

Evolution der Multiresistenz

bei *Escherichia coli*

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

Kimberley Jane Sherwood

aus

Bonn

Bonn 2004

Angefertigt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn.

1. Referent: Prof. Dr. B. Wiedemann
2. Referent: Prof. Dr. Dr. H. G. Trüper

Tag der Promotion: 21.12.2004

Diese Dissertation ist auf dem Hochschulschriftenserver der ULB Bonn
http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss_online elektronisch publiziert.

For my Family

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1. Der Organismus <i>Escherichia coli</i>	1
1.2. Antibiotika-Resistenz bei <i>E. coli</i>	3
1.2.1. Resistenz gegenüber β -Laktam-Antibiotika	4
1.2.2. Chinolon-Resistenz	6
1.2.3. Aminoglykosid-Resistenz	10
1.2.4. Tetracyclin-Resistenz	12
1.2.5. Antifolat-Resistenz	13
1.2.6. Chloamphenicol-Resistenz	15
1.3. Resistenzverbreitung bei <i>E. coli</i>	16
1.3.1. R-Plasmide	16
1.3.2. Konjugation	17
1.3.3. Mobile genetische Elemente	17
1.4. Zielsetzung	21
2. Material und Methoden	23
2.1. Material	23
2.1.1. Bakterienstämme	23
2.1.1.1. Klinische Isolate	23
2.1.1.2. Laborstämme	24
2.1.1.3. Referenzstämme	24
2.1.1.4. Konjuganten	25
2.1.2. Chemotherapeutika	25
2.1.3. Chemikalien und sonstige Materialien	28
2.1.4. Enzyme	30
2.1.5. Geräte	31
2.1.6. Nährmedien	32
2.1.7. Nukleinsäuren	33
2.1.7.1. Oligonukleotide	33
2.1.7.2. DNA-Größenmarker	36
2.1.8. Puffer und Lösungen	36
2.2. Mikrobiologische Methoden	39

2.2.1. Identifizierung	39
2.2.2. Testung der Antibiotika-Empfindlichkeit	39
2.2.2.1. Das Mikrodilutionsverfahren	39
2.2.2.2. Bestimmung der Quecksilber(II)-Resistenz	40
2.2.2.3. Bestimmung des Einfluss von MC-207,110 (Phe-Arg- β -Naphtylamid) auf die Minimale Hemmkonzentration (MHK) von Aminoglykosiden, Tetracyclinen, und Chloramphenicol	40
2.2.3. Bestimmung der Lösungsmittel-Toleranz auf festem Medium nach Asako et al. (1997)	41
2.2.4. Keimzahlbestimmung	41
2.2.5. Bestimmung der Generationszeit	41
2.2.6. Hämolyse-Nachweis	43
2.3. Molekularbiologische Methoden	43
2.3.1. Konzentrationsbestimmung von Oligonukleotiden	43
2.3.2. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	43
2.3.3. Agarose-Gelelektrophorese	49
2.3.4. Reinigung von PCR-Fragmenten	50
2.3.4.1. Aufreinigung mit dem QIAquick-PCR Purification Kit TM (Qiagen)	50
2.3.4.2. Aufreinigung mit dem MinElute-PCR Purification Kit TM (Qiagen).. ..	50
2.3.4.3. Extraktion von DNA-Banden aus dem Agarose-Gel mittels QIAquick-Kit ^R	51
2.3.4.4. Extraktion von DNA-Banden aus dem Agarose-Gel mittels MinElute-Kit ^R	51
2.3.5. Sequenzierung von DNA	52
2.3.5.1. Cycle-Sequencing	52
2.3.5.2. Aufreinigung des Reaktionsansatzes mittels Ethanol-Acetat-Fällung	53
2.3.5.3. Aufreinigung des Reaktionsansatzes mittels DyeEx TM Spin Kit (Qiagen)	53
2.3.6. Präparation von Plasmid-DNA	53
2.3.6.1. Plasmidschnellpräparation nach Maniatis et al. (1989)	53
2.3.6.2. Plasmidpräparation mit dem HiSpeed TM Plasmid Purification Kit (Qiagen)	54
2.3.6.3. K-Acetat Plasmidpräparation nach E. Tietze (Robert-Koch-Institut, Wernigerode)	55

2.3.7. Restriktionsverdauung von DNA	55
2.3.8. Übertragung von genetischem Material durch Konjugation	56
2.3.9. Transformation von genetischem Material durch Elektroporation	57
2.4. Proteinbiochemische Methoden	58
2.4.1. Präparation des β -Laktamase-Rohextraktes	58
2.4.2. Bestimmung der spezifischen β -Laktamase-Aktivität	58
2.4.3. Bestimmung der Proteingehalts nach Lowry	60
2.4.4. Elektrophoretische Auftrennung von Proteinen	61
2.4.4.1. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	61
2.4.4.2. Isolelektrische Fokussierung (IEF)	64
2.4.4.3. Nitrocefin-Färbung	65
2.4.4.4. Coomassie-Färbung	65
3. Ergebnisse	66
3.1. Allgemeine Charakterisierung der „Berliner Stämme“	66
3.1.1. Identifizierung	66
3.1.2. Resistenzbestimmung	66
3.1.3. Untersuchung der β -Laktam-Resistenz	72
3.1.3.1. Phänotypische Identifizierung von β -Laktamasen mittels dichotomem Verzweigungsschema (Westphal, 1999)	72
3.1.3.2. Genotypische Identifizierung von β -Laktamasen	73
3.1.4. Stammauswahl	76
3.2. Charakterisierung der vier ausgewählten Stämme	77
3.2.1. Konjugation der Stämme 30, 31, 38, 56	77
3.2.2. Plasmid-Analysen	79
3.2.2.1. Nachweis und Größenbestimmung der Plasmide in den Stämmen 30, 31, 38, 56, sowie den Konjuganten Kan3 und Amp16	79
3.2.2.2. Versuch zur Transformation der Plasmide	81
3.2.2.3. Versuch zum Verdau der Plasmide aus Stamm 56	81
3.2.3. Bestimmung der Generationszeit	82
3.2.4. Serotypisierung (Robert-Koch-Institut, Wernigerode)	82
3.2.5. Hämolyse-Test	83
3.2.6. Charakterisierung der β -Laktam-Resistenz	83
3.2.6.1. Charakterisierung der Lokalisation der TEM- β -Laktamase-Gene	84

3.2.6.2. Überprüfung der CMY- β -Laktamase-Gene	85
3.2.6.3. Spezifische β -Laktamase-Aktivität	85
3.2.6.4. SDS-PAGE und Detektion der β -Laktamasen durch Nitrocefin	86
3.2.6.5. Isoelektrische Fokussierung der β -Laktamasen	87
3.2.7. Charakterisierung der Chinolon-Resistenz	88
3.2.7.1. Untersuchung der QRDRs von <i>gyrA</i> und <i>parC</i>	88
3.2.7.2. Nachweis von <i>qnr</i>	89
3.2.8. Untersuchung des MAR-Phänotyps	89
3.2.8.1. Sequenzierung von <i>marOR</i>	89
3.2.8.2. Bestimmung der Lösungsmittel-Toleranz auf festem Medium	91
3.2.8.3. Bestimmung des Einflusses des Efflux-Pumpen-Inhibitors MC-207,110	92
3.2.9. Untersuchung der Aminoglykosid-Resistenz	93
3.2.9.1. Aminoglykosid-Multiplex-PCR	94
3.2.9.2. <i>aph(3')</i> -I-PCR	95
3.2.9.3. <i>strA-strB</i> -PCR	96
3.2.9.4. <i>ant(3'')</i> -I-Nachweis	98
3.2.10. Charakterisierung der Tetracyclin-Resistenz	98
3.2.11. Analyse der Chloramphenicol-Resistenz	100
3.2.12. Untersuchung der Antifolat-Resistenz	102
3.2.13. Charakterisierung der Mobilgen-Elemente	103
3.2.13.1. Analyse der Integrons	103
3.2.13.2. Untersuchung der Transposons	107
3.3. Gen-Mapping des Stammes 56	110
3.3.1. <i>catI</i> -Mapping	111
3.3.2. <i>aph(3')</i> -Ia-Tem-1b-Mapping	114
3.3.3. Transposon-Integron-Mapping	114
3.3.4. <i>flo</i> -Mapping	117
3.4. Evolution von Resistenz-Genen	122
3.4.1. β -Laktam-Resistenz	123
3.4.2. Aminoglykosid-Resistenz	124
3.4.3. Tetracyclin-Resistenz	125
3.4.4. Chloramphenicol-Resistenz	125
3.4.5. Antifolat-Resistenz	126

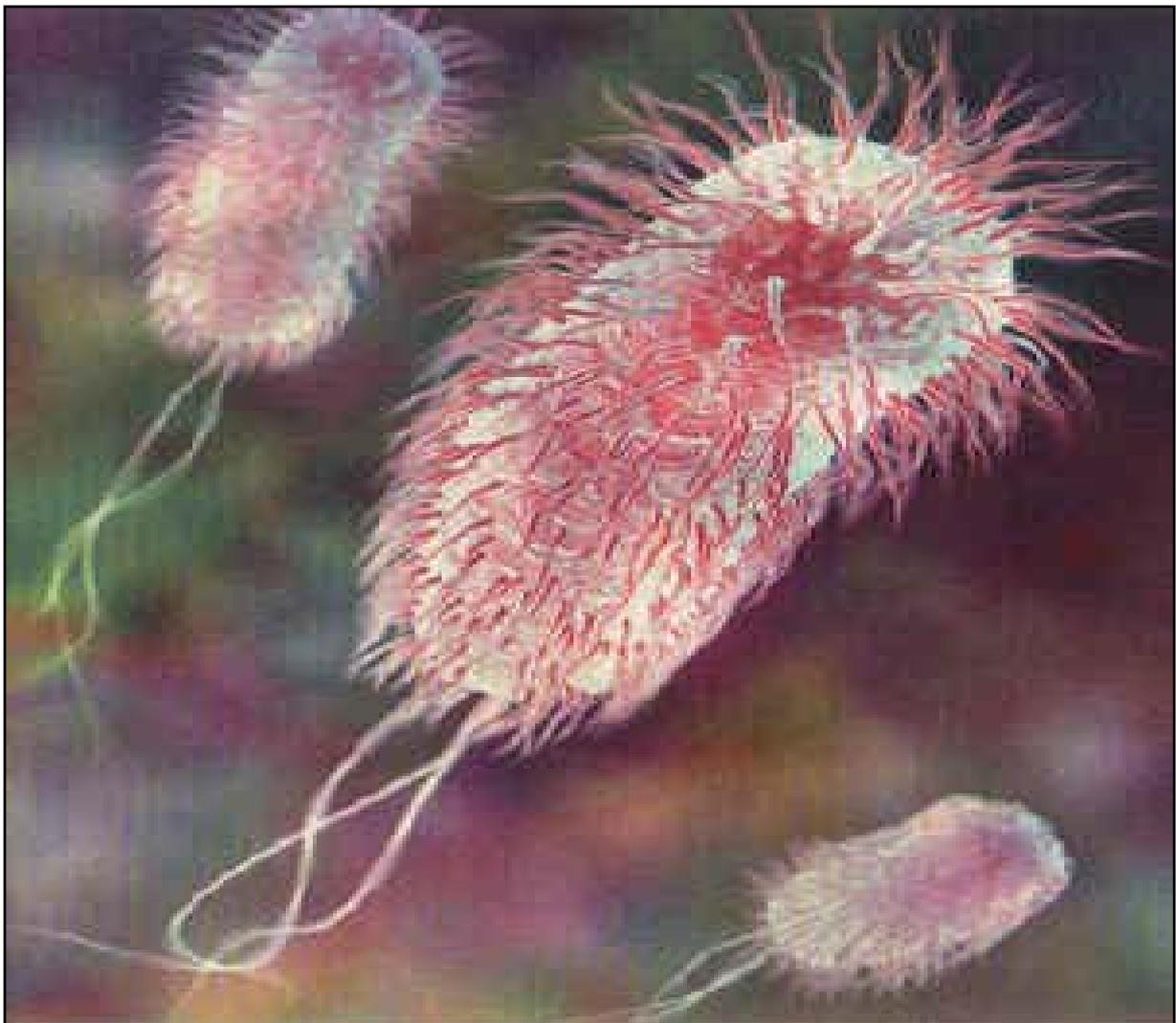
3.4.6. Quecksilber-Resistenz	127
4. Diskussion	128
4.1. Untersuchungen des Stamm-Kollektivs	128
4.2. Untersuchungen der vier Stämme	129
4.2.1. Überlebensfähigkeit der Stämme	129
4.2.1.1. Plasmid-Analysen und Konjugation	129
4.2.1.2. Analyse der Generationszeit	131
4.2.1.3. Serologie	132
4.2.2. Charakterisierung der Resistenzmechanismen	133
4.2.2.1. β -Laktam-Resistenz	134
4.2.2.2. Chinolon-Resistenz	136
4.2.2.3. Aminoglykosid-Resistenz	136
4.2.2.4. Tetracyclin-Resistenz	139
4.2.2.5. Chloramphenicol-Resistenz	140
4.2.2.6. Antifolat-Resistenz	141
4.2.2.7. Mobile Elemente	142
4.3. Anordnung von Resistenzgenen in Stamm 56	146
4.4. Herkunft der Resistenz-Gene	151
5. Zusammenfassung	153
6. Literaturverzeichnis	155
7. Anhang	173
7.1. Abkürzungsverzeichnis	173
7.2. Lebenslauf	177
7.3. Danksagung	178

1. Einleitung

1.1. Der Organismus *Escherichia coli*

Das Gram-negative Bakterium *Escherichia coli* (*E. coli*; Abbildung 1.1) gehört zur Familie der *Enterobacteriaceae*. *E. coli* ist wie die meisten *Enterobacteriaceae* ein fakultativ anaerobes Stäbchen und gehört zur physiologischen Darmflora des Menschen und vieler anderer Säugetiere. *Escherichia coli* wurde 1885 vom deutschen Kinderarzt und Bakteriologen Theodor Escherich (1857-1911) als *Bacterium coli commune* isoliert (Brock et al., 1994). Der Organismus besiedelt den Säuglingsdarm gewöhnlicherweise in den ersten Stunden des Lebens (Nataro & Kaper, 1998). Hier spielt er eine wichtige Rolle in der Vitamin K- und B₁₂-Versorgung des Menschen (Brock et al., 1994). Im Dickdarm kommen $10^{10} - 10^{12}$ Bakterien pro Gramm Darminhalt vor, was bis zu 20% der Stuhlmasse ausmachen kann. Davon sind höchstens 1% *E. coli*, ca. 10^8 Zellen/g Stuhl (Hahn et al., 1999).

