcrAB/TolC-Effluxpumpe, wurde für die RND-Effluxpumpe AcrEF/TolC ein ähnliches Substratspektrum diskutiert [55][256], was durch die Arbeiten von Dr. N. MATTHIESSEN widerlegt wurde [181]. Zur Kontrolle dieser Aussage wurde das Reportergenplasmid pHPHP177-04.1 konstruiert. Anstelle des Promotors *PacrAB* war hier der Promotor *PacrEF* mit dem *luc*-Gen fusioniert. Für die Klonierung von pHPHP177-04.1 wurde das Reportergen *PacrEF::luc* aus pPHB333 mit dem Restriktionsenzym *Pst*I ausgeschnitten und

nach Gelelektrophorese aus dem Gel isoliert. Wie das Reporter-genkonstrukt wurde auch der Vektor pACYC177 mit demselben Restriktionsenzym fragmentiert (Abschnitt 2.2.2.5.1) und danach dephosphoryliert. *PacrEF::luc* wurde mit dem linearisierten Vektor ligiert und verschiedene Bakterienstämme wurden transformiert. pHPHP177-04.1 war 6196 bp groß und enthielt noch ein intaktes Gen für eine Kanamycin-Phosphatase, die für Selektionszwecke eine Kanamycinresistenz vermittelt. Durch die Insertion des Reporter-gen-Konstrukts wurde das in pACYC177 vorhandene Gen für die Betalactamase defekt [240]. Transformanden wurden auf Selektiv-LB-Agarplatten überimpft. Positive Klone wuchsen auf Kanamycin-LB-Agarplatten [40 mg/ml], jedoch nicht auf Ampicillin-haltigen LB-Agarplatten [100 µg/ml]. Nach Plasmidisolierung aus fünf Transformanden wurde ein Restriktionsverdau durchgeführt und die gespaltenen Plasmide gelelektrophoretisch aufgetrennt. Da ungerichtet kloniert wurde, waren die Restriktionsenzyme so zu wählen, dass anhand des Bandenmusters die gewünschte Orientierung des Inserts vorlag, und das Reporter-gen nicht unter Kontrolle des Betalactamasen-Promotors stand (Tabelle 4-40).

Tabelle 4-40 Fragmentgrößen pHPHP177-04.1 nach Verdau mit *PstI* oder *XbaI*+ *BamHI*

pHPHP177-04.1 (6196 bp)	PstI	<i>XbaI</i> und <i>BamHI</i>	
		Richtige Orientierung	falsche Orientierung
	3941 bp (pACYC177)	3618 bp	4679 bp
	2255 bp (<i>PacrEF::luc</i>)	2578 bp	1517 bp

Zuerst wurde mit *PstI* fragmentiert, um die richtigen Transformanden zu selektieren. Anschließend wurden die isolierten Plasmide mit *XbaI* und *BamHI* einem Doppelverdau unterzogen, um das Plasmid mit der richtigen Orientierung zu finden (Abbildung 4-39, Abbildung 4-40, Abbildung 4-41, Abbildung 4-42).

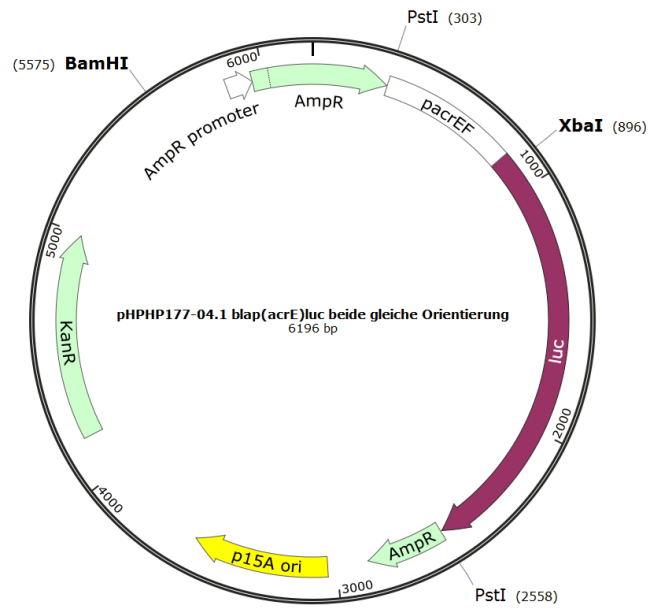


Abbildung 4-39 pPHP177-04.1 (eigene Darstellung), falsche Orientierung

Das Reportergen *PacrEF::luc* hat die gleiche Orientierung mit dem Promotor der Betalactamase

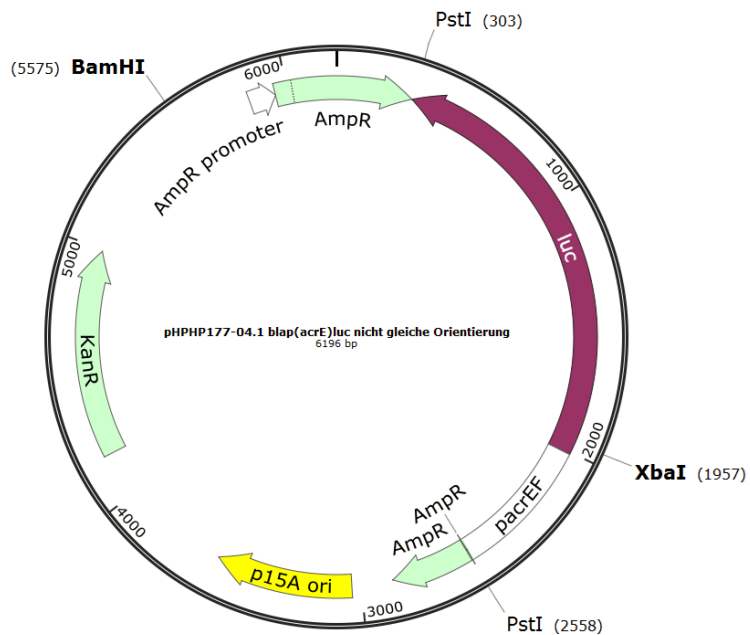


Abbildung 4-40 pPHP177-04.1 (eigene Darstellung), mit richtiger Orientierung

gewünschte Orientierung vom Promotor der Betalactamase zum Reportergen *PacrEF::luc*

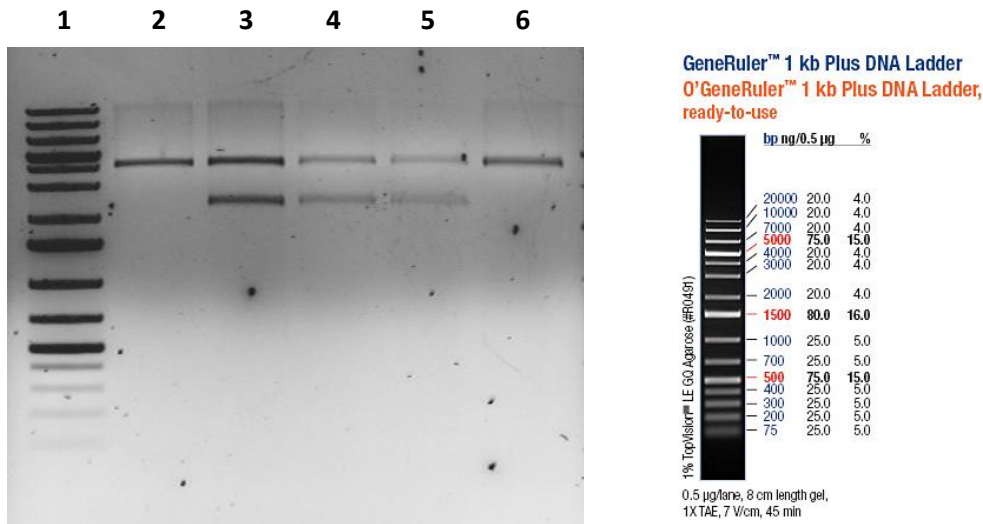


Abbildung 4-41 Gelelektrophoretische Trennung der Plasmid-Fragmente von pHPHP177-04.1 nach Isolierung aus fünf Transformanden und Restriktionsverdau mit *Pst*I

TAE-Agarosegel, 1,0%, 1-fach E-Puffer, 100 V; Ethidiumbromidfärbung; Spur 1: Größenmarker; Spur 2 bis 6: Plasmidisolierung aus Transformanden

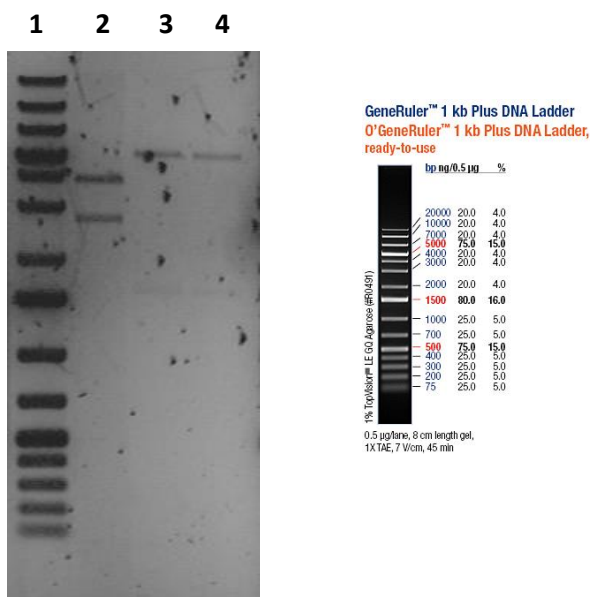


Abbildung 4-42 Plasmid-Fragmente von pHPHP177-04.1 nach Verdau *Xba*I und *Bam*HI

TAE-Agarosegel, 1,0%, 1-fach E-Puffer, 100 V; Ethidiumbromidfärbung
Plasmid mit richtiger Orientierung in Spur 2; Fragmentgrößen siehe Tabelle 4-40

4.6.7.3.7 Klonierung pHPHP177-05.1

Das Plasmid pHPHP177.05.1 sollte als Kontrollplasmid dienen. Erwartet wurde, dass kein Signal bei diesem Plasmid zu messen war, da kein Promotor vor dem Luciferasegen *luc* lag. Zur Konstruktion wurde eine SSM-PCR (englisch: *site specific mutagenesis*; Grundprinzip in

Abbildung 4-43) verwendet, um den Promotor *PacrAB* aus pHPAR177-01.1 zu entfernen. Eine SSM-PCR besteht aus einer homologen Rekombination und ortsspezifischen Mutagenese durch Totalreplikation von Plasmiden mit überlappenden Primern (englisch: *Rolling Circle*, Abschnitt 2.2.2.9).

Durch eine Anwendung des Recombineerings konnte *in vivo* per SSM-PCR das Plasmid in JM109 kloniert werden. Da es nicht gelang mittels Phusion High-Fidelity DNA Polymerase das lineare Fragment für die *In-vivo*-Klonierung von pHPHP177-05.1 zu amplifizieren, wurde die DreamTaq DNA Polymerase verwendet. Mit den Primern wurde aus pHPAR177-01.1 per *Rolling Circle* ein 5649 bp langes PCR-Produkt amplifiziert, das nicht mehr *PacrAB* enthielt. Nach Isolierung von pHPAR177-01.1 und Aufreinigung wurde mit der DreamTaq™ Polymerase ein 5968 bp großes Fragment amplifiziert mit den Primern `blap_acrA_luc_fw_5648_pACYC177_rolling_circle` und `blao_acrA_luc_rw_5619_pACYC177_rolling_circle`.

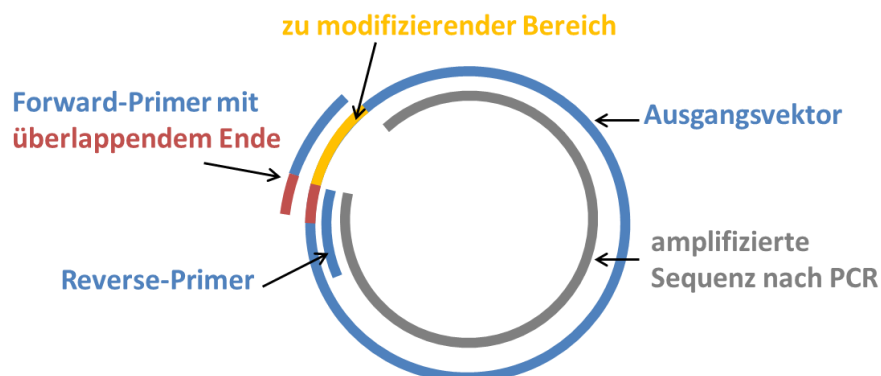


Abbildung 4-43 Grundprinzips einer SSM-PCR mit dem Ziel der Deletion eines Sequenzbereiches innerhalb des Plasmids (orange); eigene Darstellung

Ein Forward-Primer mit homologen Sequenzen (rechts im Bild) wird in einer SSM-PCR verwendet, um einen Abschnitt des Plasmids zu modifizieren (gelb). Es resultiert ein Amplicon (grau), das den gelben Bereich nicht mehr enthält. Nach Transformation in *E. coli* JM109 kann mittels homologer Rekombination ein Plasmid gebildet werden.

4.6.7.3.7.1 Verdau mit *DpnI*

Das SSM-PCR-Amplicon wurde mit *DpnI* behandelt. *DpnI* erkennt methylierte DNA, die aus Bakterien isoliert wurde und spaltet diese. Nach dem Verdau wurden direkt CaCl_2 -kompetente *E. coli* JM109-Zellen mit SSM-PCR-Amplicon transformiert und auf Kanamycin-Selektiv-Agarplatten ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Als Kontrolle wurde in einem weiteren Ansatz JM109 mit 0,6 µl einer 1:500 pHPAR177-01.1-Verdünnung transformiert und auch

auf Selektiv-Agarplatten ausgestrichen. Nach Transformation von JM109 mit dem amplifizierten linearen Produkt und Ausstreichen auf Kanamycin-Selektionsagarplatten wurde für 18 h bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden von gewachsenen Kolonien weitere ÜNK angesetzt und am Folgetag eine Alkalische Lyse ausgeführt (Abschnitt 2.2.2.1.4). Durch den Wegfall von *PacrAB* fiel eine Schnittstelle für *BglII* weg, was zur Charakterisierung des Plasmids ausgenutzt wurde. Bei einem Doppelverdau von pHPAR177-01.1 mit *BamHI* + *BglII* sollte eine Bande bei ca. 3000 bp zu sehen sein, die sich aus zwei ähnlich großen Fragmenten zusammensetzte. Nach Restriktionsverdau sollte die fehlende Schnittstelle in pHPAR177-05.1 dazu führen, dass nach Auftrennung im Agarosegel eine Bande oberhalb der 5000 bp Markierung zu sehen war (vergleiche Tabelle 4-41, Abbildung 4-44 und Abbildung 4-45).

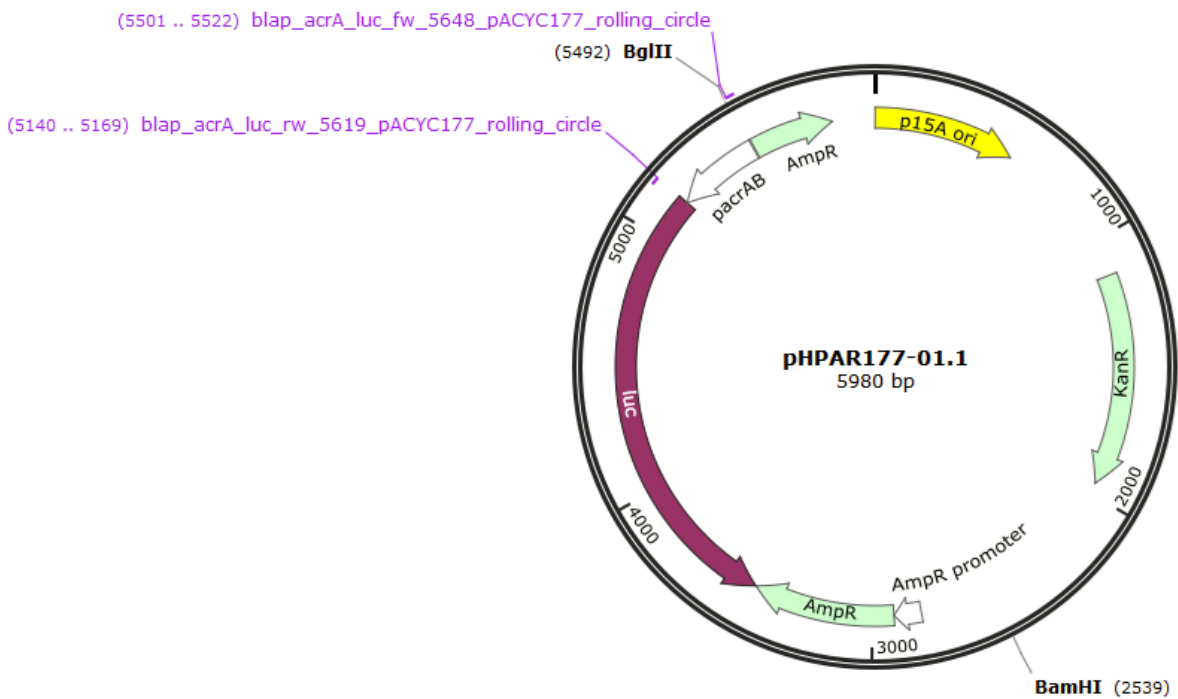


Abbildung 4-44 pHPAR177-01.1 mit den Primern für die SSM-PCR; die Schnittstelle für *BglII* ist innerhalb *PacrAB* vorhanden

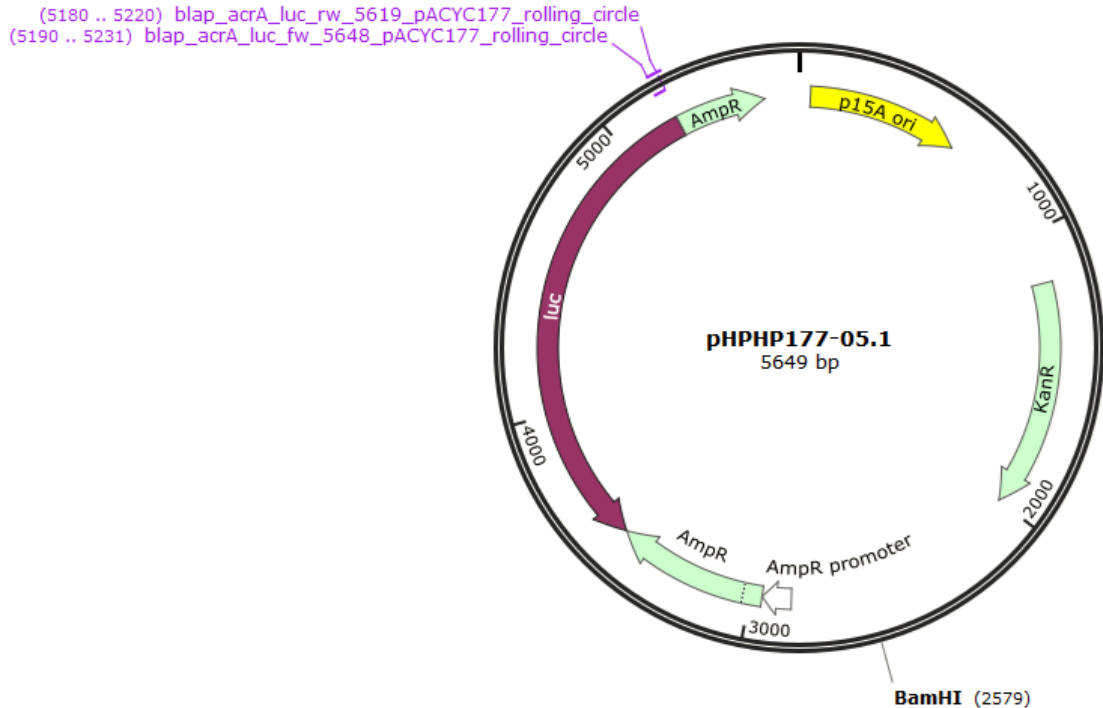


Abbildung 4-45 pPHP177-05.1 mit Primern der SSM-PCR; Schnittstelle für *Bg*III ist nicht mehr vorhanden

Tabelle 4-41 Fragment nach Verdau mit *Bam*HI und mit oder ohne *Bg*III

Plasmid	pHPAR177-01.1 + <i>Bam</i> HI	pHPAR177-01.1 + <i>Bam</i> HI + <i>Bg</i> III	pPHP177-05.1 + <i>Bam</i> HI	pPHP177-05.1 + <i>Bam</i> HI + <i>Bg</i> III
Fragmentgrößen	5980 bp	3027 bp 2953 bp	5649 bp	5649 bp

Nachdem durch Wachstum auf Kanamycin-Selektiv-Agarplatten und durch den Restriktionsverdau das Plasmid nachgewiesen wurde, wurde mittels Elektroporation der *E. coli*-Stamm WT mit dem Plasmid transformiert. Die Ergebnisse der Messungen mit pPHP177-05.1 finden sich in Abschnitt 4.6.7.3.11.

4.6.7.3.8 Vorbereitungen zur Messung der Luciferase-Aktivität

Die Luciferase-Aktivität wurde mithilfe des Reportersystems pHPAR177-01.1 gemäß Abschnitt 2.2.3.2 gemessen. In den folgenden Kapiteln sind die Kontroll-Messungen und Kalibrierungen beschrieben, um die Hintergrundaktivität zu ermitteln.

Die verwendeten Mikrotiterplatten (MicroFOUR™, DYNATEC) wurden zuerst auf Verunreinigungen überprüft und mit Aqua dest. gespült und getrocknet. Bei den Messungen der Luciferase-Aktivität wurde bei jeder Messreihe an unterschiedlichen Platten-Positionen eine leere Kavität

mitvermessen. Die ermittelten Werte lagen dabei im zwei- bis dreistelligen Bereich. Im Vergleich dazu befanden sich die Werte der Proben im sieben- bis achtstelligen Bereich. Darüber hinaus wurde pro Messreihe LAR (englisch: *Luciferase Assay Reagent*) ohne Zugabe von Bakterienextrakt vermessen. Hier wurden Werte in der Dimension der leeren Kavitäten ermittelt, so dass Verunreinigungen durch Reporter-genplasmid-tragende Bakterien ausgeschlossen wurden. Ermittelt wurde nur durch die Reaktion der Luciferase emittiertes Licht.

In der ersten durchgeführten Messung (siehe Abschnitt 4.6.7.3.1 und Abbildung 4-36) wurde der Mittelwert der Leerwerte von den absoluten RLU-Werten abgezogen, und dann der spezifische RLU/OD-Quotient ermittelt. Zur Beantwortung der Aufgabenstellung in den späteren Messungen wurden die auf den Ausgangszustand bezogenen RLU-Werte herangezogen, und die Messwerte der Leerwerte zur Berechnung der spezifischen RLU-Quotienten nicht beachtet. Die Messwerte der leeren Kavitäten dienten als Negativ-Kontrolle.

Eine Messung der Luciferase-Aktivität im Reporter-gen-freien *E. coli*-Stamm MII zeigte keine Aktivität, so dass davon auszugehen war, dass in Abwesenheit der Luciferase, bzw. des Luciferasegens (*luc*), kein Luciferin zu Oxyluciferin umgesetzt wurde. Ermittelte Messwerte lagen im Größenbereich der leeren Kavitäten (Abbildung 4-36). Die Messung der Luciferase-Aktivität eignete sich zur Expressionsuntersuchung, da Lichtsignale nur erfasst wurden, wenn ein Plasmid vorhanden war.

Als weitere Kontrolle wurde in jeder Messreihe der Bakterienstamm mit Reporter-gen-system ohne LAR vermessen, so dass keine Lichtsignale resultierten. Bei der Messung in Abschnitt 4.6.7.3.1 wurde deutlich, dass der Zeitpunkt der Messung nach Zugabe von LAR für die Fragestellung in dieser Arbeit von Bedeutung war, da die absoluten RLU-Werte mit der Zeit abnahmen. Um eine große Zeitdifferenz zwischen Zugabe von LAR bei der ersten Probe und zur letzten Probe zu vermeiden, wurden höchstens dreimal fünf Proben pro Messreihe und die dazugehörigen Kontrollen vermessen. Es wurde geachtet innerhalb von 10 s zu arbeiten und die Luciferase-Aktivität direkt nach vollständiger Zugabe des LAR zu messen. Laut Literatur sollte der Lysis-Mix die Luciferase stabilisieren [223]. Die Proben wurden doppelt vermessen, wobei ein Zeitabstand von 15 bis 20 Minuten zwischen der ersten und zweiten Messung bestand. Ein Vergleich der Messwerte der beiden Messungen entsprach den Herstellerangaben (Promega) [223]. Die Messwerte lagen in den gleichen Größenbereichen und waren daher vergleichbar. Auch in der Arbeit von Dr. M. ABU MRAHEIL (2005) wurde die gleiche Beobachtung gemacht

[224]. So wurde aus den Messwerten beider Messungen ein Mittelwert gebildet und mit diesem zur weiteren Auswertung gearbeitet.

Sämtliche Messungen wurden mit einem Lysis-Mix der gleichen Rezeptur durchgeführt. Ein Vergleich zur Rezeptur nach Herstellerangaben wurde nicht gemacht. Es war davon auszugehen, dass der Lysis-Mix allein der Stabilisierung der Luciferase diene und keinen Einfluss auf die relative Luciferase-Aktivität besaß. Um auszuschließen, dass der pH-Wert des verwendeten Wassers einen Einfluss auf die Messergebnisse hatte, wurden die pH-Werte verschiedener Wasserquellen im Pharmazeutischen Institut mit einem pH-Meter kontrolliert (Tabelle 4-42). Ein niedriger pH-Wert könnte einen Einfluss auf die Ergebnisse haben, z. B. bei der Protein-Gesamtgehaltbestimmung nach BRADFORD (Abschnitt 2.2.3.1). Die Reagenzlösungen zur Messung der Luciferase-Aktivität wurden mit „VE-Wasser, 2. Stock“ angesetzt.

Tabelle 4-42 pH-Werte Wasser unterschiedlicher Quellen

Quelle	pH-Wert
Leitungswasser, Raum U15	7,4
Merck-Wasser, 1. Stock	8,2
Millipore-Wasser, Raum U5	6,6
MilliQ, Raum U11	6,9
VE-Wasser, 2. Stock	8,1
VE-Wasser, Keller	7,5

Für die Vergleichbarkeit der einzelnen Messreihen war die Versuchsdurchführung nicht zu verändern. Aus organisatorischen Gründen wurde nicht bei allen Messungen im Vorfeld ein Schüttelinkubator verwendet. Alternativ wurde ein Wasserbad genutzt. Die Auswertung der Messergebnisse zeigte hier, dass die ermittelten absoluten Luciferaseaktivitäten niedriger ausfielen, verglichen mit absoluten Luciferaseaktivitäten nach Inkubation im Schüttelinkubator. Eine ÜNK wurde 1:100 verdünnt und als ÜTK bis zu einer $OD_{550\text{ nm}}$ von 0,45 bis 0,6 angezogen, da sich die *E. coli*-Stämme in diesem Bereich in der logarithmischen Wachstumsphase befanden, und laut Literatur ein linearer Zusammenhang zwischen $OD_{550\text{ nm}}$ und dem gemessenen absoluten RLU-Wert bestand [224]. Bei den Kulturen einer Messreihe wurden die Proben möglichst immer zur gleichen $OD_{550\text{ nm}}$ entnommen, um gleiche Messbedingungen zu schaffen und diese untereinander vergleichbar zu machen.

Um den Protein-Gesamtgehalt zu bestimmen wurde die Kalibriergerade nach BRADFORD ermittelt. Die Standardverdünnungsreihen von BSA und Lysozym wurden in 0,3 M Natronlauge gelöst, da sich die Proben zum Zeitpunkt der Messung ebenfalls in diesem Medium befanden.

Sobald neue Reagenzlösungen zur Untersuchung angesetzt wurden, war auch eine neue Kalibriergerade zu erstellen. Mit einer Dreifachbestimmung konnte aus den Mittelwerten eine Kalibriergerade erstellt werden. In Abbildung 4-46 ist die Kalibriergerade unter Angabe der Geradengleichung und des Bestimmtheitsmaßes zu sehen. Standardlösungen mit einer Konzentration von 500 µg/ml wurden bei der Erstellung der Kalibriergeraden nicht berücksichtigt, da diese mit den anderen Konzentrationen nicht in einen linearen Zusammenhang gebracht werden konnten.

Neben einer Lysozym-Verdünnungsreihe wurde eine BSA-Verdünnungsreihe zur Erstellung der Kalibriergerade verwendet (siehe Abbildung 4-47). Für Lysozym und BSA war kein Unterschied der Kalibriergeraden und des Bestimmtheitsmaßes zu sehen. Für die nachfolgenden Kalibriergeraden wurde eine Lysozym-Verdünnungsreihe verwendet, weil die erste Luciferase-Aktivitäts-Messung (Abbildung 4-46) auch mit Lysozym ausgewertet wurde und noch ausreichend Lysozym-Standardlösung vorhanden war (Abbildung 4-48 und Abbildung 4-49). Die Messung vom 17.07.2014 wurde mit der Kalibriergeraden vom 15.07.2014 ausgewertet.

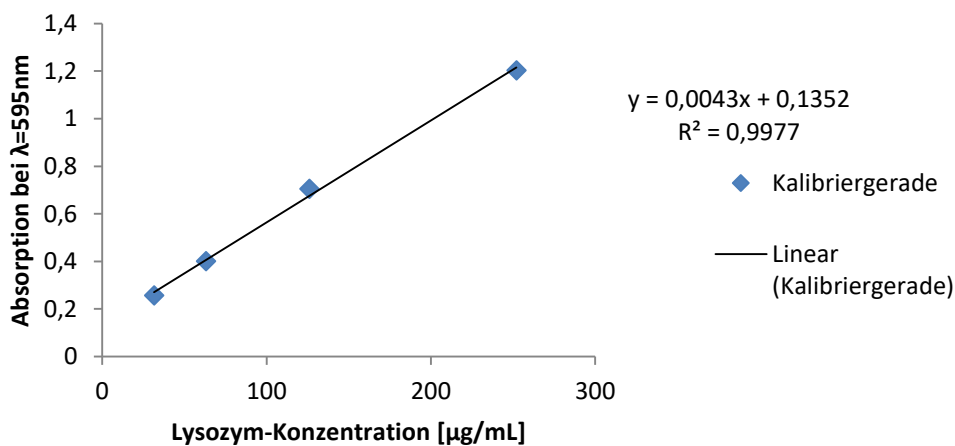


Abbildung 4-46 Kalibriergerade zur Protein-Gesamtgehalt-Bestimmung vom 10.07.2014 unter Verwendung einer Lysozym-Standardlösung in 0,3 M NaOH

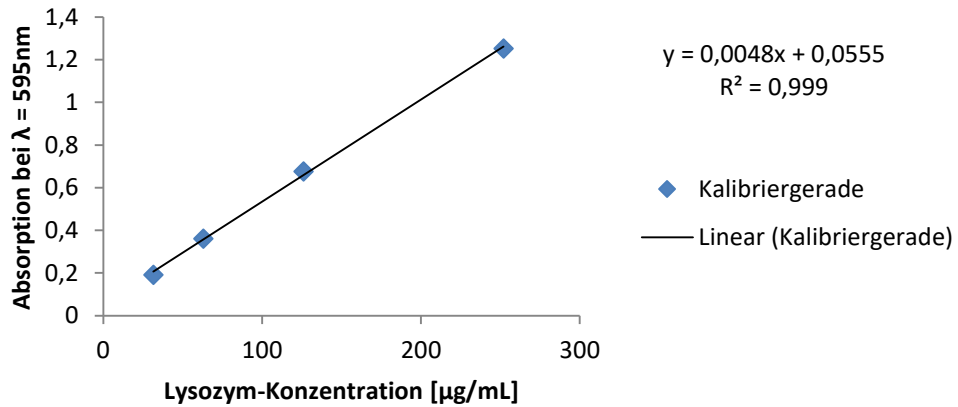


Abbildung 4-47 Kalibriergerade zur Protein-Gesamtgehalt-Bestimmung vom 15.07.2014 unter Verwendung einer Lysozym-Verdünnungsreihe in 0,3 M NaOH

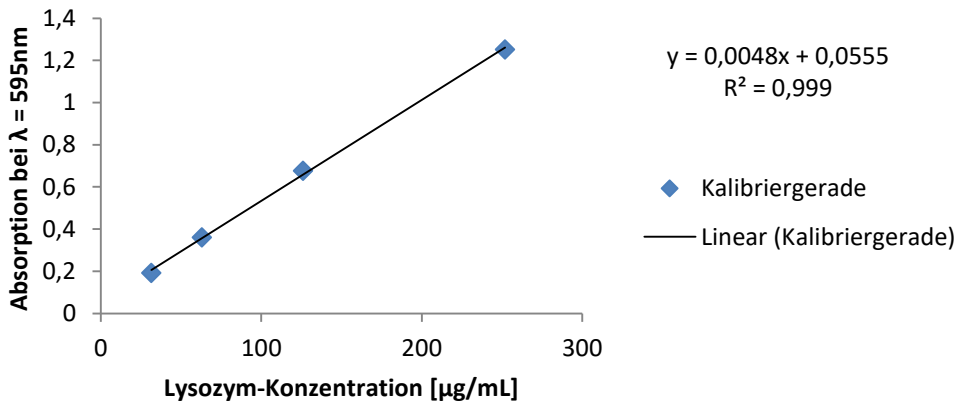


Abbildung 4-48 Kalibriergerade zur Protein-Gesamtgehalt-Bestimmung vom 17.07.2014 unter Verwendung einer Lysozym-Verdünnungsreihe in 0,3 M NaOH

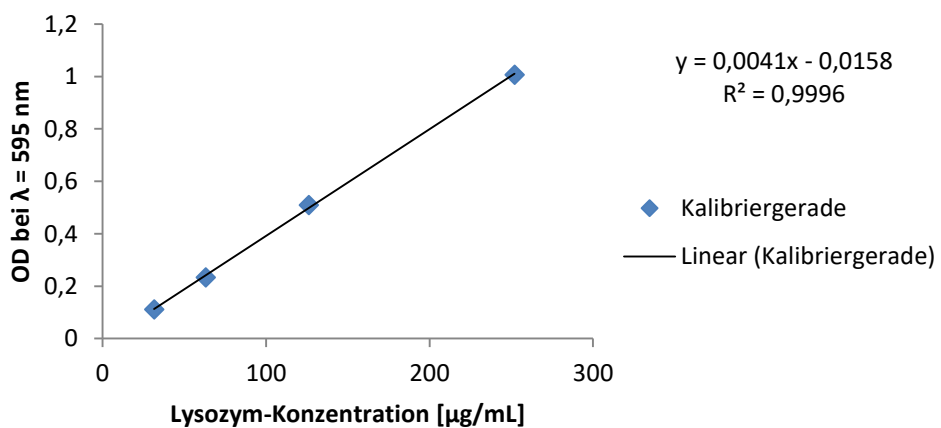


Abbildung 4-49 Kalibriergerade zur Protein-Gesamtgehalt-Bestimmung vom 14.08.2014 unter Verwendung einer Lysozym-Verdünnungsreihe in 0,3 M NaOH

4.6.7.3.9 Messung der Promotoraktivität *PacrAB*

In den nächsten Kapiteln finden sich die Ergebnisse der Messungen der *PacrAB*-Aktivität mit dem Reporterplasmid pHPAR177-01.1. Während der Anzucht wurde mit Kanamycin (40 µg/ml) gearbeitet; bei MII Δ *icd* 7 bp pHPNE19-02.1 mit Ampicillin (100 µg/ml).

4.6.7.3.9.1 Einfluss unterschiedlicher Mutationen auf die Expression von *PacrAB* in *E. coli*

In der ersten Messung der Luciferase-Aktivität (10.07.2014) wurde die *PacrAB*-Aktivität in den isogenen *E. coli*-Stämmen WT (GK571), MI (GK572), MII (GK573), MII Δ *icd* 7 bp und zusätzlich in *E. coli*-Stamm JM109 untersucht. WT diente als Bezugsgröße (Tabelle 4-43).

Tabelle 4-43 Spezifische Luciferase-Aktivitäten (Mittelwerte)

Messung nach Abschnitt 2.2.3.2; Die Quotienten aus RLU/KBE und RLU/Proteingehalt wurden pro 1 ml und pro 90 µl berechnet; für die Luciferase-Aktivität-Messung wurden 90 µl bei der Messung verwendet

Bezugsvolumen	1 ml	1 ml	90 µl	1 ml	90 µl
Stamm	RLU/OD	RLU/KBE	RLU/KBE	RLU/Protein	RLU/Protein
WT pHPAR177-01.1	1028681	3,04E-03	3,38E-02	6555	72829
MI pHPAR177-01.1	1575064	3,28E-03	3,64E-02	12324	136931
MII pHPAR177-01.1	3053883	1,12E-02	1,25E-01	22744	252708
MII Δ <i>icd</i> 7 bp pHPAR177-01.1	2876925	8,99E-03	9,99E-02	17498	194423
JM109 pHPAR177-01.1	912714	8,05E-03	8,95E-02	5578	61974

Über die Standardkurve und der Geradengleichung aus Abbildung 4-46 wurde der Proteingehalt (Abschnitt 2.2.3.1) berechnet. In der Luciferase-Messung selbst wurden 90 µl an aufbereiteter Probe vermessen. Anschließend wurde dieser Quotient auf 1 ml umgerechnet, da KBE, OD und Proteingehalt sich auf 1 ml bezogen. Die auf WT bezogene relative Luciferase-Aktivitäten sind mit einer prozentualen Standardabweichung in Tabelle 4-44 gelistet.

Tabelle 4-44 Auf *E. coli*-Stamm WT bezogene relative Luciferase-Aktivitäten inkl. prozentualer Standardabweichung

Stamm	RLU/OD	RLU/KBE	RLU/Protein
WT pHPAR177-01.1	100 ± 1	100 ± 9	100 ± 1
MI pHPAR177-01.1	153 ± 6	108 ± 34	188 ± 3
MII pHPAR177-01.1	297 ± 10	369 ± 74	347 ± 4
MII Δ pHPAR177-01.1	280 ± 9	296 ± 8	267 ± 5
JM109 pHPAR177-01.1	89 ± 4	265 ± 91	85 ± 2

Die Verwendung der KBE bzw. des Quotienten aus RLU und KBE eignete sich nicht, um eine relative Luciferase-Aktivität abzubilden, da die Quotienten von den Werten der anderen Quotienten abwichen. Auch wiesen die Quotienten aus RLU/KBE große Abweichungen untereinander in den Einzelwerten auf. Das erklärte die großen Standardabweichungen dieses Quotienten (Abbildung 4-50). Hier ließen sich keine Ergebnisse reproduzieren. Auch bei späteren Messungen war zu sehen, dass die gebildeten Quotienten große Abweichungen untereinander hatten. Daher wurde in den weiteren Messungen nur die $OD_{550\text{ nm}}$ und die Proteingesamtmenge zur Erstellung eines Quotienten verwendet. Hier ließen sich vergleichbare und reproduzierbare Ergebnisse erreichen. Die Aussagefähigkeit der einzelnen Quotienten wird in Abschnitt 5.4.7.2 diskutiert.

Der *E. coli*-Stamm MI weist die *gyrA*-Mutation S83L auf. Hier wurde eine Zunahme von 50 % bis 100 % der Aktivität für *PacrAB* zu WT ermittelt. Gleiche Ergebnisse finden sich in der Arbeit von Dr. N. MATTHIESSEN [181]. In den Arbeiten von HEISIG *et al.* finden sich Untersuchungen zur Akkumulation von Ciprofloxacin [167]. Hier wurde der *E. coli*-Stamm MI mit dem Ausgangsstamm WT verglichen und abhängig vom Zeitpunkt der Messung ließ sich eine Akkumulation von 65% bis 85% an Ciprofloxacin-Konzentration im Vergleich zu WT finden. Für *E. coli* MII war dieser Unterschied ausgeprägter, und konnte mit der Zunahme der in dieser Arbeit gemessenen *PacrAB* Expression erklärt werden. Die Luciferase-Aktivität in MII und MII Δicd 7 bp befand sich auf gleichem Niveau. Die zusätzliche Deletion in MII Δicd 7 bp zeigte keinen Einfluss auf die Promotoraktivität. Auf gleichem Niveau befanden sich auch die MHK der beiden Stämme [257], [258]. In MII und MII Δicd 7 bp lag eine drei bis dreieinhalbfache Luciferase-Aktivität im Vergleich zu WT vor. Die erhöhte Aktivität war der *marR*-Deletion geschuldet [181]. Bei *E. coli* JM109 hatte die Mutation *gyrA96* keine Auswirkung auf die Promotoraktivität.

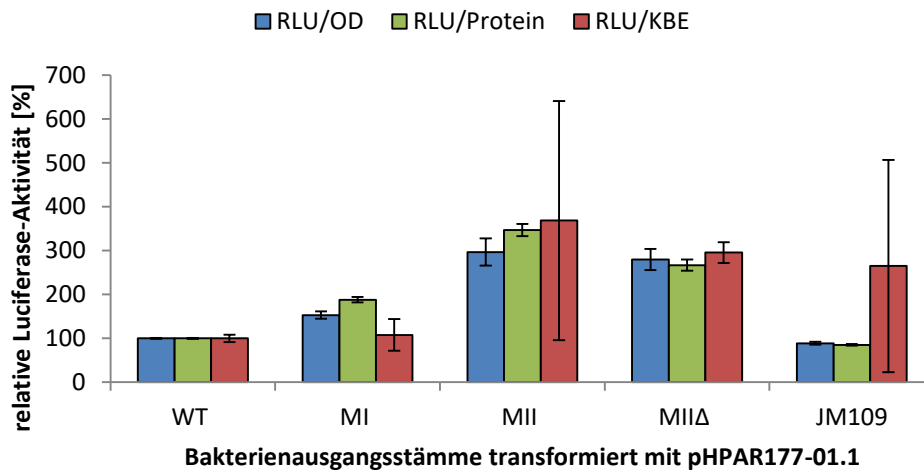


Abbildung 4-50 Messungen der Aktivität von *PacrAB* ausgewählter *E. coli*-Stämme mit pHPAR177-01.1 bezogen auf *E. coli*-Stamm WT vom 10.07.2014

In der ersten Messung der Luciferase-Aktivität vom 10.07.2014 wurden die bisherigen Literaturergebnisse reproduziert und mit den *E. coli*-Stämmen JM109 und MII Δ icd 7 bp verglichen. In den nächsten Messungen sollten alle Stämme vermessen werden, die mit pHPAR177-01.1 transformiert wurden. Den Vorgaben in Abschnitt 2.2.3.2 folgend, wurde diese Messung (15.07.2014) durchgeführt. Aus organisatorischen Gründen wurde bei dieser Messung statt im Schüttelinkubator im Wasserbad angezogen (Tabelle 4-45).

Die Luciferase-Aktivität für *E. coli*-Stamm MII Δ icd 7 bp pHPNE19-02.1 mit pHPAR177-01.1 konnte in dieser Messreihe (15.07.2014) nicht vermessen werden, da dieser Stamm in der ÜTK nicht gewachsen war. Als Bezugsgröße diente die Luciferase-Aktivität in *E. coli* WT. Aus der Bestimmung der Gesamtproteinmenge wurden für MII sehr geringe Werte erhalten, so dass der RLU/Protein-Quotient verglichen zur vorherigen Messung groß ausfiel. Der Quotient aus RLU/Protein für MII konnte nicht verwendet werden. In der Messung, die in Abbildung 4-50 zu sehen ist, lagen die Quotienten RLU/Protein und RLU/OD in der gleichen Größenordnung. Es wurde in der Messung vom 15.07.2014 davon ausgegangen, dass die Bestimmung des Gesamtproteingehaltes nicht erfolgreich durchgeführt wurde. Bei einem unvollständigen Zellaufschluss werden niedrige Mengen Protein gemessen.

Tabelle 4-45 Ergebnisse der Messung vom 15.07.2014

Alle Transformanden enthalten Plasmid pHPAR177-01.1

Bezugsvolumen	1 ml	1 ml	1 ml	90 µl
Stamm	RLU/OD	RLU/KBE	RLU/Protein	RLU/Protein
WT pHPAR177-01.1	791007	4,16E-03	4987	55408
MI pHPAR177-01.1	1659875	5,79E-03	10554	117265
MII pHPAR177-01.1	4695520	1,65E-02	201823	2242477
MIIΔ pHPAR177-01.1	4462441	2,06E-02	27015	300165
JM109 pHPAR177-01.1	959150	1,08E-02	7100	78885
AI43 pHPAR177-01.1	nicht in ÜTK angewachsen, ergo keine Messung möglich			
AII21 pHPAR177-01.1	4943034	1,76E-02	29801	331120
AIII13 pHPAR177-01.1	5084759	1,93E-02	32589	362102
BII18 pHPAR177-01.1	4918527	3,03E-02	31495	349943
BIII27 pHPAR177-01.1	5134030	2,54E-02	32220	358000

Unter Angabe der prozentualen Standardabweichungen sind die Mittelwerte der relativen Luciferase-Aktivitäten in Tabelle 4-46 angegeben und in Abbildung 4-51 dargestellt.

Tabelle 4-46 Ergebnisse der Messung vom 15.07.2014 -Luciferaseaktivität auf WT bezogen

Stamm	RLU/OD	RLU/Protein
WT pHPAR177-01.1	100 ± 12	100 ±
MI pHPAR177-01.1	211 ±	213 ±
MII pHPAR177-01.1	602 ±	4106 ±
MIIΔ pHPAR177-01.1	571 ±	548 ±
JM109 pHPAR177-01.1	123 ±	145 ±
AI43 pHPAR177-01.1	nicht in der ÜTK angewachsen	
AII21 pHPAR177-01.1	630 ±	603 ±
AIII13 pHPAR177-01.1	638 ±	649 ±
BII18 pHPAR177-01.1	626 ±	636 ±
BIII27 pHPAR177-01.1	662 ±	659 ±

Die Ergebnisse vom 15.07.2014 zeigten für die Mutanten aus dem MII Ciprofloxacin-Forward-Assay (Abschnitt 4.2) eine Luciferase-Aktivität in der gleichen Größenordnung, wie bei Ausgangsstamm MII (Abbildung 4-51). Auch zeigten die Promotoraktivitäten von MII und MII Δicd 7 bp Werte auf dem gleichen Niveau. Das war auch in der Messung vom 10.07.2014 (Abbildung 4-50) der Fall. Die intern als AII21, AIII13, BII18 und BIII27 bezeichneten Stämme wiesen in der QRDR keine zusätzlichen Mutationen auf (Abschnitt 4.4.2.2). Für diese vier Mutanten wurden keine Genomsequenzierungen durchgeführt. Nach *plasmid-curing* (gemäß Abschnitt 2.2.1.11) lag die MHK von Fluorchinolonen für diese Mutanten nicht höher als für MII (Tabelle 4-27 und Tabelle 4-28) [258]. Auch schien unter Abwesenheit von pHPNE19-02.1 und pHPNE18-01.1 keine Mutation vorzuliegen, die eine Erhöhung der *PacrAB* Expression bewirkte.

Die Promotoraktivitäten für MII und MII Δicd 7 bp aus der Messung vom 10.07.2014 (Abbildung 4-50) ließen sich in der Messung vom 15.07.2014 (Abbildung 4-51) bestätigen. Hier betrug das Verhältnis zum Ausgangsstamm WT 6:1, während in der Messung vom 10.07.2014 das Verhältnis bei 3:1 lag. Die relative Luciferase-Aktivität wird als Quotient angegeben. Hier kann es zu unterschiedlichen Verhältnissen in verschiedenen Messreihen kommen. Abweichungen der Einzelwerte führen im Ergebnis zur Veränderung des Gesamt-Quotienten und somit zu einem Verhältnisunterschied.

Abweichend zur Messung vom 10.07.2014 wurden in der Messung vom 15.07.2014 die Stämme WT, MI und JM109 im Wasserbad statt im Schüttelinkubator inkubiert, was einen Einfluss auf die Wachstumsphase der Kulturen haben könnte. Diese drei Stämme haben in beiden Messungen die gleichen Verhältnisse zueinander behalten. Die Luciferase-Aktivität in MI ist um das 1,5- bis 2-fach größer im Vergleich zum Ausgangsstamm WT. Die Messwerte für JM109 sind in der gleichen Größenordnung wie bei WT. In dieser Messreihe wurden uneinheitliche Kolbengrößen verwendet, was zur unterschiedlichen Belüftung der Kulturen führte. Die Bedingungen werden in Abschnitt 5.4.7.3 diskutiert.

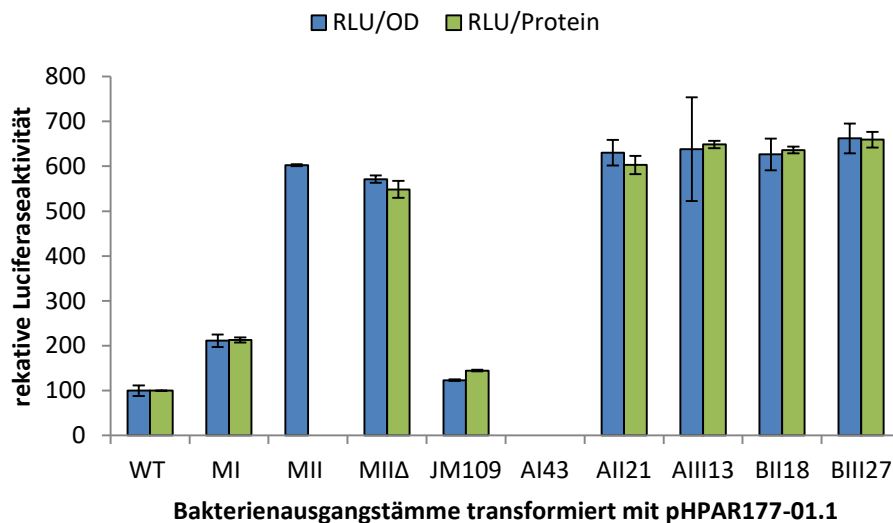


Abbildung 4-51 Messungen der Aktivität von *PacrAB* vom 15.07.2014 ausgewählter *E. coli*-Stämme mit pHPAR177-01.1 bezogen auf *E. coli*-Stamm WT

4.6.7.3.9.2 Einfluss von Fluorchinolonen auf die Expression von *PacrAB* in *E. coli*-Stamm

In den folgenden Messungen wurde die *PacrAB*-Expression unter Einfluss von Norfloxacin betrachtet. Bei Fluorchinolon-Resistenz war bekannt, dass diese mit einer *acrAB-toIC*-Überexpression korreliert [259], [260]. Je nach MHK von Norfloxacin für den jeweiligen Stamm wurden verschiedene Konzentrationen entsprechend einer 0,5- bis 1-fachen MHK eingestellt (MHK in Abschnitt 4.6.4.2).

Zum besseren Vergleich erfolgte für jeden Stamm eine weitere Untersuchung bei einer Konzentration für Norfloxacin von 0,5 µg/ml. Die Zugabe des Antibiotikums erfolgte im Bereich zwischen OD_{550 nm} 0,09 und OD_{550 nm} 0,14. Als Reporterplasmid wurde pHPAR177-01.1 verwendet. Für die Messung der *PacrAB* Expression (17.07.2014) unter Einfluss von Norfloxacin wurden MII, MII *Δicd* 7 bp und MII *Δicd* 7 bp pHPNE19-02.1 (AI43) untersucht (Tabelle 4-47).

Tabelle 4-47 Messung 17.07.2014; Norfloxacin-Konzentrationen zur Ermittlung der spezifischen Luciferase-Aktivität ausgewählter Stämme

Nor: Norfloxacin, MHK: minimale Hemmkonzentration; AI43: MII *Δicd* 7 bp pHPNE19-02.1

Ausgangsstamm	MHK (µg/ml)	[Nor I] (µg/ml)	[Nor II] (µg/ml)	[Nor III] (µg/ml)
MII	2	0,5	1	2
MII <i>Δicd</i> 7 bp	4-8	0,5	2	4
AI43	16-32	0,5	8	16
AI43	16-32	Messung ohne Norfloxacin		

Für MII *Δicd* 7 bp pHPNE19-02.1 (AI43) wurde die *PacrAB* Expression zusätzlich ohne Norfloxacin vermessen. Zugleich war diese Messung nachzuholen, da in der Messung vom 15.07.2014 (Abbildung 4-47) dieser Stamm nicht angewachsen war. In Tabelle 4-48 sind die Messwerte der Messung vom 17.07.2014 aufgelistet. Über die Standardkurve vom 15.07.2014 (siehe Abbildung 4-47) wurde der Protein-Gesamtgehalt berechnet.

Tabelle 4-48 Mittelwerte der Messung vom 17.07.2014

Alle Transformanden tragen das Plasmid pHPAR177-01.1;
AI43: MII Δ icd 7 bp pHPNE19-02.1; Nor: Norfloxacin

Bezugsvolumen	1 ml	1 ml	90 μ l
Stamm	RLU/OD	RLU/Protein	RLU/Protein
MII pHPAR177-01.1 + 0,5 μ g/ml Nor	2018067	12629	140323
MII pHPAR177-01.1 + 1 μ g/ml Nor	4721594	29608	328973
MII pHPAR177-01.1 + 2 μ g/ml Nor	4689996	31257	347305
MII Δ pHPAR177-01.1 + 0,5 μ g/ml Nor	4719268	31264	347380
MII Δ pHPAR177-01.1 + 2 μ g/ml Nor	3780116	25801	286682
MII Δ pHPAR177-01.1 + 4 μ g/ml Nor	3463823	27043	300474
AI43 pHPAR177-01.1	4550124	37204	413378
AI43 pHPAR177-01.1 + 0,5 μ g/ml Nor	4917874	36933	410366
AI43 pHPAR177-01.1 + 8 μ g/ml Nor	4141543	31285	347609
AI43 pHPAR177-01.1 + 16 μ g/ml Nor	6617565	41672	463020

In dieser Messreihe wurde als Bezugsgröße MII pHPAR177-01.1 + 0,5 μ g/ml Norfloxacin verwendet. Die Mittelwerte der relativen Luciferase-Aktivitäten mitsamt der prozentualen Standardabweichung finden sich in Tabelle 4-49.

Tabelle 4-49 Ergebnisse der Messung vom 17.07.2014

Mittelwerte der relativen auf MII + 0,5 μ g/ml NFX bezogenen Luciferase-Aktivitäten; mit angegeben ist die prozentuale Standardabweichung; Nor: Norfloxacin

Stamm + Konz. Nor	RLU/OD %	RLU/Protein %
MII + 0,5 μ g/ml Nor	100 \pm 1	100 \pm 7
MII + 1 μ g/ml Nor	234 \pm <1	234 \pm 3
MII + 2 μ g/ml Nor	232 \pm 5	247 \pm 3
MII Δ + 0,5 μ g/ml Nor	234 \pm 2	248 \pm 2
MII Δ + 2 μ g/ml Nor	187 \pm 17	204 \pm 6
MII Δ + 4 μ g/ml Nor	172 \pm 1	214 \pm 8
AI43	225 \pm 4	295 \pm 3
AI43 + 0,5 μ g/ml Nor	244 \pm 2	292 \pm 3
AI43 + 8 μ g/ml Nor	205 \pm 1	248 \pm 7
AI43 + 16 μ g/ml Nor	328 \pm 4	330 \pm 2

Bei AI43 wurde in dieser Messreihe eine Abweichung zwischen RLU/OD und RLU/Proteingehalt-Quotient festgestellt (Abbildung 4-52). In der Messung vom 15.07.2014 war hier noch kein Unterschied zu sehen. Diese Abweichung konnte mit einem nicht vollständig durchgeführten Zellaufschluss der Proteinisolierung erklärt werden, welcher in einem vermeintlich geringeren Proteingehalt resultierte, und den RLU/Protein-Quotient größer als erwartet ausfallen ließ. Bei AI43 ließen sich alle Messwerte mit Ausnahme der Norfloxacin-Konzentration von 16 μ g/ml miteinander vergleichen. In Abbildung 4-52 ist der Anstieg der Promotor-Aktivität zwischen

MII + 0,5 µg/ml und MII mit 1 µg/ml Norfloxacin zu sehen. Die *PacrAB* Expression bei 1 µg/ml und 2 µg/ml fiel gleich aus. Bei Anwesenheit von Fluorchinolonen schien sich die Effluxpumpenaktivität zu erhöhen.

Bei MII Δ *icd* 7 bp lag die Luciferase-Aktivität bei einer Norfloxacin-Konzentration von 0,5 µg/ml auf dem gleichen Niveau wie bei MII mit 1 µg/ml oder 2 µg/ml Norfloxacin. Eine Wiederholung bestätigte, dass die Aktivitäten der *E. coli*-Stämme MII und MII Δ *icd* 7 bp gleich waren. Mit zunehmender Fluorchinolon-Konzentration schien die Luciferase-Aktivität bei MII Δ *icd* 7 bp abzunehmen. Aus den Quotienten von RLU/OD und RLU/Protein wurde die spezifische Luciferase-Aktivität berechnet. Der RLU/Protein-Quotient fiel bei höherer absoluter Aktivität größer aus. Ähnlich verhielt es sich bei dem Quotienten aus RLU und OD. Möglicherweise wurden zu hohe Konzentrationen an Norfloxacin eingesetzt, und führten dazu, dass bei MII Δ *icd* 7 bp zum Zeitpunkt der Messung bereits Bakterienzellen abgestorben waren.

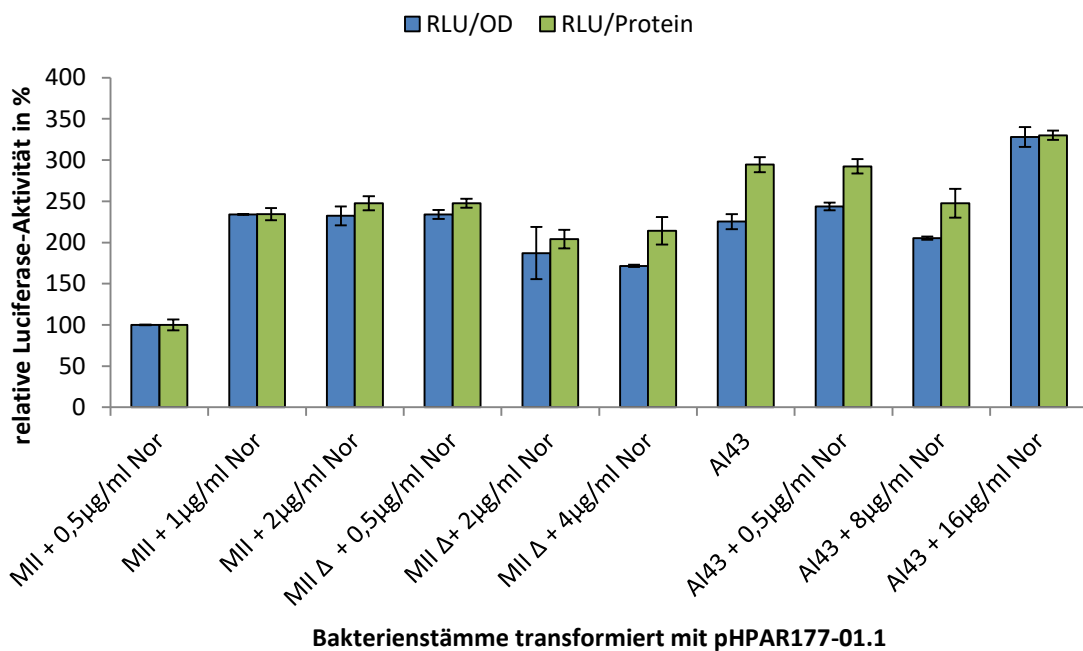


Abbildung 4-52 Messungen der *PacrAB* Expression vom 17.07.2014

Nor: Norfloxacin; MII Δ : MII Δ *icd* 7 bp; AI43: MII Δ *icd* 7 bp pHPNE19-02.1; In Abhängigkeit von der MHK von Norfloxacin für die jeweilige Mutante wurde die *PacrAB* Expression mittels des Luciferase-Assays (Reportergenplasmid pHPAR177-01.1) ermittelt. Bei jedem Stamm wurde Norfloxacin (0,5 µg/ml) zugefügt. Zusätzlich die einfache MHK und die doppelte MHK von Norfloxacin.

Da bei der Messung vom 17.07.2014 *E. coli* WT nicht mitgeführt wurde, wurde die Aktivitätsmessung mit WT als Bezugsgröße wiederholt (Messung vom 14.08.2014, Tabelle 4-51). Die

Konzentration von Norfloxacin wurde für MII Δicd 7 bp verringert, da in der Messung vom 17.07.2014 bereits bei 4 $\mu\text{g/ml}$ ein Kulturwachstum ausblieb. Die untersuchten Stämme MII, MII Δicd 7 bp und MII Δicd 7 bp pHPNE19-02.1 wurden zusätzlich ohne Norfloxacin vermessen (Tabelle 4-50).

Tabelle 4-50 Messung 14.08.2014

Verwendete Norfloxacin-Konzentrationen in $\mu\text{g/ml}$ zur Bestimmung der spezifischen Luciferase-Aktivität ausgewählter Stämme; Nor: Norfloxacin

Ausgangsstamm	MHK Nor [$\mu\text{g/ml}$]	Norfloxacin-Konzentration			
		Konz. 1 [$\mu\text{g/ml}$]	Konz 2 [$\mu\text{g/ml}$]	Konz 3 [$\mu\text{g/ml}$]	Konz 4 [$\mu\text{g/ml}$]
MII	2	0	0,5	1	2
MII Δicd 7 bp	4 – 8	0	0,5	1	2
MII Δicd 7 bp pHPNE19-02.1	16 - 32	0	0,5	8	16

In Tabelle 4-51 finden sich die Messergebnisse der Messung vom 14.08.2014. Der Protein-Gesamtgehalt wurde über die Geradengleichung der Standardkurve vom 14.08.2014 (Abbildung 4-49) ermittelt. In Tabelle 4-51 finden sich auch die Messwerte der Ansätze ohne Zusatz von LAR, wo Norfloxacin allein keinen Einfluss auf die Absorptionsmessung hatte. Die Ergebnisse zeigten, dass mit Zunahme des Norfloxacingehalts nicht die Luciferaseaktivität zunahm.

Tabelle 4-51 Mittelwerte der Messung vom 14.08.2014 der spezifischen Luciferase-Aktivität

Alle Stämme tragen das Plasmid pHPAR177-01.1; Nor: Norfloxacin

Bezugsvolumen	1 ml	1 ml	90 μl	
Stamm	RLU/OD	RLU/Protein	RLU/Protein	ohne LAR
WT	1170071	8794	97711	83
MII	3039854	22653	251696	113
MII + 0,5 $\mu\text{g/ml}$ Nor	2536530	19340	214894	67
MII + 1 $\mu\text{g/ml}$ Nor	2905616	19045	211616	93
MII + 2 $\mu\text{g/ml}$ Nor	3580054	28185	313171	77
MII Δ	3490932	23898	265528	110
MII Δ + 0,5 $\mu\text{g/ml}$ Nor	3230988	20830	231446	50
MII Δ + 1 $\mu\text{g/ml}$ Nor	2865928	20655	229502	72
MII Δ + 2 $\mu\text{g/ml}$ Nor	3126283	24483	272034	67
AI43	4234394	26412	293463	197
AI43 + 0,5 $\mu\text{g/ml}$ Nor	4154491	21867	242962	72
AI43 + 8 $\mu\text{g/ml}$ Nor	4246794	31205	346727	89
AI43 + 16 $\mu\text{g/ml}$ Nor	3673506	22784	253155	58

Ohne Zugabe von LAR lagen die gemessenen Luciferase-Aktivitäten im Bereich der Leerwerte. Bei der verwendeten Methode wurden Emissionen gemessen und nicht Absorptionen, so dass

die Beobachtung den Erwartungen entsprach. Das Emissionsmaximum für das Chromophor in Norfloxacin befindet sich in einem anderen Wellenlängenbereich als für die Luciferase-Aktivität. Bei der Bestimmung des Protein-Gesamtgehalts übte Norfloxacin keinen Einfluss auf das Messergebnis aus, da zuvor die Proteine isoliert und vom Medium getrennt wurden. Unter Angabe der prozentualen Standardabweichung sind die Mittelwerte auf den Stamm WT bezogen in Tabelle 4-52 angegeben. Graphisch sind die Werte unter Angabe der Fehlerindikatoren in Abbildung 4-54 dargestellt.

Analog zur Messung vom 17.07.2014 (Abbildung 4-52), fanden sich bei AI43 (MII Δicd 7 bp pHPNE19-02.1) mit pHPAR177-01.1 Abweichungen zwischen den Quotienten von RLU/OD und RLU/Protein. Für die vorangegangene Messung wurde vermutet, dass der Zellaufschluss im Rahmen der Proteinisolierung nicht vollständig verlaufen war, und daher ein Grund für die Abweichung war. Hier wichen die Quotienten in entgegengesetzter Richtung voneinander ab, so dass diese Erklärung nicht für die Abweichung in der Messung vom 14.08.2014 galt. Die Unterschiede zwischen den Quotienten befanden sich bei AI43 in einem ähnlichen Verhältnis. Ausnahme war hier AI43 mit 8 $\mu\text{g/ml}$ Norfloxacin (grün unterlegt in Tabelle 4-52).

Tabelle 4-52 Messung vom 14.08.2014 -Relative auf den WT bezogene Luciferase-Aktivitäten mit prozentualer Standardabweichung

MII Δ : MII Δicd 7 bp; AI43: MII Δicd 7 bp pHPNE19-02.1 bezogen auf WT Mittelwerte; Nor: Norfloxacin

Stamm	RLU/OD	RLU/Protein
WT pHPAR177-01.1	100 \pm 5	100 \pm 11
MII pHPAR177-01.1	261 \pm 2	258 \pm 9
+ 0,5 $\mu\text{g/ml}$ Nor	216 \pm 12	219 \pm 5
+ 1 $\mu\text{g/ml}$ Nor	248 \pm 6	216 \pm 7
+ 2 $\mu\text{g/ml}$ Nor	306 \pm 2	321 \pm 10
MII Δicd 7 bp pHPAR177-01.1	300 \pm 4	273 \pm 2
+ 0,5 $\mu\text{g/ml}$ Nor	278 \pm 10	238 \pm 1
+ 1 $\mu\text{g/ml}$ Nor	247 \pm 14	237 \pm 4
+ 2 $\mu\text{g/ml}$ Nor	269 \pm 13	281 \pm 9
MII Δicd 7 bp pHPNE19-02.1 pHPAR177-01.1	362 \pm 4	300 \pm 13
+ 0,5 $\mu\text{g/ml}$ Nor	354 \pm 10	248 \pm 3
+ 8 $\mu\text{g/ml}$ Nor	363 \pm 6	355 \pm 2
+ 16 $\mu\text{g/ml}$ Nor	314 \pm 7	259 \pm 13

Bei Abwesenheit von Fluorchinolonen (Norfloxacin) lag die spezifische Luciferase-Aktivität bei MII und MII Δicd 7 bp in der gleichen Größenordnung (Abbildung 4-53). Im Verhältnis zur Aktivität bei WT lag die Promotor-Aktivität bei MII und MII Δicd 7 bp 2,5-- bis 3-fach erhöht vor. Die Messwerte wurden in den vorangegangenen Messungen bestätigt (vergleiche Abbildung

4-50) und ließen sich mit den Daten für MII und WT aus der Literatur vergleichen [181]. Im Gegensatz zu WT zeigte AI43 eine höhere Luciferase-Aktivität gegenüber MII und MII Δicd 7 bp. Bei MII Δicd 7 bp bewirkte die Deletion im Vergleich zu MII keine Steigerung der Promotoraktivität.

Bezogen auf die Promotoraktivität in MII ohne Fluorchinolon-Zusatz nahm die Promotoraktivität bei den untersuchten Stämmen nach Zugabe von Norfloxacin ab (Abbildung 4-53 und Abbildung 4-54). Der absolute RLU/OD-Quotient sowie auch der absolute RLU/Protein-Quotient zeigten dieses Ergebnis. In der Literatur fanden sich Daten aus einer *real-time quantitative PCR* zur Abnahme der *acrAB*-Expression nach Zugabe von Ciprofloxacin [261]. Wurde bei MII und MII Δicd 7 bp die Norfloxacin-Konzentration auf die halbe MHK eingestellt, so war die Zunahme der Aktivität moderat. Wurde die Konzentration für Norfloxacin auf das Niveau der MHK erhöht, so stieg die Promotoraktivität an. Auch hier fanden sich in der Literatur ähnliche Beobachtungen [261].

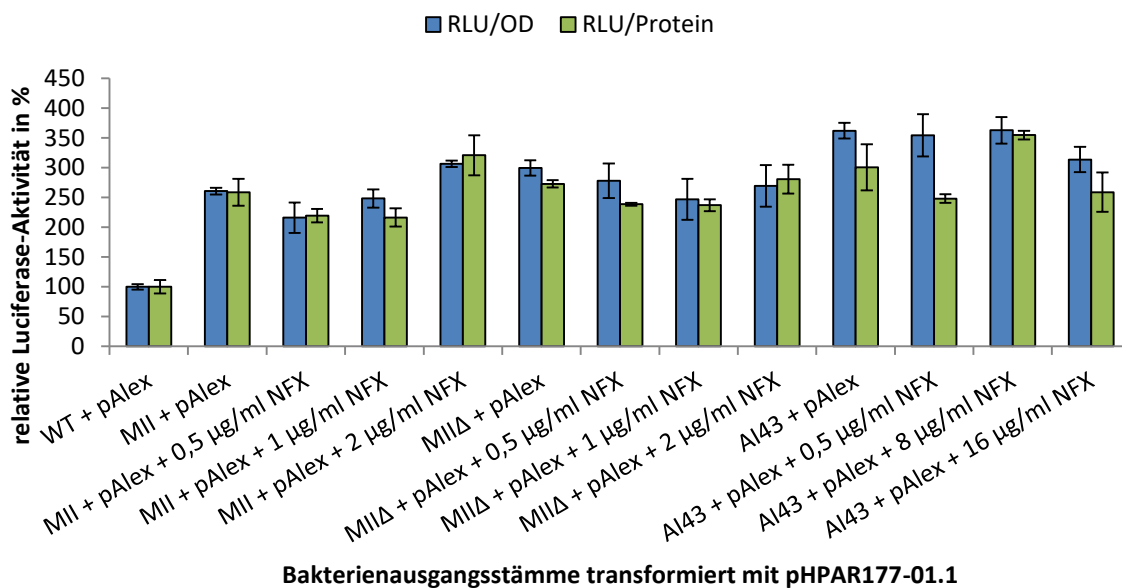
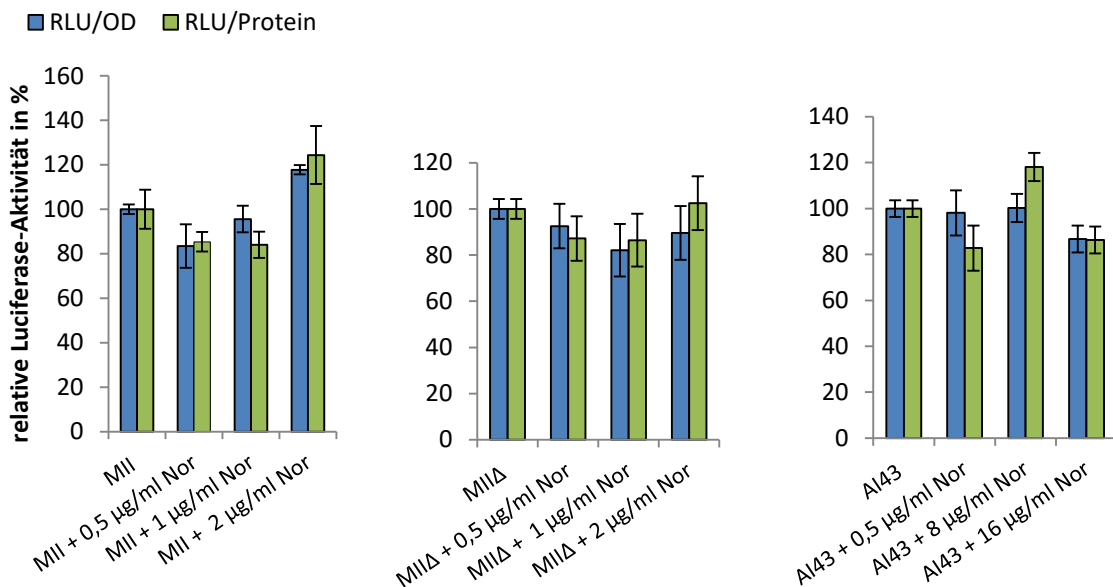


Abbildung 4-53 Messungen der Aktivität von *PacrAB* vom 14.08.2014 der Stämme WT, MII, MIIΔ (MII Δicd 7 bp) und AI43 (MII Δicd 7 bp pHNE19-02.1 Nr. 143)

Nor: Norfloxacin; MIIΔ: MII Δicd 7 bp; AI43: MII Δicd 7 bp pHNE19-02.1; In Abhängigkeit von der MHK von Norfloxacin für die jeweilige Mutante wurde die *PacrAB* Expression mittels des Luciferase-Assays (Alex: Reporterplasmid pHPAR177-01.1, *PacrAB::luc*) ermittelt. Bei jedem Stamm wurde Norfloxacin (0,5 µg/ml) zugefügt. Zusätzlich die einfache MHK und die doppelte MHK von Norfloxacin.

Bei Stamm MII Δicd 7 bp pHNE19-02.1 (AI43) stieg die Promotoraktivität bereits bei der halben MHK, und fiel bei der MHK für Norfloxacin von 16 µg/ml wieder ab. Die Konzentration an

Norfloxacin konnte hier zu hoch angesetzt worden sein, so dass die Zellen bereits abgestorben waren. Die Messwerte bestätigen die Ergebnisse der Messung vom 17.07.2014 (Abbildung 4-52) soweit, dass die spezifische Luciferase-Aktivität für MII bei der Zunahme der Norfloxacin-Konzentrationen von 0,5 µg/ml auf 2,0 µg/ml zunimmt. Ein Vergleich zu MII Δicd 7 bp war nicht möglich, da die Konzentrationen für Norfloxacin im Vergleich zu den vorherigen Messungen geändert wurden. Die Luciferase-Aktivität des Stammes MII Δicd 7 bp war bei einer Konzentration von 0,5 mg/ml für Norfloxacin höher als bei MII.



Bakterienausgangstämme transformiert mit pHPAR177-01.1

Abbildung 4-54 Messungen der Aktivität von *PacrAB* vom 14.08.2014 der Stämme WT, MII, MIIΔ (MII Δicd 7 bp) und AI43 (MII Δicd 7 bp pHPNE19-02.1)

Nor: Norfloxacin; MIIΔ: MII Δicd 7 bp; AI43: MII Δicd 7 bp pHPNE19-02.1; In Abhängigkeit von der MHK von Norfloxacin für die jeweilige Mutante wurde die *PacrAB* Expression mittels des Luciferase-Assays (Reportergenplasmid pHPAR177-01.1) ermittelt. Bei jedem Stamm wurde Norfloxacin (0,5 µg/ml) zugefügt. Zusätzlich die einfache MHK und die doppelte MHK von Norfloxacin

4.6.7.3.9.3 Einfluss der Deletion in *icd* in WT

Nach ortsspezifischer Mutagenese war WT Δicd 7 bp (Abschnitt 2.2.2.9.2.2) für Untersuchungen verfügbar. Um schnell zu einem Ergebnis zu kommen, wurde auf den Vektor pPHB331 aus der Arbeit von Dr. N. MATTHIESSEN zurückgegriffen, da in WT Δicd 7 bp noch chromosomal eine Kanamycinresistenzkassette vorlag, weshalb die Verwendung des Plasmids pHPAR177-01.1 nicht möglich war [181].

Nach erfolgreicher Transformation der Stämme WT, MII und WT Δicd 7 bp (interne Bezeichnung Nr. IV7) mit pPHB331 wurde die Luciferaseaktivität gemessen (Abbildung 4-55). Für WT Δicd 7 bp betrug die MHK von Norfloxacin 0,125 $\mu\text{g/ml}$. $\frac{1}{4}$ der MHK von Norfloxacin (0,03 $\mu\text{g/ml}$) und $\frac{1}{2}$ der MHK (0,062 $\mu\text{g/ml}$) für WT Δicd 7 bp wurden in zwei getrennten Ansätzen zur Luciferase-Messung hinzugegeben, um die *PacrAB* Expression zu untersuchen, wenn im isogenen Stammhintergrund von *E. coli*-Stamm WT eine 7 bp-Deletion in *icd* vorlag. Eine Steigerung der *PacrAB*-Aktivität in MII im Vergleich zu WT war sehen. Für WT Δicd 7 bp zeigte sich eine Steigerung von 50 % gegenüber der Aktivität bei WT. Bei $\frac{1}{4}$ der MHK von Norfloxacin (0,03 $\mu\text{g/ml}$) war keine Erhöhung der Aktivität zu messen. Bei $\frac{1}{2}$ MHK von Norfloxacin war die Aktivität auf Höhe wie bei WT.

Bei $\frac{1}{4}$ und $\frac{1}{2}$ der MHK von Norfloxacin für WT Δicd 7 bp pPHB331 war eine Abnahme der *PacrAB*-Aktivität zu sehen. Eine Abnahme der Aktivität auf das Niveau von WT war nicht erwartet worden. Im Mikrodilutionsverfahren war eine Konzentration von 0,062 $\mu\text{g/ml}$ nicht ausreichend, um Wachstum komplett zu verhindern. Die MHK von Norfloxacin für WT Δicd 7 bp lag vermutlich im Bereich von 0,062 $\mu\text{g/ml}$ bis 0,125 $\mu\text{g/ml}$.

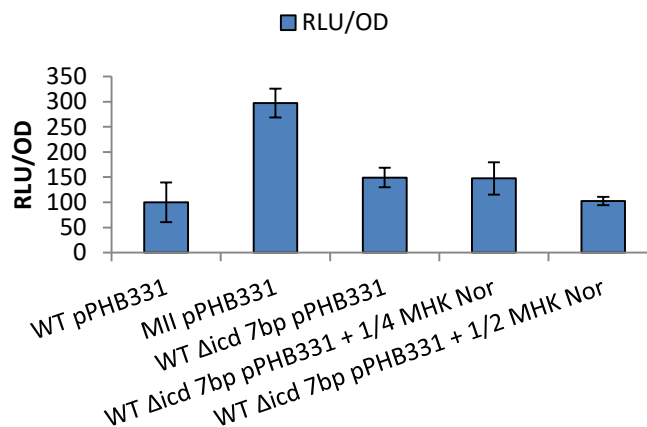


Abbildung 4-55 RLU/OD % Quotienten der Stämme WT, MII und WT Δicd 7 bp mit pPHB331

Nor: Norfloxacin; $\frac{1}{4}$ MHK Nor: 0,031 $\mu\text{g/ml}$; $\frac{1}{2}$ MHK Nor: 0,062 $\mu\text{g/ml}$;

pPHB331: Fusion des *PacrAB*-Promotors mit dem *luc*-Gen inseriert in pBR322 [181].

4.6.7.3.10 Messung der Promotoraktivität *PacrEF*

Mit dem Reporterplasmid pPHB333 wurde die Aktivität von *PacrEF* gemessen. Bedingt durch eine Überlappung des Substratspektrums der *AcrAB*/*ToIC*-Effluxpumpe mit der homolo-

gen AcrEF/TolC-Effluxpumpe sollte überprüft werden, ob ein Zusammenhang nach einer Deletion in *icd* mit AcrEF/TolC bestand. Vermessen wurden die Stämme WT, MII und WT Δicd 7 bp. Auch wenn hier eine deutliche Erhöhung der Aktivität in MII gefunden wurde, ist an dieser Stelle zu erwähnen, dass in absoluten Zahlen keine bedeutende Aktivität von *PacrEF* im Vergleich zu *PacrAB* ermittelt wurde (Abbildung 4-56).

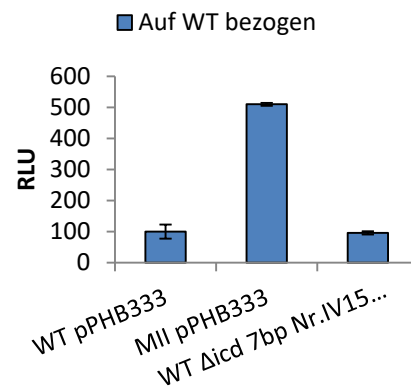


Abbildung 4-56 Messung Promotoraktivität *PacrEF*

pPHB331: Fusion des *PacrEF*-Promotors mit dem *luc*-Gen inseriert in pBR322 [181]

4.6.7.3.11 Kontrollmessung ohne Luciferase-Promotor

Als Kontrolle diente ein Ansatz mit einem Reporter-genkonstrukt in pPHP177-05.1 (siehe Abbildung 4-57), das keine Promotorregion vor dem Luciferasegen *luc* enthielt (vergleiche 4.6.7.3.6).

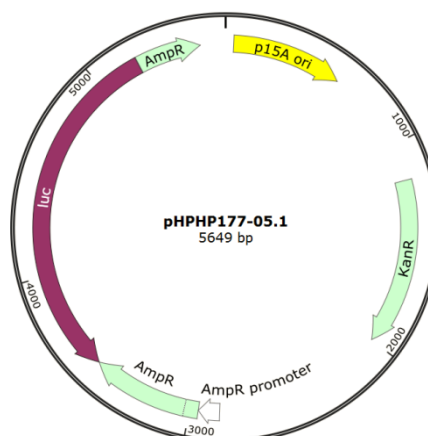


Abbildung 4-57 pPHP177-05.1; *luc* ohne *PacrAB* (eigene Darstellung)

Die Ergebnisse ohne *PacrAB* (Abbildung 4-58) zeigten keine Luciferaseaktivität. Zum Vergleich wurde *E. coli* WT mit dem Plasmid pHPAR177-01.1 vermessen. Hier wurde eine Luciferaseaktivität gemessen. Die zuvor gemessenen Werte ließen sich direkt mit dem Promotor in Verbindung bringen und konnten nicht durch das alleinige Vorhandensein des Luciferasegens erklärt werden. Ein Fehlen des Promotors war gleichzustellen mit einem plasmid-freien Kontrollansatz.