Abb. 1.1 *Escherichia coli* (www.harbinson.fslife.co.uk, courtesy Scientific American)



Die meisten *E.-coli*-Stämme sind fakultativ pathogen. Es kann zu extraintestinalen Infektionen kommen, wenn Kolibakterien an andere Stellen des Körpers gelangen. Zu den häufigen Schmierinfektionen gehören die Harnwegsinfekte, die sich entweder nur im unteren Bereich der Harnwege manifestieren (Urethritis, Zystitis, Urethrozystitis) oder auch das Nierenbecken und die Niere betreffen (Zystopyelitis, Pyelonephritis). Bei akuten Harnwegsinfekten beruht die Ursache in 70 – 80%, bei chronisch persistierenden Harnwegsinfekten in 40 – 50 % der Fälle auf *E. coli* (Kayser et al., 1998). *E. coli* verursacht außerdem 15 % aller nosokomialen Sepsen und 30% aller Sepsen durch Gram-negative Bakterien. Bei Neugeborenen ist *E. coli* der häufigste Erreger von Sepsis und Meningitis.

Neben den fakultativ pathogenen Stämmen gibt es auch obligat pathogene *E.-coli*-Stämme wie DAEC (diffus adhaerierende *E. coli*), EaggEC (enteroaggregative *E. coli*), EHEC (enterohämorrhagische *E. coli*), EIEC (enteroinvasive *E. coli*), EPEC (enteropathogene *E. coli*), und ETEC (enterotoxinogene *E. coli*), die nicht zur physiologischen Bakterienflora gehören (Hahn et al., 1999). Die obligat pathogenen Stämme unterscheiden sich von den fakultativ pathogenen Stämmen durch den Besitz besonderer Virulenzfaktoren, die meistens Plasmid-kodiert sind.

Zur Therapie werden Amino- oder Ureidopenicilline, Cephalosporine, 4-Chinolone oder Co-trimoxazol herangezogen (Kayser et al., 1998). Gerade gegenüber diesen Antibiotika ist aber in den letzten Jahren die Resistenz stark gestiegen, was zu Therapieversagen führen kann. Tabelle 1.1 zeigt eine Übersicht von Resistenz-Daten ausgewählter Antibiotika für *E. coli* in Deutschland, die im Rahmen der PEG-Studien der Paul-Ehrlich Gesellschaft für Chemotherapie e.V. erhoben worden sind (<http://www.P-E-G.de>):

Tab. 1.1 Resistenzentwicklung bei *E. coli* in den Jahren 1984 - 2001

	1984	1990	1995	1998	2001
Ampicillin	22 %	31 %	36 %	41 %	49 %
Ciprofloxacin*	-	< 1 %	5 %	8 %	15 %
Co-trimoxazol	10 %	20 %	23 %	27 %	32 %
Gentamicin	< 1 %	3 %	6 %	5 %	6 %
Tetracycline	28 %	28 %	34 %	35 %	35 %

* Ciprofloxacin wurde erst 1987 in Deutschland eingeführt.

Daher soll an dieser Stelle auf Antibiotika-Resistenz und ihre Ursachen bei *E. coli* eingegangen werden.

1.2. Antibiotika-Resistenz bei *E. coli*

Die Wirksamkeit eines Antibiotikums gegenüber einem Bakterienstamm wird mit Hilfe der Minimalen Hemmkonzentration (MHK) bestimmt (vgl. 2.2.2.1.). Als MHK bezeichnet man die geringste Konzentration eines Antibiotikums, die gerade noch ausreicht, um ein mit bloßem Auge als Trübung der Nährbouillon erkennbares Wachstum zu verhindern (Deutsches Institut für Normung e.V., 1995).

Als klinisch resistent bezeichnet man Bakterien, die sich bei therapeutisch relevanten Konzentrationen eines Antibiotikums vermehren können. Bei bakterieller Resistenz wird zwischen natürlicher und erworbener Resistenz unterschieden. Von natürlicher Resistenz spricht man, wenn die gesamte natürliche Population einer Spezies einem bestimmten Antibiotikum gegenüber resistent ist. Alle Stämme der betreffenden Art sollten die genetische Information zur Ausbildung der Resistenz besitzen. Von erworbener oder sekundärer Resistenz spricht man, wenn sich einzelne Stämme von der übrigen Population durch verminderte Empfindlichkeit gegenüber einem Antibiotikum abheben (Stock, 1999).

Die bakterielle Resistenz gegenüber Antibiotika kann auf drei Mechanismen beruhen:

1. **Veränderung der Zielstruktur.** Bei diesem Mechanismus wird die Zielstruktur (der Antibiotika-Angriffsort) so verändert, dass sie durch das Antibiotikum nicht mehr gebunden und inaktiviert werden kann. Mutationen im Gen der Zielstruktur und enzymatische Modifikation der Zielstruktur (z.B. Addition von Schutzgruppen) können diese Veränderung bewirken. Es besteht auch die Möglichkeit, eine zweite, Antibiotika-unempfindliche Zielstruktur auszubilden (Bypass), die bei Hemmung der ursprünglichen Enzymform deren Funktion übernimmt.
2. **Verhinderung des Zugangs der Substanz zur Zielstruktur.** Bakterien besitzen mit ihrer Zytoplasmamembran eine Abgrenzung zur Umgebung. Gram-negative Bakterien wie *E. coli* haben zusätzlich eine äußere Membran, die von Poren-bildenden Proteinen, den Porinen, durchsetzt ist. Durch diese Porine können kleine, hydrophile Antibiotika wie Aminoglykoside, β -Laktamantibiotika, Chloramphenicol, Chinolone und Tetracycline ins Periplasma und von dort durch die Zytoplasmamembran passiv diffundieren. Durch Modifikation dieser Porine kann der Zugang der Antibiotika in die Zelle behindert werden, es können aber auch Effluxproteine in die Zytoplasmamembran eingebaut werden, die die Antibiotika aktiv aus der Zelle heraus pumpen. In beiden Fällen wird die Antibiotika-Konzentration an der Zielstruktur verringert.

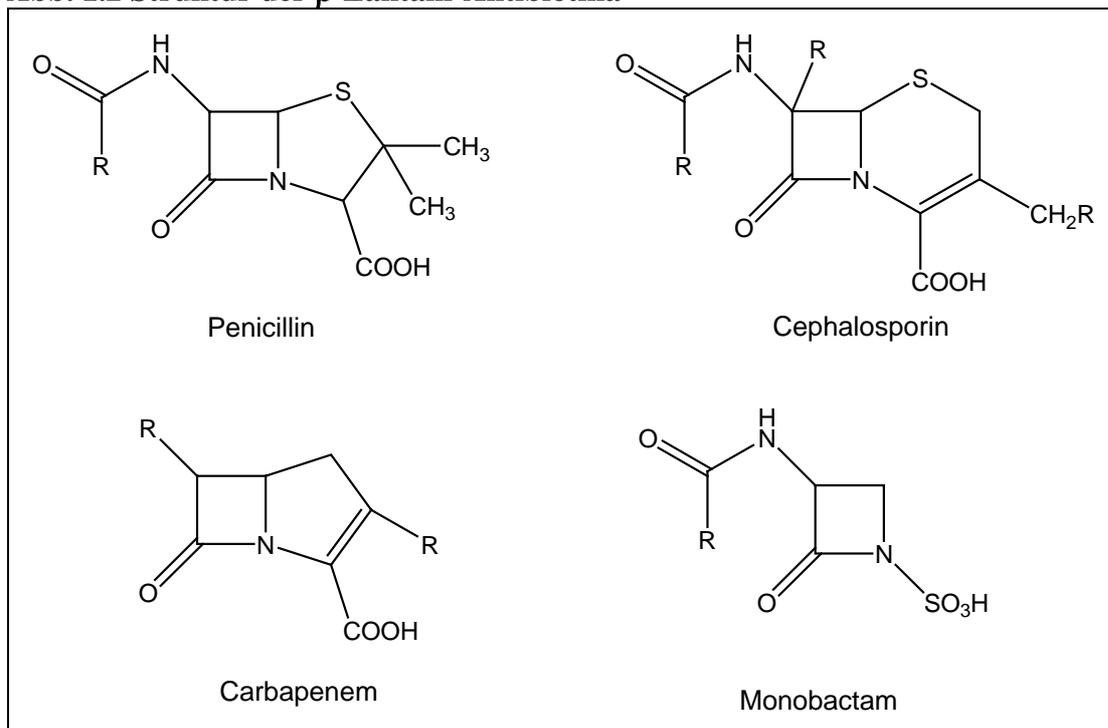
3. **Enzymatische Inaktivierung des Antibiotikums.** Hierbei werden Antibiotika-Moleküle inaktiviert, indem sie durch bakterielle Enzyme gespalten oder modifiziert werden, zum Beispiel durch Übertragung einer Acetyl-Gruppe.

Die Veränderung der Zielstruktur spielt eine große Rolle bei der Resistenz gegenüber Chinolonen, aber auch gegen β -Laktamantibiotika und Folsäure-Antagonisten. Die Verhinderung des Zugangs zur Zielstruktur ist zum Beispiel für geringe Chloramphenicol-, Tetracyclin- und Chinolon-Resistenz im Rahmen des MAR-Phänotyps (multiple Antibiotika Resistenz, vgl. 1.2.2.), aber auch bei hoher Tetracyclin-Resistenz von Bedeutung. Die Inaktivierung der Substanz durch bakterielle Enzyme ist für viele natürlich vorkommende und davon abgeleitete Antibiotika, wie zum Beispiel β -Laktame und Aminoglykoside, und für das Phenylalanin-Derivat Chloramphenicol sehr wichtig (zur Übersicht: Heisig, 1994).

1.2.1. Resistenz gegenüber β -Laktam-Antibiotika

Zur Gruppe der β -Laktam-Antibiotika gehören die Penicilline, Cephalosporine, Carbapeneme und Monobactame, die alle durch die Anwesenheit des viergliedrigen β -Laktamrings charakterisiert werden (vgl. Abbildung 1.2).

Abb. 1.2 Struktur der β -Laktam-Antibiotika



Das erste β -Laktam-Antibiotikum Penicillin G wurde 1929 von Alexander Fleming beschrieben, es wurde aber erst ab 1940 in der Therapie eingesetzt. β -Laktamantibiotika wirken, indem sie in die bakterielle Zellwandsynthese eingreifen. Sie hemmen speziell die Aktivität der Transpeptidasen und Carboxypeptidasen, die für die Quervernetzung des Mureins verantwortlich sind. Hierbei wirken die β -Laktame als Strukturanaloga des Acyl-D-Alanyl-D-Alanin, des Substrats der Enzyme, und bilden eine stabile Verbindung zwischen β -Laktam-Ring und Peptidase (Tipper & Strominger, 1965). Die Inaktivierung dieser Enzyme führt zu einem gestörten Gleichgewicht zwischen dem Peptidoglykan-Abbau und der Peptidoglykan-Synthese, was die Lyse der Zelle zur Folge hat (Tomasz, 1979; Höltje, 1989). Die Resistenz gegenüber β -Laktamantibiotika kann wie eingangs erwähnt auf mehreren Mechanismen beruhen.

Eine Möglichkeit besteht in der Veränderung der für die Wirkung verantwortlichen Zielstrukturen, den Penicillinbindeproteinen (PBPs). So konnte z.B. in Experimenten gezeigt werden, daß die Einführung mehrerer Punkt-Mutationen in PBP 3 von *E. coli* eine deutliche Steigerung der MHK gegenüber Ampicillin bewirkt (Georgopapadakou, 1993). Veränderungen der PBPs spielen jedoch für klinisch relevante Resistenz bei Gram-negativen Bakterien gegenüber β -Laktamantibiotika eine untergeordnete Rolle.

Bei Gram-negativen Bakterien erfolgt der Zugang zur Zielstruktur durch Porine in der äußeren Membran. Das Hauptporin bei *E. coli* ist OmpF. Man hat einen schrittweisen Anstieg der MHK gegenüber Penicillinen, Cefoxitin, und Cephalosporinen mit engem und breitem Spektrum verzeichnen können, wenn erst OmpC und dann OmpF verloren ging (Jaffe et al., 1982).

Wichtigster Resistenzmechanismus von Gram-negativen Bakterien gegenüber β -Laktamantibiotika ist jedoch die enzymatische Inaktivierung des Antibiotikums durch Hydrolyse des β -Laktamrings durch β -Laktamasen (Wiedemann et al., 1989):

E. coli besitzt wie die meisten *Enterobacteriaceae* eine chromosomale β -Laktamase des AmpC-Typs. Diese ist bei *E. coli* allerdings nicht induzierbar, so dass sie nur in geringen Mengen produziert wird. Dadurch ist *E. coli* natürlich sensibel gegenüber Ampicillin und Cephalosporinen mit engem Spektrum wie Cephalotin und Cephalexin (Livermore, 1995). In einigen Fällen wird das Enzym jedoch hyperproduziert. Diese Isolate zeigen dann reduzierte Empfindlichkeit gegenüber fast allen β -Laktamen außer den Carbapenemen (Normark et al., 1980). Molekulare Ursachen für diese Hyperproduktion können der Besitz mehrerer Kopien von *ampC*, Mutationen im Promotor-Bereich von *ampC*, oder Aneignung eines stärkeren Promotors von *Shigella* spp. sein (Nelson & Gay Elisha, 1999).

Der häufigste Mechanismus zur Ausbildung signifikanter Resistenz ist jedoch der Erwerb sekundärer β -Laktamasen, die meistens Plasmid-kodiert sind (zur Übersicht: Livermore, 1995). Das häufigste dieser Enzyme ist die Breitspektrum- β -Laktamase TEM-1, die für den Großteil der Ampicillin-Resistenz verantwortlich ist, welche in ungefähr 50% der *E. coli* Isolate beobachtet wird (Sanders & Sanders, 1992). Breitspektrum- β -Laktamasen (original-spectrum- β -lactamases, OSBL) sind in der Lage, Penicilline und Cephalosporine der ersten Generation zu inaktivieren. Zu den OSBL gehören neben TEM-1 auch die bei *E. coli* seltener angetroffenen Enzyme TEM-2 und SHV-1. Durch Punktmutationen entstanden aus ihnen β -Laktamasen mit erweitertem Wirkspektrum (extended-spectrum- β -lactamases, ESBL), die in der Lage sind, zusätzlich Cephalosporine der dritten Generation, wie Cefotaxim oder Ceftazidim, und Aztreonam zu hydrolysieren (Jacoby & Medeiros, 1991). Zu dieser Gruppe gehört eine ständig wachsende Zahl von TEM- und SHV-Enzymen (über 100, bzw. über 50). Eine aktuelle Übersicht kann auf der von Karen Bush und George Jacoby betreuten Seite unter <http://www.lahey.org./studies/temtable.asp> abgerufen werden. SHV-10 und SHV-49, sowie 23 TEM-Enzyme (TEM 30-36, 38-40, 44, 45, 51, 59, 65, 73, 74, 76, 77, 78, 80, 103) gehören zu den Inhibitor-resistenten β -Laktamasen (IRBL), die sich durch eine verringerte Hemmbarkeit durch Clavulansäure auszeichnen.

Zusätzlich zu den TEM- und SHV-abgeleiteten Enzymen sind in *E. coli* Plasmid-kodierte β -Laktamasen des AmpC-Typs nachgewiesen worden, die sich evolutionär von den chromosomalen AmpC- β -Laktamasen bestimmter Bakterienspezies herleiten: so stammen die LAT- und bestimmte CMY-Enzyme von der *Citrobacter freundii* AmpC- β -Laktamase ab, ACT und MIR haben ihren Ursprung in *Enterobacter cloacae*, DHA in *Morganella morganii*, ACC in *Hafnia alvei*, sowie die FOX-, MOX- und manche CMY-Enzyme in *Aeromonas sobria*. Plasmid-kodierte AmpC- β -Laktamasen vermitteln Resistenz gegenüber fast allen β -Laktamen außer dem 4. Generation-Cephalosporin Cefepim und der Gruppe der Carbapeneme. Die Kombination aus AmpC mit dem Verlust von Porinen führt allerdings zur Resistenz auch gegenüber diesen Substanzen (zur Übersicht: Philippon et al., 2002; Barlow & Hall, 2002).