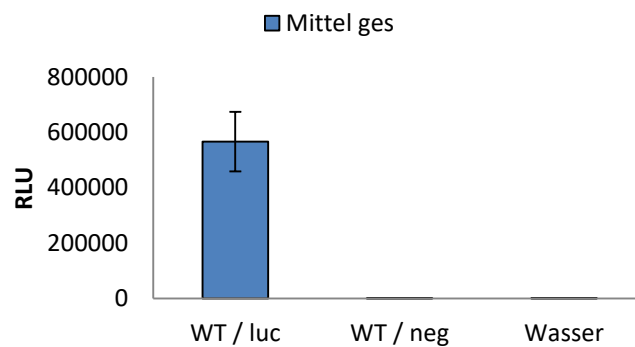


Abbildung 4-58 Messung WT mit Luciferaseplasmid pHPAR17701.1 und WT mit Kontrollplasmid pHPHP177-05.1

pHPHP177-05.1 enthält keinen *luc*-Promotor, so dass keine Luciferase exprimiert werden kann.

5 Diskussion

Antibiotikaresistenz stellt ein uraltes Phänomen dar, da sich bereits in denselben Genclustern für die Biosynthese von Antibiotika (z.B. bei *Streptomyces*-Arten) Gene für Resistenzmechanismen finden. Mit solchen Genprodukten schützt sich der Antibiotikaproduzent vor seinem eigenen Produkt: dem Antibiotikum. Die entsprechenden Gene können mit extrachromosomalen Elementen auf zugängliche Zellen übertragen werden. Alternativ können sich Bakterienzellen durch den - ungerichteten - Erwerb von Mutationen anpassen und Resistenzen erwerben.

Mit den rein synthetischen Fluorchinolon-Antibiotika wurden Antibiotika entwickelt und im Jahr 1985 in die Therapie eingeführt, für die zunächst keine transferierbaren Resistenzgene bekannt waren. Dementsprechend war die Resistenzsituation in den ersten Jahren nach Markteinführung sehr günstig. Übermäßige Anwendung der Fluorchinolon-Antibiotika bedingte jedoch einen starken Selektionsdruck, dem die Erreger mit dem Erwerb von Mehrfachmutationen zur Resistenz begegneten. Befunde an Labormutanten und klinischen Isolaten zeigten, dass für die Ausprägung einer hochgradigen Fluorchinolon-Resistenz bei natürlicherweise hochempfindlichen Spezies, wie *Escherichia coli*, eine Doppelmutation in der primären Zielstruktur Gyrase und mindestens eine Mutation in der sekundären Zielstruktur Topoisomerase IV vorliegen musste.

In den letzten 15 Jahren wurde zunehmend von plasmidbasierter FQ-Resistenz (englisch: *plasmid-mediated quinolone resistance*: PMQR) berichtet. Derzeit sind mindestens drei Mechanismen von PMQR bekannt: Enzymatische Modifikation von Fluorchinolonen (durch eine Acetyltransferase), plasmidcodierte Effluxsysteme (QepA, OqxAB) und DNA-Gyrase/Topoisomerase IV-Schutzproteine (Qnr). Qnr Gyrase-Schutzproteine gehören zur *pentapeptide-repeat Proteinfamilie* (PRP), und codieren für Proteine, die aus ungefähr 200 Aminosäuren bestehen. Die *pentapeptide-repeat Proteinfamilie* umfasst mehr als 1000 Proteine [44], [84], [136]. Gyrase-/Topoisomerase IV-Schutzproteine binden an Komplexe aus DNA und DNA Gyrase bzw. Topoisomerase IV und schützen diese so vor der inhibitorischen Aktivität der Fluorchinolone. Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit wurde der Beitrag des *Quorum-Sensings* (QS) bei FQ-Resistenz untersucht. Bakterien sind imstande zur Zell-Zell-Kommunikation und Antibiotika werden als mögliche QS-Signalmoleküle diskutiert. QS kann die Synthese, Detektion und Re-

aktion diffundierender Signalmoleküle umfassen. Bei *E. coli* ist die Fähigkeit zum *Eavesdropping* („Abhören“) durch das LuxR-Homolog SdiA (*suppressor of cell division inhibitor*) bekannt und bis dato gering untersucht. In *E. coli* kann SdiA auf nicht selbst produzierte Signale beispielsweise konzentrationsabhängig reagieren, und so die Transkription des bei FQ-Resistenz wichtigen Antibiotikumpumpsystems AcrAB-TolC regulieren. Diese Arbeit widmete sich der Untersuchung der SdiA-Aktivität in den FQ-resistenten *in vitro* selektierten *E. coli*-Mutanten MIII (GK574) und MIVa (GK575). In beiden Mutanten waren bisher die gleichen QRDR-Mutationen identifiziert, jedoch unterschieden sich die Mutanten phänotypisch um eine Stufe in der MHK von Ciprofloxacin. In älteren Arbeiten wurde bereits für MIVa eine erhöhte *acrA*- und *marA* Expression gezeigt [225].

Der zweite Teil hatte zur Zielsetzung den Einfluss der Topoisomerase-Schutzproteine QnrA1 und QnrB1 (Abschnitt 1.7.3.3) auf den Wechsel von einer behandelbaren Fluorchinolon-Resistenz in *E. coli* MII (GK573) hin zu einer hochgradigen Fluorchinolon-Resistenz zu untersuchen. Die Anwesenheit von QnrA1 und QnrB1 allein in *E. coli* sorgte nicht für die Ausbildung einer klinisch relevanten Fluorchinolon-Resistenz. Der Effekt durch Qnr allein ist gering und steigert die minimale Hemmkonzentration (MHK) von Fluorchinolonen um 1 bis 2 Stufen. Dennoch werden zunehmend bei hoch FQ-resistenten Isolaten Plasmid-codierte *qnr*-Gene detektiert. In der Literatur finden sich bei STRAHILEVITZ *et al.* Hinweise, dass bei *E. coli* nach Ciprofloxacin-Forward-Assays mit Endpunkt einer Ciprofloxacin-Resistenz (MHK > 4 µg/ml), unter Anwesenheit von QnrA1 die Ausbildung spontaner Mutationen 100 mal höher ausfiel als ohne QnrA1 [152], [158], [214], [292], [293]. Weitere Arbeiten zeigten eine Zunahme der Mutationsrate bei Anwesenheit von Qnr, gingen im Gegensatz zur vorliegenden Arbeit aber nicht von einer Zweitschritt-Mutante, wie *E. coli* MII (GK573) mit Qnr, aus. Stattdessen wurden in diesen Arbeiten *E. coli*-Stämme vergleichbar mit *E. coli* WT (GK571) untersucht [262]–[265].

5.1 Untersuchungen zu SdiA in WT, MIII und MIVa

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Einfluss von SdiA (englisch: *suppressor of cell division inhibitor*) auf die Ausbildung einer Fluorchinolon-Hochresistenz in den *in vitro* selektierten Mutanten MIII und MIVa untersucht (Abschnitt 3) [167]. Im Zusammenhang mit einer Regulation der *acrAB*-Expression, sollte in den *E. coli*-Stämmen die Aktivität des LuxR-Homologs SdiA un-

tersucht, und eine Erklärung für die erhöhte MHK von Ciprofloxacin und die erhöhte *marA*-Expression in MIVa im Vergleich zu MIII gefunden werden [181], [225]. Aus den Arbeiten von HEISIG *et al.* (1994) lagen die Mutanten MIII (GK574) und MIVa (GK575) vor, die beide die identischen Mutationen innerhalb der QRDR von *gyrA* (S83L, D87G) und *parC* (S80I) sowie die gleiche *marR*-Deletion ($\Delta marR$ 74 bp) aufwiesen. Trotz gleicher Akkumulation von Mutationen (Abschnitt 1.8), fiel die MHK von Ciprofloxacin für diese Mutanten unterschiedlich aus (MIII 64 $\mu\text{g/ml}$ vs. MIVa 128 $\mu\text{g/ml}$) [167].

Aufbauend auf den Arbeiten von Dr. N. MATTHIESSEN (2007) und Dr. B. ARNTJEN (2013) wurde SdiA für eine Erklärung des MHK-Unterschieds zwischen MIII und MIVa betrachtet [65], [66]. Für SdiA ist eine Induktion der *acrAB*-Expression bekannt [68], [69]. Eine strenge Kontrolle der Expression der AcrAB-TolC Effluxpumpe wird in *E. coli* neben SdiA von den Repressoren AcrR und AcrS, MarA, SoxS und Rob gewährleistet [225], [250], [266]. Das Antibiotikumpumpsystem AcrAB-TolC scheint ergänzend zur Aufgabe Xenobiotika aus der Zelle zu schleusen auch eine Rolle in der Zell-Zell-Kommunikation durch den Transport von Signalmolekülen in die Zellumgebung einzunehmen (englisch: *Quorum Sensing*, Abschnitt 1.3) [65]. Bei Dr. N. MATTHIESSEN (2007) konnte eine Induktion der *acrAB*-Expression in MII trotz *marR*-Deletion ($\Delta marR$ 175 bp) gezeigt werden [181]. Hierzu ergänzend fanden sich bei Dr. B. ARNTJEN (2011) Ergebnisse, die eine erhöhte *marA*-Expression (ohne Induktion durch Natriumsalicylat) bei MIII und MIVa im Vergleich zu *E. coli* WT (GK571) und für MIVa die höchste *acrA*-Expression zeigten [167], [181], [225].

Mittels SANGER-Sequenzierung, Pyrosequenzierung und Southern Blot wurde für *sdiA* in *E. coli* WT, MIII und MIVa gezeigt, dass ein einziges, identisches Gen in den beiden *in vitro* selektierten Mutanten MIII und MIVa vorlag und der Wildtyp-Sequenz von *E. coli* WT entsprach. Eine erhöhte *sdiA*-Expression durch weitere Genkopien oder eine Mutation im *sdiA*-Gen waren nicht als Erklärung für die erhöhte *acrA*-Expression in MIVa möglich [225].

Eine bakterielle Strategie, um unter (Fluorchinolon-)Antibiotika zu überleben, kann ein verstärkter Efflux sein (Abschnitt 1.3) [39], [267]. Da SdiA ein positiver Regulator für die AcrAB-TolC-Effluxpumpe ist, wurde die *sdiA*-Expression in WT, MIII und MIVa mittels *real-time quantitative PCR* in Abhängigkeit der Wachstumsphase ermittelt (OD-bereinigt, gemäß Abschnitt 2.2.2.3.5). Bei MIII (Messpunkt $\text{OD}_{600 \text{ nm}}$ 0,7) war die Genexpression im Vergleich zu WT (Messpunkt $\text{OD}_{600 \text{ nm}}$ 0,4) um ca. 27 % erniedrigt (MIII 0,73 vs. WT 1,0). Bei MIVa (Messpunkt

OD_{600 nm} 0,4) war die Expression um 42 % erhöht. Im Unterschied zu MIII scheint bei MIVa die *sdiA* Expression durch einen unbekanntem Faktor induziert zu werden. Ob die erhöhte *sdiA* Expression in MIVa Bestandteil einer Erklärung für die MHK-Zunahme in MIVa gegenüber MIII war, wurde mit der *real-time quantitative PCR* nicht abschließend beantwortet.

Bei RAHMATI *et al.* (2002) führte eine *sdiA*-Überexpression zur Zunahme der MHK von Fluorchinolonen. Ergänzend hierzu wurde auch eine Verbindung zwischen der *sdiA*- und *acrAB*-Expression diskutiert. In einer *sdiA*-Mutante zeigte sich eine Abnahme der *acrB*-Expression, dabei blieb die *acrA*-Expression unverändert [69]. In den Arbeiten von DYSZEL *et al.* (2010) war zu sehen, dass die Transkription des *acrAB*-Operons durch *sdiA*-Überexpression von einem Plasmid verursacht wurde, wenn N-(3-oxo-hexanoyl)-L-homoserinlacton (AHL, Abschnitt 1.3) anwesend war, was auf *Quorum-Sensing* schließen lässt. Die Expression des *acrAB*-Operons erhöhte sich nicht allein durch chromosomales *sdiA*. Zusätzlich zeigten die Ergebnisse für *E. coli*, dass die chromosomale *sdiA*-Expression andere Gene beeinflusst im Vergleich zur plasmidbasierten *sdiA*-Expression. Allerdings geht diese Arbeit von einem *E. coli*-Stamm mit einem zum *E. coli* WT vergleichbaren Hintergrund aus [268]. Für eine Dreischritt- (MIII), bzw. Vierschrittmutante (MIVa) liegen bisher keine Daten in der Literatur vor.

Auch wurde bei RAHMATI *et al.* (2002) gezeigt, dass in *E. coli* eine erhöhte *sdiA*-Expression zu einer erhöhten Konzentration von AcrA und AcrB führt. Bei $\Delta sdiA$ war für AcrA keine Veränderung im Vergleich zum Wildtyp zu sehen. Für AcrB halbierte sich die Konzentration bei Abwesenheit von *sdiA* im Vergleich zum WT [69]. TAVÍO *et al.* (2010) zeigten für *in vitro* selektierte Einschrittmutanten eine erhöhte *sdiA*-Expression zeitgleich mit *acrB*, *marA*, *tolC* und einer Abnahme der *ompF*-Expression. Bei den klinischen Isolaten *E. coli* PS7 und *E. coli* PS11 wurde in *gyrA* der Aminosäure-Austausch S83L gefunden, während in den Mutanten LomE7 und CazE11 keine *gyrA*-Mutation zu finden war. Eine Erklärung für die Expressionszunahme liefert die Arbeit nicht. Vermutet wurde als Expressionsinduktor eine Mutation in einem noch unbekanntem Regulator für *sdiA* [68]. Für die Überexpression von *sdiA* mittels eines High Copy Plasmids wurde bei RAHMATI *et al.* eine erhöhte Expression von *acrA* und *acrB* gezeigt [69]. Einen ähnlichen Befund zeigen auch TAVÍO *et al.* (2014) anhand einer zeitgleichen Überexpression von *sdiA* und *acrB* bei vorliegender *marR*-Mutation [269]. Neben MarA sind noch die Einflüsse von SoxS und Rob für die gesteigerte *acrA* Expression in MIVa zu diskutieren [46], [270], [271]. In der

Arbeit von Dr. S. ECKHARDT (2015) wird gezeigt, dass SoxS keinen Einfluss auf die *sdiA*-Expression hat [272]. Hier wird die Möglichkeit eines zu geringen Stresslevels für die untersuchten *E. coli*-Stämme diskutiert, um eine Signaltransduktion via Quorum Sensing und damit über das Signalprotein SdiA auszulösen [272].

Die erhöhte *sdiA*-Expression in MIVa lässt sich aufgrund der gleichen QRDR- und *marR*-Mutationen in MIVa und MIII noch nicht erklären. Die erhöhten *marA*- und *acrA*-Expressionen in MIVa lassen sich mit einer erhöhten *sdiA*-Expression in Verbindung bringen. Da SdiA ein positiver Regulator für die AcrAB-TolC-Effluxpumpe ist, kann in diesem Zusammenhang ein unterstützender Einfluss für eine Resistenz gegenüber Antibiotika diskutiert werden. Eine *sdiA*- und *marA*-Überexpression könnte eine bakterielle Strategie unterstützen, um unter Anwesenheit von Fluorchinolonen oder anderen Antibiotika zu überleben (Abschnitt 1.3).

5.2 Einfluss von plasmidkodierten und chromosomalen Resistenzmechanismen auf die Aktivität von Ciprofloxacin in isogenen *Escherichia coli* Isolaten

5.2.1 Vergleich der Plasmide pHPNE18-01 mit pHPNE18-01.1 und pHPNE19-02 mit pHPNE19-02.1

Aus einer vorgegangenen Arbeit wurden Vektoren mit *qnrA1* (pHPNE18-01.1; pUC18) und *qnrB1* (pHPNE19-02.1; pUC19) verwendet [18]. In der MHK-Feinbestimmung von Ciprofloxacin für MII-Transformanten, die jeweils einen der vier oben genannten Vektoren enthielten, konnte mit oder ohne Induktion durch IPTG keine Zunahme der MHK von Ciprofloxacin festgestellt werden, was die Beobachtungen von Dr. N. HILSBERG-EMRICH (2012) bestätigte [18]. In der Vorbereitung für einen Ciprofloxacin-Forward-Assay (Abschnitt 2.2.1.15) war eine Feinbestimmung der MHK von Ciprofloxacin notwendig, um ein festes Nährmedium mit der 4-fachen, bzw. 8-fachen MHK von Ciprofloxacin herzustellen (Abschnitt 5.2.2) [18]. Im Gegensatz zum chromosomalen *lac*-Operon ist in pUC18 und pUC19 nur ein unvollständiges *lac*-Operon vorhanden. Der Repressor jedoch war chromosomal in *E. coli* kodiert. Die Vektoren pUC19 oder pUC18 lagen in einer hohen Kopienzahl in der Zelle vor. In der Zelle werden wenig Repressoren chromosomal exprimiert, und nicht alle *lac*-Operons der Plasmide können besetzt werden. Daher wird das *lac*-Operon als „undicht“ (englisch: *leaky*) tituliert [273]–[277].

In der vorliegenden Arbeit ist zu sehen, dass ohne Induktion mit IPTG ein *high-copy* Vektor, wie pUC19, mit einem „undichten“ *lac*-Operon die Expression von *qnr* zulässt und die MHK von Ciprofloxacin für die untersuchten Transformanden auf das gleiche Niveau wie bei Induktion mit IPTG anhebt. Als Ergänzung wäre ein Vergleich mit einem Vektor mit niedriger Kopienzahl, wie zum Beispiel pBR322 denkbar (vergleiche Tabelle 5-5).

5.2.2 *In-vitro*-Selektion von QnrA1 und QnrB1 in *E. coli* WT (GK571), *E. coli* WT-K (GK4041) und *E. coli* (GK573) MII

Aus Vorarbeiten war bekannt, dass *E. coli*-Stämme durch Mutationen innerhalb der QRDR der Gyrase (*gyrA*) oder Topoisomerase IV (*parC*) höhere Fluorchinolon-Konzentrationen im Vergleich zu Stämmen der Elterngeneration tolerieren [15], [167]. Zur Ausbildung einer Fluorchinolon-Resistenz müssen sich in einer Mutante mehrere Mutationen akkumulieren. Um die Lebensfähigkeit nicht zu beeinträchtigen, ist eine niedrige spontane Mutationsrate sinnvoll [278], [279]. Jedoch sind Veränderungen des Erbguts auch als Reaktion auf veränderte Umweltbedingungen notwendig.

Bei HEISIG *et al.* (1994) konnte sich ausgehend vom *E. coli* Wildtyp WT (GK571) *in vitro* in einem Nalidixinsäure-Forward-Assay die Mutante MI (GK572; *gyrA* S83L) ausbilden [167]. Diese Mutation ist im Zusammenhang mit Fluorchinolon-Resistenz bei *E. coli* und anderen gramnegativen Spezies häufig an dieser Position zu finden (Abbildung 5-1 und Abschnitt 1.7.1) [84], [167]. Ausgehend von der Mutante MI wurde nach einem Ciprofloxacin-Forward-Assay die Mutante MII (GK573) mit einer zusätzlichen 175 bp Deletion in *marR* (Repressor des *mar*-Operons) selektiert [27], [280]. Die Deletion innerhalb *marR* führt zu einem verkürzten, defekten *marR*-Protein mit fehlender Repressorfunktion auf *marAB*. MarA wird vermehrt gebildet und kann dadurch strangaufwärts durch Bindung an die *mar*-Box die Expression von *acrAB* und *tolC* erhöhen, so dass es zu einem gesteigerten Effluxverhalten kommt. Gleichzeitig bewirkt MarA eine Reduktion der Bildung von Porinen (vergleiche Abschnitt 1.7.2), was zur Steigerung des Efflux von Fluorchinolon-Molekülen beiträgt [167], [267], [281].

Die bei HEISIG *et al.* (1994) nach einem Ciprofloxacin-Forward-Assay - ausgehend von der Mutante MII (GK572) - selektierte Mutante MIII (GK573) wies zwei zusätzliche QRDR-Mutationen auf (*gyrA* D87G und *parC* S80L) [15], [84]. Das Auftreten von zwei Mutationen in einem einzel-

nen Selektionsschritt (MII \rightarrow MIII; Abbildung 5-1) stellt ein seltenes Ereignis dar. In vorangegangenen Arbeiten wurde *in vitro* eine einzelne weitere Mutation bei MII in *gyrA* eingeführt und war für die Zelle von Nachteil. Erst bei zwei Mutationen innerhalb der beiden Zielstrukturen *gyrA* und *parC* reduzierte sich die Empfindlichkeit gegenüber Fluorchinolonen und ebnete den Weg zu hochresistenten Keimen (Abschnitte 1.7 und 1.8) [27], [84], [130], [167].

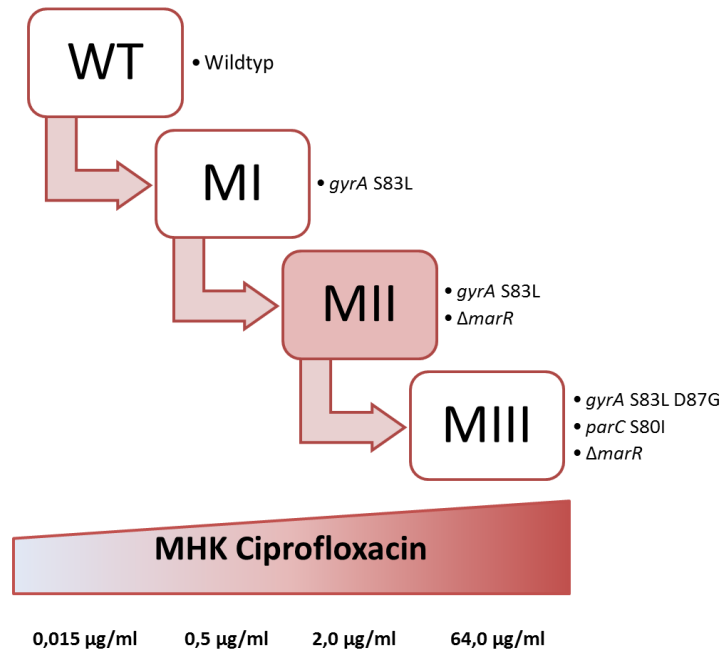


Abbildung 5-1 Akkumulation von Fluorchinolon-Resistenzmutationen am Beispiel der Entstehung von *E. coli* MIII beginnend mit *E. coli* WT, modifiziert nach [27]

Bei Bakterien treten Mutationen mit einer Wahrscheinlichkeit von 10^{-5} [25] bis 10^{-8} [15] oder 10^{-9} [282] auf. Ausgehend vom *E. coli*-Stamm WT hin zur Mutante MIII mit einer klinisch relevanten Fluorchinolon-Resistenz, ergibt sich eine kumulierte Mutationsfrequenz von ca. 10^{-32} [15]. Aufgrund dieser niedrigen Mutationsfrequenz waren bis in die 1990er Jahre Ciprofloxacinresistente *E. coli*-Stämme unbekannt [15], [282].

In der vorliegenden Arbeit wurden Ciprofloxacin-Forward-Assays mit *E. coli* Wildtyp WT (GK571), *E. coli* WT-K (GK4041) und *E. coli* MII (GK573) durchgeführt. Diese Stämme hatten einen isogenen Stammhintergrund gemeinsam. Jeder Stamm wurde mit den Plasmiden pHPNE19-02.1 (*qnrA1*), pHPNE18-01.1 (*qnrB1*) und pUC19 transformiert. Es wurden Mutanten erhalten, die noch auf der 8-fachen Konzentration der jeweiligen MHK von Ciprofloxacin wachsen konnten. Auch wenn nicht die *mutant prevention concentration* (MPC) bestimmt wurde, so war die MPC für diese Mutanten oberhalb der 8-fachen MHK von Ciprofloxacin zu

vermuten. Die Selektion fand vermutlich innerhalb des *Mutant Selection Window* statt. Ein ähnlicher Konzentrationsbereich für Selektionen wird bei BIALES *et al.* (2011) beschrieben [283]. Selektierte Mutanten wurden nach 48 h gesichert, da nach 24 h noch sehr kleine Kolonien zu sehen waren. Eine Veränderung der Mutationsrate im Rahmen der durchgeführten Ciprofloxacin-Forward-Assays war ein Hinweis auf den Einfluss der verwendeten Resistenzgene. Bedingt durch die Abnahme der Empfindlichkeit auf Fluorchinolone durch QnrA1 und QnrB1 in *E. coli*, wurde eine Zunahme der selektierten Mutanten nach der *In-vitro*-Selektion gezeigt (Abschnitt 4.3).

In Tabelle 5-1 sind die eingesetzten Ciprofloxacin-Konzentrationen zusammen mit den ermittelten Mutationsraten der Ciprofloxacin-Forward-Assays gezeigt. Die Mutationsraten für WT pHPNE18-01.1 und WT-K pUC19 waren nur eingeschränkt für einen Vergleich brauchbar. Hier gelang keine Auswertung der Mutationsrate bei Verwendung von LB-Agar mit der 8-fachen MHK von Ciprofloxacin, da kein Auszählen der Kolonien möglich war. Für eine Orientierung wurden die Mutationsraten bei der 16-fachen MHK für WT pHPNE18-01.1 und der 4-fachen MHK bei WT-K pUC19 ermittelt. Die Mutationsraten lagen ein bis zwei Zehnerpotenzen höher als für den PMQR-freien Ansatz. Die Mutationsraten bei Ansätzen mit QnrB1 fielen höher aus als mit QnrA1.

Tabelle 5-1 Eingesetzte Selektionskonzentrationen und ermittelte Mutationsraten

Mutationsraten für die verwendeten Stämme mit Qnr oder pUC19 zur Selektion von Mutanten (Mutanten/KBE pro 1 ml). Blau: eine Auswertung erfüllte bei abweichenden MHK-Vielfachen.

Stamm	x-fach MHK	[Ciprofloxacin] in µg/ml	Mutationsrate (Mutanten/KBE)
WT pHPNE19-02.1	8x	1,4	$4,7 \cdot 10^{-07}$
WT pHPNE18-01.1	16x	0,96	$1,1 \cdot 10^{-06}$
WT pUC19	8x	0,125	$5,6 \cdot 10^{-09}$
WT-K pHPNE19-02.1	8x	4,0	$7,9 \cdot 10^{-08}$
WT-K pHPNE18-01.1	8x	2,4	$8,6 \cdot 10^{-07}$
WT-K pUC19	4x	0,5	$3,9 \cdot 10^{-06}$
MII pHPNE19-02.1	8x	16	$2,0 \cdot 10^{-07}$
MII pHPNE18-01.1	8x	28,8	$8,9 \cdot 10^{-07}$
MII pUC19	8x	9,6	$1,1 \cdot 10^{-08}$

Zu einem ähnlichen Ergebnis mit QnrA1 kommen MARTÍNEZ-MARTÍNEZ *et al.* (1998) [142]. Hier war bei *E. coli* J53 mit natürlichem *qnrA1*-Plasmid (pMG252) verglichen zum plasmidfreien Ansatz die Mutationsrate um zwei Zehnerpotenzen erhöht. Ohne QnrA1 lag die Mutationsrate bei 10^{-8} und mit Anwesenheit von QnrA1 bei 10^{-6} . Wichtiger Unterschied zum klonierten *qnrA1*

Gen in pUC19 war das bei MARTÍNEZ-MARTÍNEZ *et al.* verwendete natürliche *qnrA1*-Plasmid pMG252. Bei Anwesenheit von pMG252 wurde eine schnelle Ausbildung und Verbreitung von Fluorchinolone-Resistenzen postuliert [142]. Bei Versuchen mit Klonierungsvektoren mit höherer Kopienzahl (*ori*: p15A) fanden sich in Verbindung mit *qnr* auch erhöhte Mutationsraten. Hier zeigten die Arbeiten von GOTO *et al.* (2015) bei klinischen Isolaten eine Zunahme der Mutationsrate [265]. Eine Erklärung für die erhöhte Mutationsrate versuchte die Arbeit von JACOBY *et al.* (2005) zu geben: Auch wenn Qnr allein die Empfindlichkeit auf Fluorchinolone nur schwach reduzierten, so wurden aus einer Population dank Qnr vermehrt (Fluor)chinolon-resistente Mutanten selektiert [131].

Um auszuschließen, dass eine Mutation innerhalb der verwendeten Vektoren für das Wachstum auf höheren Konzentrationen von Ciprofloxacin verantwortlich war, wurde ein Kontroll-Assay durchgeführt (Abschnitt 4.3). Nach der Plasmidisolierung aus drei verschiedenen MII-Mutanten (MII pHPNE19-02.1 Nr. I 43 und Nr. II 21 und aus MII pHPNE18-01.1 Nr. II 19) wurde der Ausgangsstamm *E. coli* MII mit jeweils einem dieser isolierten Vektoren transformiert. Die MHK von Ciprofloxacin für die Transformanten und für den Ausgangsstamm mit pHPNE1-02.1 oder pHPNE18-01.1 war gleich (Abschnitt 4.3.1).

In einem weiteren Versuch wurde in drei Ansätzen untersucht, ob nicht-benötigte Plasmide bei fehlendem Selektionsdruck abgestoßen wurden (Abschnitt 4.3.2). Bei fehlendem Selektionsdruck gaben die Wildtyp-Derivate das Plasmid ab und auf Platten mit Ampicillin war kein Wachstum festzustellen. In einem zweiten Ansatz wurde zusätzlich JM109 mit pUC19 betrachtet. Es stellte sich heraus, dass bei JM109 im Gegensatz zu WT kein Plasmidverlust festzustellen war. Bei SUBBIAH *et al.* (2011) finden sich für *E. coli* DH10B bei Langzeit-Passage-Experimenten mit drei Plasmiden vergleichbare Beobachtungen. Nach mehreren Passagen überwogen die plasmidfreien Klone. Sobald ein Plasmid in der Zelle vorlag, kam es zu Fitnessseinbußen und bei fehlendem Selektionsdruck wurde das Plasmid abgestoßen [284].

Für die selektierten Mutanten ließ sich mit dem Plasmidverlust erklären, warum nach Passage auf LB-Agarplatten ohne Selektionsantibiotikum kein Wachstum mehr auf Ampicillin-LB-Agarplatten möglich war. Nach dieser Erkenntnis wurden die selektierten Mutanten nur noch unter Selektionsdruck angezogen. Gleichzeitig war eine Möglichkeit gefunden bei Mutanten einen Plasmidverlust zu erreichen (*Plasmid Curing*, Abschnitt 2.2.1.11).

5.3 Untersuchung der selektierten Mutanten nach Durchführung des Ciprofloxacin-Forward-Assays

Nach dem Ciprofloxacin-Forward-Assay bei *E. coli* WT (GK571), *E. coli* WT-K (GK4041) und *E. coli* MII (GK573) (Abschnitt 4.2), wurden die selektierten Mutanten charakterisiert (Zusammenfassung MHK in Abbildung 5-2). Die MHKs von Ciprofloxacin für Mutanten mit QnrA1 (WT, WT-K oder MII) waren im Durchschnitt höher, als bei Mutanten mit QnrB1 oder den pUC19-Kontrollansätzen. Insgesamt war das Verhältnis der MHK-Zunahme durch Qnr nach den Selektionsschritten geringer bei den Fluorchinolon-empfindlichen Stämmen WT und WT-K, bezogen auf die MHK-Zunahmen bei Versuchsansätzen mit MII, wo bereits erste Mutationen vorlagen. Für Ansätze bei MII wurde nach Selektion keine MHK von Ciprofloxacin wie für die Dreischritt-Mutante *E. coli* MIII mit 64 µg/ml ermittelt [167]. Die höchste ermittelte MHK von Ciprofloxacin lag bei 32 µg/ml. Die MHKs von Ciprofloxacin der MII-Mutanten lagen zum Teil in Bereichen vergleichbar mit den Ergebnissen bei Dr. M. PETSCHULIES (2014). In der Arbeit von Dr. M. PETSCHULIES konnte durch ein Ciprofloxacin-Forward-Assay erst eine hochresistente Mutante ausgehend von einem *E. coli* MII-Mutatorstamm selektiert werden. Bei diesem Mutatorstamm fiel durch eine ortsspezifische Mutation innerhalb der Epsilon-Untereinheit der replikativen DNA-Polymerase III (DnaQ) die Proof-Reading-Funktion aus, und ein *dnaQ*-Mutator-Allel erhöhte die Wahrscheinlichkeit zur Selektion Fluorchinolon-hochresistenter Mutanten [27].

Für die selektierten Mutanten wurde eine Sequenzanalyse der QRDR für *gyrA*, *parC*, *gyrB* (nicht bei WT) und *parE* durchgeführt. Bei WT-K wurde die QRDR von *gyrA* sequenziert. Zusätzlich wurde auf eine Deletion in *marR* hin untersucht, sofern diese Mutation nicht schon vorhanden war (*E. coli* MII besaß bereits eine Deletion in *marR*) (Abschnitt 4.4.3).

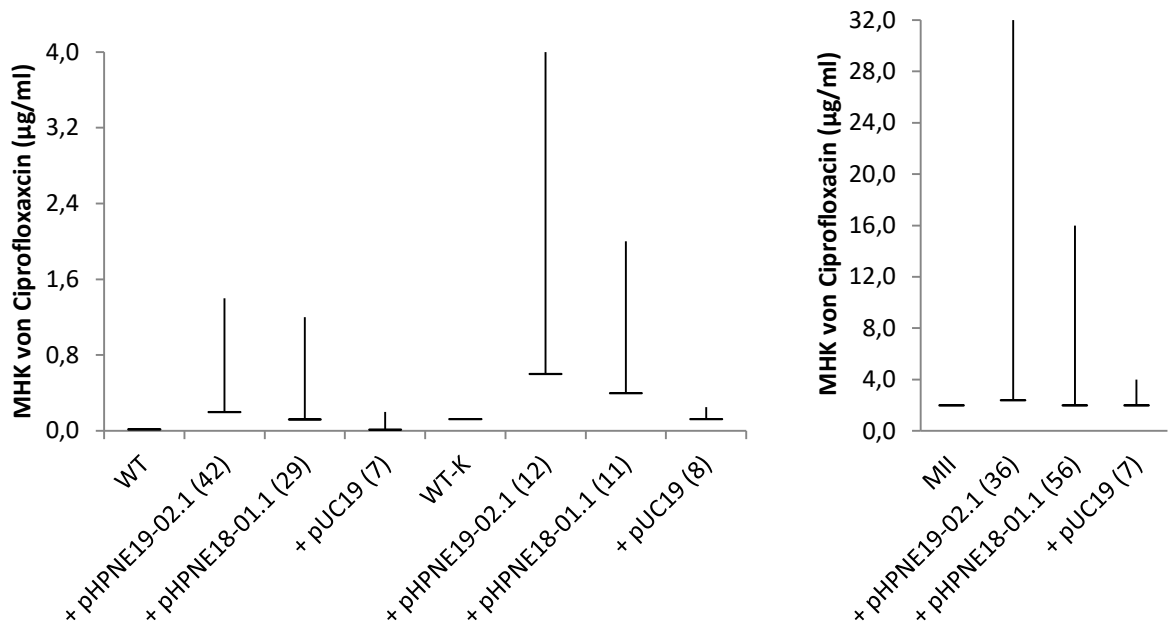


Abbildung 5-2 Grafische Darstellung der minimalen und maximalen Erhöhung der MHK

Links: WT und WT-K und die jeweils selektierten Mutanten mit pHPNE19-02.1 (QnrA1), pHPNE18-02.1 (QnrB1) und pUC19. **Rechts:** MII und die selektierten Mutanten mit pHPNE19-02.1 (QnrA1), pHPNE18-01.1 (QnrB1) und pUC19.

In Klammern steht die Anzahl der untersuchten Mutanten. Die MHK von Ciprofloxacin für die selektierten Mutanten nach Durchführung eines Ciprofloxacin-Forwardassays fällt unterschiedlich hoch aus, was durch die dünne vertikale Linie ausgedrückt wird. Der dicke Balken stellt die MHK von Ciprofloxacin für den Ausgangsstamm dar.

Im Rahmen des Ciprofloxacin-Forward-Assays wurde bei Ansätzen mit WT und WT-K (auch bei MII) jeweils eine einzelne Kolonie vom Ciprofloxacin-Selektiv-Agar gepickt und auf frischem LB-Agar ausgestrichen, bzw. angezogen. Dennoch fanden sich bei jeweils einer WT- und einer WT-K-Mutante nach RFLP zur $\Delta marR$ -Untersuchung nach Agarose-Gelelektrophorese für ein Isolat zwei unterschiedliche Banden (Mutation und Wildtyp-Allel, Abbildung 15-1 und Abbildung 15-3). Erwartet wurde eine einzelne Bande. Während des Wachstums auf LB-Agarplatten mit Ciprofloxacin (8-fache MHK) schien $\Delta marR$ bei einem Teil der Zellen innerhalb der Kolonie aufzutreten. Damit ließ sich ein Hinweis finden, warum bei HEISIG *et al.* (1994) verschiedene *marR*-Deletion gefunden wurden [167]. Im Selektionsschritt von der Einschnitt-Mutante MI zur Zweischrittmutante MII trat eine 175 bp-Deletion in *marR* auf. Beim anschließenden Selektionsschritt von MII zur Mutante MIII hin, fiel die *marR*-Deletion in MIII mit 74 bp kleiner aus [15], [167], [285].

Aus einer einzelnen mutierten Zelle wuchs nach Inkubation eine Kolonie heran, bestehend aus Klonen der ersten Kolonie-bildenden Zelle. Dass sich eine *marR*-Deletion neben dem Wildtyp-Allel nachweisen ließ, obwohl nur eine einzelne Kolonie gepickt wurde, ließ die Vermutung einer durch spontane ungerichtete Mutation auf Ciprofloxacin Selektiv-Agar später auftretenden *marR*-Deletion zu. Gegen diese These sprach die Tatsache, dass vor dem Auftreten der Mutation, diese Kolonien nicht auf dem Selektiv-Agar wachsen konnte. Eine detailliertere Untersuchung wurde nicht durchgeführt. Mit fortschreitender Inkubationszeit nahm durch Zellteilung die Zahl der $\Delta marR$ Mutanten zu, so dass ein Teil der Zellen der Kolonie das $\Delta marR$ enthielt.

Die Veränderungen innerhalb der QRDR wurden durch SANGER-Sequenzierung ermittelt. Bei allen Versuchsreihen mit Qnr bei WT, WT-K und MII fanden sich keine zusätzlichen Mutationen innerhalb der QRDR (Tabelle 4-8). Die Anwesenheit von Qnr schien die notwendigen zusätzlichen Mutationen innerhalb der Zielstrukturen (*gyrA*, *parC*) zu kompensieren. Aus den Arbeiten von Dr. N. HILSBURG-EMRICH (2012) war bekannt, dass bei einem Selektionsexperiment mit *E. coli* WT QnrS1 mit Ciprofloxacin keine Mutation in *gyrA* in Codon 83 gefunden wurde. Außerhalb der QRDR fand sich bei ca. 50 % der untersuchten Stämme eine *marR*-Deletion. [18]. Durch RFLP wurden in der vorliegenden Arbeit die Mutanten aus den Qnr-freien Ansätzen mit WT pUC19 und WT-K pUC19 auf *gyrAS83L* untersucht. Hier fanden sich zwei Mutanten mit einem veränderten Bandenmuster (RFLP-Untersuchung für *gyrAS83L*, Abschnitt 4.4.2.3). Diese Mutanten wurden nicht weiter charakterisiert.

Einen Einfluss von Qnr auf die Ausbildung einer Resistenz zeigen auch die Ergebnisse bei BRIALES *et al.* (2011). Hier wurde in einem Wildtyp *E. coli*-Stamm im Vergleich zu isogenen *E. coli*-Stämmen mit Mutationen in *gyrA* und/ oder *parC* der *In-vitro*-Effekt von QnrA1, QnrB1 und QnrS1 auf die Ausbildung einer Fluorchinolon-Resistenz untersucht. Die Anwesenheit von Qnr erhöhte die MHK von Fluorchinolonen für die untersuchten *E. coli* Genotypen. Bezogen auf die MHK war die Erhöhung bei QnrB1 geringer als bei QnrA1. Die Anwesenheit von Qnr wirkte sich auf die MPC von Fluorchinolonen ähnlich aus, wie die Anwesenheit der Aminosäuresubstitution Ser83-Leu in GyrA. Bei der Ermittlung der MPC wurden nach 24 h bei der 4-fachen MHK von Ciprofloxacin für dem Wildtyp *E. coli* ATCC 25922 mit Qnr mindestens 100-mal mehr koloniebildende Einheiten (KBE) im Vergleich zum Qnr-freien Ansatz ermittelt [283].

In einem Versuchsansatz mit den zwei *E. coli* Referenzstämmen J53 und KL16 fanden sich bei CESARO *et al.* (2008) ähnliche Befunde. Nach Selektion mit Ciprofloxacin bei Transformanden mit Qnr wurde bei 20 % der selektierten Mutanten eine Mutation innerhalb der QRDR detektiert. Für die übrigen Mutanten wurden Mutationen außerhalb der QRDR vermutet. In der Vergleichsgruppe ohne Qnr fanden sich bei 79 % der Einschnitt-Mutanten die Mutationen innerhalb der Zielstrukturen [263]. Ähnliche Ergebnisse im Zusammenhang mit Ciprofloxacin-Forward Assays fanden sich in den Arbeiten von GOTO *et al.* (2015) und VINUÉ *et al.* (2014, 2016): Bei *E. coli* Wildtypstämmen wurden keine QRDR-Mutationen in Transformanden mit QnrA1 nach Ciprofloxacin-Forward-Assays gefunden [262], [265], [286]. Neben Qnr wurde eine mögliche Kompensation einer QRDR-Mutation auch durch andere PMQR in diesen Arbeiten diskutiert, da sich ähnliche Befunde in Versuchen mit weiteren PMQR fanden, wenn auch hier vereinzelt *gyrA*-Mutationen detektiert wurden. GOTO *et al.* (2015) zeigten bei klinischen *E. coli*-Isolaten, dass die Aufnahme von *qnrA1* allein ausreichte, um in eigentlich letalen Ciprofloxacin-Konzentrationen zu überleben, ohne dass QRDR-Mutationen auftraten. Besonders bei *E. coli* O25b wurde diese Beobachtung gemacht, was einen Teil zur Erklärung für die weltweite Ausbreitung des *E. coli*-Stammes O25b:H4-ST131 beitragen könnte. Das Fehlen weiterer QRDR-Mutationen ist bei Qnr und anderen PMQR zu beobachten [262], [265], [286].

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeiten lassen vermuten, dass sobald ausgehend von der Zweischnittmutante *E. coli* MII (*gyrAS83L*, $\Delta marR$ 175 bp) hin zu Mutanten mit einer MHK von Fluorchinolonen über Grenzwert nach EUCAST 2016 [24] selektiert wird, durch Qnr eine Kompensation weiterer QRDR-Mutationen zur Ausbildung einer hohen Fluorchinolon-Resistenz möglich ist. Darauf deuten auch die fehlenden QRDR-Mutationen in den selektierten WT- und WT-K-Mutanten hin. Eine weitere Bestätigung ist das Auftreten von *gyrA*-Mutationen nur Qnr-freien Ansätzen (WT pUC19 Nr. 14 und WT pUC19 Nr. 17; Abschnitt 4.4.2.3.1).

Die Befunde nach Durchführung von Ciprofloxacin-Forward-Assays wurden so nicht erwartet, da bereits bekannt war, dass sich bei Anwesenheit von Qnr in Ciprofloxacin-resistenten *gyrA*-Mutanten beide Resistenzfaktoren additiv verhalten [172], [283]. Überträgt man die Erkenntnisse aus der Charakterisierung der selektierten Mutanten auf Befunde bei klinischen Isolaten mit Qnr und einer ausgeprägten Fluorchinolon-Hochresistenz, so ist zu vermuten, dass der Transfer eines *qnr*-codierenden Plasmids erst nach der Ausbildung der notwendigen Mutatio-

nen innerhalb der Fluorchinolon-Zielstrukturen stattfindet (Abschnitt 1.8). Bei gefundenen klinischen Isolaten (auch aus der Tiermast) lassen sich Mutationen innerhalb der Gyrase und Topoisomerase IV unter Anwesenheit von Qnr nachweisen. Diese Koexistenz ist nur durch das Auftreten spontaner Mutationen zu einem Zeitpunkt vor dem Erwerb von Qnr-Plasmiden zu erklären [18], [233], [287]–[293].

Bei den untersuchten Mutanten wurden keine Mutationen innerhalb der QRDR gefunden und eine Abnahme der Empfindlichkeit gegenüber Fluorchinolonen ließ sich nicht auf Veränderungen der Plasmide zurückführen. Es war davon auszugehen, dass eine Mutation außerhalb der bisher bekannten Zielregionen vorlag. Die Ergebnisse bei VINUÉ *et al.* (2014, 2016) stützen diese Vermutung. Hier wurden 43 spontane Mutanten untersucht, nachdem ausgehend von *E. coli* J53 mit dem natürlichen *qnrA1*-Plasmid pMG252 selektiert wurde. Die Selektions-Konzentration lag zwischen der MHK von Ciprofloxacin (0,25 µg/ml) und der MPC (2 µg/ml) (vergleiche Abschnitt 1.6). Die selektierten Mutanten hatten eine reduzierte Empfindlichkeit gegenüber Ciprofloxacin (MHK von Ciprofloxacin 0,87 – 2 µg/ml). Bei VINUÉ *et al.* (2016) fand sich bei keinem Mutanten eine Mutation innerhalb der QRDR von *gyrA* [233], [262]. Bei WANG *et al.* (2004) wird berichtet, dass zusätzliche chromosomale Mutationen außerhalb der QRDR der Gyrase und Topoisomerase IV liegen müssen, die mit Qnr eine höhere MHK von Fluorchinolonen verursachen ("*The higher resistance to all quinolones tested in donor compared to transconjugant strain reflects such additional chromosomal resistance mutations*") [170].

VINUÉ *et al.* (2016) lassen eine weitere Vermutung zu. Ausgehend von einem *E. coli* Wildtyp mit Qnr werden vermehrt Mutanten mit erhöhter Effluxpumpen-Aktivität oder einer reduzierten Porin Expression selektiert. Diese Mutationen sind außerhalb der QRDR lokalisiert und scheinen den Efflux, bzw. die *acrAB*- und *tolC*-Expression zu steigern. Die Wahrscheinlichkeit ist geringer, dass eine bestimmte Veränderung der Gensequenz in Gyrase oder Topoisomerase IV auftritt, und für die Resistenzausbildung relevant ist. Mutationen der Gyrase oder Topoisomerase IV treten in einem verhältnismäßig kleinen Genabschnitt (QRDR) auf und ein bestimmter Aminosäureaustausch ist notwendig. Mutationen mit einem Einfluss auf den Efflux treten schon aufgrund der größeren infrage kommenden Sequenzbereiche häufiger auf (Abbildung 5-3). Beispielsweise kann MarR seine regulatorische Funktion durch unterschiedliche Mutationen (Deletion, Insertion, Substitution) verlieren [37].

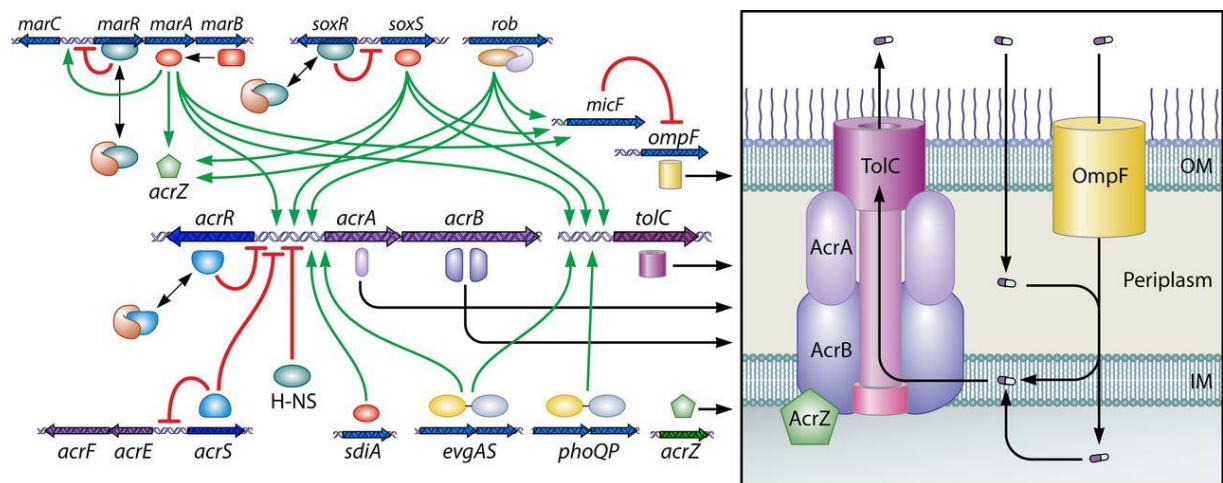


Abbildung 5-3 Die Regulation der Expression von *acrAB-tolC* in *E. coli* [37]

Die Transkription von *acrAB* und *tolC* ist nicht miteinander verknüpft. Die gleichen Regulatoren steuern die Transkription der Gene. AcrR: Repressor der *acrAB* Expression. AcrS: Repressor der *acrEF*-Expression. Andere Regulatoren: SdiA oder H-NS-Protein. Die globalen Regulatoren MarA, SoxS und Rob beeinflussen positiv die *acrAB*-, *tolC*- und *micF*-Expression. *micF* inhibiert als *antisense* RNA die Translation der *OmpF* mRNA. Das Zwei-Komponenten-Regulationssystem EvgAS und/oder PhoQP kann die *acrAB*- und *tolC*-Expression steigern.

Rote Linien bedeuten eine Repression der Transkription. Grüne Pfeile stellen eine Aktivierung der Gen-Expression dar. MarB moduliert die *marA*-Expression. Verschiedene Regulatoren können mit bestimmten Liganden Bindungen eingehen (zum Beispiel Antibiotika oder Metabolite) oder können durch oxidativen Stress induziert werden und inaktiviert (AcrR, MarR, SoxR) oder aktiviert (Rob durch Gallensalze oder Fettsäuren) werden. Auch können Mutationen zur Inaktivierung von AcrR, AcrS, MarR und SoxR führen. Auch ist eine Regulation der *acrAB*-Expression durch nicht-codierende RNAs nachgewiesen worden.

5.3.1 Identifizierung der Ursache für die Zunahme der MHK von Ciprofloxacin

Eine andere Erklärung für die erhöhte Effluxaktivität, bzw. Resistenzzunahme können veränderte Stoffwechselprozesse sein und werden in den nächsten Kapiteln diskutiert [34], [248], [294], [295].

Mutationen in der QRDR von Gyrase und Topoisomerase IV tragen stärker als PMQR zur Ausbildung einer Fluorchinolon-Hochresistenz bei. Jedoch reduziert sich durch PMQR die Zahl an Fluorchinolonen am Wirkort, so dass der Druck zur Ausbildung einer Mutation innerhalb der QRDR abnimmt. Gleichzeitig können Mutationen - mit einem schwächeren Einfluss auf die MHK von Fluorchinolonen - außerhalb der QRDR vermehrt auftreten, wenn z.B. durch Qnr die

Mutationsrate gesteigert wird (Abschnitt 4.6.3.1.2 und Abschnitt 5.2.2) [149], [233], [296]–[298]. Ähnliche Berichte über eine erniedrigte Empfindlichkeit auf Fluorchinolone ohne zusätzliche Targetmutationen fanden sich zu klinischen Isolaten, die Qnr oder andere PMQR besaßen [263], [286], [299]–[301].

Um die Ursache für die MHK-Veränderung zu finden, wurde eine Genomsequenzierung bei einer Mutante durchgeführt. (Abschnitt 4.5). Es wurde die selektierte Mutante MII pHPNE19-02.1 Nr. I 43 (MHK von Ciprofloxacin: 8 – 16 µg/ml) ausgewählt. Die Genomsequenzierung deckte eine 7 bp-Deletion im Gen der Isocitratdehydrogenase (*icd*) auf. Nach Auswertung der Sequenzdaten fanden sich keine weiteren Veränderungen im Genom verglichen mit dem Ausgangsstamm *E. coli* MII (GK573). In einem anschließenden Schnelltest auf Δicd wurden weitere selektierte Mutanten untersucht (Abschnitt 4.5.2). Bei auffälligen Mutanten in der Δicd -Untersuchung wurde die komplette *icd*-Sequenz durch Sequenzierung nach SANGER ermittelt. Zwei weitere Mutanten mit Mutation im *icd*-Gen wurden gefunden (Tabelle 5-2).

Tabelle 5-2 Δicd bei selektierten Mutanten.

Mutante	MHK Cip (µg/ml)	Mutation
II pHPNE19-02.1 Nr. III 2	16	Aminosäureaustausch, Position +284, Tyrosin (TAT) → Stoppcodon (TAG)
II pHPNE19-02.1 Nr. I 43	8	7 bp Deletion 818 bp bis +824 bp Stoppcodon an Aminosäureposition 278
II pHPNE18-01.1 Nr. II 18	8	Deletion von <i>icd</i> und angrenzender Region vermutet

Ein Alignment der Aminosäuresequenzen ist in Tabelle 5-3 zu finden. Für die Mutante MII pHPNE18-01.1 Nr. II 18 ließ sich für eine Sequenzanalyse kein Amplicon innerhalb von *icd* erzeugen, und somit keine Sequenz abbilden. Bei MII pHPNE19-02.1 Nr. III 2 fand sich an Position +284 ausgehend vom Startcodon ein Basenaustausch von TAT zu TAG. Durch diesen Basenaustausch kam es zu einem Stoppcodon, so dass statt der Aminosäure Tyrosin ein Transkriptionsstop codiert war. Bei der Positivkontrolle MII pHPNE18-01.1 Nr. II 23 fand sich eine stille Mutation (Position 1863 in Tabelle 4-19). Bei MII pHPNE19-02.1 Nr. II 18 konnte ein Bereich von 117 Basen nicht sequenziert werden (grauer Bereich in Tabelle 4-19). Bei den beiden Positivkontrollen, sowie bei allen untersuchten Mutanten, fand sich nach Sequenzanalyse eine Insertion von 11 Basen im *icd*-Terminator im Vergleich zu CFT073. Die Rolle der (veränderten) Terminator-Sequenz wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht weiter untersucht.

Eine 7 bp-Deletion wie bei MII pHPNE19-02.1 Nr. I 43 fand sich bei keiner weiteren der untersuchten Mutanten. Dennoch scheint bei drei selektierten Mutanten der Ausfall der Isocitratdehydrogenase für die Ausbildung einer klinisch relevanten Fluorchinolon-Resistenz verantwortlich zu sein. Neben der Mutation in *icd* wurden keine zusätzlichen Mutationen innerhalb der QRDR der primären Targetregionen gefunden. Von den drei gefundenen *icd*-Mutanten wurden die Auswirkungen von Δicd auf die Ausbildung einer Fluorchinolon-Resistenz anhand von MII pHPNE19-02.1 Nr. I 43 (AI43) in dieser Arbeit genauer untersucht.

Tabelle 5-3 Icd -Aminosäuresequenzen bei *E. coli* CFT073, MII und selektierter Mutanten

A: pHPNE19-02.1 (*qnrA1*); B: pHPNE18-01.1 (*qnrB1*).

Homologe Bereiche bei den untersuchten Mutanten als auch bei **CFT073** und der Zwischrittmutante **MII** sind gelb unterlegt. Blau unterlegt sind Sequenzen die nur bei einem Teil der untersuchten Mutanten homolog sind. Bei **MII A Nr. III 2** liegt ein Stopcodon vor, so dass ab Position 95 keine weiteren Aminosäuren kodiert werden. Bei **MII A Nr. I 43** kommt es bedingt durch eine Deletion von 7 bp ab Position 273 zu einer Leserasterverschiebung (*frameshift*). In Position 278 sorgt die Leserasterverschiebung für ein neues Stopcodon, so dass ab 278 keine Aminosäuren mehr codiert werden. Bei den anderen untersuchten Mutanten ließen sich keine Mutationen innerhalb *icd* finden. Für **MII B Nr. II 18** konnte kein Amplicon erhalten werden und daher ist bei dieser Mutante von einer *icd*-Deletion auszugehen. Bei diesem Sequenzvergleich lässt sich keine Aminosäuresequenz zeigen.

CFT073	icd	(1)	MESKVVVPAQGRKTTLLQNGKLNVPENP	11PYIBDDGI	GVDDT	PAMLKVVDA	VERKAY	KGERKI	ISWMEI	YNGEKSTQ	YVGGD	VWLP	ETLLD	90
MII	icd	(1)	MESKVVVPAQGRKTTLLQNGKLNVPENP	11PYIBDDGI	GVDDT	PAMLKVVDA	VERKAY	KGERKI	ISWMEI	YNGEKSTQ	YVGGD	VWLP	ETLLD	
MII A Nr. 143	icd	(1)	MESKVVVPAQGRKTTLLQNGKLNVPENP	11PYIBDDGI	GVDDT	PAMLKVVDA	VERKAY	KGERKI	ISWMEI	YNGEKSTQ	YVGGD	VWLP	ETLLD	
MII A Nr. 118	icd	(1)	MESKVVVPAQGRKTTLLQNGKLNVPENP	11PYIBDDGI	GVDDT	PAMLKVVDA	VERKAY	KGERKI	ISWMEI	YNGEKSTQ	YVGGD	VWLP	ETLLD	
MII A Nr. 113	icd	(1)	MESKVVVPAQGRKTTLLQNGKLNVPENP	11PYIBDDGI	GVDDT	PAMLKVVDA	VERKAY	KGERKI	ISWMEI	YNGEKSTQ	YVGGD	VWLP	ETLLD	
MII A Nr. 112	icd	(1)	MESKVVVPAQGRKTTLLQNGKLNVPENP	11PYIBDDGI	GVDDT	PAMLKVVDA	VERKAY	KGERKI	ISWMEI	YNGEKSTQ	YVGGD	VWLP	ETLLD	
MII A Nr. 1113	icd	(1)	MESKVVVPAQGRKTTLLQNGKLNVPENP	11PYIBDDGI	GVDDT	PAMLKVVDA	VERKAY	KGERKI	ISWMEI	YNGEKSTQ	YVGGD	VWLP	ETLLD	
MII B Nr. 1123	icd	(1)	MESKVVVPAQGRKTTLLQNGKLNVPENP	11PYIBDDGI	GVDDT	PAMLKVVDA	VERKAY	KGERKI	ISWMEI	YNGEKSTQ	YVGGD	VWLP	ETLLD	
CFT073	icd	(91)	LIRB	RVAIKG	PLTTPVGGG	IRSLNVA	LRQBLD	YICLR	VRVY	YQGT	PSE	VKHBELT	DWV	180
MII	icd	(91)	LIRB	RVAIKG	PLTTPVGGG	IRSLNVA	LRQBLD	YICLR	VRVY	YQGT	PSE	VKHBELT	DWV	180
MII A Nr. 143	icd	(91)	LIRB	RVAIKG	PLTTPVGGG	IRSLNVA	LRQBLD	YICLR	VRVY	YQGT	PSE	VKHBELT	DWV	180
MII A Nr. 118	icd	(91)	LIRB	RVAIKG	PLTTPVGGG	IRSLNVA	LRQBLD	YICLR	VRVY	YQGT	PSE	VKHBELT	DWV	180
MII A Nr. 113	icd	(91)	LIRB	RVAIKG	PLTTPVGGG	IRSLNVA	LRQBLD	YICLR	VRVY	YQGT	PSE	VKHBELT	DWV	180
MII A Nr. 112	icd	(91)	LIRB	RVAIKG	PLTTPVGGG	IRSLNVA	LRQBLD	YICLR	VRVY	YQGT	PSE	VKHBELT	DWV	180
MII A Nr. 1113	icd	(91)	LIRB	RVAIKG	PLTTPVGGG	IRSLNVA	LRQBLD	YICLR	VRVY	YQGT	PSE	VKHBELT	DWV	180
MII B Nr. 1123	icd	(91)	LIRB	RVAIKG	PLTTPVGGG	IRSLNVA	LRQBLD	YICLR	VRVY	YQGT	PSE	VKHBELT	DWV	180
CFT073	icd	(181)	EMG	VKRI	IR	PEHGG	IG	IK	PCSE	EG	TR	KL	VRA	181
MII	icd	(181)	EMG	VKRI	IR	PEHGG	IG	IK	PCSE	EG	TR	KL	VRA	181
MII A Nr. 143	icd	(181)	EMG	VKRI	IR	PEHGG	IG	IK	PCSE	EG	TR	KL	VRA	181
MII A Nr. 118	icd	(181)	EMG	VKRI	IR	PEHGG	IG	IK	PCSE	EG	TR	KL	VRA	181
MII A Nr. 113	icd	(181)	EMG	VKRI	IR	PEHGG	IG	IK	PCSE	EG	TR	KL	VRA	181
MII A Nr. 112	icd	(95)	EMG	VKRI	IR	PEHGG	IG	IK	PCSE	EG	TR	KL	VRA	181
MII A Nr. 1113	icd	(181)	EMG	VKRI	IR	PEHGG	IG	IK	PCSE	EG	TR	KL	VRA	181
MII B Nr. 1123	icd	(181)	EMG	VKRI	IR	PEHGG	IG	IK	PCSE	EG	TR	KL	VRA	181
CFT073	icd	(271)	TGK	E	V	I	K	D	V	I	A	D	A	271
MII	icd	(271)	TGK	E	V	I	K	D	V	I	A	D	A	271
MII A Nr. 143	icd	(271)	TGK	E	V	I	K	D	V	I	A	D	A	271
MII A Nr. 118	icd	(271)	TGK	E	V	I	K	D	V	I	A	D	A	271
MII A Nr. 113	icd	(271)	TGK	E	V	I	K	D	V	I	A	D	A	271
MII A Nr. 112	icd	(95)	TGK	E	V	I	K	D	V	I	A	D	A	271
MII A Nr. 1113	icd	(271)	TGK	E	V	I	K	D	V	I	A	D	A	271
MII B Nr. 1123	icd	(271)	TGK	E	V	I	K	D	V	I	A	D	A	271
CFT073	icd	(361)	EMM	L	R	H	G	W	T	E	A	A	D	361
MII	icd	(361)	EMM	L	R	H	G	W	T	E	A	A	D	361
MII A Nr. 143	icd	(278)	EMM	L	R	H	G	W	T	E	A	A	D	361
MII A Nr. 118	icd	(361)	EMM	L	R	H	G	W	T	E	A	A	D	361
MII A Nr. 113	icd	(361)	EMM	L	R	H	G	W	T	E	A	A	D	361
MII A Nr. 112	icd	(95)	EMM	L	R	H	G	W	T	E	A	A	D	361
MII A Nr. 1113	icd	(361)	EMM	L	R	H	G	W	T	E	A	A	D	361
MII B Nr. 1123	icd	(361)	EMM	L	R	H	G	W	T	E	A	A	D	361

5.4 Einfluss Δicd auf Entwicklung einer FQ-Resistenz

5.4.1 Charakterisierung MII pHPNE19-02.1 Nr. I 43

Die Genomsequenzierung deckte bei *E. coli* MII pHPNE19-02.1 Nr. I 43 eine Mutation in der Isocitratdehydrogenase (Δicd 7 bp) auf (Abschnitt 4.4.2.1). *E. coli*-Stämme können ohne eine funktionierende Isocitratdehydrogenase überleben, da der Stoffwechsel vom Citratzyklus auf den Glyoxylatzyklus ausweicht (englisch: *glyoxylate shunt*) [302], [303]. Ohne funktionierende Isocitratdehydrogenase ist in *icd*-Mutanten konstitutiv der Glyoxylatzyklus aktiv. Die MHKs von weiteren Fluorchinolonen (Ofloxacin, Norfloxacin, Ciprofloxacin, Levofloxacin, Moxifloxacin) lagen höher als beim Ausgangsstamm MII pHPNE19-02.1 und oberhalb Grenzwerte gemäß EUCAST 2016 [24]. Zusätzlich war die MHK von Tetracyclin für MII Δicd 7 bp pHPNE19-02.1 im Vergleich zu MII pHPNE19-02.1 um eine Stufe erhöht [24].

Durch Komplementation mit dem dominanten Wildtyp-Gen konnte der Einfluss von Δicd 7 bp auf die Erhöhung der MHK von Ciprofloxacin gezeigt werden. Die Komplementation von Δicd führte bei MII Δicd 7 bp pHPNE19-02.1 zum Absinken der MHK von Ciprofloxacin wieder auf Niveau von MII pHPNE19-02.1 (Abbildung 5-4). Eine Komplementation von $\Delta marR$ bewirkte bei MII Δicd 7 bp keine Veränderung der MHK. Vermutet wurde, dass hier Δicd 7 bp zu einem induzierten Efflux führte, was in Abschnitt 5.4.7.3 noch diskutiert wird. Die Komplementation von $\Delta marR$ in MII bewirkte ein Absinken der MHK auf Niveau der *E. coli* Einschnitt-Mutante MI (GK572) [167]. Das Zusammenspiel der einzelnen Mutationen in MII Δicd 7 bp zusammen mit QnrA1 schien für die Ausbildung einer klinisch relevanten Fluorchinolon-Resistenz notwendig. Neben QnrA1 (pHPNE19-02.1) und QnrB1 (pHPNE18-01.1) wurde auch der Einfluss weiterer Qnr-Varianten auf die Ausbildung einer Fluorchinolon-Resistenz im Zusammenspiel mit den Targetmutationen in MII und Δicd 7 bp betrachtet (Abbildung 5-5). Bei allen untersuchten Qnr-Varianten nahm bei MII Δicd 7 bp die MHK von Fluorchinolonen im Vergleich zu MII zu. Besonders ausgeprägt war der Effekt bei MII Δicd 7 bp mit QnrS1 (pHPNE19-03.1).

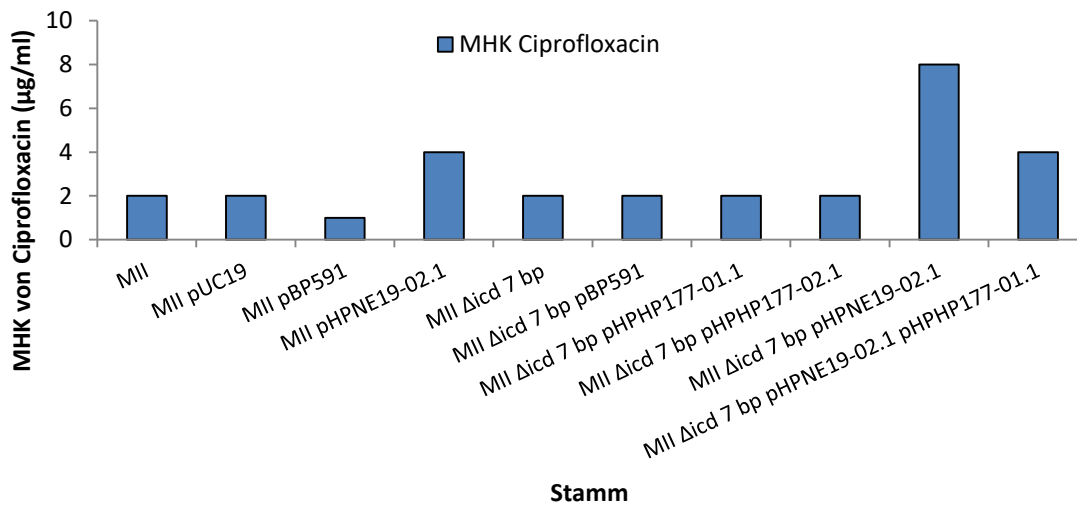


Abbildung 5-4 MHK von Cip nach Komplementation von Δicd 7 bp oder $\Delta marR$

Für die $\Delta marR$ -Komplementation wurde pBP591 verwendet (*marR*-Wildtyp-Allel). Für die Δicd -Komplementation wurden die Plasmide pHPHP177-01.1 und pHPHP177-02.1 verwendet, die beide das *icd*-Wildtyp-Allel enthielten. Betrachtet wurden die *E. coli*-Stämme MII und MII Δicd 7 bp.

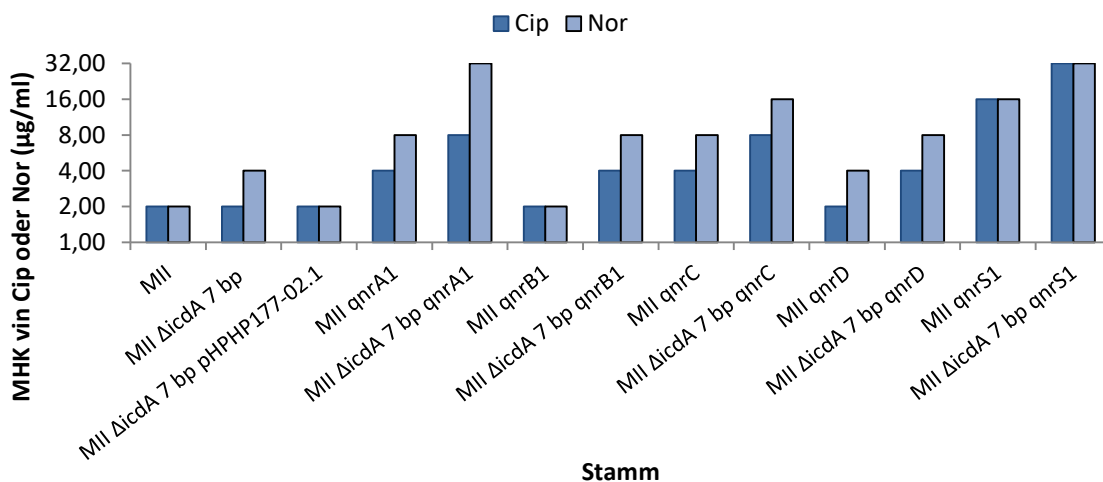


Abbildung 5-5 MHK von Fluorchinolonen für Transformanten mit Qnr-Plasmiden

Cip: Ciprofloxacin; Nor: Norfloxacin; MHK von Cip und Nor für MII oder MII Δicd 7 bp abgebildet. MHK nach Komplementation mit *icd*-WT zum Vergleich gezeigt. *icd*-WT: pHPHP177-02.1; qnrA1: pHPNE19-02.1; qnrB1: pHPNE18-01.1; qnrC: pHPHP19-02.1; qnrD: pHPHP19-01.1; qnrS1: pHPNE19-03.1

Von den Ergebnissen bei Dr. M. PETSCHULIES (2014) und MACIAG *et al.* (2012) wurde die Frage abgeleitet, ob Δicd 7 bp einen Einfluss auf das dominante Mutator-Allel *dnaQ905* besaß [27], [242]. Ein transformierter *E. coli*-Stamm MII (GK573) mit einem in pBR322 klonierten *dnaQ*-Allel aus MIIQ (MII *dnaQ905*) besaß eine Mutationsrate auf Mutatorniveau (Abbildung 5-6).

dnaQ aus MIIQ hatte einen dominanten Mutatorphänotyp gegenüber dem Wildtyp *dnaQ*-Allel [27], [304], [305]. MACIAG *et al.* (2012) zeigten, dass bei Doppelmutanten mit dem rezessiven Mutator-Allel *dnaQ49* und einer Δicd - (Stoffwechsel-)Mutation der Mutatorphänotyp aufgehoben wurde, und die Mutationsrate wieder auf Wildtypniveau sank [27], [242], [244].

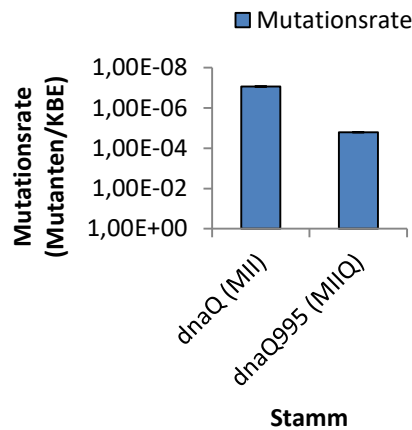


Abbildung 5-6 Mutationsraten aus der Dissertation von Dr. M. PETSCHULIES (2014) [27]

Verglichen wird die Mutationsrate des *dnaQ*-Allels der Zweitschritt-Mutante MII, das sich nicht vom Wildtyp unterscheidet, mit einem mutierten *dnaQ*-Allel aus MIIQ (MII *dnaQ905*). Mutationsrate mit Standardabweichung (RIF^F-Assay, 4-fache MHK); *E. coli* MII transformiert mit plasmidkodierten Allelen aus MII (unverändert) und MIIQ (mutiert).

Der in dieser Arbeit und bei Dr. M. PETSCHULIES verwendete *dnaQ*-Mutator Phänotyp *dnaQ905* schien im Gegensatz zu *dnaQ49* bei MACIAG *et al.* (2012) nicht durch Stoffwechsellmutationen beeinflussbar zu sein [27], [241], [242]. So konnte kein Zusammenhang von zentralen Stoffwechsel- und DNA-Replikationsprozessen im Rahmen eines Rifampicin-Forward-Assays gezeigt werden (Abschnitt 4.6.3). Ein Unterschied in der Mutationsrate war bei den verschiedenen Transformanden nicht festzustellen. Die Mutationsrate war bei Transformanden mit *dnaQ905* erhöht. Transformanden mit dem *dnaQ* Wildtyp-Allel zeigten keine Mutanten im Rahmen des Rifampicin-Forwardassays. Im Gegensatz zu den Ergebnissen bei MACIAG *et al.* (2012) blieb die Mutationsrate unverändert durch Δicd . Als Kontrolle wäre hier ein Ansatz mit Δicd 7 bp und *dnaQ49* sinnvoll gewesen, um zu zeigen, dass *dnaQ49* verglichen mit *dnaQ905* ein rezessiver Mutatorphänotyp ist.

Die hohe Genauigkeit der DNA-Replikation in *E. coli* wird durch die α (DnaE) und ϵ (DnaQ) Untereinheiten der DNA-Polymerase III sichergestellt. Beide Untereinheiten gewährleisten einen korrekten Einbau von DNA-Bausteinen durch eine 3' – 5' Korrekturleseaktivität und ein Dam-

Methylase orientiertes Mismatch-Reparatur-System. *dnaQ49* ist ein rezessives Allel, das eine temperaturempfindliche Korrekturleseaktivität besitzt, und dadurch einen Phänotyp besitzt, der in einer hohen Rate von spontanen Mutationen und einer chronischen Induktion der SOS-Antwort resultiert [242], [306]–[308]. Abhängig von der Bindungsaffinität der mutierten ϵ -Untereinheit (DnaQ) zur α -Untereinheit (DnaE) der DNA-Polymerase III existieren auch dominante Mutator-Allele, wie z.B. *dnaQ905* [244], [309].

MARUYAMA *et al.* (1983) zeigten, dass der *dnaQ905* (*mutD5*) Mutator dominant über das Wildtyp-Allel war, während sich *dnaQ49* gegenüber dem *dnaQ*-Wildtyp-Allel rezessiv verhielt [307]. Der *E. coli*-Mutator *mutD5* war zudem der stärkste *E. coli* Mutator [310]. Bei *dnaQ905* lagen zwei Mutationen im *dnaQ*-Strukturgen vor (T15I, E220D) [27].

5.4.2 Konstruktion von WT Δicd 7 bp

Die gleiche Deletion in der selektierten Mutante *E. coli* MII Δicd 7 bp (isogen zu *E. coli* MII), wurde innerhalb des Chromosoms von *E. coli* WT in *icd* mittels ortsspezifischer Mutagene eingeführt. Mit den isogenen Stämmen MII, MII Δicd 7 bp und WT, WT Δicd 7 bp waren so die Ergebnisse besser vergleichbar, als allein durch Komplementation von *Icd* oder *MarR* mit den Plasmiden pPHP177-01.1, pPHP177-02.1 und pPB591 [27].

Um die Deletion in das Chromosom einzuführen, wurde zuerst die Methode nach DATSENKO *et al.* (2000) verfolgt. Unter Ausnutzung des bakteriellen Rekombinationssystems sollte ein PCR-Fragment mit einer homologen Sequenz, die die gewünschte Mutation enthielt, im bakteriellen Chromosom eingeführt werden [182]. Das Verfahren nach DATSENKO *et al.* war nicht erfolgreich. Bakterielle Rekombinationssysteme erreichten nicht die hohe Rekombinationseffizienz wie das *red*-Rekombinationssystem in der später angewendeten Methode des *Gene Doctorings*. Die Methode nach DATSENKO *et al.* hatte eine geringere Effizienz (Rekombinationsfrequenz $1/10^6 - 1/10^7$) als die Methode des *Gene Doctorings* nach LEE *et al.*, die eine Rekombinationsfrequenz von ca. $1/10$ besaß [27], [245]. Beim *Gene Doctoring* wurde das lineare Fragment *in vivo* durch Restriktion des Plasmids freigesetzt. Zusätzlich lag das Fragment zu diesem Zeitpunkt bereits in allen Zellen der Bakterienkultur vor und wurde hier in mehrfacher Kopie freigesetzt [27], [182], [245]. Unter Verwendung des Selektionsmarkers Levansucrase und durch ein Screening mittels ARMS-PCR wurden schnell rekombinante Stämme als WT Δicd 7 bp identifiziert.

5.4.3 Auswirkungen von Δicd 7 bp auf den Stoffwechsel in *E. coli*

Die Deletion Δicd 7 bp (+818 bp bis +824 bp) führte in *E. coli* zu einem Frameshift und resultierte in einem frühzeitigen Stoppcodon an der Aminosäureposition +278 (Abbildung 5-7). Die Isocitratdehydrogenase katalysiert die Decarboxylierung von Isocitrat zu 2-Oxoglutarat unter Verbrauch von $NADP^+$ zu $NADPH$ (Gl. 10) [311]. Nach einer post-translationalen Modifikation, die eine Phosphorylierung von Serin 113 umfasst, wird Icd durch die Isocitratdehydrogenase Kinase/Phosphatase (AceK) inaktiviert [239]. Nach Dephosphorylierung durch AceK kann Icd wieder aktiviert werden. So kann AceK die Aktivität von Icd modulieren (Abbildung 5-8). Damit wird die optimale Verteilung der Zelle mit Stoffwechselprodukten aus dem Glyoxylatzyklus und dem Citratzyklus möglich [239].

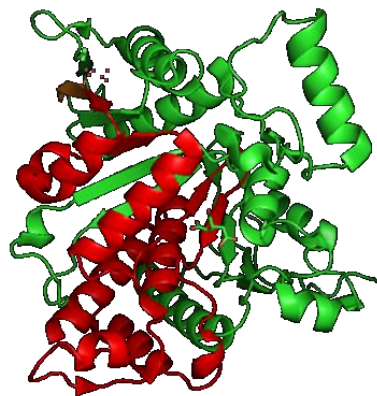


Abbildung 5-7 Auswirkungen der 7 bp Deletion in *E. coli icd*

In rot eingefärbt ist der Bereich gekennzeichnet, der durch Deletion und dem damit frühen Stoppcodon nicht mehr synthetisiert wird.

Wächst die Zelle unter Konditionen mit Acetat oder Fettsäuren, so wird Icd in den Zellen durch Phosphorylierung inaktiviert und der Glyoxylatzyklus aktiviert. Sind Glucose oder Vorstufen dieses Saccharids vorhanden, wird Icd wieder aktiv und mehrheitlich wird der Citratzyklus durchlaufen (Abbildung 5-3) [239]. Als Folge von Δicd 7 bp war keine Modulation von Icd durch AceK möglich, da durch das entstandene Stoppcodon ein verkürztes Protein mit einer zum Wildtyp-Icd abweichenden Faltung exprimiert wurde. Zusätzlich fielen Bindungsstellen weg, die in Tabelle 5-4 blau unterlegt wurden und für die katalytische Aktivität notwendig waren. Zu *icd/Icd* im Zusammenhang mit einer verringerten Empfindlichkeit auf Chinolone fanden sich

bei HELLING *et al.* (1971) erste Hinweise [246]. *E. coli* Mutanten konnten aus einem Nalidixinsäure-Forward-Assay (10 µg/ml) selektiert werden. Ein Ausfall der Isocitratdehydrogenase (Icd) in diesen Mutanten wurde per Ausschlussverfahren mit verschiedenen Zusätzen stellvertretend für den jeweiligen Schritt des Citratzyklus ermittelt (Abbildung 5-8). Keine Icd-Enzymaktivität war bei diesen Mutanten zu messen [246].

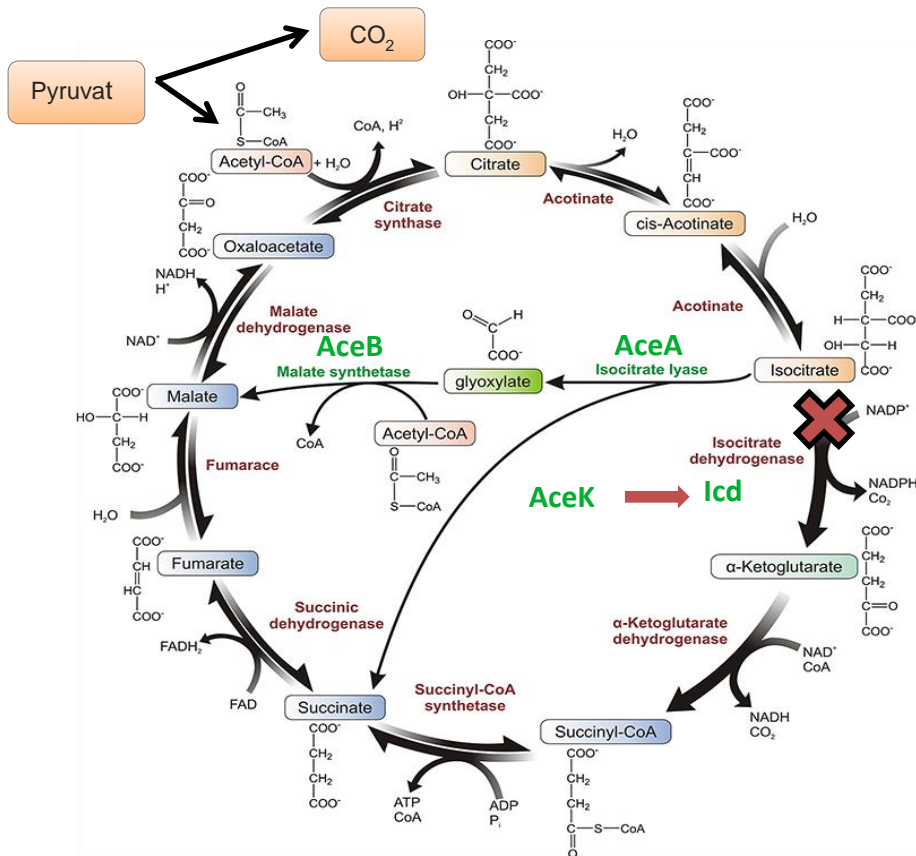


Abbildung 5-8 Citratzyklus und Glyoxylatzyklus, modifiziert nach [312]

Rotes Kreuz: Block im Citratzyklus bedingt durch $\Delta icdA$. AceK reguliert die Icd-Aktivität durch Phosphorylierung/Dephosphorylierung. Nach Phosphorylierung kann Icd kein NADP binden.



Mit Ausfall der Isocitratdehydrogenase (Icd) bleibt als alternativer Stoffwechselweg zur Synthese von Reduktionsäquivalenten nur der Glyoxylatzyklus verfügbar. LAKSHMI *et al.* (1976) stellten die Hypothese auf, dass sowohl die verbesserte Beständigkeit gegenüber Nalidixinsäure als auch die schlechte Wachstumsrate bei Mutanten mit fehlendem *icd* wahrscheinlich durch die Anhäufung eines hemmenden Stoffwechselprodukts innerhalb der

Zelle verursacht wurden. Als verantwortliche Verbindungen wurden Citrat, Isocitrat, Aconitat und Derivate dieser Verbindungen vermutet. Durch Akkumulationsassays wurden in *icd*-Mutanten höhere Konzentrationen an Citrat und Isocitrat im Vergleich zu den jeweiligen Ausgangsstämmen gemessen [244].

Aufbauend auf den Arbeiten von SULAVIK *et al.* (2001) stellten HELLING *et al.* (2002) bei der Untersuchung von *E. coli*-Mutanten einen konkreten Zusammenhang von Stoffwechselprozessen zur Induktion der AcrAB/TolC-Effluxpumpe bei *E. coli icd*-Mutanten her [35], [246]. Eine erhöhte *acrAB* Expression wurde bei *icd*-Mutanten gezeigt. Die Erhöhung wurde auch bei Nalidixinsäure-resistenten *cysH*-, *metE*- und *purB*-Mutanten gemessen. Bei diesen Mutanten fand sich keine erhöhte Expression für *emrAB* und *tolC* [35].

Tabelle 5-4 Übersicht der Substratbindestellen und aktiven Zentren bei *E. coli* K12 *Icd*

blau: Bindestellen, die nach Frameshift durch 7 bp Deletion und frühem Stoppcodon fehlen.

AS-Position	Beschreibung [Quelle]
104 - 104	NADP-Bindestelle [311], [313]–[315]
113 - 113	Substratbindestelle [315], [316]
115 - 115	Substratbindestelle [315]
119 - 119	Substratbindestelle [315]
129 - 129	Substratbindestelle [315]
153 - 153	Substratbindestelle [315]
160 - 160	Kritisch für Katalyse [315]
230 - 230	Kritisch für Katalyse [315]
307 - 307	Bindestelle für Magnesium oder Mangan [311], [313], [315], [317]
352 - 352	NADP-Bindestelle; Stickstoff des Amids und Sauerstoff der Carbonylgruppe [311], [313]–[315]
391 - 391	NADP-Bindestelle [311], [313]–[315]
395 - 395	NADP-Bindestelle [311], [313]–[315]

Wie bei LAKSHMI *et al.* (1976) wurde auch bei HELLING *et al.* (2002) die Hypothese aufgestellt, dass die Erhöhung der *acrAB* Expression durch die Akkumulation von Metaboliten innerhalb der Zelle induziert wurde (englisch: *toxic waste disposal*). Die Konzentration an vermeintlich toxischen Metaboliten stieg aufgrund der Blockaden in Stoffwechselprozessen an. Der Blockade vorgelagerte funktionierende Prozesse erzeugten weiter Metaboliten [34], [247].

ROSNER *et al.* (2009) bestätigten die Ergebnisse von HELLING *et al.* (2002), dass die durch MarA, SoxS und Rob gesteuerten Systeme nicht nur Xenobiotika detektierten, sondern auch auf veränderte Konzentrationen von Metaboliten reagierten. TolC-abhängige Pumpen und Trigger Metabolite (TM) beeinflussten sich gegenseitig in *E. coli* Wildtyp-Zellen. Neben TolC-abhängigen Pumpen wurden im Gegensatz zu den Aussagen bei HELLING *et al.* (2002) noch weitere

TolC-unabhängige Pumpen vermutet [34], [318]. CHUBIZ *et al.* (2010) konnten bei einzelnen aromatischen Metaboliten zeigen, dass diese *in vivo* das *marRAB*-Operon aktivierten. Im verwendeten Modell banden Metaboliten, die an der TolC-Synthese beteiligt waren, direkt an MarR [319].

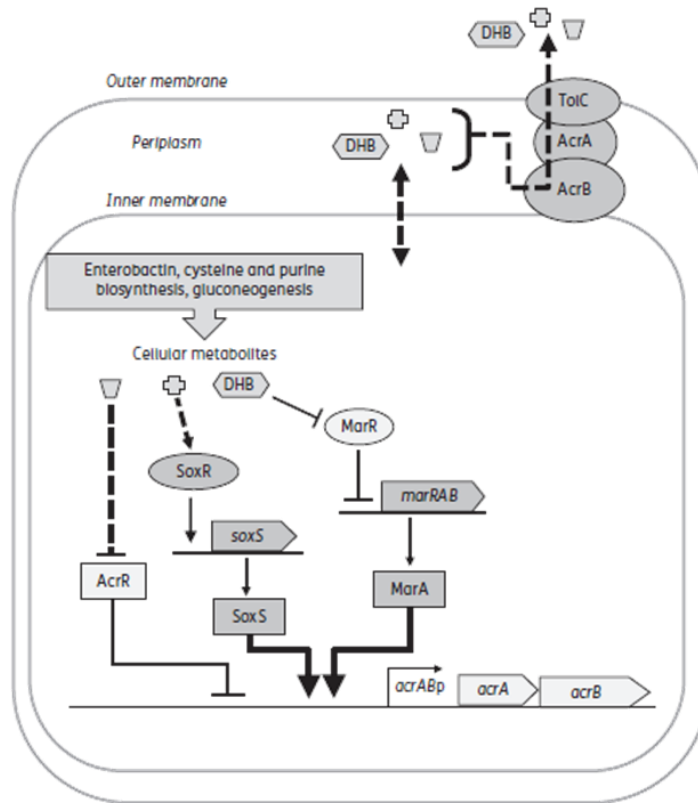


Abbildung 5-9 Regulation der *acrAB* Expression durch zelluläre Metabolite [248]

DHB (2,3-Dihydroxybenzoat) und andere Metabolite (kleine eckige Formen) werden durch AcrAB-TolC ausgeschleust. In Δ *acrB*-Mutanten akkumulieren diese Metabolite und inaktivieren AcrR und induzieren gleichzeitig die Expression von *soxS* und *marA*. Für Interaktionen sind bei Aktivierungen Pfeile verwendet. Für Repression werden „T“ verwendet. Durchgehende Linien zeigen bekannte Interaktionen. Gestrichelte Linien stellen hypothetische Interaktionen dar.

Die von HELLING *et al.* (2002) zuerst postulierte Regulation der *acrAB* Expression durch zelluläre Metabolite untersuchten auch RUIZ *et al.* (2013). Im Gegensatz zu ROSNER *et al.* (2009) wurde eine wichtige Rolle für das AcrAB-TolC-Effluxsystem zur Eliminierung toxischer Metabolit-Konzentrationen gezeigt. Auch wenn andere Effluxpumpen in der Zelle vorlagen, so wurden die (toxischen) Metabolite hauptsächlich durch AcrAB-TolC ausgeschleust. Gleichzeitig nahm das AcrAB-TolC Effluxsystem eine wichtige Rolle bei der Regulation der *soxS*- und *marA* Expression ein. Die Ergebnisse bei Ruiz *et al.* (2013) für die *soxS* und *marA* Transkription wurde direkt durch *quantitative real-time PCR* gemessen, statt indirekte Reporterassays [34], [248], [318].

5.4.4 Metabolische Regulation in *E. coli*

Bakterien können nur überleben, indem sie ständig auf Veränderungen in der Umgebung reagieren. Das ist dank eines durchgehenden Überprüfens der Zustände inner- und außerhalb der Zelle möglich. Der Großteil einer adäquaten Antwort auf Veränderungen wird durch die metabolische Regulation bewerkstelligt. Die Enzyme in den verschiedenen Stoffwechselwegen unterliegen mehreren Stufen der Regulation, bei der auch die Regulation der Transkription von Bedeutung ist [320]–[322]. Das wird durch globale Regulatoren erreicht (englisch: *global regulators*), welche hauptsächlich auf der Ebene der Transkription tätig werden. Globale Transkriptionsregulatoren werden selbst von posttranskriptionalen Regulatoren beeinflusst, und damit eine Kaskade von Regulationsprozessen ausgelöst [320], [323].

Bakterien, Pflanzen, und einige Tiere (z.B. Leberegel) können unter Ausnutzung des Glyoxylatzyklus den zwei Decarboxylierungen des Citratzyklus ausweichen und zwei Acetyl-CoA-Moleküle pro Zyklus einführen, statt einem Molekül im Citratzyklus und so eine Verbindung vom Fettsäureabbau zur Gluconeogenese schaffen. Durch die Abkürzung des Glyoxylatzyklus werden vor allem Fette (Triglyceride), aber auch andere organische Verbindungen effektiv in Glucose (und anschließend in Glykogen und Stärke) umgebaut. Die Organismen „*gewinnen mit dem Glyoxylatzyklus metabolische Vielseitigkeit*“ [324], [325].

Bei intakter Isocitratdehydrogenase wird in *E. coli* primär der Citratzyklus ablaufen. Der Glyoxylatzyklus wird bei Anwesenheit exogener (langkettiger) Fettsäuren oder teilweise unter anaeroben Bedingungen aktiviert, sofern nicht die bevorzugte Glucose als Kohlenstoffquelle im Wachstumsmedium vorliegt [303], [326]. Auch bei Fettsäuren als Energiequelle bildet sich beim Abbau vermehrt Acetyl-CoA (β -Oxidation), das über den Citratzyklus oxidiert werden kann. Acetyl-CoA muss zuerst von einem C2-Körper in einen C3- oder C4-Körper umgebaut werden. Diese Aufgabe übernimmt der Glyoxylatzyklus und benötigt Energie, die größtenteils durch die Oxidation von Acetyl-CoA im Citratzyklus gewonnen wird. Daher sind Glyoxylat- und Citratzyklus in *E. coli* voneinander abhängig. Beide Zyklen werden durch die Isocitratdehydrogenase miteinander verknüpft und im Gleichgewicht gehalten. Hohe Isocitrat-Konzentrationen sorgen für einen verstärkten Ablauf des Citratzyklus und einer vermehrten Bildung von ATP und NADPH. Umgekehrt sorgen niedrige Isocitrat-Konzentrationen für einen verstärkten Ablauf des Glyoxylatzyklus. In der Folge werden Zwischenprodukte aus dem Citratzyklus abgezo-

gen, und die Produktion von ATP und NADPH sinkt [326]–[328]. Beim Menschen und Wirbeltieren ist eine Synthese von Kohlenhydraten aus Fettsäuren nicht möglich, da diesen kein Glyoxylatzyklus zur Verfügung steht. Beim vollständigen Verzicht auf Nahrung (Nulldiät) muss der Organismus daher durch den Abbau von Aminosäuren seinen Glucosebedarf decken und es kommt zu einem Muskelabbau [324], [325], [329]. Bei *E. coli* spielt Cra (englisch: *catabolite repressor/ activator protein*) eine wichtige Rolle bei der Regulierung des Kohlenstoffzyklus. Die Expression von Genen für die Aufnahme von Kohlenstoff und für die Glykolyse werden von Cra unterdrückt, während z.B. *icd* von Cra aktiviert wird [320], [330]–[332].

Der Ausfall der Isocitratdehydrogenase in *E. coli* MII Δicd 7 bp bedeutet den Verlust von metabolischer Vielseitigkeit. Der Glyoxylatzyklus ist dauerhaft aktiviert und es ist keine Wahl zwischen Citrat- oder Glyoxylatzyklus möglich. Dieser Verlust scheint der Mutante von Vorteil zu sein, um unter hohen Fluorchinolon-Konzentrationen zu überleben. Die Mutante MII Δicd 7 bp ist allein auf den Glyoxylatzyklus angewiesen und unfähig auf veränderte Lebensbedingungen adäquat zu reagieren. Wenn keine optimalen Wachstumsbedingungen vorliegen, erfährt die Mutante Fitnessseinbußen. Im Wettbewerb zu anderen Bakterienspezies könnte dies einen Nachteil darstellen, sofern keine Fluorchinolon-Antibiotika in der Umgebung der Bakterien vorliegen. Sollte durch eine weitere Mutation zusätzlich der Glyoxylatzyklus ausfallen, so wäre diese Mutante nicht lebensfähig. In Abschnitt 5.4.5 wird auf Fitnessseinbußen eingegangen.

5.4.5 Zusammenhang Stoffwechsel und Generationszeiten

Durch Ermittlung der Generationszeiten konnte die Fitness bei *icd*-Mutanten gegenüber Stämmen mit isogenem Stammhintergrund und intaktem *icd* quantifiziert werden [225]. Die Generationszeit von *E. coli* MII Δicd 7 bp pHPNE19-02.1 war im Vergleich zu *E. coli*-Stamm MII Δicd 7 bp verlängert. Wurde auf Ampicillin (50 $\mu\text{g/ml}$) bei der Anzucht verzichtet, so sank die Generationszeit auf Werte wie bei MII Δicd 7 bp. Das war ein Hinweis, dass die betrachteten *E. coli*-Stämme mit Abstammung von WT (GK571) bei Ausbleiben eines Selektionsdrucks nicht benötigte, plasmidbasierte Resistenzfaktoren verloren, und dadurch schneller wuchsen (vergleiche Abschnitt 4.3.2) [167], [257]. Auffällig war die Generationszeit für MII Δicd 7 bp pBP591 (Kan 25 $\mu\text{g/ml}$) nach MarR-Komplementation. pBP591 (*marR*) führte in MII Δicd 7 bp zur Erhöhung der Generationszeit auf 39 min. Die Auffälligkeit wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht weiter untersucht. Als Ergänzung wäre ein Vergleich zu *E. coli* MI Δicd 7 bp sinnvoll gewesen.

Nach *marR*-Komplementation entsprach MII Δicd 7 bp dem Stamm MI Δicd 7 bp. Die ermittelten Generationszeiten für WT und MII deckten sich mit den Ergebnissen bei BAGEL *et al.* (1999), die für *E. coli* MI eine Generationszeit auf Niveau von WT, bzw. MII zeigten [130]. Die Generationszeiten von WT Δicd 7 bp und MII Δicd 7 bp pBP591 waren ungefähr gleich groß. Übertragen auf die Generationszeiten für MII Δicd 7 bp pBP591 (bzw. MI Δicd 7 bp) wäre gemäß den Erkenntnissen bei BAGEL *et al.* (1999) nach MarR-Komplementation eine Generationszeit in ähnlicher Höhe zu erwarten gewesen. Jedoch war die ermittelte Generationszeit kürzer.

Der Vergleich der ermittelten Generationszeiten (Abbildung 4-35) zeigte, dass Δicd 7 bp für verlängerte Generationszeiten in WT Δicd 7 bp und MII Δicd 7 bp verantwortlich war, und damit negative Auswirkungen auf die Fitness hatte. Als Folge könnten diese Stämme nicht mit schneller wachsenden Zellen konkurrieren. Bedingt durch eine höhere MHK von Fluorchinolonen schien für MII Δicd 7 bp pHPNE19-02.1 eine verlangsamte Wachstumsgeschwindigkeit das „geringere Übel“ zu sein. Eine Erklärung für die Fitnessverluste könnte im veränderten Stoffwechsel bedingt durch Δicd 7 bp liegen. Der Glyoxylatzyklus lieferte weniger Reduktionsäquivalente als der Citratzyklus. Dieser Zustand war bei WT Δicd 7 bp und MII Δicd 7 bp dauerhaft. Zusammengefasst stand der (*E. coli*) Zelle weniger Energie für weitere Stoffwechselprozesse zur Verfügung, was sich auf die Generationszeit auswirkte.

Zusätzlich ist zu diskutieren, ob die von HELLING *et al.* (2002) und RUIZ *et al.* (2013) postulierte Induktion der *acrAB* Expression durch eine Akkumulation an Stoffwechselprodukten (Abschnitt 5.4.6 und Abschnitt 5.4.7.3) gleichzeitig zu einem verstärkten Auswärtstransport von wichtigen Nährstoffen führte. In Stämmen mit einem MII-Stammhintergrund wirkte sich die durch MarA-gesteuerte *acrAB*- und *tolC*-Überexpression verstärkend auf den Efflux aus. Nährstoffe standen nicht mehr ausreichend zur Verfügung und bedeuteten für diese Zellen einen biologischen Nachteil, der sich in einem langsamen Stoffwechsel und einer Zunahme der Generationszeit sichtbar machte [34], [225], [248]. Einen Zusammenhang von induziertem Efflux und einem langsamen Wachstum bei *E. coli* findet man auch in den Daten von Dr. ARNTJEN (2002) und bei RAND *et al.* (2002) [225], [333]. Ähnliche Beobachtungen wurden auch bei anderen Spezies gemacht, wie z. B. *Salmonella* oder *Pseudomonas* [334]–[336].

5.4.6 Einfluss von Effluxpumpeninhibitor und –induktor auf die MHK von Fluorchinolonen für MII Δicd 7 bp

Durch die Bestimmung der MHK von Fluorchinolonen (FQ) unter Zugabe von Phe-Arg b-Naphthylamid Dihydrochlorid (PA β N, Effluxpumpen-Inhibitor) oder Natrium-Salicylat (Na-Salicylat, Induktor) waren Aussagen über den veränderten Efflux durch Δicd 7 bp möglich.

Nach Zugabe von PA β N bei *E. coli* MII Δicd 7 bp zeigte sich kein Absinken der MHK von Ciprofloxacin oder Norfloxacin auf das Niveau von *E. coli* MII. Die ermittelten MHK von FQ wiesen auf einen gemeinsamen Einfluss von Δicd und Qnr auf den MDR-Efflux hin, da dieser unvollständig durch PA β N in MII Δicd 7 bp pHPNE19-02.1 inhibiert wurde. Zum Vergleich ließ sich der MDR-Efflux in den Qnr-freien Ansätzen mit MII, MII pUC19, MII Δicd 7 bp und MII Δicd 7 bp pPHP177-02.1 vollständig inhibieren (Tabelle 4-35).

Ähnlich wirkten sich auch weitere Qnr-Varianten auf die MHK von Fluorchinolonen aus. Besonders ausgeprägt war der Effekt für MII Δicd 7 bp mit pHPNE19-03.1 (QnrS1, Tabelle 4-36). Aufgrund der ermittelten MHK von Norfloxacin ließ sich interpretieren, dass der MDR-Efflux trotz Zugabe von PA β N nicht vollständig inhibiert wurde, oder es wurde der Einfluss von Qnr auf die Gyrase hier gezeigt. Außer bei MII Δicd 7 bp mit Qnr bewirkte PA β N bei allen Ansätzen eine Zunahme der Empfindlichkeit auf FQ. Die MHK von Norfloxacin sank für diese Stämme um ein bis zwei Verdünnungsstufen und unter den Wert für eine klinisch relevante FQ-Resistenz (gemäß EUCAST 2016) [24], [27], [337], [338].

Natriumsalicylat kann besonders mit MarR interagieren, was zu einer verstärkten Bildung von MarA führt, und so die *acrAB*-Expression induzieren kann, die in einen MDR-Phänotyp resultiert. Neben einem Mar-abhängigen Einfluss von Natriumsalicylat werden noch zusätzlich Mar-unabhängige Mechanismen diskutiert [34], [138], [145], [181], [248], [251], [252].

Aus den Ergebnissen von Dr. N. MATTHIESSEN (2007), war bekannt, dass sich die *acrAB*-Expression in MII trotz *marR*-Deletion steigern ließ. Daraus ergab sich für diese Arbeit die Frage, ob die *acrAB*-Expression durch Δicd 7 bp gesteigert wurde, wenn die regulierende Wirkung von MarR in *E. coli* MII bereits durch die Deletion $\Delta marR$ 175 bp ausfiel. Während die *acrAB*-Expression negativ durch AcrR reguliert wird, wird die Expression positiv bei *acrAB* und *tolC* durch die Transkriptions-Regulatoren MarA, Rob und SoxS beeinflusst [46], [260], [266], [339].

Unter Zugabe des Induktors Natriumsalicylat wurden Empfindlichkeitsbestimmungen durchgeführt (Abschnitt 4.6.7.2) und die Verdopplung der *PacrAB*-Aktivität in *E. coli* MII ($\Delta marR$ 175 bp) im Vergleich zum Natriumsalicylat-freien Ansatz gezeigt (Tabelle 4-37 und Abschnitt 5.4.7.3) [138], [145], [181], [251], [252].

KRISHNAMOORTHY *et al.* (2013) zeigten, dass bei Mangel an TolC nicht wie erwartet die MHK sank. Auch wenn ein aktiver Efflux-Komplex zwingend einen TolC-Kanal benötigt, so reichte eine kleine Fraktion an aktiven AcrAB-TolC-Efflux-Komplexen in einer *E. coli*-Zelle aus, um einen ausreichend hohen Efflux von Xenobiotika zu gewährleisten. Dabei wurde nicht die volle Kapazität an verfügbaren AcrAB-TolC-Komplexen ausgereizt. Auch hatten größere Schwankungen in der Anzahl der AcrAB-TolC-Komplexe einen geringen Einfluss auf die MHK von verschiedenen Antibiotika [340]. Die Ergebnisse von TIKHONOVA *et al.* (2004, 2011) deuten darauf hin, dass AcrAB in *E. coli* im Überschuss zu TolC vorliegt, und nicht der limitierende Faktor für die Assemblierung der AcrAB-TolC-Effluxpumpe ist. Im Umkehrschluss schien nur eine kleine Fraktion an TolC zur Komplex-Bildung für AcrAB zugänglich zu sein [49], [342].

Neben dem Einfluss von Qnr auf die MHK von Fluorchinolonen schien in *E. coli* MII eine *icd*-Deletion durch die Akkumulation von (giftigen) Metaboliten für die Induktion weiterer Regulationsprozesse zu sorgen. Eine „Reserve“ an AcrAB-TolC-Effluxpumpen wurde verfügbar. Die Anzahl an AcrAB-TolC Effluxpumpen, die in die Zellmembran eingebaut werden, scheint limitiert zu sein. Antibiotika und toxische Metabolite werden über die AcrAB-Pumpe aus der Zelle geschleust. Die Transport-Fähigkeit des TolC-Kanals ist abhängig von der Kapazität der AcrAB-Pumpe (V_{max}) [340], [341].

Bei HELLING *et al.* (2002) und RUIZ *et al.* (2013) fanden sich neben der Vermutung, dass das AcrAB-TolC-Effluxsystem die wichtigste Rolle beim Ausschleusen zellulärer Metabolite und anderer Xenobiotika einnimmt, der Hinweis, dass neben MarA zusätzlich die globalen Transkriptionsregulatoren SoxS oder Rob die *acrAB*-Expression induzierten [34], [248]. In der vorliegenden Arbeit ließen die Ergebnisse aus den Versuchen mit Induktion durch Natriumsalicylat die Vermutung zu, dass in MII Δicd 7 bp pHNE19-02.1 die *icd*-Deletion verantwortlich für die Ausbildung zusätzlicher AcrAB-TolC-Komplexe war (Ergebnisse in Abschnitt 4.6.7.2). Bereits die Anwesenheit von Qnr allein in der Zelle schien im Zusammenspiel mit Natriumsalicylat die Empfindlichkeit auf Ciprofloxacin herabzusetzen. Nach Zugabe von Natriumsalicylat fiel in Stämmen mit Δicd 7 bp und Qnr die MHK höher aus

im Vergleich zu Stämmen ohne Δicd 7 bp und Qnr oder im Vergleich zu Stämmen nur mit Qnr. In MII schien trotz einer *marR*-Deletion eine Induktion des Effluxes mit Salicylat möglich (Abbildung 5-10).

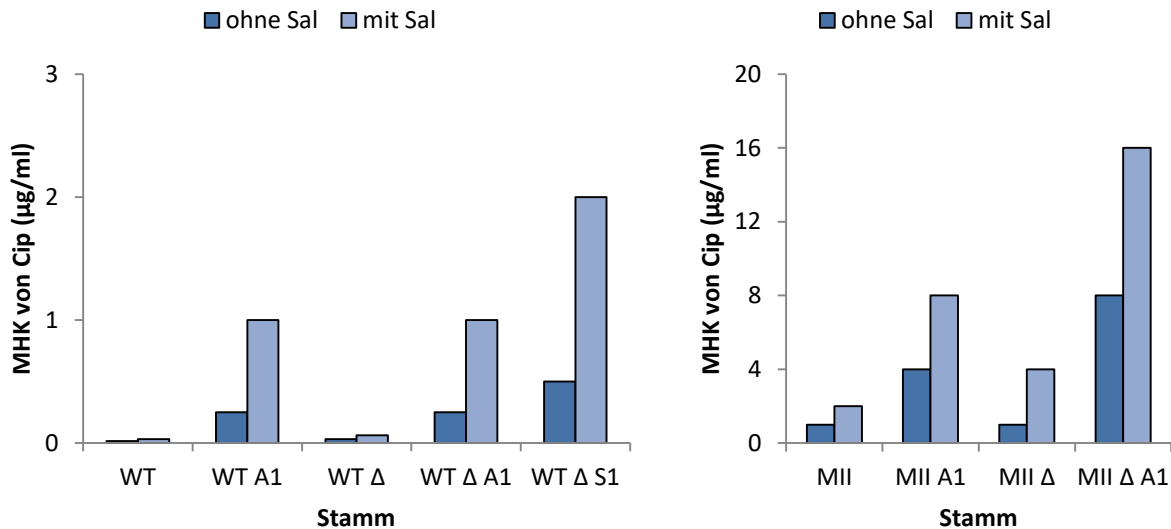


Abbildung 5-10 Einfluss von Natriumsalicylat auf die MHK von Ciprofloxacin

Δ : Δicd 7 bp; A1: pHPNE19-02.1 (*qnrA1*); S1: pHPNE19-03.1; Cip: Ciprofloxacin; Vergleich der MHK von Ciprofloxacin für *E. coli* WT (GK571), MII (GK573) und Mutanten mit Δicd 7 bp (MII Δicd 7 bp) und isogenem Stammhintergrund. Gegenüberstellung der MHK für jeden einzelnen Stamm mit Zusatz von Natriumsalicylat („mit Sal“) und ohne Zusatz („ohne Sal“). Anzucht von Ansätzen mit Plasmid unter Zusatz des Selektionsantibiotikums Ampicillin (50 µg/ml).

5.4.7 Verwendung von Reporterplasmiden zur Messung der Luciferase-Aktivität

Unter Mitwirkung von B.Sc. Sarah-Franziska Stahl im Rahmen einer Bachelorarbeit

5.4.7.1 Vorversuche und Ermittlung der optimalen Messbedingungen

Aufbauend auf den Erkenntnissen mit PA β N und Natriumsalicylat (Abschnitt 5.4.6) wurde die *acrAB*-Expression in MII Δicd 7 bp untersucht. Mit der Verwendung von Reporterplasmiden (*PacrAB(ΔEF)::luc*) sollte ein möglicher Zusammenhang in *E. coli* MII Δicd 7 bp zwischen der Regulation der Expression der AcrAB/TolC-Effluxpumpe und einem Block im Citratzyklus detaillierter analysiert werden. Reporterplasmide erlaubten eine indirekte Erfassung der transkriptionalen Aktivierung durch Korrelation der Aktivität des Reporterproteins (*luc*) mit

den Promotoren *PacrAB* (oder *PacrEF*). Ziel war eine Erklärung für die Zunahme der MHK von Fluorchinolonen in MII Δicd 7 bp pHPNE19-02.1 zu finden.

Die von Dr. N. MATTHIESSEN (2007) verwendeten Plasmide pPHB335, pPHB333 und pPHB331 konnten in den Stämmen MII Δicd 7 bp und MII Δicd 7 bp pHPNE19-02.1 nicht wie geplant verwendet werden (Abschnitt 4.6.7.3.9) [181]. Die genaue Ursache für die erfolglose Transformation von MII Δicd 7 bp mit pPHB331, pPHB333 und pPHB335 wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht weiter untersucht. Die Transformation gelang mit pHPAR177-01.1, da dieses Plasmid mit dem Ausgangsvektor pACYC177 einen *ori* aufwies, der nicht zur Inkompatibilitätsgruppe um pBR322 und pUC19 zählte (Tabelle 5-5) [244], [245], [247]. Für Untersuchungen in WT und WT Δicd 7 bp konnten die Reporterplasmide von Dr. N. MATTHIESSEN verwendet werden [181], [238], [253], [343], [344]. Der eingesetzte Reporterassay gab nicht alle Prozesse einer *E. coli*-Zelle wieder. Genabschnitte, die zusätzlich zu den untersuchten Promotoren an der Regulation der Expression von *acrAB* (und *acrEF*) beteiligt waren, wurden durch die gewählte Methode nicht vollständig berücksichtigt.

Tabelle 5-5 Übersicht Vektoren mit ORI, Kopienzahl und Inkompatibilitätsgruppe [311], [324]

Vektor	Kopienzahl	ORI	Inkompatibilitätsgruppe
pUC	ca. 500-700	pMB1 (Derivat)	A
pBR322	ca. 15-20	pMB1	A
pACYC	ca. 10	p15A	B

Bei Verwendung von Reporterplasmiden mit *PacrAB::luc* war zu beachten, dass sich die Kopienzahl des Plasmids direkt auf die Genexpression und damit auf die detektierten Lichtsignale auswirkte. Auch wirkte sich theoretisch die Kopienzahl auf die Wachstumsgeschwindigkeit einer Zelle aus (Abschnitt 4.6.6). Dieser Einfluss war jedoch in den Ergebnissen dieser vorliegenden Arbeit nicht zu sehen. Für alle Versuchsansätze wurde die Einhaltung gleicher Anzuchtbedingungen angestrebt, um einen möglichen Einfluss auf die Kopienzahl und Genexpression gering zu halten. Zur Untersuchung der *acrEF*-Expression wurde das Reporterplasmid pHPHP177-04.1 (*PacrEF::luc*) kloniert (Abschnitt 4.6.7.3.6). Für WT und WT Δicd 7 bp wurde pPHB333 eingesetzt, da dieser Vektor im Gegensatz zu pHPHP177-04.1 (Kan^r) eine Tetracyclin-Resistenz vermittelte. Aufgrund der Aussagen bei HELLING *et al.* (2002) und RUIZ *et al.* (2013), dass die durch AcrEF-TolC erbrachte Effluxleistung im Vergleich zu AcrAB-TolC vernachlässigbar war, wurde in Mutanten mit einem isogenen MII-Hintergrund keine Messung der

PacrEF Expression durchgeführt, und diese Messung blieb auf WT und WT-Mutanten beschränkt. Auch fanden sich bei Dr. N. MATTHIESSEN vergleichbare Aussagen [34], [181], [248]. Lichtsignale konnten bei dieser Methode nur erfasst werden, wenn das plasmidbasierte *luc*-Gen exprimiert wurde. Somit waren Lichtsignale direkt mit einer Promotoraktivität in Verbindung zu bringen.

Bei der Ermittlung der optimalen Messbedingungen wurde festgestellt, dass der Zeitpunkt der LAR-Zugabe (englisch: *Luciferase Assay Reagent*) einen direkten Einfluss auf die absolute Luciferase-Aktivität hatte (Abschnitt 4.6.7.3.1). Diese Beobachtung findet sich auch bei Dr. M. ABU MRAHEIL (2005), wo ein Luciferase-Testsystem zur Ermittlung von Genexpressionen verwendet wurde. Nach Zugabe von LAR nahmen die RLU-Werte mit der Zeit ab [224]. Um eine große Zeitdifferenz zu vermeiden, wurden maximal fünf Proben pro Messreihe zeitgleich vermessen. Durch den Einfluss der Zeit auf das Messergebnis wies die Messung einer Genexpression durch Luciferase-Reporterassays methodische Grenzen auf. RLU-Werte könnten aufgrund des Verbrauchs von LAR durch die Luciferase mit der Zeit abnehmen, oder die Enzymaktivität nahm mit der Zeit ab und LAR war noch ausreichend im Messansatz vorhanden. Eine Enzymaktivität war jedoch auszuschließen, da der verwendete Lysis-Mix das Luciferase-Enzym für mehrere Minuten stabilisierte. Diese Beobachtung deckte sich mit den Vorgaben von PROMEGA und erneut mit der Arbeit von Dr. M. ABU MRAHEIL (2005) [223], [224]. Daher war die Abnahme der RLU-Werte auf den Abbau von LAR zurückzuführen. Die Vorgaben durch PROMEGA machten keine Vorschläge, wie dieser Abnahme begegnet werden konnte. Eine erneute Zugabe von LAR wäre zur erneuten Substratsättigung vor jeder Messung sinnvoll, um den Einfluss des Zeitfaktors möglichst klein zu halten. In dieser Arbeit wurde nach Vorversuchen eine von den Herstellerangaben abweichende Rezeptur für den Lysis-Mix verwendet. Die Lysozym-Konzentration betrug zwei Drittel und die BSA-Konzentration betrug ein Drittel der vom Hersteller vorgegebenen Konzentrationen. Hier wurde auf die Erfahrung von Dr. M. ABU MRAHEIL (2005) und Dr. N. MATTHIESSEN (2007) zurückgegriffen [181], [223], [224].

5.4.7.2 Wahl eines geeigneten Quotienten zur Ermittlung der spezifischen Luciferase-Aktivität

Der Einfluss von Δcd 7 bp auf die Expression von *acrAB* wurde über die spezifische Luciferaseaktivität sichtbar gemacht. Hierzu wurden Quotienten der absoluten RLU-Werte

bezogen auf die optische Dichte (OD), Anzahl der Koloniebildenden Einheiten (KBE) oder auf den Proteingehalt (nach BRADFORD) ermittelt. Durch die Quotienten wurden Schwankungen bedingt durch unterschiedliche KBE oder durch unterschiedliche Wachstumsphasen ausgeglichen und somit die einzelnen Proben erst vergleichbar gemacht. Für den Vergleich der einzelnen spezifischen Luciferase-Aktivitäten wurden die Aktivitäten auf einen bestimmten Ausgangsstamm bezogen. Die *PacrAB*-Aktivität dieses Ausgangsstammes (z.B. *E. coli* WT, GK571) bildete den Grundwert. Die RLU/KBE-Quotienten unterschieden sich vom RLU/Protein- und RLU/OD-Quotienten (Abbildung 4-50). Die untersuchten Stämme wurden bis zur gleichen optischen Dichte (OD) angezogen, unterschieden sich jedoch in Ihrer Morphologie. Bei gleicher OD konnten unterschiedliche KBE vorliegen. Als Maß für die Trübung einer Flüssigkultur und als schneller Indikator für den Wachstumszustand einer Kultur wurde die OD über eine Absorptionsmessung bestimmt. Mit der OD wurde indirekt die KBE gemessen, da bei einer höheren Zellzahl auch eine höhere OD gemessen wurde. Das war eingeschränkt möglich, da ab einer gewissen Zelldichte, die OD nicht mehr anstieg. Bei gleicher OD verschiedener Stämme werden die Zell-Morphologien nicht unterschieden und daher führen unterschiedliche KBE zur gleichen OD. Dadurch konnte eine Abweichung der RLU/KBE-Quotienten erklärt werden. Auch war nicht zufriedenstellend, dass bei diesem Quotienten die Einzelwerte eines Stammes untereinander schwankten, was in der Standardabweichung deutlich wurde. Zur Untersuchung der *PacrAB*-Aktivität wurden die RLU/OD- und RLU/Protein-Quotienten berücksichtigt, da beide Quotienten miteinander korrelierten.

5.4.7.3 Untersuchung des Einflusses von Δicd 7 bp auf die Expression von *acrAB* (und *acrEF*) durch Verwendung eines Luciferase-Reporterassays

Die erste Messung der *PacrAB*-Aktivität in Stämmen mit isogenem Stammhintergrund (10.07.2014, Abbildung 4-50, Abschnitt 4.6.7.3.9) zeigte bei *E. coli* MI (*gyrAS83L*, GK572) eine Erhöhung von 150 % im Vergleich zu WT (GK571). Diese Beobachtung fand sich auch in der Arbeit von Dr. N. MATTHIESSEN (2007), und wurde dort im Zusammenhang mit dem Einfluss der *AcrAB*/*TolC*-Effluxpumpe auf die Entstehung einer Folgemutation diskutiert. Hier wurden die gemachten Beobachtungen mit der von LINDGREN *et al.* (2003) beschriebenen Erhöhung der Mutationsrate im Laufe der Entwicklung einer Fluorchinolon-Resistenz in *E. coli* in Verbindung gebracht [181], [345]. In der vorliegenden Arbeit hatte bei *E. coli*-Stamm JM109 die Mutation

im Gyrase-Gen (*gyrA96*) keinerlei Auswirkung auf die Promotoraktivität. In *E. coli* MII (GK573) konnte bedingt durch die *target*-Mutation *gyrAS83L* und durch die zusätzliche *non target*-Mutation (*marR*-Deletion) eine Zunahme der *PacrAB*-Aktivität im Vergleich zu *E. coli* WT von 300 % bis 350 % gemessen werden. Für MII Δicd 7 bp (ohne pHPNE19-02.1) lag die Aktivität auf gleichem Niveau wie für MII und ein Effekt von Δicd 7 bp auf die *PacrAB* Expression wurde nicht detektiert. Diese Ergebnisse korrelierten mit den MHK von Fluorchinolonen für die untersuchten Stämme [167], [257], [258].

In der zweiten Messung (15.07.2014, Abbildung 4-51) wurde bei MII und MII Δicd 7 bp eine Erhöhung der *PacrAB*-Aktivität von 600 % im Vergleich zu WT ermittelt. Bei dieser Messung musste die Versuchsdurchführung geändert werden, und statt der Inkubation in einem Schüttelinkubator wurden in einem Wasserbad die Kulturen für WT, MI und JM109 anzogen. Diese Änderung führte vermutlich zur Änderung der absoluten RLU-Werte, die fast doppelt so hoch ausfielen verglichen mit der ersten Messung (10.07.2014, Abbildung 4-50). Jedoch fanden sich bei WT, MI und JM109 zueinander die gleichen Verhältnisse der *PacrAB*-Aktivität wie in der Messung vom 10.07.2014. Bei dieser Messung war es nicht möglich gewesen die verschiedenen Stämme unter gleichen Bedingungen anzuziehen. Bei der zweiten Messung (15.07.2014, Abbildung 4-51, Abschnitt 4.6.7.3.9.1) wurden vier weitere selektierte Mutanten (Qnr-frei nach *plasmid curing*) aus dem MII-Ciprofloxacin-Forward-Assay untersucht (interne Bezeichnung: MII A Nr. II 21; MII A Nr. III 13; MII B Nr. II 18; MII B Nr. II27, Abschnitt 4.4.2.2 und Abschnitt 4.6.4.3). Die *PacrAB*-Aktivität dieser Mutanten war auf einem Niveau mit MII und MII Δicd 7 bp. Eine mögliche unbekannte zusätzliche Mutation in diesen Mutanten wirkte sich nicht auf die Erhöhung einer Expression aus. Interessant war die Mutante MII pHPNE18-02.1 Nr. II 18, die vermutlich kein *icd*-Gen besaß (Abschnitt 4.5.2.2). Hier fand sich ein Aktivitätsniveau vergleichbar zu MII und MII Δicd 7 bp. Dieses Ergebnis deckte sich mit der erwarteten MHK-Zunahme, die erst bei Anwesenheit von Qnr in der Mutante zu sehen war (Tabelle 4-27 und Tabelle 4-41) [257], [258].

In einem dritten Versuchsansatz (17.07.2014, Abbildung 4-52, Abschnitt 4.6.7.3.9.2) wurde der Einfluss von Norfloxacin (stellvertretend für Fluorchinolone) auf die *PacrAB*-Aktivität in den *E. coli*-Stämmen MII, MII Δicd 7 bp und MII Δicd 7 bp pHPNE19-02.1 untersucht. Mit zunehmender Norfloxacin-Konzentration, die einem Mehrfachen der jeweiligen MHK von Norfloxacin für die einzelnen Stämme entsprach, wurde die Aktivität untersucht (Abbildung 4-52). Es

wurde erwartet, dass die Aktivität von *PacrAB* nach Zugabe von Norfloxacin anstieg, da die Anwesenheit von Norfloxacin zur Erhöhung der Effluxpumpen-Aktivität führte. Die Messwerte der Stämme nach Einstellung der Norfloxacin-Konzentration auf 0,5 µg/ml stimmten aber mit den Ergebnissen bei PIDDOCK *et al.* (2006) und Dr. N. MATTHIESSEN (2007) überein [33], [181]. Eine Erklärung könnte sein, dass die Aktivitätszunahme bei höheren Norfloxacin-Konzentrationen (2x MHK, 4x MHK, 8x MHK) für die Zelle eine Zunahme an Zellstress bedeutete und zunächst eine Senkung der *acrAB*-Expression bewirkte. Nach Behebung größerer Schäden wird die AcrAB-TolC-Effluxpumpe vermehrt gebildet [304]. Bei dieser Messung (17.07.2014) konnte *E. coli* WT nicht als Bezugsgröße verwendet werden, da diese Kultur nicht gewachsen war. Daher wurden die Ergebnisse auf MII mit Norfloxacin (0,5 µg/ml) bezogen. Mit zunehmender Norfloxacin-Konzentration war eine Zunahme der Promotoraktivität bei MII und MII Δicd 7 bp pHPNE19-02.1 zu beobachten.

Die Ergebnisse für MII Δicd 7 bp (17.07.2014, Abschnitt 4.6.7.3.9.2) zeigten ein umgekehrtes Verhalten, da mit zunehmender Norfloxacin-Konzentration die Promotoraktivität abnahm. Der RLU/Protein-Quotient war bei hohen absoluten Werten und niedrigen Proteingesamtmengen hoch. Lagen bei höherer Norfloxacin-Konzentration vermehrt tote Zellen vor, so blieb die Proteingesamtmenge gleich, doch nahm die *PacrAB*-Aktivität ab, was zu einem niedrigen RLU/Protein-Quotienten führte. Eine ähnliche Beobachtung ließ sich beim RLU/OD-Quotienten feststellen. Da auch tote Zellen Licht absorbierten, konnte bei einer hohen OD ein niedriger RLU/OD-Quotient resultieren. Auch war zu berücksichtigen, dass Fluorchinolone ab gewissen Konzentrationen dafür sorgten, dass Bakterien sich unvollständig teilten und so nur in die Länge wuchsen. Das führte zu hohen OD bei niedriger KBE. Zum Messzeitpunkt könnten im Ansatz mit MII Δicd 7 bp tote oder nicht vollständig geteilte Zellen vorgelegen haben, da vermutlich eine zu hohe Norfloxacin-Konzentration gewählt wurde (MII Δicd 7 bp + Norfloxacin 4 µg/ml).

Bei der Messung vom 17.07.2014 (Abbildung 4-52, Abschnitt 4.6.7.3.9.2) wurde bei MII Δicd 7 bp pHPNE19-02.1 eine höhere Promotoraktivität als bei MII und MII Δicd 7 bp gemessen. Diese Aussage galt für den RLU/Protein-Quotienten. Bezogen auf den RLU/OD-Quotienten lag über die unterschiedlichen Messansätze hinweg die von *PacrAB* abhängige Luciferase-Aktivität bei MII Δicd 7 bp pHPNE19-02.1 im Mittel um 32 % höher gegenüber MII. Im Vergleich zu MII Δicd 7 bp war die ermittelte Aktivität um 26 % erhöht. Bezogen auf den

RLU/Protein-Quotienten war die Aktivität bei MII Δicd 7 bp pHPNE19-02.1 im Mittel um 50 % gegenüber MII und um 31 % gegenüber MII Δicd 7 bp erhöht.

Da ein Vergleich zu *E. coli* WT in der Messung vom 17.07.2014 fehlte, wurde die Messung am 14.08.2014 wiederholt (Abbildung 4-53 und Abbildung 4-54, Abschnitt 4.6.7.3.9.2). Bei der Wiederholung wurden alle untersuchten Mutanten zusätzlich ohne Zugabe von Norfloxacin vermessen, was im Vorversuch (17.07.2014) nicht gemacht wurde. Die Bezugsgröße war die *PacrAB*-Aktivität bei WT ohne Fluorchinolon-Zugabe. Erneut lag die ermittelte Promotoraktivität bei den Antibiotika-freien Kontrollen MII und MII Δicd 7 bp auf einem vergleichbaren Niveau und betrug 250 % bis 300 % der WT-Aktivität. Bei MII Δicd 7 bp pHPNE19-02.1 fanden sich vergleichbare Ergebnisse zur Messung vom 17.07.2014. Die Luciferase-Aktivität war höher als bei MII und MII Δicd 7 bp. Im Durchschnitt war die ermittelte Luciferase-Aktivität bei MII Δicd 7 bp pHPNE19-02.1 bezogen auf den RLU/OD-Quotienten um ca. 35 % erhöht gegenüber MII und ca. 27 % erhöht gegenüber MII Δicd 7 bp. Betrachtet man den RLU/Protein-Quotienten, so war bei MII Δicd 7 bp pHPNE19-02.1 die Luciferase-Aktivität um 14 % gegenüber MII erhöht und um 12 % gegenüber MII Δicd 7 bp erhöht. Die Anwesenheit von QnrA1 oder die Kombination aus QnrA1 mit Δicd schien die *PacrAB*-Aktivität zu induzieren. Kontrollen für WT mit Δicd 7 bp zeigten hier eine Induktion der Promotoraktivität (Abbildung 4-55).

Neben *E. coli* WT wurden die Ergebnisse der Wiederholung (14.08.2014, Abschnitt 4.6.7.3.9.2) mit der Antibiotika-freien Kontrolle des jeweiligen Stammes ins Verhältnis gesetzt (Abbildung 4-54). Die Zugabe von Norfloxacin 0,5 $\mu\text{g/ml}$ bei MII, MII Δicd 7 bp, MII Δicd 7 bp pHPNE19-02.1 zur Antibiotikafreien-Kontrolle löste eine Abnahme der *PacrAB*-Aktivität aus. BAILEY *et al.* (2006) kommen zu ähnlichen Expressionsmustern bei Versuchen mit *E. coli* MG1655 [261]. Zur Erklärung einer verringerten Empfindlichkeit gegenüber Fluorchinolonen war eine Zunahme der *acrAB*-Expression erwartet worden. Die Ergebnisse nach Zusatz von subinhibitorischen Norfloxacin-Konzentrationen passen zu den Beobachtungen von Dr. N. MATTHIESSEN (2007) und BAILEY *et al.* (2006) [181], [261]. Nach Erhöhung der Norfloxacin-Konzentration auf MHK-Niveau und auf die doppelte MHK scheint im Rahmen einer SOS-Antwort (englisch: *sos response*, Abschnitt 1.5.2) die *acrAB*-Expression wieder zuzunehmen. Vermutlich sobald DNA-Schäden behoben wurden, und eine fehlerfreie Expression wieder gewährleistet war. Bei MII Δicd 7 bp pHPNE19-02.1 war dieser Trend auch zu beobachten. Hier war bei der doppelten MHK jedoch wieder eine Abnahme der Promotoraktivität zu sehen (Abbildung 4-53, Abschnitt

4.6.7.3.9.2). Eine Norfloxacin-Konzentration von 16 µg/ml schien hier für eine Abnahme der KBE zu sorgen.

Eine untergeordnete Rolle bei der Ausbildung einer Fluorchinolon-Resistenz im Zusammenhang mit einer *icd*-Deletion spielte die Effluxpumpe AcrEF-TolC. Bei WT Δicd 7 bp konnte keine Zunahme der Promotoraktivität (*PacrEF::luc*; Abschnitt 4.6.7.3.10) gemessen werden. Bei MII betrug die Promotoraktivität 600 % der Aktivität bei *E. coli* WT. Der Vergleich der absoluten *PacrAB*-Aktivität mit der *PacrEF*-Aktivität in Form der RLU/OD-Werte zeigte, dass insgesamt für *PacrEF* eine geringe Aktivität ausging. Bei Dr. N. MATTHIESSEN (2007), HELLING *et al.* (2002) und RUIZ *et al.* (2013) fanden sich ähnliche Aussagen zur Bedeutung von AcrEF-TolC [34], [181], [248].

5.5 Fazit und Ausblick - Toxische metabolische Störungen können eine Efflux-vermittelte Antibiotika –Resistenz in gramnegativen Bakterien unterstützen

Hinsichtlich der Untersuchung einer möglichen Induktion von SdiA auf die *acrA*-Expression und einen Einfluss von SoxS auf die *sdiA*-Expression ist eine zusätzliche Anzucht unter Stress, z.B. unter (Fluorchinolon-)Antibiotika- oder Paraquat-Zugabe, und anschließender Expressionsuntersuchung durch *real-time quantitative PCR* in Erwägung zu ziehen. Auch wäre ein Vergleich zur *sdiA*-Expression in MI und MII interessant. Eine Zunahme der *sdiA*-Expression in MIII und MIVa lässt sich durch das Vorliegen der Mutationen in MIII und MIVa teilweise erklären. Weitere SdiA-regulierte Faktoren, wie bspw. der Einfluss auf die Biofilm-Bildung, sollten Bestandteil aufbauender Untersuchungen sein [72].

In der hier vorliegenden Arbeit wurde erstmalig gezeigt, dass ausgehend von der Zweitschrittmutante *E. coli* MII (GK573) nach Akquisition von Qnr und nach Durchführung eines Ciprofloxacin-Forward-Assays Mutanten selektiert wurden, die eine klinisch relevante Fluorchinolon-Resistenz besitzen ohne zusätzliche Mutationen innerhalb der QRDR von *gyrA* und *parC* aufzuweisen. Andere Arbeiten mit vergleichbaren Versuchsansätzen kommen nicht zu diesem Ergebnis, da von Ciprofloxacin-empfindlichen WT-Stämmen und nicht von einer Zweitschrittmutante ausgegangen wurde [263], [265], [286]. Die Kombination aus Qnr, QRDR- und Stoffwech-

selmutationen am Beispiel von Δicd 7 bp wirkt sich synergistisch auf die Ausbildung einer Fluorchinolon-Hochresistenz aus. Da die Deletion Δicd nicht bei allen selektierten Mutanten mit erhöhter MHK von Fluorchinolonen nachgewiesen wurde, scheint die Selektion von Mutanten ausgehend von *E. coli*-Stämmen, die Qnr enthalten, zu weiteren – bisher unbekanntem - Mutationen jenseits der QRDR zu führen, die die Empfindlichkeit auf Fluorchinolone (Ciprofloxacin) senken können [286].

Während sich ältere Arbeiten auf die Regulation der Transkription nach Einfluss von Antibiotika beschäftigen, lassen jüngere Arbeiten vermuten, dass Veränderungen der zellulären Metabolit-Zusammensetzung zu einer veränderten Antibiotika-Empfindlichkeit führen [294], [327], [346]. In verschiedenen bakteriellen Spezies konnte durch einen veränderten zellulären Kohlenstofffluss ein Einfluss auf die Antibiotika-Empfindlichkeit gezeigt werden. So finden sich bei THOMAS *et al.* (2013) *in-vitro*-Versuche mit einer *S. epidermidis* Citratzyklus-Mutante, die eine reduzierte Anfälligkeit auf Betalactam-Antibiotika zeigten [347]. Für Fluorchinolone sind die Wirkmechanismen mittlerweile geklärt, jedoch lässt sich die bakterizide Wirkung nicht allein durch die Stabilisierung eines *Cleavage-Komplexes* erklären. Zusätzlich scheinen Stoffwechselprozesse außerhalb der primären Fluorchinolon-Zielregionen eine Rolle bei der Wirksamkeit dieser Antibiotika zu spielen [294], [295], [327], [346]. Anhand von drei selektierten *icd*-Mutanten (zwei Mutanten bestätigt, eine Mutante noch nicht abschließend untersucht) lässt sich ein Zusammenhang von Antibiotikaresistenz zu zentralen Stoffwechselprozessen in *E. coli* im Rahmen der vorliegenden Arbeit - ausgehend von einer Zweitschrittmutante (MII) - zeigen. Zuvor wurde bei HELLING *et al.* (2002) und RUIZ *et al.* (2013) nur ausgehend von *E. coli* Wildtypstämmen ein Zusammenhang hergestellt [34], [248].

Für die Behandlung mit bakteriziden Antibiotika zu denen die Fluorchinolone gehören, konnten die Arbeiten von DWYER *et al.* (2014) und KOHANSKI *et al.* (2007) zeigen, dass sich vermehrt reaktive Sauerstoffspezies bilden (ROS), bei gleichzeitiger Konzentrationserhöhung an Citratzyklus-Zwischenprodukten und einer Veränderung des NAD⁺-Metabolismus. Daneben wurden auch erhöhte Konzentrationen anderer Stoffwechselprodukte ermittelt. Bakterizide Antibiotika rufen neben ihrer eigentlichen Wirkung zusätzlich Veränderungen im Stoffwechsel hervor, die einen oxidativen Stress für die Zelle bedeuten können, der in Mutagenese und Zelltod endet (vergleiche Abbildung 5-11) [295], [346], [346], [348]. Diese Mutagenese kann zu

Stoffwechsellmutationen, wie bspw. Δicd 7 bp führen. Mit einem Block im Citratzyklus und unter Ausnutzung des Glyoxylatzyklus entflieht die Zelle dem oxidativen Stress. Einen Hinweis hierzu geben die Arbeiten von VAN ACKER *et al.* (2013, 2014) [327], [328], [346].

Durch den Block im Citratzyklus kam es zu einer Akkumulation von Metaboliten, die die Expression des Antibiotikumpumpsystems AcrAB-TolC induzierten (Abschnitt 4.6.7.3.9) [34], [248]. Gleichzeitig führte als verbleibender zentraler Stoffwechselprozess der Glyoxylatzyklus zu einer Verknappung an Reduktionsäquivalenten und ATP in der Zelle. Die Konzentration an intrazellulären NADH sinkt und damit auch die Konzentration an reaktiven Sauerstoffspezies (ROS). Normalerweise induzieren bakterizide Antibiotika die Bildung von ROS in der Zelle. Weniger Radikale ($O_2^{\cdot-}$) stören die Eisen-Schwefel-Cluster [Fe-S] in Proteinen und senken die Anzahl an freien Eisenionen (Fe^{2+}), die im Rahmen einer Fenton-Reaktion ($Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{3+} + HO^{\cdot} + OH^-$) gebildet werden. Reaktive Hydroxylradikale können zum Zelltod führen, der durch eine ROS-Konzentrationsabnahme verhindert wird [327], [328].

Im Zusammenspiel der bereits vorliegenden Mutationen in *E. coli* MII mit Qnr scheint Δicd 7 bp zur Ausbildung einer Fluorchinolone-Resistenz einen wichtigen Beitrag zu leisten. In MII Δicd 7 bp pHPNE19-02.1 scheint eine langsame, mutierte Gyrase bereits durch geringe Mengen an Qnr ausreichend gegenüber dem Zugriff durch Fluorchinolone geschützt zu werden, da mit und ohne Induktion des *lac*-Operons auf den verwendeten Qnr-Plasmiden gleiche Ergebnisse der MHK von Ciprofloxacin ermittelt wurden (Abschnitt 4.1).

Für die schützende Wirkung spricht die Bindung von Qnr zur Gyrase in einem ATP-unabhängigen Prozess. Chinolone können Komplexe aus geschnittener DNA und Gyrase (englisch: *cleavage-complex*) stabilisieren und verursachen somit vermehrt Doppelstrangbrüche im bakteriellen Chromosom. Da Qnr-Proteine DNA nachahmen (englisch: *DNA mimicry*), wird durch diese Eigenschaft indirekt die Empfindlichkeit der Gyrase für Fluorchinolone herabgesetzt und die Zahl der stabilisierten Doppelstrangbrüche reduziert [44], [162], [349]–[351]. Bei 2 $\mu g/ml$ (6 μM) Ciprofloxacin sind 0,5 nM QnrB1 ausreichend. Qnr-Konzentrationen von 25–30 μM hemmen die Gyrase-Funktion [44], [352], [353]. Der Mechanismus von aufgereinigtem QnrA wurde in einem Überspiralisierungsexperiment mit Ciprofloxacin und *E. coli* Topoisomerase IV beschrieben. Allein beeinflusst QnrA nicht die Überspiralisierung von DNA. Sobald Topoisomerase IV und DNA mit Qnr vorlagen, störte QnrA die Überspiralisierungsfunktion der Topoisomerase IV [18], [354], [355]. Durch *DNA-mimicry* bindet die Topoisomerase IV (oder Gyrase)

Qnr in einem ATP-unabhängigen Prozess. Dazu ist keine DNA in relaxierter Form notwendig. Der Gyrase-Qnr-Komplex bildet sich schneller als der Cleavage-Komplex (Abschnitt 1.7). Weniger freie Topoisomerase IV liegt vor, um DNA zu binden, und damit reduziert sich die Zahl der Angriffspunkte für Fluorchinolone, die die DNA-Topoisomerase IV-Komplexe stabilisieren (Cleavage-Komplexe) [18], [162], [355], [356]. Zusätzlich wird durch $\Delta marR$ 175 bp und der Akkumulation toxischer Stoffwechselprodukte bedingt durch einen Block im Citratzyklus (Δicd 7 bp) ein Efflux induziert. Im Zusammenspiel mit einer durch $\Delta marR$ 175 bp reduzierten *ompF*-Expression verursachen die oben genannten Effekte am Wirkort eine Konzentrationsabnahme des Antibiotikums und erhöhen so die Überlebenschancen der *E. coli*-Mutante [34], [248], [258], [357].

In *icd*-Mutanten ist dauerhaft der Glyoxylatzyklus aktiviert. Hier findet sich eine Parallele zum Tuberkulose-Erreger *Mycobacterium tuberculosis*, der über längere Zeiträume nur den Glyoxylatzyklus aktiviert. Mit dem Glyoxylatzyklus ist es für die Tuberkel möglich unter geringem Aufwand die notwendigsten Lebensfunktionen aufrechtzuerhalten und über längere Zeiträume in Makrophagen zu überleben, bis beispielsweise das Immunsystems des Wirtes geschwächt wird. Dann kann durch die Tuberkel wieder die Krankheit ausgelöst werden mit teils tödlichen Folgen [358]. Bisher ist die Einnahme von Antibiotika (z.B. Fluorchinolone) über einen längeren Zeitraum notwendig, um die Tuberkel zu bekämpfen [359]. Ein interessanter Therapieansatz ist die Hemmung der Isocitratlyase in diesen Keimen. Da die Isocitratlyase das erste Enzym im Glyoxylatzyklus ist, und der Glyoxylatzyklus nicht im Menschen zu finden ist, bliebe eine Blockade dieses Enzyms ohne größere Folgen für den Wirt. Ausgehend von der Itaconsäure, die als bakterizides Stoffwechselprodukt in Makrophagen gebildet wird, finden sich derzeit mehrere Wirkstoffkandidaten zur Inhibition der Isocitratlyase, z.B. IMBI-3 oder Itaconat [360], [361]. SASIKARAN *et al.* (2014) konnten jedoch zeigen, dass eine Hemmung der Isocitratlyase mit Itaconsäure zu Mutationen führen kann, die der Bakterienzelle den Abbau des Hemmstoffes erlauben [362]. Interessant wäre dennoch die Untersuchung der Inhibition des Glyoxylatzyklus in MII Δicd 7 bp pHPNE19-02.1 durch Itaconsäure und der gleichzeitigen Gabe von Fluorchinolon-Antibiotika. Durch die Inhibition bleibt keine Möglichkeit für einen weiteren Bypass des durch Δicd 7 bp blockierten Citratzyklus und bedeutet den Tod für die Zelle.

Derzeit breiten sich Qnr sehr schnell in der Familie der *Enterobacteriaceae* weltweit aus. Besonders *E. coli* O25b:H4-ST131 profitiert hier durch die von QnrA1 vermittelten Effekte im Rahmen einer Fluorchinolon-Resistenz [265]. Auch wenn bisher noch kein signifikanter Unterschied in der Klinik in Bezug auf ernste Infektionen zwischen *qnr*-positiven und *qnr*-negativen Gruppen gefunden werden konnte, so deuten Tiermodelle darauf hin, dass gerade bei Pneumonien oder Harnwegsinfekten die Anwesenheit von Qnr die Wirksamkeit von Ciprofloxacin deutlich reduziert. In der Arbeit von SATO *et al.* (2013) wurde ein klinisches *E. coli*-Isolat vorgestellt (HUE1), das keine Mutationen in der QRDR von Gyrase und Topoisomerase IV besaß, und Mutationen in *marR* und *acrR* besaß. Zusätzlich wurden zum erhöhten Efflux noch PMQR in diesem Isolat gefunden. Das Isolat hatte eine MHK von Ciprofloxacin von 4 µg/ml und ist als resistent einzustufen [24], [363]. Die Arbeit von SATO *et al.* zeigt, dass auch ohne QRDR-Mutationen klinisch relevante Fluorchinolon-Resistenzen auftreten können. Nehmen empfindliche Stämme *qnr* auf, so kann das zu einer klinisch relevanten Fluorchinolon-Resistenz führen.

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass die Anwesenheit von *qnr*-Genen besonders in intermediären Mutanten - nahe am klinisch relevanten Grenzwert – die Ausbildung einer Fluorchinolon-Hochresistenz fördern kann [265], [364]–[367]. Es konnten drei Mutanten selektiert werden mit Δicd . Die Möglichkeit des Auftretens von Mutationen außerhalb der QRDR zur Ausbildung von Resistenzmechanismen birgt ein großes Potential für Stämme, um mit Fluorchinolonen zurechtzukommen. Eine Untersuchung der in dieser Arbeit selektierten Stämme auf weitere Mutationen sollte eine Antwort geben, wie groß die Gefahr dieser neuen Resistenzen im Zusammenhang mit der Therapie mit Fluorchinolonen ist, und einen Ansatz für zukünftige neue Therapieansätze ermöglichen.

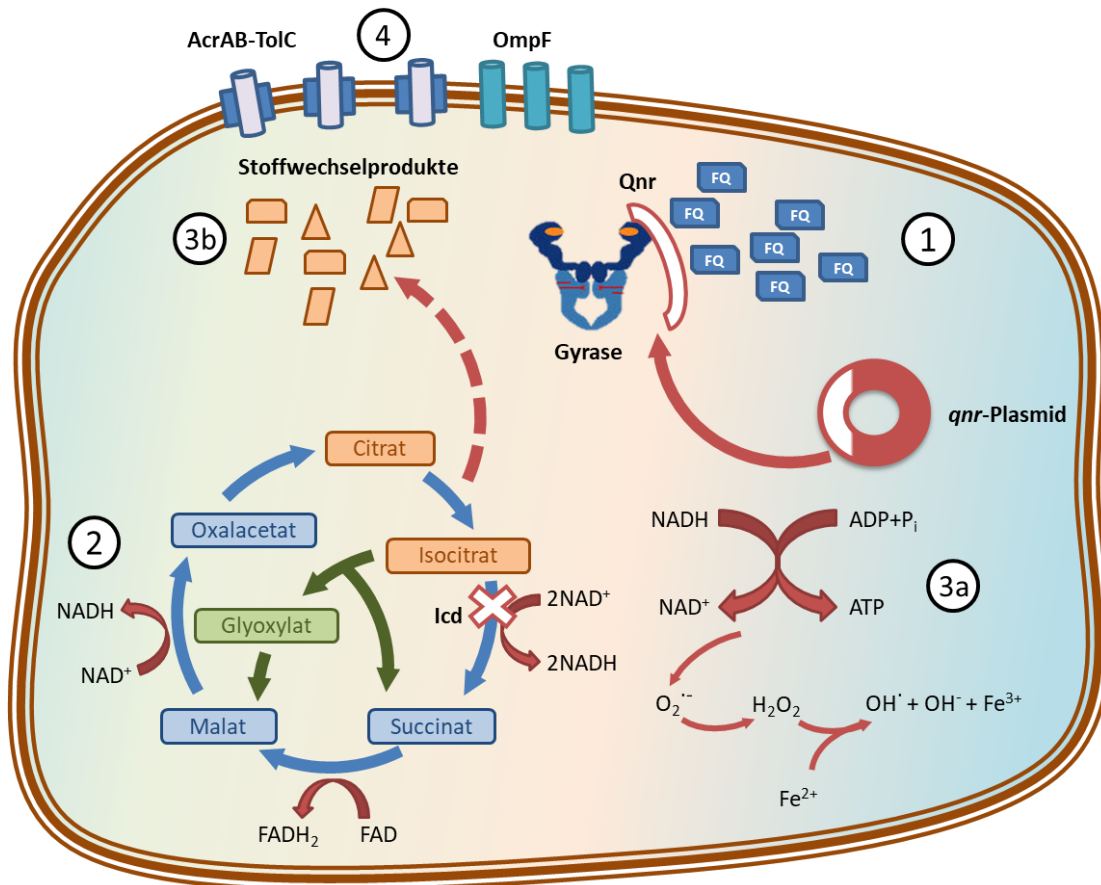


Abbildung 5-11 Möglicher Mechanismus der es MII Δicd 7 bp pHPNE19-02.1 erlaubt auch in Umgebungen mit hohen Fluorchinolon-Konzentrationen zu überleben, eigene Darstellung, modifiziert nach [34], [248], [257], [294], [327]

- (1) In MII pHPNE19-02.1 stören Qnr-Proteine die Wirkung von Fluorchinolonen (FQ) am Wirkort und erhöhen die MHK von Ciprofloxacin. Dennoch findet bei Konzentrationen oberhalb der MHK von FQ die bakterizide Wirkung statt. Im Rahmen der SOS-Antwort wird eine Mutagenese aktiv, gleichzeitig werden Stoffwechselprozesse aktiviert, die zur Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies führen.
- (2) Durch eine Mutation im Citratzyklus, bleibt der Glyoxylatzyklus dauerhaft aktiv. Im Citratzyklus sind nicht alle Reaktionsschritte gezeigt. Die Konzentration an NADH nimmt bedingt durch den Ausfall der Isocitratdehydrogenase ab. Gleichzeitig kommt es zu einem Rückstau von Stoffwechselprodukten, die in der Zelle akkumulieren (3b).
- (3) (a) Die Konzentration an intrazellulären NADH sinkt und damit auch die Konzentration an reaktiven Sauerstoffspezies (ROS). Normalerweise induzieren bakterizide Antibiotika die Bildung von ROS in der Zelle. Weniger Radikale ($O_2^{\cdot-}$) stören Eisenschwefelcluster [Fe-S] in Proteinen und senken die Anzahl an freien Eisenionen (Fe^{2+}), die im Rahmen einer Fenton-Reaktion ($Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{3+} + HO^{\cdot} + OH^-$) gebildet werden. Hochreaktive Hydroxylradikale können zum Zelltod führen, der durch eine ROS-Konzentrationszunahme verhindert wird.
 (b) Ein Block bedingt durch Δicd 7 bp verursacht eine Akkumulation von toxischen Metaboliten.
- (4) Die *acrAB*- und *tolC* Expression wird durch $\Delta marR$ 175 bp und durch die Akkumulation der toxischen Metabolite induziert. Gleichzeitig senkt $\Delta marR$ 175 bp die Expression von *ompF*, so dass weniger FQ in die Zelle eindringen können.

6 Zusammenfassung

Nach anfänglich sehr großen Erfolgen bei der Bekämpfung von bakteriellen Infektionskrankheiten durch die Einführung von Antibiotika seit den 1930er Jahren, stellt Antibiotikaresistenz heute eines der größten Gesundheitsprobleme weltweit dar, und es wird geschätzt, dass Antibiotika-resistente Erreger die häufigste Todesursache im Jahr 2050 sein werden. Die Gründe hierfür sind neben der unkritischen Anwendung der Antibiotika für humanmedizinische Zwecke und der unkontrollierten Anwendung für nicht-medizinische Zwecke vor allem die hohe genetische Variabilität der Bakterien, die ihnen eine leichte Anpassung ermöglicht. Dadurch werden nicht nur die im Verlauf der Evolution erworbenen Resistenzgene von Antibiotikaproduzenten, durch die diese sich selbst schützen können, weitergegeben, sondern es können auch rasch Resistenzeigenschaften gegen rein synthetische Wirkstoffe, wie die Fluorchinolone (FQ) ausgebildet werden.

Infolge übermäßiger Anwendung von FQ sind inzwischen bei FQ-resistenten Mutanten verschiedene genetische Veränderungen identifiziert worden. Die Resistenzmechanismen sind vielfältig. Zufällig erworbene Genmutationen in Genabschnitten der beiden Typ-II-Topoisomerase-Zielstrukturen DNA-Gyrase (i.e. DNA-Topoisomerase II) und Topoisomerase IV, führen zum Verlust der Wirksamkeit der mit diesen Zielstrukturen interagierenden Fluorchinolone. Mutationen in Regulatorgenen, die zu einer Überexpression von *multiple-drug resistance* (*mdr*)-Effluxpumpen führen, verringern die effektive Konzentration der Fluorchinolone in der Zielzelle. Und schließlich sind inzwischen auch drei plasmidkodierte und damit transferierbare Resistenzmechanismen identifiziert worden: enzymatische Modifikation von Fluorchinolonen (Acetyltransferase), Effluxsysteme (QepA, OqxAB) und Gyrase/Topoisomerase IV-Schutzproteine (Qnr). Als wesentlicher Mechanismus für klinisch relevante Fluorchinolone-Resistenz, z.B. in *Escherichia coli* (*E. coli*), erweist sich eine Kombination einer Doppelmutation in der A-Untereinheit (GyrA) der primären Zielstruktur DNA-Gyrase und mindestens einer Mutation in der homologen Untereinheit (ParC) der Topoisomerase IV. Diese Mutationen liegen innerhalb der QRDR (*quinolone resistance-determining region*).

Zusätzlich wird für Antibiotika eine Rolle als mögliche Signalmoleküle im Rahmen der Zell-Zell-Kommunikation (englisch: *quorum sensing*) diskutiert, die u.a. indirekt eine Überexpression

von Effluxpumpen bewirken können. In *E. coli* kann der Transkriptionsaktivator SdiA (*suppressor of cell division inhibitor*) auf äußere Signalmoleküle reagieren und beispielsweise die Expression des Antibiotikumpumpsystems AcrAB-TolC verstärken.

In diesem Zusammenhang sollte in der vorliegenden Arbeit der Einfluss von SdiA in den *in vitro* selektierten Mutanten *E. coli* MIII (GK574) und *E. coli* MIVa (GK575) untersucht werden. Für MIII und MIVa waren bereits die gleichen QRDR-Mutationen (*gyrA* Asp87Gly und *parC* Ser80Leu) und die gleiche Deletion im Regulatorgen *marR*, die zu einer Überexpression der AcrAB-TolC-Effluxpumpe führt, identifiziert. Jedoch fällt bei MIVa im Vergleich zu MIII die *acrA*-Expression höher aus, und die minimale Hemmkonzentration (MHK) des FQ-Antibiotikums Ciprofloxacin ist für MIVa um eine Stufe erhöht. Um den Unterschied zwischen MIII und MIVa zu erklären, wurde für *sdiA* die Sequenz mittels SANGER-Sequenzierung und Pyrosequenzierung untersucht. Zusätzlich wurde die Genzahl mittels Southern Blot und die Expression mittels *real-time quantitative* PCR in den beiden Mutanten MIII und MIVa ermittelt und mit dem Wildtypstamm *E. coli* WT (GK571) verglichen. MIII und MIVa besaßen jeweils eine Genkopie von *sdiA*, die sich nicht in der Sequenz unterschieden. Die Untersuchung mittels *real-time quantitative* PCR zeigte, dass bei MIII die Genexpression im Vergleich zu WT um 27 % erniedrigt war, während MIVa eine Erhöhung um 42 % aufwies. Ob die erhöhte *sdiA*-Expression in MIVa mitverantwortlich für die MHK-Zunahme in MIVa gegenüber MIII ist, lässt sich durch die Ergebnisse dieser Arbeit vermuten. Im Unterschied zu MIII scheint bei MIVa neben der *acrA*-Expression auch die *sdiA*-Expression durch einen noch unbekanntem Faktor induziert zu werden.

Das Ziel im zweiten Teil dieser Arbeit bestand darin, den Einfluss der Topoisomerase-Schutzproteine QnrA1 und QnrB1 auf die Entwicklung einer FQ-Hochresistenz (oberhalb Grenzwerte gemäß EUCAST 2016) zu untersuchen. Die Anwesenheit von Qnr allein bewirkt in *E. coli* noch keine Ausprägung einer FQ-Hochresistenz. Dennoch werden zunehmend bei hoch FQ-resistenten Isolaten Plasmid-codierte *qnr*-Gene detektiert. Dieser Einfluss sollte anhand von Selektionsexperimenten mit Qnr-Transformanden untersucht werden.

Für die Untersuchungen wurde die *in vitro* selektierte, intermediäre Mutante *E. coli* MII (GK573) vorrangig als Ausgangsstamm verwendet. Diese Mutante trägt die bei *E. coli* häufigste *gyrA* Mutation (*gyrA* Ser83Leu) sowie eine *marR*-Deletionsmutation. Die Fluorchinolon-Resistenz dieser Mutante liegt jedoch unterhalb der Grenzwerte gemäß EUCAST 2016. Nach Transformation der Mutante MII mit einem Qnr-tragenden (QnrA1 bzw. QnrB1) Plasmid wurden *in-*

in vitro resistente Mutanten unter Ciprofloxacin-Konzentrationen selektiert, die der vier- bis achtfachen minimalen Hemmkonzentration entsprachen. Trotz Abnahme der FQ-Empfindlichkeit konnte bei den *in vitro* selektierten Mutanten erstmalig eine FQ-Hochresistenz ohne die zusätzlichen Mutationen in *gyrA* und *parC* gezeigt werden. Durch Genomsequenzierung wurde bei der selektierten Mutante MII pHPNE19-02.1 Nr. I 43 im Gen der Isocitratdehydrogenase die Deletion Δicd 7 bp (+818 bp bis +824 bp) detektiert, die zu einem frühzeitigen Stoppcodon an der Aminosäureposition +278 führt (*E. coli* MII Δicd 7 bp). Ein defektes Gen der Isocitratdehydrogenase konnte in zwei weiteren Mutanten (MII pHPNE19-02.1 Nr. III 2 und MII pHPNE18-01.1 Nr. II 18) nachgewiesen werden. Der Citratzyklus ist aufgrund Δicd geblockt, da in *E. coli* nur ein einziges Gen für die Isocitratdehydrogenase vorliegt. Als Alternative aktiviert *E. coli* den Glyoxylatzyklus dauerhaft (*glyoxylate shunt*). Das gleichzeitige Auftreten von *qnr*-Genen mit Gyrase- und Stoffwechselformation (Δicd 7 bp) in intermediären Mutanten deutet darauf hin, dass sich diese Faktoren synergistisch auf die Ausbildung einer FQ-Hochresistenz (oberhalb Grenzwerte gemäß EUCAST 2016) auswirken.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass in *E. coli* die Anwesenheit von Qnr die Ausbildung einer FQ-Resistenz durch neue Mutationen außerhalb der bekannten Zielregionen begünstigt und gleichzeitig durch Qnr die zur Ausbildung einer FQ-Hochresistenz zusätzlich notwendigen Mutationen innerhalb der QRDR kompensiert werden.

7 Summary

After the initial success of antibiotics in combating bacterial infectious diseases from the 1930's onward, antibiotic resistance is currently on the rise and fast becoming one of the world's biggest health crises. It is estimated that antibiotic-resistant pathogens will be the leading cause of death in 2050.

Increased resistance of bacteria to antibiotic drugs is the result of uncritical use of antibiotics for both medical and non-medical purposes coupled with the high genetic variability of the bacteria themselves. This genetic variability allows bacteria to pass on resistant genes acquired by the evolution of antibiotic producers, as well as quickly developing resistance properties against purely synthetic drugs such as the fluoroquinolone antibiotics (FQ). Currently, diverse genetic alterations have been identified in FQ-resistant mutants. Randomly acquired gene mutations in gene segments of the two type II topoisomerase targeting pathways - DNA gyrase (i.e., DNA topoisomerase II) and topoisomerase IV - result in the loss of efficacy of the fluoroquinolones interacting with these targets. Mutations in regulatory genes that result in overexpression of multiple drug resistance (*mdr*) efflux pumps reduce the effective concentration of fluoroquinolones in the target cell. Finally, three plasmid-encoded and thus transferable resistance mechanisms have been identified: enzymatic modification of fluoroquinolones (acetyltransferase), efflux systems (QepA, OqxAB) and gyrase / topoisomerase IV protection proteins (Qnr). As an essential mechanism for clinically relevant fluoroquinolone resistance, e.g. in *Escherichia coli* (*E. coli*), a combination of a double mutation in the A subunit (GyrA) of the primary target DNA gyrase and at least one mutation in the homologous subunit (ParC) of topoisomerase IV is found. These mutations are within the QRDR (*quinolone resistance-determining region*).

Contemporary discussions concern the possibility of antibiotics functions as signal molecules in the context of cell-to-cell communication, also known as *quorum sensing*, which indirectly causes overexpression of efflux pumps. In *E. coli*, the transcriptional activator SdiA (*suppressor of cell division inhibitor*) can react to external signal molecules and enhance the expression of the antibiotic pumping system AcrAB-TolC. In this context, the influence of SdiA in the in vitro selected mutants *E. coli* MIII (GK574) and *E. coli* MIVa (GK575) was investigated. For MIII and MIVa, the same QRDR mutations (*gyrA* Asp87Gly and *parC* Ser80Leu) and the same deletion

in the regulatory gene *marR*, which results in overexpression of the AcrAB-TolC efflux pump, have already been identified. However, in MIVa compared to MIII, the expression of the AcrA subunit of the AcrAB-TolC efflux pump is higher and the minimum inhibitory concentration (MIC) of the FQ antibiotic ciprofloxacin is increased by one notch for MIVa. To explain the difference between MIII and MIVa, the sequence for *sdiA* gene was analyzed by Sanger sequencing and pyrosequencing. In addition, the gene count was determined by means of Southern blot and expression by means of real-time quantitative PCR in the two mutants MIII and MIVa and compared with the homologous wild-type strain *E. coli* WT (GK571). The results showed that MIII and MIVa each had a gene copy of *sdiA* that did not differ in sequence. Examination by means of real-time quantitative PCR showed that MIII gene expression was reduced by 27% compared to WT, while MIVa increased by 42%. Based on results thus far it can be assumed that the increased *sdiA* expression in MIVa is partly responsible for the MIC increase in MIVa over MIII. In contrast to MIII, in addition to *acrA* expression, MIVa also seems to induce *sdiA* expression by a factor which is still unknown.

The aim of the second part of this work was to investigate the influence of the topoisomerase protection proteins QnrA1 and QnrB1 on the development of high FQ resistance (above limits according to EUCAST 2016). The presence of Qnr alone in *E. coli* does not yet produce any expression of high FQ resistance. Nevertheless, plasmid-coded *qnr*-genes are increasingly being detected in highly FQ-resistant isolates. This influence of Qnr should be investigated by selection experiments with Qnr transformants.

For the investigations, the in vitro selected, intermediate mutant *E. coli* MII (GK573) was mainly used as parent strain. This mutant carries the most common *E. coli gyrA* mutation (*gyrA* Ser83Leu) and a *marR* deletion mutation. The fluoroquinolone resistance of this mutant is below the limits of EUCAST 2016. After transformation of the mutant MII with a Qnr-bearing (QnrA1 or QnrB1) plasmid, in vitro resistant mutants were selected at ciprofloxacin concentrations corresponding to four to eight times the minimum inhibitory concentration. Despite a decrease in FQ sensitivity, FQ resistance could be demonstrated for the first time among the in vitro selected mutants without the necessary additional mutations in *gyrA* and *parC*. By genome sequencing, the deletion Δicd 7 bp (+818 bp to +824 bp) was instead detected in the gene of isocitrate dehydrogenase in the selected mutant MII pHPNE19-02.1 No. I 43, which leads to an early stop codon at the amino acid position +278 (*E. coli* MII Δicd 7 bp).

Failure of the isocitrate dehydrogenase could be detected in two further mutants (MII pHPNE19-02.1 No. III 2 and MII pHPNE18-01.1 No. II 18). The citrate cycle is blocked due to Δicd , since there is only one single gene for isocitrate dehydrogenase in *E. coli*. As an alternative, *E. coli* permanently activates the glyoxylate cycle (*glyoxylate shunt*). The co-occurrence of Qnr with gyrase and metabolic mutation (Δicd 7 bp) in intermediate mutants indicates that these factors synergistically affect the formation of high FQ resistance (above EUCAST 2016 limits).

This work demonstrates that in *E. coli* the presence of Qnr favors the formation of FQ resistance by new mutations outside the known target regions. At the same time Qnr compensates for the additional mutations within the QRDR necessary for the development of FQ resistance.