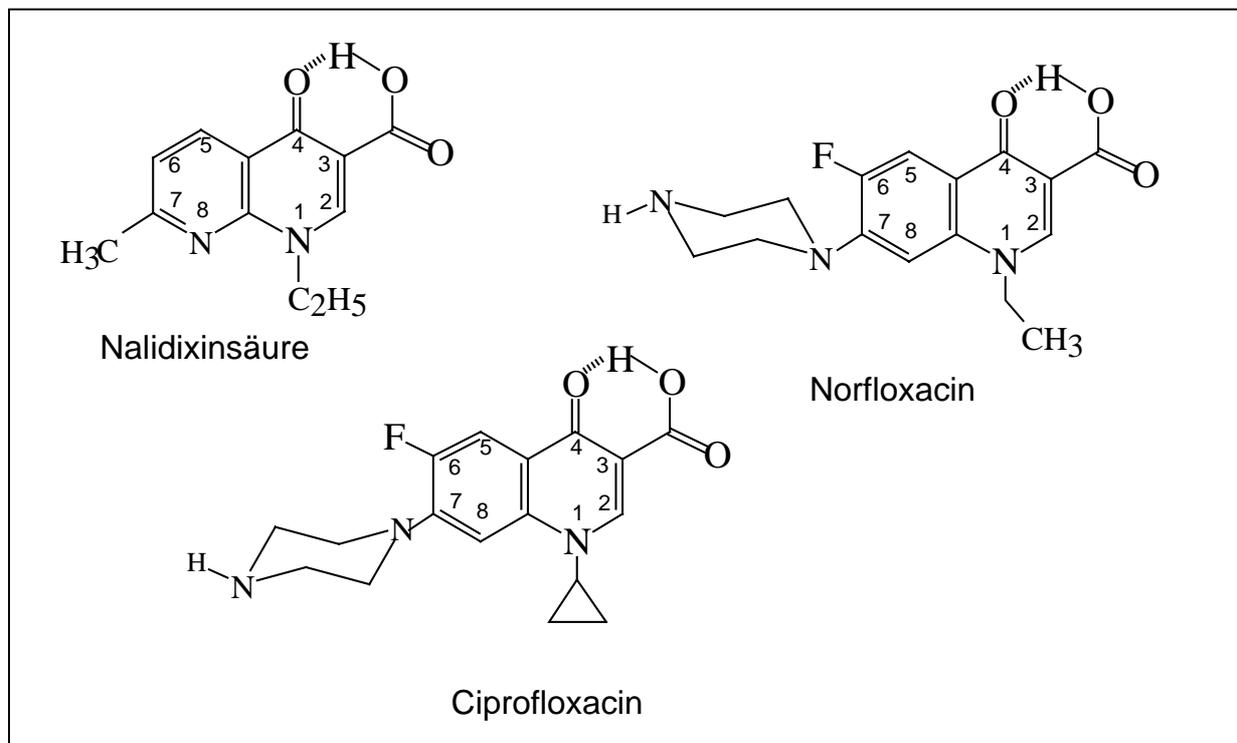
1.2.2. Chinolon-Resistenz

Chinolone sind eine weitere Antibiotika-Gruppe, die in der Therapie von *E.-coli*-Infektionen häufig eingesetzt wird. Nalidixinsäure (vgl. Abbildung 1.3) wurde 1962 als erster Vertreter dieser Substanzklasse im Rahmen eines Screeningprogramms zur Auffindung von Derivaten

des Malariamittels Chloroquin als Nebenprodukt synthetisiert. Nalidixinsäure und analoge Substanzen wie Pipemidsäure zeichnen sich durch ein auf Gram-negative Enterobakterien beschränktes Wirkungsspektrum aus und wurden ausschließlich zur Therapie von Harnwegsinfektionen eingesetzt (Heisig, 1997).

Durch die Fluorierung des Chinolongrundgerüsts an Position-C₆ wurde 1978 mit der Entwicklung von Norfloxacin (vgl. Abbildung 1.3) das Zeitalter der zweiten Generation der Chinolone, der sogenannten Fluorchinolone eingeleitet. Diese zeichnen sich durch erhöhte antibakterielle Aktivität und erweitertes Wirkungsspektrum aus. Zu den Fluorchinolonen gehört auch das in der Humanmedizin vielfach eingesetzte Ciprofloxacin (vgl. Abbildung 1.3).

Abb. 1.3 Strukturformeln von Nalidixinsäure, Norfloxacin und Ciprofloxacin



Zielstrukturen der Chinolone sind die Typ II Topoisomerasen Gyrase und Topoisomerase IV. Gyrase führt in der Zelle in einer ATP-abhängigen Reaktion negative Überspiralisierung durch Doppelstrangbrüche in die DNA ein. In Abwesenheit von ATP kann Gyrase die DNA wieder entspannen. Der Grad der Überspiralisierung spielt eine wichtige Rolle in der Regulierung vieler Gene z.B. Typ I- und P-Fimbrien (Dove & Dormann, 1994; Bagel, 1998). Die Aktivität der Gyrase ist aber auch essentiell für die Funktion des Replikations- und Transkriptionsapparates der bakteriellen Zelle. Das Enzym Gyrase ist ein Tetramer aus je

zwei Untereinheiten A und B (A_2B_2), die von den Genen *gyrA* und *gyrB* kodiert werden. Die Topoisomerase IV ist für die Dekatenierung von replizierten Tochterchromosomen verantwortlich. Auch diese Reaktion verläuft unter Doppelstrangbruch, aber ohne ATP-Verbrauch. Topoisomerase IV ist ebenfalls ein Tetramer aus je zwei Untereinheiten A und B (A_2B_2), die von den Genen *parC* und *parE* kodiert werden (Drlica & Zhao, 1997). Vergleicht man die Aminosäuresequenzen von GyrA und ParC ergibt sich eine Homologie von 35,9%, zwischen GyrB und ParE besteht 40,1% Homologie (Kato et al., 1990). Die bakterizide Wirkung der Chinolone beruht auf ihrer stabilen Bindung an den Komplex aus DNA und Typ II Topoisomerasen, was dazu führt, daß die DNA nicht mehr transkribiert und repliziert werden kann (Wiedemann & Heisig, 1999).

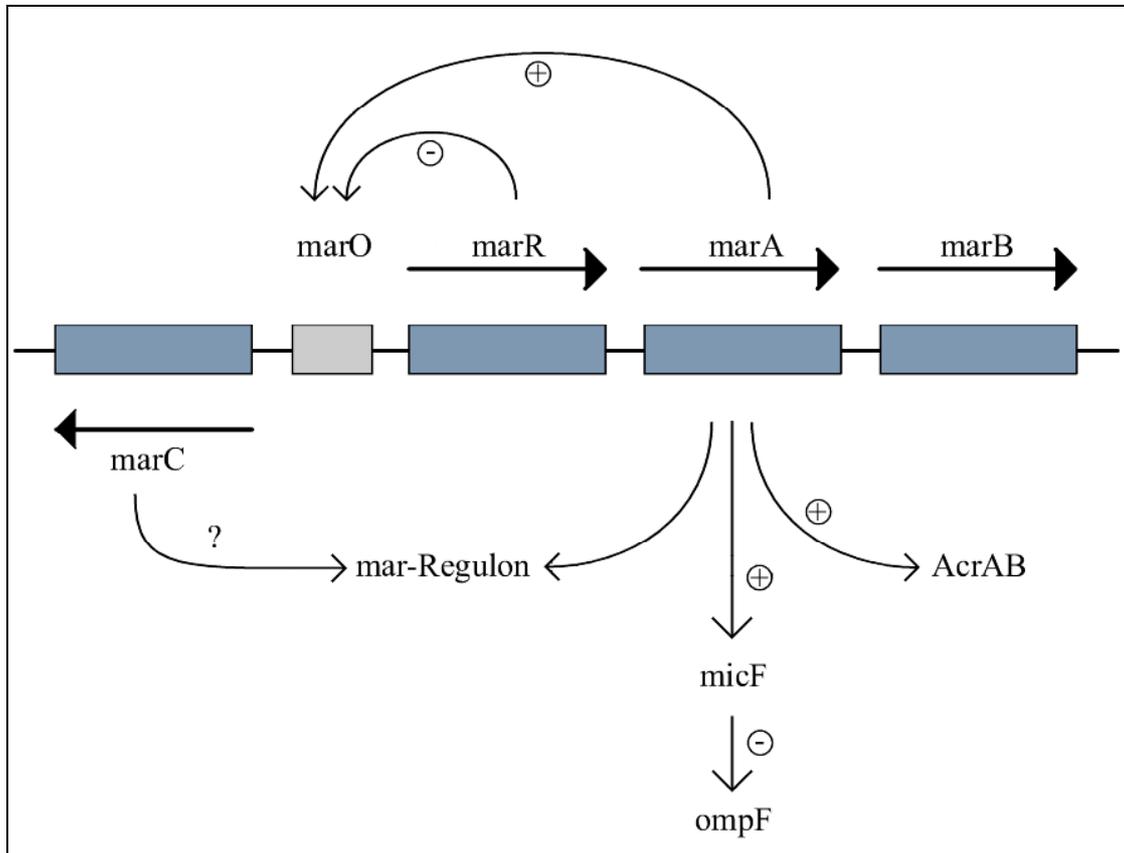
Chinolon-Resistenz kann bei *E. coli* auf mehreren Ursachen beruhen.

Die meisten Chinolonresistenz-vermittelnden Mutationen sind in der A-Untereinheit der primären Zielstruktur bei Gram-negativen Bakterien, der Gyrase lokalisiert. Diese Mutationen häufen sich innerhalb der Codons für die Aminosäuren Serin-83 und Aspartat-87, die in der QRDR (quinolone resistance-determining region) liegen, welche sich von Alanin-67 bis Glutamin-106 erstreckt (Heisig, 1996). Für das Erreichen hoher Fluorchinolonresistenz sind bei *E. coli* neben *gyrA*-Doppel-Mutationen in den Codons Serin-83 und Aspartat-87 auch Mutationen in der ParC-Untereinheit der Topoisomerase IV, der sekundären Zielstruktur der Chinolone, essentiell. Bei *E. coli* sind besonders häufig Mutationen, die die Aminosäuren Serin-80 und Glutaminsäure-84 der ParC-Untereinheit betreffen, beteiligt (Heisig, 1996).

Der zweite bakterielle Mechanismus, der zur 4-Chinolon-Resistenz führt, ist eine verringerte Chinolonakkumulation im Cytoplasma. Dies kann auf verringertem Einstrom, erhöhtem Efflux von Chinolonen oder einer Kombination beider Mechanismen beruhen. Bei *E. coli* ist der verringerte Einstrom hauptsächlich auf eine Reduktion der Anzahl oder Veränderungen der OmpF-Porine in der äußeren Membran zurückzuführen (Heisig, 1994). Dies sind zum Einen Mutationen in dem *ompF*-Gen selber, zum Anderen können aber auch Mutationen im *mar*-Operon zu einer Reprimierung der *ompF*-Expression führen, was eine verminderte 4-Chinolon-Aufnahme zur Folge hat (Cohen et al., 1993, Hüllen et al., 1998). Für den Efflux der Chinolone sind Pumpen verantwortlich. Eine solche Pumpe bei *E. coli* ist die AcrAB-Pumpe. Ihre Aktivierung kann durch Mutationen im *mar*-Operon verursacht werden (Okusu et al., 1996; vgl. Abbildung 1.4). Die oben erwähnten Porine und Effluxpumpen transportieren neben Chinolonen auch Antibiotika anderer Klassen z.B. Chloramphenicol und Tetracycline (George & Levy, 1983). Diese Kombination aus verringerter Anzahl der Porine und erhöhter Anzahl der Effluxpumpen führt zu erhöhter Resistenz gegenüber Antibiotika

verschiedener Klassen, was als multiple Antibiotika-Resistenz (MAR) bezeichnet wird. Für die molekularen Ursachen des MAR-Phänotyps muß der chromosomal kodierte *mar*-Locus genauer betrachtet werden (Abb. 1.4).

Abb. 1.4 Schematische Darstellung des *mar*-Locus in *E. coli* (nach Alekshun and Levy, 1997)



Der *mar*-Locus besteht aus zwei Operons, die den Operator *marO* flankieren. Das eine Operon kodiert für MarC, ein integrales Protein der Cytoplasma-Membran, das eine Rolle in der Fluorchinolon-Resistenz zu spielen scheint (Alekshun & Levy, 1997). Das andere Operon *marRAB* kodiert für einen Repressor MarR, und zwei weitere Proteine MarA und MarB (Cohen et al., 1993). MarA ist ein Transkriptionsaktivator, der einerseits durch Aktivierung von *micF* die Expression von *ompF* reprimiert (Cohen et al., 1993), andererseits die Expression der AcrAB-Effluxpumpe steigert (Okusu et al., 1996). Normalerweise wird die Expression von *marA* durch den Repressor MarR reprimiert, bei Mutationen in *marR* oder *marO* kann *marA* aber konstitutiv transkribiert werden und es kommt zur Ausbildung des MAR-Phänotyps (Cohen et al., 1993). Die Funktion des Genprodukts von *marB* ist noch ungeklärt (Alekshun & Levy, 1997). Asako et al. konnten 1997 zeigen, dass Mutationen in

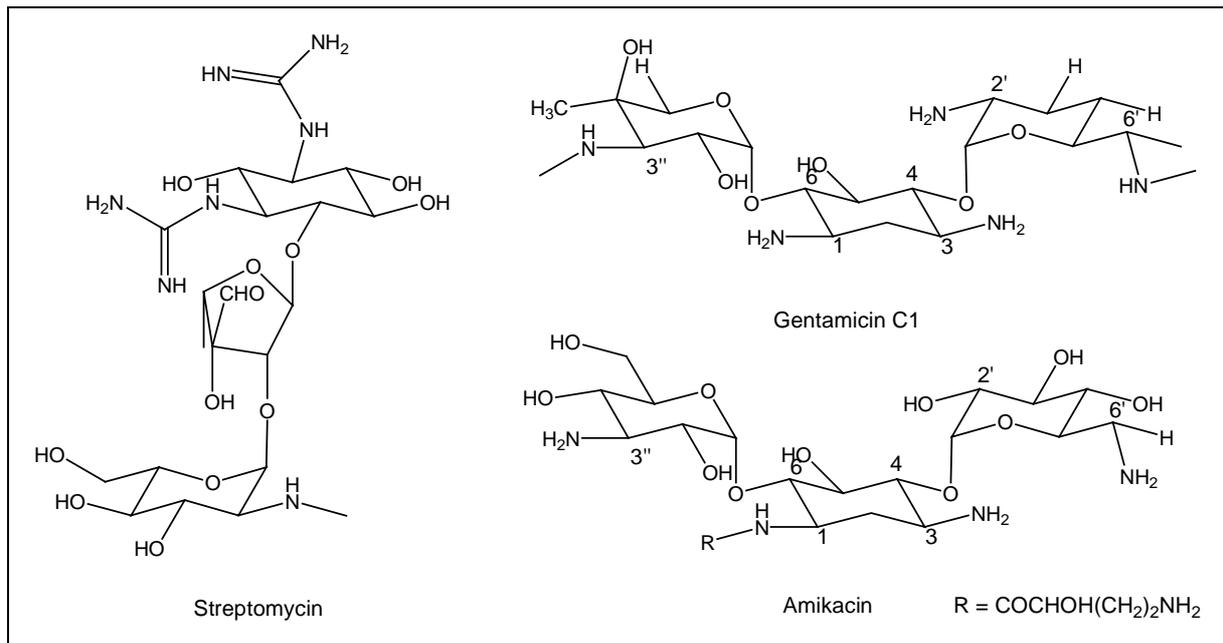
marR, die zu einer Überexpression von MarA und somit zur Ausprägung des MAR-Phänotyps führen, auch für Lösungsmittel-Toleranz in *E. coli* verantwortlich sind.