8 Lebenslauf

Lebenslauf entfällt aus datenschutzrechtlichen Gründen

9 Poster und Veröffentlichungen

- 1** Plasmid-encoded QnrA1 or QnrB1 give rise to high-level fluoroquinolone resistance in *gyrA* single mutants of *Escherichia coli* lacking additional target mutations
Hans-Peter Sfeir, Anke Heisig, Peter Heisig
23rd ECCMID, Berlin, Germany, 27. – 30. April 2013, Nr. 3206
- 2** Impact of target mutations on topoisomerase protection proteins in *Escherichia coli* lacking additional target mutations
Hans-Peter Sfeir, Philipp Hebel, Anke Heisig, Peter Heisig
65. Jahrestagung DGHM, Rostock, Germany, 22. – 25.09.2013, KMP18
- 3** Combination of plasmid-encoded *qnrA1* and a mutation blocking a central biosynthetic pathway as basis for high-level fluoroquinolone resistance in *gyrA* single mutants of *Escherichia coli*
Hans-Peter Sfeir, Anke Heisig, Peter Heisig
24th ECCMID, Barcelona, Spain, 10. – 13. May 2014, P1133
- 4** Whole-Genome Sequencing Revealed a Combination of Known and Novel Non-Target Mutations after *In-Vitro*-Selection of High-Level Fluoroquinolone Resistance of *E. coli* Presumably Substituting for Additional Topoisomerase Mutations
Hans-Peter Sfeir, Philipp Hebel, Anke Heisig, Peter Heisig
54th ICAAC, Washington, DC, USA, September 5 -9, 2014 C-1439
- 5** Prevalence of Chromosomal and Plasmid-Mediated Fluoroquinolone Resistance Mechanisms among Bacteraemia Isolates of *Escherichia coli* including ST131 since 2001 – The Quiet before the Storm?
P. Hebel, P. Zimmermann, H.-P. Sfeir, R. Reynolds, A. Schnasse, P. Heisig, A. Heisig
25th ECCMID, Copenhagen, DK, 25. – 28. April 2015, P1133

10 Abkürzungsverzeichnis

Tabelle 10-1 Allgemeine Abkürzungen

Abkürzung	Bedeutung
®	englisch: <i>registered</i>
°C	Grad Celsius
A	Ampere/Adenin
AAC	Aminoacyltransferase
Abb.	Abbildung
Ac	Acetat
ad	lateinisch auf
AK	Arbeitskreis
AMP	Adenosinmonophosphat
Amp ^r /Ap ^R	Ampicillinresistenz
APS	Ammoniumpersulfat
ARMS	sequenzspezifische-PCR (englisch: <i>amplification refractory mutation system</i>)
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
B. subtilis	Bacillus subtilis
bp	Basenpaare (englisch: <i>base pairs</i>)
BSA	Rinderserumalbumin (englisch: <i>bovine serum albumin</i>)
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
C-	Carboxy
ca.	circa
CCLR	englisch: <i>cell culture lysis reagent</i>
cdNA	englisch: <i>complimentary/copy DNA</i>
CFU	englisch: <i>colony forming units</i>
Cip /CIP	Ciprofloxacin
Clm	Chloramphenicol
Clm ^R /Clm ^r	Chloramphenicolresistenz
CLSI	englisch: <i>Clinical Laboratory Standards Institute</i>
CT	englisch: <i>cycle threshold</i>
Da	Dalton
ddNTP	2',3'-Didesoxynukleosidtriphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dH ₂ O	Reinstwasser
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (englisch: <i>desoxyribonucleic acid</i>)
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
dsDNA	double stranded DNA
E. coli	Escherichia coli
EB	Elutionspuffer (englisch: <i>elution buffer</i>)
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EP	Error-prone
EPI	Effluxpumpeninhibitor
<i>et al.</i>	lateinisch <i>et alia</i> (und andere)
EtBr	Ethidiumbromid
F	Farad
for	englisch: <i>forward</i>

FQ	Fluorchinolon (englisch: <i>fluoroquinolone</i>)
FRT	englisch: <i>flippase recognition target</i>
fw	englisch: <i>forward</i>
g	Gramm/Gravitationskonstante
G	Guanin
GFP	englisch: <i>green fluorescent protein</i>
ggf.	gegebenenfalls
GK	Glycerinkultur(nummer)
GSP	Gen-spezifischer Primer
GTE-Puffer	Glucose-Tris-EDTA-Puffer
h	Stunde/n
HTH	englisch: <i>helix-turn-helix</i>
icdA	Isocitratdehydrogenase-A
icd	Isocitratdehydrogenase
inkl.	inklusive/inklusive
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
k	kilo (1 x 10 ³)
Kan	Kanamycin
KanR/Kan ^r	Kanamycinresistenz
kb	Kilobasen(paare)
KBE	koloniebildende Einheiten
KPE-Puffer	Kaliumphosphat-EDTA-Puffer
L	Liter
l	Liter
LAR	englisch: <i>luciferase assay reagent</i>
LB	Luria-Bertani
Lsg.	Lösung
m	milli (10 ⁻³)
M	Molar (mol/L)
mar	englisch: <i>multiple antibiotic resistance</i>
max.	Maximal
MDR	englisch: <i>multiple drug resistance</i>
MFS	englisch: <i>major facilitator superfamily</i>
MHB	Müller-Hinton Bouillon
MHK	minimale Hemmkonzentration
MIC	englisch: <i>minimum inhibitory concentration</i>
min	Minute/n
ml	Milliliter
mM	Millimolar
MOPS	3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure
MPC	englisch: <i>mutant prevention concentration</i>
mRNA	englisch: <i>messenger-RNA</i>
MTP	Mikrotiterplatte
MW	Molekulargewicht, englisch: <i>molecular weight</i>
n	nano (1 x 10 ⁻⁹)
N-	Amino
n.b.	nicht bestimmt
n.d.	englisch: <i>not determined</i>
n.u.	nicht untersucht
NAC	englisch: <i>no amplification control</i>
Nal	Nalidixinsäure

Nal ^r	Nalidixinsäure-Resistenz
ng	Nanogramm
Novo	Novobiocin
NTC	englisch: <i>no template control</i>
OD	optische Dichte
OMP	englisch: <i>outer membran protein</i>
ORF	offener Leserahmen, englisch: <i>open reading frame</i>
ori	Replikationsursprung, englisch: <i>origin of replication</i>
p	pico (10 ⁻¹²)
p.a.	analysenrein (lateinisch: <i>pro analysi</i>)
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
PAβN	Phenylalanyl-arginyl-β-naphthylamid
PCR	Polymerase-Kettenreaktion, englisch: <i>polymerase chain reaction</i>
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
PMQR	englisch: <i>plasmid mediated (fluoro)quinolone resistance</i>
QRDR	Chinolonresistenz determinierende Region, englisch: <i>quinolone resistance determining region</i>
qRT-PCR	englisch: <i>quantitative Real-time PCR</i>
Qsc	englisch: <i>quotient of supercoiling</i>
rev, rw	englisch: <i>reverse</i>
RFLP	Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus
Rif ^r	Rifampicin-Resistenz
RLU	Relative Lichteinheiten, englisch: <i>relative light units</i>
RNA	Ribonukleinsäure, englisch: <i>ribonucleic acid</i>
RNAse	Ribonuklease
RND	englisch: <i>resistance nodulation cell division</i>
rpm	Umdrehungen pro Minute, englisch: <i>rounds/revelation/rotations per minute</i>
RT	Raumtemperatur
rv	englisch: <i>reverse</i>
s	Sekunde/n
SdiA	englisch: <i>suppressor of cell division inhibitor</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat, englisch: <i>sodium dodecyl sulfate</i>
SOEing	englisch: <i>splicing by overlap extension</i>
SSM	ortsspezifischen Mutagenese, englisch: <i>site-specific mutagenesis</i>
T	Thymin
Tab.	Tabelle
TAE-Puffer	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE-Puffer	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TEMED	Tetramethylethylendiamin
Tet	Tetracyclin
Tet ^r	Tetracyclinresistenz
TFB	englisch: <i>transformation buffer</i>
TM	Schmelztemperatur
T _m	Schmelztemperatur
Topo	Topoisomerase
Tris	Tris-(hydroxymethyl-)aminomethan
™	englisch: <i>trademark</i>
u	englisch: <i>units</i>
U	Uracil
U	Einheiten, englisch: <i>units</i>

ÜN	über Nacht
ÜNK	Übernachtkultur
ÜTK	Übertagkultur
UV	Ultraviolett
V	Volt
WHO	Weltgesundheitsorganisation, englisch: <i>World Health Organisation</i>
WOB	englisch: <i>wobble</i>
WT	Wildtyp
z.B.	zum Beispiel
Δ	Deletion/Differenz
μ	mikro (10 ⁻⁶)
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
Ω	Ohm

Tabelle 10-2 Genbezeichnungen und Erklärungen

Genbezeichnung	Erklärungen
<i>aac</i>	Aminoglykosidacetyltransferase
<i>aac(6')Ib</i>	Aminoglykosid-Acyltransferase AAC(6')Ib
<i>acrA</i>	periplasmatisches Adapterprotein AcrA der AcrAB-TolC Effluxpumpe
<i>acrB</i>	Pumpenprotein AcrB der AcrAB-TolC Effluxpumpe
<i>acrE</i>	periplasmatisches Adapterprotein AcrE der AcrEF-TolC Effluxpumpe
<i>acrF</i>	Pumpenprotein AcrF der AcrEF-TolC Effluxpumpe
<i>acrR</i>	lokaler Repressor AcrR von <i>acrAB</i>
<i>acrS</i>	Repressor AcrS von <i>acrAB</i> und <i>acrEF</i>
<i>aphA</i>	Aminoglykosid-Phosphotransferase
<i>cysG</i>	Sirohäm-Synthase
<i>dnaE</i>	Alpha-Untereinheit der Polymerase III
<i>dnaQ/mutD</i>	Epsilon-Untereinheit der Polymerase III
<i>gyrA</i>	A-Untereinheit der Gyrase
<i>gyrB</i>	B-Untereinheit der Gyrase
<i>lexA</i>	Repressor der SOS-Antwort LexA
<i>luc</i>	kodiert für die Luciferase
<i>marA</i>	globaler Transkriptionsfaktor MarA
<i>marB</i>	Protein unbekannter Funktion
<i>marC</i>	putatives Membranprotein unbekannter Funktion
<i>marO</i>	Operatorregion des mar Operons
<i>marR</i>	Repressor des mar Operons MarR
<i>micF</i>	kodiert für die nicht translatierte antisense RNA micF
<i>mutH</i>	DNA mismatch repair Protein MutH
<i>mutL</i>	DNA mismatch repair Protein MutL
<i>mutS</i>	DNA mismatch repair Protein MutS
<i>mutT</i>	Nucleosidtriphosphatase MutT
<i>mutY</i>	Adenin DNA-Glykosylase
<i>ompF</i>	outer membrane protein F
<i>oqx</i>	Effluxpumpe QepA
<i>parC</i>	A-Untereinheit der Topo IV
<i>parE</i>	B-Untereinheit der Topo IV
<i>qepA</i>	Effluxpumpe QepA
<i>qnr</i>	Topoisomerase-Schutzprotein(e)

<i>recA</i>	Recombinase A mit Protease- und Nukleaseaktivität
<i>soxR</i>	Repressor von <i>soxS</i>
<i>soxS</i>	globaler Transkriptionsfaktor SoxS
<i>tolC</i>	Porin TolC in der äußeren Membran
<i>topA</i>	A-Untereinheit der Topo I
<i>uvrC</i>	Endonulease-Untereinheit der Excinuklease UvrABC
<i>uvrD</i>	DNA-abhängige Helikase II

Tabelle 10-3 Abkürzungen der DNA-Basen und deren Erklärung

DNA-Basen	Erklärung
A	Adenin
T	Thymin
C	Cytosin
G	Guanin
U	Uracil

Tabelle 10-4 Aminosäuren und deren 3- und 1-Buchstaben Code

Aminosäure	Abkürzung (3-Buchstaben-Code)	Abkürzung (1-Buchstaben-Code)
Alanin	Ala	A
Arginin	Arg	R
Asparagin	Asn	N
Asparaginsäure	Asp	D
Cystein	Cys	C
Glutamin	Gln	Q
Glutaminsäure	Glu	E
Glycin	Gly	G
Histidin	His	H
Isoleucin	Ile	I
Leucin	Leu	L
Lysin	Lys	K
Methionin	Met	M
Phenylalanin	Phe	F
Prolin	Pro	P
Serin	Ser	S
Threonin	Thr	T
Tryptophan	Trp	W
Tyrosin	Tyr	Y
Valin	Val	V

11 Gefahrstoffverzeichnis

In Tabelle 11-1 sind die KMR-Substanzen der Kategorien I und II aufgeführt, die in dieser Arbeit verwendet wurden. In Tabelle 11-2 finden sich die verwendeten Gefahrenstoffe.

Tabelle 11-1 Liste verwendeten KMR-Substanzen der Kategorien I und II

Cas-Nr.	IUPAC-Bezeichnung	Verwendung & Menge	Kategorie
67-66-3	Trichlormethan (Chloroform)	Phenol-Chloroform-Extraktion; Menge ca. 1 ml	K2; H351
1239-45-8	3,8-Diamino-5-ethyl-6-phenylphenanthridinium-bromid (Ethidiumbromid)	Agarose-Gelelektrophorese; Menge höchstens 4 µL einer 1 %-igen Lösung	M2; H341
75-12-7	Formamid	Sequenzierung; Menge 30 µL	M2; H360D
108-95-2	Benzenol (Phenol)	Phenol-Chloroform-Extraktion; Menge ca. 500 µL	M2; H341
79-06-1	Acrylamid (Propensäureamid)	Auftrennung von Proteinen mittels Polyacrylamid-Gelelektrophorese, Menge: max. 7,8 ml einer 40 %-Lösung	K2, M2

Tabelle 11-2 Liste der Gefahrstoffe mit Gefahrensymbol, GHS Gefahren und GHS Maßnahmen

Substanz	Gefahrensymbol	GHS Gefahren (Hazard)	GHS Maßnahmen (Precaution)
Acrylamid		H301, H312, H315, H317, H319, H332, H340, H350, H361f, H372	P201, P202, P260, P264, P280, P281, P301+P310, P302+P352, P304+P340, P305+P351+P338, P308+P313, P321, P330, P333+P313, P337+P313, P362, P405, P501
Aminocapronsäure		H315, H319, H335	P261, P264, P280, P302+P352, P304+P340, P305+P351+P338, P312, P321, P332+P313, P337+P313, P362, P403+P233, P405, P501
Ammoniumchlorid		H302 -H 319	P305, P351, P338
Ammoniumpersulfat		H272, H302, H315, H317, H319, H334, H335	P210, P220, P221, P261, P264, P280, P285, P301+P312, P302+P352, P304+P340, P305+P351+P338, P321, P330, P333+P313, P337+P313, P342+P311, P362, P370+P378, P403+P233, P405, P501
Borsäure		H360FD	P201, P308+P313
Butanol		H226, H302, H315, H318, H335, H336	P301+P312, P302+P352, P303+P361+P353, P304+P340, P305+P351+P338, P310, P321, P330, P332+P313, P370+P378, P403+P233, P403+P235, P405, P501, P210, P240, P241, P242, P243, P261, P264, P280

Calciumchlorid-Dihydrat		H319	P264, P280, P305+P351+P338, P337+P313
Chloroform		H302, H315, H350, H373 **	P201, P202, P260, P264, P280, P281, P301+P312, P302+P352, P308+P313, P321, P330, P332+P313, P362, P405, P501
Citronensäure-Monohydrat		H318	P305, P351, P338
2,6-Diaminotoluol		H341, H212, G302, H317, H411	P273, P280
Digoxigenin		H300, H310, H330	P260, P264, P280, P284, P302+P350, P310
Essigsäure (100 %)		H226, H314	P210, P233, P240, P241, P242, P243, P260, P264, P280, P301+P330+P331, P303+P361+P353, P304+P340, P305+P351+P338, P310, P321, P370+P378, P403+P235, P405, P501
Ethanol		H225	P210, P233, P240, P241, P242, P243, P280, P303+P361+P353, P370+P378, P403+P235, P501
Ethidiumbromid			
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)		H318	P280, P305+P351+P338, P310
Formamid		H360D	P201-P308, P313
Guanidin-HCl		H302, H319, H315	P305+P351+P338, P302+P352
Indol		H302, H311, H315, H318, H335, H400	P261, P273, P280, P305+P351+P338, P312
Isoamylalkohol		EUH066, H226, H332, H335	P210, P240, P241, P242, P243, P261, P280, P303+P361+P353, P304+P340, P312, P370+P378, P403+P233, P403+P235, P405, P501
Isopropanol (2-Propanol)		H225, H319, H336	P210, P233, P305+P351+P338
Kaliumhydroxid		H302, H314	P260, P264, P280, P301+P312, P301+P330+P331, P303+P361+P353, P304+P340, P305+P351+P338, P310, P321, P405, P501
Maleinsäure		H302, H319, H335, H315, H317	P280, P302+P350, P305+P351+338
β-Mercaptoethanol		H302, H311, H314, H332, H411	P260, P264, P273, P280, P301+P312, P301+P330+P331, P302+P352, P303+P361+P353, P304+P340, P305+P351+P338, P310, P321, P391, P405, P501
Methanol		H225, H301, H311, H331, H370(Augen)	P210, P261, P280.1-3+7, P301+310, P307+311, P402+433
MOPS (3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure)		H315, H319, H335	P261, P305, P351, P338
Natriumdodecylsulfat (SDS)		H302, H312, H315, H319, H335	P261, P264, P280, P301+P312, P302+P352, P304+P340, P305+P351+P338, P321, P330,

Natriumhydroxid		H314	P332+P313, P337+P313, P362, P403+P233, P405, P501 P260, P264, P280, P301+P330+P331, P303+P361+P353, P304+P340, P305+P351+P338, P310, P321, P405, P501
Natriumsalicylat		H302-H319	P260-P305, P351, P338
Nitroblau- Tetrazoliumchlorid (NBT)		H302, H315, H319, H335	P261, P270, P280, P305+P351+P338
Phenol	 	H301, H311, H314, H331, H341, H373 **	P201, P202, P260, P264, P280, P281, P301+P310, P301+P330+P331, P302+P352, P303+P361+P353, P304+P340, P305+P351+P338, P308+P313, P321, P403+P233, P405, P501
Phosphorsäure		H314	P305, P351, P338, P309, P310
Polyvinylpyrrolidon K30	entfällt	H303, H333	
6-ROX (6-Carboxy-X- rhodamin)		H315, H319, H335	P261, P305 + P351 + P338
Salzsäure (37 %)	 	H290-H314-H335	P260, P264, P280, P301+P330+P331, P303+P361+P353, P304+P340, P305+P351+P338, P310, P321, P403+P233, P405, P501
SYBR-Green		H373	P260, P314, P501
TEMED	 	H225, H302, H314, H332	P210, P233, P240, P241, P242, P243, P260, P264, P280, P301+P312, P301+P330+P331, P303+P361+P353, P304+P340, P305+P351+P338, P310, P321, P370+P378, P403+P235, P405, P501
Tris		H315-H319-H335	P261-P280-P305+P351+P338-P321-P405-P501
Triton X-100	 	H302, H318, H411	P264, P273, P280, P301+P312, P305+P351+P338, P310, P330, P391, P501
Xylencyanol		H315, H319, H335	P261, P264, P280, P302+P352, P304+P340, P305+P351+P338, P312, P321, P332+P313, P337+P313, P362, P403+P233, P405, P501

12 Tabellenverzeichnis

TABELLE 1-1	HISTORISCHE BETRACHTUNG DER RESISTENZ - EIN URALTES PHÄNOMEN.....	16
TABELLE 2-1	LISTE VERWENDETE GERÄTE UND VERBRAUCHSMATERIALIEN.....	47
TABELLE 2-2	LISTE VERWENDETE KITS.....	51
TABELLE 2-3	LISTE VERWENDETE SOFTWARE.....	52
TABELLE 2-4	LISTE DER VERWENDETEN PUFFER UND LÖSUNGEN.....	52
TABELLE 2-5	VERWENDETE NÄHRMEDIEN.....	55
TABELLE 2-6	AUFLISTUNG DER VERWENDETEN ENZYME.....	55
TABELLE 2-7	LISTE DER VERWENDETEN CHEMIKALIEN UND ANTIBIOTIKA.....	57
TABELLE 2-8	LISTE DER VERWENDETEN BAKTERIENSTÄMME.....	59
TABELLE 2-9	VERWENDETE VEKTOREN UND REKOMBINANTE PLASMIDE.....	63
TABELLE 2-10	OLIGONUKLEOTIDE FÜR REAL TIME QUANTITATIVE PCR SDIA.....	64
TABELLE 2-11	OLIGONUKLEOTIDE FÜR WEITERE FRAGESTELLUNGEN MIT SDIA.....	64
TABELLE 2-12	OLIGONUKLEOTIDE ZUR QRDR-SEQUENZIERUNG DER GYRASE UND TOPOISOMERASE IV UND ZUR DETEKTION EINER <i>MARR</i> -DELETION IN <i>E. COLI</i>	65
TABELLE 2-13	OLIGONUKLEOTIDE FÜR KLONIERUNGEN MIT <i>ICD</i>	65
TABELLE 2-14	PRIMER ZUR ORTSSPEZIFISCHEN MUTAGENESE NACH DATSENKO UND WANNER [182].....	66
TABELLE 2-15	OLIGONUKLEOTIDE ZUM NACHWEIS VON Δ <i>ICD</i> 7 BP.....	66
TABELLE 2-16	ÜBERSICHT DER VERWENDETEN GRÖßENSTANDARDS FÜR DNA-GELE.....	67
TABELLE 2-17	TFB1 100ML ANSATZ.....	71
TABELLE 2-18	ZUSAMMENSETZUNG TFB2 50 ML ANSATZ.....	71
TABELLE 2-19	VOLUMENBEISPIELE FÜR RNASE A VERDAU.....	81
TABELLE 2-20	VERGLEICH DER VERWENDETEN THERMOSTABILEN POLYMERASEN.....	83
TABELLE 2-21	STANDARD REAKTIONSANSATZ DREAMTAQ™PCR.....	84
TABELLE 2-22	STANDARD-PCR-PROGRAMM.....	84
TABELLE 2-23	ZUSAMMENSETZUNG PHUSION-PCR-ANSATZ.....	85
TABELLE 2-24	PHUSION-PCR-PROGRAMM.....	85
TABELLE 2-25	ZUSAMMENSETZUNG REAKTIONSANSATZ FÜR <i>REAL-TIME QUANTITATIVE PCR</i> [201].....	87
TABELLE 2-26	TEMPERATUR- UND ZEITPROFIL FÜR EINEN <i>REAL-TIME QUANTITATIVE PCR</i> -ANSATZ [201].....	87
TABELLE 2-27	ZUSAMMENSETZUNG GRADIENT MIT DEN PRIMERN FÜR <i>REAL-TIME QUANTITATIVE PCR</i>	88
TABELLE 2-28	<i>CYSG</i> -AMPLIFIKATION PCR-PROGRAMM.....	88
TABELLE 2-29	REAKTIONSANSATZ DREAMTAQ™ PCR.....	91
TABELLE 2-30	STANDARD PCR-PROGRAMM.....	91
TABELLE 2-31	STANDARDANSATZ FÜR VERDAU ZUR UNTERSUCHUNG VON RFLP VON <i>GYRA</i> (S83L).....	91
TABELLE 2-32	PROGRAMMVORGABEN ZUM RESTRIKTIONSVERDAU MIT <i>HINFL</i>	91
TABELLE 2-33	FRAGMENTGRÖßEN NACH AMPLIFIKATION EINES 592 BP PCR-FRAGMENT MIT DEN PRIMERN <i>MARR_-101_FOR</i> UND <i>MARA_+42_REV</i> UND MIT/OHNE VERDAU MIT <i>SAU3A1</i>	92

TABELLE 2-34	REAKTIONSANSATZ DREAMTAQ™ PCR	92
TABELLE 2-35	STANDARD PCR-PROGRAMM.....	92
TABELLE 2-36	STANDARDANSATZ FÜR VERDAU ZUR UNTERSUCHUNG VON RFLP VON <i>MARR</i>	92
TABELLE 2-37	PROGRAMMVORGABEN ZUM RESTRIKTIONSVERDAU MIT <i>SAU3A1</i>	92
TABELLE 2-38	ZUSAMMENSETZUNG REAGENZIEN FÜR DIE PYROSEQUENZIERUNG.....	95
TABELLE 3-1	VERGLEICH DER ZU UNTERSUCHENDEN MUTANTEN.....	104
TABELLE 3-2	VERGLEICH DER ERGEBNISSE DER ERSTEN SEQUENZIERUNG (EIGENE DARSTELLUNG).....	104
TABELLE 3-3	SEQUENZALIGNMENT FÜR WT (GK571), MIII (GK574 UND MIVA (GK575) (EIGENE DARSTELLUNG)	105
TABELLE 3-4	AMINOSÄURE-SEQUENZ-ALIGNMENT FÜR <i>SDIA</i> IN <i>E. COLI</i> WT, MIII UND MIVA	106
TABELLE 3-5	BIOTINPRIMER UNTERSCHIED IN EINER BASE ZWISCHEN <i>E. COLI</i> -STAMM MG1655 UND <i>E. COLI</i> WT.....	107
TABELLE 4-1	VERGLEICH DER MHK VON CIPROFLOXACIN (CIP); VERWENDUNG UNTERSCHIEDLICHER PLASMIDE (MHK-WERTE IN μG/ML)	121
TABELLE 4-2	VERGLEICH DER MHK VON CIPROFLOXACIN (CIP); VERWENDUNG UNTERSCHIEDLICHER PLASMIDE	122
TABELLE 4-3	MHK VON VERSCHIEDENEN ANTIBIOTIKA VOR SELEKTIONSVERSUCH	124
TABELLE 4-4	ABLAUF SELEKTIONSVERSUCH AM BEISPIEL VON MII PHPNE18-01.1 UND MII PHPNE19-02.1.....	124
TABELLE 4-5	SCHEMA DER EINZUSETZENDEN CIPROFLOXACIN-KONZENTRATION ANHAND DER ERGEBNISSE DER FEINBESTIMMUNG FÜR DIE STÄMME WT, WT-K UND MII MIT QNR.....	125
TABELLE 4-6	EINGESETZTE SELEKTIONSKONZENTRATIONEN FÜR DIE VERWENDETEN STÄMME	127
TABELLE 4-7	BESTIMMUNG DER MHK VON CIPROFLOXACIN (μG/ML) NACH SELEKTION UND NACH PLASMIDISOLIERUNG UND ANSCHLIEßENDER TRANSFORMATION VON MII	128
TABELLE 4-8	ZUSAMMENFASSUNG DER ERGEBNISSE DER GESICHERTEN SELEKTIERTEN STÄMME	132
TABELLE 4-9	ZUSAMMENFASSUNG DER ERGEBNISSE DER ERMITTLUNG DER MHK.....	134
TABELLE 4-10	ERGEBNISSE DER SANGER-SEQUENZIERUNG DER QRDR	135
TABELLE 4-11	FRAGMENTGRÖßEN NACH AMPLIFIKATION EINES 526 BP PCR-FRAGMENT MIT DEN PRIMERN <i>GYRA_5-1</i> UND <i>GYRA_3-1</i> UND MIT/OHNE ANSCHLIEßENDEM VERDAU MIT <i>HINFI</i>	137
TABELLE 4-12	ERGEBNISSE DES RFLP TABELLARISCH ZUSAMMENGEFASST.....	137
TABELLE 4-13	ÜBERSICHT ERGEBNISSE DER UNTERSUCHUNG <i>MARR</i> -DELETION	140
TABELLE 4-14	SEQUENZEN VON <i>MARR</i> FÜR WT PHPNE19-02.1 NR. 1 I 2 17 (WT A1 I 2 17 FW UND RV) UND WT PHPNE19- 02.1 NR. 1 I 2 18 (WT A1 I 2 18 FW UND RV)	142
TABELLE 4-15	ERGEBNIS DER SANGER-SEQUENZIERUNG IN MII Δ <i>ICD</i> 7 BP PHPNE19-02.1.....	145
TABELLE 4-16	ERGEBNISSE DER SEQUENZIERUNG <i>ICD</i> UND UMGEBUNG.	145
TABELLE 4-17	SELEKTIERTE MUTANTEN MIT VERDACHT AUF Δ <i>ICD</i>	149
TABELLE 4-18	ZUSAMMENFASSUNG DER ERGEBNISSE DER SEQUENZIERUNG VON <i>ICDA</i>	151
TABELLE 4-19	<i>ICD</i> -SEQUENZALIGNMENT DER UNTERSUCHTEN MUTANTEN IM VERGLEICH ZU CFT073	153
TABELLE 4-20	ÜBERSICHT VERWENDETE PRIMERPAARE FÜR AMPLIFIKATION VON SEQUENZBEREICHEN BEI <i>ICD</i> BEI MII PHPNE18- 01.1 NR. II 18 („NR. II 18“); IN CHRONOLOGISCHER REIHENFOLGE	156
TABELLE 4-21	ERGEBNISSE MICRONAUT-S BEI MII Δ <i>ICD</i> 7 BP PHPNE19-02.1 (NR. I 43) IM VERGLEICH ZU MII	160
TABELLE 4-22	ERWARTETE FRAGMENTGRÖßEN NACH RESTRIKTIONSVERDAU FÜR PHPHP177-01.1.....	164

TABELLE 4-23	MHK DER KOMPLEMENTATIONSVERSUCHE.....	166
TABELLE 4-24	MHK DER EINZELNEN STÄMME FÜR RIFAMPICIN.....	168
TABELLE 4-25	VERWENDETE QNR-VARIANTEN UND DIE DAZUGEHÖRIGEN VEKTOREN.....	170
TABELLE 4-26	WEITERE MUTANTEN AUS SELEKTIONSVERSUCHEN.....	173
TABELLE 4-27	MHK VON CIPROFLOXACIN VERSCHIEDENE MII-MUTANTEN.....	174
TABELLE 4-28	MHK VON NORFLOXACIN BEI VERSCH. MII-MUTANTEN.	174
TABELLE 4-29	VERWENDETE PRIMER FÜR <i>GENE DOCTORING</i>	177
TABELLE 4-30	SEQUENZALIGNMENT DES ÜBERGANGS IN 5'-RICHTUNG VOR DER KANAMYCIN-RESISTENZKASSETTE NACH HOMOLOGER REKOMBINATION DURCH DAS GENE DOCTORING	186
TABELLE 4-31	SEQUENZALIGNMENT DES ÜBERGANGS IN 3'-RICHTUNG NACH DER KANAMYCIN- RESISTENZKASSETTE NACH HOMOLOGER REKOMBINATION DURCH DAS GENE DOCTORING.	187
TABELLE 4-32	ERGEBNISSE MHK VON CIPROFLOXACIN (CIP), NORFLOXACIN (NOR), TETRACYCLIN (TET).....	189
TABELLE 4-33	ÜBERSICHT MHK VON VERSCHIEDENEN ANTIBIOTIKA FÜR WT, WT Δ ICD 7 BP, MI, MII UND MII Δ ICD 7 BP	190
TABELLE 4-34	ERGEBNISSE ERMITTLUNG MHK NACH SELEKTIONSEXPERIMENT IN μ G/ML.....	191
TABELLE 4-35	MHK VON VERSCHIEDENEN ANTIBIOTIKA IN AN- UND ABWESENHEIT DES EFFLUXPUMPENINHIBITORS (EPI) PABN FÜR DEN AUSGANGSSTAMM MII UND MII Δ ICD 7 BP	197
TABELLE 4-36	MHK VON CIPROFLOXACIN UND NORFLOXACIN FÜR MII Δ ICD 7 BP MIT VERSCHIEDENEN QNR-VARIANTEN.....	198
TABELLE 4-37	DATEN DISSERTATION DR. N. MATTHIESSEN (2007) [181]	199
TABELLE 4-38	ERGEBNISSE DER MHK-BESTIMMUNG MIT UND OHNE INDUKTION DURCH NATRIUMSALICYLAT.....	200
TABELLE 4-39	ERWARTETE FRAGMENTGRÖßEN DER PLASMIDE PPHB331, PPHB333 UND PPHB335 NACH VERDAU MIT <i>BAM</i> HI UND <i>XHO</i> I	204
TABELLE 4-40	FRAGMENTGRÖßEN PHPHP177-04.1 NACH VERDAU MIT <i>Pst</i> I ODER <i>Xba</i> I+ <i>Bam</i> HI	206
TABELLE 4-41	FRAGMENT NACH VERDAU MIT <i>Bam</i> HI UND MIT ODER OHNE <i>Bgl</i> II	211
TABELLE 4-42	PH-WERTE WASSER UNTERSCHIEDLICHER QUELLEN	213
TABELLE 4-43	SPEZIFISCHE LUCIFERASE-AKTIVITÄTEN (MITTELWERTE)	216
TABELLE 4-44	AUF <i>E. COLI</i> -STAMM WT BEZOGENE RELATIVE LUCIFERASE-AKTIVITÄTEN INKL. PROZENTUALER STANDABWEICHUNG..	216
TABELLE 4-45	ERGEBNISSE DER MESSUNG VOM 15.07.2014	219
TABELLE 4-46	ERGEBNISSE DER MESSUNG VOM 15.07.2014 -LUCIFERASEAKTIVITÄT AUF WT BEZOGEN.....	219
TABELLE 4-47	MESSUNG 17.07.2014; NORFLOXACIN-KONZENTRATIONEN ZUR ERMITTLUNG DER SPEZIFISCHEN LUCIFERASE- AKTIVITÄT AUSGEWÄHLTER STÄMME	221
TABELLE 4-48	MITTELWERTE DER MESSUNG VOM 17.07.2014	222
TABELLE 4-49	ERGEBNISSE DER MESSUNG VOM 17.07.2014	222
TABELLE 4-50	MESSUNG 14.08.2014	224
TABELLE 4-51	MITTELWERTE DER MESSUNG VOM 14.08.2014 DER SPEZIFISCHEN LUCIFERASE-AKTIVITÄT.....	224
TABELLE 4-52	MESSUNG VOM 14.08.2014 -RELATIVE AUF DEN WT BEZOGENE LUCIFERASE-AKTIVITÄTEN MIT PROZENTUALER STANDARDABWEICHUNG.....	225
TABELLE 5-1	EINGESETZTE SELEKTIONSKONZENTRATIONEN UND ERMITTELTE MUTATIONS RATEN	238

TABELLE 5-2	Δ ICD BEI SELEKTIERTEN MUTANTEN.	246
TABELLE 5-3	ICD -AMINOSÄURESEQUENZEN BEI <i>E. COLI</i> CFT073, MII UND SELEKTIERTER MUTANTEN	248
TABELLE 5-4	ÜBERSICHT DER SUBSTRATBINDESTELLEN UND AKTIVEN ZENTREN BEI <i>E. COLI</i> K12 ICD	255
TABELLE 5-5	ÜBERSICHT VEKTOREN MIT ORI, KOPIENZAHL UND INKOMPATIBILITÄTSGRUPPE [311], [324].....	263
TABELLE 10-1	ALLGEMEINE ABKÜRZUNGEN	283
TABELLE 10-2	GENBEZEICHNUNGEN UND ERKLÄRUNGEN	286
TABELLE 10-3	ABKÜRZUNGEN DER DNA-BASEN UND DEREN ERKLÄRUNG	287
TABELLE 10-4	AMINOSÄUREN UND DEREN 3- UND 1-BUCHSTABEN CODE	287
TABELLE 10-5	LISTE VERWENDETEN KMR-SUBSTANZEN DER KATEGORIEN I UND II	288
TABELLE 10-6	LISTE DER VERWENDETEN GEFAHRSTOFFE MIT GEFAHRENSYMBOL, GHS GEFAHREN UND GHS MAßNAHMEN	288
TABELLE 10-7	ÜBERSICHT DER GESICHERTEN MUTANTEN UND DER MHK VON CIP IN (μ G/ML).....	315
TABELLE 10-8	ÜBERSICHT DER MHK FÜR SELEKTIERTE WT-MUTANTEN IN (μ G/ML)	316
TABELLE 10-9	ÜBERSICHT DER MHK FÜR SELEKTIERTE WT-K-MUTANTEN	317
TABELLE 10-10	ÜBERSICHT DER MHK FÜR SELEKTIERTE MII-MUTANTEN.....	318
TABELLE 10-11	DETAILLIERTE ANSICHT ERGEBNISSE SCREENING	322
TABELLE 10-12	ERGEBNISSE DER SEQUENZANALYSE FÜR <i>GYRA</i> DER WT-MUTANTEN.....	328
TABELLE 10-13	ABBILDUNG 10-9 ERGEBNISSE DER SEQUENZANALYSE FÜR <i>PARC</i> DER WT-MUTANTEN	329
TABELLE 10-14	ERGEBNISSE DER SEQUENZANALYSE FÜR <i>PARÉ</i> DER WT-MUTANTEN	329
TABELLE 10-15	ERGEBNISSE DER SEQUENZANALYSE FÜR <i>GYRA</i> DER MII-MUTANTEN.....	330
TABELLE 10-16	ERGEBNISSE DER SEQUENZANALYSE FÜR <i>PARC</i> DER MII-MUTANTEN	331
TABELLE 10-17	ERGEBNISSE DER SEQUENZANALYSE FÜR <i>GYRB</i> DER MII-MUTANTEN.....	333
TABELLE 10-18	ERGEBNISSE DER SEQUENZANALYSE FÜR <i>PARÉ</i> DER MUTANTEN.....	334
TABELLE 10-19	ERGEBNISSE DER SEQUENZANALYSE FÜR MII PHPNE19-02.1 NR. II 18	336
TABELLE 10-20	ERGEBNISSE DER SEQUENZANALYSE FÜR MII PHPNE19-02.1 NR. III 2.....	337
TABELLE 10-21	ERGEBNISSE DER SEQUENZANALYSE FÜR MII PHPNE19-02.1 NR. III 3	339
TABELLE 10-22	ERGEBNISSE DER SEQUENZANALYSE FÜR MII PHPNE19-02.1 NR. III 13	341
TABELLE 10-23	ERGEBNISSE DER SEQUENZANALYSE FÜR MII PHPNE18-01.1 NR. II 23	343
TABELLE 10-24	ABSOLUTE RLU-WERTE DES STAMMES MII PPHB335	346
TABELLE 10-25	ABSOLUTE RLU-WERTE DES VERMEINTLICHEN STAMMES MII Δ ICD 7 BP PPHB335.....	346
TABELLE 10-26	ABSOLUTE RLU-WERTE DES VERMEINTLICHEN STAMMES MII Δ ICD 7 BP PPHB335.....	346
TABELLE 10-27	ABSOLUTE RLU-WERTE DES VERMEINTLICHEN STAMMES MII	347
TABELLE 10-28	ABSOLUTE RLU-WERTE DER LEERPROBEN	347
TABELLE 10-29	ABSOLUT BESTIMMTE KBE- UND PROTEIN-GESAMTGEHALT-WERTE DER UNTERSUCHTEN BAKTERIENSTÄMME	348
TABELLE 10-30	ABSOLUTE RLU-WERTE DER UNTERSUCHTEN STÄMME	348
TABELLE 10-31	ABSOLUTE RLU-WERTE DER UNTERSUCHTEN STÄMME	348
TABELLE 10-32	ABSOLUT BESTIMMT KBE- UND PROTEIN-GESAMTGEHALT-WERTE DER UNTERSUCHTEN BAKTERIENSTÄMME	349
TABELLE 10-33	ABSOLUTE RLU-WERTE DER 1. MESSUNG DER UNTERSUCHTEN STÄMME	350
TABELLE 10-34	ABSOLUTE RLU-WERTE DER 2. MESSUNG DER UNTERSUCHTEN STÄMME	350

TABELLE 10-35 ABSOLUT BESTIMMTE PROTEIN-GESAMTGEHALT-WERTE	351
TABELLE 10-36 ABSOLUTE RLU-WERTE DER 1. MESSUNG DER UNTERSUCHTEN STÄMME	351
TABELLE 10-37 ABSOLUTE RLU-WERTE DER 2. MESSUNG DER UNTERSUCHTEN STÄMME	352
TABELLE 10-38 ABSOLUTE RLU-WERTE DER LEERPROBEN	352
TABELLE 10-39 ABSOLUT BESTIMMTE PROTEIN-GESAMTGEHALT-WERTE	353
TABELLE 10-40 ABSOLUTE RLU-WERTE DER 1. MESSUNG DER UNTERSUCHTEN STÄMME.....	354
TABELLE 10-41 ABSOLUTE RLU-WERTE DER 2. MESSUNG DER UNTERSUCHTEN STÄMME.....	354
TABELLE 10-42 ABSOLUTE RLU-WERTE DER LEERPROBEN	354

13 Abbildungsverzeichnis

ABBILDUNG 1-1	FLUORCHINOLON-RESISTENZEN; GRENZWERTE (GEMÄß EUCAST) FÜR DIE JAHRE 2001, 2009 UND 2013, MODIFIZIERT NACH [21]–[24].....	17
ABBILDUNG 1-2	SCHEMATISCHE DARSTELLUNG VON MDR (MULTIDRUG RESISTANCE)-EFFLUXPUMPEN BEI GRAMPOSITIVEN UND GRAMNEGATIVEN BAKTERIEN MITSAMT LOKALISIERUNG IN DER MEMBRAN, MODIFIZIERT NACH [33]	20
ABBILDUNG 1-3	MODELL ZUR ERKLÄRUNG DER FUNKTION DES DREITEILIGEN ACRAABZ-TOLC-EFFLUXSYSTEMS [39].....	21
ABBILDUNG 1-4	BAKTERIELLES QUORUM SENSING, MODIFIZIERT NACH [61]	22
ABBILDUNG 1-5	QUORUM-SENSING MODELL IN <i>P. FISCHERI</i> , MODIFIZIERT NACH [63].....	23
ABBILDUNG 1-6	<i>ACRAAB</i> -REGULATION IN <i>E. COLI</i> [75].....	24
ABBILDUNG 1-7	MECHANISMUS NEGATIVE DNA-ÜBERSPIRALISIERUNG DURCH GYRASE [91]	26
ABBILDUNG 1-8	SCHEMA DNA-GYRASE SUPERSPIRALISIERUNGSPROZESS, MODIFIZIERT NACH [93]	26
ABBILDUNG 1-9	ÜBERSICHT VERSCHIEDENER CHINOLON-STRUKTUREN, MODIFIZIERT NACH [100]	28
ABBILDUNG 1-10	STRUKTUR-WIRKUNGSBEZIEHUNGEN BEI GYRASEHEMMERN, MODIFIZIERT NACH [77].....	29
ABBILDUNG 1-11	GYRASE MIT DEN HERVORGEHOBENEN REGIONEN DER GYRA-UNTEREINHEIT, MODIFIZIERT NACH [125].....	30
ABBILDUNG 1-12	HELIX IV FQ-BINDEMODELL INNERHALB DER <i>E. COLI</i> GYRASE [109]	31
ABBILDUNG 1-13	BINDUNG CHINOLON ZU TOPOISOMERASE DURCH WASSER-METALLIONENBRÜCKE.....	32
ABBILDUNG 1-14	RESISTENZMECHANISMEN GEGENÜBER (FLUOR)CHINOLONEN (FQ), MODIFIZIERT NACH [84].....	34
ABBILDUNG 1-15	SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DER BEKANNTEN REGULATIONSMECHANISMEN ZUR EXPRESSION VON <i>ACRAAB</i> UND <i>TOLC</i> IN <i>E. COLI</i> , MODIFIZIERT NACH [147]	37
ABBILDUNG 1-16	PENTAPEPTID WIEDERHOLUNGEN IN QNRA1 UND MFPA [164]	39
ABBILDUNG 1-17	MÖGLICHES MODELL FÜR DIE INTERAKTION VON PRP (<i>PENTAPEPTID-REPEAT PROTEIN</i>) MIT PROTEKTIVEM EFFEKT GEGENÜBER CHINOLONEN MIT GYRASE [165]	40
ABBILDUNG 1-18	AKKUMULATION VON FLUORCHINOLON-RESISTENZMUTATIONEN AM BEISPIEL DER ENTSTEHUNG VON <i>E. COLI</i> MIII BEGINNEND MIT <i>E. COLI</i> WT, MODIFIZIERT NACH [27].	41
ABBILDUNG 2-1	DREIÖSENAUSSTRICH [184]	68
ABBILDUNG 2-2	SCHEMA 50ER-PLATTE (EIGENE DARSTELLUNG)	69
ABBILDUNG 2-3	THEORETISCHES PRINZIP DER POLYMERASE-KETTENREAKTION [195]	82
ABBILDUNG 2-4	PRINZIP DER KLASSISCHEN ARMS-PCR [198]	86
ABBILDUNG 2-5	POSITIONEN FÜR PRIMER BEIM RECOMBINEERING (EIGENE DARSTELLUNG)	96
ABBILDUNG 2-6	SCHEMA FÜR RECOMBINEERING MIT ZWEI PCR-PRODUKTEN (EIGENE DARSTELLUNG)	97
ABBILDUNG 2-7	SCHEMATISCHE PLASMIDKARTEN VON PDOC-K (LINKS) UND PACBSCE (RECHTS) [27].....	98
ABBILDUNG 2-8	PRINZIP EINES LUCIFERASE-REPORTERGEN-ASSAYS (EIGENE DARSTELLUNG).....	100
ABBILDUNG 3-1	AUSZUG DER CHROMATOGRAMME VON POSITION +583 BP DER SEQUENZIERUNGEN VON <i>SDIA</i> FÜR <i>E. COLI</i> WT (LINKS), MIII (MITTE) UND MIVA (RECHTS) (EIGENE DARSTELLUNG).....	105
ABBILDUNG 3-2	BEREICH <i>SDIA</i> MIT DEN VERWENDETEN PRIMERN FÜR DIE PYROSEQUENZIERUNG, (EIGENE DARSTELLUNG).....	107
ABBILDUNG 3-3	PYROSEQUENZIERUNG FÜR WT, MIII UND MIVA	108
ABBILDUNG 3-4	STRATEGIE ZUM NACHWEIS MEHRERER <i>SDIA</i> -GENE IN WT, MIII UND MIVA (EIGENE DARSTELLUNG)	109

ABBILDUNG 3-5	POSITIONEN DER PRIMER INNERHALB <i>SDIA</i> (EIGENE DARSTELLUNG).....	110
ABBILDUNG 3-6	GELBILD <i>SDIA</i> DIG-11-DUTP-SONDE; 13.04.2012.....	111
ABBILDUNG 3-7	ERMITTLUNG DETEKTIONSGRENZE DER <i>SDIA</i> -DIG-11-DUTP-SONDE.....	112
ABBILDUNG 3-8	ERGEBNIS DETEKTIONSGRENZE DER <i>SDIA</i> -DIG-11-DUTP-SONDE.....	113
ABBILDUNG 3-9	SCHNITTSTELLEN FÜR DAS RESTRIKTIONSENZYM FASTDIGEST <i>DRAI</i> IM SEQUENZBEREICH BEI <i>SDIA</i> (EIGENE DARSTELLUNG).....	116
ABBILDUNG 3-10	SCHNITTSTELLEN FÜR DAS RESTRIKTIONSENZYM FASTDIGEST <i>ECORI</i> IM SEQUENZBEREICH BEI <i>SDIA</i> (EIGENE DARSTELLUNG).....	116
ABBILDUNG 3-11	LINKE GELHÄLFTE: VERLAUFSKONTROLLE NACH FÄRBUNG MIT ETHIDIUMBROMID; RECHTE GELHÄLFTE: SOUTHERN BLOT MEMBRAN NACH DETEKTION.....	118
ABBILDUNG 3-12	ERGEBNISSE DER QUANTITATIVEN BESTIMMUNG DER <i>SDIA</i> EXPRESSION.....	120
ABBILDUNG 4-1	MITTELWERTE DER MUTATIONS RATEN NACH 48 H BEI 8-FACH MHK VON CIPROFLOXACIN (GILT NICHT FÜR WT QNRB1 UND WT-K PUC19).....	126
ABBILDUNG 4-2	UNTERSUCHUNG AUF PLASMIDVERLUST BEI FEHLENDEM SELEKTIONS DRUCK.....	130
ABBILDUNG 4-3	UNTERSUCHUNG AUF PLASMIDVERLUST BEI FEHLENDEM SELEKTIONS DRUCK BEI WT.....	131
ABBILDUNG 4-4	AGAROSEGEL MIT AUFGETRAGENER DNA NACH RESTRIKTIONSVERDAU MIT <i>HINFI</i>	138
ABBILDUNG 4-5	AGAROSEGEL MIT AUFGETRAGENER DNA NACH RESTRIKTIONSVERDAU MIT <i>HINFI</i>	139
ABBILDUNG 4-6	AGAROSEGEL <i>MARR</i> -PCR FÜR WT PUC19 KLONE.....	143
ABBILDUNG 4-7	POSITION DER PRIMER FÜR ARMS-PCR (EIGENE DARSTELLUNG).....	147
ABBILDUNG 4-8	AGAROSE-GELELEKTROPHORESE ZUM TESTEN DER ARMS-PCR.....	148
ABBILDUNG 4-9	ARMS-PCR FÜR Δ <i>ICD</i> 7 BP BEI MUTANTEN MII PHPNE18-01.1 UND MII PHPNE19-02.1.....	149
ABBILDUNG 4-10	WIEDERHOLUNG DER ARMS-PCR UND MEHR AUFGETRAGENES PCR-PRODUKT.....	150
ABBILDUNG 4-11	VORBEREITUNG FÜR SANGER-SEQUENZIERUNG VON <i>ICD</i>	152
ABBILDUNG 4-12	REGION <i>ICD</i> IN CFT073 (NCBI REFERENZNUMMER NC_004431.1 (EIGENE DARSTELLUNG).....	156
ABBILDUNG 4-13	PCR MIT PRIMERN MIT BINDUNGSSTELLEN INNERHALB <i>ICD</i>	157
ABBILDUNG 4-14	AGAROSEBILD ZUM PCR-NACHWEIS FÜR Δ <i>MARR</i> 175 BP.....	158
ABBILDUNG 4-15	ANSATZ ZUM NACHWEIS EINES AMPLICONS IM BEREICH <i>ICD</i> BEI MII PHPNE18-01.1 NR. II 18.....	159
ABBILDUNG 4-16	<i>ICD</i> -FRAGMENT FÜR DIE KLONIERUNG IN PACYC177 (EIGENE DARSTELLUNG).....	162
ABBILDUNG 4-17	VEKTORKARTE FÜR PACYC177 (EIGENE DARSTELLUNG).....	162
ABBILDUNG 4-18	VEKTORKARTE DEN ENDVEKTOR HPHP177-01.1 (EIGENE DARSTELLUNG).....	163
ABBILDUNG 4-19	AGAROSEGELELEKTROPHORESE ZUR IDENTIFIKATION VON HPHP177-01.1.....	164
ABBILDUNG 4-20	VEKTORKARTE VON HPHP177-02.1 (EIGENE DARSTELLUNG).....	165
ABBILDUNG 4-21	ERGEBNISSE DES RIFAMPICIN-FORWARDASSAYS (64 μ G/ML) FÜR MII UND MII Δ <i>ICD</i> 7 BP.....	169
ABBILDUNG 4-22	ERGEBNISSE DES RIFAMPICIN-FORWARDASSAYS (128 μ G/ML) FÜR MII UND MII Δ <i>ICD</i> 7 BP.....	170
ABBILDUNG 4-23	PUC19 UND VEKTOREN MIT <i>QNR</i> -GENEN (BASIEREND AUF PUC18/PUC19) (EIGENE DARSTELLUNG).....	171
ABBILDUNG 4-24	MHK VON CIPROFLOXACIN FÜR WT MIT UND OHNE <i>QNR</i> -PLASMIDE.....	172
ABBILDUNG 4-25	ERGEBNISSE MHK VON CIPROFLOXACIN FÜR MII ODER MII Δ <i>ICD</i> 7 BP NACH TRANSFORMATION MIT VERSCHIEDENEN <i>QNR</i> -PLASMIDEN.....	173

ABBILDUNG 4-26 ERGEBNIS GELELEKTROPHORESE DER SOEING-PCR MIT DREI FRAGMENTEN	176
ABBILDUNG 4-27 AUSSCHNITT VEKTORKARTE PDOC-K (EIGENE DARSTELLUNG)	178
ABBILDUNG 4-28 AUSSCHNITT VEKTORKARTE PHPHPDOC-01.1 (EIGENE DARSTELLUNG)	178
ABBILDUNG 4-29 AUSSCHNITT VEKTORKARTE PHPHPDOC-01.1 (EIGENE DARSTELLUNG)	179
ABBILDUNG 4-30 VEKTORKARTE VON PDOC-K (EIGENE DARSTELLUNG)	180
ABBILDUNG 4-31 VEKTORKARTE PHPHPDOC-01.1 (EIGENE DARSTELLUNG).....	181
ABBILDUNG 4-32 AGAROSEGELELEKTROPHORESE MIT PRODUKTEN EINER <i>ICD</i> ARMS-PCR, FARBEN INVERTIERT	183
ABBILDUNG 4-33 UV-AUFNAHME EINER AGAROSEGELELEKTROPHORESE ZUM NACHWEIS EINER <i>MARR</i> -DELETION	184
ABBILDUNG 4-34 WT Δ <i>ICD</i> 7 BP MIT <i>KANR</i> NACH <i>GENE DOCTORING</i> (EIGENE DARSTELLUNG).....	185
ABBILDUNG 4-35 ÜBERSICHT ERGEBNISSE DER GENERATIONSBESTIMMUNG	194
ABBILDUNG 4-36 LUCIFERASE-AKTIVITÄT-MESSUNG DER <i>E. COLI</i> -STÄMME MII (GK573), MII <i>PHB335</i> UND MII Δ <i>PHB335</i> 202	
ABBILDUNG 4-37 RESTRIKTIONSPRODUKTE DER PLASMIDISOLIERUNG VON <i>PHB335</i> AUS MII Δ <i>ICD</i> 7 BP.....	203
ABBILDUNG 4-38 PLASMIDFRAGMENTEN NACH RESTRIKTIONSVERDAU MIT <i>BAM</i> HI UND <i>XHO</i> I.....	204
ABBILDUNG 4-39 <i>PHPHP177-04.1</i> (EIGENE DARSTELLUNG), FALSCHER ORIENTIERUNG.....	207
ABBILDUNG 4-40 <i>PHPHP177-04.1</i> (EIGENE DARSTELLUNG), MIT RICHTIGER ORIENTIERUNG	207
ABBILDUNG 4-41 GELELEKTROPHORETISCHE TRENNUNG DER PLASMID-FRAGMENTE VON <i>PHPHP177-04.1</i> NACH ISOLIERUNG AUS FÜNF TRANSFORMANDEN UND RESTRIKTIONS VERDAU MIT <i>Pst</i> I.....	208
ABBILDUNG 4-42 PLASMID-FRAGMENTE VON <i>PHPHP177-04.1</i> NACH VERDAU <i>Xba</i> I UND <i>Bam</i> HI.....	208
ABBILDUNG 4-43 GRUNDPRINZIPIEN EINER SSM-PCR MIT DEM ZIEL DER DELETION EINES SEQUENZBEREICHES INNERHALB DES PLASMIDS (ORANGE); EIGENE DARSTELLUNG	209
ABBILDUNG 4-44 <i>PHPAR177-01.1</i> MIT DEN PRIMERN FÜR DIE SSM-PCR; DIE SCHNITTSTELLE FÜR <i>Bgl</i> II IST INNERHALB <i>PACrAB</i> VORHANDEN	210
ABBILDUNG 4-45 <i>PHPHP177-05.1</i> MIT PRIMERN DER SSM-PCR; SCHNITTSTELLE FÜR <i>Bgl</i> II IST NICHT MEHR VORHANDEN.....	211
ABBILDUNG 4-46 KALIBRIERGERADE ZUR PROTEIN-GESAMTGEHALT-BESTIMMUNG VOM 10.07.2014 UNTER VERWENDUNG EINER LYSOZYM-STANDARDLÖSUNG IN 0,3 M <i>NaOH</i>	214
ABBILDUNG 4-47 KALIBRIERGERADE ZUR PROTEIN-GESAMTGEHALT-BESTIMMUNG VOM 15.07.2014 UNTER VERWENDUNG EINER <i>BSA</i> -VERDÜNNUNGSREIHE IN 0,3 M <i>NaOH</i>	215
ABBILDUNG 4-48 KALIBRIERGERADE ZUR PROTEIN-GESAMTGEHALT-BESTIMMUNG VOM 17.07.2014 UNTER VERWENDUNG EINER <i>BSA</i> -VERWENDUNGSREIHE IN 0,3 M <i>NaOH</i>	215
ABBILDUNG 4-49 KALIBRIERGERADE ZUR PROTEIN-GESAMTGEHALT-BESTIMMUNG VOM 14.08.2014 UNTER VERWENDUNG EINER LYSOZYM-VERDÜNNUNGSREIHE IN 0,3 M <i>NaOH</i>	215
ABBILDUNG 4-50 MESSUNGEN DER AKTIVITÄT VON <i>PACrAB</i> AUSGEWÄHLTER <i>E. COLI</i> -STÄMME MIT <i>PHPAR177-01.1</i> BEZOGEN AUF <i>E. COLI</i> -STAMM WT VOM 10.07.2014.....	218
ABBILDUNG 4-51 MESSUNGEN DER AKTIVITÄT VON <i>PACrAB</i> VOM 15.07.2014 AUSGEWÄHLTER <i>E. COLI</i> -STÄMME MIT <i>PHPAR177-01.1</i> BEZOGEN AUF <i>E. COLI</i> -STAMM WT	220
ABBILDUNG 4-52 MESSUNGEN DER <i>PACrAB</i> EXPRESSION VOM 17.07.2014	223
ABBILDUNG 4-53 MESSUNGEN DER AKTIVITÄT VON <i>PACrAB</i> VOM 14.08.2014 DER STÄMME WT, MII, MII Δ (MII Δ <i>ICD</i> 7 BP) UND AI43 (MII Δ <i>ICD</i> 7 BP <i>PHPNE19-02.1</i> NR. I 43).....	226

ABBILDUNG 4-54 MESSUNGEN DER AKTIVITÄT VON <i>PACRAB</i> VOM 14.08.2014 DER STÄMME WT, MII, MIIΔ (MII Δ <i>ICD</i> 7 BP) UND AI43 (MII Δ <i>ICD</i> 7 BP PHPNE19-02.1)	227
ABBILDUNG 4-55 RLU/OD % QUOTIENTEN DER STÄMME WT, MII UND WT Δ <i>ICD</i> 7 BP MIT PPHB331	228
ABBILDUNG 4-56 MESSUNG PROMOTORAKTIVITÄT <i>PACREFF</i>	229
ABBILDUNG 4-57 PHPHP177-05.1; <i>LUC</i> OHNE <i>PACRAB</i> (EIGENE DARSTELLUNG)	229
ABBILDUNG 4-58 MESSUNG WT MIT LUCIFERASEPLASMID PHPAR17701.1 UND WT MIT KONTROLLPLASMID PHPHP177-05.1	230
ABBILDUNG 5-1 AKKUMULATION VON FLUORCHINOLON-RESISTENZMUTATIONEN AM BEISPIEL DER ENTSTEHUNG VON <i>E. COLI</i> MIII BEGINNEND MIT <i>E. COLI</i> WT, MODIFIZIERT NACH [27]	237
ABBILDUNG 5-2 GRAFISCHE DARSTELLUNG DER MINIMALEN UND MAXIMALEN ERHÖHUNG DER MHK.....	241
ABBILDUNG 5-3 DIE REGULATION DER EXPRESSION VON <i>ACRAB-TOLC</i> IN <i>E. COLI</i> [37]	245
ABBILDUNG 5-4 MHK VON CIP NACH KOMPLEMENTATION VON Δ <i>ICD</i> 7 BP ODER Δ <i>MARR</i>	250
ABBILDUNG 5-5 MHK VON FLUORCHINOLONEN FÜR TRANSFORMANDEN MIT QNR-PLASMIDEN	250
ABBILDUNG 5-6 MUTATIONS RATEN AUS DER DISSERTATION VON DR. M. PETSCHULIES (2014) [27]	251
ABBILDUNG 5-7 AUSWIRKUNGEN DER 7 BP DELETION IN <i>E. COLI</i> <i>ICD</i>	253
ABBILDUNG 5-8 CITRATZYKLUS UND GLYOXYLATZYKLUS, MODIFIZIERT NACH [312].....	254
ABBILDUNG 5-9 REGULATION DER <i>ACRAB</i> EXPRESSION DURCH ZELLULÄRE METABOLITE [248]	256
ABBILDUNG 5-10 EINFLUSS VON NATRIUMSALICYLAT AUF DIE MHK VON CIPROFLOXACIN	262
ABBILDUNG 5-11 MÖGLICHER MECHANISMUS DER ES MII Δ <i>ICD</i> 7 BP PHPNE19-02.1 ERLAUBT AUCH IN UMGEBUNGEN MIT HOHEN FLUORCHINOLON-KONZENTRATIONEN ZU ÜBERLEBEN, EIGENE DARSTELLUNG, MODIFIZIERT NACH [34], [248], [257], [294], [327]	274
ABBILDUNG 15-1 AGAROSEGEL <i>MARR</i> -PCR FÜR WT-KLONE	319
ABBILDUNG 15-2 AGAROSEGEL DER <i>MARR</i> -PCR FÜR WT PHPNE19-02.1 NR. 1 I 2.....	320
ABBILDUNG 15-3 AGAROSEGEL <i>MARR</i> -PCR FÜR WT-K	321
ABBILDUNG 15-4 GELBILD 1 AGAROSEGELELEKTROPHORESE NACH VERDAU MIT SAU3A1 (FASTDIGEST).....	323
ABBILDUNG 15-5 GELBILD 2 AGAROSEGELELEKTROPHORESE NACH VERDAU MIT SAU3A1 FD	324
ABBILDUNG 15-6 GELBILD 3 AGAROSEGELELEKTROPHORESE NACH VERDAU MIT SAU3A1 FD	325
ABBILDUNG 15-7 GELBILD 4 AGAROSEGELELEKTROPHORESE NACH VERDAU MIT SAU3A1 FD	326
ABBILDUNG 15-8 GELBILD 5 AGAROSEGELELEKTROPHORESE NACH VERDAU MIT SAU3A1 FD	327
TABELLE 15-7 ABBILDUNG 15-9 ERGEBNISSE DER SEQUENZANALYSE FÜR <i>PARC</i> DER WT-MUTANTEN	329

14 Literaturverzeichnis

- [1] „Publikation - Bevölkerung - Bevölkerung Deutschlands bis 2060 - 13. koordinierte Bevölkerungsvorausberechnung - Statistisches Bundesamt (Destatis)“. [Online]. Verfügbar unter: <https://www.destatis.de/DE/Publikationen/Thematisch/Bevoelkerung/VorausberechnungBevoelkerung/BevoelkerungDeutschland2060Presse.html;jsessionid=47C652008E6F94DAEED153DCB257CC88.cae1>. [Zugegriffen: 24-Apr-2016].
- [2] L. Klöckner und J. Lubbaddeh, „Antibiotika: Soll ich, oder soll ich nicht?“, *Die Zeit*, Hamburg, 05-Apr-2016.
- [3] W. Scientific, *Nobel Lectures, Physiology Or Medicine, 1942-1962*, Bd. 3. World Scientific, 1999.
- [4] S. A. Waksman und J. E. Flynn, „History of the word ‚antibiotic‘“, *J. Hist. Med. Allied Sci.*, Bd. 28, Nr. 3, S. 284–286, Juli 1973.
- [5] J. Davies und D. Davies, „Origins and Evolution of Antibiotic Resistance“, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, Bd. 74, Nr. 3, S. 417–433, Jan. 2010.
- [6] B. G. Hall und M. Barlow, „Evolution of the serine beta-lactamases: past, present and future“, *Drug Resist. Updat. Rev. Comment. Antimicrob. Anticancer Chemother.*, Bd. 7, Nr. 2, S. 111–123, Apr. 2004.
- [7] C. P. Miller und M. Bohnhoff, „Two Streptomycin-resistant Variants of Meningococcus“, *J. Bacteriol.*, Bd. 54, Nr. 4, S. 467–481, Okt. 1947.
- [8] R. H. Baltz, „Antibiotic discovery from actinomycetes: will a renaissance follow the decline and fall?“, *SIMB News*, Nr. 55, S. 186–196, 2005.
- [9] T. J. Dougherty und M. J. Pucci, *Antibiotic Discovery and Development*. Springer Science & Business Media, 2011.
- [10] E. J. L. Lowbury und L. Hurst, „THE SENSITIVITY OF STAPHYLOCOCCI AND OTHER WOUND BACTERIA TO ERYTHROMYCIN, OLEANDOMYCIN, AND SPIRAMYCIN“, *J. Clin. Pathol.*, Bd. 12, Nr. 2, S. 163–169, März 1959.
- [11] M. C. Enright, D. A. Robinson, G. Randle, E. J. Feil, H. Grundmann, und B. G. Spratt, „The evolutionary history of methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA)“, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, Bd. 99, Nr. 11, S. 7687–7692, Mai 2002.
- [12] T. M. Cook, W. A. Goss, und W. H. Deitz, „Mechanism of Action of Nalidixic Acid on Escherichia coli V. Possible Mutagenic Effect“, *J. Bacteriol.*, Bd. 91, Nr. 2, S. 780–783, Feb. 1966.
- [13] L. B. Rice, „Emergence of vancomycin-resistant enterococci.“, *Emerg. Infect. Dis.*, Bd. 7, Nr. 2, S. 183–187, 2001.
- [14] G. D. Wright, „The antibiotic resistome: the nexus of chemical and genetic diversity“, *Nat. Rev. Microbiol.*, Bd. 5, Nr. 3, S. 175–186, Jan. 2007.
- [15] P. Heisig, „Bakterielle Resistenz gegenüber Chinolonen (Ciprofloxacin)“, *ChemotherapieJournal*, Bd. 3, Nr. 1999, 1999.
- [16] K. S. Long und B. Vester, „Resistance to Linezolid Caused by Modifications at Its Binding Site on the Ribosome“, *Antimicrob. Agents Chemother.*, Bd. 56, Nr. 2, S. 603–612, Feb. 2012.
- [17] M. K. Hayden, K. Rezai, R. A. Hayes, K. Lolans, J. P. Quinn, und R. A. Weinstein, „Development of Daptomycin Resistance In Vivo in Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus“, *J. Clin. Microbiol.*, Bd. 43, Nr. 10, S. 5285–5287, Okt. 2005.
- [18] N.-C. Emrich, „Molekulare Grundlagen der Entstehung der Variante AAC(6′)-Ib-cr und deren Bedeutung für die Aktivität von Fluorchinolonen im Vergleich zu anderen plasmidkodierten und chromosomalen Fluorchinolonen-Resistenzmechanismen“, 2012.
- [19] C. M. Waters und B. L. Bassler, „Quorum sensing: cell-to-cell communication in bacteria“, *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, Bd. 21, S. 319–346, 2005.
- [20] P. Williams, „Quorum sensing, communication and cross-kingdom signalling in the bacterial world“, *Microbiology*, Bd. 153, Nr. 12, S. 3923–3938, Dez. 2007.
- [21] „Annual antimicrobial resistance surveillance reports“. [Online]. Verfügbar unter: http://ecdc.europa.eu/en/publications/surveillance_reports/arhai/Pages/annual-antimicrobial-resistance-surveillance-report.aspx. [Zugegriffen: 24-Apr-2016].
- [22] „EUCAST: Clinical breakpoints“. [Online]. Verfügbar unter: http://www.eucast.org/clinical_breakpoints/. [Zugegriffen: 25-Mai-2015].
- [23] „EUCAST v_5.0_Breakpoint_Table_01.pdf“. [Online]. Verfügbar unter: http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Breakpoint_tables/v_5.0_Breakpoint_Table_01.pdf. [Zugegriffen: 25-Mai-2015].
- [24] „EUCAST Clinical Breakpoint Tables v. 6.0, valid from 2016-01-01“. [Online]. Verfügbar unter: http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Breakpoint_tables/v_6.0_Breakpoint_table.pdf. [Zugegriffen: 23-Feb-2016].
- [25] T. Dingermann, E. Reinhard, und Dingermann-Kreis-Rimpler-Zündorf, Hrsg., *Reinhard Pharmazeutische Biologie: Grundlagen für Studium und Praxis ; 97 Tabellen, 7., Völlig neu bearb. und erw. Aufl.* Stuttgart: Wiss. Verl.-Ges, 2009.
- [26] J. B. Kaper, J. P. Nataro, und H. L. T. Mobley, „Pathogenic Escherichia coli“, *Nat. Rev. Microbiol.*, Bd. 2, Nr. 2, S. 123–140, Feb. 2004.
- [27] Marco Petschulies, „Der Einfluss des Mutatorgens dnaQ auf die Resistenzentwicklung gegen Fluorchinolone bei Escherichia coli - Petschulies, Marco“, 2014.

- [28] F. H. Kayser, Hrsg., *Taschenlehrbuch Medizinische Mikrobiologie: [Hygiene, Immunologie, Bakteriologie, Virologie, Mykologie, Parasitologie, Infektiologie]*, 13., Vollst. überarb. und erw. Aufl. Stuttgart: Thieme, 2014.
- [29] „Ausbrüche von Infektionen mit E.coli O104:H4“, 24-Nov-2015. [Online]. Verfügbar unter: <http://www.euro.who.int/de/health-topics/disease-prevention/food-safety/outbreaks-of-e.-coli-o104h4-infection>. [Zugegriffen: 24-Nov-2015].
- [30] G. C. Schito *et al.*, „The ARES study: an international survey on the antimicrobial resistance of pathogens involved in uncomplicated urinary tract infections“, *Int. J. Antimicrob. Agents*, Bd. 34, Nr. 5, S. 407–413, Nov. 2009.
- [31] F. M. Wagenlehner *et al.*, „Epidemiologie, Diagnostik, Therapie und Management unkomplizierter bakterieller ambulant erworbener Harnwegsinfektionen bei erwachsenen Patienten“, *S3-Leitlin. AWMF-Regist.*, Nr. 043/044, 2010.
- [32] D. M. Drekonja und J. R. Johnson, „Urinary Tract Infections“, *Prim. Care Clin. Off. Pract.*, Bd. 35, Nr. 2, S. 345–367, Juni 2008.
- [33] L. J. V. Piddock, „Multidrug-resistance efflux pumps — not just for resistance“, *Nat. Rev. Microbiol.*, Bd. 4, Nr. 8, S. 629–636, Aug. 2006.
- [34] R. B. Helling *et al.*, „Toxic Waste Disposal in Escherichia coli“, *J. Bacteriol.*, Bd. 184, Nr. 13, S. 3699–3703, Jan. 2002.
- [35] M. Malléa *et al.*, „Alkylaminoquinolines inhibit the bacterial antibiotic efflux pump in multidrug-resistant clinical isolates“, *Biochem. J.*, Bd. 376, Nr. Pt 3, S. 801–805, Dez. 2003.
- [36] H. Venter, R. Mowla, T. Ohene-Agyei, und S. Ma, „RND-type drug efflux pumps from Gram-negative bacteria: molecular mechanism and inhibition“, *Front. Microbiol.*, Bd. 6, Apr. 2015.
- [37] X.-Z. Li, P. Plésiat, und H. Nikaido, „The challenge of efflux-mediated antibiotic resistance in Gram-negative bacteria“, *Clin. Microbiol. Rev.*, Bd. 28, Nr. 2, S. 337–418, Apr. 2015.
- [38] D. H. Nies, „Efflux-mediated heavy metal resistance in prokaryotes“, *FEMS Microbiol. Rev.*, Bd. 27, Nr. 2–3, S. 313–339, Juni 2003.
- [39] J. Anes, M. P. McCusker, S. Fanning, und M. Martins, „The ins and outs of RND efflux pumps in Escherichia coli“, *Antimicrob. Resist. Chemother.*, S. 587, 2015.
- [40] H. Wang, J. L. Dzink-Fox, M. Chen, und S. B. Levy, „Genetic Characterization of Highly Fluoroquinolone-Resistant Clinical Escherichia coli Strains from China: Role of *acrR* Mutations“, *Antimicrob. Agents Chemother.*, Bd. 45, Nr. 5, S. 1515–1521, Mai 2001.
- [41] H. Hirakawa, A. Takumi-Kobayashi, U. Theisen, T. Hirata, K. Nishino, und A. Yamaguchi, „AcrS/EnvR Represses Expression of the *acrAB* Multidrug Efflux Genes in Escherichia coli“, *J. Bacteriol.*, Bd. 190, Nr. 18, S. 6276–6279, Sep. 2008.
- [42] Y. Wei, J.-M. Lee, D. R. Smulski, und R. A. LaRossa, „Global Impact of *sdiA* Amplification Revealed by Comprehensive Gene Expression Profiling of Escherichia coli“, *J. Bacteriol.*, Bd. 183, Nr. 7, S. 2265–2272, Apr. 2001.
- [43] J. A. Fralick, „Evidence that TolC is required for functioning of the Mar/AcrAB efflux pump of Escherichia coli“, *J. Bacteriol.*, Bd. 178, Nr. 19, S. 5803–5805, Okt. 1996.
- [44] D. C. Hooper und G. A. Jacoby, „Mechanisms of drug resistance: quinolone resistance: Mechanisms of quinolone resistance“, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, Bd. 1354, Nr. 1, S. 12–31, Sep. 2015.
- [45] K. W. Jair *et al.*, „Transcriptional activation of promoters of the superoxide and multiple antibiotic resistance regulons by Rob, a binding protein of the Escherichia coli origin of chromosomal replication“, *J. Bacteriol.*, Bd. 178, Nr. 9, S. 2507–2513, Mai 1996.
- [46] D. M. Warner und S. B. Levy, „Different effects of transcriptional regulators MarA, SoxS and Rob on susceptibility of Escherichia coli to cationic antimicrobial peptides (CAMPs): Rob-dependent CAMP induction of the *marRAB* operon“, *Microbiol. Read. Engl.*, Bd. 156, Nr. Pt 2, S. 570–578, Feb. 2010.
- [47] D. Du *et al.*, „Structure of the AcrAB-TolC multidrug efflux pump“, *Nature*, Bd. 509, Nr. 7501, S. 512–515, Mai 2014.
- [48] H. I. Zgurskaya, G. Krishnamoorthy, A. Ntreh, und S. Lu, „Mechanism and Function of the Outer Membrane Channel TolC in Multidrug Resistance and Physiology of Enterobacteria“, *Front. Microbiol.*, Bd. 2, Sep. 2011.
- [49] E. B. Tikhonova, Y. Yamada, und H. I. Zgurskaya, „Sequential mechanism of assembly of multidrug efflux pump AcrAB-TolC“, *Chem. Biol.*, Bd. 18, Nr. 4, S. 454–463, Apr. 2011.
- [50] E. W. Yu, J. R. Aires, G. McDermott, und H. Nikaido, „A periplasmic drug-binding site of the AcrB multidrug efflux pump: a crystallographic and site-directed mutagenesis study“, *J. Bacteriol.*, Bd. 187, Nr. 19, S. 6804–6815, Okt. 2005.
- [51] E. W. Yu, J. R. Aires, und H. Nikaido, „AcrB Multidrug Efflux Pump of Escherichia coli: Composite Substrate-Binding Cavity of Exceptional Flexibility Generates Its Extremely Wide Substrate Specificity“, *J. Bacteriol.*, Bd. 185, Nr. 19, S. 5657–5664, Okt. 2003.
- [52] X.-Z. Li und H. Nikaido, „Efflux-Mediated Drug Resistance in Bacteria: an Update“, *Drugs*, Bd. 69, Nr. 12, S. 1555–1623, Aug. 2009.

- [53] S. Murakami, R. Nakashima, E. Yamashita, und A. Yamaguchi, „Crystal structure of bacterial multidrug efflux transporter AcrB“, *Nature*, Bd. 419, Nr. 6907, S. 587–593, Okt. 2002.
- [54] F. Husain und H. Nikaido, „Substrate path in the AcrB multidrug efflux pump of *Escherichia coli*“, *Mol. Microbiol.*, Bd. 78, Nr. 2, S. 320–330, Okt. 2010.
- [55] K. Nishino und A. Yamaguchi, „Analysis of a Complete Library of Putative Drug Transporter Genes in *Escherichia coli*“, *J. Bacteriol.*, Bd. 183, Nr. 20, S. 5803–5812, Okt. 2001.
- [56] S. Y. Lau und H. I. Zgurskaya, „Cell division defects in *Escherichia coli* deficient in the multidrug efflux transporter AcrEF-TolC“, *J. Bacteriol.*, Bd. 187, Nr. 22, S. 7815–7825, Nov. 2005.
- [57] R. Misra, K. D. Morrison, H. J. Cho, und T. Khuu, „Importance of Real-Time Assays To Distinguish Multi-drug Efflux Pump-Inhibiting and Outer Membrane-Destabilizing Activities in *Escherichia coli*“, *J. Bacteriol.*, Bd. 197, Nr. 15, S. 2479–2488, Aug. 2015.
- [58] K. Kobayashi, N. Tsukagoshi, und R. Aono, „Suppression of hypersensitivity of *Escherichia coli* acrB mutant to organic solvents by integrational activation of the acrEF operon with the IS1 or IS2 element“, *J. Bacteriol.*, Bd. 183, Nr. 8, S. 2646–2653, Apr. 2001.
- [59] A. S. Jellen-Ritter und W. V. Kern, „Enhanced expression of the multidrug efflux pumps AcrAB and AcrEF associated with insertion element transposition in *Escherichia coli* mutants Selected with a fluoroquinolone“, *Antimicrob. Agents Chemother.*, Bd. 45, Nr. 5, S. 1467–1472, Mai 2001.
- [60] K. Kawamura-Sato, K. Shibayama, T. Horii, Y. Iimura, Y. Arakawa, und M. Ohta, „Role of multiple efflux pumps in *Escherichia coli* in indole expulsion“, *FEMS Microbiol. Lett.*, Bd. 179, Nr. 2, S. 345–352, Okt. 1999.
- [61] M. B. Miller und B. L. Bassler, „Quorum sensing in bacteria“, *Annu. Rev. Microbiol.*, Bd. 55, S. 165–199, 2001.
- [62] S. Yang, C. R. Lopez, und E. L. Zechiedrich, „Quorum sensing and multidrug transporters in *Escherichiacoli*“, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, Bd. 103, Nr. 7, S. 2386–2391, 2006.
- [63] J. E. González und M. M. Marketon, „Quorum Sensing in Nitrogen-Fixing Rhizobia“, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, Bd. 67, Nr. 4, S. 574–592, Jan. 2003.
- [64] Y. Yao, M. A. Martinez-Yamout, T. J. Dickerson, A. P. Brogan, P. E. Wright, und H. J. Dyson, „Structure of the *Escherichia coli* Quorum Sensing Protein SdiA: Activation of the Folding Switch by Acyl Homoserine Lactones“, *J. Mol. Biol.*, Bd. 355, Nr. 2, S. 262–273, Jan. 2006.
- [65] J. L. Smith, P. M. Fratamico, und X. Yan, „Eavesdropping by bacteria: the role of SdiA in *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* serovar Typhimurium quorum sensing“, *Foodborne Pathog. Dis.*, Bd. 8, Nr. 2, S. 169–178, Feb. 2011.
- [66] X. D. Wang, P. A. de Boer, und L. I. Rothfield, „A factor that positively regulates cell division by activating transcription of the major cluster of essential cell division genes of *Escherichia coli*“, *EMBO J.*, Bd. 10, Nr. 11, S. 3363–3372, Nov. 1991.
- [67] R. J. Case, M. Labbate, und S. Kjelleberg, „AHL-driven quorum-sensing circuits: their frequency and function among the Proteobacteria“, *ISME J.*, Bd. 2, Nr. 4, S. 345–349, Feb. 2008.
- [68] M. M. Tavio, V. D. Aquili, J. B. Poveda, N. T. Antunes, J. Sanchez-Cespedes, und J. Vila, „Quorum-sensing regulator sdiA and marA overexpression is involved in in vitro-selected multidrug resistance of *Escherichia coli*“, *J. Antimicrob. Chemother.*, Bd. 65, Nr. 6, S. 1178–1186, Juni 2010.
- [69] S. Rahmati, S. Yang, A. L. Davidson, und E. L. Zechiedrich, „Control of the AcrAB multidrug efflux pump by quorum-sensing regulator SdiA“, *Mol. Microbiol.*, Bd. 43, Nr. 3, S. 677–685, Feb. 2002.
- [70] K. Suzuki *u. a.*, „Regulatory Circuitry of the CsrA/CsrB and BarA/UvrY Systems of *Escherichia coli*“, *J. Bacteriol.*, Bd. 184, Nr. 18, S. 5130–5140, Sep. 2002.
- [71] R. Houdt, A. Aertsen, P. Moons, K. Vanoirbeek, und C. W. Michiels, „N-acyl-l-homoserine lactone signal interception by *Escherichia coli*“, *FEMS Microbiol. Lett.*, Bd. 256, Nr. 1, S. 83–89, März 2006.
- [72] J. Lee, T. Maeda, S. H. Hong, und T. K. Wood, „Reconfiguring the quorum-sensing regulator SdiA of *Escherichia coli* to control biofilm formation via indole and N-acylhomoserine lactones“, *Appl. Environ. Microbiol.*, Bd. 75, Nr. 6, S. 1703–1716, März 2009.
- [73] J. Lee, A. Jayaraman, und T. K. Wood, „Indole is an inter-species biofilm signal mediated by SdiA“, *BMC Microbiol.*, Bd. 7, S. 42, 2007.
- [74] J. Lee, X.-S. Zhang, M. Hegde, W. E. Bentley, A. Jayaraman, und T. K. Wood, „Indole cell signaling occurs primarily at low temperatures in *Escherichia coli*“, *ISME J.*, Bd. 2, Nr. 10, S. 1007–1023, Okt. 2008.
- [75] K. Nishino, E. Nikaido, und A. Yamaguchi, „Regulation and physiological function of multidrug efflux pumps in *Escherichia coli* and *Salmonella*“, *Biochim. Biophys. Acta*, Bd. 1794, Nr. 5, S. 834–843, Mai 2009.
- [76] P. M. Hawkey, „Mechanisms of quinolone action and microbial response“, *J. Antimicrob. Chemother.*, Bd. 51, Nr. 90001, S. 29–35, Mai 2003.
- [77] D. Steinhilber, M. Schubert-Zsilavec, und H. J. Roth, *Medizinische Chemie. Targets und Arzneistoffe*, 1., Aufl. Deutscher Apotheker Verlag, 2005.
- [78] J. J. Champoux, „DNA topoisomerases: structure, function, and mechanism“, *Annu. Rev. Biochem.*, Bd. 70, S. 369–413, 2001.
- [79] J. C. Wang, „Cellular roles of DNA topoisomerases: a molecular perspective“, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, Bd. 3, Nr. 6, S. 430–440, Juni 2002.