Die bisher beschriebenen Mechanismen der Chinolon-Resistenz sind alle chromosomal kodiert und können nicht horizontal auf andere Bakterien übertragen werden. 1998 berichteten Martinez-Martinez et al. über Plasmid-kodierte Chinolon-Resistenz, die von *Klebsiella pneumoniae* auf *E. coli* übertragbar war. 2002 konnten Tran und Jacoby zeigen, dass diese Resistenz von dem *qnr*-Gen vermittelt wird, das Teil eines Plasmid-kodierten Integrons ist (vgl. 1.3.3.). Der Resistenz-Mechanismus scheint auf einem Schutz der Gyrase (nicht aber der Topoisomerase IV) durch das Qnr-Protein zu beruhen. Das *qnr*-Gen selbst vermittelt keine klinische Resistenz gegenüber Fluorchinolonen, es erleichtert aber die Selektion hochresistenter Mutanten und kann bereits bestehende Resistenz verstärken (Martinez-Martinez et al., 1998; Martinez-Martinez et al., 2003), wodurch *qnr* klinisch relevant sein könnte.

1.2.3. Aminoglykosid-Resistenz

Aminoglykoside sind Antibiotika mit breitem Wirkungsspektrum, die früher häufiger in der Therapie Gram-negativer Bakterien eingesetzt wurden. Aufgrund ihrer Nebenwirkungen (Nephrotoxizität und Ototoxizität) und der Verbreitung von Resistenz werden sie heute in der Therapie von *E. coli*-Infektionen nur noch selten eingesetzt. Das erste Aminoglykosid, Streptomycin, wurde 1944 eingeführt, weitere wichtige Aminoglykoside wie Kanamycin, Gentamicin (das zu einem Drittel aus Gentamicin C₁ besteht) und Tobramycin folgten. In den 70er Jahren wurden dann wegen der Resistenzentwicklung semisynthetische Derivate wie Amikacin und Netilmicin eingeführt (Abb. 1.5).

Die Wirkung der Aminoglykoside beruht auf der Behinderung der bakteriellen Protein-Biosynthese. Im Zytosol binden sie an die 30S Untereinheit des prokaryontischen Ribosoms, wodurch die Elongation der naszierenden Peptidkette durch Behinderung der Korrekturlese-Funktion gestört wird (Mingeot-Leclercq et al., 1999). Fehlerhafte Proteine können in die Zellmembran eingebaut werden, wodurch die Permeabilität verändert und der Aminoglykosid-Einstrom weiter erhöht wird, was letzten Endes zur Zerstörung der Zellmembran und damit zum Zelltod führt.

Abb. 1.5 Strukturformeln von Streptomycin, Gentamicin C₁ und Amikacin

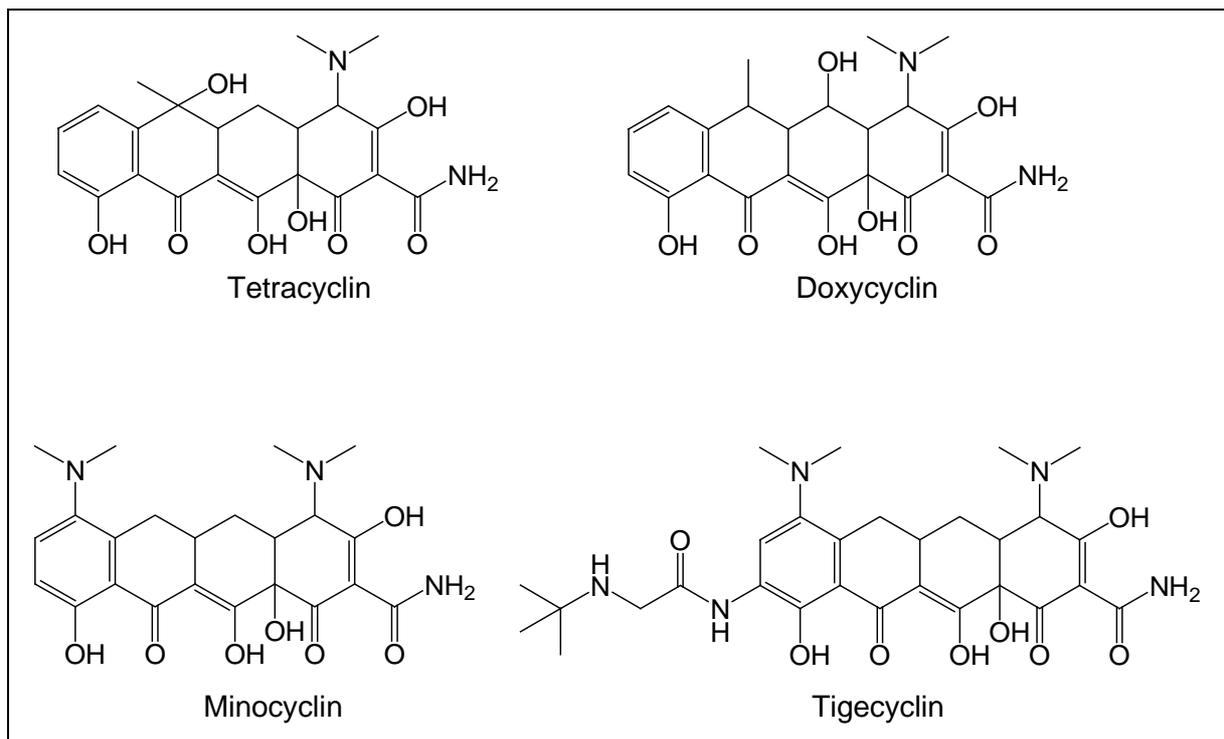
Punktmutationen im *rpsL*-Gen, was für das ribosomale Strukturprotein S12 kodiert, können zu hoher Streptomycin-Resistenz führen. Die Hauptursache der klinisch relevanten Aminoglykosid-Resistenz bei *E. coli* ist jedoch die Modifikation spezifischer Amino- oder Hydroxyl-Gruppen des Antibiotikums durch sogenannte Aminoglykosid-modifizierende Enzyme (AME). Das modifizierte Antibiotikum bindet viel schlechter an das Ribosom, wodurch die Protein-Biosynthese relativ ungestört weiterlaufen kann. Man unterscheidet bei den AMEs N-Acetyltransferasen (AAC), die Acetyl-CoenzymA als Donor nutzen und Amino-Gruppen angreifen, O-Nukleotidyltransferasen (AAD oder ANT) und O-Phosphotransferasen (APH), die beide ATP als Donor nutzen und Hydroxyl-Gruppen angreifen (Mingeot-Leclercq et al., 1999). Aminoglykosid-modifizierende Enzyme sind häufig Plasmid-kodiert, werden aber auch auf Transposons und als Genkassetten in Integrons (vgl. 1.3.3.) gefunden. Ein Beispiel ist das Nukleotidyltransferase-Gen *aadA1* [*ant(3'')*-Ia], das zu Spectinomycin- und Streptomycin-Resistenz führt und als Genkassette in vielen Integrons, unter anderem in In2 von Transposon21 (Liebert et al., 1999) gefunden wird. Aminoglykosid-modifizierende Enzyme werden häufig phänotypisch charakterisiert, indem untersucht wird, gegenüber welchen Aminoglykosiden das jeweilige Enzym Resistenz vermittelt. Dabei ist eine Vielzahl an Enzymen entdeckt worden und man hat erkannt, daß eigentlich jede angreifbare Position in einem Aminoglykosid von mehreren Enzymen modifiziert wird (Mingeot-Leclercq et al., 1999). Genetische Analysen haben gezeigt, dass es viele verschiedene Enzyme gibt, die die gleiche Aminoglykosid-modifizierende Aktivität besitzen, aber nicht unbedingt sehr nah verwandt sind (Shaw et al., 1993).

Eine weite Möglichkeit zur Verringerung der Aminoglykosid-Empfindlichkeit könnte erhöhter Efflux im Rahmen des MAR-Phänotyps sein. Wie unter 1.2.2. beschrieben wurde, führen bestimmte Mutationen in *marR* und *marO* zu einer Überexpression des Transkriptionsaktivators MarA. Das schon vorgestellte Efflux-System AcrAB kann keine stark hydrophilen Substanzen transportieren, wie es die meisten Aminoglykoside sind. Es gibt aber Anzeichen dafür, dass MarA auch die Expression der mit AcrB verwandten Efflux-Pumpe AcrD erhöht, die die Aminoglykoside Amikacin, Gentamicin, Kanamycin, Neomycin, und Tobramycin transportieren kann (Rosenberg et al., 2000; Elkins & Nikaido, 2002).

1.2.4. Tetracyclin-Resistenz

Tetracycline sind eine weitere Gruppe von Antibiotika, die ihre Wirkung durch Hemmung der bakteriellen Protein-Synthese entfalten. Dies geschieht durch Blockierung der 30S-Untereinheit des Ribosoms, das die Bindung der tRNA verhindert und die Elongation hemmt. Aufgrund der Reversibilität der Blockierung ist die Wirkung der Tetracycline bakteriostatisch (Kayser et al., 1998). Zur Gruppe der Tetracycline gehören neben dem eigentlichen Tetracyclin auch Doxycyclin, Minocyclin und als neuste Entwicklung das Minocyclin-Derivat Tigecyclin, die in Abb. 1.6 dargestellt sind.

Abb. 1.6 Strukturformeln von Tetracyclin, Doxycyclin, Minocyclin und Tigecyclin



Auf Grund hoher Resistenz in Kombination mit der nur bakteriostatischen Wirkung werden Tetracycline in der Therapie von *E. coli* Infektionen nicht mehr eingesetzt.

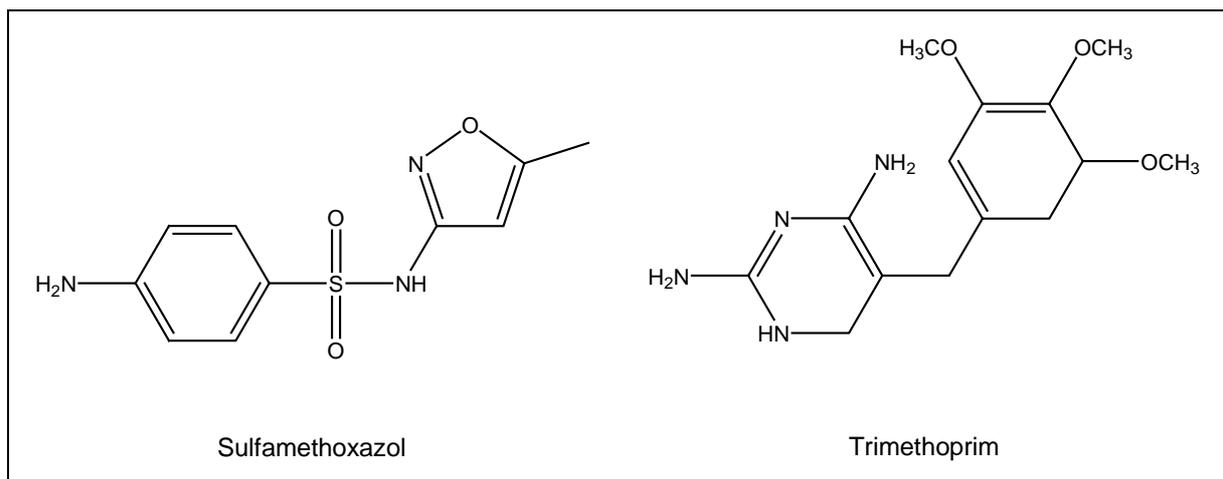
Tetracyclin-Resistenz wird in Gram-negativen Organismen meistens durch aktiven Efflux in Form eines H^+ /Tetracyclin-Antiports vermittelt. So sind inzwischen über 12 verschiedene Klassen homologer Efflux-Proteine [Tet(A), Tet(B), Tet(C), Tet(D), Tet(E), Tet(F), Tet(H), Tet(I), Tet(J), Tet(Y), Tet(30), Tet(31)] identifiziert worden, wobei die Liste kontinuierlich wächst. Tetracyclin-Efflux-Gene bestehen meistens aus 2 Genen in divergenter Orientierung: *tetR*, das für einen Repressor kodiert, und *tetA*, das für die Effluxpumpe kodiert. Die Klassen-Designation wird in Klammern angegeben (*tetA(B)* ist also das Effluxpumpen-Gen der Klasse B). Die Gene *tet(A)*, *tet(B)*, *tet(C)*, *tet(D)*, *tet(E)*, *tet(I)*, und *tet(Y)* sind schon bei *E. coli* nachgewiesen worden (zur Übersicht: Chopra & Roberts, 2001).

Auch bei Tetracyclinen können Mutationen im *mar*-Operon zu einem MHK-Anstieg führen (Cohen et al., 1993, vgl. 1.2.2.).

1.2.5. Antifolat-Resistenz

Das Antibiotikum Co-trimoxazol wird in der Therapie von durch *E. coli* verursachten Harnwegs-Infektionen eingesetzt. Hierbei handelt es sich um eine Kombination der Antifolate Sulfamethoxazol und Trimethoprim (Abb. 1.7).

Abb. 1.7 Strukturformeln der Antifolate Sulfamethoxazol und Trimethoprim



Sulfamethoxazol ist ein Vertreter der Gruppe der Sulfonamide, der ältesten Gruppe antibakterieller Substanzen, die ab 1935 in der Klinik eingesetzt wurden. Sulfonamide inhibieren den bakteriellen Folsäure-Stoffwechsel, indem sie an Stelle des eigentlichen Substrats, p-Aminobenzoessäure, an die Substrat-Bindestelle der Dihydropteroat-Synthetase

(DHPS) binden, wodurch die Umsetzung der p-Aminobenzoesäure zu Dihydrofolat unterbunden wird (Huovinen, 2001).