- [80] J. D. Watson und F. H. C. Crick, „Molecular Structure of Nucleic Acids: A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid“, *Nature*, Bd. 171, Nr. 4356, S. 737–738, Apr. 1953.
- [81] B. Wiedemann und P. Heisig, „Mechanisms of quinolone resistance“, *Infection*, Bd. 22 Suppl 2, S. S73-79, 1994.
- [82] C. Levine, H. Hiasa, und K. J. Marians, „DNA gyrase and topoisomerase IV: biochemical activities, physiological roles during chromosome replication, and drug sensitivities“, *Biochim. Biophys. Acta*, Bd. 1400, Nr. 1–3, S. 29–43, Okt. 1998.
- [83] Y. Pommier, E. Leo, H. Zhang, und C. Marchand, „DNA topoisomerases and their poisoning by anticancer and antibacterial drugs“, *Chem. Biol.*, Bd. 17, Nr. 5, S. 421–433, Mai 2010.
- [84] K. J. Aldred, R. J. Kerns, und N. Osheroff, „Mechanism of Quinolone Action and Resistance“, *Biochemistry (Mosc.)*, Bd. 53, Nr. 10, S. 1565–1574, März 2014.
- [85] „DNA-Topoisomerasen - Lexikon der Biologie“. [Online]. Verfügbar unter: <http://www.spektrum.de/lexikon/biologie/dna-topoisomerasen/18870>. [Zugegriffen: 05-Nov-2015].
- [86] L. Aravind, D. D. Leipe, und E. V. Koonin, „Toprim—a conserved catalytic domain in type IA and II topoisomerases, DnaG-type primases, OLD family nucleases and RecR proteins“, *Nucleic Acids Res.*, Bd. 26, Nr. 18, S. 4205–4213, Sep. 1998.
- [87] K. D. Corbett, R. K. Shultzaberger, und J. M. Berger, „The C-terminal domain of DNA gyrase A adopts a DNA-bending beta-pinwheel fold“, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, Bd. 101, Nr. 19, S. 7293–7298, Mai 2004.
- [88] E. M. Tretter und J. M. Berger, „Mechanisms for defining supercoiling set point of DNA gyrase orthologs: II. The shape of the GyrA subunit C-terminal domain (CTD) is not a sole determinant for controlling supercoiling efficiency“, *J. Biol. Chem.*, Bd. 287, Nr. 22, S. 18645–18654, Mai 2012.
- [89] E. M. Tretter und J. M. Berger, „Mechanisms for defining supercoiling set point of DNA gyrase orthologs: I. A nonconserved acidic C-terminal tail modulates *Escherichia coli* gyrase activity“, *J. Biol. Chem.*, Bd. 287, Nr. 22, S. 18636–18644, Mai 2012.
- [90] J. E. Deweese und N. Osheroff, „The DNA cleavage reaction of topoisomerase II: wolf in sheep’s clothing“, *Nucleic Acids Res.*, Bd. 37, Nr. 3, S. 738–748, Feb. 2009.
- [91] „Chegg.com“. [Online]. Verfügbar unter: <https://www.chegg.com/homework-help/definitions/bacterial-dna-replication-and-cell-division-14>. [Zugegriffen: 05-Nov-2015].
- [92] J. Kato, Y. Nishimura, R. Imamura, H. Niki, S. Hiraga, und H. Suzuki, „New topoisomerase essential for chromosome segregation in *E. coli*“, *Cell*, Bd. 63, Nr. 2, S. 393–404, Okt. 1990.
- [93] A. D. Bates, J. M. Berger, und A. Maxwell, „The ancestral role of ATP hydrolysis in type II topoisomerases: prevention of DNA double-strand breaks“, *Nucleic Acids Res.*, Bd. 39, Nr. 15, S. 6327–6339, Aug. 2011.
- [94] G. Y. Leshner, E. J. Froelich, M. D. Gruett, J. H. Bailey, und R. P. Brundage, „1,8-NAPHTHYRIDINE DERIVATIVES. A NEW CLASS OF CHEMOTHERAPEUTIC AGENTS“, *J. Med. Pharm. Chem.*, Bd. 91, S. 1063–1065, Sep. 1962.
- [95] K. J. Aldred, S. A. McPherson, C. L. Turnbough, R. J. Kerns, und N. Osheroff, „Topoisomerase IV-quinolone interactions are mediated through a water-metal ion bridge: mechanistic basis of quinolone resistance“, *Nucleic Acids Res.*, Bd. 41, Nr. 8, S. 4628–4639, Apr. 2013.
- [96] Shabeel, „From anti-malarial to antibacterial“, 01-Apr-2010.
- [97] K. A. V. Cartwright, „Fifty years of antimicrobials: Past perspectives and future trends“, *Epidemiol. Infect.*, Bd. 116, Nr. 3, S. 381–382, Juni 1996.
- [98] C. M. Oliphant und G. M. Green, „Quinolones: A Comprehensive Review - American Family Physician“, 01-Feb-2002. [Online]. Verfügbar unter: <http://www.aafp.org/afp/2002/0201/p455.html>. [Zugegriffen: 28-Okt-2015].
- [99] K. G. Naber und D. Adam, „Classification of fluoroquinolones“, *Int. J. Antimicrob. Agents*, Bd. 10, Nr. 4, S. 255–257, Nov. 1998.
- [100] S. J. Childs, „Safety of the Fluoroquinolone Antibiotics“, *Medscape*. [Online]. Verfügbar unter: <http://www.medscape.com/viewarticle/410202>. [Zugegriffen: 28-Okt-2015].
- [101] A. M. Emmerson und A. M. Jones, „The quinolones: decades of development and use“, *J. Antimicrob. Chemother.*, Bd. 51 Suppl 1, S. 13–20, Mai 2003.
- [102] R. Stahlmann und Dietrich Höffler, „Unerwünschte Wirkungen und Risiken von Fluorchinolonen“, *Deutsches Ärzteblatt*, Bd. Jahrgang 97, Nr. Heft 45, S. A 3022-A 3026, 10-Nov-2000.
- [103] Z. P. Qureshi, E. Seoane-Vazquez, R. Rodriguez-Monguio, K. B. Stevenson, und S. L. Szeinbach, „Market withdrawal of new molecular entities approved in the United States from 1980 to 2009“, *Pharmacoepidemiol. Drug Saf.*, Bd. 20, Nr. 7, S. 772–777, Juli 2011.
- [104] M. I. Andersson und A. P. MacGowan, „Development of the quinolones“, *J. Antimicrob. Chemother.*, Bd. 51 Suppl 1, S. 1–11, Mai 2003.
- [105] P. Ball, „Moxifloxacin (Avelox): an 8-methoxyquinolone antibacterial with enhanced potency“, *Int. J. Clin. Pract.*, Bd. 54, Nr. 5, S. 329–332, Juni 2000.
- [106] V. E. Anderson und N. Osheroff, „Type II topoisomerases as targets for quinolone antibacterials: turning Dr. Jekyll into Mr. Hyde“, *Curr. Pharm. Des.*, Bd. 7, Nr. 5, S. 337–353, März 2001.
- [107] K. Drlica, M. Malik, R. J. Kerns, und X. Zhao, „Quinolone-Mediated Bacterial Death“, *Antimicrob Agents Chemother*, Bd. 52, Nr. 2, S. 385–392, Feb. 2008.

- [108] A. Mustaev *u. a.*, „Fluoroquinolone-gyrase-DNA complexes: two modes of drug binding“, *J. Biol. Chem.*, Bd. 289, Nr. 18, S. 12300–12312, Mai 2014.
- [109] K. Drlica, H. Hiasa, R. Kerns, M. Malik, A. Mustaev, und X. Zhao, „Quinolones: Action and Resistance Updated“, *Curr. Top. Med. Chem.*, Bd. 9, Nr. 11, S. 981–998, Aug. 2009.
- [110] D. C. Hooper, „Mechanisms of fluoroquinolone resistance“, *Drug Resist. Updat. Rev. Comment. Antimicrob. Anticancer Chemother.*, Bd. 2, Nr. 1, S. 38–55, Feb. 1999.
- [111] „Mandell, Douglas, and Bennett’s Principles and Practice of Infectious Diseases 7th edition - ISBN: 9780443068393 | US Elsevier Health Bookshop“. [Online]. Verfügbar unter: <http://www.us.elsevier-health.com/infectious-disease/mandell-douglas-and-bennett-principles-and-practice-of-infectious-diseases-expert-consult/9780443068393/>. [Zugegriffen: 28-Okt-2015].
- [112] „Pharmacokinetics and pharmacodynamics of fluoroquinolones. - PubMed - NCBI“. [Online]. Verfügbar unter: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10553702>. [Zugegriffen: 28-Okt-2015].
- [113] B. Fournier, X. Zhao, T. Lu, K. Drlica, und D. C. Hooper, „Selective targeting of topoisomerase IV and DNA gyrase in *Staphylococcus aureus*: different patterns of quinolone-induced inhibition of DNA synthesis“, *Antimicrob. Agents Chemother.*, Bd. 44, Nr. 8, S. 2160–2165, Aug. 2000.
- [114] X.-S. Pan und L. M. Fisher, „DNA Gyrase and Topoisomerase IV Are Dual Targets of Clinafloxacin Action in *Streptococcus pneumoniae*“, *Antimicrob. Agents Chemother.*, Bd. 42, Nr. 11, S. 2810–2816, Nov. 1998.
- [115] K. Mizuuchi, L. M. Fisher, M. H. O’Dea, und M. Gellert, „DNA gyrase action involves the introduction of transient double-strand breaks into DNA“, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, Bd. 77, Nr. 4, S. 1847–1851, Apr. 1980.
- [116] A. Morrison, N. P. Higgins, und N. R. Cozzarelli, „Interaction between DNA gyrase and its cleavage site on DNA“, *J Biol Chem*, Bd. 255, Nr. 221, S. 1, 1980.
- [117] K. J. Marians und H. Hiasa, „Mechanism of quinolone action. A drug-induced structural perturbation of the DNA precedes strand cleavage by topoisomerase IV“, *J. Biol. Chem.*, Bd. 272, Nr. 14, S. 9401–9409, Apr. 1997.
- [118] B. D. Bax *et al.*, „Type IIA topoisomerase inhibition by a new class of antibacterial agents“, *Nature*, Bd. 466, Nr. 7309, S. 935–940, Aug. 2010.
- [119] I. Laponogov *et al.*, „Structural insight into the quinolone-DNA cleavage complex of type IIA topoisomerases“, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, Bd. 16, Nr. 6, S. 667–669, Juni 2009.
- [120] I. Laponogov, X.-S. Pan, D. A. Veselkov, K. E. McAuley, L. M. Fisher, und M. R. Sanderson, „Structural basis of gate-DNA breakage and resealing by type II topoisomerases“, *PLoS One*, Bd. 5, Nr. 6, S. e11338, 2010.
- [121] M. Snyder und K. Drlica, „DNA gyrase on the bacterial chromosome: DNA cleavage induced by oxolinic acid“, *J. Mol. Biol.*, Bd. 131, Nr. 2, S. 287–302, Juni 1979.
- [122] L. A. Mitscher, „Bacterial topoisomerase inhibitors: quinolone and pyridone antibacterial agents“, *Chem. Rev.*, Bd. 105, Nr. 2, S. 559–592, Feb. 2005.
- [123] A. Sugino, C. L. Peebles, K. N. Kreuzer, und N. R. Cozzarelli, „Mechanism of action of nalidixic acid: purification of *Escherichia coli* nalA gene product and its relationship to DNA gyrase and a novel nicking-closing enzyme“, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, Bd. 74, Nr. 11, S. 4767–4771, Nov. 1977.
- [124] E. Leo *et al.*, „Novel symmetric and asymmetric DNA scission determinants for *Streptococcus pneumoniae* topoisomerase IV and gyrase are clustered at the DNA breakage site“, *J. Biol. Chem.*, Bd. 280, Nr. 14, S. 14252–14263, Apr. 2005.
- [125] S. M. Friedman, T. Lu, und K. Drlica, „Mutation in the DNA Gyrase A Gene of *Escherichia coli* That Expands the Quinolone Resistance-Determining Region“, *Antimicrob. Agents Chemother.*, Bd. 45, Nr. 8, S. 2378–2380, Aug. 2001.
- [126] E. Cambau, F. Bordon, E. Collatz, und L. Gutmann, „Novel gyrA point mutation in a strain of *Escherichia coli* resistant to fluoroquinolones but not to nalidixic acid“, *Antimicrob. Agents Chemother.*, Bd. 37, Nr. 6, S. 1247–1252, Juni 1993.
- [127] A. Wohlkonig *et al.*, „Structural basis of quinolone inhibition of type IIA topoisomerases and target-mediated resistance“, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, Bd. 17, Nr. 9, S. 1152–1153, Sep. 2010.
- [128] J. M. Blondeau, „New concepts in antimicrobial susceptibility testing: the mutant prevention concentration and mutant selection window approach“, *Vet. Dermatol.*, Bd. 20, Nr. 5–6, S. 383–396, Okt. 2009.
- [129] O. Nolte, „Relevance of MIC50 and MIC90 determination?“ [Online]. Verfügbar unter: http://www.researchgate.net/post/Relevance_of_MIC50_and_MIC90_determination. [Zugegriffen: 29-Okt-2015].
- [130] S. Bagel, V. Hüllen, B. Wiedemann, und P. Heisig, „Impact of gyrA and parCMutations on Quinolone Resistance, Doubling Time, and Supercoiling Degree of *Escherichia coli*“, *Antimicrob. Agents Chemother.*, Bd. 43, Nr. 4, S. 868–875, Jan. 1999.
- [131] G. A. Jacoby, „Mechanisms of resistance to quinolones“, *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.*, Bd. 41 Suppl 2, S. S120-126, Juli 2005.
- [132] K. Drlica und X. Zhao, „DNA gyrase, topoisomerase IV, and the 4-quinolones“, *Microbiol Mol Biol Rev*, Bd. 61, Nr. 3, S. 377–392, Sep. 1997.

- [133] I. Laponogov, D. A. Veselkov, I. M.-T. Crevel, X.-S. Pan, L. M. Fisher, und M. R. Sanderson, „Structure of an ‚open‘ clamp type II topoisomerase-DNA complex provides a mechanism for DNA capture and transport“, *Nucleic Acids Res.*, Bd. 41, Nr. 21, S. 9911–9923, Nov. 2013.
- [134] X.-S. Pan, K. A. Gould, und L. M. Fisher, „Probing the Differential Interactions of Quinazolinone PD 0305970 and Quinolones with Gyrase and Topoisomerase IV“, *Antimicrob. Agents Chemother.*, Bd. 53, Nr. 9, S. 3822–3831, Sep. 2009.
- [135] F. M. Barnard und A. Maxwell, „Interaction between DNA Gyrase and Quinolones: Effects of Alanine Mutations at GyrA Subunit Residues Ser83 and Asp87“, *Antimicrob. Agents Chemother.*, Bd. 45, Nr. 7, S. 1994–2000, Juli 2001.
- [136] J. Strahilevitz, G. A. Jacoby, D. C. Hooper, und A. Robicsek, „Plasmid-mediated quinolone resistance: a multifaceted threat“, *Clin. Microbiol. Rev.*, Bd. 22, Nr. 4, S. 664–689, Okt. 2009.
- [137] M. M. Tavío, J. Vila, J. Ruiz, J. Ruiz, A. M. Martín-Sánchez, und M. T. Jiménez de Anta, „Mechanisms involved in the development of resistance to fluoroquinolones in *Escherichia coli* isolates“, *J. Antimicrob. Chemother.*, Bd. 44, Nr. 6, S. 735–742, Dez. 1999.
- [138] S. P. Cohen, L. M. McMurry, D. C. Hooper, J. S. Wolfson, und S. B. Levy, „Cross-resistance to fluoroquinolones in multiple-antibiotic-resistant (Mar) *Escherichia coli* selected by tetracycline or chloramphenicol: decreased drug accumulation associated with membrane changes in addition to OmpF reduction.“, *Antimicrob. Agents Chemother.*, Bd. 33, Nr. 8, S. 1318–1325, Aug. 1989.
- [139] R. Kishii und M. Takei, „Relationship between the expression of ompF and quinolone resistance in *Escherichia coli*“, *J. Infect. Chemother. Off. J. Jpn. Soc. Chemother.*, Bd. 15, Nr. 6, S. 361–366, Dez. 2009.
- [140] M. Karczmarczyk, M. Martins, T. Quinn, N. Leonard, und S. Fanning, „Mechanisms of Fluoroquinolone Resistance in *Escherichia coli* Isolates from Food-Producing Animals“, *Appl. Environ. Microbiol.*, Bd. 77, Nr. 20, S. 7113–7120, Okt. 2011.
- [141] „Porine - Chemgapedia“. [Online]. Verfügbar unter: <http://www.chemgapedia.de/vsen-gine/vlu/vsc/de/ch/8/bc/vlu/transport/po-rine.vlu/Page/vsc/de/ch/8/bc/transport/po-rine1.vscml.html>. [Zugegriffen: 12-Nov-2015].
- [142] L. Martínez-Martínez, A. Pascual, und G. A. Jacoby, „Quinolone resistance from a transferable plasmid“, *Lancet*, Bd. 351, Nr. 9105, S. 797–799, März 1998.
- [143] L. Poirel, V. Cattoir, und P. Nordmann, „Is plasmid-mediated quinolone resistance a clinically significant problem?“, *Clin. Microbiol. Infect.*, Bd. 14, Nr. 4, S. 295–297, Apr. 2008.
- [144] J. D. Goldman, D. G. White, und S. B. Levy, „Multiple antibiotic resistance (mar) locus protects *Escherichia coli* from rapid cell killing by fluoroquinolones“, *Antimicrob. Agents Chemother.*, Bd. 40, Nr. 5, S. 1266–1269, Mai 1996.
- [145] M. N. Alekshun und S. B. Levy, „The mar regulon: multiple resistance to antibiotics and other toxic chemicals“, *Trends Microbiol.*, Bd. 7, Nr. 10, S. 410–413, Okt. 1999.
- [146] R. G. Martin, P. S. Nyantakyi, und J. L. Rosner, „Regulation of the multiple antibiotic resistance (mar) regulon by marORA sequences in *Escherichia coli*“, *J. Bacteriol.*, Bd. 177, Nr. 14, S. 4176–4178, Juli 1995.
- [147] S. Grkovic, M. H. Brown, und R. A. Skurray, „Regulation of Bacterial Drug Export Systems“. [Online]. Verfügbar unter: <http://mibr.asm.org>. [Zugegriffen: 11-Nov-2015].
- [148] N. Delahas und S. Forst, „MicF: an antisense RNA gene involved in response of *Escherichia coli* to global stress factors“, *J. Mol. Biol.*, Bd. 313, Nr. 1, S. 1–12, Okt. 2001.
- [149] A. Robicsek *et al.*, „Fluoroquinolone-modifying enzyme: a new adaptation of a common aminoglycoside acetyltransferase“, *Nat. Med.*, Bd. 12, Nr. 1, S. 83–88, Jan. 2006.
- [150] L. H. Hansen, L. B. Jensen, H. I. Sørensen, und S. J. Sørensen, „Substrate specificity of the OqxAB multidrug resistance pump in *Escherichia coli* and selected enteric bacteria“, *J. Antimicrob. Chemother.*, Bd. 60, Nr. 1, S. 145–147, Juli 2007.
- [151] K. Yamane *et al.*, „New Plasmid-Mediated Fluoroquinolone Efflux Pump, QepA, Found in an *Escherichia coli* Clinical Isolate“, *Antimicrob. Agents Chemother.*, Bd. 51, Nr. 9, S. 3354–3360, Sep. 2007.
- [152] M. W. Vetting, C. H. Park, S. S. Hegde, G. A. Jacoby, D. C. Hooper, und J. S. Blanchard, „Mechanistic and Structural Analysis of Aminoglycoside N-Acetyltransferase AAC(6′)-Ib and Its Bifunctional, Fluoroquinolone-Active AAC(6′)-Ib-cr Variant“, *Biochemistry (Mosc.)*, Bd. 47, Nr. 37, S. 9825–9835, Sep. 2008.
- [153] „Olaquinox - ein neuer Wachstumspromotor in der Tierernährung“. [Online]. Verfügbar unter: http://www.readcube.com/articles/10.1111%2Fj.1439-0396.1975.tb01140.x?r3_referer=wol&tracking_action=preview_click&show_checkout=1&purchase_referrer=onlinelibrary.wiley.com&purchase_site_license=LICENSE_DENIED_NO_CUSTOMER. [Zugegriffen: 16-Nov-2015].
- [154] A. H. Sørensen, L. H. Hansen, E. Johannesen, und S. J. Sørensen, „Conjugative Plasmid Conferring Resistance to Olaquinox“, *Antimicrob. Agents Chemother.*, Bd. 47, Nr. 2, S. 798–799, Feb. 2003.

- [155] M. Wang, J. H. Tran, G. A. Jacoby, Y. Zhang, F. Wang, und D. C. Hooper, „Plasmid-mediated quinolone resistance in clinical isolates of *Escherichia coli* from Shanghai, China“, *Antimicrob. Agents Chemother.*, Bd. 47, Nr. 7, S. 2242–2248, Juli 2003.
- [156] T. K. M. Cheung, „Plasmid-mediated resistance to ciprofloxacin and cefotaxime in clinical isolates of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis in Hong Kong“, *J. Antimicrob. Chemother.*, Bd. 56, Nr. 3, S. 586–589, Juli 2005.
- [157] J.-Y. Jeong u. a., „Detection of *qnr* in Clinical Isolates of *Escherichia coli* from Korea“, *Antimicrob. Agents Chemother.*, Bd. 49, Nr. 6, S. 2522–2524, Juni 2005.
- [158] D. Jonas, K. Biehler, D. Hartung, B. Spitzmüller, und F. D. Daschner, „Plasmid-Mediated Quinolone Resistance in Isolates Obtained in German Intensive Care Units“, *Antimicrob. Agents Chemother.*, Bd. 49, Nr. 2, S. 773–775, Jan. 2005.
- [159] H. Mammeri, M. Van De Loo, L. Poirel, L. Martinez-Martinez, und P. Nordmann, „Emergence of plasmid-mediated quinolone resistance in *Escherichia coli* in Europe“, *Antimicrob. Agents Chemother.*, Bd. 49, Nr. 1, S. 71–76, Jan. 2005.
- [160] É. L. Fonseca, F. dos Santos Freitas, V. V. Vieira, und A. C. Vicente, „New *qnr* gene cassettes associated with superintegron repeats in *Vibrio cholerae* O1“, *Emerg. Infect. Dis.*, Bd. 14, Nr. 7, S. 1129, 2008.
- [161] K. S. Park *et al.*, „Determination of Pentapeptide Repeat Units in Qnr Proteins by the Structure-Based Alignment Approach“, *Antimicrob. Agents Chemother.*, Bd. 55, Nr. 9, S. 4475–4478, Sep. 2011.
- [162] S. S. Hegde *et al.*, „A fluoroquinolone resistance protein from *Mycobacterium tuberculosis* that mimics DNA“, *Science*, Bd. 308, Nr. 5727, S. 1480–1483, Juni 2005.
- [163] C. Montero, G. Mateu, R. Rodriguez, und H. Takiff, „Intrinsic resistance of *Mycobacterium smegmatis* to fluoroquinolones may be influenced by new pentapeptide protein MfpA“, *Antimicrob. Agents Chemother.*, Bd. 45, Nr. 12, S. 3387–3392, Dez. 2001.
- [164] Q. Guo *et al.*, „A mutational analysis and molecular dynamics simulation of quinolone resistance proteins QnrA1 and QnrC from *Proteus mirabilis*“, *BMC Struct. Biol.*, Bd. 10, Nr. 1, S. 33, 2010.
- [165] S. Shah und J. G. Heddle, „Squaring up to DNA: pentapeptide repeat proteins and DNA mimicry“, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, Bd. 98, Nr. 23, S. 9545–9560, Dez. 2014.
- [166] G. A. Jacoby, M. A. Corcoran, D. M. Mills, C. M. Griffin, und D. C. Hooper, „Mutational Analysis of Quinolone Resistance Protein QnrB1“, *Antimicrob. Agents Chemother.*, Bd. 57, Nr. 11, S. 5733–5736, Jan. 2013.
- [167] P. Heisig und R. Tschorny, „Characterization of fluoroquinolone-resistant mutants of *Escherichia coli* selected in vitro“, *Antimicrob. Agents Chemother.*, Bd. 38, Nr. 6, S. 1284–1291, Juni 1994.
- [168] P. Heisig, „Genetic evidence for a role of *parC* mutations in development of high-level fluoroquinolone resistance in *Escherichia coli*.“, *Antimicrob. Agents Chemother.*, Bd. 40, Nr. 4, S. 879–885, Jan. 1996.
- [169] „SOS-System - Lexikon der Biologie“. [Online]. Verfügbar unter: <http://www.spektrum.de/lexikon/biologie/sos-system/62213>. [Zugegriffen: 04-Dez-2015].
- [170] M. Wang, D. F. Sahm, G. A. Jacoby, Y. Zhang, und D. C. Hooper, „Activities of Newer Quinolones against *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* Containing the Plasmid-Mediated Quinolone Resistance Determinant *qnr*“, *Antimicrob. Agents Chemother.*, Bd. 48, Nr. 4, S. 1400–1401, Apr. 2004.
- [171] M. Wang, G. A. Jacoby, D. M. Mills, und D. C. Hooper, „SOS Regulation of *qnrB* Expression“, *Antimicrob. Agents Chemother.*, Bd. 53, Nr. 2, S. 821–823, Jan. 2009.
- [172] L. Martínez-Martínez, A. Pascual, I. García, J. Tran, und G. A. Jacoby, „Interaction of plasmid and host quinolone resistance“, *J. Antimicrob. Chemother.*, Bd. 51, Nr. 4, S. 1037–1039, Apr. 2003.
- [173] J. M. Rodríguez-Martínez, A. Briaies, C. Velasco, M. C. Conejo, L. Martínez-Martínez, und A. Pascual, „Mutational analysis of quinolone resistance in the plasmid-encoded pentapeptide repeat proteins QnrA, QnrB and QnrS“, *J. Antimicrob. Chemother.*, Bd. 63, Nr. 6, S. 1128–1134, Juni 2009.
- [174] M. M. Bradford, „A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding“, *Anal. Biochem.*, Bd. 72, Nr. 1–2, S. 248–254, Mai 1976.
- [175] H. C. Birnboim und J. Doly, „A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA“, *Nucleic Acids Res.*, Bd. 7, Nr. 6, S. 1513–1523, Nov. 1979.
- [176] K. Potrykus, G. Wegrzyn, und V. J. Hernandez, „Multiple mechanisms of transcription inhibition by ppGpp at the *λ*dap(R) promoter“, *J. Biol. Chem.*, Bd. 277, Nr. 46, S. 43785–43791, Nov. 2002.
- [177] K. F. Jensen, „The *Escherichia coli* K-12 ‚wild types‘ W3110 and MG1655 have an *rph* frameshift mutation that leads to pyrimidine starvation due to low *pyrE* expression levels“, *J. Bacteriol.*, Bd. 175, Nr. 11, S. 3401–3407, Juni 1993.
- [178] C. Yanisch-Perron, J. Vieira, und J. Messing, „Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors“, *Gene*, Bd. 33, Nr. 1, S. 103–119, 1985.
- [179] T. Baba u. a., „Construction of *Escherichia coli* K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: the Keio collection“, *Mol. Syst. Biol.*, Bd. 2, Nr. 1, Feb. 2006.

- [180] Barbara Körber-Irrgang, „Entwicklung zellulärer und molekularbiologischer Testsysteme zur Bestimmung der Aktivität von Fluorchinolonen auf Typ II-Topoisomerasen am Beispiel von Pradofloxacin – einem neuen C8-Cyanofluorchinolon“, Universität Hamburg, Hamburg, Deutschland, 2005.
- [181] N. Matthiessen, „Untersuchungen zur Expression und Regulation der AcrAB/- und AcrEF/TolC-Effluxpumpe in Hinblick auf Fluorchinolon-Resistenz in Escherichia coli - DissertationNinaMatthiessen.pdf“, Dissertation, Universität Hamburg, Hamburg, Deutschland, 2007.
- [182] K. A. Datsenko und B. L. Wanner, „One-step inactivation of chromosomal genes in Escherichia coli K-12 using PCR products“, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, Bd. 97, Nr. 12, S. 6640–6645, Juni 2000.
- [183] D. J. Lee *u. a.*, „Gene doctoring: a method for recombineering in laboratory and pathogenic Escherichia coli strains“, *BMC Microbiol.*, Bd. 9, Nr. 1, S. 252, Dez. 2009.
- [184] tom linder, „Reinkulturgewinnung - Mikrobiologisches Praktikum“, 31-Okt-2008. [Online]. Verfügbar unter: http://www.genstrom.net/public/biology/microbiology/microbiology_module/protocols/protokoll_d.html. [Zugegriffen: 21-Apr-2015].
- [185] D. A. Morrison, „Transformation in Escherichia coli: cryogenic preservation of competent cells.“, *J. Bacteriol.*, Bd. 132, Nr. 1, S. 349–351, Okt. 1977.
- [186] D. Hanahan, „Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids“, *J. Mol. Biol.*, Bd. 166, Nr. 4, S. 557–580, Juni 1983.
- [187] J. J. Sambrook und D. W. Russell, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Vol. 2*. CSHL Press, 2001.
- [188] McFARLAND J, „The nephelometer: aN instrument for estimating the number of bacteria in suspensions used for calculating the opsonic index and for vaccines.“, *J. Am. Med. Assoc.*, Bd. XLIX, Nr. 14, S. 1176–1178, Okt. 1907.
- [189] „RNA isolation User manual NucleoSpin® RNA NucleoSpin® RNA Mid“. 17-Juni-2015.
- [190] „(EN) - DNeasy Blood & Tissue Handbook - QI-AGEN“. [Online]. Verfügbar unter: <https://www.qiagen.com/de/resources/resourcedetail?id=6b09dfb8-6319-464d-996c-79e8c7045a50&lang=en>. [Zugegriffen: 03-Juli-2015].
- [191] „MasterPure- Complete DNA and RNA Purification Kit“. [Online]. Verfügbar unter: <http://www.epibio.com/applications/nucleic-acid-purification-extraction-kits/dna-purification-genomic/master-pure-complete-dna-and-rna-purification-kit>. [Zugegriffen: 08-Dez-2015].
- [192] „User Manual Hi Yield® Plasmid Mini DNA Isolierungskit | Süd-Laborbedarf“, 2012. [Online]. Verfügbar unter: <http://www.suedlabor.de/art/30-HYPD>. [Zugegriffen: 16-Mai-2015].
- [193] „NucleoSpin Gel and PCR Clean-up“. Macherey Nagel, Juli-2014.
- [194] R. K. Saiki *et al.*, „Primer-Directed Enzymatic Amplification of DNA with a Thermostable DNA Polymerase“, *Science*, Bd. 239, Nr. 4839, S. 487–491, Jan. 1988.
- [195] „biobook_dna_graphik_38.png (PNG-Grafik, 855 × 464 Pixel)“. [Online]. Verfügbar unter: http://media1.shmoop.com/images/biology/biobook_dna_graphik_38.png. [Zugegriffen: 15-Mai-2015].
- [196] „Gentechnische Methoden - Chemgapedia“. [Online]. Verfügbar unter: <http://www.chemgapedia.de/vsengine/vlu/vsc/de/ch/5/bc/gentechnik/methoden.vlu/Page/vsc/de/ch/5/bc/gentechnik/methoden/blotting/denhardt/denhardt.vscml.html>. [Zugegriffen: 09-Dez-2015].
- [197] C. R. Newton *et al.*, „Analysis of any point mutation in DNA. The amplification refractory mutation system (ARMS)“, *Nucleic Acids Res.*, Bd. 17, Nr. 7, S. 2503–2516, Apr. 1989.
- [198] „F1.large.jpg (JPEG-Grafik, 1280 × 970 Pixel) - Skaliert (71%)“. [Online]. Verfügbar unter: <http://nar.oxfordjournals.org/content/29/17/e88/F1.large.jpg>. [Zugegriffen: 15-Mai-2015].
- [199] R. M. Horton, „PCR-mediated recombination and mutagenesis: SOEing together tailor-made genes“, *Mol. Biotechnol.*, Bd. 3, Nr. 2, S. 93–99, Apr. 1995.
- [200] „Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit for RT-qPCR, with dsDNase - Thermo Fisher Scientific“. [Online]. Verfügbar unter: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/K1671>. [Zugegriffen: 28-Jan-2016].
- [201] E. M. Kroh, R. K. Parkin, P. S. Mitchell, und M. Tewari, „SYBR Green PCR Master ;Ox and SYBR Green RT-PCR Reagents Kit - Analysis of circulating microRNA biomarkers in plasma and serum using quantitative reverse transcription-PCR (qRT-PCR)“, *Methods*, Bd. 50, Nr. 4, S. 298–301, 2010.
- [202] M. W. Pfaffl, „A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR“, *Nucleic Acids Res.*, Bd. 29, Nr. 9, S. e45, Mai 2001.
- [203] „DNA Gel Loading Dye (6X) - Life Technologies“. [Online]. Verfügbar unter: <https://www.lifetechnologies.com/order/catalog/product/R0611>. [Zugegriffen: 16-Mai-2015].
- [204] „Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus“, *Wikipedia*. 18-Aug-2016.
- [205] „recommendations-accurate-gel-quantification.pdf“. [Online]. Verfügbar unter: <https://www.lifetechnologies.com/content/dam/LifeTech/global/brands/Documents/1114/recommendations-accurate-gel-quantification.pdf>. [Zugegriffen: 21-Mai-2015].

- [206] „GeneRuler™ and O'GeneRuler™ DNA Ladders | Life Technologies“. [Online]. Verfügbar unter: <https://www.lifetechnologies.com/de/de/home/brands/thermo-scientific/molecular-biology/thermo-scientific-nucleic-acid-electrophoresis-purification/dna-electrophoresis-thermo-scientific/dna-ladders-thermo-scientific/generuler-dna-ladders.html>. [Zugegriffen: 21-Mai-2015].
- [207] Thermo Scientific, „NanoDrop 1000 User Manual“, *NanoDrop 1000 User Manual*. [Online]. Verfügbar unter: <http://www.nanodrop.com/Library/nd-1000-v3.8-users-manual-8%205x11.pdf>. [Zugegriffen: 21-Mai-2015].
- [208] „User Guide: Qubit dsDNA BR Assay Kits - Qubit_dsDNA_BR_Assay_UG.pdf“. [Online]. Verfügbar unter: https://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/manuals/Qubit_dsDNA_BR_Assay_UG.pdf. [Zugegriffen: 23-Mai-2015].
- [209] „Qubit 2.0 Fluorometer - qubit-2-fluorometer-user-manual.pdf“. [Online]. Verfügbar unter: <https://www.lifetechnologies.com/content/dam/Life-Tech/migration/en/filelibrary/cell-tissue-analysis/qubit-all-file-types.par.0519.file.dat/qubit-2-fluorometer-user-manual.pdf>. [Zugegriffen: 21-Mai-2015].
- [210] „Agilent 2100 Bioanalyzer User's Guide (without Security Package) - G2946-90004_Vespucci_UG_eBook_(NoSecPack).pdf“. [Online]. Verfügbar unter: [https://www.agilent.com/cs/library/usermanuals/Public/G2946-90004_Vespucci_UG_eBook_\(NoSecPack\).pdf](https://www.agilent.com/cs/library/usermanuals/Public/G2946-90004_Vespucci_UG_eBook_(NoSecPack).pdf). [Zugegriffen: 28-Jan-2016].
- [211] „Genomelab™ GeXP Genetic Analysis System - Beckman Coulter, Inc.“ [Online]. Verfügbar unter: https://www.beckmancoulter.com/wsrportal/wsrportal.portal?_nfpb=true&_windowLabel=UCM_RENDE-RER&_urlType=render&wlpUCM_RENDE-RER_path=%252Fwsr%252Fresearch-and-discovery%252Fproducts-and-services%252Fgenetic-analysis-systems%252Fgenomelab-gexp-genetic-analysis-system%252Fin-dex.htm#2/10/0/25/1/0/asc/2/A26572//0/1//0/%2Fwsrportal%2Fwsr%2Fresearch-and-discovery%2Fproducts-and-services%2Fgenetic-analysis-systems%2Fgenomelab-gexp-genetic-analysis-system%2Findex.htm/. [Zugegriffen: 01-Juli-2015].
- [212] F. Sanger, S. Nicklen, und A. R. Coulson, „DNA sequencing with chain-terminating inhibitors“, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, Bd. 74, Nr. 12, S. 5463–5467, Dez. 1977.
- [213] „Technology Overview“. [Online]. Verfügbar unter: <http://cgs.hku.hk/portal/index.php/pyrosequencing>. [Zugegriffen: 07-Dez-2015].
- [214] Biotage AB, „PSQ™ 96 Sample Preparation - cc2005379ae91ecd2309922894e55891.pdf“. 2002.
- [215] „Bioruptor® NGS (UCD-600): Watch the video | Diagenode“. [Online]. Verfügbar unter: <http://www.dia-genode.com/en/videos/vd-600.php>. [Zugegriffen: 08-Juli-2015].
- [216] „Epigenetics, DNA Methylation, Chromatin Shearing , Bioruptor Sonication, SX-8G IP Star | Diagenode.com“. [Online]. Verfügbar unter: <http://www.dia-genode.com/en/index.php>. [Zugegriffen: 08-Juli-2015].
- [217] „NEBNext® Fast DNA Library Prep Set for Ion Torrent™ | NEB“. [Online]. Verfügbar unter: <https://www.neb.com/products/e6270-nebnext-fast-dna-library-prep-set-for-ion-torrent>. [Zugegriffen: 08-Juli-2015].
- [218] „Home | Integrative Genomics Viewer“. [Online]. Verfügbar unter: <https://www.broadinstitute.org/igv/>. [Zugegriffen: 10-Juli-2015].
- [219] „Escherichia coli CFT073 (ID 167) - Genome - NCBI“. [Online]. Verfügbar unter: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/167?genome_assembly_id=161527. [Zugegriffen: 10-Juli-2015].
- [220] Doris Eisel, Oliver Seth, PH.D., Stefanie Grünwald-Janho, Bettina Kruchen, PH.D., und Barbara Rüger, PH.D., „DIG Application Manual for Filter Hybridization.indb - 05353149001_08.08.pdf“. Roche Diagnostics GmbH, 2008.
- [221] A. R. Poteete, „What makes the bacteriophage λ Red system useful for genetic engineering: molecular mechanism and biological function“, *FEMS Microbiol. Lett.*, Bd. 201, Nr. 1, S. 9–14, Juli 2001.
- [222] K. C. Murphy, „Use of Bacteriophage λ Recombination Functions To Promote Gene Replacement in Escherichia coli“, *J. Bacteriol.*, Bd. 180, Nr. 8, S. 2063–2071, Apr. 1998.
- [223] „Luciferase Assay System Protocol“. [Online]. Verfügbar unter: <https://www.promega.de/resources/protocols/technical-bulletins/0/luciferase-assay-system-protocol/>. [Zugegriffen: 16-Apr-2015].
- [224] M. Abu Mraheil, „Entwicklung eines molekularbiologischen Testsystems zum Nachweis von Inhibitoren bakterieller Topoisomerasen, deren Wirkung und des DNA- Superspiralisierungsgrades in vivo“, 2005.
- [225] B. Arntjen, „Der Einfluss von multiple antibiotic resistance (mar) Mutationen auf die Fitness fluorochinolon-resistenter Mutanten von Escherichia coli“, Shaker, Herzogenrath, 2011.
- [226] „sdiA quorum-sensing transcriptional activator [Escherichia coli str. K-12 substr. MG1655] - Gene - NCBI“. [Online]. Verfügbar unter: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/946421>. [Zugegriffen: 07-Dez-2015].
- [227] „PyroMark Supplementary Software - QIAGEN“. [Online]. Verfügbar unter: <https://www.qiagen.com/de/shop/automated-solutions/accessories/pyromark-supplementary-software/>. [Zugegriffen: 07-Dez-2015].

- [228] Roche Life Science, „PCR DIG Probe Synthesis Kit Cat. No. 11 636 090 910“. Roche Life Science, Okt-2011.
- [229] „FastDigest Dnal - Thermo Fisher Scientific“. [Online]. Verfügbar unter: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/FD0224>. [Zugegriffen: 09-Dez-2015].
- [230] „Escherichia coli str. K-12 substr. MG1655 (ID 167) - Genome - NCBI“. [Online]. Verfügbar unter: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/167?genome_assembly_id=161521. [Zugegriffen: 27-Jan-2016].
- [231] „Horizontale Maxigel-Elektrophorese | PerfectBlue Maxi ExW Revolution | Agarose-Gelkammer, Gelkammer, Elektrophoresekammer, Agarose-Gel-Elektrophorese, Horizontal-Kammer, ... | VWR International GmbH (Shop)“. [Online]. Verfügbar unter: <http://www.peqlab.de/wcms/de/produkte/index.php?do=getArticleDetails&which=41-2325R>. [Zugegriffen: 27-Jan-2016].
- [232] K. Zhou, L. Zhou, Q. 'En Lim, R. Zou, G. Stephanopoulos, und H.-P. Too, „Novel reference genes for quantifying transcriptional responses of Escherichia coli to protein overexpression by quantitative PCR“, *BMC Mol. Biol.*, Bd. 12, S. 18, Apr. 2011.
- [233] L. Vinué, M. A. Corcoran, D. C. Hooper, und G. A. Jacoby, „Mutations that enhance the ciprofloxacin resistance of Escherichia coli with qnrA1“, *Antimicrob. Agents Chemother.*, S. AAC.02167-15, Dez. 2015.
- [234] „Bacterial Strain JM109“. [Online]. Verfügbar unter: <https://www.promega.de/products/cloning-and-dna-markers/cloning-tools-and-competent-cells/bacterial-strains-and-competent-cells/bacterial-strain-jm109/#>. [Zugegriffen: 02-Feb-2016].
- [235] „Ion PGM™ Sequencer Specifications | Thermo Fisher Scientific“. [Online]. Verfügbar unter: <https://www.thermofisher.com/de/de/home/life-science/sequencing/next-generation-sequencing/ion-torrent-next-generation-sequencing-workflow/ion-torrent-next-generation-sequencing-run-sequence/ion-pgm-system-for-next-generation-sequencing/ion-pgm-system-specifications.html>. [Zugegriffen: 28-Sep-2015].
- [236] „Torrent Suite User Documentation : Torrent Variant Caller Plugin“. [Online]. Verfügbar unter: <http://mendel.iontorrent.com/ion-docs/Torrent-Variant-Caller-Plugin.html>. [Zugegriffen: 11-Mai-2015].
- [237] „CLC Sequence Viewer - A free software package supporting a number of basic bioinformatics features“, *CLC bio*. .
- [238] K. Morgan, „Plasmids 101: Origin of Replication“. [Online]. Verfügbar unter: <http://blog.addgene.org/plasmid-101-origin-of-replication>. [Zugegriffen: 01-Apr-2016].
- [239] G. Chao, J. Shen, C. P. Tseng, S. J. Park, und R. P. Gunsalus, „Aerobic regulation of isocitrate dehydrogenase gene (icd) expression in Escherichia coli by the arcA and fnr gene products.“, *J. Bacteriol.*, Bd. 179, Nr. 13, S. 4299–4304, Juli 1997.
- [240] „pACYC177 (ATCC® 37031™)“. [Online]. Verfügbar unter: https://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/37031.aspx?geo_country=de. [Zugegriffen: 19-Aug-2017].
- [241] M. Maciąg, D. Nowicki, L. Janniere, A. Szalewska-Pałasz, und G. Węgrzyn, „Genetic response to metabolic fluctuations: correlation between central carbon metabolism and DNA replication in Escherichia coli“, *Microb. Cell Factories*, Bd. 10, Nr. 1, S. 19, März 2011.
- [242] M. Maciąg, D. Nowicki, A. Szalewska-Pałasz, und G. Węgrzyn, „Central carbon metabolism influences fidelity of DNA replication in Escherichia coli“, *Mutat. Res.*, Bd. 731, Nr. 1–2, S. 99–106, März 2012.
- [243] S. Barańska *et al.*, „Replicating DNA by cell factories: roles of central carbon metabolism and transcription in the control of DNA replication in microbes, and implications for understanding this process in human cells“, *Microb. Cell Factories*, Bd. 12, S. 55, 2013.
- [244] J. H. Miller, *A short course in bacterial genetics: a laboratory manual and handbook for Escherichia coli and related bacteria*. Plainview, N.Y: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1992.
- [245] D. J. Lee *et al.*, „Gene doctoring: a method for recombineering in laboratory and pathogenic Escherichia coli strains“, *BMC Microbiol.*, Bd. 9, Nr. 1, S. 252, Dez. 2009.
- [246] R. B. Helling und J. S. Kukora, „Nalidixic Acid-Resistant Mutants of Escherichia coli Deficient in Isocitrate Dehydrogenase“, *J. Bacteriol.*, Bd. 105, Nr. 3, S. 1224–1226, Jan. 1971.
- [247] T. M. Lakshmi und R. B. Helling, „Selection for citrate synthase deficiency in icd mutants of Escherichia coli“, *J. Bacteriol.*, Bd. 127, Nr. 1, S. 76–83, Juli 1976.
- [248] C. Ruiz und S. B. Levy, „Regulation of acrAB expression by cellular metabolites in Escherichia coli“, *J. Antimicrob. Chemother.*, Sep. 2013.
- [249] M. C. Sulavik *et al.*, „Antibiotic susceptibility profiles of Escherichia coli strains lacking multidrug efflux pump genes“, *Antimicrob. Agents Chemother.*, Bd. 45, Nr. 4, S. 1126–1136, Apr. 2001.
- [250] D. G. White, J. D. Goldman, B. Demple, und S. B. Levy, „Role of the acrAB locus in organic solvent tolerance mediated by expression of marA, soxS, or roxA in Escherichia coli“, *J. Bacteriol.*, Bd. 179, Nr. 19, S. 6122–6126, Okt. 1997.
- [251] S. P. Cohen, S. B. Levy, J. Foulds, und J. L. Rosner, „Salicylate induction of antibiotic resistance in Escherichia coli: activation of the mar operon and a mar-independent pathway.“, *J. Bacteriol.*, Bd. 175, Nr. 24, S. 7856–7862, Jan. 1993.

- [252] M. N. Alekshun, S. B. Levy, T. R. Mealy, B. A. Seaton, und J. F. Head, „The crystal structure of MarR, a regulator of multiple antibiotic resistance, at 2.3 Å resolution“, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, Bd. 8, Nr. 8, S. 710–714, Aug. 2001.
- [253] S. Lin-Chao, W. T. Chen, und T. T. Wong, „High copy number of the pUC plasmid results from a Rom/Rop-suppressible point mutation in RNA II“, *Mol. Microbiol.*, Bd. 6, Nr. 22, S. 3385–3393, Nov. 1992.
- [254] „Plasmid incompatibility: more compatible than previously thought?“ [Online]. Verfügbar unter: <http://peds.oxfordjournals.org/content/20/7/309.short?rss=1&ssource=mfc>. [Zugegriffen: 04-Aug-2015].
- [255] E. Tsui, „Determination of exclusion effects of potentially rop deficient mutant pBR322 during cotransformation with the wild-type plasmid“, *J Exp Microbiol Immunol*, Bd. 10, S. 23–26, 2006.
- [256] D. Ma, D. N. Cook, M. Alberti, N. G. Pon, H. Nikaido, und J. E. Hearst, „Molecular cloning and characterization of acrA and acrE genes of Escherichia coli.“, *J. Bacteriol.*, Bd. 175, Nr. 19, S. 6299–6313, Okt. 1993.
- [257] Hans-Peter Sfeir, Philipp Hebel, Anke Heisig, und Peter Heisig, „2014: C-1439. Whole-Genome Sequencing Revealed a Combination of Known and Novel Non-Target Mutations after In-Vitro Selection of High-Level Fluoroquinolone Resistance of E. coli Presumably Substituting for Additional Topoisomerase Mutations“, gehalten auf der ICAAC.
- [258] Hans-Peter Sfeir, Anke Heisig, und Peter Heisig, „Combination of plasmid-encoded qnrA1 and a mutation blocking a central biosynthetic pathway as basis for high-level fluorquinolone resistance in gyrA single mutations of Escherichia coli“, gehalten auf der 24. ECCMID, Barcelona, Spain, 2014.
- [259] M. C. Swick, S. K. Morgan-Linnell, K. M. Carlson, und L. Zechiedrich, „Expression of multidrug efflux pump genes acrAB-tolC, mdFA, and norE in Escherichia coli clinical isolates as a function of fluoroquinolone and multi-drug resistance“, *Antimicrob. Agents Chemother.*, Bd. 55, Nr. 2, S. 921–924, Feb. 2011.
- [260] D. Ma, M. Alberti, C. Lynch, H. Nikaido, und J. E. Hearst, „The local repressor AcrR plays a modulating role in the regulation of acrAB genes of Escherichia coli by global stress signals“, *Mol. Microbiol.*, Bd. 19, Nr. 1, S. 101–112, Jan. 1996.
- [261] A. M. Bailey, M. A. Webber, und L. J. V. Piddock, „Medium Plays a Role in Determining Expression of acrB, marA, and soxS in Escherichia coli“, *Antimicrob. Agents Chemother.*, Bd. 50, Nr. 3, S. 1071–1074, März 2006.
- [262] Laura Vinué, G A Jacoby, M. A. Corcoran, und D. C. Hooper, „2014: C-1429. Genetic Analysis of Enhanced Quinolone Resistance Without Gyrase Mutations in Escherichia coli J53 pMG252 (qnrA1)“, gehalten auf der ICAAC 2014, Washington D.C.
- [263] A. Cesaro, R. R. D. Bettoni, C. Lascols, A. Mérens, C. J. Soussy, und E. Cambau, „Low selection of topoisomerase mutants from strains of Escherichia coli harbouring plasmid-borne qnr genes“, *J. Antimicrob. Chemother.*, Bd. 61, Nr. 5, S. 1007–1015, Jan. 2008.
- [264] A. Briaies *et al.*, „Exposure to diverse antimicrobials induces the expression of qnrB1, qnrD and smaqr genes by SOS-dependent regulation“, *J. Antimicrob. Chemother.*, Bd. 67, Nr. 12, S. 2854–2859, Aug. 2012.
- [265] K. Goto, K. Kawamura, und Y. Arakawa, „Contribution of QnrA, a Plasmid-Mediated Quinolone Resistance Peptide, to Survival of Escherichia coli Exposed to a Lethal Ciprofloxacin Concentration“, *Jpn. J. Infect. Dis.*, Bd. 68, Nr. 3, S. 196–202, 2015.
- [266] P. F. Miller, L. F. Gambino, M. C. Sulavik, und S. J. Gracheck, „Genetic relationship between soxRS and mar loci in promoting multiple antibiotic resistance in Escherichia coli“, *Antimicrob. Agents Chemother.*, Bd. 38, Nr. 8, S. 1773–1779, Aug. 1994.
- [267] H. Okusu, D. Ma, und H. Nikaido, „AcrAB efflux pump plays a major role in the antibiotic resistance phenotype of Escherichia coli multiple-antibiotic-resistance (Mar) mutants.“, *J. Bacteriol.*, Bd. 178, Nr. 1, S. 306–308, Jan. 1996.
- [268] J. L. Dyszel, J. A. Soares, M. C. Swearingen, A. Lindsay, J. N. Smith, und B. M. M. Ahmer, „E. coli K-12 and EHEC Genes Regulated by SdiA“, *PLoS One*, Bd. 5, Nr. 1, Jan. 2010.
- [269] M. M. Tavío, V. D. Aquili, J. Vila, und J. B. Poveda, „Resistance to ceftazidime in Escherichia coli associated with AcrR, MarR and PBP3 mutations and overexpression of sdiA“, *J. Med. Microbiol.*, Bd. 63, Nr. Pt 1, S. 56–65, Jan. 2014.
- [270] V. Duval und I. M. Lister, „MarA, SoxS and Rob of Escherichia coli – Global regulators of multidrug resistance, virulence and stress response“, *Int. J. Biotechnol. Wellness Ind.*, Bd. 2, Nr. 3, S. 101–124, 2013.
- [271] A. Zhang, J. L. Rosner, und R. G. Martin, „Transcriptional activation by MarA, SoxS and Rob of two tolC promoters using one binding site: a complex promoter configuration for tolC in Escherichia coli“, *Mol. Microbiol.*, Bd. 69, Nr. 6, S. 1450–1455, Sep. 2008.
- [272] S. P. Eckhardt, „Die Bedeutung des Gens soxS bei E. coli und sein Einfluss auf Antibiotika-Efflux-Pumpen“, 2015.
- [273] M. Lanzer und H. Bujard, „Promoters largely determine the efficiency of repressor action“, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, Bd. 85, Nr. 23, S. 8973–8977, Dez. 1988.
- [274] P. Penumetcha, K. Lau, X. Zhu, K. Davis, T. T. Eckdahl, und A. M. Campbell, „Improving the Lac System for Synthetic Biology“, *BIOS*, Bd. 81, Nr. 1, S. 7–15, März 2010.
- [275] R. C. Dickson, J. Abelson, W. M. Barnes, und W. S. Reznikoff, „Genetic regulation: the Lac control region“, *Science*, Bd. 187, Nr. 4171, S. 27–35, Jan. 1975.

- [276] C. B. Glascock und M. J. Weickert, „Using chromosomal lacIQ1 to control expression of genes on high-copy-number plasmids in *Escherichia coli*“, *Gene*, Bd. 223, Nr. 1–2, S. 221–231, Nov. 1998.
- [277] M. Lewis *et al.*, „Crystal structure of the lactose operon repressor and its complexes with DNA and inducer“, *Science*, Bd. 271, Nr. 5253, S. 1247–1254, März 1996.
- [278] I. J. Fijalkowska und R. M. Schaaper, „Mutants in the Exo I motif of *Escherichia coli* dnaQ: defective proof-reading and inviability due to error catastrophe.“, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, Bd. 93, Nr. 7, S. 2856–2861, Apr. 1996.
- [279] D. Ahluwalia und R. M. Schaaper, „Hypermutability and error catastrophe due to defects in ribonucleotide reductase“, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, Bd. 110, Nr. 46, S. 18596–18601, Nov. 2013.
- [280] R. G. Martin und J. L. Rosner, „Binding of purified multiple antibiotic-resistance repressor protein (MarR) to mar operator sequences.“, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, Bd. 92, Nr. 12, S. 5456–5460, Juni 1995.
- [281] J. Andersen, S. A. Forst, K. Zhao, M. Inouye, und N. Delilhas, „The function of micF RNA. micF RNA is a major factor in the thermal regulation of OmpF protein in *Escherichia coli*.“, *J. Biol. Chem.*, Bd. 264, Nr. 30, S. 17961–17970, Okt. 1989.
- [282] K. Drlica, „The mutant selection window and antimicrobial resistance“, *J. Antimicrob. Chemother.*, Bd. 52, Nr. 1, S. 11–17, Jan. 2003.
- [283] A. Briaies *et al.*, „In vitro effect of qnrA1, qnrB1, and qnrS1 genes on fluoroquinolone activity against isogenic *Escherichia coli* isolates with mutations in gyrA and parC“, *Antimicrob. Agents Chemother.*, Bd. 55, Nr. 3, S. 1266–1269, März 2011.
- [284] M. Subbiah, E. M. Top, D. H. Shah, und D. R. Call, „Selection Pressure Required for Long-Term Persistence of bla_{CMY-2}-Positive IncA/C Plasmids“, *Appl. Environ. Microbiol.*, Bd. 77, Nr. 13, S. 4486–4493, Juli 2011.
- [285] H. J. Linde, F. Notka, M. Metz, B. Kochanowski, P. Heisig, und N. Lehn, „In vivo increase in resistance to ciprofloxacin in *Escherichia coli* associated with deletion of the C-terminal part of MarR“, *Antimicrob. Agents Chemother.*, Bd. 44, Nr. 7, S. 1865–1868, Juli 2000.
- [286] L. Vinué, M. A. Corcoran, D. C. Hooper, und G. A. Jacoby, „Mutations That Enhance the Ciprofloxacin Resistance of *Escherichia coli* with qnrA1“, *Antimicrob. Agents Chemother.*, Bd. 60, Nr. 3, S. 1537–1545, März 2016.
- [287] L. Yue *et al.*, „Prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance qnr genes in poultry and swine clinical isolates of *Escherichia coli*“, *Vet. Microbiol.*, Bd. 132, Nr. 3–4, S. 414–420, Dez. 2008.
- [288] J. Yang, Y. Luo, S. Cui, W. Wang, und L. Han, „Diverse phenotypic and genotypic characterization among clinical *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* isolates carrying plasmid-mediated quinolone resistance determinants“, *Microb. Drug Resist. Larchmt. N*, Bd. 17, Nr. 3, S. 363–367, Sep. 2011.
- [289] S. A. E. Mohamed Adel El Sokkary Mohamed, „Antibacterial resistance pattern among *Escherichia coli* strains isolated from Mansoura hospitals in Egypt with a special reference to quinolones“, *Afr. J. Microbiol. Res.*, Bd. 9, Nr. 9, S. 662–670, 2015.
- [290] A. A.-F. Zayed, T. M. Essam, A.-G. M. Hashem, und O. M. El-Tayeb, „‘Supermutators’ found amongst highly levofloxacin-resistant *E. coli* isolates: a rapid protocol for the detection of mutation sites“, *Emerg. Microbes Infect.*, Bd. 4, Nr. 1, S. e4, Jan. 2015.
- [291] E. Ruiz *et al.*, „qnr, aac(6′)-Ib-cr and qepA genes in *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp.: genetic environments and plasmid and chromosomal location“, *J. Antimicrob. Chemother.*, Bd. 67, Nr. 4, S. 886–897, Apr. 2012.
- [292] V. Cattoir *et al.*, „Update on fluoroquinolone resistance in *Helicobacter pylori*: new mutations leading to resistance and first description of a gyrA polymorphism associated with hypersusceptibility“, *Int. J. Antimicrob. Agents*, Bd. 29, Nr. 4, S. 389–396, Apr. 2007.
- [293] C. Lascols *et al.*, „Type II topoisomerase mutations in clinical isolates of *Enterobacter cloacae* and other enterobacterial species harbouring the qnrA gene“, *Int. J. Antimicrob. Agents*, Bd. 29, Nr. 4, S. 402–409, Apr. 2007.
- [294] M. A. Lobritz *et al.*, „Antibiotic efficacy is linked to bacterial cellular respiration“, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, Bd. 112, Nr. 27, S. 8173–8180, Juli 2015.
- [295] M. A. Kohanski, D. J. Dwyer, B. Hayete, C. A. Lawrence, und J. J. Collins, „A Common Mechanism of Cellular Death Induced by Bactericidal Antibiotics“, *Cell*, Bd. 130, Nr. 5, S. 797–810, Sep. 2007.
- [296] N.-C. Emrich, A. Heisig, W. Stubbings, H. Labischinski, und P. Heisig, „Antibacterial activity of finafloxacin under different pH conditions against isogenic strains of *Escherichia coli* expressing combinations of defined mechanisms of fluoroquinolone resistance“, *J. Antimicrob. Chemother.*, Bd. 65, Nr. 12, S. 2530–2533, Dez. 2010.
- [297] E. S. Kim *et al.*, „Interactions between QnrB, QnrB Mutants, and DNA Gyrase“, *Antimicrob. Agents Chemother.*, Bd. 59, Nr. 9, S. 5413–5419, Jan. 2015.
- [298] B. Périchon, P. Courvalin, und M. Galimand, „Transferable Resistance to Aminoglycosides by Methylation of G1405 in 16S rRNA and to Hydrophilic Fluoroquinolones by QepA-Mediated Efflux in *Escherichia coli*“, *Antimicrob. Agents Chemother.*, Bd. 51, Nr. 7, S. 2464–2469, Jan. 2007.

- [299] F. Al-Marzooq, M. Y. Mohd Yusof, und S. T. Tay, „Molecular Analysis of Ciprofloxacin Resistance Mechanisms in Malaysian ESBL-Producing *Klebsiella pneumoniae* Isolates and Development of Mismatch Amplification Mutation Assays (MAMA) for Rapid Detection of *gyrA* and *parC* Mutations“, *BioMed Res. Int.*, Bd. 2014, 2014.
- [300] Z. Zhang *et al.*, „Presence of *qnr*, *aac(6′)-Ib*, *qepA*, *oqxAB*, and mutations in *gyrase* and *topoisomerase* in nalidixic acid-resistant *Salmonella* isolates recovered from retail chicken carcasses“, *Foodborne Pathog. Dis.*, Bd. 11, Nr. 9, S. 698–705, Sep. 2014.
- [301] A. S. Saiful Anuar, M. Y. Mohd Yusof, und S. T. Tay, „Prevalence of plasmid-mediated *qnr* determinants and *gyrase* alteration in *Klebsiella pneumoniae* isolated from a university teaching hospital in Malaysia“, *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.*, Bd. 17, Nr. 13, S. 1744–1747, Juli 2013.
- [302] S. R. Maloy, M. Bohlander, und W. D. Nunn, „Elevated levels of glyoxylate shunt enzymes in *Escherichia coli* strains constitutive for fatty acid degradation“, *J. Bacteriol.*, Bd. 143, Nr. 2, S. 720–725, Aug. 1980.
- [303] S. R. Maloy und W. D. Nunn, „Genetic regulation of the glyoxylate shunt in *Escherichia coli* K-12“, *J. Bacteriol.*, Bd. 149, Nr. 1, S. 173–180, Jan. 1982.
- [304] J. R. Pohlhaus, D. T. Long, E. O’Reilly, und K. N. Kreuzer, „The ϵ Subunit of DNA Polymerase III Is Involved in the Nalidixic Acid-Induced SOS Response in *Escherichia coli*“, *J. Bacteriol.*, Bd. 190, Nr. 15, S. 5239–5247, Aug. 2008.
- [305] Z. Whatley und K. N. Kreuzer, „Mutations that Separate the Functions of the Proofreading Subunit of the *Escherichia coli* Replicase“, *G3 GenesGenomesGenetics*, Bd. 5, Nr. 6, S. 1301–1311, Apr. 2015.
- [306] T. Horiuchi, H. Maki, und M. Sekiguchi, „A new conditional lethal mutator (*dnaQ49*) in *Escherichia coli* K12“, *Mol. Gen. Genet. MGG*, Bd. 163, Nr. 3, S. 277–283, Jan. 1978.
- [307] M. Maruyama, T. Horiuchi, H. Maki, und M. Sekiguchi, „A dominant (*mutD5*) and a recessive (*dnaQ49*) mutator of *Escherichia coli*“, *J. Mol. Biol.*, Bd. 167, Nr. 4, S. 757–771, Juli 1983.
- [308] A. Nowosielska, M. Wrzesiński, J. Nieminuszczy, C. Janion, und E. Grzesiuk, „Mutator activity and specificity of *Escherichia coli* *dnaQ49* allele – effect of *umuDC* products“, *Mutat. Res. Mol. Mech. Mutagen.*, Bd. 572, Nr. 1–2, S. 113–122, Mai 2005.
- [309] E. D. Lancy, M. R. Lifshics, D. G. Kehres, und R. Maurer, „Isolation and characterization of mutants with deletions in *dnaQ*, the gene for the editing subunit of DNA polymerase III in *Salmonella typhimurium*.“, *J. Bacteriol.*, Bd. 171, Nr. 10, S. 5572–5580, Okt. 1989.
- [310] R. M. Schaaper und M. Radman, „The extreme mutator effect of *Escherichia coli* *mutD5* results from saturation of mismatch repair by excessive DNA replication errors.“, *EMBO J.*, Bd. 8, Nr. 11, S. 3511–3516, Nov. 1989.
- [311] S. A. Doyle, P. T. Beernink, und D. E. Koshland, „Structural Basis for a Change in Substrate Specificity: Crystal Structure of S113E Isocitrate Dehydrogenase in a Complex with Isopropylmalate, Mg²⁺, and NADP⁺“, *Biochemistry (Mosc.)*, Bd. 40, Nr. 14, S. 4234–4241, Apr. 2001.
- [312] Agrotman, *English: The glyoxylate cycle together with the krebs cycle*. 2010.
- [313] J. M. Bolduc *u. a.*, „Mutagenesis and Laue structures of enzyme intermediates: isocitrate dehydrogenase“, *Science*, Bd. 268, Nr. 5215, S. 1312–1318, Juni 1995.
- [314] J. H. Hurley, P. E. Thorsness, V. Ramalingam, N. H. Helmers, D. E. Koshland, und R. M. Stroud, „Structure of a bacterial enzyme regulated by phosphorylation, isocitrate dehydrogenase“, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, Bd. 86, Nr. 22, S. 8635–8639, Nov. 1989.
- [315] „*icd* - Isocitrate dehydrogenase [NADP] - *Escherichia coli* (strain K12)“. [Online]. Verfügbar unter: <http://www.uniprot.org/uniprot/P08200>. [Zugegriffen: 30-Sep-2015].
- [316] P. E. Thorsness und D. E. Koshland, „Inactivation of isocitrate dehydrogenase by phosphorylation is mediated by the negative charge of the phosphate“, *J. Biol. Chem.*, Bd. 262, Nr. 22, S. 10422–10425, Aug. 1987.
- [317] J. H. Hurley, A. M. Dean, J. L. Sohl, D. E. Koshland, und R. M. Stroud, „Regulation of an enzyme by phosphorylation at the active site“, *Science*, Bd. 249, Nr. 4972, S. 1012–1016, Aug. 1990.
- [318] J. L. Rosner und R. G. Martin, „An Excretory Function for the *Escherichia coli* Outer Membrane Pore TolC: Upregulation of *marA* and *soxS* Transcription and Rob Activity Due to Metabolites Accumulated in *tolC* Mutants“, *J. Bacteriol.*, Bd. 191, Nr. 16, S. 5283–5292, Aug. 2009.
- [319] L. M. Chubiz und C. V. Rao, „Aromatic Acid Metabolites of *Escherichia coli* K-12 Can Induce the *marRAB* Operon“, *J. Bacteriol.*, Bd. 192, Nr. 18, S. 4786–4789, Sep. 2010.
- [320] K. Shimizu, „Metabolic Regulation of a Bacterial Cell System with Emphasis on *Escherichia coli* Metabolism“, *Int. Sch. Res. Not.*, Bd. 2013, S. e645983, Feb. 2013.
- [321] S. C. Janga, H. Salgado, A. Martínez-Antonio, und J. Collado-Vides, „Coordination logic of the sensing machinery in the transcriptional regulatory network of *Escherichia coli*“, *Nucleic Acids Res.*, Bd. 35, Nr. 20, S. 6963–6972, Nov. 2007.

- [322] S. Gama-Castro *et al.*, „RegulonDB (version 6.0): gene regulation model of *Escherichia coli* K-12 beyond transcription, active (experimental) annotated promoters and Textpresso navigation“, *Nucleic Acids Res.*, Bd. 36, Nr. Database issue, S. D120-124, Jan. 2008.
- [323] J. Timmermans und L. V. Melderer, „Post-transcriptional global regulation by CsrA in bacteria“, *Cell. Mol. Life Sci.*, Bd. 67, Nr. 17, S. 2897–2908, Mai 2010.
- [324] J. M. Berg, J. L. Tymoczko, und L. Stryer, *Biochemie*, 5. Aufl. Heidelberg: Spektrum Akad. Verl, 2003.
- [325] G. CZIHAK, H. Langer, und H. Ziegler, *Biologie: Ein Lehrbuch für Studenten der Biologie*. Springer-Verlag, 2013.
- [326] Aichun Dong, „Dynamics of the Citric Acid and Glyoxylate Cycles“. University of Northern Colorado, 2004.
- [327] H. Van Acker, P. Van Dijck, und T. Coenye, „Molecular mechanisms of antimicrobial tolerance and resistance in bacterial and fungal biofilms“, *Trends Microbiol.*, Bd. 22, Nr. 6, S. 326–333, Juni 2014.
- [328] H. Van Acker *et al.*, „Biofilm-grown *Burkholderia cepacia* complex cells survive antibiotic treatment by avoiding production of reactive oxygen species“, *PLoS One*, Bd. 8, Nr. 3, S. e58943, 2013.
- [329] P. Christen, R. Jaussi, und R. Benoit, *Biochemie und Molekularbiologie: Eine Einführung in 40 Lerneinheiten*. Springer-Verlag, 2015.
- [330] T. M. Ramseier, S. Y. Chien, und M. H. Saier, „Cooperative interaction between Cra and Fnr in the regulation of the *cydAB* operon of *Escherichia coli*“, *Curr. Microbiol.*, Bd. 33, Nr. 4, S. 270–274, Okt. 1996.
- [331] M. H. Saier und T. M. Ramseier, „The catabolite repressor/activator (Cra) protein of enteric bacteria.“, *J. Bacteriol.*, Bd. 178, Nr. 12, S. 3411–3417, Juni 1996.
- [332] S. B. Tom M. Ramseier, „The global regulatory protein FruR modulates the direction of carbon flow in *Escherichia coli*“, *Mol. Microbiol.*, Bd. 16, Nr. 6, S. 1157–69, 1995.
- [333] J. D. Rand, S. G. Danby, D. L. A. Greenway, und R. R. England, „Increased expression of the multidrug efflux genes *acrAB* occurs during slow growth of *Escherichia coli*“, *FEMS Microbiol. Lett.*, Bd. 207, Nr. 1, S. 91–95, Jan. 2002.
- [334] E. Kugelberg, S. Löfmark, B. Wretling, und D. I. Andersson, „Reduction of the fitness burden of quinolone resistance in *Pseudomonas aeruginosa*“, *J. Antimicrob. Chemother.*, Bd. 55, Nr. 1, S. 22–30, Jan. 2005.
- [335] E. O’Regan *et al.*, „Fitness Costs and Stability of a High-Level Ciprofloxacin Resistance Phenotype in *Salmonella enterica* Serotype Enteritidis: Reduced Infectivity Associated with Decreased Expression of *Salmonella* Pathogenicity Island 1 Genes“, *Antimicrob. Agents Chemother.*, Bd. 54, Nr. 1, S. 367–374, Jan. 2010.
- [336] P. Sánchez *et al.*, „Fitness of in vitro selected *Pseudomonas aeruginosa* *nalB* and *nfxB* multidrug resistant mutants“, *J. Antimicrob. Chemother.*, Bd. 50, Nr. 5, S. 657–664, Nov. 2002.
- [337] N. T. Nhung *u. a.*, „Induction of Antimicrobial Resistance in *Escherichia coli* and Non-Typhoidal *Salmonella* Strains after Adaptation to Disinfectant Commonly Used on Farms in Vietnam“, *Antibiotics*, Bd. 4, Nr. 4, S. 480–494, Okt. 2015.
- [338] R. P. Lamers, J. F. Cavallari, und L. L. Burrows, „The Efflux Inhibitor Phenylalanine-Arginine Beta-Naphthylamide (PAβN) Permeabilizes the Outer Membrane of Gram-Negative Bacteria“, *PLOS ONE*, Bd. 8, Nr. 3, S. e60666, März 2013.
- [339] T. M. Barbosa und S. B. Levy, „Differential expression of over 60 chromosomal genes in *Escherichia coli* by constitutive expression of MarA“, *J. Bacteriol.*, Bd. 182, Nr. 12, S. 3467–3474, Juni 2000.
- [340] G. Krishnamoorthy, E. B. Tikhonova, G. Dhamdhare, und H. I. Zgurskaya, „On the role of TolC in multidrug efflux: the function and assembly of AcrAB-TolC tolerate significant depletion of intracellular TolC protein“, *Mol. Microbiol.*, Bd. 87, Nr. 5, S. 982–997, März 2013.
- [341] L. Balakrishnan, C. Hughes, und V. Koronakis, „Substrate-triggered recruitment of the TolC channel-tunnel during type I export of hemolysin by *Escherichia coli*“, *J. Mol. Biol.*, Bd. 313, Nr. 3, S. 501–510, Okt. 2001.
- [342] E. B. Tikhonova und H. I. Zgurskaya, „AcrA, AcrB, and TolC of *Escherichia coli* Form a Stable Intermembrane Multidrug Efflux Complex“, *J. Biol. Chem.*, Bd. 279, Nr. 31, S. 32116–32124, Juli 2004.
- [343] D. WANG, „Attempt to Construct a Rop pUC19 from pBR322 Mutant lacking the Tetracycline Resistance Gene“, *J. Exp. Microbiol. Immunol. JEMI Vol.*, Bd. 10, S. 18–22, 2006.
- [344] „Maps: pUC18, pUC19 DNA“. [Online]. Verfügbar unter: <http://dwb4.unl.edu/Chem/CHEM869N/CHEM869NLinks/www.fermentas.com/techinfo/NucleicAcids/map-puc1819.htm>. [Zugegriffen: 26-Mai-2015].
- [345] P. Komp Lindgren, Å. Karlsson, und D. Hughes, „Mutation Rate and Evolution of Fluoroquinolone Resistance in *Escherichia coli* Isolates from Patients with Urinary Tract Infections“, *Antimicrob. Agents Chemother.*, Bd. 47, Nr. 10, S. 3222–3232, Okt. 2003.
- [346] P. Belenky *et al.*, „Bactericidal Antibiotics Induce Toxic Metabolic Perturbations that Lead to Cellular Damage“, *Cell Rep.*, Bd. 13, Nr. 5, S. 968–980, Nov. 2015.
- [347] V. C. Thomas *et al.*, „A dysfunctional tricarboxylic acid cycle enhances fitness of *Staphylococcus epidermidis* during β -lactam stress“, *mBio*, Bd. 4, Nr. 4, 2013.

- [348] D. J. Dwyer *et al.*, „Antibiotics induce redox-related physiological alterations as part of their lethality“, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, Bd. 111, Nr. 20, S. E2100–2109, Mai 2014.
- [349] R. Kumar, B. S. Madhumathi, und V. Nagaraja, „Molecular basis for the differential quinolone susceptibility of mycobacterial DNA gyrase“, *Antimicrob. Agents Chemother.*, Bd. 58, Nr. 4, S. 2013–2020, 2014.
- [350] C. J. Willmott und A. Maxwell, „A single point mutation in the DNA gyrase A protein greatly reduces binding of fluoroquinolones to the gyrase-DNA complex“, *Antimicrob. Agents Chemother.*, Bd. 37, Nr. 1, S. 126–127, Jan. 1993.
- [351] L. L. Shen, W. E. Kohlbrenner, D. Weigl, und J. Baranowski, „Mechanism of quinolone inhibition of DNA gyrase. Appearance of unique norfloxacin binding sites in enzyme-DNA complexes“, *J. Biol. Chem.*, Bd. 264, Nr. 5, S. 2973–2978, Feb. 1989.
- [352] A. Mérens *et al.*, „The Pentapeptide Repeat Proteins MfpAMt and QnrB4 Exhibit Opposite Effects on DNA Gyrase Catalytic Reactions and on the Ternary Gyrase-DNA-Quinolone Complex“, *J. Bacteriol.*, Bd. 191, Nr. 5, S. 1587–1594, Jan. 2009.
- [353] G. A. Jacoby *et al.*, „qnrB, Another Plasmid-Mediated Gene for Quinolone Resistance“, *Antimicrob. Agents Chemother.*, Bd. 50, Nr. 4, S. 1178–1182, Apr. 2006.
- [354] J. H. Tran und G. A. Jacoby, „Mechanism of plasmid-mediated quinolone resistance“, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, Bd. 99, Nr. 8, S. 5638–5642, Apr. 2002.
- [355] J. H. Tran, G. A. Jacoby, und D. C. Hooper, „Interaction of the plasmid-encoded quinolone resistance protein Qnr with Escherichia coli DNA gyrase“, *Antimicrob. Agents Chemother.*, Bd. 49, Nr. 1, S. 118–125, Jan. 2005.
- [356] J. H. Tran, G. A. Jacoby, und D. C. Hooper, „Interaction of the Plasmid-Encoded Quinolone Resistance Protein QnrA with Escherichia coli Topoisomerase IV“, *Antimicrob. Agents Chemother.*, Bd. 49, Nr. 7, S. 3050–3052, Jan. 2005.
- [357] A. S. Seoane und S. B. Levy, „Characterization of MarR, the repressor of the multiple antibiotic resistance (mar) operon in Escherichia coli“, *J. Bacteriol.*, Bd. 177, Nr. 12, S. 3414–3419, Juni 1995.
- [358] „Der Tuberkulose die Energiezufuhr verweigern“. [Online]. Verfügbar unter: <http://www.spektrum.de/news/der-tuberkulose-die-energiezufuhr-verweigern/344429>. [Zugegriffen: 03-Dez-2015].
- [359] J. E. Gomez und J. D. McKinney, „M. tuberculosis persistence, latency, and drug tolerance“, *Tuberculosis*, Bd. 84, Nr. 1–2, S. 29–44, Jan. 2004.
- [360] Y.-V. Lee, H. A. Wahab, Y. S. Choong, Y.-V. Lee, H. A. Wahab, und Y. S. Choong, „Potential Inhibitors for Isocitrate Lyase of Mycobacterium tuberculosis and Non-M. tuberculosis: A Summary, Potential Inhibitors for Isocitrate Lyase of Mycobacterium tuberculosis and Non-M. tuberculosis: A Summary“, *BioMed Res. Int. BioMed Res. Int.*, Bd. 2015, 2015, S. e895453, Jan. 2015.
- [361] Y. Liu *et al.*, „Identification of a novel inhibitor of isocitrate lyase as a potent antitubercular agent against both active and non-replicating Mycobacterium tuberculosis“, *Tuberculosis*, Bd. 97, S. 38–46, März 2016.
- [362] J. Sasikaran, M. Ziemski, P. K. Zadora, A. Fleig, und I. A. Berg, „Bacterial itaconate degradation promotes pathogenicity“, *Nat. Chem. Biol.*, Bd. 10, Nr. 5, S. 371–377, Mai 2014.
- [363] T. Sato *et al.*, „Fluoroquinolone resistance mechanisms in an Escherichia coli isolate, HUE1, without quinolone resistance-determining region mutations“, *Front. Microbiol.*, Bd. 4, 2013.
- [364] J. Domínguez-Herrera *u. a.*, „Impact of qnrA1, qnrB1 and qnrS1 on the efficacy of ciprofloxacin and levofloxacin in an experimental pneumonia model caused by Escherichia coli with or without the GyrA mutation Ser83Leu“, *J. Antimicrob. Chemother.*, Bd. 68, Nr. 7, S. 1609–1615, Jan. 2013.
- [365] N. Allou, E. Cambau, L. Massias, F. Chau, und B. Fantin, „Impact of Low-Level Resistance to Fluoroquinolones Due to qnrA1 and qnrS1 Genes or a gyrA Mutation on Ciprofloxacin Bactericidal Activity in a Murine Model of Escherichia coli Urinary Tract Infection“, *Antimicrob. Agents Chemother.*, Bd. 53, Nr. 10, S. 4292–4297, Juli 2009.
- [366] L. Jakobsen, V. Cattoir, K. S. Jensen, A. M. Hammerum, P. Nordmann, und N. Frimodt-Møller, „Impact of low-level fluoroquinolone resistance genes qnrA1, qnrB19 and qnrS1 on ciprofloxacin treatment of isogenic Escherichia coli strains in a murine urinary tract infection model“, *J. Antimicrob. Chemother.*, Bd. 67, Nr. 10, S. 2438–2444, Okt. 2012.
- [367] Y. P. Chong *et al.*, „Bloodstream infections caused by qnr-positive Enterobacteriaceae: clinical and microbiologic characteristics and outcomes“, *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, Bd. 67, Nr. 1, S. 70–77, Mai 2010.

15 Anhänge

15.1 Übersicht der gesicherten Mutanten

Tabelle 15-1 Übersicht der gesicherten Mutanten und der MHK von Cip in ($\mu\text{g/ml}$)

WT

+ pHPNE18-01.1	MHK Cip	+ pHPNE19-02.1	MHK Cip)	+ pUC19	MHK Cip
1 Nr. I 1	0,8	1 Nr. I 19	0,8	Nr. 1	0,1
1 Nr. I 4	0,6	1 Nr. I 2	0,8	Nr. 2	0,1
1 Nr. II 12	0,2	1 Nr. I 50	1	Nr. 14	0,1
1 Nr. II 40	0,6	2 Nr. I 10	0,8	Nr. 5	0,2
		2 Nr. I 18	1,2	Nr. 4	0,2
		2 Nr. I 29	1,2	Nr. 3	0,125
				Nr. 17	0,1

WT-K

+ pHPNE18-01.1	MHK Cip	+ pHPNE19-02.1	MHK Cip	+ pUC19	MHK Cip
1 Nr. 1 1	0,75	1 Nr. 2 45	2	Nr. 45	0,25
1 Nr. 1 8	0,875	1 Nr. 2 44	>2	Nr. 19	0,25
1 Nr. 1 19	0,75	1 Nr. 2 37	1,5	Nr. 33	0,5
1 Nr. 1 23	0,875	1 Nr. 2 35	>2	Nr. 14	0,5
1 Nr. 1 26	0,75	1 Nr. 2 34	>2	Nr. 11	0,75
1 Nr. 1 27	0,5	1 Nr. 2 24	>2	Nr. 9	0,25
1 Nr. 2 4	1,25	1 Nr. 2 18	2	Nr. 5	0,5
1 Nr. 2 9	0,75	1 Nr. 2 3	0,875	Nr. 6	0,5
1 Nr. 2 22	2	1 Nr. 3 21	>2		
1 Nr. 2 24	0,75	1 Nr. 3 22	>2		
1 Nr. 2 34	1	1 Nr. 3 27	1,25		
		1 Nr. 3 28	>2		

MII

+ pHPNE18-01.1	MHK Cip	+ pHPNE19-02.1	MHK Cip	+ pUC19	MHK Cip
Nr. II 12 (1)	4	Nr. I 13 (1)	8	Nr. 13	4
Nr. II 18 (1)	8	Nr. I 20 (1)	16	Nr. 26	4
Nr. II 42 (1)	8	Nr. I 43 (1)	16		
Nr. II 11 (2)	8	Nr. II 21 (2)	32		
Nr. III 10 (2)	4	Nr. II 6 (2)	8		
Nr. III 27 (2)	8	Nr. III 13 (2)	32		
		Nr. III 2 (2)	32		
		Nr. III 4 (2)	32		

15.2 Detaillierte Übersicht der MHK für selektierte Mutanten

15.2.1 Ergebnisse für WT

Tabelle 15-2 Übersicht der MHK für selektierte WT-Mutanten in ($\mu\text{g/ml}$)

Cip: Ciprofloxacin; Nal: Nalidixinsäure; Tet: Tetracyclin; Clm: Chloramphenicol;
Oxa: Oxacillin; Ery: Erythromycin; Novo: Novobiocin

MHK in ($\mu\text{g/ml}$)							
	Cip	Nal	Tet	Clm	Oxa	Ery	Novo
WT pHPNE19-02.1					>2048	32-64	<16
1 Nr. I 19	0,8	128-256	2	16	n.d.	n.d.	n.d.
1 Nr. I 2	0,8	64-128	1	8	>2048	32-64	64-128
1 Nr. I 50	1	128-256	1-2	8	>2048	<32	32
2 Nr. I 10	0,8	128-256	2	16	>2048	128	256
2 Nr. I 18	1,2	64	0,5	8	>2048	32-64	32-64
2 Nr. I 29	1,2	256	2	16	>2048	128	256
WT pHPNE18-01.1					>2048	<32	64
1 Nr. I 1	0,8	64	0,5	4-8	>2048	<32	64
1 Nr. I 4	0,6	64	1-2	8	>2048	64	32-64
1 Nr. II 12	<0,4	32	0,5	4	>2048	64	128
1 Nr. II 40	0,6	32	0,5	4	>2048	64	32-64
WT pUC19					>2048	<32	<16
Nr. 1	0,1	256	2	8	n.d.	n.d.	n.d.
Nr. 2	0,1	256	2	8	>2048	64	128
Nr. 14	0,1	1024?	2	4-8	>2048	<32	128
Nr. 5	0,2	128	n.d.	8	n.d.	n.d.	n.d.
Nr. 4	0,2	512	n.d.	8	>2048	<32	32-128
Nr. 3	0,125	256	2	32	>2048	64	256
Nr. 17	0,1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

15.2.2 Ergebnisse für WT-K

Tabelle 15-3 Übersicht der MHK für selektierte WT-K-Mutanten

Cip: Ciprofloxacin; Nal: Nalidixinsäure; Tet: Tetracyclin; Clm: Chloramphenicol

	MHK in (µg/ml)						
	Cip	Nal	Tet	Clm	Oxa	Ery	Novo
WT-K pHPNE19-02.1					n.d.	64-256	64
1 Nr. 2 45	2	256	1	16	>2048	64	32
1 Nr. 2 44	>2	512	2	16	n.d.	n.d.	n.d.
1 Nr. 2 37	1,5	128	2	16	n.d.	n.d.	n.d.
1 Nr. 2 35	>2	128	1	16	n.d.	n.d.	n.d.
1 Nr. 2 34	>2	512	2	32	n.d.	n.d.	n.d.
1 Nr. 2 24	>2	256	2	16	n.d.	n.d.	n.d.
1 Nr. 2 18	2	256	1	16	>2048	128	128
1 Nr. 2 3	0,875	128	1	8	>2048	64	128
1 Nr. 3 21	>2	512	2	32?	n.d.	n.d.	n.d.
1 Nr. 3 22	>2	128	2	8	n.d.	n.d.	n.d.
1 Nr. 3 27	1,25	128	1	8	n.d.	n.d.	n.d.
1 Nr. 3 28	>2	256	2	8	n.d.	n.d.	n.d.
WT-K pHPNE18-01.1					n.d.	n.d.	n.d.
1 Nr. 1 1	0,75	128	2	16	>2048	64	128
1 Nr. 1 8	0,875	256	n.d.	16	>2048	128	512
1 Nr. 1 19	0,75	256	1	8	>2048	64	256-512
1 Nr. 1 23	0,875	128	2	8	>2048	64	512
1 Nr. 1 26	0,75	256	2	16	>2048	<32	128
1 Nr. 1 27	0,5	128	2	16	>2048	64	256
1 Nr. 2 4	1,25	256	n.d.	16	>2048	64	512-1024
1 Nr. 2 9	0,75	128	2	8	>2048	<32	128
1 Nr. 2 22	2	256	4	8	>2048	64-256	1024-2048
1 Nr. 2 24	0,75	256	2	8	>2048	<32	n.d.
1 Nr. 2 34	1	256 - 512	2	32	>2048	64-256	512-1024
WT-K pUC19					n.d.	n.d.	n.d.
Nr. 45	0,25	64	4	8	n.d.	n.d.	n.d.
Nr. 19	0,25	128	2	8	n.d.	n.d.	n.d.
Nr. 33	0,5	128	4	32	n.d.	n.d.	n.d.
Nr. 14	0,5	128	2	32	n.d.	n.d.	n.d.
Nr. 11	0,75	128	4	64	n.d.	n.d.	n.d.
Nr. 9	0,25	64	1	16	n.d.	n.d.	n.d.
Nr. 5	0,5	64	1	32	n.d.	n.d.	n.d.
Nr. 6	0,5	512	1	32	n.d.	n.d.	n.d.