Bei *E. coli* kann Resistenz durch eine einzelne Mutation im chromosomalen *folP* Gen entstehen, das für die DHPS kodiert. Der resultierende Aminosäure-Austausch führt zu einer DHPS mit 150fach geringerer Affinität zu Sulfonamiden, allerdings auch zu Lasten einer 10fach geringeren Affinität zum eigentlichen Substrat p-Aminobenzoesäure (Skold, 2001). Der weit häufigere Resistenzmechanismus ist allerdings der Erwerb Plasmid-kodierter Dihydropteroat-Synthetasen, die das Sulfonamid kaum binden. So beobachteten Swedberg und Skold 1980, dass die Sulfonamid-Bindung beim Plasmid-kodierten Enzym 10000 mal niedriger als beim chromosomalen Enzym war. Lange Zeit kannte man nur zwei Gene, die für Plasmid-kodierte Sulfonamid-Resistenz verantwortlich waren: *sulI* und *sulIII* (Radstrom et al., 1991; Skold, 2001). Die Gene *sulI* und *sulIII* haben auf Aminosäure-Ebene 57% Identität, wobei *sulI* immer auf Integrons (z.B. Integron2 in Transposon21, Liebert et al., 1999) und *sulIII* meistens auf kleinen, nicht-konjugativen Plasmiden wie pBP1 und RSF1010 gefunden wird. Dort ist es sehr häufig mit den Streptomycin-Resistenzgenen *strA* und *strB* verbunden, die für die Aminoglykosid-modifizierenden Enzyme Aph(3'') und Aph(6) kodieren. Die DNA-Region um *sul2-strA-strB* wird von gleichgerichteten Sequenz-Wiederholungen (sogenannten Direct Repeats) flankiert, die ein Anzeichen für Rekombination-Ereignisse sein können (Radstrom et al., 1991). 2003 wurde ein drittes Gen – *sulIII* oder *sul3* - in *E.-coli*-Isolaten aus Schweizer Schweinen entdeckt (Perreten & Boerlin, 2003). Es kodiert für ein Protein mit ca. 41% Aminosäure-Homologie mit Sul1 und Sul2 und wird von zwei Kopien der Insertions-Sequenz IS15 Δ /26 flankiert (vgl. 1.3.3.).

Trimethoprim inhibiert die bakterielle Dihydrofolat-Reduktase (DHFR) durch kompetitive Bindung an die Substrat-Bindestelle.

Auch bei Trimethoprim kann Resistenz durch Mutationen im chromosomalen *dhfr*-Gen entstehen, der Hauptmechanismus ist aber auch hier der Erwerb Plasmid-kodierter Dihydrofolat-Reduktasen mit Trimethoprim-unempfindliche Substrat-Bindestellen (Skold, 2001). Im Gegensatz zu den *sul* Genen gibt es eine Vielzahl sehr unterschiedlicher *dhfr* oder *dfr* Gene. Bis jetzt sind 19 verschiedene Gene aus zwei verschiedenen Familien in der Literatur beschrieben worden, wovon 15 als Genkassetten in Integrons (vgl. 1.3.3.) gefunden wurden (White & Rawlinson, 2001).

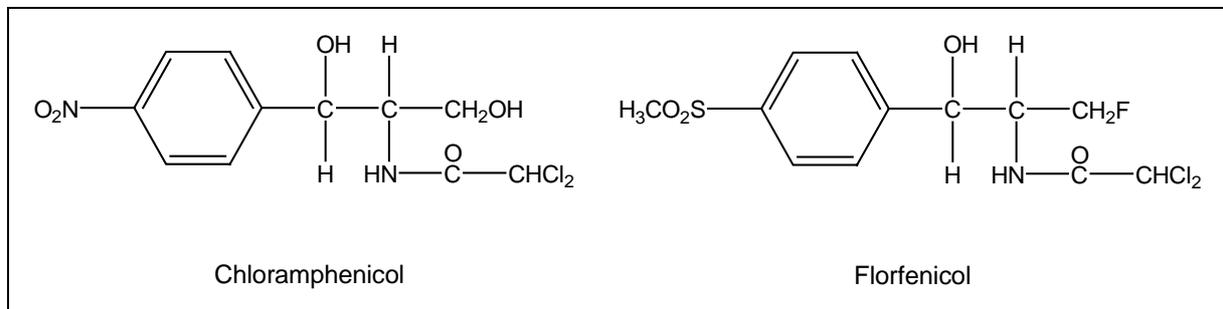
Einzelnen wirken Sulfamethoxazol und Trimethoprim bakteriostatisch und Resistenz entwickelt sich relativ schnell. Zusammen als Co-trimoxazol wirken sie wegen eines synergistischen Effektes bakterizid (Simon & Stille, 2000). Da Resistenzgene gegenüber zwei Antibiotika

erworben werden müssen, verläuft die Resistenz-Entwicklung langsamer, wobei Integrons mit *dfr* und *sulI* inzwischen häufig angetroffen werden.

1.2.6. Chloramphenicol-Resistenz

Chloramphenicol (Abb. 1.8) ist ein weiteres Antibiotikum, das die bakterielle Proteinbiosynthese hemmt. Auf Grund der reversiblen Bindung des Antibiotikums an die Peptidyltransferase der prokaryontischen Ribosomen ist die Wirkung bakteriostatisch (Kayser et al., 1998).

Abb. 1.8 Strukturformeln von Chloramphenicol und Florfenicol



Viele *E.-coli*-Isolate sind Chloramphenicol-resistent, obwohl Chloramphenicol nicht in der Therapie von *E.-coli*-Infektionen eingesetzt wird. Es werden zwei Klassen von Resistenz-Determinanten unterschieden, die Chloramphenicol-Acetyltransferasen (CAT) und Chloramphenicol-Efflux-Pumpen (CML).

Resistenz durch CATs beruht auf der Übertragung der Acetyl-Gruppe von Acetyl-CoenzymA auf Chloramphenicol, wodurch die Bindung an die Peptidyltransferase verhindert wird. Die Chloramphenicol-Acetyltransferasen bilden eine eigene Subfamilie innerhalb der Acetyltransferasen und zeigen keine nähere Verwandtschaft zu den Aminoglykosid-Acetyltransferasen (Shaw et al., 1993). Bei *E. coli* sind *catI* (= *catA1*), *catII*, *catIII* und Gene der *catB*-Familie häufig, wobei *catI* häufig mit IS1-assoziiert auftritt (Alton und Vapnek, 1979) und *catB*-Gene häufig Integron-lokalisiert sind (Parent & Roy, 1992; Laraki et al., 1999).

Cml-Gene kodieren für Chloramphenicol-spezifische Efflux-Pumpen, die vom Protonen-Gradient angetrieben werden. Die Gene sind Integron-lokalisiert und gehören zu den wenigen Gen-Kassetten, die einen eigenen Promotor besitzen (George & Hall, 2002; vgl. 1.3.3.). Zur *cml*-Familie gehören auch die *flo*-Gene, die für ähnliche Efflux-Pumpen kodieren, die aber zusätzlich zur Chloramphenicol-Resistenz auch Resistenz gegenüber dem nur in der

Tiermedizin eingesetzten fluorierten Chloramphenicol-Derivat Florfenicol (Abb. 1.8) vermitteln (Kim & Aoki, 1996; Bolton et al., 1999).

Weitere Ursachen für Chloramphenicol-Resistenz sind Mutationen im *mar*-Operon (Cohen et al., 1993; vgl. 1.2.2.).

1.3. Resistenzverbreitung bei *E. coli*

Bei der Besprechung möglicher Mechanismen für Antibiotika-Resistenz in 1.2. wurde häufig auf Gene hingewiesen, die Plasmid-kodiert vorliegen. Plasmide spielen somit für die Antibiotika-Resistenz eine wichtige Rolle. Des weiteren wurden mobile genetische Elemente wie Transposons, Integrons und Insertions-Sequenzen angesprochen. An dieser Stelle soll auf diese Strukturen eingegangen werden, die eine wichtige Funktion in der Verbreitung von Resistenzgenen einnehmen.

1.3.1. R-Plasmide

Plasmide sind kleine (3×10^3 – $4,5 \times 10^5$ bp im Vergleich zu $4,65 \times 10^6$ bp des *E. coli* Chromosoms, Kayser et al., 1998), zirkuläre DNA-Stränge, die separat vom Chromosom repliziert werden. Große Plasmide liegen teilweise in nur ein oder zwei Kopien vor, kleinere Plasmide können auch in hunderten von Kopien vorliegen. Die Kopienzahl spielt bei der Resistenz manchmal eine Rolle, weil eine erhöhte Kopienzahl auch eine erhöhte Proteinmenge zur Folge haben kann, was wiederum Auswirkungen auf die MHK haben könnte. Beispielsweise werden normale TEM-1- β -Laktamasen manchmal auf den ersten Blick fälschlicherweise als IRBL eingestuft (vgl. 1.2.1.), da sie, wenn sie in großer Menge vorliegen, IRBL-ähnliche MHK-Werte verursachen können.

Neben Resistenzgenen können auch andere für die Zelle vorteilhafte Gene auf Plasmiden liegen. Das können unter anderem Pathogenitäts- und Virulenz-Faktoren sein. So besitzen zum Beispiel fast alle EHEC-Stämme des Serotyps O157:H7 und viele andere Shiga-Toxin produzierende *E. coli* (STEC) ein 60 Mda großes Plasmid pO157, das für das Enterohämolysin und andere potentielle Kolonisations-Faktoren kodiert (Nataro & Kaper, 1998).

Plasmide mit Resistenzeigenschaften werden bei der Teilung an die Tochterzellen weitergegeben, es kann aber auch horizontaler Gen-Transfer der Plasmide durch Konjugation stattfinden.

Neben der Konjugation kann DNA auch durch Transformation und Transduktion horizontal übertragen werden. Bei der Transformation wird freie, lösliche DNA, die aus einem Spender-Bakterium (Donor) freigesetzt oder extrahiert worden ist, auf ein Empfängerbakterium (Rezipient) übertragen (vgl. 2.3.9.). Als Transduktion wird die Übertragung von DNA aus einem Donor-Stamm in einen Rezipienten durch Bakteriophagen bezeichnet. Da von diesen drei Methoden nur die Konjugation bei *E. coli* in der Natur von Bedeutung ist, soll an dieser Stelle näher auf die Konjugation eingegangen werden.

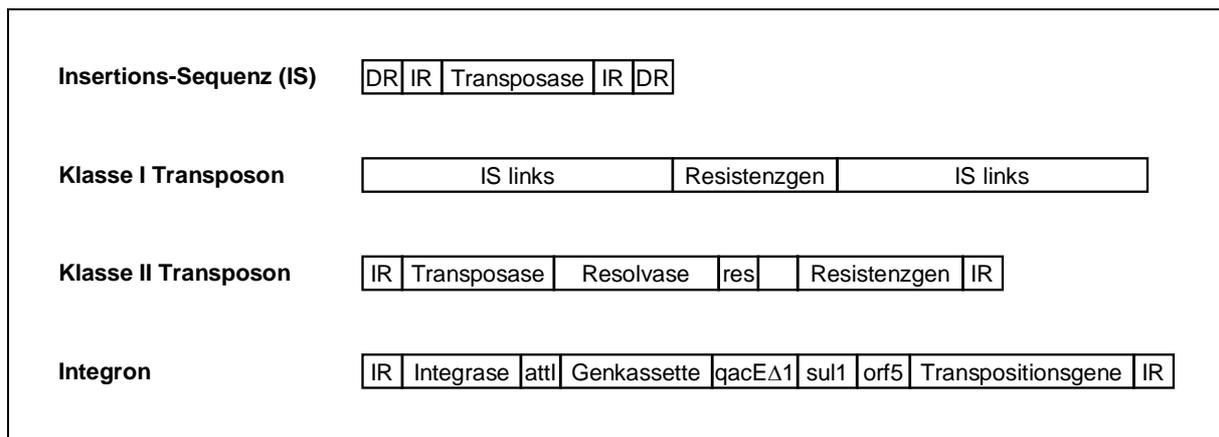
1.3.2. Konjugation

Bei der Konjugation werden Plasmide von einem Donor-Stamm auf einen Rezipienten übertragen. Man unterscheidet zwischen konjugativen und mobilisierbaren Plasmiden. Konjugative Plasmide besitzen *tra*-Gene, die für die Konjugation essentiell sind, sie brauchen keine externen Faktoren zur Übertragung. Mobilisierbare Plasmide können nur übertragen werden, wenn ein weiteres, konjugatives Plasmid in der Zelle vorliegt und sie mit diesem zusammen übertragen werden. Die Konjugation spielt für die Verbreitung der Resistenz eine wichtige Rolle, da hierbei Resistenz-tragende Plasmide an andere Stämme weiter gegeben werden können. Sie ist die wichtigste Verbreitungsmethode innerhalb von Bakterienpopulationen einer Spezies. Es besteht aber auch die Möglichkeit, Plasmide von Stämmen einer Spezies auf Stämme einer anderen zu übertragen. So können bestimmte Resistenzplasmide von *E. coli* auf *Pseudomonas aeruginosa* und sogar auf die Hefe *Saccharomyces cerevisiae* durch Konjugation übertragen werden (Waters, 1999).

1.3.3. Mobile genetische Elemente

Mobile genetische Elemente stellen das Bindeglied zwischen chromosomaler und Plasmid-kodierter Resistenz dar. Resistenzgene können mit Hilfe mobiler Elemente vom Chromosom auf Plasmide transferiert und von dort aus durch Konjugation verbreitet werden.

Man kennt heute über zehn Gruppen mobiler Elemente (Mahillon, 1998), wobei hier nur auf drei dieser Gruppen näher eingegangen werden soll, die bei *E. coli* häufiger vorkommen. Abbildung 1.9 zeigt Grundstrukturen der wichtigsten mobilen Elemente:

Abb. 1.9 Strukturen mobiler genetischer Elemente (Erläuterungen siehe S. 18 bis 19)

Zu den mobilen Elementen der Klasse I gehören die Insertions-Sequenzen (IS) und zusammengesetzten Transposons wie Tn9. Insertions-Sequenzen (oder IS-Elemente) sind kleine (0,7 – 2,5 kb) mobile genetische Einheiten, die nur die für die Transposition nötigen Gene besitzen. Man kennt mehr als 500 IS aus mindestens 17 Familien, aber das Basis-Modul scheint aus ein bis zwei Transposase-Genen und den Erkennungssequenzen der Transposase an den Enden des Elements zu bestehen. Diese Erkennungssequenzen liegen meistens in invertierter Orientierung vor und werden als „inverted repeats“ oder IRs bezeichnet. Bei den IS, die transpositionale Rekombination benutzen, werden die IRs von direkten Wiederholungen (DR, direct repeats) flankiert, die mit der Duplikation des Zielorts während der Transposition übereinstimmen (Mahillon & Chandler, 1998).

Die zusammengesetzten Transposons (Klasse I Transposons) wie Tn9 bestehen aus einem Resistenzgen (bei Tn9 einer Chloramphenicol-Acetyltransferase, Alton und Vapnek, 1979), das von zwei Kopien eines IS-Elements entweder in direkter oder umgekehrter Orientierung flankiert wird, so dass bei der Transposition das Resistenzgen mitbewegt wird (Mahillon, 1998).