15.2.3 Ergebnisse für MII

Tabelle 15-4 Übersicht der MHK für selektierte MII-Mutanten.

Cip: Ciprofloxacin; Nal: Nalidixinsäure; Tet: Tetracyclin; Clm: Chloramphenicol; rot unterlegt: selektierte Mutanten bei denen eine Mutation in *icd* gefunden wurde (MII pHPNE19-02.1 Nr. I 43 und MII pHPNE19-02.1 Nr. III 2) oder sich kein Gen amplifizieren ließ (MII pHPNE18-01.1 Nr. II 18)

MHK in (µg/ml)							
	Cip	Nal	Tet	Clm	Oxa	Ery	Novo
MII pHPNE19-02.1					>2048	128	1024
Nr. I 13 (1)	8	4096	2-4	16	>2048	64-128	128-256
Nr. I 20 (1)	16	4096	4	16	>2048	64	512
Nr. I 43 (1)	16	>4096	4	16	>2048	64	512
Nr. II 21 (2)	32	>4096	2-4	16	>2048	64	512
Nr. II 6 (2)	8	2048- 4096	2-4	16	>2048	64	1024- 2048
Nr. III 13 (2)	32	4096	2-4	16	>2048	128	1024
Nr. III 2 (2)	32	>4096	4	16			
Nr. III 4 (2)	32	4096	4	16	>2048	64	256-512
MII pHPNE18-01.1					>2048	64	512
Nr. II 12 (1)	4	>4096	4	16-32	>2048	64	512
Nr. II 18 (1)	8	4096	2-4	16	>2048	64	512
Nr. II 42 (1)	8	>4096	4	16-32	>2048	64-128	1024
Nr. III 1 (2)	8	4096	2-4	16-32	>2048	<64	512
Nr. III 10 (2)	4	>4096	4	16-32	>2048	64	512-1024
Nr. III 27 (2)	8	>4096	4	32	>2048	64	512-1024
MII pUC19					>2048	128	1024
Nr. 13	2-4	>1024	2	32	n.d.	n.d.	n.d.
Nr. 26	2-4	>1024	n.d.	32	n.d.	n.d.	n.d.

15.3 Untersuchung $\Delta marR175$ bp

15.3.1 Ergebnisse für WT pHPNE18-01.1, WT pHPNE19-02.1

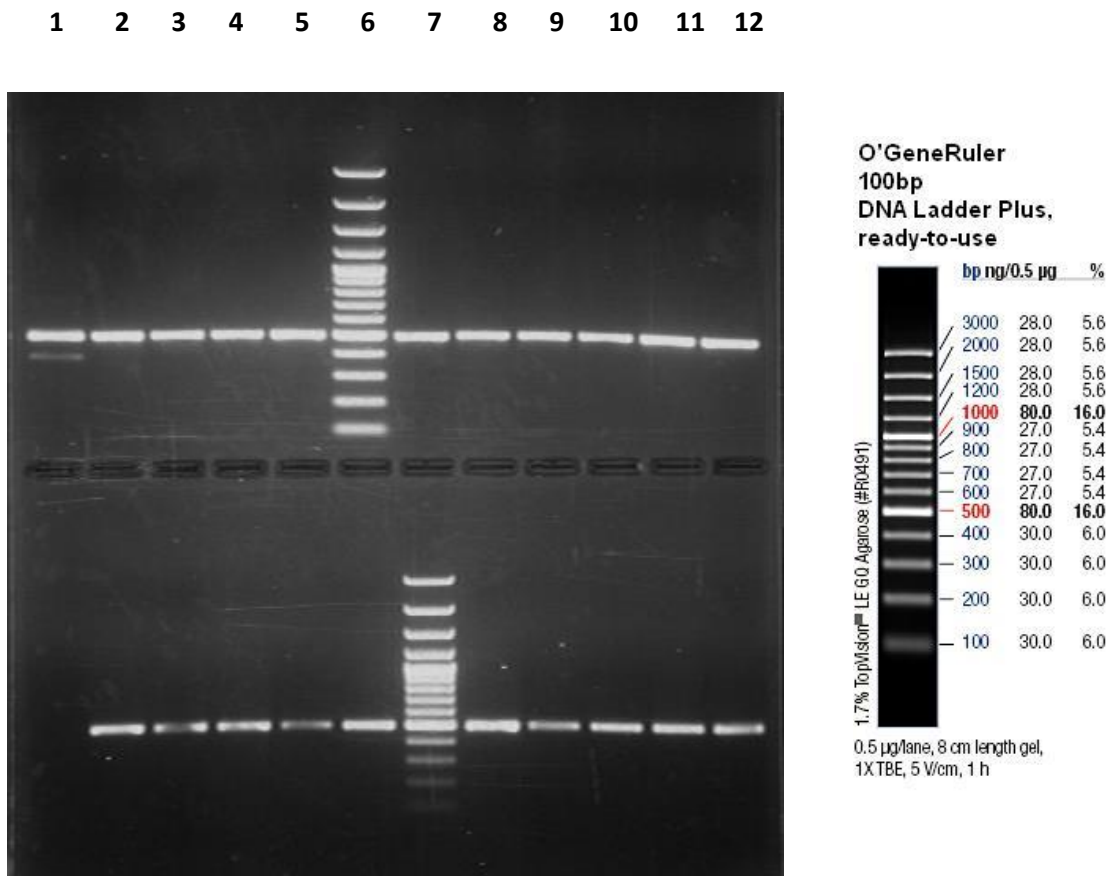


Abbildung 15-1 **Agarosegel *marR*-PCR für WT-Klone**

TAE-Agarosegel, 1,6%, 1-fach E-Puffer, 70 V; Ethidiumbromidfärbung.

A1: pHPNE19-02.1; B1: pHPNW18-01.1

oben

Spur 1: WT A1 Nr. 1 I 2; Spur 2: WT A1 Nr. 1 I 29; Spur 3: WT A1 Nr. 1 I 39; Spur 4: WT A1 Nr. 1 I 50;

Spur 5: WT A1 Nr. 1 I 33; Spur 6: DNA-Größenmarker; Spur 7: WT A1 Nr. 2 I 10;

Spur 8: WT A1 Nr. 2 I 18; Spur 9: WT A1 Nr. 2 I 29; Spur 10: WT A1 Nr. 2 I 31;

Spur 11: WT A1 Nr. 2 I 35; Spur 12: WT A1 Nr. 2 I 43

unten

Spur 1: NTC; Spur 2: WT B1 Nr 1 I 1; Spur 3: WT B1 Nr. 1 I 4; Spur 4: WT B1 Nr. 1 I 32;

Spur 5: WT B1 Nr 1 I 37; Spur 6: WT B1 Nr 1 II 13; Spur 7: DNA-Größenmarker;

Spur 8: WT B1 Nr. 1 II 15; Spur 9: WT B1 Nr. 1 II 18; Spur 10: WT B1 Nr. 1 II 19;

Spur 11: WT B1 Nr. 1 II 38; Spur 12: WT B1 Nr. 1 II 40

15.3.2 Ergebnisse für WT pHPNE19-02.1 Nr. 1 | 2

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15

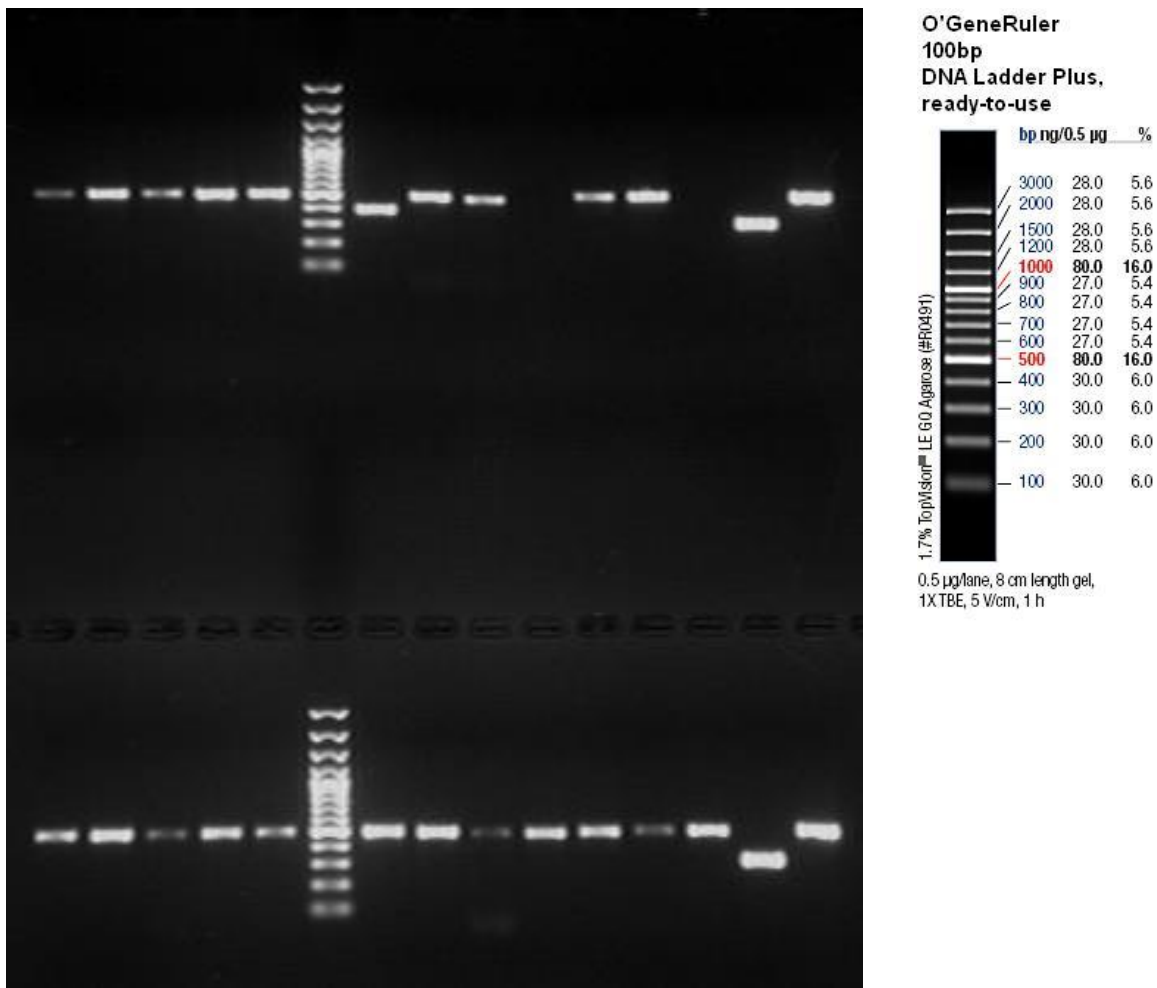


Abbildung 15-2 Agarosegel der *marR*-PCR für WT pHPNE19-02.1 Nr. 1 | 2

Das erwartete Amplicon hatte eine Größe von 484 bp. Insgesamt wurden 23 einzelne Kulturen aufgetragen.

TAE-Agarosegel, 1,0%, 1-fach E-Puffer, 100 V; Ethidiumbromidfärbung

oben

Spur 1: Nr. 13; Spur 2: Nr. 14; Spur 3: Nr. 15; Spur 4: Nr. 16; Spur 5: Nr. 17;

Spur 6: DNA-Größenmarker; Spur 7: Nr. 18; Spur 8: Nr. 19; Spur 9: Nr. 20;

Spur 10: Nr. 21; Spur 11: Nr. 22; Spur 12: Nr. 23; Spur 13: NTC; Spur 14: MII; Spur 15: WT

unten

Spur 1: Nr. 1; Spur 2: Nr. 2; Spur 3: Nr. 3; Spur 4: Nr. 4; Spur 5: Nr. 5;

Spur 6: DNA-Größenmarker; Spur 7: Nr. 6; Spur 8: Nr. 7; Spur 9: Nr. 8;

Spur 10: Nr. 9; Spur 11: Nr. 10; Spur 12: Nr. 11; Spur 13: Nr. 12; Spur 14: MII; Spur 15: WT

15.3.3 WT-K pHPNE18-01.1, WT-K pHPNE19-02.1; WT-K pUC19

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18

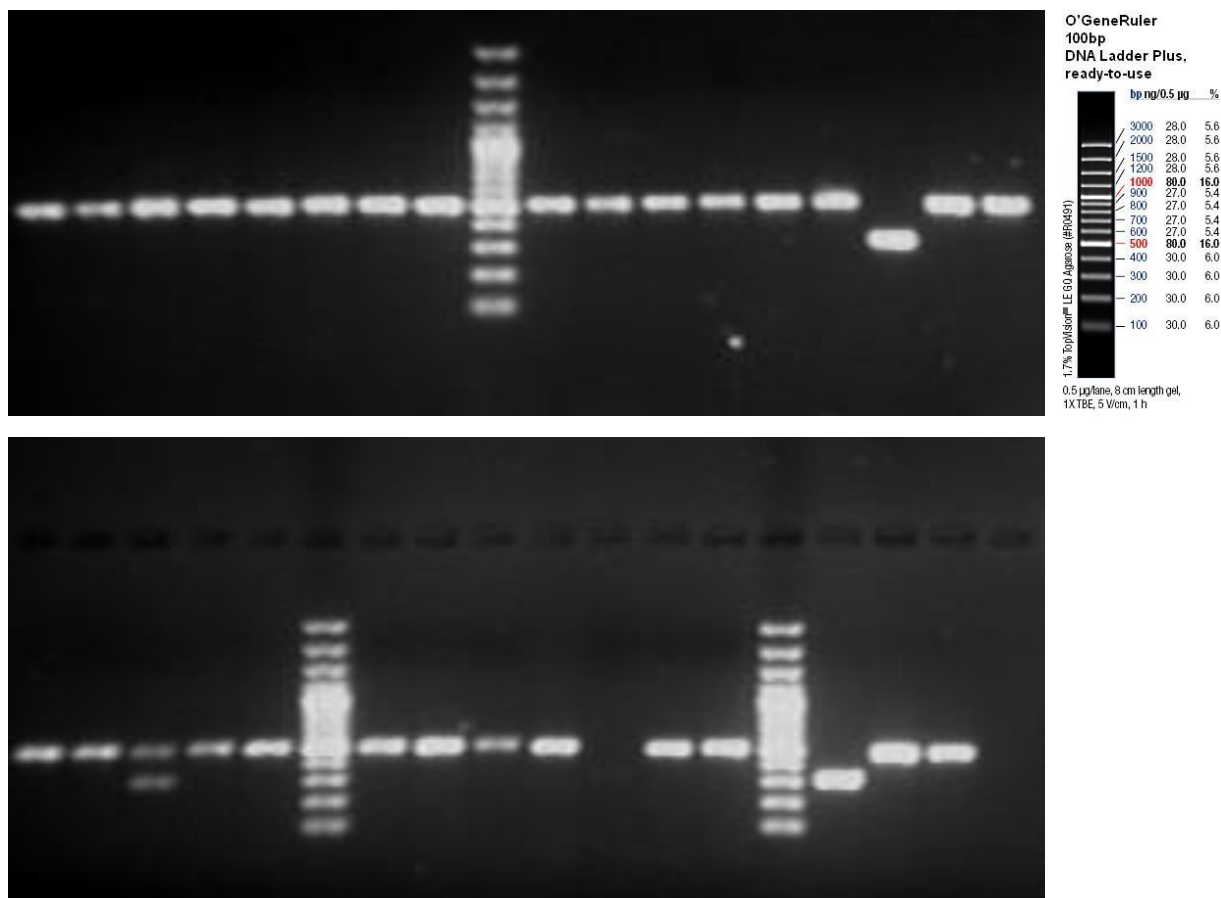


Abbildung 15-3 Agarosegel *marR*-PCR für WT-K

TAE-Agarosegel, 1,0%, 1-fach E-Puffer, 100 V; Ethidiumbromidfärbung

A: pHPNE19-02.1; B: pHPNE18-01.1

oben

Spur 1: WT-K A Nr. 2 3; Spur 2: WT-K A Nr. 2 18; Spur 3: WT-K A Nr. 2 24;
Spur 4: WT-K A Nr. 2 34; Spur 5: WT-K A Nr. 2 35; Spur 6: WT-K A Nr. 2 37;
Spur 7: WT-K A Nr. 2 44; Spur 8: WT-K A Nr. 2 45; Spur 9: DNA-Größenmarker;
Spur 10: WT-K B Nr. 2 1; Spur 11: WT-K B Nr. 2 8;
Spur 12: WT-K B Nr. 2 19; Spur 13: WT-K B Nr. 2 23; Spur 14: WT-K B Nr. 2 26;
Spur 15: WT-K B Nr. 2 27; Spur 16: MII; Spur 17: WT; Spur 18: WT-K A Nr. 1 I 2 6

unten

Spur 1: WT-K B Nr. 2 4; Spur 2: WT-K B Nr. 2 9; Spur 3: WT-K B Nr. 2 22;
Spur 4: WT-K B Nr. 2 24; Spur 5: WT-K B Nr. 2 34; Spur 6: DNA-Größenmarker;
Spur 7: WT-K pUC19 Nr. 5; Spur 8: WT-K pUC19 Nr. 6; Spur 9: WT-K pUC19 Nr. 9;
Spur 10: WT-K pUC19 Nr. 11; Spur 11: WT-K pUC19 Nr. 14; Spur 12: WT-K pUC19 Nr. 33;
Spur 13: WT-K pUC19 Nr. 45; Spur 14: DNA-Größenmarker; Spur 15: MII; Spur 16: WT;
Spur 17: WT A Nr. 1 I 2 6

15.3.4 Ergebnisse Untersuchung *marR*-RFLP

Zuerst gibt eine Tabelle den Überblick, hinter welcher Probennummer sich welcher Stamm verbirgt. Anschließend sind die Ergebnisse Agarose-Gelelektrophoresen zu sehen in den folgenden Bildern.

Tabelle 15-5 Detaillierte Ansicht Ergebnisse Screening

Stämme mit internen Bezeichnungen genannt; A:

pHPNE19-02.1 (QnrA1); B: pHPNE18-01.1 (QnrB1)

Nr.	Stamm	Nr.	Stamm
1	WT A Nr. 2 I 10	28	WT pUC19 Nr. 14
2	WT A Nr. 1 I 33	29	WT pUC19 Nr. 17
3	WT B Nr. 1 II 40	30	WT pUC19 Nr. 2
4	WT A Nr. 1 I 50	31	WT pUC19 Nr. 4
5	WT A Nr. 2 I 29	32	WT K A Nr. 2 24
6	WT B Nr. 1 II 18	33	WT K A Nr. 2 45
7	WT B Nr. 1 II 19	34	WT K B Nr. 2 4
8	WT B Nr. 1 II 15	35	WT K B Nr. 2 24
9	WT B Nr. 1 II 38	36	WT K B Nr. 2 22
10	WT A Nr. 1 I 19	37	WT K B Nr. 1 19
11	WT A Nr. 2 I 43	38	WT K B Nr. 1 1
12	WT A Nr. 1 I 39	39	WT K B Nr. 1 27
13	WT A Nr. 2 I 35	40	WT K B Nr. 1 26
14	WT A Nr. 2 I 18	41	WT pUC19 Nr. 3
15	WT B Nr. 1 I 1	42	WT K A Nr. 2 37
16	WT B Nr. 1 I 57	43	WT pUC19 Nr. 1
17	WT A Nr. 1 I 2	44	WT K pUC19 Nr. 5
18	WT B Nr. 1 I 32	45	WT K pUC19 Nr. 6
19	WT B Nr. 1 I 4	46	WT K A Nr. 2 18
20	WT B Nr. 1 II 13	47	WT K pUC19 Nr. 14
21	WT A Nr. 2 I 31	48	WT K pUC19 Nr. 9
22	WT K B Nr. 1 23	49	WT K A Nr. 2 3
23	WT pUC19 Nr. 5	50	WT K pUC19 Nr. 45
24	WT K A Nr. 2 44	51	WT K pUC19 Nr. 33
25	WT K A Nr. 2 35	52	WT K pUC19 Nr. 11
26	WT K B Nr. 2 34	53	WT K B Nr. 2 9
27	WT K A Nr. 2 34	54	WT K B Nr. 1 8

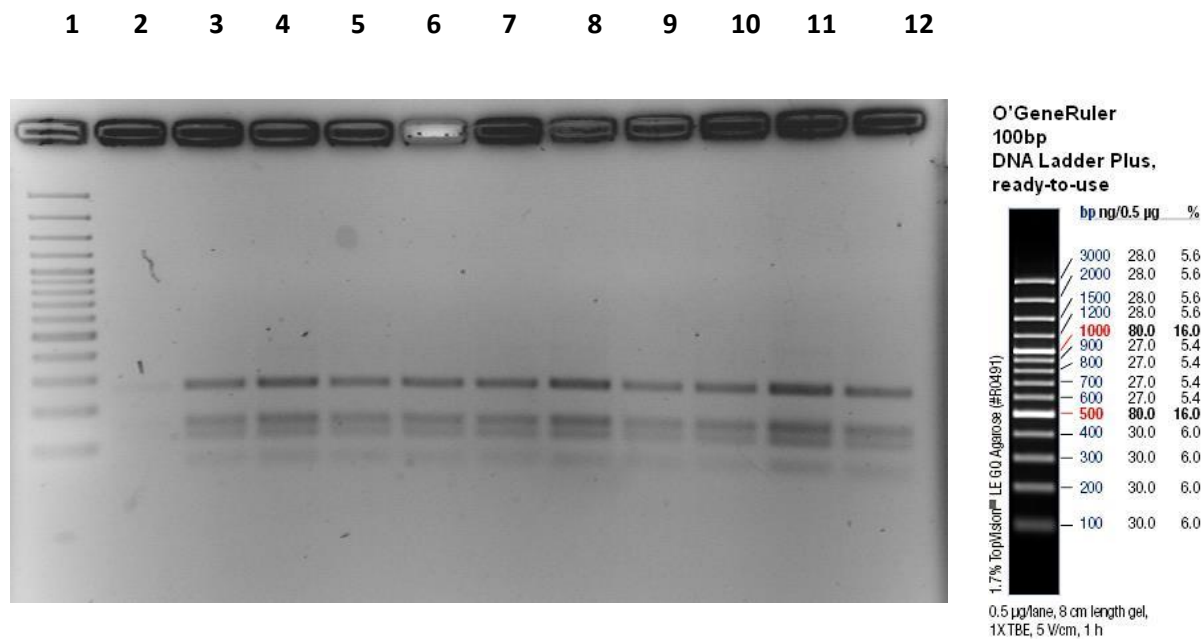


Abbildung 15-4 Gelbild 1 Agarosegelelektrophorese nach Verdau mit Sau3A1 (FastDigest)

Jeweils 12 µl Restriktionsansatz aufgetragen, interne Bezeichnungen der Stämme

TAE-Agarosegel, 1,5%, 1-fach E-Puffer, 100 V; Ethidiumbromidfärbung;

A: pHPNE19-02.1 (QnrA1); B: pHPNE18-01.1 (QnrB1)

Spur 1: DNA-Größenmarker 100 bp; Spur 2: WT A Nr. 2 I 10; Spur 3: WT A Nr. 1 I 33,

Spur 4: WT B Nr. 1 II 40; Spur 5: A Nr. 1 I 50; Spur 6: WT A Nr. 2 I 29;

Spur 7: WT B Nr. 1 II 18; Spur 8: WT B Nr. 1 II 19; Spur 9: WT B Nr. 1 II 15;

Spur 10: WT B Nr. 1 II 38; Spur 11: WT A Nr. 1 I 19; Spur 11: WT A Nr. 2 I 43

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12

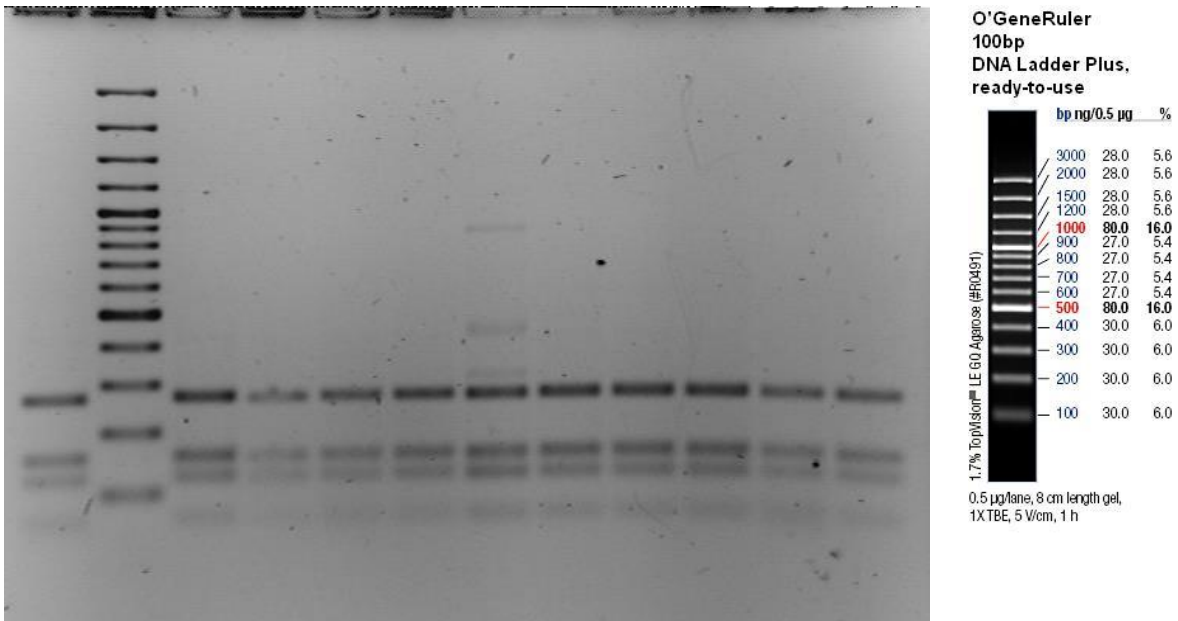


Abbildung 15-5 Gelbild 2 Agarosegelelektrophorese nach Verdau mit Sau3A1 FD

Jeweils 12 µl Restriktionsansatz aufgetragen, interne Bezeichnungen der Stämme

TAE-Agarosegel, 1,5%, 1-fach E-Puffer, 100 V; Ethidiumbromidfärbung

A: pHPNE19-02.1 (QnrA1); B: pHPNE18-01.1 (QnrB1)

Spur 1: WT A Nr. 1 I 39; Spur 2: DNA-Größenmarker 100 bp; Spur 3: WT A Nr. 2 I 35;

Spur 4: WT A Nr. 2 I 18; Spur 5: WT B Nr. 1 I 1; Spur 6: WT B Nr. 1 I 57;

Spur 7: WT A Nr. 1 I 2; Spur 8: WT B Nr. 1 I 32; Spur 9: WT B Nr. 1 I 4;

Spur 10: WT B Nr. 1 II 13; Spur 11: WT A Nr. 2 I 31; Spur 12: WT-K B Nr. 1 23

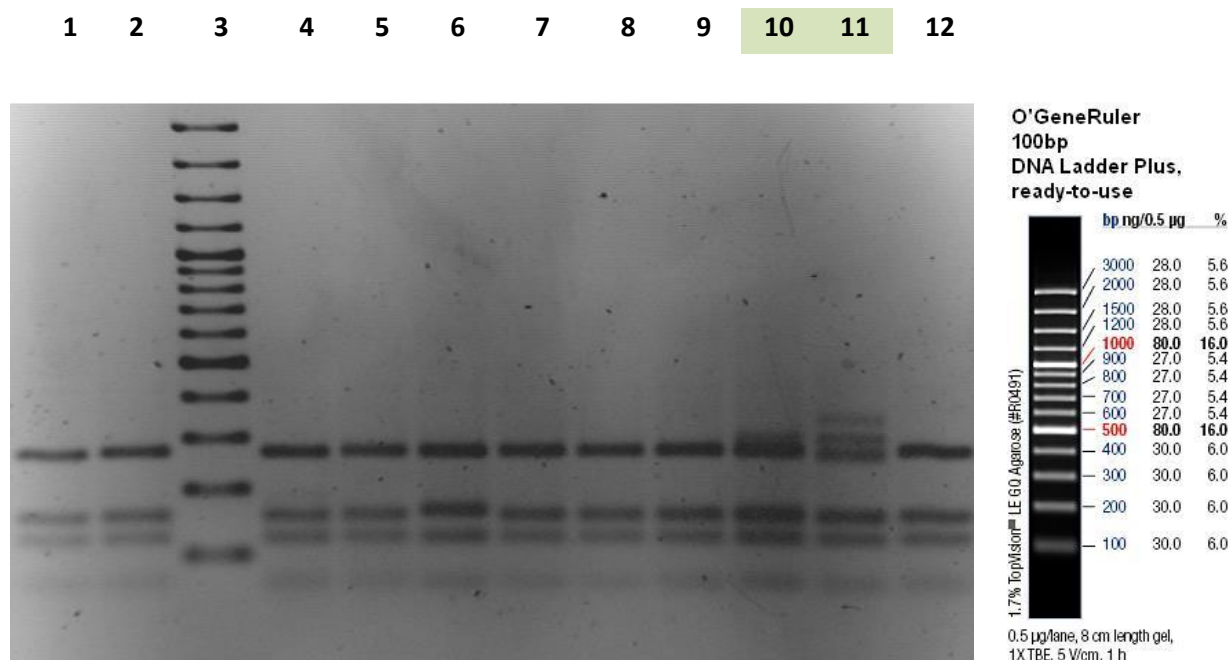


Abbildung 15-6 Gelbild 3 Agarosegelelektrophorese nach Verdau mit *Sau3A1* FD

Jeweils 12 µl Restriktionsansatz aufgetragen, interne Bezeichnungen der Stämme

TAE-Agarosegel, 1,5%, 1-fach E-Puffer, 100 V; Ethidiumbromidfärbung

A: pHPNE19-02.1 (QnrA1); B: pHPNE18-01.1 (QnrB1)

Spur 1: WT pUC19 Nr. 5; Spur 2: WT-K A Nr. 2 44; Spur 3: DNA-Größenmarker 100 bp;

Spur 4: WT-K A Nr. 2 35; Spur 5: WT-K B Nr. 2 34; Spur 6: WT-K A Nr. 2 34;

Spur 7: WT pUC19 Nr. 14; Spur 8: WT pUC19 Nr. 17; Spur 9: WT pUC 19 Nr. 2;

Spur 10: WT pUC19 Nr. 4; Spur 11: WT-K A Nr. 2 24; Spur 12: WT-K A Nr. 2 45

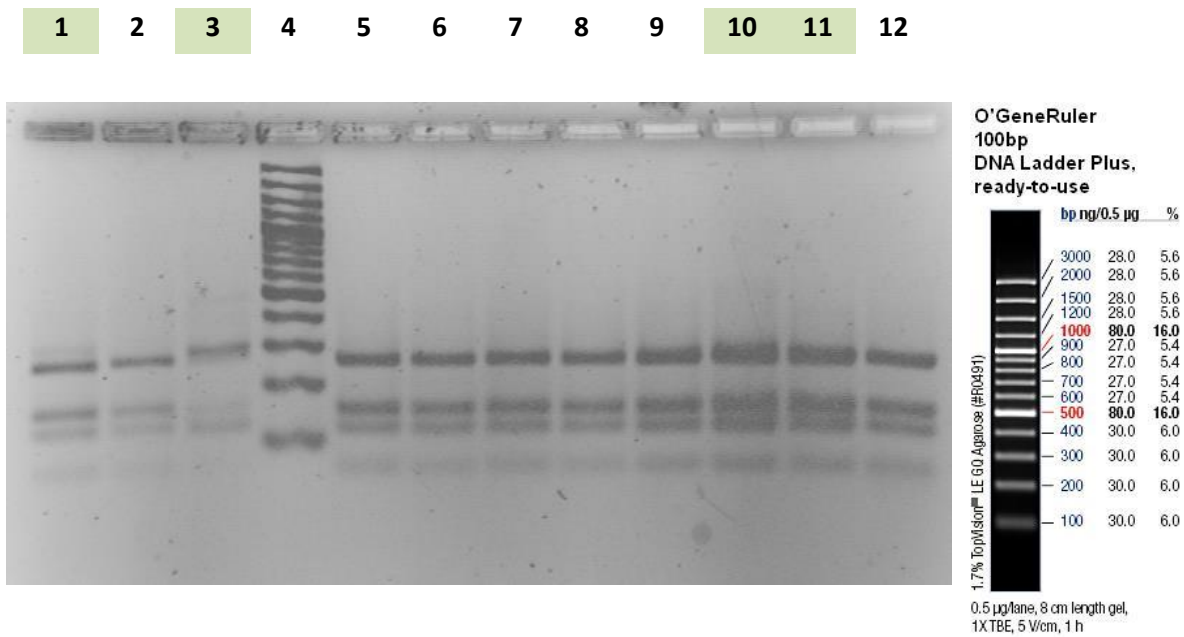


Abbildung 15-7 Gelbild 4 Agarosegelelektrophorese nach Verdau mit *Sau3A1* FD

Jeweils 12 µl Restriktionsansatz aufgetragen, interne Bezeichnungen der Stämme

TAE-Agarosegel, 1,5%, 1-fach E-Puffer, 100 V; Ethidiumbromidfärbung

A: pHPNE19-02.1 (QnrA1); B: pHPNE18-01.1 (QnrB1)

Spur 1: WT-K B Nr. 2 4; Spur 2: WT-K B Nr. 2 24; Spur 3: WT-K B Nr. 2 22;

Spur 4: DNA-Größenmarker 100 bp; Spur 5: WT-K B Nr. 1 19; Spur 6: WT-K B Nr. 1 1;

Spur 7: WT-K B Nr. 1 27; Spur 8: WT-K B Nr. 1 26; Spur 9: WT pUC19 Nr. 3;

Spur 10: WT-K A Nr. 2 37; Spur 11: WT pUC19 Nr. 1; Spur 12: WT-K pUC19 Nr. 5

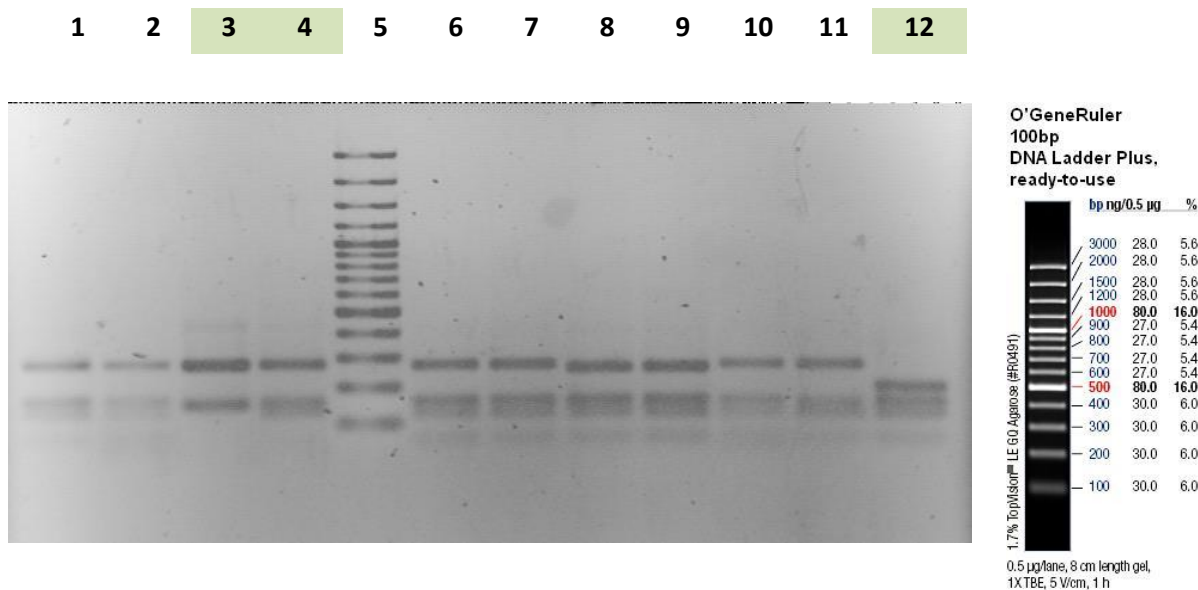


Abbildung 15-8 Gelbild 5 Agarosegelelektrophorese nach Verdau mit *Sau3A1* FD

Jeweils 12 µl Restriktionsansatz aufgetragen, interne Bezeichnungen der Stämme.

TAE-Agarosegel, 1,0%, 1-fach E-Puffer, 100 V; Ethidiumbromidfärbung

A: pHPNE19-02.1 (QnrA1); B: pHPNE18-01.1 (QnrB1)

Spur 1: WT-K pUC19 Nr. 6; Spur 2: WT-K A Nr.2 18; Spur 3: WT-K pUC19 Nr. 14;

Spur 4: WT-K pUC 9; Spur 5: DNA Größenmarker 100 bp; Spur 6: WT-K A Nr. 2 3;

Spur 7; WT-K pUC19 Nr. 45; Spur 8: WT-K pUC19 Nr. 33; Spur 9: WT-K pUC19 Nr. 11;

Spur 10: WT-K B Nr.2 9; Spur 11: WT-K B Nr. 1 8; Spur 12: MIII

15.4 Ergebnisse der Sequenzanalyse

15.4.1 Sequenzierung der QRDR bei WT-Mutanten

Tabelle 15-6 Ergebnisse der Sequenzanalyse für *gyrA* der WT-Mutanten

A: pHPNE19-02.1; B: pHPNE18-01.1; Gelb unterlegt sind Bereiche, die bei allen untersuchten Sequenzen homolog sind. Blau eingefärbte Sequenzen sind nicht bei allen untersuchten Sequenzen homolog

	81	160
<i>gyrA</i> CFT073	(81)	GGTCATTGTTGGCCGTGCGCTGCCAGATG TCCGAGATGGCC TGAAGCCGGTACACCGTCGCGTACTTTACGCCATGAACG
<i>gyrA</i> MIIQ	(81)	GGTCATTGTTGGCCGTGCGCTGCCAGATG TCCGAGATGGCC TGAAGCCGGTACACCGTCGCGTACTTTACGCCATGAACG
A 1 I2 <i>gyrA</i> -fw	(57)	GGTCATTGTTGGCCGTGCGCTGCCAGATG TCCGAGATGGCC TGAAGCCGGTACACCGTCGCGTACTTTACGCCATGAACG
A 1 I33 <i>gyrA</i> -fw	(68)	GGTCATTGTTGGCCGTGCGCTGCCAGATG TCCGAGATGGCC TGAAGCCGGTACACCGTCGCGTACTTTACGCCATGAACG
A 1 I39 <i>gyrA</i> -fw	(68)	GGTCATTGTTGGCCGTGCGCTGCCAGATG TCCGAGATGGCC TGAAGCCGGTACACCGTCGCGTACTTTACGCCATGAACG
A 1 I50 <i>gyrA</i> -fw	(68)	GGTCATTGTTGGCCGTGCGCTGCCAGATG TCCGAGATGGCC TGAAGCCGGTACACCGTCGCGTACTTTACGCCATGAACG
A 2 I10 <i>gyrA</i> -fw	(68)	GGTCATTGTTGGCCGTGCGCTGCCAGATG TCCGAGATGGCC TGAAGCCGGTACACCGTCGCGTACTTTACGCCATGAACG
A 2 I18 <i>gyrA</i> -fw	(53)	GGTCATTGTTGGCCGTGCGCTGCCAGATG TCCGAGATGGCC TGAAGCCGGTACACCGTCGCGTACTTTACGCCATGAACG
A 2 I29 <i>gyrA</i> -fw	(1)	-----TCCGAGATGGCC TGAAGCCGGTACACCGTCGCGTACTTTACGCCATGAACG
A 2 I31 <i>gyrA</i> -fw	(67)	GGTCATTGTTGGCCGTGCGCTGCCAGATG TCCGAGATGGCC TGAAGCCGGTACACCGTCGCGTACTTTACGCCATGAACG
A 2 I35 <i>gyrA</i> fw	(18)	GGTCATTGTTGGCCGTGCGCTGCCAGATG TCCGAGATGGCC TGAAGCCGGTACACCGTCGCGTACTTTACGCCATGAACG
A 2 I43 <i>gyrA</i> -fw	(68)	GGTCATTGTTGGCCGTGCGCTGCCAGATG TCCGAGATGGCC TGAAGCCGGTACACCGTCGCGTACTTTACGCCATGAACG
B 1 I1 <i>gyrA</i> -fw	(68)	GGTCATTGTTGGCCGTGCGCTGCCAGATG TCCGAGATGGCC TGAAGCCGGTACACCGTCGCGTACTTTACGCCATGAACG
B 1 I4 <i>gyrA</i> -fw	(66)	GGTCATTGTTGGCCGTGCGCTGCCAGATG TCCGAGATGGCC TGAAGCCGGTACACCGTCGCGTACTTTACGCCATGAACG
B 1 I32 <i>gyrA</i> -fw	(68)	GGTCATTGTTGGCCGTGCGCTGCCAGATG TCCGAGATGGCC TGAAGCCGGTACACCGTCGCGTACTTTACGCCATGAACG
B 1 I57 <i>gyrA</i> -fw	(1)	-----GGCCGTGCGCTGCCAGATG TCCGAGATGGCC TGAAGCCGGTACACCGTCGCGTACTTTACGCCATGAACG
B 1 II13 <i>gyrA</i> -fw	(1)	-----GGCCGTGCGCTGCCAGATG TCCGAGATGGCC TGAAGCCGGTACACCGTCGCGTACTTTACGCCATGAACG
B 1 II18 <i>gyrA</i> fw	(68)	GGTCATTGTTGGCCGTGCGCTGCCAGATG TCCGAGATGGCC TGAAGCCGGTACACCGTCGCGTACTTTACGCCATGAACG
B 1 II19 <i>gyrA</i> fw	(75)	GGTCATTGTTGGCCGTGCGCTGCCAGATG TCCGAGATGGCC TGAAGCCGGTACACCGTCGCGTACTTTACGCCATGAACG
B 1 II38 <i>gyrA</i> fw	(68)	GGTCATTGTTGGCCGTGCGCTGCCAGATG TCCGAGATGGCC TGAAGCCGGTACACCGTCGCGTACTTTACGCCATGAACG
B 1 II40 <i>gyrA</i> fw	(68)	GGTCATTGTTGGCCGTGCGCTGCCAGATG TCCGAGATGGCC TGAAGCCGGTACACCGTCGCGTACTTTACGCCATGAACG
B 1 II15 <i>gyrA</i> fw	(68)	GGTCATTGTTGGCCGTGCGCTGCCAGATG TCCGAGATGGCC TGAAGCCGGTACACCGTCGCGTACTTTACGCCATGAACG
	161	240
<i>gyrA</i> CFT073	(161)	TACTAGGCAATGACTGGAACAAAGCCTATAAAAAATCTGCCCGTGTTCGTTGGTGACGTAATCGGTAATACCATCCCCAT
<i>gyrA</i> MIIQ	(161)	TACTAGGCAATGACTGGAACAAAGCCTATAAAAAATCTGCCCGTGTTCGTTGGTGACGTAATCGGTAATACCATCCCCAT
A 1 I2 <i>gyrA</i> -fw	(137)	TACTAGGCAATGACTGGAACAAAGCCTATAAAAAATCTGCCCGTGTTCGTTGGTGACGTAATCGGTAATACCATCCCCAT
A 1 I33 <i>gyrA</i> -fw	(148)	TACTAGGCAATGACTGGAACAAAGCCTATAAAAAATCTGCCCGTGTTCGTTGGTGACGTAATCGGTAATACCATCCCCAT
A 1 I39 <i>gyrA</i> -fw	(148)	TACTAGGCAATGACTGGAACAAAGCCTATAAAAAATCTGCCCGTGTTCGTTGGTGACGTAATCGGTAATACCATCCCCAT
A 1 I50 <i>gyrA</i> -fw	(148)	TACTAGGCAATGACTGGAACAAAGCCTATAAAAAATCTGCCCGTGTTCGTTGGTGACGTAATCGGTAATACCATCCCCAT
A 2 I10 <i>gyrA</i> -fw	(148)	TACTAGGCAATGACTGGAACAAAGCCTATAAAAAATCTGCCCGTGTTCGTTGGTGACGTAATCGGTAATACCATCCCCAT
A 2 I18 <i>gyrA</i> -fw	(133)	TACTAGGCAATGACTGGAACAAAGCCTATAAAAAATCTGCCCGTGTTCGTTGGTGACGTAATCGGTAATACCATCCCCAT
A 2 I29 <i>gyrA</i> -fw	(52)	TACTAGGCAATGACTGGAACAAAGCCTATAAAAAATCTGCCCGTGTTCGTTGGTGACGTAATCGGTAATACCATCCCCAT
A 2 I31 <i>gyrA</i> -fw	(147)	TACTAGGCAATGACTGGAACAAAGCCTATAAAAAATCTGCCCGTGTTCGTTGGTGACGTAATCGGTAATACCATCCCCAT
A 2 I35 <i>gyrA</i> fw	(98)	TACTAGGCAATGACTGGAACAAAGCCTATAAAAAATCTGCCCGTGTTCGTTGGTGACGTAATCGGTAATACCATCCCCAT
A 2 I43 <i>gyrA</i> -fw	(148)	TACTAGGCAATGACTGGAACAAAGCCTATAAAAAATCTGCCCGTGTTCGTTGGTGACGTAATCGGTAATACCATCCCCAT
B 1 I1 <i>gyrA</i> -fw	(148)	TACTAGGCAATGACTGGAACAAAGCCTATAAAAAATCTGCCCGTGTTCGTTGGTGACGTAATCGGTAATACCATCCCCAT
B 1 I4 <i>gyrA</i> -fw	(146)	TACTAGGCAATGACTGGAACAAAGCCTATAAAAAATCTGCCCGTGTTCGTTGGTGACGTAATCGGTAATACCATCCCCAT
B 1 I32 <i>gyrA</i> -fw	(148)	TACTAGGCAATGACTGGAACAAAGCCTATAAAAAATCTGCCCGTGTTCGTTGGTGACGTAATCGGTAATACCATCCCCAT
B 1 I57 <i>gyrA</i> -fw	(71)	TACTAGGCAATGACTGGAACAAAGCCTATAAAAAATCTGCCCGTGTTCGTTGGTGACGTAATCGGTAATACCATCCCCAT
B 1 II13 <i>gyrA</i> -fw	(71)	TACTAGGCAATGACTGGAACAAAGCCTATAAAAAATCTGCCCGTGTTCGTTGGTGACGTAATCGGTAATACCATCCCCAT
B 1 II18 <i>gyrA</i> fw	(148)	TACTAGGCAATGACTGGAACAAAGCCTATAAAAAATCTGCCCGTGTTCGTTGGTGACGTAATCGGTAATACCATCCCCAT
B 1 II19 <i>gyrA</i> fw	(155)	TACTAGGCAATGACTGGAACAAAGCCTATAAAAAATCTGCCCGTGTTCGTTGGTGACGTAATCGGTAATACCATCCCCAT
B 1 II38 <i>gyrA</i> fw	(148)	TACTAGGCAATGACTGGAACAAAGCCTATAAAAAATCTGCCCGTGTTCGTTGGTGACGTAATCGGTAATACCATCCCCAT
B 1 II40 <i>gyrA</i> fw	(148)	TACTAGGCAATGACTGGAACAAAGCCTATAAAAAATCTGCCCGTGTTCGTTGGTGACGTAATCGGTAATACCATCCCCAT
B 1 II15 <i>gyrA</i> fw	(148)	TACTAGGCAATGACTGGAACAAAGCCTATAAAAAATCTGCCCGTGTTCGTTGGTGACGTAATCGGTAATACCATCCCCAT
	241	320
<i>gyrA</i> CFT073	(241)	GGTGACTCGGCCGTTTATGACACGATCGTCCGATG GCGCAGCCATTCTCGCTGCGTTACATGCTGGTAGACGGTCAGGG
<i>gyrA</i> MIIQ	(241)	GGTGACTCGGCCGTTTATGACACGATCGTCCGATG GCGCAGCCATTCTCGCTGCGTTACATGCTGGTAGACGGTCAGGG
A 1 I2 <i>gyrA</i> -fw	(217)	GGTGACTCGGCCGTTTATGACACGATCGTCCGATG GCGCAGCCATTCTCGCTGCGTTACATGCTGGTAGACGGTCAGGG
A 1 I33 <i>gyrA</i> -fw	(228)	GGTGACTCGGCCGTTTATGACACGATCGTCCGATG GCGCAGCCATTCTCGCTGCGTTACATGCTGGTAGACGGTCAGGG
A 1 I39 <i>gyrA</i> -fw	(228)	GGTGACTCGGCCGTTTATGACACGATCGTCCGATG GCGCAGCCATTCTCGCTGCGTTACATGCTGGTAGACGGTCAGGG
A 1 I50 <i>gyrA</i> -fw	(228)	GGTGACTCGGCCGTTTATGACACGATCGTCCGATG GCGCAGCCATTCTCGCTGCGTTACATGCTGGTAGACGGTCAGGG
A 2 I10 <i>gyrA</i> -fw	(228)	GGTGACTCGGCCGTTTATGACACGATCGTCCGATG GCGCAGCCATTCTCGCTGCGTTACATGCTGGTAGACGGTCAGGG
A 2 I18 <i>gyrA</i> -fw	(213)	GGTGACTCGGCCGTTTATGACACGATCGTCCGATG GCGCAGCCATTCTCGCTGCGTTACATGCTGGTAGACGGTCAGGG
A 2 I29 <i>gyrA</i> -fw	(132)	GGTGACTCGGCCGTTTATGACACGATCGTCCGATG GCGCAGCCATTCTCGCTGCGTTACATGCTGGTAGACGGTCAGGG
A 2 I31 <i>gyrA</i> -fw	(227)	GGTGACTCGGCCGTTTATGACACGATCGTCCGATG GCGCAGCCATTCTCGCTGCGTTACATGCTGGTAGACGGTCAGGG
A 2 I35 <i>gyrA</i> fw	(178)	GGTGACTCGGCCGTTTATGACACGATCGTCCGATG-----
A 2 I43 <i>gyrA</i> -fw	(228)	GGTGACTCGGCCGTTTATGACACGATCGTCCGATG GCGCAGCCATTCTCGCTGCGTTACATGCTGGTAGACGGTCAGGG
B 1 I1 <i>gyrA</i> -fw	(228)	GGTGACTCGGCCGTTTATGACACGATCGTCCGATG GCGCAGCCATTCTCGCTGCGTTACATGCTGGTAGACGGTCAGGG
B 1 I4 <i>gyrA</i> -fw	(226)	GGTGACTCGGCCGTTTATGACACGATCGTCCGATG GCGCAGCCATTCTCGCTGCGTTACATGCTGGTAGACGGTCAGGG
B 1 I32 <i>gyrA</i> -fw	(228)	GGTGACTCGGCCGTTTATGACACGATCGTCCGATG GCGCAGCCATTCTCGCTGCGTTACATGCTGGTAGACGGTCAGGG
B 1 I57 <i>gyrA</i> -fw	(151)	GGTGACTCGGCCGTTTATGACACGATCGTCCGATG GCGCAGCCATTCTCGCTGCGTTACATGCTGGTAGACGGTCAGGG
B 1 II13 <i>gyrA</i> -fw	(151)	GGTGACTCGGCCGTTTATGACACGATCGTCCGATG GCGCAGCCATTCTCGCTGCGTTACATGCTGGTAGACGGTCAGGG
B 1 II18 <i>gyrA</i> fw	(228)	GGTGACTCGGCCGTTTATGACACGATCGTCCGATG GCGCAGCCATTCTCGCTGCGTTACATGCTGGTAGACGGTCAGGG
B 1 II19 <i>gyrA</i> fw	(235)	GGTGACTCGGCCGTTTATGACACGATCGTCCGATG GCGCAGCCATTCTCGCTGCGTTACATGCTGGTAGACGGTCAGGG
B 1 II38 <i>gyrA</i> fw	(228)	GGTGACTCGGCCGTTTATGACACGATCGTCCGATG GCGCAGCCATTCTCGCTGCGTTACATGCTGGTAGACGGTCAGGG
B 1 II40 <i>gyrA</i> fw	(228)	GGTGACTCGGCCGTTTATGACACGATCGTCCGATG GCGCAGCCATTCTCGCTGCGTTACATGCTGGTAGACGGTCAGGG
B 1 II15 <i>gyrA</i> fw	(228)	GGTGACTCGGCCGTTTATGACACGATCGTCCGATG GCGCAGCCATTCTCGCTGCGTTACATGCTGGTAGACGGTCAGGG

Tabelle 15-7 Abbildung 15-9 Ergebnisse der Sequenzanalyse für *parC* der WT-Mutanten

A: pHPNE19-02.1; B: pHPNE18-01.1; Gelb unterlegt sind Bereiche, die bei allen untersuchten Sequenzen homolog sind. Blau eingefärbte Sequenzen sind nicht bei allen untersuchten Sequenzen homolog.

		81		160
parC CFT073	(81)	GGACCGTGC	TTATGGT	ATGCTGAAACCTGTT
parC MIIQ	(81)	GGACCGTGC	TTATGGT	ATGCTGAAACCTGTT
A 2 I10 parC-fw	(31)	GGACCGTGC	TTATGGT	ATGCTGAAACCTGTT
A 2 I43 parC-fw	(40)	GGACCGTGC	TTATGGT	ATGCTGAAACCTGTT
B 1 I1 parC-fw	(45)	GGACCGTGC	TTATGGT	ATGCTGAAACCTGTT
B 1 I4 parC-fw	(40)	GGACCGTGC	TTATGGT	ATGCTGAAACCTGTT
B 1 I32 parC-fw	(49)	GGACCGTGC	TTATGGT	ATGCTGAAACCTGTT
B 1 I57 parC-fw	(1)	-GACCGTGC	TTATGGT	ATGCTGAAACCTGTT
B 1 II13 parC-fw	(45)	GGACCGTGC	TTATGGT	ATGCTGAAACCTGTT
B 1 II18 parC-fw	(45)	GGACCGTGC	TTATGGT	ATGCTGAAACCTGTT
B 1 II19 parC-fw	(45)	GGACCGTGC	TTATGGT	ATGCTGAAACCTGTT
B 1 II40 parC-fw	(45)	GGACCGTGC	TTATGGT	ATGCTGAAACCTGTT
		161		240
parC CFT073	(161)	TGAATGCC	AGCGCCAAATTTAAAAAATCGCCCGTACC	CGTCCGTTACCGTACGTTACCGTAAATACCATCCG
parC MIIQ	(161)	TGAATGCC	AGCGCCAAATTTAAAAAATCGCCCGTACC	CGTCCGTTACCGTACGTTACCGTAAATACCATCCG
A 2 I10 parC-fw	(111)	TGAATGCC	AGCGCCAAATTTAAAAAATCGCCCGTACC	CGTCCGTTACCGTACGTTACCGTAAATACCATCCG
A 2 I43 parC-fw	(120)	TGAATGCC	AGCGCCAAATTTAAAAAATCGCCCGTACC	CGTCCGTTACCGTACGTTACCGTAAATACCATCCG
B 1 I1 parC-fw	(125)	TGAATGCC	AGCGCCAAATTTAAAAAATCGCCCGTACC	CGTCCGTTACCGTACGTTACCGTAAATACCATCCG
B 1 I4 parC-fw	(120)	TGAATGCC	AGCGCCAAATTTAAAAAATCGCCCGTACC	CGTCCGTTACCGTACGTTACCGTAAATACCATCCG
B 1 I32 parC-fw	(129)	TGAATGCC	AGCGCCAAATTTAAAAAATCGCCCGTACC	CGTCCGTTACCGTACGTTACCGTAAATACCATCCG
B 1 I57 parC-fw	(80)	TGAATGCC	AGCGCCAAATTTAAAAAATCGCCCGTACC	CGTCCGTTACCGTACGTTACCGTAAATACCATCCG
B 1 II13 parC-fw	(125)	TGAATGCC	AGCGCCAAATTTAAAAAATCGCCCGTACC	CGTCCGTTACCGTACGTTACCGTAAATACCATCCG
B 1 II18 parC-fw	(125)	TGAATGCC	AGCGCCAAATTTAAAAAATCGCCCGTACC	CGTCCGTTACCGTACGTTACCGTAAATACCATCCG
B 1 II19 parC-fw	(125)	TGAATGCC	AGCGCCAAATTTAAAAAATCGCCCGTACC	CGTCCGTTACCGTACGTTACCGTAAATACCATCCG
B 1 II40 parC-fw	(125)	TGAATGCC	AGCGCCAAATTTAAAAAATCGCCCGTACC	CGTCCGTTACCGTACGTTACCGTAAATACCATCCG
		241		320
parC CFT073	(241)	GCCTGTTAT	GAAGCGATGGTCTGATGGCGAGCCGTTCTCTTACC	GTATCCCGTGGTGGTATGGTTCAGGGAACTGGGG
parC MIIQ	(241)	GCCTGTTAT	GAAGCGATGGTCTGATGGCGAGCCGTTCTCTTACC	GTATCCCGTGGTGGTATGGTTCAGGGAACTGGGG
A 2 I10 parC-fw	(191)	GCCTGTTAT	GAAGCGATGGTCTGATGGCGAGCCGTTCTCTTACC	GTATCCCGTGGTGGTATGGTTCAGGGAACTGGGG
A 2 I43 parC-fw	(200)	GCCTGTTAT	GAAGCGATGGTCTGATGGCGAGCCGTTCTCTTACC	GTATCCCGTGGTGGTATGGTTCAGGGAACTGGGG
B 1 I1 parC-fw	(205)	GCCTGTTAT	GAAGCGATGGTCTGATGGCGAGCCGTTCTCTTACC	GTATCCCGTGGTGGTATGGTTCAGGGAACTGGGG
B 1 I4 parC-fw	(200)	GCCTGTTAT	GAAGCGATGGTCTGATGGCGAGCCGTTCTCTTACC	GTATCCCGTGGTGGTATGGTTCAGGGAACTGGGG
B 1 I32 parC-fw	(209)	GCCTGTTAT	GAAGCGATGGTCTGATGGCGAGCCGTTCTCTTACC	GTATCCCGTGGTGGTATGGTTCAGGGAACTGGGG
B 1 I57 parC-fw	(160)	GCCTGTTAT	GAAGCGATGGTCTGATGGCGAGCCGTTCTCTTACC	GTATCCCGTGGTGGTATGGTTCAGGGAACTGGGG
B 1 II13 parC-fw	(205)	GCCTGTTAT	GAAGCGATGGTCTGATGGCGAGCCGTTCTCTTACC	GTATCCCGTGGTGGTATGGTTCAGGGAACTGGGG
B 1 II18 parC-fw	(205)	GCCTGTTAT	GAAGCGATGGTCTGATGGCGAGCCGTTCTCTTACC	GTATCCCGTGGTGGTATGGTTCAGGGAACTGGGG
B 1 II19 parC-fw	(205)	GCCTGTTAT	GAAGCGATGGTCTGATGGCGAGCCGTTCTCTTACC	GTATCCCGTGGTGGTATGGTTCAGGGAACTGGGG
B 1 II40 parC-fw	(205)	GCCTGTTAT	GAAGCGATGGTCTGATGGCGAGCCGTTCTCTTACC	GTATCCCGTGGTGGTATGGTTCAGGGAACTGGGG

Tabelle 15-8 Ergebnisse der Sequenzanalyse für *parE* der WT-Mutanten

A: pHPNE19-02.1; B: pHPNE18-01.1; Gelb unterlegt sind Bereiche, die bei allen untersuchten Sequenzen homolog sind. Blau eingefärbte Sequenzen sind nicht bei allen untersuchten Sequenzen homolog.

		1201		1280
parE CFT073	(1201)	TTGGCTGACTGTACC	CGCGCAGGATCTTAACCGTACC	GAACTATTCCCTGTGGAAGGTGACTCCG
parE MIIQ	(1201)	TTGGCTGACTGTACC	CGCGCAGGATCTTAACCGTACC	GAACTATTCCCTGTGGAAGGTGACTCCG
A 1 I2 parE-fw	(1)	-----	-----	-----
A 1 I19 parE-fw	(1)	-----	-----	-----
A 1 I33 parE-fw	(1)	-----	-----	-----
A 1 I39 parE-fw	(1)	-----	-----	-----
A 1 I50 parE-fw	(1)	-----	-----	-----
A 2 I31 parE-fw	(1)	-----	-----	-----
A 2 I35 parE-fw	(1)	-----	-----	-----
A 2 I43 parE-fw	(1)	-----	-----	-----
B 1 I1 parE-fw	(1)	-----	-----	-----
B 1 I4 parE-fw	(1)	-----	-----	-----
B 1 I32 parE-fw	(1)	-----	-----	-----
B 1 II13 parE-fw	(1)	-----	-----	-----
B 1 II15 parE-fw	(1)	-----	-----	-----
B 1 II18 parE-fw	(1)	-----	-----	-----
B 1 II19 parE-fw	(1)	-----	-----	-----
B 1 II40 parE-fw	(1)	-----	-----	-----
		1281		1360
parE CFT073	(1281)	GCAGGCGCGGATCGCGAATATCAGGCGATCATGCCACTGAAAGGTAAGATCCTTAACCTGGGAAGTCTCTCCGACG		
parE MIIQ	(1281)	GCAGGCGCGGATCGCGAATATCAGGCGATCATGCCACTGAAAGGTAAGATCCTTAACCTGGGAAGTCTCTCCGACG		
A 1 I2 parE-fw	(31)	GCAGGCGCGGATCGCGAATATCAGGCGATCATGCCACTGAAAGGTAAGATCCTTAACCTGGGAAGTCTCTCCGACG		
A 1 I19 parE-fw	(33)	GCAGGCGCGGATCGCGAATATCAGGCGATCATGCCACTGAAAGGTAAGATCCTTAACCTGGGAAGTCTCTCCGACG		
A 1 I33 parE-fw	(41)	GCAGGCGCGGATCGCGAATATCAGGCGATCATGCCACTGAAAGGTAAGATCCTTAACCTGGGAAGTCTCTCCGACG		
A 1 I39 parE-fw	(41)	GCAGGCGCGGATCGCGAATATCAGGCGATCATGCCACTGAAAGGTAAGATCCTTAACCTGGGAAGTCTCTCCGACG		
A 1 I50 parE-fw	(41)	GCAGGCGCGGATCGCGAATATCAGGCGATCATGCCACTGAAAGGTAAGATCCTTAACCTGGGAAGTCTCTCCGACG		
A 2 I31 parE-fw	(53)	GCAGGCGCGGATCGCGAATATCAGGCGATCATGCCACTGAAAGGTAAGATCCTTAACCTGGGAAGTCTCTCCGACG		
A 2 I35 parE-fw	(54)	GCAGGCGCGGATCGCGAATATCAGGCGATCATGCCACTGAAAGGTAAGATCCTTAACCTGGGAAGTCTCTCCGACG		
A 2 I43 parE-fw	(53)	GCAGGCGCGGATCGCGAATATCAGGCGATCATGCCACTGAAAGGTAAGATCCTTAACCTGGGAAGTCTCTCCGACG		
B 1 I1 parE-fw	(40)	GCAGGCGCGGATCGCGAATATCAGGCGATCATGCCACTGAAAGGTAAGATCCTTAACCTGGGAAGTCTCTCCGACG		
B 1 I4 parE-fw	(53)	GCAGGCGCGGATCGCGAATATCAGGCGATCATGCCACTGAAAGGTAAGATCCTTAACCTGGGAAGTCTCTCCGACG		
B 1 I32 parE-fw	(55)	GCAGGCGCGGATCGCGAATATCAGGCGATCATGCCACTGAAAGGTAAGATCCTTAACCTGGGAAGTCTCTCCGACG		

B 1 II13 parE-fw	(41)	GCAGGCGCGCATCGCGAATATCAGGCGATCATGCCACTGAAAGGTAAGATCCTTAAACACCTGGGAAGTCTCTCCGACG
B 1 II15 parE-fw	(53)	GCAGGCGCGCATCGCGAATATCAGGCGATCATGCCACTGAAAGGTAAGATCCTTAAACACCTGGGAAGTCTCTCCGACG
B 1 II18 parE-fw	(55)	GCAGGCGCGCATCGCGAATATCAGGCGATCATGCCACTGAAAGGTAAGATCCTTAAACACCTGGGAAGTCTCTCCGACG
B 1 II19 parE-fw	(55)	GCAGGCGCGCATCGCGAATATCAGGCGATCATGCCACTGAAAGGTAAGATCCTTAAACACCTGGGAAGTCTCTCCGACG
B 1 II40 parE-fw	(53)	GCAGGCGCGCATCGCGAATATCAGGCGATCATGCCACTGAAAGGTAAGATCCTTAAACACCTGGGAAGTCTCTCCGACG
		1361
parE CFT073	(1361)	AAGTGTGGCTTCGCGAGGAAGTGCACGATATTCGGTAGCTATCGGTATCGATCCTGACAGCGACGATTTGAGCCAGCTT
parE MIIQ	(1361)	AAGTGTGGCTTCGCGAGGAAGTGCACGATATTCGGTAGCTATCGGTATCGATCCTGACAGCGACGATTTGAGCCAGCTT
A 1 I2 parE-fw	(111)	AAGTGTGGCTTCGCGAGGAAGTGCACGATATTCGGTAGCTATCGGTATCGATCCTGACAGCGACGATTTGAGCCAGCTT
A 1 I19 parE-fw	(113)	AAGTGTGGCTTCGCGAGGAAGTGCACGATATTCGGTAGCTATCGGTATCGATCCTGACAGCGACGATTTGAGCCAGCTT
A 1 I33 parE-fw	(121)	AAGTGTGGCTTCGCGAGGAAGTGCACGATATTCGGTAGCTATCGGTATCGATCCTGACAGCGACGATTTGAGCCAGCTT
A 1 I39 parE-fw	(121)	AAGTGTGGCTTCGCGAGGAAGTGCACGATATTCGGTAGCTATCGGTATCGATCCTGACAGCGACGATTTGAGCCAGCTT
A 1 I50 parE-fw	(121)	AAGTGTGGCTTCGCGAGGAAGTGCACGATATTCGGTAGCTATCGGTATCGATCCTGACAGCGACGATTTGAGCCAGCTT
A 2 I31 parE-fw	(133)	AAGTGTGGCTTCGCGAGGAAGTGCACGATATTCGGTAGCTATCGGTATCGATCCTGACAGCGACGATTTGAGCCAGCTT
A 2 I35 parE-fw	(134)	AAGTGTGGCTTCGCGAGGAAGTGCACGATATTCGGTAGCTATCGGTATCGATCCTGACAGCGACGATTTGAGCCAGCTT
A 2 I43 parE-fw	(133)	AAGTGTGGCTTCGCGAGGAAGTGCACGATATTCGGTAGCTATCGGTATCGATCCTGACAGCGACGATTTGAGCCAGCTT
B 1 I1 parE-fw	(120)	AAGTGTGGCTTCGCGAGGAAGTGCACGATATTCGGTAGCTATCGGTATCGATCCTGACAGCGACGATTTGAGCCAGCTT
B 1 I4 parE-fw	(133)	AAGTGTGGCTTCGCGAGGAAGTGCACGATATTCGGTAGCTATCGGTATCGATCCTGACAGCGACGATTTGAGCCAGCTT
B 1 I32 parE-fw	(135)	AAGTGTGGCTTCGCGAGGAAGTGCACGATATTCGGTAGCTATCGGTATCGATCCTGACAGCGACGATTTGAGCCAGCTT
B 1 II13 parE-fw	(121)	AAGTGTGGCTTCGCGAGGAAGTGCACGATATTCGGTAGCTATCGGTATCGATCCTGACAGCGACGATTTGAGCCAGCTT
B 1 II15 parE-fw	(133)	AAGTGTGGCTTCGCGAGGAAGTGCACGATATTCGGTAGCTATCGGTATCGATCCTGACAGCGACGATTTGAGCCAGCTT
B 1 II18 parE-fw	(135)	AAGTGTGGCTTCGCGAGGAAGTGCACGATATTCGGTAGCTATCGGTATCGATCCTGACAGCGACGATTTGAGCCAGCTT
B 1 II19 parE-fw	(135)	AAGTGTGGCTTCGCGAGGAAGTGCACGATATTCGGTAGCTATCGGTATCGATCCTGACAGCGACGATTTGAGCCAGCTT
B 1 II40 parE-fw	(133)	AAGTGTGGCTTCGCGAGGAAGTGCACGATATTCGGTAGCTATCGGTATCGATCCTGACAGCGACGATTTGAGCCAGCTT
		1441
parE CFT073	(1441)	CGTTACGGCAAGATCTGTATCCTGGCGGATGCTGACTCCGATGGTCTGCACATTTGCCACGCTGCTCTGGCCTTTGTTTGT
parE MIIQ	(1441)	CGTTACGGCAAGATCTGTATCCTGGCGGATGCTGACTCCGATGGTCTGCACATTTGCCACGCTGCTCTGGCCTTTGTTTGT
A 1 I2 parE-fw	(191)	CGTTACGGCAAGATCTGTATCCTGGCGGATGCTGACTCCGATGGTCTGCACATTTGCCACGCTGCTCTGGCCTTTGTTTGT
A 1 I19 parE-fw	(193)	CGTTACGGCAAGATCTGTATCCTGGCGGATGCTGACTCCGATGGTCTGCACATTTGCCACGCTGCTCTGGCCTTTGTTTGT
A 1 I33 parE-fw	(201)	CGTTACGGCAAGATCTGTATCCTGGCGGATGCTGACTCCGATGGTCTGCACATTTGCCACGCTGCTCTGGCCTTTGTTTGT
A 1 I39 parE-fw	(201)	CGTTACGGCAAGATCTGTATCCTGGCGGATGCTGACTCCGATGGTCTGCACATTTGCCACGCTGCTCTGGCCTTTGTTTGT
A 1 I50 parE-fw	(201)	CGTTACGGCAAGATCTGTATCCTGGCGGATGCTGACTCCGATGGTCTGCACATTTGCCACGCTGCTCTGGCCTTTGTTTGT
A 2 I31 parE-fw	(213)	CGTTACGGCAAGATCTGTATCCTGGCGGATGCTGACTCCGATGGTCTGCACATTTGCCACGCTGCTCTGGCCTTTGTTTGT
A 2 I35 parE-fw	(214)	CGTTACGGCAAGATCTGTATCCTGGCGGATGCTGACTCCGATGGTCTGCACATTTGCCACGCTGCTCTGGCCTTTGTTTGT
A 2 I43 parE-fw	(213)	CGTTACGGCAAGATCTGTATCCTGGCGGATGCTGACTCCGATGGTCTGCACATTTGCCACGCTGCTCTGGCCTTTGTTTGT
B 1 I1 parE-fw	(200)	CGTTACGGCAAGATCTGTATCCTGGCGGATGCTGACTCCGATGGTCTGCACATTTGCCACGCTGCTCTGGCCTTTGTTTGT
B 1 I4 parE-fw	(213)	CGTTACGGCAAGATCTGTATCCTGGCGGATGCTGACTCCGATGGTCTGCACATTTGCCACGCTGCTCTGGCCTTTGTTTGT
B 1 I32 parE-fw	(215)	CGTTACGGCAAGATCTGTATCCTGGCGGATGCTGACTCCGATGGTCTGCACATTTGCCACGCTGCTCTGGCCTTTGTTTGT
B 1 II13 parE-fw	(201)	CGTTACGGCAAGATCTGTATCCTGGCGGATGCTGACTCCGATGGTCTGCACATTTGCCACGCTGCTCTGGCCTTTGTTTGT
B 1 II15 parE-fw	(213)	CGTTACGGCAAGATCTGTATCCTGGCGGATGCTGACTCCGATGGTCTGCACATTTGCCACGCTGCTCTGGCCTTTGTTTGT
B 1 II18 parE-fw	(215)	CGTTACGGCAAGATCTGTATCCTGGCGGATGCTGACTCCGATGGTCTGCACATTTGCCACGCTGCTCTGGCCTTTGTTTGT
B 1 II19 parE-fw	(215)	CGTTACGGCAAGATCTGTATCCTGGCGGATGCTGACTCCGATGGTCTGCACATTTGCCACGCTGCTCTGGCCTTTGTTTGT
B 1 II40 parE-fw	(213)	CGTTACGGCAAGATCTGTATCCTGGCGGATGCTGACTCCGATGGTCTGCACATTTGCCACGCTGCTCTGGCCTTTGTTTGT
		1521
parE CFT073	(1521)	AAAAACACTTCCGCGCATTGGTGAACACCGGTCACGTTTACGTTGCACTGCCACCGCTCTACCGTATTGACCTCGGAAAG
parE MIIQ	(1521)	AAAAACACTTCCGCGCATTGGTGAACACCGGTCACGTTTACGTTGCACTGCCACCGCTCTACCGTATTGACCTCGGAAAG
A 1 I2 parE-fw	(271)	AAAAACACTTCCGCGCATTGGTGAACACCGGTCACGTTTACGTTGCACTGCCACCGCTCTACCGTATTGACCTCGGAAAG
A 1 I19 parE-fw	(273)	AAAAACACTTCCGCGCATTGGTGAACACCGGTCACGTTTACGTTGCACTGCCACCGCTCTACCGTATTGACCTCGGAAAG
A 1 I33 parE-fw	(281)	AAAAACACTTCCGCGCATTGGTGAACACCGGTCACGTTTACGTTGCACTGCCACCGCTCTACCGTATTGACCTCGGAAAG
A 1 I39 parE-fw	(281)	AAAAACACTTCCGCGCATTGGTGAACACCGGTCACGTTTACGTTGCACTGCCACCGCTCTACCGTATTGACCTCGGAAAG
A 1 I50 parE-fw	(281)	AAAAACACTTCCGCGCATTGGTGAACACCGGTCACGTTTACGTTGCACTGCCACCGCTCTACCGTATTGACCTCGGAAAG
A 2 I31 parE-fw	(293)	AAAAACACTTCCGCGCATTGGTGAACACCGGTCACGTTTACGTTGCACTGCCACCGCTCTACCGTATTGACCTCGGAAAG
A 2 I35 parE-fw	(294)	AAAAACACTTCCGCGCATTGGTGAACACCGGTCACGTTTACGTTGCACTGCCACCGCTCTACCGTATTGACCTCGGAAAG
A 2 I43 parE-fw	(293)	AAAAACACTTCCGCGCATTGGTGAACACCGGTCACGTTTACGTTGCACTGCCACCGCTCTACCGTATTGACCTCGGAAAG
B 1 I1 parE-fw	(280)	AAAAACACTTCCGCGCATTGGTGAACACCGGTCACGTTTACGTTGCACTGCCACCGCTCTACCGTATTGACCTCGGAAAG
B 1 I4 parE-fw	(293)	AAAAACACTTCCGCGCATTGGTGAACACCGGTCACGTTTACGTTGCACTGCCACCGCTCTACCGTATTGACCTCGGAAAG
B 1 I32 parE-fw	(295)	AAAAACACTTCCGCGCATTGGTGAACACCGGTCACGTTTACGTTGCACTGCCACCGCTCTACCGTATTGACCTCGGAAAG
B 1 II13 parE-fw	(281)	AAAAACACTTCCGCGCATTGGTGAACACCGGTCACGTTTACGTTGCACTGCCACCGCTCTACCGTATTGACCTCGGAAAG
B 1 II15 parE-fw	(293)	AAAAACACTTCCGCGCATTGGTGAACACCGGTCACGTTTACGTTGCACTGCCACCGCTCTACCGTATTGACCTCGGAAAG
B 1 II18 parE-fw	(295)	AAAAACACTTCCGCGCATTGGTGAACACCGGTCACGTTTACGTTGCACTGCCACCGCTCTACCGTATTGACCTCGGAAAG
B 1 II19 parE-fw	(295)	AAAAACACTT-----
B 1 II40 parE-fw	(293)	AAAAACACTTCCGCGCATTGGTGAACACCGGTCACGTTTACGTTGCACTGCCACCGCTCTACCGTATTGACCTCGGAAAG

15.4.2 Ergebnisse der Sequenzanalyse für *E. coli* MII (GK573)

Tabelle 15-9 Ergebnisse der Sequenzanalyse für *gyrA* der MII-Mutanten

A: pHPNE19-02.1; B: pHPNE18-01.1; Gelb unterlegt sind Bereiche, die bei allen untersuchten Sequenzen homolog sind. Blau eingefärbte Sequenzen sind nicht bei allen untersuchten Sequenzen homolog.