Mobile Elemente der Klasse II bilden eine homogene Gruppe von Transposons, die mindestens aus einer Transposase, einer Resolvase, einer *res*-Site (Resolution site), und zwei kurzen (ca. 38 bp) IRs bestehen. Häufig kommen noch weitere Gene wie zum Beispiel Antibiotika-Resistenzgene dazu. Transposons dieser Klasse werden auch als kointegrative Transposons bezeichnet, weil während der Transposition ein Kointegrat aus Donor- und Ziel-Struktur entsteht. Dieses Kointegrat wird durch die Aktivität der Resolvase an der *res*-Site wieder gelöst (Mahillon, 1998). Beispiele dieser Transposon-Gruppe sind die bei *E. coli* häufig vorkommenden Transposons Tn21 (vgl. Abb. 1.10) und Tn3. Bei Tn21 liegen neben

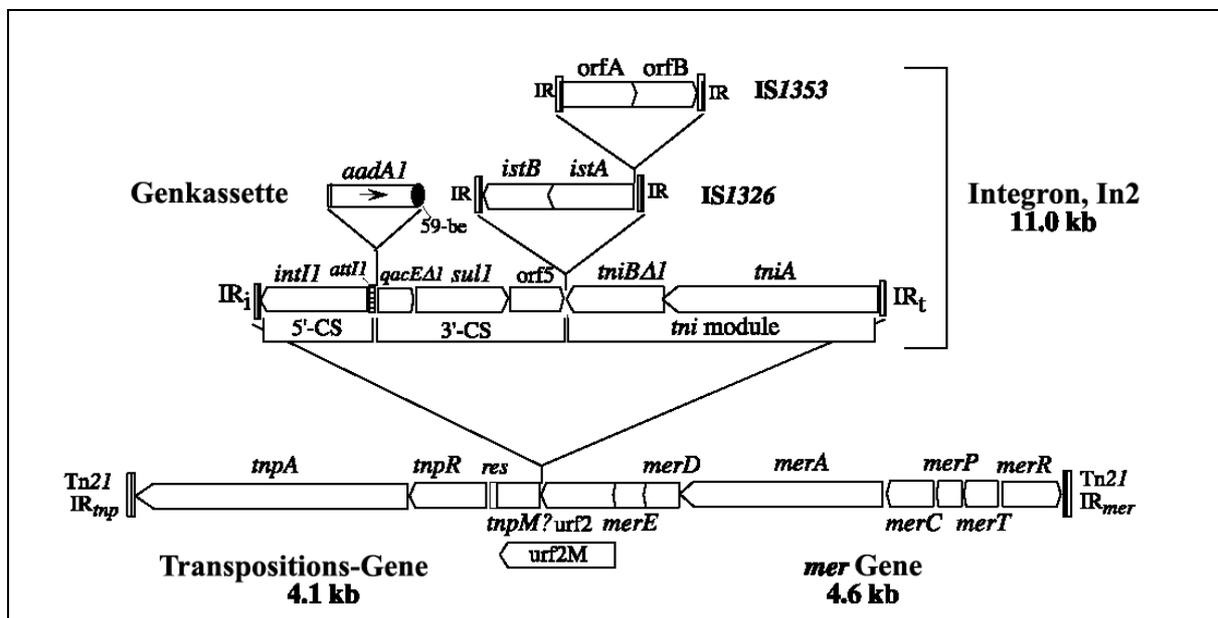
den Transpositionsgenen auch Gene für Quecksilber-Resistenz (*mer*-Operon) und bei Tn3 eine TEM-1 β -Laktamase vor.

Die für die Verbreitung von Resistenzgenen nötige Beweglichkeit erhalten Klasse II Transposons durch ihre Transpositionsgene. Die Resistenzgene stammen häufig von Integrons, die in die Transposons inseriert sind. Integrons (von Mahillon 1998 als mobile Elemente der Klasse VIII bezeichnet) sind genetische Einheiten, die Komponenten eines Rekombinationssystems besitzen, das dazu fähig ist, Gene aus Genkassetten einzufangen und zu mobilisieren (Hall & Collis, 1995). Zu den essentiellen Bestandteilen eines Integrons gehören ein *int*-Gen, das für die Orts-spezifische Integrase kodiert, der angrenzende *attI*-Bereich, der von der Integrase erkannt wird und an dem die Genkassetten inseriert werden, sowie ein Promotor P_{ant} , der die Expression Kasette-kodierter Gene steuert. Diese Elemente finden sich im vorderen Bereich des Integrons und werden, da sie stark konserviert sind, als 5'-konservierten Bereich oder 5'-CS (5'- conserved segment) bezeichnet. In den meisten Integrons, die in klinischen Isolaten gefunden werden, schließen sich an den 5'-CS Genkassetten an, wobei Anzahl und Art der Gene stark variieren, weswegen man auch vom variablen Bereich des Integrons spricht. Genkassetten bestehen aus einem Gen, welches häufig für Antibiotika-Resistenz kodiert, und einer spezifischen Rekombinationsstelle, dem 59-Basenelement. Das 59-Basenelement wird von der Integrase erkannt, so dass sie Rekombination von Genen zwischen zwei 59-Basenelementen oder zwischen einem *attI*-Bereich und einem 59-Basenelement vermitteln kann (Hall & Collis, 1995). In vielen Integrons folgt auf die Genkassetten ein zweiter konservierter Bereich, der als 3'-konservierter Bereich oder 3'-CS (3'- conserved segment) bezeichnet wird. Er besteht aus drei Genen, *qacEAI*, *sulI* und *orf5*. *qacEAI* kodiert für ein partiell funktionales Exportprotein, das den Efflux von und somit Resistenz gegen DNA-interkalierende Farbstoffe sowie quaternäre Ammonium-Verbindungen vermittelt (Paulsen et al., 1993). *sulI* kodiert für die unter 1.2.5. beschriebene Sulfonamid-Resistenz. Das postulierte Gen-Produkt von *orf5* besitzt Ähnlichkeit mit der Puromycin Acetyltransferase aus *Streptomyces alboniger*, wobei unklar ist, ob das Gen exprimiert wird (Bissonnette & Roy, 1992). Wie Klasse II Transposons werden Integrons von zwei IR flankiert. Abwärts des 3'CS aber noch innerhalb des rechten IR findet man in vielen Integrons die Überreste von bis zu vier Transpositionsgenen (*tni*-Modul). Es konnte gezeigt werden, dass Integrons, bei denen alle 4 Gene intakt sind, zur Transposition fähig sind, wie es bei In16/Tn402 der Fall ist (Brown et al., 1996). Die ursprünglichen Integrons waren demnach wahrscheinlich selber auch Transposons. Durch die Assoziation von Integrons mit Klasse II Transposons besteht kein Selektionsdruck mehr für den Erhalt der

Integron-Transpositionsgene, so dass diese häufig deletiert werden. Ist jedoch anderswo in der Zelle ein Transposon mit intakten *tni* Transpositionsgenen vorhanden, so könnte das Integron auch in *trans* durch das Transposon mobilisiert werden.

Das in Abbildung 1.10 dargestellte Transposon Tn21 ist eine Struktur, in der Vertreter der drei hier vorgestellten Gruppen mobiler Elemente zu finden sind: In ein Klasse II Transposon mit Quecksilber-Resistenz (*mer* Gene) ist In2 inseriert, ein Integron mit einer Streptomycin-Resistenz-Genkassette (*aadA1*), defektem *tni*-Modul und zwei inserierten IS-Elementen, IS1326 und IS1353 (Liebert et al., 1999).

Abb. 1.10 Struktur des Transposons Tn21 (nach Liebert et al., 1999)



1.4. Zielsetzung

Am Model *E. coli* soll untersucht werden, wie im Laufe der Evolution Resistenzgene erworben werden und wie sie im Organismus organisiert werden, so dass es den resistenten oder sogar multiresistenten Stämmen möglich ist, sich gegenüber sensiblen Stämmen ohne Selektionsdruck durchzusetzen.

Die Replikation und Expression zusätzlicher genetischer Elemente kostet eine Bakterienzelle Ressourcen und Energie, so dass es zu einem Wachstumsnachteil kommt. Es wäre zu erwarten, dass multiresistente Stämme, die einen Mehraufwand an Proteinbiosynthese zu bewältigen haben, langsamer wachsen als normale Zellen. In der Natur sollten solche Zellen sich nicht in Konkurrenz mit normal wachsenden, empfindlichen Zellen ohne Antibiotika-Selektionsdruck durchsetzen können. Da man diese Stämme aber findet, muss eine Kompensation dieses Fitness-Verlustes stattgefunden haben. Die wahrscheinlichsten Kompensations-Mechanismen sind Gen-Mutationen und Reorganisation der genetischen Elemente. Abbildung 1.11 zeigt eine mögliche Evolution von Resistenzgenen. Spuren dieser Evolution sollen im Rahmen dieser Arbeit nachgewiesen werden, um die Hypothese bestätigen zu können.

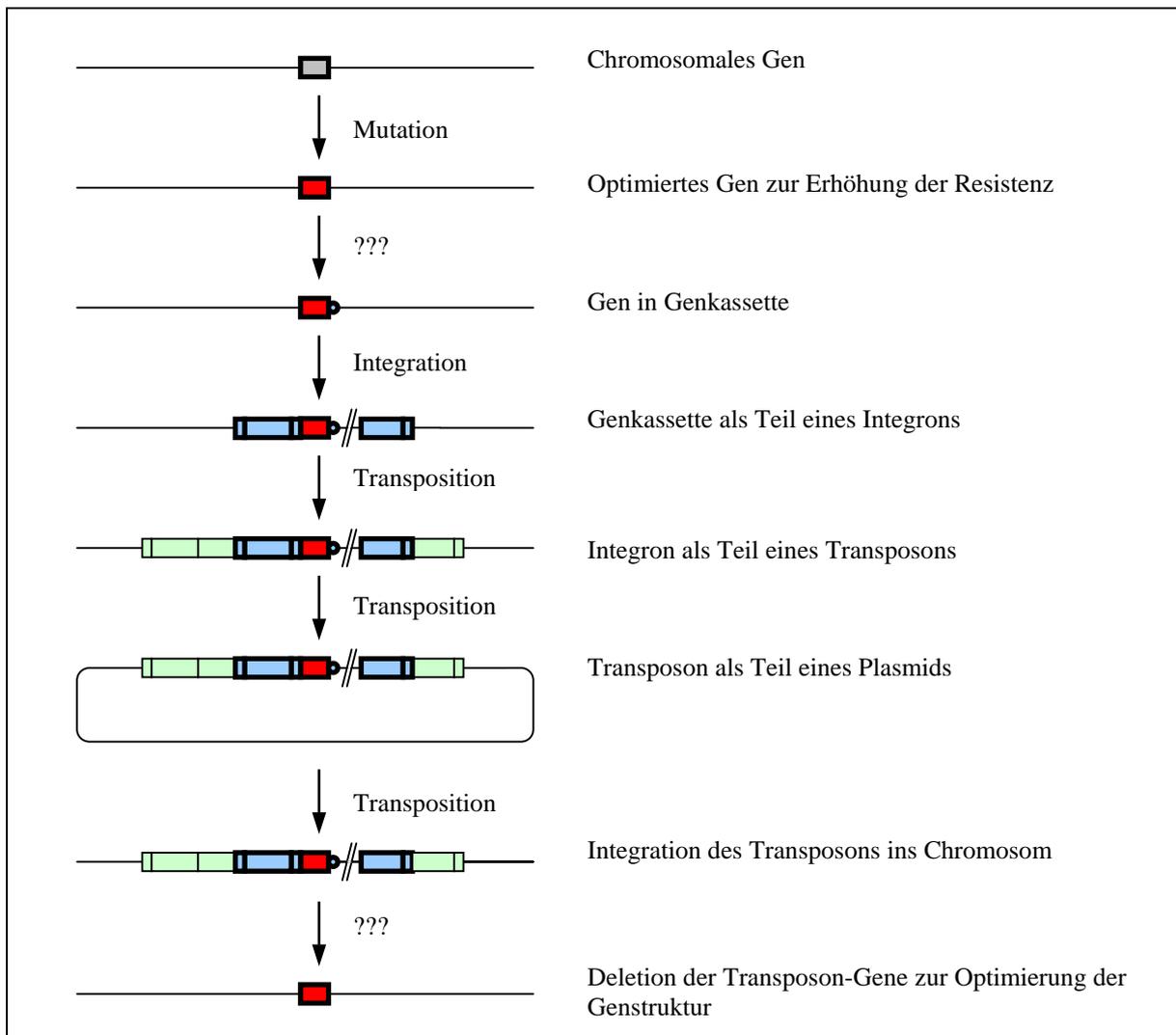
Um den Prozess der Evolution der Multiresistenz zu untersuchen, muss zuerst die molekulare Organisation der Resistenz analysiert werden. Diese Arbeit soll klären, welche Resistenzgene bei multiresistenten *E.-coli*-Stämmen vorkommen und wie sie angeordnet sind. Es soll geprüft werden, ob die Resistenzgene auf vielen einzelnen Transposons und / oder Integrons liegen, ob die Strukturen zu einem einzelnen mobilen Element komprimiert worden sind, oder ob die Mobilität ganz verloren gegangen ist.

Des weiteren soll die Herkunft der Resistenzgene untersucht werden, die bei *E. coli* als erworbene Resistenz gefunden werden. Können Bakterien identifiziert werden, bei denen diese Gene eine natürliche Resistenz vermitteln?

Schließlich sollen die ökologischen Aspekte der Multiresistenz bei *E. coli* untersucht werden. Fitness-Versuche sollen aufzeigen, ob Schritte in der Evolution stattgefunden haben, um einen eventuell durch die zusätzlichen Gene der Multiresistenz entstandenen Wachstumsnachteil zu kompensieren.

Ein Kollektiv von klinischen *E.-coli*-Isolaten mit verminderter Empfindlichkeit gegenüber Cephalosporinen dient als Untersuchungsmaterial. Anhand ausgewählter multiresistenter Stämme aus diesem Kollektiv sollen die obigen Fragen beantwortet werden.

Abb. 1.11 Hypothese zur Evolution von Resistenzgenen



Es gibt chromosomale Gene, die sich durch Mutation zu optimierten Genen entwickeln können, die eine erhöhte Resistenz vermitteln. Auf unbekanntem Weg kann ein solches Resistenzgen in eine Genkassette gelangen, die in ein Integron integriert wird. Dieses Integron kann nun in ein bereits bestehendes Transposon transponieren und ein Teil des Transposons werden. Das Transposon transponiert mit allen seinen Genen (inkl. des Integrons mit dem Resistenzgen) auf ein Plasmid, wodurch dieses zum Resistenz-Plasmid wird. Das Plasmid kann nun seinerseits durch Konjugation an andere Bakterien weitergegeben werden. Das Transposon kann dort durch Transposition auf andere Plasmide übertragen werden oder auch auf das Chromosom transponieren und integrieren, so dass das Resistenzgen wieder chromosomale Resistenz vermittelt. Anschließend kann durch Deletion der Transposon-Gene die Genstruktur optimiert werden.

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Bakterienstämme

2.1.1.1. Klinische Isolate

Bei den verwendeten Bakterienstämmen handelt es sich um *Escherichia-coli*-Isolate, die aufgrund verminderter Empfindlichkeit gegenüber Cephalosporinen von der Freien Universität Berlin zugesandt wurden (Tabelle 2.1).