<i>gyrA</i> CFT073	(81)	GGTCATTGTTGGCCGTGCGCTGCCAGATGTCGAGATGGCCTGAAGCCGGTACACCGTTCGCGTACTTTACGCCATGAACG	81
<i>gyrA</i> MIIQ	(81)	GGTCATTGTTGGCCGTGCGCTGCCAGATGTCGAGATGGCCTGAAGCCGGTACACCGTTCGCGTACTTTACGCCATGAACG	81
AI34 <i>gyrA</i> -fw	(67)	GGTCATTGTTGGCCGTGCGCTGCCAGATGTCGAGATGGCCTGAAGCCGGTACACCGTTCGCGTACTTTACGCCATGAACG	
AI43 <i>gyrA</i> -fw	(68)	GGTCATTGTTGGCCGTGCGCTGCCAGATGTCGAGATGGCCTGAAGCCGGTACACCGTTCGCGTACTTTACGCCATGAACG	
AI46 <i>gyrA</i> -fw	(57)	GGTCATTGTTGGCCGTGCGCTGCCAGATGTCGAGATGGCCTGAAGCCGGTACACCGTTCGCGTACTTTACGCCATGAACG	
AI50 <i>gyrA</i> -fw	(57)	GGTCATTGTTGGCCGTGCGCTGCCAGATGTCGAGATGGCCTGAAGCCGGTACACCGTTCGCGTACTTTACGCCATGAACG	
AI118 <i>gyrA</i> -fw	(67)	GGTCATTGTTGGCCGTGCGCTGCCAGATGTCGAGATGGCCTGAAGCCGGTACACCGTTCGCGTACTTTACGCCATGAACG	
AI129 <i>gyrA</i> -fw	(42)	GGTCATTGTTGGCCGTGCGCTGCCAGATGTCGAGATGGCCTGAAGCCGGTACACCGTTCGCGTACTTTACGCCATGAACG	
AI1m.u. <i>gyrA</i> -fw	(69)	GGTCATTGTTGGCCGTGCGCTGCCAGATGTCGAGATGGCCTGAAGCCGGTACACCGTTCGCGTACTTTACGCCATGAACG	
AI119 <i>gyrA</i> -fw	(43)	GGTCATTGTTGGCCGTGCGCTGCCAGATGTCGAGATGGCCTGAAGCCGGTACACCGTTCGCGTACTTTACGCCATGAACG	
AI1110 <i>gyrA</i> -fw	(70)	GGTCATTGTTGGCCGTGCGCTGCCAGATGTCGAGATGGCCTGAAGCCGGTACACCGTTCGCGTACTTTACGCCATGAACG	

BI38	gyrA-fw	(68)	GGTCATTGTTGGCCGTGCGCTGCCAGATGCCAGATGGCCCTGAAGCCGGTACACCGTCGCGTACTTTACGCCATGAACG
BI16	gyrA-fw	(68)	GGTCATTGTTGGCCGTGCGCTGCCAGATGCCAGATGGCCCTGAAGCCGGTACACCGTCGCGTACTTTACGCCATGAACG
BII18	gyrA-fw	(68)	GGTCATTGTTGGCCGTGCGCTGCCAGATGCCAGATGGCCCTGAAGCCGGTACACCGTCGCGTACTTTACGCCATGAACG
BII19	gyrA-fw	(68)	GGTCATTGTTGGCCGTGCGCTGCCAGATGCCAGATGGCCCTGAAGCCGGTACACCGTCGCGTACTTTACGCCATGAACG
BII23	gyrA-fw	(68)	GGTCATTGTTGGCCGTGCGCTGCCAGATGCCAGATGGCCCTGAAGCCGGTACACCGTCGCGTACTTTACGCCATGAACG
BIII14	gyrA-fw	(68)	GGTCATTGTTGGCCGTGCGCTGCCAGATGCCAGATGGCCCTGAAGCCGGTACACCGTCGCGTACTTTACGCCATGAACG
			161
	gyrA CFT073	(161)	TACTAGGCAATGACTGGAACAAAGCCTATAAAAAATCTGCCCGTGTCTGGTGACGTAATCGGTAATACCATCCCCAT
	gyrA MIIQ	(161)	TACTAGGCAATGACTGGAACAAAGCCTATAAAAAATCTGCCCGTGTCTGGTGACGTAATCGGTAATACCATCCCCAT
AI34	gyrA-fw	(147)	TACTAGGCAATGACTGGAACAAAGCCTATAAAAAATCTGCCCGTGTCTGGTGACGTAATCGGTAATACCATCCCCAT
AI43	gyrA-fw	(148)	TACTAGGCAATGACTGGAACAAAGCCTATAAAAAATCTGCCCGTGTCTGGTGACGTAATCGGTAATACCATCCCCAT
AI46	gyrA-fw	(137)	TACTAGGCAATGACTGGAACAAAGCCTATAAAAAATCTGCCCGTGTCTGGTGACGTAATCGGTAATACCATCCCCAT
AI50	gyrA-fw	(137)	TACTAGGCAATGACTGGAACAAAGCCTATAAAAAATCTGCCCGTGTCTGGTGACGTAATCGGTAATACCATCCCCAT
AI118	gyrA-fw	(147)	TACTAGGCAATGACTGGAACAAAGCCTATAAAAAATCTGCCCGTGTCTGGTGACGTAATCGGTAATACCATCCCCAT
AI129	gyrA-fw	(122)	TACTAGGCAATGACTGGAACAAAGCCTATAAAAAATCTGCCCGTGTCTGGTGACGTAATCGGTAATACCATCCCCAT
AIIm. u.	gyrA-fw	(149)	TACTAGGCAATGACTGGAACAAAGCCTATAAAAAATCTGCCCGTGTCTGGTGACGTAATCGGTAATACCATCCCCAT
AI119	gyrA-fw	(123)	TACTAGGCAATGACTGGAACAAAGCCTATAAAAAATCTGCCCGTGTCTGGTGACGTAATCGGTAATACCATCCCCAT
AI1110	gyrA-fw	(150)	TACTAGGCAATGACTGGAACAAAGCCTATAAAAAATCTGCCCGTGTCTGGTGACGTAATCGGTAATACCATCCCCAT
BI38	gyrA-fw	(148)	TACTAGGCAATGACTGGAACAAAGCCTATAAAAAATCTGCCCGTGTCTGGTGACGTAATCGGTAATACCATCCCCAT
BI16	gyrA-fw	(148)	TACTAGGCAATGACTGGAACAAAGCCTATAAAAAATCTGCCCGTGTCTGGTGACGTAATCGGTAATACCATCCCCAT
BII18	gyrA-fw	(148)	TACTAGGCAATGACTGGAACAAAGCCTATAAAAAATCTGCCCGTGTCTGGTGACGTAATCGGTAATACCATCCCCAT
BII19	gyrA-fw	(148)	TACTAGGCAATGACTGGAACAAAGCCTATAAAAAATCTGCCCGTGTCTGGTGACGTAATCGGTAATACCATCCCCAT
BII23	gyrA-fw	(148)	TACTAGGCAATGACTGGAACAAAGCCTATAAAAAATCTGCCCGTGTCTGGTGACGTAATCGGTAATACCATCCCCAT
BIII14	gyrA-fw	(148)	TACTAGGCAATGACTGGAACAAAGCCTATAAAAAATCTGCCCGTGTCTGGTGACGTAATCGGTAATACCATCCCCAT
			241
	gyrA CFT073	(241)	GGTGACTGGCCGTTTATGACACGATCGTCCGATGGCCGAGCCATTCTCGTGCCTTACATGCTGGTAGACGGTCAGGG
	gyrA MIIQ	(241)	GGTGACTGGCCGTTTATGACACGATCGTCCGATGGCCGAGCCATTCTCGTGCCTTACATGCTGGTAGACGGTCAGGG
AI34	gyrA-fw	(227)	GGTGACTGGCCGTTTATGACACGATCGTCCGATGGCCGAGCCATTCTCGTGCCTTACATGCTGGTAGACGGTCAGGG
AI43	gyrA-fw	(228)	GGTGACTGGCCGTTTATGACACGATCGTCCGATGGCCGAGCCATTCTCGTGCCTTACATGCTGGTAGACGGTCAGGG
AI46	gyrA-fw	(217)	GGTGACTGGCCGTTTATGACACGATCGTCCGATGGCCGAGCCATTCTCGTGCCTTACATGCTGGTAGACGGTCAGGG
AI50	gyrA-fw	(217)	GGTGACTGGCCGTTTATGACACGATCGTCCGATGGCCGAGCCATTCTCGTGCCTTACATGCTGGTAGACGGTCAGGG
AI118	gyrA-fw	(227)	GGTGACTGGCCGTTTATGACACGATCGTCCGATGGCCGAGCCATTCTCGTGCCTTACATGCTGGTAGACGGTCAGGG
AI129	gyrA-fw	(202)	GGTGACTGGCCGTTTATGACACGATCGTCCGATGGCCGAGCCATTCTCGTGCCTTACATGCTGGTAGACGGTCAGGG
AIIm. u.	gyrA-fw	(229)	GGTGACTGGCCGTTTATGACACGATCGTCCGATGGCCGAGCCATTCTCGTGCCTTACATGCTGGTAGACGGTCAGGG
AI119	gyrA-fw	(203)	GGTGACTGGCCGTTTATGACACGATCGTCCGATGGCCGAGCCATTCTCGTGCCTTACATGCTGGTAGACGGTCAGGG
AI1110	gyrA-fw	(230)	GGTGACTGGCCGTTTATGACACGATCGTCCGATGGCCGAGCCATTCTCGTGCCTTACATGCTGGTAGACGGTCAGGG
BI38	gyrA-fw	(228)	GGTGACTGGCCGTTTATGACACGATCGTCCGATGGCCGAGCCATTCTCGTGCCTTACATGCTGGTAGACGGTCAGGG
BI16	gyrA-fw	(228)	GGTGACTGGCCGTTTATGACACGATCGTCCGATGGCCGAGCCATTCTCGTGCCTTACATGCTGGTAGACGGTCAGGG
BII18	gyrA-fw	(228)	GGTGACTGGCCGTTTATGACACGATCGTCCGATGGCCGAGCCATTCTCGTGCCTTACATGCTGGTAGACGGTCAGGG
BII19	gyrA-fw	(228)	GGTGACTGGCCGTTTATGACACGATCGTCCGATGGCCGAGCCATTCTCGTGCCTTACATGCTGGTAGACGGTCAGGG
BII23	gyrA-fw	(228)	GGTGACTGGCCGTTTATGACACGATCGTCCGATGGCCGAGCCATTCTCGTGCCTTACATGCTGGTAGACGGTCAGGG
BIII14	gyrA-fw	(228)	GGTGACTGGCCGTTTATGACACGATCGTCCGATGGCCGAGCCATTCTCGTGCCTTACATGCTGGTAGACGGTCAGGG
			321
	gyrA CFT073	(321)	TAACTTCGGTTCATCGACGGCGACTCTGCGGGCGCAATGCGTTATACGGAAATCCGCTCTGGCGAAAATGGCCATGAAC
	gyrA MIIQ	(321)	TAACTTCGGTTCATCGACGGCGACTCTGCGGGCGCAATGCGTTATACGGAAATCCGCTCTGGCGAAAATGGCCATGAAC
AI34	gyrA-fw	(307)	TAACTTCGGTTCATCGACGGCGACTCTGCGGGCGCAATGCGTTATACGGAAATCCGCTCTGGCGAAAATGGCCATGAAC
AI43	gyrA-fw	(308)	TAACTTCGGTTCATCGACGGCGACTCTGCGGGCGCAATGCGTTATACGGAAATCCGCTCTGGCGAAAATGGCCATGAAC
AI46	gyrA-fw	(297)	TAACTTCGGTTCATCGACGGCGACTCTGCGGGCGCAATGCGTTATACGGAAATCCGCTCTGGCGAAAATGGCCATGAAC
AI50	gyrA-fw	(297)	TAACTTCGGTTCATCGACGGCGACTCTGCGGGCGCAATGCGTTATACGGAAATCCGCTCTGGCGAAAATGGCCATGAAC
AI118	gyrA-fw	(307)	TAACTTCGGTTCATCGACGGCGACTCTGCGGGCGCAATGCGTTATACGGAAATCCGCTCTGGCGAAAATGGCCATGAAC
AI129	gyrA-fw	(282)	TAACTTCGGTTCATCGACGGCGACTCTGCGGGCGCAATGCGTTATACGGAAATCCGCTCTGGCGAAAATGGCCATGAAC
AIIm. u.	gyrA-fw	(309)	TAACTTCGGTTCATCGACGGCGACTCTGCGGGCGCAATGCGTTATACGGAAATCCGCTCTGGCGAAAATGGCCATGAAC
AI119	gyrA-fw	(283)	TAACTTCGGTTCATCGACGGCGACTCTGCGGGCGCAATGCGTTATACGGAAATCCGCTCTGGCGAAAATGGCCATGAAC
AI1110	gyrA-fw	(310)	TAACTTCGGTTCATCGACGGCGACTCTGCGGGCGCAATGCGTTATACGGAAATCCGCTCTGGCGAAAATGGCCATGAAC
BI38	gyrA-fw	(308)	TAACTTCGGTTCATCGACGGCGACTCTGCGGGCGCAATGCGTTATACGGAAATCCGCTCTGGCGAAAATGGCCATGAAC
BI16	gyrA-fw	(308)	TAACTTCGGTTCATCGACGGCGACTCTGCGGGCGCAATGCGTTATACGGAAATCCGCTCTGGCGAAAATGGCCATGAAC
BII18	gyrA-fw	(308)	TAACTTCGGTTCATCGACGGCGACTCTGCGGGCGCAATGCGTTATACGGAAATCCGCTCTGGCGAAAATGGCCATGAAC
BII19	gyrA-fw	(308)	TAACTTCGGTTCATCGACGGCGACTCTGCGGGCGCAATGCGTTATACGGAAATCCGCTCTGGCGAAAATGGCCATGAAC
BII23	gyrA-fw	(308)	TAACTTCGGTTCATCGACGGCGACTCTGCGGGCGCAATGCGTTATACGGAAATCCGCTCTGGCGAAAATGGCCATGAAC
BIII14	gyrA-fw	(308)	TAACTTCGGTTCATCGACGGCGACTCTGCGGGCGCAATGCGTTATACGGAAATCCGCTCTGGCGAAAATGGCCATGAAC

Tabelle 15-10 Ergebnisse der Sequenzanalyse für *parC* der MII-Mutanten

A: pHPNE19-02.1; B: pHPNE18-01.1;

Bei MIIQ ist an Position 372 ein Basenaustausch von G zu T zu sehen, der zu einer stillen Mutation führt [27]. Gelb unterlegt sind Bereiche, die bei allen untersuchten Sequenzen homolog sind. Blau eingefärbte Sequenzen sind nicht bei allen untersuchten Sequenzen homolog.

			1		80
NC_004431	(1)	ATGAGCGATATGGC	AGAGCGCCTTGCCTACATGA	AATTTACGGAAAACGCCTACTTAAACTACTCCATGTACGTGATCAT	
MIIQ parC	(1)	ATGAGCGATATGGC	AGAGCGCCTTGCCTACATGA	AATTTACGGAAAACGCCTACTTAAACTACTCCATGTACGTGATCAT	
AI34 parC-fw	(1)	-----GC	AGAGCGCCTTGCCTACATGA	AATTTACGGAAAACGCCTACTTAAACTACTCCATGTACGTGATCAT	
AI43 parC-fw	(1)	-----GC	AGAGCGCCTTGCCTACATGA	AATTTACGGAAAACGCCTACTTAAACTACTCCATGTACGTGATCAT	
AI46 parC-fw	(1)	-----	AGAGCGCCTTGCCTACATGA	AATTTACGGAAAACGCCTACTTAAACTACTCCATGTACGTGATCAT	
AI50 parC-fw	(1)	-----	GCCTTGCCTACATGAATTTACGGAAAACGCCTACTTAAACTACTCCATGTACGTGATCAT		
AI118 parC-fw	(1)	-----	GAGCGCCTTGCCTACATGA	AATTTACGGAAAACGCCTACTTAAACTACTCCATGTACGTGATCAT	
AI129 parC-fw	(1)	-----	AGAGCGCCTTGCCTACATGA	AATTTACGGAAAACGCCTACTTAAACTACTCCATGTACGTGATCAT	
AIIm. u. parC-fw	(1)	-----	-----	GAATTTACGGAAAACGCCTACTTAAACTACTCCATGTACGTGATCAT	
AI119 parC-fw	(1)	-----	GCCTTGCCTACATGAATTTACGGAAAACGCCTACTTAAACTACTCCATGTACGTGATCAT		
AI1110 parC-fw	(1)	-----	GAGCGCCTTGCCTACATGA	AATTTACGGAAAACGCCTACTTAAACTACTCCATGTACGTGATCAT	
BI38 parC-fw	(1)	-----GC	AGAGCGCCTTGCCTACATGA	AATTTACGGAAAACGCCTACTTAAACTACTCCATGTACGTGATCAT	
BI16 parC-fw	(1)	-----GC	AGAGCGCCTTGCCTACATGA	AATTTACGGAAAACGCCTACTTAAACTACTCCATGTACGTGATCAT	
BII18 parC-fw	(1)	-----	GAGCGCCTTGCCTACATGA	AATTTACGGAAAACGCCTACTTAAACTACTCCATGTACGTGATCAT	

Tabelle 15-11 Ergebnisse der Sequenzanalyse für *gyrB* der MII-Mutanten

A: pHPNE19-02.1; B: pHPNE18-01.1; Gelb unterlegt sind Bereiche, die bei allen untersuchten Sequenzen homolog sind. Blau eingefärbte Sequenzen sind nicht bei allen untersuchten Sequenzen homolog.

		1121	1200
gyrB CFT073	(1121)	GC AAAATTATCGAT CTGCCCGTGCCCGTGAAGCTGCGCGTCGCGCGGTGAAATGACCCGCGTAAAGGTGCCT GGAT	
gyrB MIIQ	(1118)	GC AAAATTATCGAT CTGCCCGTGCCCGTGAAGCTGCGCGTCGCGCGGTGAAATGACCCGCGTAAAGGTGCCT CGAC	
AI34 gyrB-fw	(12)	GC AAAATTATCGAT CTGCCCGTGCCCGTGAAGCTGCGCGTCGCGCGGTGAAATGACCCGCGTAAAGGTGCCT CGAC	
AI46 gyrB-fw	(1)	----- CTGCCCGTGCCCGTGAAGCTGCGCGTCGCGCGGTGAAATGACCCGCGTAAAGGTGCCT CGAC	
AI43 gyrB-fw	(12)	GC AAAATTATCGAT CTGCCCGTGCCCGTGAAGCTGCGCGTCGCGCGGTGAAATGACCCGCGTAAAGGTGCCT CGAC	
AI50 gyrB-fw	(12)	GC AAAATTATCGAT CTGCCCGTGCCCGTGAAGCTGCGCGTCGCGCGGTGAAATGACCCGCGTAAAGGTGCCT CGAC	
AII18 gyrB-fw	(10)	GC AAAATTATCGAT CTGCCCGTGCCCGTGAAGCTGCGCGTCGCGCGGTGAAATGACCCGCGTAAAGGTGCCT CGAC	
AIIIm.u. gyrB-fw	(13)	GC AAAATTATCGAT CTGCCCGTGCCCGTGAAGCTGCGCGTCGCGCGGTGAAATGACCCGCGTAAAGGTGCCT CGAC	
AIII9 gyrB-fw	(12)	GC AAAATTATCGAT CTGCCCGTGCCCGTGAAGCTGCGCGTCGCGCGGTGAAATGACCCGCGTAAAGGTGCCT CGAC	
AIII10 gyrB-fw	(12)	GC AAAATTATCGAT CTGCCCGTGCCCGTGAAGCTGCGCGTCGCGCGGTGAAATGACCCGCGTAAAGGTGCCT CGAC	
BI38 gyrB-fw	(13)	GC AAAATTATCGAT CTGCCCGTGCCCGTGAAGCTGCGCGTCGCGCGGTGAAATGACCCGCGTAAAGGTGCCT CGAC	
BI16 gyrB-fw	(13)	GC AAAATTATCGAT CTGCCCGTGCCCGTGAAGCTGCGCGTCGCGCGGTGAAATGACCCGCGTAAAGGTGCCT CGAC	
BII18 gyrB-fw	(10)	GC AAAATTATCGAT CTGCCCGTGCCCGTGAAGCTGCGCGTCGCGCGGTGAAATGACCCGCGTAAAGGTGCCT CGAC	
BII23 gyrB-fw	(12)	GC AAAATTATCGAT CTGCCCGTGCCCGTGAAGCTGCGCGTCGCGCGGTGAAATGACCCGCGTAAAGGTGCCT CGAC	
BII19 gyrB-fw	(12)	GC AAAATTATCGAT CTGCCCGTGCCCGTGAAGCTGCGCGTCGCGCGGTGAAATGACCCGCGTAAAGGTGCCT CGAC	
BIII14 gyrB-fw	(12)	GC AAAATTATCGAT CTGCCCGTGCCCGTGAAGCTGCGCGTCGCGCGGTGAAATGACCCGCGTAAAGGTGCCT CGAC	
		1201	1280
gyrB CFT073	(1201)	TTAGCTGGCCTGCCGGGCAAACTGGCAGACTGCCAGGAACCGCATCCGGCGCTTCCGAACTGTACCTTGTGGAAGGGGA	
gyrB MIIQ	(1198)	TTAGCTGGCCTGCCGGGCAAACTGGCAGACTGCCAGGAACCGCATCCGGCGCTTCCGAACTGTACCTTGTGGAAGGGGA	
AI34 gyrB-fw	(92)	TTAGCTGGCCTGCCGGGCAAACTGGCAGACTGCCAGGAACCGCATCCGGCGCTTCCGAACTGTACCTTGTGGAAGGGGA	
AI46 gyrB-fw	(66)	TTAGCTGGCCTGCCGGGCAAACTGGCAGACTGCCAGGAACCGCATCCGGCGCTTCCGAACTGTACCTTGTGGAAGGGGA	
AI43 gyrB-fw	(92)	TTAGCTGGCCTGCCGGGCAAACTGGCAGACTGCCAGGAACCGCATCCGGCGCTTCCGAACTGTACCTTGTGGAAGGGGA	
AI50 gyrB-fw	(92)	TTAGCTGGCCTGCCGGGCAAACTGGCAGACTGCCAGGAACCGCATCCGGCGCTTCCGAACTGTACCTTGTGGAAGGGGA	
AII18 gyrB-fw	(90)	TTAGCTGGCCTGCCGGGCAAACTGGCAGACTGCCAGGAACCGCATCCGGCGCTTCCGAACTGTACCTTGTGGAAGGGGA	
AIIIm.u. gyrB-fw	(93)	TTAGCTGGCCTGCCGGGCAAACTGGCAGACTGCCAGGAACCGCATCCGGCGCTTCCGAACTGTACCTTGTGGAAGGGGA	
AIII9 gyrB-fw	(92)	TTAGCTGGCCTGCCGGGCAAACTGGCAGACTGCCAGGAACCGCATCCGGCGCTTCCGAACTGTACCTTGTGGAAGGGGA	
AIII10 gyrB-fw	(92)	TTAGCTGGCCTGCCGGGCAAACTGGCAGACTGCCAGGAACCGCATCCGGCGCTTCCGAACTGTACCTTGTGGAAGGGGA	
BI38 gyrB-fw	(93)	TTAGCTGGCCTGCCGGGCAAACTGGCAGACTGCCAGGAACCGCATCCGGCGCTTCCGAACTGTACCTTGTGGAAGGGGA	
BI16 gyrB-fw	(93)	TTAGCTGGCCTGCCGGGCAAACTGGCAGACTGCCAGGAACCGCATCCGGCGCTTCCGAACTGTACCTTGTGGAAGGGGA	
BII18 gyrB-fw	(90)	TTAGCTGGCCTGCCGGGCAAACTGGCAGACTGCCAGGAACCGCATCCGGCGCTTCCGAACTGTACCTTGTGGAAGGGGA	
BII23 gyrB-fw	(92)	TTAGCTGGCCTGCCGGGCAAACTGGCAGACTGCCAGGAACCGCATCCGGCGCTTCCGAACTGTACCTTGTGGAAGGGGA	
BII19 gyrB-fw	(92)	TTAGCTGGCCTGCCGGGCAAACTGGCAGACTGCCAGGAACCGCATCCGGCGCTTCCGAACTGTACCTTGTGGAAGGGGA	
BIII14 gyrB-fw	(92)	TTAGCTGGCCTGCCGGGCAAACTGGCAGACTGCCAGGAACCGCATCCGGCGCTTCCGAACTGTACCTTGTGGAAGGGGA	
		1281	1360
gyrB CFT073	(1281)	CTCCGGGGCGGCTCTGCCAAGCAGGGGCGTAACCCGAAGAACCAGGCGATTCTGCCGCTGAAGGGTAAATCCTCAACG	
gyrB MIIQ	(1278)	CTCCGGGGCGGCTCTGCCAAGCAGGGGCGTAACCCGAAGAACCAGGCGATTCTGCCGCTGAAGGGTAAATCCTCAACG	
AI34 gyrB-fw	(172)	CTCCGGGGCGGCTCTGCCAAGCAGGGGCGTAACCCGAAGAACCAGGCGATTCTGCCGCTGAAGGGTAAATCCTCAACG	
AI46 gyrB-fw	(146)	CTCCGGGGCGGCTCTGCCAAGCAGGGGCGTAACCCGAAGAACCAGGCGATTCTGCCGCTGAAGGGTAAATCCTCAACG	
AI43 gyrB-fw	(172)	CTCCGGGGCGGCTCTGCCAAGCAGGGGCGTAACCCGAAGAACCAGGCGATTCTGCCGCTGAAGGGTAAATCCTCAACG	
AI50 gyrB-fw	(172)	CTCCGGGGCGGCTCTGCCAAGCAGGGGCGTAACCCGAAGAACCAGGCGATTCTGCCGCTGAAGGGTAAATCCTCAACG	
AII18 gyrB-fw	(170)	CTCCGGGGCGGCTCTGCCAAGCAGGGGCGTAACCCGAAGAACCAGGCGATTCTGCCGCTGAAGGGTAAATCCTCAACG	
AIIIm.u. gyrB-fw	(173)	CTCCGGGGCGGCTCTGCCAAGCAGGGGCGTAACCCGAAGAACCAGGCGATTCTGCCGCTGAAGGGTAAATCCTCAACG	
AIII9 gyrB-fw	(172)	CTCCGGGGCGGCTCTGCCAAGCAGGGGCGTAACCCGAAGAACCAGGCGATTCTGCCGCTGAAGGGTAAATCCTCAACG	
AIII10 gyrB-fw	(172)	CTCCGGGGCGGCTCTGCCAAGCAGGGGCGTAACCCGAAGAACCAGGCGATTCTGCCGCTGAAGGGTAAATCCTCAACG	
BI38 gyrB-fw	(173)	CTCCGGGGCGGCTCTGCCAAGCAGGGGCGTAACCCGAAGAACCAGGCGATTCTGCCGCTGAAGGGTAAATCCTCAACG	
BI16 gyrB-fw	(173)	CTCCGGGGCGGCTCTGCCAAGCAGGGGCGTAACCCGAAGAACCAGGCGATTCTGCCGCTGAAGGGTAAATCCTCAACG	
BII18 gyrB-fw	(170)	CTCCGGGGCGGCTCTGCCAAGCAGGGGCGTAACCCGAAGAACCAGGCGATTCTGCCGCTGAAGGGTAAATCCTCAACG	
BII23 gyrB-fw	(172)	CTCCGGGGCGGCTCTGCCAAGCAGGGGCGTAACCCGAAGAACCAGGCGATTCTGCCGCTGAAGGGTAAATCCTCAACG	
BII19 gyrB-fw	(172)	CTCCGGGGCGGCTCTGCCAAGCAGGGGCGTAACCCGAAGAACCAGGCGATTCTGCCGCTGAAGGGTAAATCCTCAACG	
BIII14 gyrB-fw	(172)	CTCCGGGGCGGCTCTGCCAAGCAGGGGCGTAACCCGAAGAACCAGGCGATTCTGCCGCTGAAGGGTAAATCCTCAACG	
		1361	1440
gyrB CFT073	(1361)	TCGAGAAAGCGCGCTTCGATAAGATGCTCTCTTCTCAGGAAGTGGCGACGCTTATCACC CGCTTGGTGTGGTATCGGT	
gyrB MIIQ	(1358)	TCGAGAAAGCGCGCTTCGATAAGATGCTCTCTTCTCAGGAAGTGGCGACGCTTATCACC CGCTTGGTGTGGTATCGGT	
AI34 gyrB-fw	(252)	TCGAGAAAGCGCGCTTCGATAAGATGCTCTCTTCTCAGGAAGTGGCGACGCTTATCACC CGCTTGGTGTGGTATCGGT	
AI46 gyrB-fw	(226)	TCGAGAAAGCGCGCTTCGATAAGATGCTCTCTTCTCAGGAAGTGGCGACGCTTATCACC CGCTTGGTGTGGTATCGGT	
AI43 gyrB-fw	(252)	TCGAGAAAGCGCGCTTCGATAAGATGCTCTCTTCTCAGGAAGTGGCGACGCTTATCACC CGCTTGGTGTGGTATCGGT	
AI50 gyrB-fw	(252)	TCGAGAAAGCGCGCTTCGATAAGATGCTCTCTTCTCAGGAAGTGGCGACGCTTATCACC CGCTTGGTGTGGTATCGGT	
AII18 gyrB-fw	(250)	TCGAGAAAGCGCGCTTCGATAAGATGCTCTCTTCTCAGGAAGTGGCGACGCTTATCACC CGCTTGGTGTGGTATCGGT	
AIIIm.u. gyrB-fw	(253)	TCGAGAAAGCGCGCTTCGATAAGATGCTCTCTTCTCAGGAAGTGGCGACGCTTATCACC CGCTTGGTGTGGTATCGGT	
AIII9 gyrB-fw	(252)	TCGAGAAAGCGCGCTTCGATAAGATGCTCTCTTCTCAGGAAGTGGCGACGCTTATCACC CGCTTGGTGTGGTATCGGT	
AIII10 gyrB-fw	(252)	TCGAGAAAGCGCGCTTCGATAAGATGCTCTCTTCTCAGGAAGTGGCGACGCTTATCACC CGCTTGGTGTGGTATCGGT	
BI38 gyrB-fw	(253)	TCGAGAAAGCGCGCTTCGATAAGATGCTCTCTTCTCAGGAAGTGGCGACGCTTATCACC CGCTTGGTGTGGTATCGGT	
BI16 gyrB-fw	(253)	TCGAGAAAGCGCGCTTCGATAAGATGCTCTCTTCTCAGGAAGTGGCGACGCTTATCACC CGCTTGGTGTGGTATCGGT	
BII18 gyrB-fw	(250)	TCGAGAAAGCGCGCTTCGATAAGATGCTCTCTTCTCAGGAAGTGGCGACGCTTATCACC CGCTTGGTGTGGTATCGGT	
BII23 gyrB-fw	(252)	TCGAGAAAGCGCGCTTCGATAAGATGCTCTCTTCTCAGGAAGTGGCGACGCTTATCACC CGCTTGGTGTGGTATCGGT	
BII19 gyrB-fw	(252)	TCGAGAAAGCGCGCTTCGATAAGATGCTCTCTTCTCAGGAAGTGGCGACGCTTATCACC CGCTTGGTGTGGTATCGGT	
BIII14 gyrB-fw	(252)	TCGAGAAAGCGCGCTTCGATAAGATGCTCTCTTCTCAGGAAGTGGCGACGCTTATCACC CGCTTGGTGTGGTATCGGT	
		1441	1520
gyrB CFT073	(1441)	CGTGACGAGTACAACCCGGACAACCTGCGTTATCACAGCATCATCATGACCGATGCGGACGTCGACGGCTCGCACAT	
gyrB MIIQ	(1438)	CGTGACGAGTACAACCCGGACAACCTGCGTTATCACAGCATCATCATGACCGATGCGGACGTCGACGGCTCGCACAT	
AI34 gyrB-fw	(332)	CGTGACGAGTACAACCCGGACAACCTGCGTTATCACAGCATCATCATGACCGATGCGGACGTCGACGGCTCGCACAT	
AI46 gyrB-fw	(306)	CGTGACGAGTACAACCCGGACAACCTGCGTTATCACAGCATCATCATGACCGATGCGGACGTCGACGGCTCGCACAT	
AI43 gyrB-fw	(332)	CGTGACGAGTACAACCCGGACAACCTGCGTTATCACAGCATCATCATGACCGATGCGGACGTCGACGGCTCGCACAT	
AI50 gyrB-fw	(332)	CGTGACGAGTACAACCCGGACAACCTGCGTTATCACAGCATCATCATGACCGATGCGGACGTCGACGGCTCGCACAT	
AII18 gyrB-fw	(330)	CGTGACGAGTACAACCCGGACAACCTGCGTTATCACAGCATCATCATGACCGATGCGGACGTCGACGGCTCGCACAT	
AIIIm.u. gyrB-fw	(333)	CGTGACGAGTACAACCCGGACAACCTGCGTTATCACAGCATCATCATGACCGATGCGGACGTCGACGGCTCGCACAT	
AIII9 gyrB-fw	(332)	CGTGACGAGTACAACCCGGACAACCTGCGTTATCACAGCATCATCATGACCGATGCGGACGTCGACGGCTCGCACAT	
AIII10 gyrB-fw	(332)	CGTGACGAGTACAACCCGGACAACCTGCGTTATCACAGCATCATCATGACCGATGCGGACGTCGACGGCTCGCACAT	
BI38 gyrB-fw	(333)	CGTGACGAGTACAACCCGGACAACCTGCGTTATCACAGCATCATCATGACCGATGCGGACGTCGACGGCTCGCACAT	

BII6 gyrB-fw	(333)	CGTGACGAGTACAACCCGGACAACCTGCGTTATCACAGCATCATCATGACCGATGCGGACGTGCGAGGCTCGCACAT
BII18 gyrB-fw	(330)	CGTGACGAGTACAACCCGGACAACCTGCGTTATCACAGCATCATCATGACCGATGCGGACGTGCGAGGCTCGCACAT
BII23 gyrB-fw	(332)	CGTGACGAGTACAACCCGGACAACCTGCGTTATCACAGCATCATCATGACCGATGCGGACGTGCGAGGCTCGCACAT
BII19 gyrB-fw	(332)	CGTGACGAGTACAACCCGGACAACCTGCGTTATCACAGCATCATCATGACCGATGCGGACGTGCGAGGCTCGCACAT
BIII14 gyrB-fw	(332)	CGTGACGAGTACAACCCGGACAACCTGCGTTATCACAGCATCATCATGACCGATGCGGACGTGCGAGGCTCGCACAT
		1521
gyrB CFT073	(1521)	TCGTACGCTGCTGTTGACCTTCTTCTATCGTCAGATGCCGGAATCGTTGAACGTGGTCACGCTACATCGCTCAGCCG
gyrB MIIQ	(1518)	TCGTACGCTGCTGTTGACCTTCTTCTATCGTCAGATGCCGGAATCGTTGAACGTGGTCACGCTACATCGCTCAGCCG
AI34 gyrB-fw	(412)	TCGTACGCTGCTGTTGACCTTCTTCTATCGTCAGATGCCGGAATCGTTGAACGTGGTCACGCTACATCGCTCAGCCG
AI46 gyrB-fw	(386)	TCGTACGCTGCTGTTGACCTTCTTCTATCGTCAGATGCCGGAATCGTTGAACGTGGTCACGCTACATCGCTCAGCCG
AI43 gyrB-fw	(412)	TCGTACGCTGCTGTTGACCTTCTTCTATCGTCAGATGCCGGAATCGTTGAACGTGGTCACGCTACATCGCTCAGCCG
AI50 gyrB-fw	(412)	TCGTACGCTGCTGTTGACCTTCTTCTATCGTCAGATGCCGGAATCGTTGAACGTGGTCACGCTACATCGCTCAGCCG
AII18 gyrB-fw	(410)	TCGTACGCTGCTGTTGACCTTCTTCTATCGTCAGATGCCGGAATCGTTGAACGTGGTCACGCTACATCGCTCAGCCG
AIIIm.u. gyrB-fw	(413)	TCGTACGCTGCTGTTGACCTTCTTCTATCGTCAGATGCCGGAATCGTTGAACGTGGTCACGCTACATCGCTCAGCCG
AII19 gyrB-fw	(412)	TCGTACGCTGCTGTTGACCTTCTTCTATCGTCAGATGCCGGAATCGTTGAACGTGGTCACGCTACATCGCTCAGCCG
AIII10 gyrB-fw	(412)	TCGTACGCTGCTGTTGACCTTCTTCTATCGTCAGATGCCGGAATCGTTGAACGTGGTCACGCTACATCGCTCAGCCG
BI38 gyrB-fw	(413)	TCGTACGCTGCTGTTGACCTTCTTCTATCGTCAGATGCCGGAATCGTTGAACGTGGTCACGCTACATCGCTCAGCCG
BII6 gyrB-fw	(413)	TCGTACGCTGCTGTTGACCTTCTTCTATCGTCAGATGCCGGAATCGTTGAACGTGGTCACGCTACATCGCTCAGCCG
BII18 gyrB-fw	(410)	TCGTACGCTGCTGTTGACCTTCTTCTATCGTCAGATGCCGGAATCGTTGAACGTGGTCACGCTACATCGCTCAGCCG
BII23 gyrB-fw	(412)	TCGTACGCTGCTGTTGACCTTCTTCTATCGTCAGATGCCGGAATCGTTGAACGTGGTCACGCTACATCGCTCAGCCG
BII19 gyrB-fw	(412)	TCGTACGCTGCTGTTGACCTTCTTCTATCGTCAGATGCCGGAATCGTTGAACGTGGTCACGCTACATCGCTCAGCCG
BIII14 gyrB-fw	(412)	TCGTACGCTGCTGTTGACCTTCTTCTATCGTCAGATGCCGGAATCGTTGAACGTGGTCACGCTACATCGCTCAGCCG
		1601
gyrB CFT073	(1601)	CGCTGTACAAAGTGAAGAAAGGTAAGCAGGAACAGTACATTAAGACGACGGAAGCGATGGATCAGTACCAGATCTCTATC
gyrB MIIQ	(1598)	CGCTGTACAAAGTGAAGAAAGGTAAGCAGGAACAGTACATTAAGACGACGGAAGCGATGGATCAGTACCAGATCTCTATC
AI34 gyrB-fw	(492)	CGCTGTACAAAGTGAAGAAAGGTAAGCAGGAACAGTACATTAAGACGACGGAAGCGATGGATCAGTACCAGATCTCTATC
AI46 gyrB-fw	(466)	CGCTGTACAAAGTGAAGAAAGGTAAGCAGGAACAGTACATTAAGACGACGGAAGCGATGGATCAGTACCAGATCTCTATC
AI43 gyrB-fw	(492)	CGCTGT-----
AI50 gyrB-fw	(492)	CGCTGTACAAAGTGAAGAAAGGTAAGCAGGAACAGTACATTAAGACGACGGAAGCGATGGATCAGTACCAGATCTCTATC
AII18 gyrB-fw	(490)	CGCTGTACAAAGTGAAGAAAGGTAAGCAGGAACAGTACATTAAGACGACGGAAGCGATGGATCAGTACCAGATCTCTATC
AIIIm.u. gyrB-fw	(493)	CGCTGTACAAAGTGAAGAAAGGTAAGCAGGAACAGTACATTAAGACGACGGAAGCGATGGATCAGTACCAGATCTCTATC
AII19 gyrB-fw	(492)	CGCTGTACAAAGTGAAGAAAGGTAAGCAGGAACAGTACATTAAGACGACGGAAGCGATGGATCAGTACCAGATCTCTATC
AIII10 gyrB-fw	(480)	-----
BI38 gyrB-fw	(493)	CGCTGTACAAAGTGAAGAAAGGTAAGCAGGAACAGTACATTAAGACGACGGAAGCGATGGATCAGTACCAGATCTCTATC
BII6 gyrB-fw	(493)	CGCTGTACAAAGTGAAGAAAGGTAAGCAGGAACAGTACATTAAGACGACGGAAGCGATGGATCAGTACCAGATCTCTATC
BII18 gyrB-fw	(490)	CGCTGTACAAAGTGAAGAAAGGTAAGCAGGAACAGTACATTAAGACGACGGAAGCGATGGATCAGTACCAGATCTCTATC
BII23 gyrB-fw	(492)	CGCTGTACAAAGTGAAGAAAGGTAAGCAGGAACAGTACATTAAGACGACGGAAGCGATGGATCAGTACCAGATCTCTATC
BII19 gyrB-fw	(492)	CGCTGTACAAAGTGAAGAAAGGTAAGCAGGAACAGTACATTAAGACGACGGAAGCGATGGATCAGTACCAGATCTCTATC
BIII14 gyrB-fw	(492)	CGCTGTACAAAGTGAAGAAAGGTAAGCAGGAACAGTACATTAAGACGACGGAAGCGATGGATCAGTACCAGATCTCTATC
		1681
gyrB CFT073	(1681)	CGCGTGGATGGCGCAACGCTGCACACCAACGCCAGTGCACCGCGCTGGCTGGCGAAGCGTTAGAGAAACTGGTGTCTGA
gyrB MIIQ	(1678)	CGCGTGGATGGCGCAACGCTGCACACCAACGCCAGTGCACCGCGCTGGCTGGCGAAGCGTTAGAGAAACTGGTGTCTGA
AI34 gyrB-fw	(572)	CGCGTGGATGGCGCAACGCTGCACACCAACGCCAGTGCACCGCGCTGGCTGGCGAAGCGTTAGAGAAACTGGTGTCTGA
AI46 gyrB-fw	(546)	CGCG-----
AI43 gyrB-fw	(498)	-----
AI50 gyrB-fw	(572)	CGCGTGGATGGCGCAACGCTGCACACCAACGCCAGTGCACCGCGCTGGCTGGCGAAGCGTTAGAGAAACTGGTGTCTGA
AII18 gyrB-fw	(570)	CGCGTGGATGGCGCAACGCTGCACACCAACGCCAGTGCACCGCGCTGGCTGGCGAAGCGTTAGAGAAACTGGTGTCTGA
AIIIm.u. gyrB-fw	(573)	CGCGTGGATGGCGCAACGCTGCACACCAACGCCAGTGCACCGCGCTGGCTGGCGAAGCGTTAGAGAAACTGGTGTCTGA
AII19 gyrB-fw	(572)	CGCGTGGATGGCGCAACGCTGCACACCAACGCCAGTGCACCGCGCTGGCTGGCGAAGCGTTAGAGAAACTGGTGTCTGA
AIII10 gyrB-fw	(480)	-----
BI38 gyrB-fw	(573)	CGCGTGGATGGCGCAACGCTGCACACCAACGCCAGTGCACCGCGCTGGCTGGCGAAGCGTTAGAGAAACTGGTGTCTGA
BII6 gyrB-fw	(573)	CGCG-----
BII18 gyrB-fw	(570)	CGCGTGGATGGCGCAACGCTGCACACCAACGCCAGTGCACCGCGCTGGCTGGCGAAGCGTTAGAGAAACTGGTGTCTGA
BII23 gyrB-fw	(572)	CGCGTGGATGGCGCAACGCTGCACACCAACGCCAGTGCACCGCGCTGGCTGGCGAAGCGTTAGAGAAACTGGTGTCTGA
BII19 gyrB-fw	(572)	CGCGTGGATGGCGCAACGCTGCACACCAACGCCAGTGCACCGCGCTGGCTGGCGAAGCGTTAGAGAAACTGGTGTCTGA
BIII14 gyrB-fw	(572)	CGCGTGGATGGCGCAACGCTGCACACCAACGCCAGTGCACCGCGCTGGCTGGCGAAGCGTTAGAGAAACTGGTGTCTGA

Tabelle 15-12 Ergebnisse der Sequenzanalyse für *parE* der Mutanten

A: pHPNE19-02.1; B: pHPNE18-01.1; Gelb unterlegt sind Bereiche, die bei allen untersuchten Sequenzen homolog sind. Blau eingefärbte Sequenzen sind nicht bei allen untersuchten Sequenzen homolog.

		1201		1280
parE CFT073	(1201)	TTGGCTGACTGTACCAGCGCAGGATCTTAA	CGTACCAGAACTATTCCTTGTGGAAGGTGACTCCGAGGCGGATCTGCCAA	
parE MIIQ	(1201)	TTGGCTGACTGTACCAGCGCAGGATCTTAA	CGTACCAGAACTATTCCTTGTGGAAGGTGACTCCGAGGCGGATCTGCCAA	
AI34 parE-fw	(1)	-----	CGTACCAGAACTATTCCTTGTGGAAGGTGACTCCGAGGCGGATCTGCCAA	
AI43 parE-fw	(1)	-----A	CGTACCAGAACTATTCCTTGTGGAAGGTGACTCCGAGGCGGATCTGCCAA	
AI46 parE-fw	(1)	-----	CGTACCAGAACTATTCCTTGTGGAAGGTGACTCCGAGGCGGATCTGCCAA	
AI50 parE-fw	(1)	-----	CGTACCAGAACTATTCCTTGTGGAAGGTGACTCCGAGGCGGATCTGCCAA	
AII18 parE-fw	(1)	-----A	CGTACCAGAACTATTCCTTGTGGAAGGTGACTCCGAGGCGGATCTGCCAA	
AII29 parE-fw	(1)	-----	CGTACCAGAACTATTCCTTGTGGAAGGTGACTCCGAGGCGGATCTGCCAA	
AIIIm.u. parE-fw	(1)	-----	CGTACCAGAACTATTCCTTGTGGAAGGTGACTCCGAGGCGGATCTGCCAA	
AII19 parE-fw	(1)	-----	CGTACCAGAACTATTCCTTGTGGAAGGTGACTCCGAGGCGGATCTGCCAA	
AIII10 parE-fw	(1)	-----	CGTACCAGAACTATTCCTTGTGGAAGGTGACTCCGAGGCGGATCTGCCAA	
BI38 parE-fw	(1)	-----AA	CGTACCAGAACTATTCCTTGTGGAAGGTGACTCCGAGGCGGATCTGCCAA	
BII6 parE-fw	(1)	-----	CGTACCAGAACTATTCCTTGTGGAAGGTGACTCCGAGGCGGATCTGCCAA	
BII18 parE-fw	(1)	-----	CGTACCAGAACTATTCCTTGTGGAAGGTGACTCCGAGGCGGATCTGCCAA	
BII19 parE-fw	(1)	-----	CGTACCAGAACTATTCCTTGTGGAAGGTGACTCCGAGGCGGATCTGCCAA	
BII23 parE-fw	(1)	-----	CGTACCAGAACTATTCCTTGTGGAAGGTGACTCCGAGGCGGATCTGCCAA	
BIII14 parE-fw	(1)	-----	CGTACCAGAACTATTCCTTGTGGAAGGTGACTCCGAGGCGGATCTGCCAA	
		1281		1360
parE CFT073	(1281)	GCAGGCGCGCGATCGCGAATATCAGGCGATCATGCCACTGAAAGGTAAGATCCTTAA	TACCTGGGAAGTCTCTTCCGACG	
parE MIIQ	(1281)	GCAGGCGCGCGATCGCGAATATCAGGCGATCATGCCACTGAAAGGTAAGATCCTTAA	TACCTGGGAAGTCTCTTCCGACG	
AI34 parE-fw	(51)	GCAGGCGCGCGATCGCGAATATCAGGCGATCATGCCACTGAAAGGTAAGATCCTTAA	TACCTGGGAAGTCTCTTCCGACG	

15.4.3 Ergebnisse MII pHNE19.02.1 Nr. II 18

Tabelle 15-13 Ergebnisse der Sequenzanalyse für MII pHNE19-02.1 Nr. II 18

orange: Startcodon *icd* (ATG); grün: Stoppcodon *icd* (TAA); violett: mutierte Terminatorsequenz *icd*;
rot: nicht sequenzierter Bereich

			301		375
	CFT0743 <i>icd</i>	(301)	GAACGCGGAAGAACATCGTAGGGTTTATTGAACAGGATCACACGCGTGGGCTGGTTCAG	GTTCACGCTGGT	
	MII A Nr. I43 <i>icd</i>	(1)	-----	GTTCACGCTGGT	
	MII A Nr. II18 1 <i>icd</i> fw	(1)	-----	GTTCACGCTGGT	
	MII A Nr. II18 2 <i>icd</i> fw	(1)	-----	GTTCACGCTGGT	
	MII A Nr. II18 2 <i>icd</i> rv	(1)	-----	-----	
			376		450
	CFT0743 <i>icd</i>	(376)	AGAACGTTGCGAGCTGAATCGCTTAACCTGGTGATTCTAAAAGAAGTTTTTGCATGGTATTTTCAGAGATTAT		
	MII A Nr. I43 <i>icd</i>	(14)	AGAACGTTGCGAGCTGAATCGCTTAACCTGGTGATTCTAAAAGAAGTTTTTGCATGGTATTTTCAGAGATTAT		
	MII A Nr. II18 1 <i>icd</i> fw	(14)	AGAACGTTGCGAGCTGAATCGCTTAACCTGGTGATTCTAAAAGAAGTTTTTGCATGGTATTTTCAGAGATTAT		
	MII A Nr. II18 2 <i>icd</i> fw	(1)	-----	-----	
	MII A Nr. II18 2 <i>icd</i> rv	(1)	-----	-----	
			451		525
	CFT0743 <i>icd</i>	(451)	GAATGCGGCATTATAGCCTAATAACGCGCATCTTTCATGACGGCAAACAATAGGGTAGTATTGACAAGCCAATT		
	MII A Nr. I43 <i>icd</i>	(89)	GAATGCGGCATTATAGCCTAATAACGCGCATCTTTCATGACGGCAAACAATAGGGTAGTATTGACAAGCCAATT		
	MII A Nr. II18 1 <i>icd</i> fw	(89)	GAATGCGGCATTATAGCCTAATAACGCGCATCTTTCATGACGGCAAACAATAGGGTAGTATTGACAAGCCAATT		
	MII A Nr. II18 2 <i>icd</i> fw	(1)	-----	-----	
	MII A Nr. II18 2 <i>icd</i> rv	(1)	-----	-----	
			526		600
	CFT0743 <i>icd</i>	(526)	ACAAATCATTAAACAAAAAATGCTCTAAAGCATCCGTATCGCAGGACGCAAACGCATATGCAACGTGGTGGTAGA		
	MII A Nr. I43 <i>icd</i>	(164)	ACAAATCATTAAACAAAAAATGCTCTAAAGCATCCGTATCGCAGGACGCAAACGCATATGCAACGTGGTGGTAGA		
	MII A Nr. II18 1 <i>icd</i> fw	(164)	ACAAATCATTAAACAAAAAATGCTCTAAAGCATCCGTATCGCAGGACGCAAACGCATATGCAACGTGGTGGTAGA		
	MII A Nr. II18 2 <i>icd</i> fw	(1)	-----	-----	
	MII A Nr. II18 2 <i>icd</i> rv	(1)	-----	-----	
			601		675
	CFT0743 <i>icd</i>	(601)	CGAGCAAACCAAGTAGCGCTCGAAGGAGAGGTGAATGGAAAGTAAAGTAGTTGTTCCGGCACAAGGCAAGAAGATC		
	MII A Nr. I43 <i>icd</i>	(239)	CGAGCAAACCAAGTAGCGCTCGAAGGAGAGGTGAATGGAAAGTAAAGTAGTTGTTCCGGCACAAGGCAAGAAGATC		
	MII A Nr. II18 1 <i>icd</i> fw	(239)	CGAGCAAACCAAGTAGCGCTCGAAGGAGAGGTGAATGGAAAGTAAAGTAGTTGTTCCGGCACAAGGCAAGAAGATC		
	MII A Nr. II18 2 <i>icd</i> fw	(1)	-----	-----	
	MII A Nr. II18 2 <i>icd</i> rv	(1)	-----	-----	
			676		750
	CFT0743 <i>icd</i>	(676)	ACCCTGCAAAACGGCAAACCTCAACGTTCCCTGAAAATCCGATTATCCCTTACATTGAAGGTGATGGAATCGGTGTA		
	MII A Nr. I43 <i>icd</i>	(314)	ACCCTGCAAAACGGCAAACCTCAACGTTCCCTGAAAATCCGATTATCCCTTACATTGAAGGTGATGGAATCGGTGTA		
	MII A Nr. II18 1 <i>icd</i> fw	(314)	ACCCTGCAAAACGGCAAACCTCAACGTTCCCTGAAAATCCGATTATCCCTTACATTGAAGGTGATGGAATCGGTGTA		
	MII A Nr. II18 2 <i>icd</i> fw	(1)	-----	-----	
	MII A Nr. II18 2 <i>icd</i> rv	(1)	-----	-----	
			751		825
	CFT0743 <i>icd</i>	(751)	GATGTAACCCAGCCATGCTGAAAGTGGTGCAGCTGCAGTCGAGAAAGCCTATAAAGGCGAGCGTAAAATCTCC		
	MII A Nr. I43 <i>icd</i>	(389)	GATGTAACCCAGCCATGCTGAAAGTGGTGCAGCTGCAGTCGAGAAAGCCTATAAAGGCGAGCGTAAAATCTCC		
	MII A Nr. II18 1 <i>icd</i> fw	(389)	GATGTAACCCAGCCATGCTGAAAGTGGTGCAGCTGCAGTCGAGAAAGCCTATAAAGGCGAGCGTAAAATCTCC		
	MII A Nr. II18 2 <i>icd</i> fw	(1)	-----	-----	
	MII A Nr. II18 2 <i>icd</i> rv	(1)	-----	-----	
			826		900
	CFT0743 <i>icd</i>	(826)	TGGATGGAAATTTACACCGGTGAAAAATCCACACAGGTTTATGGTCAGGACGCTGGTTGCCTGCTGAAACCCCTT		
	MII A Nr. I43 <i>icd</i>	(464)	TGGATGGAAATTTACACCGGTGAAAAATCCACACAGGTTTATGGTCAGGACGCTGGTTGCCTGCTGAAACCCCTT		
	MII A Nr. II18 1 <i>icd</i> fw	(464)	TGGATGGAAATTTACACCGGTGAAAAATCCACACAGGTTTATGGTCAGGACGCTGGTTGCCTGCTGAAACCCCTT		
	MII A Nr. II18 2 <i>icd</i> fw	(1)	-----	-----	
	MII A Nr. II18 2 <i>icd</i> rv	(1)	-----	-----	
			901		975
	CFT0743 <i>icd</i>	(901)	GATCTGATTTCGTGAATATCGCGTTGCCATTAAGGCCCGCTGACCACTCCGGTTGGTGCCGGTATTCGCTCTCTG		
	MII A Nr. I43 <i>icd</i>	(539)	GATCTGATTTCGTGAATATCGCGTTGCCATTAAGGCCCGCTGACCACTCCGGTTGGTGCCGGTATTCGCTCTCTG		
	MII A Nr. II18 1 <i>icd</i> fw	(539)	GATCTGATTTCGTGAATATCGCGTTGCCATTAAGGCCCGCTGACCACTCCGGTTGGTGCCGGTATTCGCTCTCTG		
	MII A Nr. II18 2 <i>icd</i> fw	(1)	-----	-----	
	MII A Nr. II18 2 <i>icd</i> rv	(1)	-----	-----	
			976		1050
	CFT0743 <i>icd</i>	(976)	AACGTTGCCCTGCGCCAGGAAGTGGATCTCTACATCTGCCTGCGTCCGGTACGTTACTATCAGGGCACTCCAAGC		
	MII A Nr. I43 <i>icd</i>	(614)	AATGTTGCCCTGCGCCAGGAAGTGGATCTCTACATCTGCCTGCGTCCGGTACGTTACTATCAGGGCACTCCAAGC		
	MII A Nr. II18 1 <i>icd</i> fw	(614)	AATGTTGCCCTGCGCCAGGAAGTGGATCTCTACATCTGCCTGCGTCCGGTACGTTACTATCAGGGCACTCCAAGC		
	MII A Nr. II18 2 <i>icd</i> fw	(1)	-----	-----	
	MII A Nr. II18 2 <i>icd</i> rv	(1)	-----	-----	
			1051		1125
	CFT0743 <i>icd</i>	(1051)	CCGGTTAAACACCCCTGAAGTACCGATATGGTTATCTTCCGTGAAAACCTCGGAAGACATTTATGCGGGTATCGAA		
	MII A Nr. I43 <i>icd</i>	(689)	CCGGTTAAACACCCCTGAAGTACCGATATGGTTATCTTCCGTGAAAACCTCGGAAGACATTTATGCGGGTATCGAA		
	MII A Nr. II18 1 <i>icd</i> fw	(675)	-----	-----	
	MII A Nr. II18 2 <i>icd</i> fw	(1)	-----	-----	
	MII A Nr. II18 2 <i>icd</i> rv	(1)	-----	-----	
			1126		1200
	CFT0743 <i>icd</i>	(1126)	TGGAAAGCAGACTCTGCCGACGCTGAGAAAGTGATTAAATTCCTGCGTGAAGAGATGGGCGTGAAGAAAATTCGG		
	MII A Nr. I43 <i>icd</i>	(764)	TGGAAAGCAGACTCTGCCGACGCTGAGAAAGTGATTAAATTCCTGCGTGAAGAGATGGGCGTGAAGAAAATTCGG		
	MII A Nr. II18 1 <i>icd</i> fw	(675)	-----	-----	
	MII A Nr. II18 2 <i>icd</i> fw	(1)	-----	AGTGATTAAATTCCTGCGTGAAGAGATGGGCGTGAAGAAAATTCGG	
	MII A Nr. II18 2 <i>icd</i> rv	(1)	-----	-----	
			1201		1275
	CFT0743 <i>icd</i>	(1201)	TTCCCGGAACATTGCGGTATCGGTATTAAGCCGTGTTCCGGAAGAAGGCACCAAACGCTCGGTTTCGTGCAGCGATC		
	MII A Nr. I43 <i>icd</i>	(839)	TTCCCGGAACATTGCGGTATCGGTATTAAGCCGTGTTCCGGAAGAAGGCACCAAACGCTCGGTTTCGTGCAGCGATC		
	MII A Nr. II18 1 <i>icd</i> fw	(675)	-----	-----	
	MII A Nr. II18 2 <i>icd</i> fw	(47)	TTCCCGGAACATTGCGGTATCGGTATTAAGCCGTGTTCCGGAAGAAGGCACCAAACGCTCGGTTTCGTGCAGCGATC		

MII A Nr. III 8 2 icd rv	(1)	-----	-----
		1276	1350
CFT0743 icd	(1276)	GAATACGCAATTGCTAACGATCGTGACTCTGTGACCCTGGTGCACAAAGGCAACATCATGAAGTTCACCGAAGGC	
MII A Nr. I 43 icd	(914)	GAATACGCAATTGCTAACGATCGTGACTCTGTGACCCTGGTTCACAAAGGCAACATCATGAAGTTCACCGAAGGC	
MII A Nr. III 8 1 icd fw	(675)	-----	-----
MII A Nr. III 8 2 icd fw	(122)	GAATACGCAATTGCTAACGATCGTGACTCTGTGACCCTGGTGCACAAAGGCAACATCATGAAGTTCACCGAAGGC	
MII A Nr. III 8 2 icd rv	(1)	-----	-----
		1351	1425
CFT0743 icd	(1351)	GCGTTTAAAGACTGGGGCTACCAACTGGCGCGTGAAGAATTGGCGGTGAAGTACTGATCGAGCGCGCCCGTGGCTG	
MII A Nr. I 43 icd	(989)	GCGTTTAAAGACTGGGGCTACCAACTGGCGCGTGAAGAATTGGCGGTGAAGTACTGATCGAGCGCGCCCGTGGCTG	
MII A Nr. III 8 1 icd fw	(675)	-----	-----
MII A Nr. III 8 2 icd fw	(197)	GCGTTTAAAGACTGGGGCTACCAACTGGCGCGTGAAGAATTGGCGGTGAAGTACTGATCGAGCGCGCCCGTGGCTG	
MII A Nr. III 8 2 icd rv	(1)	-----	-----
		1426	1500
CFT0743 icd	(1426)	AAAGTTAAAAACCCGAATACCGGCAAAGAGATCGTCATTAAAGACGTGATTGCTGATGCATTCTGCAACAGATC	
MII A Nr. I 43 icd	(1064)	AAAGTTAAAAACCCGAATACCGGCAAAGAGATCGTCATTAAAGACGTGATTGCTGATGCATTCTGCAACAGATC	
MII A Nr. III 8 1 icd fw	(675)	-----	-----
MII A Nr. III 8 2 icd fw	(272)	AAAGTTAAAAACCCGAATACCGGCAAAGAGATCGTCATTAAAGACGTGATTGCTGATGCATTCTGCAACAGATC	
MII A Nr. III 8 2 icd rv	(1)	-----	-----
		1501	1575
CFT0743 icd	(1501)	CTGCTGCGTCCGGCTGAATATGATGTTATCGCCTGTATGAACCTGAACGGTGACTACATTTCTGACGCCCTGGCA	
MII A Nr. I 43 icd	(1132)	CTGCTGCGTCCGGCTGAATATGATGTTATCGCCTGTATGAACCTGAACGGTGACTACATTTCTGACGCCCTGGCA	
MII A Nr. III 8 1 icd fw	(675)	-----	-----
MII A Nr. III 8 2 icd fw	(347)	CTGCTGCGTCCGGCTGAATATGATGTTATCGCCTGTATGAACCTGAACGGTGACTACATTTCTGACGCCCTGGCA	
MII A Nr. III 8 2 icd rv	(69)	CTGCTGCGTCCGGCTGAATATGATGTTATCGCCTGTATGAACCTGAACGGTGACTACATTTCTGACGCCCTGGCA	
		1576	1650
CFT0743 icd	(1576)	GCGCAGGTTGGTGGTATCGGTATCGCCCTGGCGCAAACATCGGTGACGAATGCGCCCTGTTGAAGCCACCCAC	
MII A Nr. I 43 icd	(1207)	GCGCAGGTTGGTGGTATCGGTATCGCCCTGGCGCAAACATCGGTGACGAATGCGCCCTGTTGAAGCCACCCAC	
MII A Nr. III 8 1 icd fw	(675)	-----	-----
MII A Nr. III 8 2 icd fw	(404)	-----	-----
MII A Nr. III 8 2 icd rv	(144)	GCGCAGGTTGGTGGTATCGGTATCGCCCTGGCGCAAACATCGGTGACGAATGCGCCCTGTTGAAGCCACCCAC	
		1651	1725
CFT0743 icd	(1651)	GGTACTGCGCCGAAATATGCCGGACAGGACAAAGTAAACCCAGGCTCTATTATTCTCTCCGCTGAGATGATGCTG	
MII A Nr. I 43 icd	(1282)	GGTACTGCGCCGAAATATGCCGGACAGGACAAAGTAAACCCAGGCTCTATTATTCTCTCCGCTGAGATGATGCTG	
MII A Nr. III 8 1 icd fw	(675)	-----	-----
MII A Nr. III 8 2 icd fw	(404)	-----	-----
MII A Nr. III 8 2 icd rv	(219)	GGTACTGCGCCGAAATATGCCGGACAGGACAAAGTAAACCCAGGCTCTATTATTCTCTCCGCTGAGATGATGCTG	
		1726	1800
CFT0743 icd	(1726)	CGCCATATGGGCTGGACTGAAGCGGAGACCTGATTGTTAAAGGTATGGAAGGCGCAATCAATCGCAAGACCGTA	
MII A Nr. I 43 icd	(1357)	CGCCATATGGGCTGGACTGAAGCGGAGACCTGATTGTTAAAGGTATGGAAGGCGCAATCAATCGCAAGACCGTA	
MII A Nr. III 8 1 icd fw	(675)	-----	-----
MII A Nr. III 8 2 icd fw	(404)	-----	-----
MII A Nr. III 8 2 icd rv	(294)	CGCCATATGGGCTGGACTGAAGCGGAGACCTGATTGTTAAAGGTATGGAAGGCGCAATCAATCGCAAGACCGTA	
		1801	1875
CFT0743 icd	(1801)	ACCTATGACTTCGAACGCTCGATGGAAGGCGCTAAAGCTGCTGAAATGTTTCAGAGTTTGGTGTGCGATCATCAAG	
MII A Nr. I 43 icd	(1432)	ACCTATGACTTCGAACGCTCGATGGAAGGCGCTAAAGCTGCTGAAATGTTTCAGAGTTTGGTGTGCGATCATCAAG	
MII A Nr. III 8 1 icd fw	(675)	-----	-----
MII A Nr. III 8 2 icd fw	(404)	-----	-----
MII A Nr. III 8 2 icd rv	(369)	ACCTATGACTTCGAACGCTCGATGGAAGGCGCTAAAGCTGCTGAAATGTTTCAGAGTTTGGTGTGCGATCATCAAG	
		1876	1950
CFT0743 icd	(1876)	AATATGTAATCACTACATGTGTTAAATATTGAACGGGCGTATAACACGCCCGTTGTTTTATGATGATGTAATAAT	
MII A Nr. I 43 icd	(1507)	AATATGTAATCACTACATGTGTTAAATATTGAACGGGCGTATAACACGCCCGTTGTTTTATGATGATGTAATAAT	
MII A Nr. III 8 1 icd fw	(675)	-----	-----
MII A Nr. III 8 2 icd fw	(404)	-----	-----
MII A Nr. III 8 2 icd rv	(444)	AATATGTAATCACTACATGTGTTAAATATTGAACGGGCGTATAACACGCCCGTTGTTTTATGATGATGTAATAAT	
		1951	2025
CFT0743 icd	(1951)	CTTCCCCAAAAC-----CTTCCCCAAAACGGCTATTTTCTATGCTGTTTTGATATCTACGATAATC	
MII A Nr. I 43 icd	(1582)	CTTCCCCAAAACTTTCCCCAAAACCTTCCCCAAAACGGCTATTTTCTATGCTG-----	
MII A Nr. III 8 1 icd fw	(675)	-----	-----
MII A Nr. III 8 2 icd fw	(404)	-----	-----
MII A Nr. III 8 2 icd rv	(519)	CTTCCCCAAAACTTTCCCCAAAACCTTCCCCAAAACGGCTATTTTCTAT-----	

15.4.4 Ergebnisse MII pHNE19-02.1 Nr. III 2

Tabelle 15-14 Ergebnisse der Sequenzanalyse für MII pHNE19-02.1 Nr. III 2

orange: Startcodon *icd* (ATG); grün: Stoppcodon *icd* (TAA), violett: mutierte Terminatorsequenz *icd*; gelb: Mutation MII pHNE19-02.1 Nr. III 2 (Y (TAG) → TAA Stoppcodon)

		301	375
CFT073 icd Region	(301)	GAACTGCGGAAGAACATCGTAGGGTTTATTGAACAGGATCACACGCGTGGGCTGGTTTTTCAGGTTTACGCCTGGT	
MII A Nr. I 43 icd	(1)	-----	-----
MII A Nr. III 2 1 icd fw	(1)	-----	-----
MII A Nr. III 2 1 icd rv	(1)	-----	-----
MII A Nr. III 2 2 icd fw	(1)	-----	-----
MII A Nr. III 2 2 icd rv	(1)	-----	-----
		376	450
CFT073 icd Region	(376)	AGAACGTTGCGAGCTGAATCGCTTAACCTGGTGATTCTAAAAGAAGTTTTTGCATGGTATTTTCAGAGATTAT	
MII A Nr. I 43 icd	(14)	AGAACGTTGCGAGCTGAATCGCTTAACCTGGTGATTCTAAAAGAAGTTTTTGCATGGTATTTTCAGAGATTAT	
MII A Nr. III 2 1 icd fw	(2)	AGAACGTTGCGAGCTGAATCGCTTAACCTGGTGATTCTAAAAGAAGTTTTTGCATGGTATTTTCAGAGATTAT	
MII A Nr. III 2 1 icd rv	(1)	-----	-----
MII A Nr. III 2 2 icd fw	(1)	-----	-----

MII A Nr. III2 2 icd rv	(1)	-----	
		451	525
CFT073 icd Region	(451)	GAATGCCGCATTATAGCCTAATAACGCGCATCTTTCATGACGGCAAACAATAGGGTAGTATTGACAAGCCAATT	
MII A Nr. I43 icd	(89)	GAATGCCGCATTATAGCCTAATAACGCGCATCTTTCATGACGGCAAACAATAGGGTAGTATTGACAAGCCAATT	
MII A Nr. III2 1 icd fw	(77)	GAATGCCGCATTATAGCCTAATAACGCGCATCTTTCATGACGGCAAACAATAGGGTAGTATTGACAAGCCAATT	
MII A Nr. III2 1 icd rv	(1)	-----	
MII A Nr. III2 2 icd fw	(1)	-----	
MII A Nr. III2 2 icd rv	(1)	-----	
		526	600
CFT073 icd Region	(526)	ACAAATCATTAAACAAAAATGCTCTAAAGCATCCGTATCGCAGGACGCAAACGCATATGCAACGTGGTGGTAGA	
MII A Nr. I43 icd	(164)	ACAAATCATTAAACAAAAATGCTCTAAAGCATCCGTATCGCAGGACGCAAACGCATATGCAACGTGGTGGTAGA	
MII A Nr. III2 1 icd fw	(152)	ACAAATCATTAAACAAAAATGCTCTAAAGCATCCGTATCGCAGGACGCAAACGCATATGCAACGTGGTGGTAGA	
MII A Nr. III2 1 icd rv	(1)	-----	
MII A Nr. III2 2 icd fw	(1)	-----	
MII A Nr. III2 2 icd rv	(1)	-----	
		601	675
CFT073 icd Region	(601)	CGAGCAAACCACTAGCGCTCGAAGGAGAGGTGAATGGAAAGTAAAGTAGTTGTTCCGGCACAAGGCAAGAAGATC	
MII A Nr. I43 icd	(239)	CGAGCAAACCACTAGCGCTCGAAGGAGAGGTGAATGGAAAGTAAAGTAGTTGTTCCGGCACAAGGCAAGAAGATC	
MII A Nr. III2 1 icd fw	(227)	CGAGCAAACCACTAGCGCTCGAAGGAGAGGTGAATGGAAAGTAAAGTAGTTGTTCCGGCACAAGGCAAGAAGATC	
MII A Nr. III2 1 icd rv	(1)	-----TCGAAAGGAGAGGTGAATGGAAAGTAAAGTAGTTGTTCCGGCACAAGGCAAGAAGATC	
MII A Nr. III2 2 icd fw	(1)	-----	
MII A Nr. III2 2 icd rv	(1)	-----	
		676	750
CFT073 icd Region	(676)	ACCCGCAAACCGCAAACCTCAACGTTCCCTGAAAATCCGATTATCCCTTACATTGAAGGTGATGGAATCGGTGTA	
MII A Nr. I43 icd	(314)	ACCCGCAAACCGCAAACCTCAACGTTCCCTGAAAATCCGATTATCCCTTACATTGAAGGTGATGGAATCGGTGTA	
MII A Nr. III2 1 icd fw	(302)	ACCCGCAAACCGCAAACCTCAACGTTCCCTGAAAATCCGATTATCCCTTACATTGAAGGTGATGGAATCGGTGTA	
MII A Nr. III2 1 icd rv	(58)	ACCCGCAAACCGCAAACCTCAACGTTCCCTGAAAATCCGATTATCCCTTACATTGAAGGTGATGGAATCGGTGTA	
MII A Nr. III2 2 icd fw	(1)	-----	
MII A Nr. III2 2 icd rv	(1)	-----	
		751	825
CFT073 icd Region	(751)	GATGTAACCCAGCCATGCTGAAAGTGGTGCAGCTGCAGTCGAGAAAGCCTATAAAGGCCAGCGTAAAATCTCC	
MII A Nr. I43 icd	(389)	GATGTAACCCAGCCATGCTGAAAGTGGTGCAGCTGCAGTCGAGAAAGCCTATAAAGGCCAGCGTAAAATCTCC	
MII A Nr. III2 1 icd fw	(377)	GATGTAACCCAGCCATGCTGAAAGTGGTGCAGCTGCAGTCGAGAAAGCCTATAAAGGCCAGCGTAAAATCTCC	
MII A Nr. III2 1 icd rv	(133)	GATGTAACCCAGCCATGCTGAAAGTGGTGCAGCTGCAGTCGAGAAAGCCTATAAAGGCCAGCGTAAAATCTCC	
MII A Nr. III2 2 icd fw	(1)	-----	
MII A Nr. III2 2 icd rv	(1)	-----	
		826	900
CFT073 icd Region	(826)	TGGATGGAAATTTACACCGGTGAAAAATCCACACAGGTTTATGGTCAGGACGCTGGTGGCTGCTGAAACCCCTT	
MII A Nr. I43 icd	(464)	TGGATGGAAATTTACACCGGTGAAAAATCCACACAGGTTTATGGTCAGGACGCTGGTGGCTGCTGAAACCCCTT	
MII A Nr. III2 1 icd fw	(452)	TGGATGGAAATTTACACCGGTGAAAAATCCACACAGGTTTATGGTCAGGACGCTGGTGGCTGCTGAAACCCCTT	
MII A Nr. III2 1 icd rv	(208)	TGGATGGAAATTTACACCGGTGAAAAATCCACACAGGTTTATGGTCAGGACGCTGGTGGCTGCTGAAACCCCTT	
MII A Nr. III2 2 icd fw	(1)	-----	
MII A Nr. III2 2 icd rv	(1)	-----	
		901	975
CFT073 icd Region	(901)	GATCTGATTCGTGAATACTCGCGTTGCCATTAAGGCCCGCTGACCCTCCGGTTGGTGGCGGTATTCGCTCTCTG	
MII A Nr. I43 icd	(539)	GATCTGATTCGTGAATACTCGCGTTGCCATTAAGGCCCGCTGACCCTCCGGTTGGTGGCGGTATTCGCTCTCTG	
MII A Nr. III2 1 icd fw	(527)	GATCTGATTCGTGAATACTCGCGTTGCCATTAAGGCCCGCTGACCCTCCGGTTGGTGGCGGTATTCGCTCTCTG	
MII A Nr. III2 1 icd rv	(283)	GATCTGATTCGTGAATACTCGCGTTGCCATTAAGGCCCGCTGACCCTCCGGTTGGTGGCGGTATTCGCTCTCTG	
MII A Nr. III2 2 icd fw	(1)	-----	
MII A Nr. III2 2 icd rv	(1)	-----	
		976	1050
CFT073 icd Region	(976)	AACGTTGCCCTGCGCCAGGAACCTGGATCTCTACATCTGCCTGCGTCCGGTACGTTACTATCAGGGCACTCCAAGC	
MII A Nr. I43 icd	(614)	AATGTTGCCCTGCGCCAGGAACCTGGATCTCTACATCTGCCTGCGTCCGGTACGTTACTATCAGGGCACTCCAAGC	
MII A Nr. III2 1 icd fw	(602)	AATGTTGCCCTGCGCCAGGAACCTGGATCTCTACATCTGCCTGCGTCCGGTACGTTACTATCAGGGCACTCCAAGC	
MII A Nr. III2 1 icd rv	(358)	AATGTTGCCCTGCGCCAGGAACCTGGATCTCTACATCTGCCTGCGTCCGGTACGTTACTATCAGGGCACTCCAAGC	
MII A Nr. III2 2 icd fw	(1)	-----	
MII A Nr. III2 2 icd rv	(1)	-----	
		1051	1125
CFT073 icd Region	(1051)	CCGGTTAAACACCCCTGAACCTGACCGATATGGTTATCTTCCGTGAAAACCTCGGAAGACATTTATCGGGTATCGAA	
MII A Nr. I43 icd	(689)	CCGGTTAAACACCCCTGAACCTGACCGATATGGTTATCTTCCGTGAAAACCTCGGAAGACATTTATCGGGTATCGAA	
MII A Nr. III2 1 icd fw	(665)	CCGGTTAAACACCCCTGAACCTGACCGATATGGTTATCTTCCGTGAAAACCTCGGAAGACATTTATCGGGTATCGAA	
MII A Nr. III2 1 icd rv	(433)	CCGGTTAAACACCCCTGAACCTGACCGATATGGTTATCTTCCGTGAAAACCTCGGAAGACATTTATCGGGTATCGAA	
MII A Nr. III2 2 icd fw	(1)	-----	
MII A Nr. III2 2 icd rv	(1)	-----	
		1126	1200
CFT073 icd Region	(1126)	TGGAAAGCAGACTCTGCCAGCGTGAGAAAGTGAATAAATTCCTGCGTGAAGAGATGGCGTGAAGAAAATTCGG	
MII A Nr. I43 icd	(764)	TGGAAAGCAGACTCTGCCAGCGTGAGAAAGTGAATAAATTCCTGCGTGAAGAGATGGCGTGAAGAAAATTCGG	
MII A Nr. III2 1 icd fw	(665)	TGGAAAGCAGACTCTGCCAGCGTGAGAAAGTGAATAAATTCCTGCGTGAAGAGATGGCGTGAAGAAAATTCGG	
MII A Nr. III2 1 icd rv	(508)	TGGAAAGCAGACTCTGCCAGCGTGAGAAAGTGAATAAATTCCTGCGTGAAGAGATGGG-----	
MII A Nr. III2 2 icd fw	(1)	-----AAATTCCTGCGTGAAGAGATGGCGTGAAGAAAATTCGG	
MII A Nr. III2 2 icd rv	(1)	-----	
		1201	1275
CFT073 icd Region	(1201)	TTCCCGGAACATTGCGGTATCGGTATTAAGCCGTGTTTCGGAAGAAGGCACCAAACGCTCGGTTGCTGCAGCGATC	
MII A Nr. I43 icd	(839)	TTCCCGGAACATTGCGGTATCGGTATTAAGCCGTGTTTCGGAAGAAGGCACCAAACGCTCGGTTGCTGCAGCGATC	
MII A Nr. III2 1 icd fw	(665)	TTCCCGGAACATTGCGGTATCGGTATTAAGCCGTGTTTCGGAAGAAGGCACCAAACGCTCGGTTGCTGCAGCGATC	
MII A Nr. III2 1 icd rv	(567)	TTCCCGGAACATTGCGGTATCGGTATTAAGCCGTGTTTCGGAAGAAGGCACCAAACGCTCGGTTGCTGCAGCGATC	
MII A Nr. III2 2 icd fw	(40)	TTCCCGGAACATTGCGGTATCGGTATTAAGCCGTGTTTCGGAAGAAGGCACCAAACGCTCGGTTGCTGCAGCGATC	
MII A Nr. III2 2 icd rv	(1)	-----	
		1276	1350
CFT073 icd Region	(1276)	GAATACGCAATTGCTAACGATCTGTACTCTGTGACCCCTGGTGCACAAAGGCAACATCATGAAGTTCACCGAAGGC	
MII A Nr. I43 icd	(914)	GAATACGCAATTGCTAACGATCTGTACTCTGTGACCCCTGGTGCACAAAGGCAACATCATGAAGTTCACCGAAGGC	
MII A Nr. III2 1 icd fw	(665)	GAATACGCAATTGCTAACGATCTGTACTCTGTGACCCCTGGTGCACAAAGGCAACATCATGAAGTTCACCGAAGGC	
MII A Nr. III2 1 icd rv	(567)	GAATACGCAATTGCTAACGATCTGTACTCTGTGACCCCTGGTGCACAAAGGCAACATCATGAAGTTCACCGAAGGC	
MII A Nr. III2 2 icd fw	(115)	GAATACGCAATTGCTAACGATCTGTACTCTGTGACCCCTGGTGCACAAAGGCAACATCATGAAGTTCACCGAAGGC	
MII A Nr. III2 2 icd rv	(1)	-----	
		1351	1425
CFT073 icd Region	(1351)	CGGTTTAAAGACTGGGGCTACCACTGGCGCGTGAAGAATTTGGCGTGAAGTATGACGGCGCCCGTGGCTG	

MII A Nr. I43 icd	(989)	CGGTTTAAAGACTGGGGCTACCA	CTGGCGCGTGAAGAATTGGCGGTGAAC	GATCGACGGCGGCCCGTGGCTG
MII A Nr. III2 1 icd fw	(665)	-----	-----	-----
MII A Nr. III2 1 icd rv	(567)	-----	-----	-----
MII A Nr. III2 2 icd fw	(190)	CGGTTTAAAGACTGGGGCTACCA	CTGGCGCGTGAAGAATTGGCGGTGAAC	GATCGACGGCGGCCCGTGGCTG
MII A Nr. III2 2 icd rv	(1)	-----	-----	-----
CFT073 icd Region	(1426)	AAAGTTAAAAACCCGAATACCGGCA	AAGAGAT	CGTCATTAAAGACGTGATTGCTGATGCATTCTGCAACAGATC
MII A Nr. I43 icd	(1064)	AAAGTTAAAAACCCGAATACCGGCA	-----	CGTCATTAAAGACGTGATTGCTGATGCATTCTGCAACAGATC
MII A Nr. III2 1 icd fw	(665)	-----	-----	-----
MII A Nr. III2 1 icd rv	(567)	-----	-----	-----
MII A Nr. III2 2 icd fw	(265)	AAAGTTAAAAACCCGAATACCGGCA	AAGAGAT	CGTCATTAAAGACGTGATTGCTGATGCATTCTGCAACAGATC
MII A Nr. III2 2 icd rv	(1)	-----	-----	-----
CFT073 icd Region	(1501)	CTGCTGCGTCCGGCTGAATATGATGTTATCGCCTGTATGAACCTGAACGGTGACTACATTTCTGACGCCCTGGCA		
MII A Nr. I43 icd	(1132)	CTGCTGCGTCCGGCTGAATATGATGTTATCGCCTGTATGAACCTGAACGGTGACTACATTTCTGACGCCCTGGCA		
MII A Nr. III2 1 icd fw	(665)	-----	-----	-----
MII A Nr. III2 1 icd rv	(567)	-----	-----	-----
MII A Nr. III2 2 icd fw	(340)	CTGCTGCGTCCGGCTGAATATGATGTTATCGCCTGTATGAACCTGAACGGTGACTACATTTCTGACGCCCTGGCA		
MII A Nr. III2 2 icd rv	(1)	-----	-----	-----
CFT073 icd Region	(1576)	CGCAGGTTGGTGGTATCGGTATCGCCCTGGCGCAAACATCGGTGACGAATGCGCCCTGTTTGAAGCCACCCAC		
MII A Nr. I43 icd	(1207)	CGCAGGTTGGTGGTATCGGTATCGCCCTGGCGCAAACATCGGTGACGAATGCGCCCTGTTTGAAGCCACCCAC		
MII A Nr. III2 1 icd fw	(665)	-----	-----	-----
MII A Nr. III2 1 icd rv	(567)	-----	-----	-----
MII A Nr. III2 2 icd fw	(415)	CGCAGGTTGGTGGTATCGGTATCGCCCTGGCGCAAACATCGGTGACGAATGCGCCCTGTTTGAAGCCACCCAC		
MII A Nr. III2 2 icd rv	(1)	-----	TATCGGTATCGCCCTGGCGCAAACATCGGTGACGAATGCGCCCTGTTTGAAGCCACCCAC	
CFT073 icd Region	(1651)	GGTACTGCGCCGAAATATGCCGGACAGGACAAAGTAAACCCAGGCTCTATTATTCTCTCCGCTGAGATGATGCTG		
MII A Nr. I43 icd	(1282)	GGTACTGCGCCGAAATATGCCGGACAGGACAAAGTAAACCCAGGCTCTATTATTCTCTCCGCTGAGATGATGCTG		
MII A Nr. III2 1 icd fw	(665)	-----	-----	-----
MII A Nr. III2 1 icd rv	(567)	-----	-----	-----
MII A Nr. III2 2 icd fw	(490)	GGTACTGCGCCGAAATATGCCGGACAGGACAAAGTAAACCCAGGCTCTATTATTCTCTCCGCTGAGATGATGCTG		
MII A Nr. III2 2 icd rv	(62)	GGTACTGCGCCGAAATATGCCGGACAGGACAAAGTAAACCCAGGCTCTATTATTCTCTCCGCTGAGATGATGCTG		
CFT073 icd Region	(1726)	CGCCATATGGGTGGACTGAAGCGC	AGACCTGATTGTTAAAGGTATGGAAGGCGCAATCAAT	CGCAAGACCGTA
MII A Nr. I43 icd	(1357)	CGCCATATGGGTGGACTGAAGCGC	AGACCTGATTGTTAAAGGTATGGAAGGCGCAATCAAT	CGCAAGACCGTA
MII A Nr. III2 1 icd fw	(665)	-----	-----	-----
MII A Nr. III2 1 icd rv	(567)	-----	-----	-----
MII A Nr. III2 2 icd fw	(565)	C	-----	-----
MII A Nr. III2 2 icd rv	(137)	CGCCATATGGGTGGACTGAAGCGC	AGACCTGATTGTTAAAGGTATGGAAGGCGCAATCAAT	CGCAAGACCGTA
CFT073 icd Region	(1801)	ACCTATGACTTCGAACGCTCTGATGGAAGGCGCTAA	CTGCTGAAATGTTACAGATTTGGTGT	GCGATCATCAAG
MII A Nr. I43 icd	(1432)	ACCTATGACTTCGAACGCTCTGATGGAAGGCGCTAA	CTGCTGAAATGTTACAGATTTGGTGT	GCGATCATCAAG
MII A Nr. III2 1 icd fw	(665)	-----	-----	-----
MII A Nr. III2 1 icd rv	(567)	-----	-----	-----
MII A Nr. III2 2 icd fw	(566)	-----	-----	-----
MII A Nr. III2 2 icd rv	(212)	ACCTATGACTTCGAACGCTCTGATGGAAGGCGCTAA	CTGCTGAAATGTTACAGATTTGGTGT	GCGATCATCAAG
CFT073 icd Region	(1876)	AATATGTAATCACTACATGTGTTAAATATTG	AACGGCGGTATAACACGCCCGTTGTTTTATGATGATGTAATAA	
MII A Nr. I43 icd	(1507)	AATATGTAATCACTACATGTGTTAAATATTG	AACGGCGGTATAACACGCCCGTTGTTTTATGATGATGTAATAA	
MII A Nr. III2 1 icd fw	(665)	-----	-----	-----
MII A Nr. III2 1 icd rv	(567)	-----	-----	-----
MII A Nr. III2 2 icd fw	(566)	-----	-----	-----
MII A Nr. III2 2 icd rv	(287)	AATATGTAATCACTACATGTGTTAAATATTG	AACGGCGGTATAACACGCCCGTTGTTTTATGATGATGTAATAA	
CFT073 icd Region	(1951)	CTTCCCCAAAAC	-----	CTTCCCCAAAAC
MII A Nr. I43 icd	(1582)	CTTCCCCAAAAC	TTTCCCCAAAAC	CTTCCCCAAAAC
MII A Nr. III2 1 icd fw	(665)	-----	-----	-----
MII A Nr. III2 1 icd rv	(567)	-----	-----	-----
MII A Nr. III2 2 icd fw	(566)	-----	-----	-----
MII A Nr. III2 2 icd rv	(362)	CTTCCCCAAAAC	TTTCCCCAAAAC	CTTCCCCAAAAC