Tab. 2.1 *Escherichia-coli*-Isolate

Stamm-Nr.	Labor-Nr.	Isolationsmaterial	Dauerkultur-Standort
1	A51993	Abstrich, Punktat	10-04-01
4	A03569	Abstrich, Punktat	10-04-02
18	A06439	Abstrich, Punktat	10-04-11
19	A66690	Abstrich, Punktat	10-04-12
24	U01602	Urin	10-04-17
29	U66881	Urin	10-04-19
30	A68031	Abstrich, Punktat	10-04-20
31	U01697	Urin	10-04-21
36	A08593	Abstrich, Punktat	10-04-29
38	A08651	Abstrich, Punktat	10-04-31
42	U02149	Urin	10-04-34
44	U69434	Urin	10-04-35
45	U02357	Urin	10-04-36
48	A73648	Abstrich, Punktat	10-04-38
49	U02812	Urin	10-04-39
50	U71550	Urin	10-04-40
51	A75089	Abstrich, Punktat	10-04-41

Fortsetzung Tab. 2.1 *Escherichia-coli*-Isolate

Stamm-Nr.	Labor-Nr.	Isolationsmaterial	Dauerkultur-Standort
53	A75512	Abstrich, Punktat	10-04-43
55	U03096	Urin	10-04-44
56	U03166	Urin	10-04-45
57	A75887	Abstrich, Punktat	10-04-46
58	U72456	Urin	10-04-47

2.1.1.2. Laborstämme

In Tabelle 2.2 sind *E.-coli*-Laborstämme dargestellt, die zur Konjugation und Transformation verwandt wurden.

Tab. 2.2 *E.-coli*-Laborstämme

Bakterienstamm	Charakteristika	Dauerkultur-Standort
<i>E. coli</i> JM109	<i>recA1 endA1 gyrA1 thi hsdR17(r_k⁻ m_k⁺) supE44 relA1 λ- Δ(lac-proAB) [F' tra36.proAB lacIqZΔM15]</i>	10-03-01
<i>E. coli</i> DH5α	<i>F φ80dlacZΔM15 Δ(lacZYA-argF)U169 deoR, recA1 endA1 hsdR17(r_k⁻ m_k⁺ phoA supE44 λ⁻ thi-1 gyrA96 relA1, Wirtsstamm für Transformationen</i>	10-03-17
<i>E. coli</i> W3110 lac ⁻ 3a	lac ⁻ , Rif ^R , Rezipient für Konjugationen	10-03-02
<i>E. coli</i> MC1061-4	<i>rpsL</i> (Str ^f), <i>hsdR</i> (r ⁻), Rif ^f , Rezipient für Konjugationen	10-03-13

2.1.1.3. Referenzstämme

In Tabelle 2.3 sind Isolate dargestellt, die als Kontrollen für MHK- und Generationszeit-Bestimmungen, sowie als Referenzen für Plasmid-, Gen- und Protein-Nachweise verwandt wurden.

Tab. 2.3 *E.-coli*-Referenzstämme

Bakterienstamm	Charakteristika	Dauerkultur-Standort
<i>E. coli</i> ATCC 25922	Kontrollstamm für MHK-Bestimmungen	04-10-03
<i>E. coli</i> WT	<i>E. coli</i> Wildtyp (klinisches Isolat ohne erworbene Resistenz), Kontrollstamm für Generationszeitbestimmungen	14-09-01
<i>E. coli</i> R27	trägt Referenzplasmid R27	10-04-63
<i>E. coli</i> V517	trägt 8 Referenzplasmide	10-04-64
<i>E. coli</i> JC2926 pBR322:Tn21	trägt Transposon Tn21 mit In2, Referenz für <i>int1</i> , <i>tnpA</i> , HgCl ₂ ^R ,	10-03-04
<i>E. coli</i> 76	Referenz für <i>bla</i> _{CMY-2} , HgCl ₂ ^R ,	10-03-08
<i>E. cloacae</i> 11.14	Referenz für AmpC	02-06-33
<i>P. aeruginosa</i>	Referenz für Pse-1 (=CARB-2)	04-03-13
<i>E. coli</i> W3110	Referenz für OXA-1	04-03-08
<i>E. coli</i> JM83 pBR322	Referenz für TEM-1	10-03-05

2.1.1.4. Konjuganten

In Tabelle 2.4 sind die in dieser Arbeit hergestellten Konjuganten dargestellt. Als Donor diente jeweils der *E.-coli*-Stamm 56, als Rezipient der *E.-coli*-Stamm MC1061-4 (vgl. 2.3.8.).

Tab. 2.4 *E.-coli*-Konjuganten

Bakterienstamm	Charakteristika	Dauerkultur-Standort
<i>E. coli</i> 56 Kan3	auf Kanamycin selektierter Konjugant	10-04-56
<i>E. coli</i> 56 Tet1	auf Tetracyclin selektierter Konjugant	10-04-57
<i>E. coli</i> 56 Amp16	auf Ampicillin selektierter Konjugant	10-04-59
<i>E. coli</i> 56 Chlor1	auf Chloramphenicol selektierter Konjugant	10-04-61

2.1.2. Chemotherapeutika

Zur Bestimmung der MHK-Werte nach dem Mikrodilutionsverfahren (vgl. 2.2.2.1.) wurden verschiedene Mikrotitrationsplatten der Firma MERLIN Diagnostika GmbH verwendet, die

Antibiotika in dehydratisierter Form enthalten. Dabei handelte es sich um die in Tabelle 2.5 angegebenen Substanzen.

Tab. 2.5 Auflistung der in den MICRONAUT-S-Platten enthaltenen Antibiotika

Antibiotika-Klasse	Antibiotikum
Penicilline	Amoxicillin
	Amoxicillin/Clavulansäure
	Ampicillin
	Ampicillin/Sulbactam
	Ampicillin/Tazobactam
	Piperacillin
	Piperacillin/Sulbactam
	Piperacillin/Tazobactam
	Ticarcillin
Cephalosporine	Cefazolin
	Cefepim
	Cefotaxim
	Cefotaxim/Clavulansäure
	Cefotetan
	Cefpodoxim-Proxetil
	Cefpodoxim/Clavulansäure
	Cefoxitin
	Ceftazidim
	Ceftazidim/Clavulansäure
	Ceftriaxon
	Cefuroxim
Monobactame	Aztreonam
Carbapeneme	Imipenem
	Meropenem
Aminoglycoside	Amikacin
	Apramycin
	Gentamicin
	Kanamycin
	Neomycin
	Netilmicin

Fortsetzung Tab. 2.5 Auflistung der in den MICRONAUT-S-Platten enthaltenen Antibiotika

Antibiotika-Klasse	Antibiotikum
Aminoglykoside (Fortsetzung)	Spectinomycin
	Streptomycin
	Tobramycin
Tetracycline	Doxycyclin
	Minocyclin
	Tetracyclin
Chinolone	Ciprofloxacin
	Enoxacin
	Fleroxacin
	Norfloxacin
	Ofloxacin
	Pefloxacin
	Pipemidsäure
	Sparfloxacin
Antifolate	Cotrimoxazol
	Sulfmethoxazol
	Trimethoprim
sonstige	Chloramphenicol
	Dalfopristin
	Fosfomycin
	Fusidinsäure
	Nitrofurantoin
	Quinupristin
	Rifampicin
	Teicoplanin
	Vancomycin

In Tabelle 2.6 sind unter Angabe der Bezugsquelle Chemotherapeutika aufgelistet, die zusätzlich verwendet wurden.

Tab. 2.6 Chemotherapeutika

Chemotherapeutikum	Bezugsquelle
Amikacin	Bristol-Myers Squibb GmbH, Regensburg
Ampicillin	Grünenthal GmbH, Stolberg
Chloramphenicol	Boehringer GmbH, Mannheim
Florfenicol	Schering-Plough (China) Ltd, Shanghai, China
Gentamicin	Merck KGaA, Darmstadt
Kanamycin	Ursapharm GmbH, Bübingen
Netilmicin	Schering Corporation, Bloomfield, USA
Nitrocefin	Oxoid LTD, Basingstoke, England
Rifampicin	Grünenthal GmbH, Stolberg
Streptomycin	Hoechst AG, Frankfurt a.M.
Tetracyclin	Hoechst AG, Frankfurt a.M.
Tobramycin	Eli Lilly GmbH, Giessen
Trimethoprim	Hoffmann-La Roche AG, Grenzach-Wyhlen

2.1.3. Chemikalien und sonstige Materialien

Tabelle 2.7 zeigt die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien und sonstigen Materialien.

Tab. 2.7 Chemikalien und sonstige Materialien

Chemikalien	Hersteller
Acrylamid/Bisacrylamid	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Agar	Merck KGaA, Darmstadt
Agarose	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Agarose, SeaKem ^R LE	Cambrex BioScience, Rockland, USA
Agarose, Small DNA	Biozym GmbH, Hess. Ollendorf
Ammoniumpersulphat (APS)	Bio-Rad Lab., München
Borsäure	Merck KGaA, Darmstadt
Bromphenolblau	Merck KGaA, Darmstadt
BSA (Rinderserumalbumin)	Serva GmbH, Heidelberg
Chloroform	Merck KGaA, Darmstadt
Coomassie-Brilliant-Blau G-250	Merck KGaA, Darmstadt
Criterion-Gel (3% Polyacrylamid, 2% Ampholyte, pH 3-10)	Bio-Rad Lab., München

Fortsetzung Tab. 2.7 Chemikalien und sonstige Materialien

Chemikalien	Hersteller
Dinatriumhydrogenphosphat	Merck KGaA, Darmstadt
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Fluka (Sigma-Aldrich GmbH, Seelze)
dNTPs	Promega Corporation, Madison, USA
dNTPs	PeqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen
DyeEx™ Spin Kit 2.0	Qiagen GmbH, Hilden
Essigsäure	Riedel-de Haen (Sigma-Aldrich GmbH, Seelze)
Ethanol	Merck KGaA, Darmstadt
Ethidiumbromid	Biomol GmbH, Hamburg
Ethidiumbromid	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Filterpapier	Schleicher und Schüll, Dassel
Folin-Ciocalteu-Phenolreagenz	Merck KGaA, Darmstadt
Glucose	Merck KGaA, Darmstadt
Glycerin	Merck KGaA, Darmstadt
n-Hexan	Merck KGaA, Darmstadt
HiSpeed™ Plasmid Purification Kit	Qiagen GmbH, Hilden
IEF Standard, Broad Range pI 4,45-9,6	Bio-Rad Lab., München
Indol-Reagenz	MERLIN Diagnostika GmbH, Bornheim
Isopropanol	Riedel-de Haen, Seelze
Kaliumacetat	Merck KGaA, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck KGaA, Darmstadt
Kalium-Natrium-Tartrat	Merck KGaA, Darmstadt
Kupfersulfat-Pentahydrat	Merck KGaA, Darmstadt
Magnesiumchlorid für PCR	Promega Corporation, Madison, USA
Magnesiumchlorid für PCR	Sigma, St. Louis, USA
Magnesiumsulphat	Merck KGaA, Darmstadt
MC-207,110 (Phe-Arg-β-Naphtylamid)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
MCN-E-Identifizierungsplatte	MERLIN Diagnostika GmbH, Bornheim
Methanol	Merck KGaA, Darmstadt
MinElute PCR Aufreinigungskit	Qiagen GmbH, Hilden
Mineralöl	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Mitsubishi Thermo Papier K61B	Mitsubishi Electric Corporation, Japan
Natriumacetat	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumcarbonat	Merck KGaA, Darmstadt

Fortsetzung Tab. 2.7 Chemikalien und sonstige Materialien

Chemikalien	Hersteller
Natriumchlorid	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumhydroxid	Merck KGaA, Darmstadt
Parafilm	American National Can™, Menasha, USA
Parafinöl	MERLIN Diagnostika GmbH, Bornheim
n-Pentan	Merck KGaA, Darmstadt
Phenol	Merck KGaA, Darmstadt
Phosphorsäure	Merck KGaA, Darmstadt
Proteinmarker, Prestained Broad Range	New England Biolabs GmbH, Frankfurt a.M.
Quecksilber(II)chlorid	Riedel-de-Haen AG, Seelze
QIAquick PCR Aufreinigungskit	Qiagen GmbH, Hilden
SDS	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Sterilfilter	Pall Corporation, Ann Arbor, USA
Sterilfilter	Schleicher & Schüll GmbH, Daßel
TDA-Reagenz	MERLIN Diagnostika GmbH, Bornheim
TEMED	Bio-Rad Lab., München
Titriplex III (EDTA)	Merck KGaA, Darmstadt
Triton-X-100	Fluka (Sigma-Aldrich GmbH, Seelze)
Trizma Hydrochlorid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Trizma Base	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Xylencyanol	Fluka AG, Buchs, Schweiz
Wasser, HPLC rein	Merck KGaA, Darmstadt

2.1.4. Enzyme

In Tabelle 2.8 sind die verwendeten Enzyme aufgeführt. Die Puffer für die Enzyme werden von den Firmen in 10x Konzentration mitgeliefert und wurden laut Herstellerangabe verwendet.

Tab. 2.8 Verwendete Enzyme

Enzym	Hersteller
BamHI	New England Biolabs GmbH, Frankfurt a.M.
REDTaq™ DNA Polymerase	Sigma, St. Louis, USA
RNase A	Sigma, Deisenhofen
Taq DNA Polymerase	Promega Corporation, Madison, USA

2.1.5. Geräte

In Tabelle 2.9 sind die in dieser Arbeit verwendeten Geräte aufgeführt.

Tab. 2.9 Geräte

Gerät	Hersteller
ABI PRISM™ 310 Genetic Analyser	Perkin Elmer Corporation, Foster City, USA
Analog pH-Meter CG711	Schott, Hofheim
Biofuge A	Heraeus Holding GmbH, Osterode
Biofuge 28RS, Rotoren 3042, 3746, 3751	Heraeus Holding GmbH, Osterode
Brutschrank	Heraeus Holding GmbH, Osterode
Criterion Gelkammer	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
DNA-Synthesizer 391	Perkin Elmer Corporation, Foster City, USA
Electrophoresis Power Supply	LKB Pharmacia, Freiburg
Electrophoresis Power Supply	Gibco/BRL, Eggenstein
Electrophoresis Power Supply PowerPac 200	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Elektroporationsgerät MicroPulser™	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Eppendorf MiniSpin	Eppendorf AG, Hamburg
Gelelektrophorese-Apparaturen Typ 30015 und 300413	Renner, Darmstadt
iCycler	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Kühlzentrifuge J2-21, Rotoren JA-20 und JA-21	Beckmann Instruments GmbH, München
Labsystems Multiskan Multisoft ^R Photometer	Labsystems Oy, Helsinki, Finnland
Mini-Protean-III-Gelkammer	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
PCR Uno-Thermoblock	Biometra GmbH, Göttingen
Reinstwasseranlage Easy Pure LF [®]	Barnstead, Dubuque, USA
Rollinkubator	Schütt, Göttingen
Scanner Agfa e40	Agfa-Gevaert, Leverkusen
Schüttelinkubator Certomat	Braun Biotech, Melsungen
Schüttelinkubator Serie 25	New Brunswick Scientific Co., N.J., USA
Spectralphotometer 150-20	Hitachi Ltd, Tokyo, Japan

Fortsetzung Tab. 2.9 Geräte

Gerät	Hersteller
Spectrophotometer Novaspec ^R II	Pharmacia Biotech, Freiburg
Speed Vac SPD101B	Savant, Farmingdale, USA
Thermocycler 9700	Perkin Elmer Corporation, Foster City, USA
Ultraschallprozessor UP 50H	Dr. Hielscher GmbH, Teltow
UV-Bank	Biometra GmbH, Göttingen
Videodokumentationsanlage mit Programm WINCAM, Ver. 2.2 und Drucker	INTAS, Göttingen Cybertec, Berlin (über INTAS) Mitsubishi, Japan

2.1.6. Nährmedien

In Tabelle 2.10 sind die verwendeten Nährmedien aufgelistet. Diese wurden entsprechend der Herstellerangaben eingewogen, in Aqua dem. gelöst und 15 Minuten bei 121°C autoklaviert. Eine Ausnahme bildet der direkt anwendbare, vorgefertigte Columbia-Agar.