15.4.5 Ergebnisse MII pHPNE19-02.1 Nr. III 3

Tabelle 15-15 Ergebnisse der Sequenzanalyse für MII pHPNE19-02.1 Nr. III 3

orange: Startcodon *icd* (ATG); grün: Stoppcodon *icd* (TAA)

CFT073 icd Region	(301)	GAAGTGCAGGAAAGAACATCGTAGGGTTTATTGAACAGGATCACACGCGTGGGCTGGTTTTTCAGGTTTACGCCT	GGT
MII A Nr. I43 icd	(1)	-----	-----
MII A Nr. III3 1 icd fw	(1)	-----	-----
MII A Nr. III3 1 icd rv	(1)	-----	-----
MII A Nr. III3 2 icd fw	(1)	-----	-----
MII A Nr. III3 2 icd rv	(1)	-----	-----
CFT073 icd Region	(376)	AGAACGTTGCGAGCTGAATCGCTTAACCTGGTGATTCTAAAAGAAGTTTTTGCATGGTATTTTCAGAGATTAT	
MII A Nr. I43 icd	(14)	AGAACGTTGCGAGCTGAATCGCTTAACCTGGTGATTCTAAAAGAAGTTTTTGCATGGTATTTTCAGAGATTAT	
MII A Nr. III3 1 icd fw	(4)	AGAACGTTGCGAGCTGAATCGCTTAACCTGGTGATTCTAAAAGAAGTTTTTGCATGGTATTTTCAGAGATTAT	
MII A Nr. III3 1 icd rv	(1)	-----	-----
MII A Nr. III3 2 icd fw	(1)	-----	-----
MII A Nr. III3 2 icd rv	(1)	-----	-----
		451	525

CFT073 icd Region	(451)	GAATTGCCGCATTATAGCCCTAATAACGCGCATCTTTCATGACGGCAAACAATAGGGTAGTATTGACAAGCCAATT	
MII A Nr. I43 icd	(89)	GAATTGCCGCATTATAGCCCTAATAACGCGCATCTTTCATGACGGCAAACAATAGGGTAGTATTGACAAGCCAATT	
MII A Nr. III3 1 icd fw	(79)	GAATTGCCGCATTATAGCCCTAATAACGCGCATCTTTCATGACGGCAAACAATAGGGTAGTATTGACAAGCCAATT	
MII A Nr. III3 1 icd rv	(1)	-----	
MII A Nr. III3 2 icd fw	(1)	-----	
MII A Nr. III3 2 icd rv	(1)	-----	
		526	600
CFT073 icd Region	(526)	ACAAATCATTAAACAAAAAATGCTCTAAAGCATCCGTATCGCAGGACGCAAACGCATATGCAACGTGGTGGTAGA	
MII A Nr. I43 icd	(164)	ACAAATCATTAAACAAAAAATGCTCTAAAGCATCCGTATCGCAGGACGCAAACGCATATGCAACGTGGTGGTAGA	
MII A Nr. III3 1 icd fw	(154)	ACAAATCATTAAACAAAAAATGCTCTAAAGCATCCGTATCGCAGGACGCAAACGCATATGCAACGTGGTGGTAGA	
MII A Nr. III3 1 icd rv	(1)	-----	
MII A Nr. III3 2 icd fw	(1)	-----	
MII A Nr. III3 2 icd rv	(1)	-----	
		601	675
CFT073 icd Region	(601)	CGAGCAAACCACTAGCGCTCGAAGGAGAGGTGAATGGAAAGTAAAGTAGTTGTTCCGGCACAAGGCAAGAAGATC	
MII A Nr. I43 icd	(239)	CGAGCAAACCACTAGCGCTCGAAGGAGAGGTGAATGGAAAGTAAAGTAGTTGTTCCGGCACAAGGCAAGAAGATC	
MII A Nr. III3 1 icd fw	(229)	CGAGCAAACCACTAGCGCTCGAAGGAGAGGTGAATGGAAAGTAAAGTAGTTGTTCCGGCACAAGGCAAGAAGATC	
MII A Nr. III3 1 icd rv	(1)	-----	
MII A Nr. III3 2 icd fw	(1)	-----	
MII A Nr. III3 2 icd rv	(1)	-----	
		676	750
CFT073 icd Region	(676)	ACCCTGCAAAACGGCAAACCTCAACGTTCCCTGAAAATCCGATTATCCCTTACATTGAAGGTGATGGAATCGGTGTA	
MII A Nr. I43 icd	(314)	ACCCTGCAAAACGGCAAACCTCAACGTTCCCTGAAAATCCGATTATCCCTTACATTGAAGGTGATGGAATCGGTGTA	
MII A Nr. III3 1 icd fw	(304)	ACCCTGCAAAACGGCAAACCTCAACGTTCCCTGAAAATCCGATTATCCCTTACATTGAAGGTGATGGAATCGGTGTA	
MII A Nr. III3 1 icd rv	(1)	-----	
MII A Nr. III3 2 icd fw	(1)	-----	
MII A Nr. III3 2 icd rv	(1)	-----	
		751	825
CFT073 icd Region	(751)	GATGTAACCCAGCCATGCTGAAAGTGGTCGACGCTGCAGTCGAGAAAGCCTATAAAGGCGAGCGTAAAATCTCC	
MII A Nr. I43 icd	(389)	GATGTAACCCAGCCATGCTGAAAGTGGTCGACGCTGCAGTCGAGAAAGCCTATAAAGGCGAGCGTAAAATCTCC	
MII A Nr. III3 1 icd fw	(379)	GATGTAACCCAGCCATGCTGAAAGTGGTCGACGCTGCAGTCGAGAAAGCCTATAAAGGCGAGCGTAAAATCTCC	
MII A Nr. III3 1 icd rv	(1)	-----	
MII A Nr. III3 2 icd fw	(1)	-----	
MII A Nr. III3 2 icd rv	(1)	-----	
		826	900
CFT073 icd Region	(826)	TGGATGGAAATTTACACCGGTGAAAAATCCACACAGGTTTATGGTCAGGACGCTGTTGCTGCTGAAACCCCTT	
MII A Nr. I43 icd	(464)	TGGATGGAAATTTACACCGGTGAAAAATCCACACAGGTTTATGGTCAGGACGCTGTTGCTGCTGAAACCCCTT	
MII A Nr. III3 1 icd fw	(454)	TGGATGGAAATTTACACCGGTGAAAAATCCACACAGGTTTATGGTCAGGACGCTGTTGCTGCTGAAACCCCTT	
MII A Nr. III3 1 icd rv	(1)	-----	
MII A Nr. III3 2 icd fw	(1)	-----	
MII A Nr. III3 2 icd rv	(1)	-----	
		901	975
CFT073 icd Region	(901)	GATCTGATTCGTGAATATCGCGTTGCCATTAAAGGCCCGCTGACCACTCCGGTTGGTGGCGGTATTCGCTCTCTG	
MII A Nr. I43 icd	(539)	GATCTGATTCGTGAATATCGCGTTGCCATTAAAGGCCCGCTGACCACTCCGGTTGGTGGCGGTATTCGCTCTCTG	
MII A Nr. III3 1 icd fw	(529)	GATCTGATTCGTGAATATCGCGTTGCCATTAAAGGCCCGCTGACCACTCCGGTTGGTGGCGGTATTCGCTCTCTG	
MII A Nr. III3 1 icd rv	(1)	-----	
MII A Nr. III3 2 icd fw	(1)	-----	
MII A Nr. III3 2 icd rv	(1)	-----	
		976	1050
CFT073 icd Region	(976)	AACCTTGCCCTGCGCCAGGAACCTGGATCTCTACATCTGCCTGCGTCCGGTACGTTACTATCAGGGCACTCCAAGC	
MII A Nr. I43 icd	(614)	AATGTTGCCCTGCGCCAGGAACCTGGATCTCTACATCTGCCTGCGTCCGGTACGTTACTATCAGGGCACTCCAAGC	
MII A Nr. III3 1 icd fw	(604)	AATGTTGCCCTGCGCCAGGAACCTGGATCTCTACATCTGCCTGCG-----TCGCTCCGGTACGTTACTATCAGGGCACTCCAAGC	
MII A Nr. III3 1 icd rv	(1)	-----	
MII A Nr. III3 2 icd fw	(1)	-----	
MII A Nr. III3 2 icd rv	(1)	-----	
		1051	1125
CFT073 icd Region	(1051)	CCGGTTAAACACCCCTGAACCTGACCATATGGTTATCTTCCGTGAAAACCTCGGAAGACATTTATGCGGGTATCGAA	
MII A Nr. I43 icd	(689)	CCGGTTAAACACCCCTGAACCTGACCATATGGTTATCTTCCGTGAAAACCTCGGAAGACATTTATGCGGGTATCGAA	
MII A Nr. III3 1 icd fw	(648)	CCGGTTAAACACCCCTGAACCTGACCATATGGTTATCTTCCGTGAAAACCTCGGAAGACATTTATGCGGGTATCGAA	
MII A Nr. III3 1 icd rv	(36)	CCGGTTAAACACCCCTGAACCTGACCATATGGTTATCTTCCGTGAAAACCTCGGAAGACATTTATGCGGGTATCGAA	
MII A Nr. III3 2 icd fw	(1)	-----	
MII A Nr. III3 2 icd rv	(1)	-----	
		1126	1200
CFT073 icd Region	(1126)	TGGAAAGCAGACTCTGCCGACGCTGAGAAAGTGAATAAATTCCTGCGTGAAGAGATGGGCGTGAAGAAAATTCGG	
MII A Nr. I43 icd	(764)	TGGAAAGCAGACTCTGCCGACGCTGAGAAAGTGAATAAATTCCTGCGTGAAGAGATGGGCGTGAAGAAAATTCGG	
MII A Nr. III3 1 icd fw	(648)	TGGAAAGCAGACTCTGCCGACGCTGAGAAAGTGAATAAATTCCTGCGTGAAGAGATGGGCGTGAAGAAAATTCGG	
MII A Nr. III3 1 icd rv	(111)	TGGAAAGCAGACTCTGCCGACGCTGAGAAAGTGAATAAATTCCTGCGTGAAGAGATGG-----	
MII A Nr. III3 2 icd fw	(1)	-----TGATTAATTCCTGCGTGAAGAGATGGGCGTGAAGAAAATTCGG	
MII A Nr. III3 2 icd rv	(1)	-----	
		1201	1275
CFT073 icd Region	(1201)	TTCCCGGAACATTGCGGTATCGGTATTAAAGCCGTGTTCCGAAGAAGGACCAACCTGCTGGTTGCTGACGCGATC	
MII A Nr. I43 icd	(839)	TTCCCGGAACATTGCGGTATCGGTATTAAAGCCGTGTTCCGAAGAAGGACCAACCTGCTGGTTGCTGACGCGATC	
MII A Nr. III3 1 icd fw	(648)	TTCCCGGAACATTGCGGTATCGGTATTAAAGCCGTGTTCCGAAGAAGGACCAACCTGCTGGTTGCTGACGCGATC	
MII A Nr. III3 1 icd rv	(169)	-----	
MII A Nr. III3 2 icd fw	(46)	TTCCCGGAACATTGCGGTATCGGTATTAAAGCCGTGTTCCGAAGAAGGACCAACCTGCTGGTTGCTGACGCGATC	
MII A Nr. III3 2 icd rv	(1)	-----	
		1276	1350
CFT073 icd Region	(1276)	GAATACGCAATTGCTAACGATCGTGACTCTGTGACCCCTGGTGCACAAAGGCAACATCATGAAGTTCACCGAAGGC	
MII A Nr. I43 icd	(914)	GAATACGCAATTGCTAACGATCGTGACTCTGTGACCCCTGGTGCACAAAGGCAACATCATGAAGTTCACCGAAGGC	
MII A Nr. III3 1 icd fw	(648)	GAATACGCAATTGCTAACGATCGTGACTCTGTGACCCCTGGTGCACAAAGGCAACATCATGAAGTTCACCGAAGGC	
MII A Nr. III3 1 icd rv	(169)	-----	
MII A Nr. III3 2 icd fw	(121)	GAATACGCAATTGCTAACGATCGTGACTCTGTGACCCCTGGTGCACAAAGGCAACATCATGAAGTTCACCGAAGGC	
MII A Nr. III3 2 icd rv	(1)	-----	
		1351	1425
CFT073 icd Region	(1351)	CGGTTTAAAGACTGGGGCTACCAACTGGCCGCGTGAAGAATTTGGCGGTGAAGTGCACGCGCGCCGCTGGCTG	
MII A Nr. I43 icd	(989)	CGGTTTAAAGACTGGGGCTACCAACTGGCCGCGTGAAGAATTTGGCGGTGAAGTGCACGCGCGCCGCTGGCTG	
MII A Nr. III3 1 icd fw	(648)	-----	

MII A Nr. III3 1 icd rv	(169)	-----
MII A Nr. III3 2 icd fw	(196)	CGCTTTAAAGACTGGGGCTACCACTGGCGCGTGAAGAAATTGGCGGTGAAGTATCGACGGCGGCCCGTGGCTG
MII A Nr. III3 2 icd rv	(1)	-----CTG
	1426	-----1500
CFT073 icd Region	(1426)	AAAGTTAAAACCCGAATACCGGCAAAGAGATCGTCATTAAAGACGTGATTGCTGATGCATTCTGCAACAGATC
MII A Nr. I43 icd	(1064)	AAAGTTAAAACCCGAATACCGGCA-----CGTCATTAAAGACGTGATTGCTGATGCATTCTGCAACAGATC
MII A Nr. III3 1 icd fw	(648)	-----
MII A Nr. III3 1 icd rv	(169)	-----
MII A Nr. III3 2 icd fw	(271)	AAAGTTAAAACCCGAATACCGGCAAAGAGATCGTCATTAAAGACGTGATTGCTGATGCATTCTGCAACAGATC
MII A Nr. III3 2 icd rv	(4)	AAAGTTAAAACCCGAATACCGGCAAAGAGATCGTCATTAAAGACGTGATTGCTGATGCATTCTGCAACAGATC
	1501	-----1575
CFT073 icd Region	(1501)	CTGCTGCGTCCGGCTGAATATGATGTTATCGCCTGTATGAACCTGAACGGTGACTACATTTCTGACGCCCTGGCA
MII A Nr. I43 icd	(1132)	CTGCTGCGTCCGGCTGAATATGATGTTATCGCCTGTATGAACCTGAACGGTGACTACATTTCTGACGCCCTGGCA
MII A Nr. III3 1 icd fw	(648)	-----
MII A Nr. III3 1 icd rv	(169)	-----
MII A Nr. III3 2 icd fw	(346)	CTGCTGCGTCCGGCTGAATATGATGTTATCGCCTGTATGAACCTGAACGGTGACTACATTTCTGACGCCCTGGCA
MII A Nr. III3 2 icd rv	(79)	CTGCTGCGTCCGGCTGAATATGATGTTATCGCCTGTATGAACCTGAACGGTGACTACATTTCTGACGCCCTGGCA
	1576	-----1650
CFT073 icd Region	(1576)	GCGCAGGTTGGTGGTATCGGTATCGCCCTGGCGCAAACATCGGTGACGAATGCGCCCTGTTTGAAGCCACCCAC
MII A Nr. I43 icd	(1207)	GCGCAGGTTGGTGGTATCGGTATCGCCCTGGCGCAAACATCGGTGACGAATGCGCCCTGTTTGAAGCCACCCAC
MII A Nr. III3 1 icd fw	(648)	-----
MII A Nr. III3 1 icd rv	(169)	-----
MII A Nr. III3 2 icd fw	(421)	GCGCAGGTTGGTGGTATCGGTATCGCCCTGGCGCAAACATCGGTGACGAATGCGCCCTGTTTGAAGCCACCCAC
MII A Nr. III3 2 icd rv	(154)	GCGCAGGTTGGTGGTATCGGTATCGCCCTGGCGCAAACATCGGTGACGAATGCGCCCTGTTTGAAGCCACCCAC
	1651	-----1725
CFT073 icd Region	(1651)	GGTACTGCGCCGAAATATGCCGGACAGGACAAAGTAAACCCAGGCTCTATTATTCTCTCCGCTGAGATGATGCTG
MII A Nr. I43 icd	(1282)	GGTACTGCGCCGAAATATGCCGGACAGGACAAAGTAAACCCAGGCTCTATTATTCTCTCCGCTGAGATGATGCTG
MII A Nr. III3 1 icd fw	(648)	-----
MII A Nr. III3 1 icd rv	(169)	-----
MII A Nr. III3 2 icd fw	(496)	GGTACTGCGCCGAAATATGCCGGACAGGACAAAGTAAACCCAGGCTCTATTATTCTCTCCG-----
MII A Nr. III3 2 icd rv	(229)	GGTACTGCGCCGAAATATGCCGGACAGGACAAAGTAAACCCAGGCTCTATTATTCTCTCCGCTGAGATGATGCTG
	1726	-----1800
CFT073 icd Region	(1726)	CGCCATATGGGCTGGACTGAAGCGCTGACCTGATTGTTAAAGGTATGGAAGGCGCAATCAATGCGAAGACCGTA
MII A Nr. I43 icd	(1357)	CGCCATATGGGCTGGACTGAAGCGCTGACCTGATTGTTAAAGGTATGGAAGGCGCAATCAATGCGAAGACCGTA
MII A Nr. III3 1 icd fw	(648)	-----
MII A Nr. III3 1 icd rv	(169)	-----
MII A Nr. III3 2 icd fw	(557)	CGCCATATGGGCTGGACTGAAGCGCTGACCTGATTGTTAAAGGTATGGAAGGCGCAATCAATGCGAAGACCGTA
MII A Nr. III3 2 icd rv	(304)	CGCCATATGGGCTGGACTGAAGCGCTGACCTGATTGTTAAAGGTATGGAAGGCGCAATCAATGCGAAGACCGTA
	1801	-----1875
CFT073 icd Region	(1801)	ACCTATGACTTCGAACGCTCTGATGGAAGGCGCTAAAGCTGCTGAAATGTTTCAGAGTTTGGTGCATGCGATCATCAAG
MII A Nr. I43 icd	(1432)	ACCTATGACTTCGAACGCTCTGATGGAAGGCGCTAAAGCTGCTGAAATGTTTCAGAGTTTGGTGCATGCGATCATCAAG
MII A Nr. III3 1 icd fw	(648)	-----
MII A Nr. III3 1 icd rv	(169)	-----
MII A Nr. III3 2 icd fw	(557)	ACCTATGACTTCGAACGCTCTGATGGAAGGCGCTAAAGCTGCTGAAATGTTTCAGAGTTTGGTGCATGCGATCATCAAG
MII A Nr. III3 2 icd rv	(379)	ACCTATGACTTCGAACGCTCTGATGGAAGGCGCTAAAGCTGCTGAAATGTTTCAGAGTTTGGTGCATGCGATCATCAAG
	1876	-----1950
CFT073 icd Region	(1876)	AAATATGTAATCACTACATGTGTTAAATATTGTAACGGGCGTATAACACGCCCGTGTGTTTATGATGATGTAATAAT
MII A Nr. I43 icd	(1507)	AAATATGTAATCACTACATGTGTTAAATATTGTAACGGGCGTATAACACGCCCGTGTGTTTATGATGATGTAATAAT
MII A Nr. III3 1 icd fw	(648)	-----
MII A Nr. III3 1 icd rv	(169)	-----
MII A Nr. III3 2 icd fw	(557)	AAATATGTAATCACTACATGTGTTAAATATTGTAACGGGCGTATAACACGCCCGTGTGTTTATGATGATGTAATAAT
MII A Nr. III3 2 icd rv	(454)	AAATATGTAATCACTACATGTGTTAAATATTGTAACGGGCGTATAACACGCCCGTGTGTTTATGATGATGTAATAAT
	1951	-----2025
CFT073 icd Region	(1951)	CTTCCCCAAAAC-----CTTCCCCAAAACCTGGCTATTCTCTATGCTGTTTGGATATCTACGATAAATC
MII A Nr. I43 icd	(1582)	CTTCCCCAAAACTTTCCCCAAAACCTTCCCCAAAACCTGGCTATTCTCTATGCTG-----
MII A Nr. III3 1 icd fw	(648)	-----
MII A Nr. III3 1 icd rv	(169)	-----
MII A Nr. III3 2 icd fw	(557)	CTTCCCCAAAACTTTCCCCAAAACCTTCCCCAAAACCTGGCTATTCTCTATGCTG-----
MII A Nr. III3 2 icd rv	(529)	CTTCCCCAAAACTTTCCCCAAAACCTTCCCCAAAACCTGGCTATTCTCTATGCTG-----

15.4.6 Ergebnisse MII pHNE19-02.1 Nr. III 13

Bei MII pHNE19-02.1 Nr. III 13 wurde ein Bereich von circa 230 bp nicht sequenziert. Für diesen Bereich kann daher keine Sequenzaussage gemacht werden. Der Bereich ist in Tabelle 15-16 rot markiert.

Tabelle 15-16 Ergebnisse der Sequenzanalyse für MII pHNE19-02.1 Nr. III 13

orange: Startcodon *icd* (ATG); grün: Stoppcodon *icd* (TAA); violett: mutierte Terminatorsequenz *icd*

		301		375
CFT073 icd Region	(301)	GAACTGCGGAAGAACATCGTAGGGTTTATTGAACAGGATCACACGCGTGGGCTGGTTTTTCAG	GTTCACGCGTGGT	
MII A Nr. I43 icd	(1)	-----	GTTCACGCGTGGT	
MII A Nr. III13 1 icd fw	(1)	-----	GTTCACGCGTGGT	
MII A Nr. III13 1 icd rv	(1)	-----	GTTCACGCGTGGT	
MII A Nr. III13 2 icd fw	(1)	-----	GTTCACGCGTGGT	
MII A Nr. III13 2 icd rv	(1)	-----	GTTCACGCGTGGT	

		376		450
CFT073 icd Region	(376)	AGAACGTTGCGAGCTGAATCGCTTAACCTGGTGATTTCATAAAGAAGTTTTTGCATGGTATTTTCAGAGATTAT		
MII A Nr. I43 icd	(14)	AGAACGTTGCGAGCTGAATCGCTTAACCTGGTGATTTCATAAAGAAGTTTTTGCATGGTATTTTCAGAGATTAT		
MII A Nr. III13 1 icd fw	(14)	AGAACGTTGCGAGCTGAATCGCTTAACCTGGTGATTTCATAAAGAAGTTTTTGCATGGTATTTTCAGAGATTAT		
MII A Nr. III13 1 icd rv	(1)	-----		
MII A Nr. III13 2 icd fw	(1)	-----		
MII A Nr. III13 2 icd rv	(1)	-----		
		451		525
CFT073 icd Region	(451)	GAATTGCCGCATTATAGCCTAATAACGGCATCTTTCATGACGGCAAACAATAGGGTAGTATTGACAAGCCAATT		
MII A Nr. I43 icd	(89)	GAATTGCCGCATTATAGCCTAATAACGGCATCTTTCATGACGGCAAACAATAGGGTAGTATTGACAAGCCAATT		
MII A Nr. III13 1 icd fw	(89)	GAATTGCCGCATTATAGCCTAATAACGGCATCTTTCATGACGGCAAACAATAGGGTAGTATTGACAAGCCAATT		
MII A Nr. III13 1 icd rv	(1)	-----		
MII A Nr. III13 2 icd fw	(1)	-----		
MII A Nr. III13 2 icd rv	(1)	-----		
		526		600
CFT073 icd Region	(526)	ACAAATCATTAAACAAAAATGCTCTAAAGCATCCGTATCGCAGGACGCAAACGCATATGCAACGTGGTGGTAGA		
MII A Nr. I43 icd	(164)	ACAAATCATTAAACAAAAATGCTCTAAAGCATCCGTATCGCAGGACGCAAACGCATATGCAACGTGGTGGTAGA		
MII A Nr. III13 1 icd fw	(164)	ACAAATCATTAAACAAAAATGCTCTAAAGCATCCGTATCGCAGGACGCAAACGCATATGCAACGTGGTGGTAGA		
MII A Nr. III13 1 icd rv	(1)	-----		
MII A Nr. III13 2 icd fw	(1)	-----		
MII A Nr. III13 2 icd rv	(1)	-----		
		601		675
CFT073 icd Region	(601)	CGAGCAAACCCAGTAGCGCTCGAAGGAGAGGTGAATGAAAGTAAAGTAGTTGTTCCGGCACAAGGCAAGAAGATC		
MII A Nr. I43 icd	(239)	CGAGCAAACCCAGTAGCGCTCGAAGGAGAGGTGAATGAAAGTAAAGTAGTTGTTCCGGCACAAGGCAAGAAGATC		
MII A Nr. III13 1 icd fw	(239)	CGAGCAAACCCAGTAGCGCTCGAAGGAGAGGTGAATGAAAGTAAAGTAGTTGTTCCGGCACAAGGCAAGAAGATC		
MII A Nr. III13 1 icd rv	(1)	-----		
MII A Nr. III13 2 icd fw	(1)	-----		
MII A Nr. III13 2 icd rv	(1)	-----		
		676		750
CFT073 icd Region	(676)	ACCCTGCAAAAACGGCAAACCTCAACGTTCTGAAATCCGATTATCCCTTACATTGAAGGTGATGGAATCGGTGTA		
MII A Nr. I43 icd	(314)	ACCCTGCAAAAACGGCAAACCTCAACGTTCTGAAATCCGATTATCCCTTACATTGAAGGTGATGGAATCGGTGTA		
MII A Nr. III13 1 icd fw	(314)	ACCCTGCAAAAACGGCAAACCTCAACGTTCTGAAATCCGATTATCCCTTACATTGAAGGTGATGGAATCGGTGTA		
MII A Nr. III13 1 icd rv	(1)	-----		
MII A Nr. III13 2 icd fw	(1)	-----		
MII A Nr. III13 2 icd rv	(1)	-----		
		751		825
CFT073 icd Region	(751)	GATGTAACCCAGCCATGCTGAAAGTGGTFCGACGCTGCAGTCGAGAAAGCCTATAAAGGCGAGCGTAAATCTCC		
MII A Nr. I43 icd	(389)	GATGTAACCCAGCCATGCTGAAAGTGGTFCGACGCTGCAGTCGAGAAAGCCTATAAAGGCGAGCGTAAATCTCC		
MII A Nr. III13 1 icd fw	(389)	GATGTAACCCAGCCATGCTGAAAGTGGTFCGACGCTGCAGTCGAGAAAGCCTATAAAGGCGAGCGTAAATCTCC		
MII A Nr. III13 1 icd rv	(1)	-----		
MII A Nr. III13 2 icd fw	(1)	-----		
MII A Nr. III13 2 icd rv	(1)	-----		
		826		900
CFT073 icd Region	(826)	TGGATGGAATTTACACCGGTGAAAAATCCACACAGGTTTATGGTCAGGACGCTGGTTCCTGCTGAAACCCCT		
MII A Nr. I43 icd	(464)	TGGATGGAATTTACACCGGTGAAAAATCCACACAGGTTTATGGTCAGGACGCTGGTTCCTGCTGAAACCCCT		
MII A Nr. III13 1 icd fw	(464)	TGGATGGAATTTACACCGGTGAAAAATCCACACAGGTTTATGGTCAGGACGCTGGTTCCTGCTGAAACCCCT		
MII A Nr. III13 1 icd rv	(1)	-----		
MII A Nr. III13 2 icd fw	(1)	-----		
MII A Nr. III13 2 icd rv	(1)	-----		
		901		975
CFT073 icd Region	(901)	GATCTGATTCGTGAATATCGCGTTGCCATTAAGGCCCGCTGACCACTCCGGTTGGTGGCGGTATTTCGCTCTCTG		
MII A Nr. I43 icd	(539)	GATCTGATTCGTGAATATCGCGTTGCCATTAAGGCCCGCTGACCACTCCGGTTGGTGGCGGTATTTCGCTCTCTG		
MII A Nr. III13 1 icd fw	(539)	GATCTGATTCGTGAATATCGCGTTGCCATTAAGGCCCGCTGACCACTCCGGTTGGTGGCGGTATTTCGCTCTCTG		
MII A Nr. III13 1 icd rv	(1)	-----GGCGGTATTTCGCTCTCTG		
MII A Nr. III13 2 icd fw	(1)	-----		
MII A Nr. III13 2 icd rv	(1)	-----		
		976		1050
CFT073 icd Region	(976)	AACGTTGCCCTGCGCCAGGAAGTGGATCTCTACATCTGCCTGCGTCCGGTACGTTACTATCAGGGCACTCCAAGC		
MII A Nr. I43 icd	(614)	AATGTTGCCCTGCGCCAGGAAGTGGATCTCTACATCTGCCTGCGTCCGGTACGTTACTATCAGGGCACTCCAAGC		
MII A Nr. III13 1 icd fw	(614)	AATGTTGCCCTGCGCCAGGAAGTGGATCTCTACATCTGCCTGCGTCCGGTACGTTACTATCAGGGCACTCCAAGC		
MII A Nr. III13 1 icd rv	(19)	AATGTTGCCCTGCGCCAGGAAGTGGATCTCTACATCTGCCTGCGTCCGGTACGTTACTATCAGGGCACTCCAAGC		
MII A Nr. III13 2 icd fw	(1)	-----		
MII A Nr. III13 2 icd rv	(1)	-----		
		1051		1125
CFT073 icd Region	(1051)	CCGGTTAAACACCCTGAACTGACCGATATGGTTATCTTCCGTGAAAACCTCGGAAGACATTTATGCGGGTATCGAA		
MII A Nr. I43 icd	(689)	CCGGTTAAACACCCTGAACTGACCGATATGGTTATCTTCCGTGAAAACCTCGGAAGACATTTATGCGGGTATCGAA		
MII A Nr. III13 1 icd fw	(689)	CCGGTTAAACACCCTGAACTGACCGATATGGTTATCTTCCGTGAAAACCTCGGAAGACATTTATGCGGGTATCGAA		
MII A Nr. III13 1 icd rv	(94)	CCGGTTAAACACCCTGAACTGACCGATATGGTTATCTTCCGTGAAAACCTCGGAAGACATTTATGCGGGTATCGAA		
MII A Nr. III13 2 icd fw	(1)	-----		
MII A Nr. III13 2 icd rv	(1)	-----		
		1126		1200
CFT073 icd Region	(1126)	TGAAAGCAGACTCTGCCGACGCTGAGAAAGTAAATTCCTGCGTGAAGAGATGGGCGTGAAGAAAATTCGC		
MII A Nr. I43 icd	(764)	TGAAAGCAGACTCTGCCGACGCTGAGAAAGTAAATTCCTGCGTGAAGAGATGGGCGTGAAGAAAATTCGC		
MII A Nr. III13 1 icd fw	(745)	TGAAAGCAGACTCTGCCGACGCTGAGAAAGTAAATTCCTGCGTGAAGAGATGGGCGTGAAGAAAATTCGC		
MII A Nr. III13 1 icd rv	(169)	TGAAAGCAGACTCTGCCGACGCTGAGAAAGTAAATTCCTGCGTGAAGAGATGGGCGTGAAGAAAATTCGC		
MII A Nr. III13 2 icd fw	(1)	-----AAATTCCTGCGTGAAGAGATGGGCGTGAAGAAAATTCGC		
MII A Nr. III13 2 icd rv	(1)	-----		
		1201		1275
CFT073 icd Region	(1201)	TTCCCGAACATTGCGGTATCGGTATTAAGCCGTGTTCCGGAAGAAGGCACCAACGCTTGGTTCGTGCAGCGATC		
MII A Nr. I43 icd	(839)	TTCCCGAACATTGCGGTATCGGTATTAAGCCGTGTTCCGGAAGAAGGCACCAACGCTTGGTTCGTGCAGCGATC		
MII A Nr. III13 1 icd fw	(745)	TTCCCGAACATTGCGGTATCGGTATTAAGCCGTGTTCCGGAAGAAGGCACCAACGCTTGGTTCGTGCAGCGATC		
MII A Nr. III13 1 icd rv	(244)	TTCCCGAACATTGCGGTATCGGTATTAAGCCGTGTTCCGGAAGAAGGCACCAACGCTTGGTTCGTGCAGCGATC		
MII A Nr. III13 2 icd fw	(40)	TTCCCGAACATTGCGGTATCGGTATTAAGCCGTGTTCCGGAAGAAGGCACCAACGCTTGGTTCGTGCAGCGATC		
MII A Nr. III13 2 icd rv	(1)	-----TGGTTCGTGCAGCGATC		
		1276		1350
CFT073 icd Region	(1276)	GAATACGCAATTGCTAACGATCGTACTCTGTGACCCCTGGTGCAAAAGGCAACATCATGAAGTTACCCGAAGGC		
MII A Nr. I43 icd	(914)	GAATACGCAATTGCTAACGATCGTACTCTGTGACCCCTGGTGCAAAAGGCAACATCATGAAGTTACCCGAAGGC		

MII A Nr. III13 1 icd fw	(745)	-----
MII A Nr. III13 1 icd rv	(259)	-----
MII A Nr. III13 2 icd fw	(115)	GAATACGCAATTCGCTAACGATCGTGACTCTGTGACCCTGGTTCACAAAGGCCAACATCATGAAGTTCACCGAAGGC
MII A Nr. III13 2 icd rv	(18)	GAATACGCAATTCGCTAACGATCGTGACTCTGTGACCCTGGTTCACAAAGGCCAACATCATGAAGTTCACCGAAGGC
CFT073 icd Region	(1351)	1351
MII A Nr. I43 icd	(989)	CGCTTTAAAGACTGGGGCTACCACCTGGCGCGTGAAGAATTTGGCGGTGAACATGATCGACGGCGGCCCGTGGCTG
MII A Nr. III13 1 icd fw	(745)	-----
MII A Nr. III13 1 icd rv	(259)	-----
MII A Nr. III13 2 icd fw	(190)	CGCTTTAAAGACTGGGGCTACCAGCTGGCGCGTGAAGAATTTGGCGGTGAACATGATCGACGGCGGCCCGTGGCTG
MII A Nr. III13 2 icd rv	(93)	CGCTTTAAAGACTGGGGCTACCAGCTGGCGCGTGAAGAATTTGGCGGTGAACATGATCGACGGCGGCCCGTGGCTG
CFT073 icd Region	(1426)	1426
MII A Nr. I43 icd	(1064)	AAAGTTAAAAACCCGAATACCGGCAAGAGATCGTCATTAAAGACGTGATTGCTGATGCATTCTCTGCAACAGATC
MII A Nr. III13 1 icd fw	(745)	AAAGTTAAAAACCCGAATACCGGCA-----CGTCATTAAAGACGTGATTGCTGATGCATTCTCTGCAACAGATC
MII A Nr. III13 1 icd rv	(259)	-----
MII A Nr. III13 2 icd fw	(265)	AAAGTTAAAAACCCGAATACCGGCAAGAGATCGTCATTAAAGACGTGATTGCTGATGCATTCTCTGCAACAGATC
MII A Nr. III13 2 icd rv	(168)	AAAGTTAAAAACCCGAATACCGGCAAGAGATCGTCATTAAAGACGTGATTGCTGATGCATTCTCTGCAACAGATC
CFT073 icd Region	(1501)	1501
MII A Nr. I43 icd	(1132)	CTGCTGCGTCCGGCTGAATATGATGTTATCGCCTGTATGAACCTGAACGGTGACTACATTTCTGACGCCCTGGCA
MII A Nr. III13 1 icd fw	(745)	CTGCTGCGTCCGGCTGAATATGATGTTATCGCCTGTATGAACCTGAACGGTGACTACATTTCTGACGCCCTGGCA
MII A Nr. III13 1 icd rv	(259)	-----
MII A Nr. III13 2 icd fw	(340)	CTGCTGCGTCCGGCTGAATATGATGTTATCGCCTGTATGAACCTGAACGGTGACTACATTTCTGACGCCCTGGCA
MII A Nr. III13 2 icd rv	(243)	CTGCTGCGTCCGGCTGAATATGATGTTATCGCCTGTATGAACCTGAACGGTGACTACATTTCTGACGCCCTGGCA
CFT073 icd Region	(1576)	1576
MII A Nr. I43 icd	(1207)	GCGCAGGTTGGTGGTATCGGTATCGCCCTGGCGCAAACATCGGTGACGAATGCGCCCTGTTTGAAGCCACCCAC
MII A Nr. III13 1 icd fw	(745)	GCGCAGGTTGGTGGTATCGGTATCGCCCTGGCGCAAACATCGGTGACGAATGCGCCCTGTTTGAAGCCACCCAC
MII A Nr. III13 1 icd rv	(259)	-----
MII A Nr. III13 2 icd fw	(415)	GCGCAGGTTGGTGGTATCGGTATCGCCCTGGCGCAAACATCGGTGACGAATGCGCCCTGTTTGAAGCCACCCAC
MII A Nr. III13 2 icd rv	(318)	GCGCAGGTTGGTGGTATCGGTATCGCCCTGGCGCAAACATCGGTGACGAATGCGCCCTGTTTGAAGCCACCCAC
CFT073 icd Region	(1651)	1651
MII A Nr. I43 icd	(1282)	GGTACTGCGCCGAAATATGCCGGACAGGCAAAAGTAAACCCAGGCTCTATTATTCTCTCCGCTGAGATGATGCTG
MII A Nr. III13 1 icd fw	(745)	GGTACTGCGCCGAAATATGCCGGACAGGCAAAAGTAAACCCAGGCTCTATTATTCTCTCCGCTGAGATGATGCTG
MII A Nr. III13 1 icd rv	(259)	-----
MII A Nr. III13 2 icd fw	(471)	GGTACTGCGCCGAAATATGCCGGACAGGCAAAAGTAAACCCAGGCTCTATTATTCTCTCCGCTGAGATGATGCTG
MII A Nr. III13 2 icd rv	(393)	GGTACTGCGCCGAAATATGCCGGACAGGCAAAAGTAAACCCAGGCTCTATTATTCTCTCCGCTGAGATGATGCTG
CFT073 icd Region	(1726)	1726
MII A Nr. I43 icd	(1357)	CGCCATATGGGCTGGACTGAAGCGCAGACCTGATTGTTAAAGGTATGGAAGGCGCAATCAATCGCAAGACCGTA
MII A Nr. III13 1 icd fw	(745)	CGCCATATGGGCTGGACTGAAGCGCCTGACCTGATTGTTAAAGGTATGGAAGGCGCAATCAATCGCCAGACCGTA
MII A Nr. III13 1 icd rv	(259)	-----
MII A Nr. III13 2 icd fw	(471)	CGCCATATGGGCTGGACTGAAGCGCCTGACCTGATTGTTAAAGGTATGGAAGGCGCAATCAATCGCCAGACCGTA
MII A Nr. III13 2 icd rv	(468)	CGCCATATGGGCTGGACTGAAGCGCCTGACCTGATTGTTAAAGGTATGGAAGGCGCAATCAATCGCCAGACCGTA
CFT073 icd Region	(1801)	1801
MII A Nr. I43 icd	(1432)	ACCTATGACTTCGAACGCTCTGATGGAAGGCGCTAACTGCTGAAATGTTTCAGAGTTTGGTGA
MII A Nr. III13 1 icd fw	(745)	ACCTATGACTTCGAACGCTCTGATGGAAGGCGCTAACTGCTGAAATGTTTCAGAGTTTGGTGA
MII A Nr. III13 1 icd rv	(259)	-----
MII A Nr. III13 2 icd fw	(471)	ACCTATGACTTCGAACGCTCTGATGGAAGGCGCTAACTGCTGAAATGTTTCAGAGTTTGGTGA
MII A Nr. III13 2 icd rv	(543)	ACCTATGACTTCGAACGCTCTGATGGAAGGCGCTAACTGCTGAAATGTTTCAGAGTTTGGTGA
CFT073 icd Region	(1876)	1876
MII A Nr. I43 icd	(1507)	AATATGTAATCACTACATGTGTTAAATATTGAACGGGCGTATAACACGCCCGTGTGTTTATGATGATGTAATAAT
MII A Nr. III13 1 icd fw	(745)	AATATGTAATCACTACATGTGTTAAATATTGAACGGGCGTATAACACGCCCGTGTGTTTATGATGATGTAATAAT
MII A Nr. III13 1 icd rv	(259)	-----
MII A Nr. III13 2 icd fw	(471)	AATATGTAATCACTACATGTGTTAAATATTGAACGGGCGTATAACACGCCCGTGTGTTTATGATGATGTAATAAT
MII A Nr. III13 2 icd rv	(618)	AATATGTAATCACTACATGTGTTAAATATTGAACGGGCGTATAACACGCCCGTGTGTTTATGATGATGTAATAAT
CFT073 icd Region	(1951)	1951
MII A Nr. I43 icd	(1582)	CTTCCCAAAAAC-----CCTTCCCAAAAACCTGGCTATTTTCTATGCTGTTTTGATATCTACGATAATC
MII A Nr. III13 1 icd fw	(745)	CTTCCCAAAAACTTTCCCAAAAACCTTCCCAAAAACCTGGCTATTTTCTATGCTG-----
MII A Nr. III13 1 icd rv	(259)	-----
MII A Nr. III13 2 icd fw	(471)	CTTCCCAAAAACTTTCCCAAAAACCTTCCCAAAAACCTGGCTATTTTCTATGCTG-----
MII A Nr. III13 2 icd rv	(693)	CTTCCCAAAAACTTTCCCAAAAACCTTCCCAAAAACCTGGCTATTTTCTATGCTG-----

15.4.7 Ergebnisse MII pHPNE18-01.1 Nr. II 23

Tabelle 15-17 Ergebnisse der Sequenzanalyse für MII pHPNE18-01.1 Nr. II 23

orange: Startcodon *icd* (ATG); grün: Stoppcodon *icd* (TAA);
 violett: mutierte Terminatorsequenz *icd*; gelb: stille Mutation (Asp GAT→GAC)

CFT073 icd Region	(301)	301	GAACTGCGGAAGAACATCGTAGGGTTTATTGAACAGGATCACACGCGTGGGCTGGTTTTTCAG	375
MII A Nr. I43 icd	(1)	(1)	-----GTTTACGCCCTGGT	375
MII B Nr. II23 1 icd fw	(1)	(1)	-----GTTTTCTGCTGGT	375
MII B Nr. II23 1 icd rv	(1)	(1)	-----GTTTTCTGCTGGT	375
MII B Nr. II23 2 icd rv	(1)	(1)	-----	375
		376		450

CFT073 icd Region	(376)	AGAACGTTGCGAGCTGAATCGCTTAACCTGGTGATTTCTAAAAGAAGTTTTTTCATGGTATTTTCAGAGATTAT	
MII A Nr. I43 icd	(14)	AGAACGTTGCGAGCTGAATCGCTTAACCTGGTGATTTCTAAAAGAAGTTTTTTCATGGTATTTTCAGAGATTAT	
MII B Nr. II23 1 icd fw	(15)	AGAACGTTGCGAGCTGAATCGCTTAACCTGGTGATTTCTAAAAGAAGTTTTTTCATGGTATTTTCAGAGATTAT	
MII B Nr. II23 1 icd rv	(1)	-----GCATGGTATTTTCAGAGATTAT	
MII B Nr. II23 2 icd rv	(1)	-----	
		451	525
CFT073 icd Region	(451)	GAATGCGGCATTATAGCCTAATAACGCGCATCTTTCATGACGGCAAACAATAGGGTAGTATTGACAAGCCAATT	
MII A Nr. I43 icd	(89)	GAATGCGGCATTATAGCCTAATAACGCGCATCTTTCATGACGGCAAACAATAGGGTAGTATTGACAAGCCAATT	
MII B Nr. II23 1 icd fw	(90)	GAATGCGGCATTATAGCCTAATAACGCGCATCTTTCATGACGGCAAACAATAGGGTAGTATTGACAAGCCAATT	
MII B Nr. II23 1 icd rv	(23)	GAATGCGGCATTATAGCCTAATAACGCGCATCTTTCATGACGGCAAACAATAGGGTAGTATTGACAAGCCAATT	
MII B Nr. II23 2 icd rv	(1)	-----	
		526	600
CFT073 icd Region	(526)	ACAAATCATTAAACAAAAATGCTCTAAAGCATCCGTATCGCAGGACGCAAACGCATATGCAACGTGGTGGTAGA	
MII A Nr. I43 icd	(164)	ACAAATCATTAAACAAAAATGCTCTAAAGCATCCGTATCGCAGGACGCAAACGCATATGCAACGTGGTGGTAGA	
MII B Nr. II23 1 icd fw	(165)	ACAAATCATTAAACAAAAATGCTCTAAAGCATCCGTATCGCAGGACGCAAACGCATATGCAACGTGGTGGTAGA	
MII B Nr. II23 1 icd rv	(98)	ACAAATCATTAAACAAAAATGCTCTAAAGCATCCGTATCGCAGGACGCAAACGCATATGCAACGTGGTGGTAGA	
MII B Nr. II23 2 icd rv	(1)	-----	
		601	675
CFT073 icd Region	(601)	CGAGCAAACCAAGTAGCGCTCGAAGGAGAGGTGAATCGAAAGTAAAGTAGTTGTTCCGGCACAAGGCAAGAAGATC	
MII A Nr. I43 icd	(239)	CGAGCAAACCAAGTAGCGCTCGAAGGAGAGGTGAATCGAAAGTAAAGTAGTTGTTCCGGCACAAGGCAAGAAGATC	
MII B Nr. II23 1 icd fw	(240)	CGAGCAAACCAAGTAGCGCTCGAAGGAGAGGTGAATCGAAAGTAAAGTAGTTGTTCCGGCACAAGGCAAGAAGATC	
MII B Nr. II23 1 icd rv	(173)	CGAGCAAACCAAGTAGCGCTCGAAGGAGAGGTGAATCGAAAGTAAAGTAGTTGTTCCGGCACAAGGCAAGAAGATC	
MII B Nr. II23 2 icd rv	(1)	-----	
		676	750
CFT073 icd Region	(676)	ACCTTGCAAACCGCAAACCTCAACGTTCTGAAATCCGATTATCCCTTACATTGAAGGTGATGGAATCGGTGTA	
MII A Nr. I43 icd	(314)	ACCTTGCAAACCGCAAACCTCAACGTTCTGAAATCCGATTATCCCTTACATTGAAGGTGATGGAATCGGTGTA	
MII B Nr. II23 1 icd fw	(315)	ACCTTGCAAACCGCAAACCTCAACGTTCTGAAATCCGATTATCCCTTACATTGAAGGTGATGGAATCGGTGTA	
MII B Nr. II23 1 icd rv	(248)	ACCTTGCAAACCGCAAACCTCAACGTTCTGAAATCCGATTATCCCTTACATTGAAGGTGATGGAATCGGTGTA	
MII B Nr. II23 2 icd rv	(1)	-----	
		751	825
CFT073 icd Region	(751)	GATGTAACCCAGCCATGCTGAAAGTGGTGCAGCTGCAGTCGAGAAAGCCTATAAAGGCGAGCGTAAAATCTCC	
MII A Nr. I43 icd	(389)	GATGTAACCCAGCCATGCTGAAAGTGGTGCAGCTGCAGTCGAGAAAGCCTATAAAGGCGAGCGTAAAATCTCC	
MII B Nr. II23 1 icd fw	(390)	GATGTAACCCAGCCATGCTGAAAGTGGTGCAGCTGCAGTCGAGAAAGCCTATAAAGGCGAGCGTAAAATCTCC	
MII B Nr. II23 1 icd rv	(323)	GATGTAACCCAGCCATGCTGAAAGTGGTGCAGCTGCAGTCGAGAAAGCCTATAAAGGCGAGCGTAAAATCTCC	
MII B Nr. II23 2 icd rv	(1)	-----	
		826	900
CFT073 icd Region	(826)	TGGATGGAATTTACACCGGTGAAAAATCCACACAGGTTTATGGTCAGGACGCTGTTGCTGCTGAAACCCCTT	
MII A Nr. I43 icd	(464)	TGGATGGAATTTACACCGGTGAAAAATCCACACAGGTTTATGGTCAGGACGCTGTTGCTGCTGAAACCCCTT	
MII B Nr. II23 1 icd fw	(465)	TGGATGGAATTTACACCGGTGAAAAATCCACACAGGTTTATGGTCAGGACGCTGTTGCTGCTGAAACCCCTT	
MII B Nr. II23 1 icd rv	(398)	TGGATGGAATTTACACCGGTGAAAAATCCACACAGGTTTATGGTCAGGACGCTGTTGCTGCTGAAACCCCTT	
MII B Nr. II23 2 icd rv	(1)	-----	
		901	975
CFT073 icd Region	(901)	GATCTGATTCGTGAATATCGCGTTGCCATTAAAGGCCCGCTGACCCTCCGGTTGGTGGCGGTATTCGCTCTCTG	
MII A Nr. I43 icd	(539)	GATCTGATTCGTGAATATCGCGTTGCCATTAAAGGCCCGCTGACCCTCCGGTTGGTGGCGGTATTCGCTCTCTG	
MII B Nr. II23 1 icd fw	(540)	GATCTGATTCGTGAATATCGCGTTGCCATTAAAGGCCCGCTGACCCTCCGGTTGGTGGCGGTATTCGCTCTCTG	
MII B Nr. II23 1 icd rv	(473)	GATCTGATTCGTGAATATCGCGTTGCCATTAAAGGCCCGCTGACCCTCCGGTTGGTGGCGGTATTCGCTCTCTG	
MII B Nr. II23 2 icd rv	(1)	-----	
		976	1050
CFT073 icd Region	(976)	AACGTTGCCCCTGCGCCAGGAACCTGATCTCTACATCTGCCTGCGTCCGGTACGTTACTATCAGGGCACTCCAAGC	
MII A Nr. I43 icd	(614)	AATGTTGCCCTGCGCCAGGAACCTGATCTCTACATCTGCCTGCGTCCGGTACGTTACTATCAGGGCACTCCAAGC	
MII B Nr. II23 1 icd fw	(615)	AATGTTGCCCTGCGCCAGGAACCTGATCTCTACATCTGCCTGCGTCCGGTACGTTACTATCAGGGCACTCCAAGC	
MII B Nr. II23 1 icd rv	(548)	AATGTTGCCCTGCGCCAGGAACCTGATCTCTACATCTGCCTGCGTCCGGTACGTTACTATCAGGGCACTCCAAGC	
MII B Nr. II23 2 icd rv	(1)	-----	
		1051	1125
CFT073 icd Region	(1051)	CCGGTTAAACACCCCTGAACCTGACCGATATGGTTATCTTCCGTGAAAACCTCGGAAGACATTTATCGGGTATCGAA	
MII A Nr. I43 icd	(689)	CCGGTTAAACACCCCTGAACCTGACCGATATGGTTATCTTCCGTGAAAACCTCGGAAGACATTTATCGGGTATCGAA	
MII B Nr. II23 1 icd fw	(690)	CCGGTTAAACACCCCTGAACCTGACCGATATGGTTATCTTCCGTGAAAACCTCGGAAGACATTTATCGGGTATCGAA	
MII B Nr. II23 1 icd rv	(623)	CCGGTTAAACACCCCTGAACCTGACCGATATGGTTATCTTCCGTGAAAACCTCGGAAGACATTTATCGGGTATCGAA	
MII B Nr. II23 2 icd rv	(1)	-----	
		1126	1200
CFT073 icd Region	(1126)	TGGAAAGCAGACTCTGCCGACGCTGAGAAAGTGATTAATTCCTGCGTGAAGAGATGGGCGTGAAGAAAATTCGG	
MII A Nr. I43 icd	(764)	TGGAAAGCAGACTCTGCCGACGCTGAGAAAGTGATTAATTCCTGCGTGAAGAGATGGGCGTGAAGAAAATTCGG	
MII B Nr. II23 1 icd fw	(765)	TGGAAAGCAGACTCTGCCGACGCTGAGAAAGTGATTAATTCCTGCGTGAAGAGATGGGCGTGAAGAAAATTCGG	
MII B Nr. II23 1 icd rv	(698)	TGGAAAGCAGACTCTGCCGACGCTGAGAAAGTGATTAATTCCTGCGTGAAGAGATGGGCGTGAAGAAAATTCGG	
MII B Nr. II23 2 icd rv	(1)	-----GAAGAAAATTCGG	
		1201	1275
CFT073 icd Region	(1201)	TTCCCGGAACATTGCGGTATCGGTATTAAGCCGTGTTCCGGAAGAAGGCACCAAACGCTCGGTTCTGTCGACCGATC	
MII A Nr. I43 icd	(839)	TTCCCGGAACATTGCGGTATCGGTATTAAGCCGTGTTCCGGAAGAAGGCACCAAACGCTCGGTTCTGTCGACCGATC	
MII B Nr. II23 1 icd fw	(766)	TTCCCGGAACATTGCGGTATCGGTATTAAGCCGTGTTCCGGAAGAAGGCACCAAACGCTCGGTTCTGTCGACCGATC	
MII B Nr. II23 1 icd rv	(769)	TTCCCGGAACATTGCGGTATCGGTATTAAGCCGTGTTCCGGAAGAAGGCACCAAACGCTCGGTTCTGTCGACCGATC	
MII B Nr. II23 2 icd rv	(14)	TTCCCGGAACATTGCGGTATCGGTATTAAGCCGTGTTCCGGAAGAAGGCACCAAACGCTCGGTTCTGTCGACCGATC	
		1276	1350
CFT073 icd Region	(1276)	GAATACGCAATTGCTAACGATCGTGACTCTGTGACCCCTGGTGCACAAAGGCAACATCATGAAGTTCACCGAAGGC	
MII A Nr. I43 icd	(914)	GAATACGCAATTGCTAACGATCGTGACTCTGTGACCCCTGGTGCACAAAGGCAACATCATGAAGTTCACCGAAGGC	
MII B Nr. II23 1 icd fw	(766)	-----	
MII B Nr. II23 1 icd rv	(769)	-----	
MII B Nr. II23 2 icd rv	(89)	GAATACGCAATTGCTAACGATCGTGACTCTGTGACCCCTGGTGCACAAAGGCAACATCATGAAGTTCACCGAAGGC	
		1351	1425
CFT073 icd Region	(1351)	CGGTTTAAAGACTGGGGCTACCAACTGGCCGCTGAAGAATTTGGCGGTGAAGTATCGACGGCGCCGCTGGCTG	
MII A Nr. I43 icd	(989)	CGGTTTAAAGACTGGGGCTACCAACTGGCCGCTGAAGAATTTGGCGGTGAAGTATCGACGGCGCCGCTGGCTG	
MII B Nr. II23 1 icd fw	(766)	-----	
MII B Nr. II23 1 icd rv	(769)	-----	
MII B Nr. II23 2 icd rv	(164)	CGGTTTAAAGACTGGGGCTACCAACTGGCCGCTGAAGAATTTGGCGGTGAAGTATCGACGGCGCCGCTGGCTG	
		1426	1500
CFT073 icd Region	(1426)	AAAGTTAAAACCCGAATACCGGCAAGAGATCGTCATTAAAGACGTGATGCTGATGCATTCCTGCAACAGATC	
MII A Nr. I43 icd	(1064)	AAAGTTAAAACCCGAATACCGGCAAGAGATCGTCATTAAAGACGTGATGCTGATGCATTCCTGCAACAGATC	
MII B Nr. II23 1 icd fw	(766)	-----CGTCATTAAAGACGTGATGCTGATGCATTCCTGCAACAGATC	

```

MII B Nr. II23 1 icd rv (769) -----
MII B Nr. II23 2 icd rv (239) AAAGTTAAAACCCGAATACCGGCAAGAGATCGTCATTAAAGACGTGATFGCTGATGCATTCTGCAACAGATC
1501 1575
CFT073 icd Region (1501) CTGCTGCGTCCGGCTGAATATGATGTTATCGCCTGTATGAACCTGAACGGTGACTACATTTCTGACGCCCTGGCA
MII A Nr. I43 icd (1132) CTGCTGCGTCCGGCTGAATATGATGTTATCGCCTGTATGAACCTGAACGGTGACTACATTTCTGACGCCCTGGCA
MII B Nr. II23 1 icd fw (766) -----
MII B Nr. II23 1 icd rv (769) -----
MII B Nr. II23 2 icd rv (314) CTGCTGCGTCCGGCTGAATATGATGTTATCGCCTGTATGAACCTGAACGGTGACTACATTTCTGACGCCCTGGCA
1576 1650
CFT073 icd Region (1576) GCGCAGGTTGGTGGTATCGGTATCGCCCTGGCGCAAACATCGGTGACGAATGCGCCCTGTTTGAAGCCACCCAC
MII A Nr. I43 icd (1207) GCGCAGGTTGGTGGTATCGGTATCGCCCTGGCGCAAACATCGGTGACGAATGCGCCCTGTTTGAAGCCACCCAC
MII B Nr. II23 1 icd fw (766) -----
MII B Nr. II23 1 icd rv (769) -----
MII B Nr. II23 2 icd rv (389) GCGCAGGTTGGTGGTATCGGTATCGCCCTGGCGCAAACATCGGTGACGAATGCGCCCTGTTTGAAGCCACCCAC
1651 1725
CFT073 icd Region (1651) GGTACTGCGCCGAAATATGCCGGACAGGACAAAGTAAACCCAGGCTCTATTATTCTCTCCGCTGAGATGATGCTG
MII A Nr. I43 icd (1282) GGTACTGCGCCGAAATATGCCGGACAGGACAAAGTAAACCCAGGCTCTATTATTCTCTCCGCTGAGATGATGCTG
MII B Nr. II23 1 icd fw (766) -----
MII B Nr. II23 1 icd rv (769) -----
MII B Nr. II23 2 icd rv (464) GGTACTGCGCCGAAATATGCCGGACAGGACAAAGTAAACCCAGGCTCTATTATTCTCTCCGCTGAGATGATGCTG
1726 1800
CFT073 icd Region (1726) CGCCATATGGGCTGGACTGAAGCGGCTGACCTGATTGTTAAAGGTATGGAAGGCGCAATCAATGCGAAGACCGTA
MII A Nr. I43 icd (1357) CGCCATATGGGCTGGACTGAAGCGGCTGACCTGATTGTTAAAGGTATGGAAGGCGCAATCAATGCGAAGACCGTA
MII B Nr. II23 1 icd fw (766) -----
MII B Nr. II23 1 icd rv (769) -----
MII B Nr. II23 2 icd rv (539) CGCCATATGGGCTGGACTGAAGCGGCTGACCTGATTGTTAAAGGTATGGAAGGCGCAATCAATGCGAAGACCGTA
1801 1875
CFT073 icd Region (1801) ACCTATGACTTCGAACGCTCTGATGGAAGGCGCTAAAGCTGCTGAAATGTTTCAAGTTTGGTGATGCGATCATCAAG
MII A Nr. I43 icd (1432) ACCTATGACTTCGAACGCTCTGATGGAAGGCGCTAAAGCTGCTGAAATGTTTCAAGTTTGGTGATGCGATCATCAAG
MII B Nr. II23 1 icd fw (766) -----
MII B Nr. II23 1 icd rv (769) -----
MII B Nr. II23 2 icd rv (614) ACCTATGACTTCGAACGCTCTGATGGAAGGCGCTAAAGCTGCTGAAATGTTTCAAGTTTGGTGATGCGATCATCAAG
1876 1950
CFT073 icd Region (1876) AATATGTAACTACTACATGTGTTAAATATTGTAACGGGCGTATAACACGCCCGTTGTTTTATGATGATGTAATAAT
MII A Nr. I43 icd (1507) AATATGTAACTACTACATGTGTTAAATATTGTAACGGGCGTATAACACGCCCGTTGTTTTATGATGATGTAATAAT
MII B Nr. II23 1 icd fw (766) -----
MII B Nr. II23 1 icd rv (769) -----
MII B Nr. II23 2 icd rv (689) AATATGTAACTACTACATGTGTTAAATATTGTAACGGGCGTATAACACGCCCGTTGTTTTATGATGATGTAATAAT
1951 2025
CFT073 icd Region (1951) CTTCCCAAAAC-----CCTTCCCAAAACTGGCTATTTTCTATGCTGTTTGTATCTACGATAATC
MII A Nr. I43 icd (1582) CTTCCCAAAACTTTCCCAAAACCTTCCCAAAACTGGCTATTTTCTATGCTG-----
MII B Nr. II23 1 icd fw (766) -----
MII B Nr. II23 1 icd rv (769) -----
MII B Nr. II23 2 icd rv (764) CTTCCCAAAACTTTCCCAAAACCTTCCCAAAACTGGCTATTTTCTATGCTI-----

```

15.5 Ergebnisse der Luciferase-Messung / Rohdaten

In den folgenden Abschnitten sind die Rohdaten aller durchgeführten Luciferase-Aktivitäts-Messungen in tabellarischer Form dargestellt. Diese sind in chronologischer Reihenfolge aufgeführt. Die nicht zur Berechnung der Aktivitäts-Werte verwendeten Messwerte sind kursiv geschrieben. Darüber hinaus wurden sie mit (n. v.) gekennzeichnet.

15.5.1 Messung vom 04.06.2014

Bei der Messung vom 04.06.14 wurden die Stämme MII und MII Δicd 7 bp mit dem Plasmid pPHB335, sowie der Stamm MII zur Kontrolle ohne Plasmid vermessen.

Tabelle 15-18 Absolute RLU-Werte des Stammes MII pPHB335

Zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Zugabe der LAR. Mit angegeben ist die OD, bei der die Proben entnommen und zur Luciferase-Messung aufgearbeitet wurden.

Stamm	0 min	10 min	20 min	OD _{550 nm}
MII pPHB335 Nr. 1	6418046	3246724	1420374	
MII pPHB335 Nr. 2	7224907	3706991	1626459	0,5937
MII pPHB335 Nr. 3	7559021	3754181	1633449	
Mittelwert	7067325	3569298	1560094	

Tabelle 15-19 Absolute RLU-Werte des vermeintlichen Stammes MII Δicd 7 bp pPHB335

Zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Zugabe der LAR. Mit angegeben ist die OD, bei der die Proben entnommen und zur Luciferase-Messung aufgearbeitet wurden.

Stamm	0 min	10 min	20 min	OD _{550 nm}
MII Δicd 7 bp pPHB335 Nr. 1	113	43	25	
MII Δicd 7 bp pPHB335 Nr. 2	47	20	13	0,5892
MII Δicd 7 bp pPHB335 Nr. 3	47	16	17	
Mittelwert	69	26	18	

Tabelle 15-20 Absolute RLU-Werte des vermeintlichen Stammes MII Δicd 7 bp pPHB335

Zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Zugabe der LAR. Mit angegeben ist die OD, bei der die Proben entnommen und zur Luciferase-Messung aufgearbeitet wurden.

Stamm	0 min	10 min	20 min	OD _{550 nm}
MII Δicd 7 bp pPHB335 Nr. 1	113	43	25	
MII Δicd 7 bp pPHB335 Nr. 2	47	20	13	0,5892
MII Δicd 7 bp pPHB335 Nr. 3	47	16	17	
Mittelwert	69	26	18	

Tabelle 15-21 Absolute RLU-Werte des vermeintlichen Stammes MII

Zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Zugabe der LAR. Mit angegeben ist die OD, bei der die Proben entnommen und zur Luciferase-Messung aufgearbeitet wurden.

Stamm	0 min	10 min	20 min	OD_{550 nm}
MII Nr. 1	88	33	17	0,5741
MII Nr. 2	85	33	16	
MII Nr. 3	73	36	16	
Mittelwert	82	34	16	

Tabelle 15-22 Absolute RLU-Werte der Leerproben

Aufgeführt sind die Messwerte der leeren Kavitäten und der der LAR ohne Bakterienstamm.

	Nr. 1	Nr. 2	Nr. 3
Leere Kavität	59	15	13
LAR allein	54	16	8

15.5.2 Messung vom 10.07.2014

In der Messung vom 10.07.14 wurden die Stämme WT, MI, MII und MIIΔ untersucht. Diese trugen alle das Plasmid pPHP177-01.1. Übersichtshalber sind in den Tabellen nur die Ausgangsstammbezeichnungen aufgeführt.

Tabelle 15-23 Absolut bestimmte KBE- und Protein-Gesamtgehalt-Werte der untersuchten Bakterienstämme

Die Werte sind beide jeweils auf 1 ml und auf 90 µl bezogen. Darüber hinaus ist die OD, bei der die Proben entnommen und zur Luciferase-Messung aufgearbeitet wurden mit angegeben.

Stamm	OD _{550 nm}	KBE/ml	KBE/90 µl	Proteingehalt [µg/ml]	Proteingehalt [µg/90 µl]
WT	0,5892	1,99 · 10 ⁸	1,79 · 10 ⁷	92,47	8,322
MI	0,5714	2,75 · 10 ⁸	2,47 · 10 ⁷	73,03	6,572
II	0,5615	1,53 · 10 ⁸	1,38 · 10 ⁷	75,39	6,785
IIΔ <i>icd</i> 7 bp	0,4623	1,48 · 10 ⁸	1,33 · 10 ⁷	76,01	6,841

Tabelle 15-24 Absolute RLU-Werte der untersuchten Stämme

Mit angegeben ist der berechnete Mittelwert aus den jeweiligen Messungen. Es handelt sich um die Werte der 1. Messung

Stamm	RLU 1	RLU 2	RLU 3	RLU 4	Mittelwert
WT	521271	530391	4894 (n. v.)	747462	599708
MI	719759	1050033	881045	1153573	951103
II	1608727	1677243	2119480	2165838	1892822
IIΔ <i>icd</i> 7 bp	1502664	1163017	1633851	1477779	1444328
JM109	474667	422033	572198	536593	501373
Blank	190				

Tabelle 15-25 Absolute RLU-Werte der untersuchten Stämme

Mit angegeben ist der berechnete Mittelwert aus den jeweiligen Messungen, sowie die Messwerte der Proben ohne die Zugabe von LAR und die Werte der Leerproben. Es handelt sich um die Werte der 2. Messung.

Stamm	RLU 1	RLU 2	RLU 3	ohne LAR	Mittelwert
WT	2725 (n. v.)	614825	610154	21	612490
MI	814462	867182	864999	33	848881
II	1505037	1555717	1549312	31	1536689
IIΔ <i>icd</i> 7 bp	1181958	1277544	1187528	31	1215677
JM109	496317	469811	429447	16	465192
Blank	152				
LAR	136				

15.5.3 Messung vom 15.07.2014

In der Messung vom 15.07.14 wurden mit Ausnahme von MII Δicd 7 bp pHPNE19-02.1, alle aufgeführten Ausgangsbakterienstämme untersucht. Diese Stämme waren zuvor mit dem Plasmid pHPAR177-01.1 transformiert worden. Die selektierten Mutanten MII pHPNE19-02.1 Nr. II 21, MII pHPNE19-02.1 Nr. III13; MII pHPNE18-01.1 Nr. II 18 und MII pHPNE18-01.1 Nr. III 27 enthielten nach *plasmid curing* (Abschnitt 2.2.1.11) nicht mehr das jeweilige Qnr-Plasmid. Nach Transformation mit pHPAR177-01.1 wurde für diese selektierten Mutanten die *PacrAB* Expression im Plasmidfreien Modell betrachtet (Tabelle 15-26).

Tabelle 15-26 Absolut bestimmt KBE- und Protein-Gesamtgehalt-Werte der untersuchten Bakterienstämme

Alle Stämme mit pHPAR177-01.1 transformiert. Die Werte sind jeweils auf 1 ml und auf 90 μ l bezogen. Die OD, bei der die Proben entnommen und zur Luciferase-Messung aufgearbeitet wurden, sind mit angegeben. Selektierte Mutanten nach *plasmid curing*: AII21: MII pHPNE19-02.1 Nr. II 21; AIII13: MII pHPNE19-02.1 Nr. III 13; BII18: MII pHPNE18-01.1 Nr. II 18; BIII27: MII pHPNE18-01.1 Nr. III 27.

Stamm	OD _{550 nm}	KBE/ml	KBE/90 μ l	Proteingehalt (μ g/ml)	Proteingehalt (μ g/90 μ l)
WT	0,5318	$1,01 \cdot 10^8$	$9,09 \cdot 10^6$	84,4	7,59
MI	0,5201	$1,49 \cdot 10^8$	$1,34 \cdot 10^7$	81,8	7,36
MII	0,5163	$1,47 \cdot 10^8$	$1,32 \cdot 10^7$	12,0	1,08
MII Δicd 7 bp	0,5314	$1,15 \cdot 10^8$	$1,04 \cdot 10^7$	87,8	7,90
JM109	0,5184	$4,60 \cdot 10^7$	$4,14 \cdot 10^6$	70,0	6,30
MII Δicd 7 bp pHPNE19-02.1	Keine Messung möglich, da nicht in ÜTK angewachsen				
AII21	0,5163	$1,45 \cdot 10^8$	$1,31 \cdot 10^7$	85,6	7,71
AIII13	0,4983	$1,31 \cdot 10^8$	$1,18 \cdot 10^7$	77,8	7,00
BII18	0,4863	$7,90 \cdot 10^7$	$7,11 \cdot 10^6$	76,0	6,84
BIII27	0,5097	$1,03 \cdot 10^8$	$9,27 \cdot 10^6$	81,2	7,31

Tabelle 15-27 Absolute RLU-Werte der 1. Messung der untersuchten Stämme

Mit angegeben ist der berechnete Mittelwert aus den jeweiligen Messungen, sowie die Messwerte der Proben ohne die Zugabe von LAR. Alle Stämme mit pHPAR177-01.1 transformiert. Die Werte sind jeweils auf 1 ml und auf 90 µl bezogen. Die OD, bei der die Proben entnommen und zur Luciferase-Messung aufgearbeitet wurden, sind mit angegeben. Selektierte Mutanten nach *plasmid curing*: AII21: MII pHPNE19-02.1 Nr. II 21; AIII13: MII pHPNE19-02.1 Nr. III 13; BII18: MII pHPNE18-01.1 Nr. II 18; BIII27: MII pHPNE18-01.1 Nr. III 27. n. v.: nicht verwertbar.

Stamm	RLU 1	RLU 2	RLU 3	ohne LAR	Mittelwert
WT	466321	239415 (n. v.)	474521	292	470421
MI	943790	940927	875514	390	920077
MII	2606986	2065771	2575627	603	2416128
MII Δicd 7 bp	2444815	2518167	2253294	553	2405425
JM109	437297	503169	526768	246	489078
MII Δicd 7 bp pHPNE19-02.1	Keine Messung möglich, da nicht in ÜTK angewachsen				
AII21	2621210	3920750 (n. v.)	2714161	1005	2667686
AIII13	3373854	3631301 (n. v.)	2613251	960	2993553
BII18	2516550	2376928	2688034	966	2527171
BIII27	2228593	2841734	2385558	755	2485295

Tabelle 15-28 Absolute RLU-Werte der 2. Messung der untersuchten Stämme

Mit angegeben ist der berechnete Mittelwert aus den jeweiligen Messungen, sowie die Messwerte der Proben ohne die Zugabe von LAR. Alle Stämme mit pHPAR177-01.1 transformiert. Die Werte sind jeweils auf 1 ml und auf 90 µl bezogen. Die OD, bei der die Proben entnommen und zur Luciferase-Messung aufgearbeitet wurden, sind mit angegeben. Selektierte Mutanten nach *plasmid curing*: AII21: MII pHPNE19-02.1 Nr. II 21; AIII13: MII pHPNE19-02.1 Nr. III 13; BII18: MII pHPNE18-01.1 Nr. II 18; BIII27: MII pHPNE18-01.1 Nr. III 27. n. v.: nicht verwertbar.

Stamm	RLU 1	RLU 2	RLU 3	ohne LAR	Mittelwert
WT	345148	260469	507065 (n.v.)	303	370894
MI	810841	810367	798368	494	806525
MII	2650984	2225373	2421042	764	2432466
MII Δicd 7 bp	2169921	2613338	2228512	790	2337257
JM109	490017	497920	528170	371	505369
MII Δicd 7 bp pHPNE19-02.1	Keine Messung möglich, da nicht in ÜTK angewachsen				
AII21	2614699	2670678	2024098	799	2436492
AIII13	1658512	2489161	2074082	714	2073918
BII18	2084214	2394703	2290849	752	2256589
BIII27	2914965	2519501	2810539	675	2748335

15.5.4 Messung vom 17.07.2014

In der Messung vom 17.07.14 wurden die Stämme MII, MII Δicd 7 bp und MII Δicd 7 bp pHPNE19-02.1 unter den Einfluss von Norfloxacin (Nor) untersucht. Die Stämme sind mit dem Plasmid pHPHP177-01.1 transformiert worden.

Tabelle 15-29 Absolut bestimmte Protein-Gesamtgehalt-Werte

Der Gehalt ist auf 1 ml und auf 90 μ l bezogen. Neben dem Ausgangsstamm angegeben ist die verwendete Konzentration an Norfloxacin (Nor), die bei der OD_{550 nm} 1 hinzugegeben wurde. Diese ist ebenfalls in der Tabelle aufgeführt. Bei der OD_{550 nm} 2 wurden die Proben zur Luciferase-Messung entnommen.

Stamm	Nor (μ g/ml)	OD _{550 nm} 1	OD _{550 nm} 2	Proteingehalt (μ g/ml)	Proteingehalt (μ g/90 μ l)
MII	0,5	0,1054	0,539	86,13	7,75
	1,0		0,5498	87,68	7,89
	2,0		0,5487	82,33	7,41
MII Δicd 7 bp	0,5	0,1445	0,4701	70,96	6,39
	2,0		0,4756	69,68	6,27
	4,0		0,5382	68,94	6,20
MII Δicd 7 bp pHPNE19-02.1	0,0	0,0993	0,4797	58,67	5,28
	0,5		0,5252	69,93	6,29
	8,0		0,5	66,19	5,96
	16,0		-	0,4896	77,75

Tabelle 15-30 Absolute RLU-Werte der 1. Messung der untersuchten Stämme

Mit angegeben ist die jeweilige Konzentration an Norfloxacin (Nor), sowie der berechnete Mittelwert aus den jeweiligen Messungen. Zusätzlich aufgeführt sind die Messwerte der Proben ohne die Zugabe von LAR. n. v.: nicht verwertbar.

Stamm	Nor (μ g/ml)	RLU 1	RLU 1	RLU 1	Mittelwert	ohne LAR
MII	0,5	1019473	1122663	1103108	1081748	584
	1,0	2616727	2568479	2602473	2595893	907
	2,0	2391506	6938 (n. v.)	2502287	2446897	705
MII Δicd 7 bp	0,5	2428528	2362390	2021254	2270724	704
	2,0	1423846	1622976	1436364	1494395	503
	4,0	1754492	1945738	1852286	1850839	473
MII Δicd 7 bp pHPNE19-02.1	0,0	1955660	2039113	2287775	2094183	823
	0,5	2713186	2532106	2352940	2532744	793
	8,0	2051472	3783 (n. v.)	2526 (n. v.)	2051472	330
	16,0	1786929 (n. v.)	3466960	3253729	3360345	670

Tabelle 15-31 Absolute RLU-Werte der 2. Messung der untersuchten Stämme

Mit angegeben ist die jeweilige Konzentration an Norfloxacin (Nor), sowie der berechnete Mittelwert aus den jeweiligen Messungen. Zusätzlich aufgeführt sind die Messwerte der Proben ohne die Zugabe von LAR. n. v.: nicht verwertbar.

Stamm	Nor (µg/ml)	RLU 1	RLU 1	RLU 1	Mittelwert	ohne LAR
MII	0,5	264968	628439	2387779	1093729	915
	1,0	2810547	2432258	2545111	2595972	1093
	2,0	2505500	105973 (n. v.)	2894310	2699905	926
MII Δicd 7 bp	0,5	2102358	2125175	2271463	2166332	924
	2,0	2563962	1264753 (n. v.)	2475039	2101251	832
	4,0	1991260	1754881	1886720	1877620	755
MII Δicd 7 bp pHPNE19-02.1	0,0	2635262	2155672	2022686	2271207	680
	0,5	2713525	2704358	2481088	2632990	626
	8,0	2090071	2974 (n. v.)	2395 (n. v.)	2090071	347
	16,0	1539489 (n. v.)	3236009	3003142	3119576	580

Tabelle 15-32 Absolute RLU-Werte der Leerproben

Aufgeführt sind die Messwerte der leeren Kavitäten und der der LAR ohne Bakterienstamm.

	Nr. 1	Nr. 2	Nr. 3	Nr. 4
Leere Kavität	571	668	785	507
LAR allein	679	54	351	119

15.5.5 Messung vom 14.08.2014

In der Messung vom 14.08.14 wurden die Stämme MII, MII Δicd 7 bp und MII Δicd 7 bp pHPNE19-02.1 unter den Einfluss von Norfloxacin untersucht. Zusätzlich wurde die Aktivität des WT als Bezugsstamm vermessen. Die Stämme waren zuvor mit dem Plasmid pHPHP177-01.1 transformiert worden.

Tabelle 15-33 Absolut bestimmte Protein-Gesamtgehalt-Werte

Der Gehalt ist auf 1 ml und auf 90 μ l bezogen. Neben dem Ausgangsstamm angegeben ist die verwendete Konzentration an Norfloxacin (Nor), die bei der OD_{550 nm} 1 hinzugegeben wurde. Diese ist ebenfalls in der Tabelle aufgeführt. Bei der OD_{550 nm} 2 wurden die Proben zur Luciferase-Messung entnommen.

Stamm	Nor (μ g/ml)	OD _{550 nm} 1	OD _{550 nm} 2	Proteingehalt (μ g/ml)	Proteingehalt (μ g/90 μ l)
WT	0,0	-	0,4965	66,06	5,95
MII	0,0	-	0,5724	76,81	6,91
	0,5	0,0975	0,5050	66,23	5,96
	1,0		0,5827	88,90	8,00
	2,0		0,5503	69,90	6,29
	0,0		-	0,5312	77,60
MII Δicd 7 bp	0,5	0,1104	0,5693	88,30	7,95
	2,0		0,5391	74,80	6,73
	4,0		0,4999	63,83	5,74
	0,0		-	0,4818	77,24
MII Δicd 7 bp pHPNE19-02.1	0,5	0,0947	0,4694	89,18	8,03
	8,0		0,4624	62,93	5,66
	16,0		0,4574	73,75	6,64

Tabelle 15-34 Absolute RLU-Werte der 1. Messung der untersuchten Stämme

Mit angegeben ist die jeweilige Konzentration an Norfloxacin (Nor), sowie der berechnete Mittelwert aus den jeweiligen Messungen. Zusätzlich aufgeführt sind die Messwerte der Proben ohne die Zugabe von LAR. n. v.: nicht verwertbar.

Stamm	Nor (µg/ml)	RLU 1	RLU 2	RLU 3	Mittelwert	ohne LAR
WT	0,0	394209 (n. v.)	518474	590677	554576	83
	0,0	1478415	2075432	1650 (n. v.)	1776924	113
MII	0,5	1049412	1210505	3098101(n. v.)	1129959	67
	1,0	1094672(n. v.)	1639294	1535235	1587265	93
	2,0	1326549 (n. v.)	1917156	1953080	1935118	77
	0,0	2042173	2119896	1640353	1934141	110
MII <i>Δicd 7 bp</i>	0,5	1877520	2197673	2020103	2031765	50
	2,0	1931848	1932396	1416115	1760120	72
	4,0	1661768	1761629	1873252	1765550	67
MII <i>Δicd 7 bp</i> pHPNE19-02.1	0,0	2113557	1794524	1991597	1966559	197
	0,5	1541115	1960735	1760753	1754201	72
	8,0	1822171	1914614	1793553	1843446	89
	16,0	1772801	1518140	1408616	1566519	58

Tabelle 15-35 Absolute RLU-Werte der 2. Messung der untersuchten Stämme

Mit angegeben ist die jeweilige Konzentration an Norfloxacin (Nor), sowie der berechnete Mittelwert aus den jeweiligen Messungen. Zusätzlich aufgeführt sind die Messwerte der Proben ohne die Zugabe von LAR. n. v.: nicht verwertbar.

Stamm	Nor (µg/ml)	RLU 1	RLU 2	RLU 3	Mittelwert	ohne LAR
WT	0,0	650089	564575	607250	607305	60
	0,0	1243676	1914819	1950810	1703102	475
MII	0,5	834108 (n. v.)	1481026	1382847	1431937	529
	1,0	1338238 (n. v.)	1747081	1850799	1798940	692
	2,0	1759791	2386100	1869376	2005089	734
MII <i>Δicd 7 bp</i>	0,0	1611723	1917109	1795045	1774626	114
	0,5	1655989	1556243	1728880	1647037	89
	2,0	1177657	1205410	1606704	1329924	71
	4,0	1187236	1449474	1443614	1360108	55
MII <i>Δicd 7 bp</i> pHPNE19-02.1	0,0	2143792	1798705(n.v)	2083613	2113703	197
	0,5	2101982	1885865(n. v.)	2190089	2146036	143
	8,0	2020577	1673996(n. v.)	2147401	2083989	118
	16,0	1648680	1669829	2063503	1794004	66

Tabelle 15-36 Absolute RLU-Werte der Leerproben

Aufgeführt sind die Messwerte der leeren Kavitäten und der der LAR ohne Bakterienstamm.

	Nr. 1	Nr. 2	Nr. 3	Nr. 4	Nr. 5	Nr. 6	Nr. 7	Nr. 8
Leere Kavität	64	536	79	59	83	54	68	33
LAR allein	869	401						