Tab. 2.10 Nährmedien

Medium	Bezugsquelle bzw. Herstellungsvorschrift
Caso-Agar	Merck KgaA, Darmstadt
Chinablau-Lactose-Agar	OXOID LTD, Basingstoke, England
Columbia-Agar mit Schafblut ^{Plus}	OXOID LTD, Basingstoke, England
LB-Agar	1% (Gewicht/Volumen) Trypton, 0,5% Hefeextrakt, 1% NaCl, 1,3% Agar Agar
LBGMg-Agar	1% Trypton, 0,5% Hefeextrakt, 1% NaCl, 0,1% Glucose, 10 mM MgSO ₄ , 1,3% Agar Agar
LB-Medium	1% Trypton, 0,5% Hefeextrakt, 1% NaCl
LBGMg-Medium	1% Trypton, 0,5% Hefeextrakt, 1% NaCl, 0,1% Glucose, 10 mM MgSO ₄
BBL TM Mueller Hinton II Agar	Becton, Dickinson & Co., Sparks, USA
BBL TM Mueller Hinton II Bouillon	Becton, Dickinson & Co., Sparks, USA
Standard-No.I-Nähragar	Merck KgaA, Darmstadt
Standard-No.I-Nährbouillon	Merck KgaA, Darmstadt
SOC-Medium	2% Trypton, 0,5% Hefeextrakt, 10 mM MgSO ₄ , 10 mM MgCl ₂ , 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 20 mM Glucose

2.1.7. Nukleinsäuren

2.1.7.1. Oligonukleotide

Die in dieser Arbeit als Amplifikationsprimer eingesetzten Desoxyoligonukleotide sind in Tabelle 2.11 aufgelistet. Sie wurden zum Teil mit dem DNA-Synthesizer, Modell 391, PCR-Mate hergestellt, zum Teil von Sigma-Ark oder Qiagen-Operon bezogen.

Tab. 2.11 Oligonukleotide

Bezeichnung	Funktion	Sequenz 5' -> 3'	Herkunft
OT3	<i>bla</i> _{TEM} -Nachweis und -Sequenzierung	ATGAGTATTCAACATTTCCG	Arlet et al., 1995
OT4	<i>bla</i> _{TEM} -Nachweis und -Sequenzierung	CCAATGCTTAATCAGTGAGG	Arlet et al., 1995
TEM T1	<i>bla</i> _{TEM} -Nachweis und -Sequenzierung	ATTCTTGAAGACGAAAGGGCCTC	Wiegand, pers. Mitteilung
TEM T2	<i>bla</i> _{TEM} -Nachweis und -Sequenzierung	CGCAACGTTGTTGCCATTGCTG	Wiegand, pers. Mitteilung
TEM T3	<i>bla</i> _{TEM} -Nachweis und -Sequenzierung	TTGGTCTGACAGTTACCAATGC	Wiegand, pers. Mitteilung
NI1	<i>bla</i> _{SHV} -Nachweis und -Sequenzierung	GCCCCGGTTATTCTTATTTGTCGC	Nüesch-Inderbinen et al., 1996
NI2	<i>bla</i> _{SHV} -Nachweis und -Sequenzierung	TCTTTCCGATGCCGCCAGTCA	Nüesch-Inderbinen et al., 1996
AmpC H-1	Sequenzierung des <i>E. coli ampC</i> -Promotors	CTACGGTCTGGCTGCTA	Nelson und Gay Elisha, 1999
AmpC H-2	Sequenzierung des <i>E. coli ampC</i> -Promotors	TGGAGCAAGAGGCGGTA	Nelson und Gay Elisha, 1999
AmpC CR4	Sequenzierung des <i>E. coli ampC</i> -Promotors	TTATCCGTGACCTCATCCGGTACC	Wiegand, 2001
AmpC P-1	<i>ampC</i> -Nachweis und -Sequenzierung	GGATTCCGGGTATGGCSGTNGC	Sherwood, 2000
AmpC P-2	<i>ampC</i> -Nachweis und -Sequenzierung	TGGCCAAAMAGRCCDATGCTGG	Sherwood, 2000
AmpC P-4	<i>ampC</i> -Nachweis und -Sequenzierung	TCCCAGCCTARYCCCTGRTACAT	Sherwood, 2000
AmpC C1	<i>ampC</i> _{Citrobacter} -Nachweis und -Sequenzierung	ATGATGAAAAATCGTTATGC	Koeck et al., 1997
AmpC C2	<i>ampC</i> _{Citrobacter} -Nachweis und -Sequenzierung	TTGCAGCTTTTCAAGAATGCGC	Koeck et al., 1997
CTX-MA	CTX-M-Nachweis	CGCTTTGCGATGTGCAG	Bonnet et al., 2001
CTX-MB	CTX-M-Nachweis	ACCGCGATATCGTTGGT	Bonnet et al., 2001
GyrA 3-1	Sequenzierung des <i>gyrA</i> -Gens	GGAATTTTGGTTGGCATGACGTCCGGA	Abu Mraheil, 1999
GyrA 5-1	Sequenzierung des <i>gyrA</i> -Gens	GAATCCGGGATACAGTAGAGGGATAG	Abu Mraheil, 1999
ParC S	Sequenzierung des <i>parC</i> -Gens	GTATGCGATGTCTGAACTGGGCCTG	Heisig, 1996
ParC U	Sequenzierung des <i>parC</i> -Gens	ACCGGGATTCCGGTGTAACGCATTGC	Heisig, 1996
ORAB2	Sequenzierung des <i>marOR</i> -Genbereichs	GGACTGCAG-GCTAGCCTTGCATCGCAT	Maneewannakul und Levy, 1996

Fortsetzung Tab. 2.11 Oligonukleotide

Bezeichnung	Funktion	Sequenz 5' -> 3'	Herkunft
RK3	Sequenzierung des <i>marOR</i> -Genbereichs	TCTTGAATTC- TTACGGCAGGACTTTCTTAAG	Maneewannakul und Levy, 1996
marO	Sequenzierung des <i>marOR</i> -Genbereichs	GCTAGCCTTGCATCGCATTG	Diese Arbeit
marR	Sequenzierung des <i>marOR</i> -Genbereichs	TTACGGCAGGACTTTCTTAAG	Diese Arbeit
IS1-F	<i>IS1</i> -Nachweis	TTAAAAAACTCAGGCCGAGTCG	Diese Arbeit
IS1-R	<i>IS1</i> -Nachweis	ATTCATAMAGCGGCCAGCCATC	Diese Arbeit
Tn21 T-1	<i>tnpA</i> -Nachweis und -Sequenzierung	GGTGAARATCACBCCGCTGGA	Sherwood, 2000
Tn21 T-2	<i>tnpA</i> -Nachweis und -Sequenzierung	GAAGCCKGCSGTRTCGGTGTA	Sherwood, 2000
Tn3 T-4	<i>tnpA</i> -Nachweis	GGCCCTGTKAYVRTCAGTGG	Sherwood, 2000
Tn3 T-5	<i>tnpA</i> -Nachweis	GTTCCAGRCCGRTRTRCAGGC	Sherwood, 2000
Tn3 T-6	<i>tnpA</i> -Nachweis	GTGACRAAGCGCATKCCRTC	Sherwood, 2000
tnpR-F	<i>tnpR</i> -Nachweis und -Sequenzierung	CGTGGTGGTGCAAYAGCATGG	Diese Arbeit
tnpR-R	<i>tnpR</i> -Nachweis und -Sequenzierung	CGCGGATCAGGGCGCGCTCG	Diese Arbeit
merA-F	<i>merA</i> -Nachweis und -Sequenzierung	ACCATCGGCGGCACCTGCGT	Bass et al., 1999
merA-R	<i>merA</i> -Nachweis und -Sequenzierung	ACCATCGTCAGGTAGGGGAACA	Bass et al., 1999
merR-F	<i>merR</i> -Nachweis und -Sequenzierung	TAYGCCAGCATYCGCCGCTATGG	Diese Arbeit
merR-R	<i>merR</i> -Nachweis und -Sequenzierung	TCGCGCACRTCCTBRAGCTTGTG	Diese Arbeit
int1-F	<i>int1</i> -Nachweis und -Sequenzierung	CCTCCCGCACGATGATC	Goldstein et al., 2001
int1-R	<i>int1</i> -Nachweis und -Sequenzierung	TCCACGCATCGTCAGGC	Goldstein et al., 2001
int2-F	<i>int2</i> -Nachweis	TTATTGCTGGGATTAGGC	Goldstein et al., 2001
int2-R	<i>int2</i> -Nachweis	ACGGCTACCCTCTGTTATC	Goldstein et al., 2001
int3-F	<i>int3</i> -Nachweis	AGTGGGTGGCGAATGAGTG	Goldstein et al., 2001
int3-R	<i>int3</i> -Nachweis	TGTTCTTGTATCGGCAGGTG	Goldstein et al., 2001
5'CS	Gen-Kassetten-Nachweis und -Sequenzierung	GGCATCCAAGCAGCAAG	Levesque et al., 1995
3'CS	Gen-Kassetten-Nachweis und -Sequenzierung	AAGCAGACTTGACCTGA	Levesque et al., 1995
Pant-F	Gen-Kassetten - Sequenzierung	GTGGAAACGGATGAAGGCACG	Sandvang, 1999
qacEA1-F	<i>qacEA1</i> -Nachweis	ATCGCAATAGTTGGCGAAGT	Sandvang et al., 1997
qacEA1-B	<i>qacEA1</i> -Nachweis	CAAGCTTTTGCCCATGAAGC	Sandvang et al., 1997
sul1-F	<i>sul1</i> -Nachweis	CTTCGATGAGAGCCGCGGCC	Sandvang et al., 1997
sul1-B	<i>sul1</i> -Nachweis	GCAAGGCGGAAACCCGCGCC	Sandvang et al., 1997
sulII-F	<i>sulII</i> -Nachweis	ACAGTTTCTCCGATGGAGGCC	Kehrenberg und Schwarz, 2001a
sulII-R	<i>sulII</i> -Nachweis	CTCGTGTGTGCGGATGAAGTC	Kehrenberg und Schwarz, 2001a

Fortsetzung Tab. 2.11 Oligonukleotide

Bezeichnung	Funktion	Sequenz 5' -> 3'	Herkunft
tet(A)-F	<i>tet(A)</i> -Nachweis und -Sequenzierung	GCTACATCCTGCTTGCCTTC	Ng et al., 2001
tet(A)-F2	<i>tet(A)</i> -Sequenzierung	CCTCTTACGGCGATCTATG	Diese Arbeit
tet(A)-F3	<i>tet(A)</i> -Sequenzierung	GCTTCTATAACAACGTGGAACG	Diese Arbeit
tet(A)-R	<i>tet(A)</i> -Nachweis und -Sequenzierung	CATAGATCGCCGTGAAGAGG	Ng et al., 2001
tetR(A)-F	<i>tetR(A)</i> -Nachweis	CCATCGACAACACTACCGCGAG	Diese Arbeit
tetR(A)-R	<i>tetR(A)</i> -Nachweis	GACGCCGTCAATGCGCTGATG	Diese Arbeit
tet(B)-F	<i>tet(B)</i> -Nachweis	TTGGTTAGGGGCAAGTTTTG	Ng et al., 2001
tet(B)-R	<i>tet(B)</i> -Nachweis	GTAATGGGCCAATAACACCG	Ng et al., 2001
tet(C)-F	<i>tet(C)</i> -Nachweis	CTTGAGAGCCTTCAACCCAG	Ng et al., 2001
tet(C)-R	<i>tet(C)</i> -Nachweis	ATGGTCGTCATCTACCTGCC	Ng et al., 2001
tet(D)-F	<i>tet(D)</i> -Nachweis	AAACCATTACGGCATTCTGC	Ng et al., 2001
tet(D)-R	<i>tet(D)</i> -Nachweis	GACCGGATACACCATCCATC	Ng et al., 2001
tet(E)-F	<i>tet(E)</i> -Nachweis	AAACCACATCCTCCATACGC	Ng et al., 2001
tet(E)-R	<i>tet(E)</i> -Nachweis	AAATAGGCCACAACCGTCAG	Ng et al., 2001
tet(G)-F	<i>tet(G)</i> -Nachweis	GCTCGGTGGTATCTCTGCTC	Ng et al., 2001
tet(G)-R	<i>tet(G)</i> -Nachweis	AGCAACAGAATCGGGAACAC	Ng et al., 2001
CAT I-F	<i>catI</i> -Nachweis	GGCATTTCAGTCAGTTG	Vassort-Bruneau et al., 1996
CAT I-R	<i>catI</i> -Nachweis	CCGCCCTGCCACTCATC	Vassort-Bruneau et al., 1996
CAT II-F	<i>catII</i> -Nachweis	CCTGGAACCGCAGAGAAC	Vassort-Bruneau et al., 1996
CAT II-R	<i>catII</i> -Nachweis	CCTGCTGAAACTTTGCCA	Vassort-Bruneau et al., 1996
CAT III-F	<i>catIII</i> -Nachweis	ATTGGGTTCCGCCGTGAGC	Vassort-Bruneau et al., 1996
CAT III-R	<i>catIII</i> -Nachweis	AGTCTATCCCCTTCTTG	Vassort-Bruneau et al., 1996
catB-FA	<i>catB</i> -Nachweis	TAYAGCTAYTAYTCYGGYTAYTAYC	Diese Arbeit
catB-FB	<i>catB</i> -Nachweis	TTYATBATGGCBGGBAATCARGGNC	Diese Arbeit
catB-RC	<i>catB</i> -Nachweis	GARCCDATCCAVACRTCATKDCC	Diese Arbeit
catB-RD	<i>catB</i> -Nachweis	GAYBCCRGGCATDAHSATNGCCTC	Diese Arbeit
cml-F	<i>cml</i> -Nachweis	CCGCCACGGTGTTGTTGTTATC	Keyes et al., 2000
cml-R	<i>cml</i> -Nachweis	CACCTTGCTGCCCATCATTAG	Keyes et al., 2000
flo-F	<i>flo</i> -Nachweis und -Sequenzierung	TATCTCCCTGTCGTTCCAG	Keyes et al., 2000
flo-F2	<i>flo</i> -Sequenzierung	GYGAYACAGCGTGGCCCCGTG	Diese Arbeit
flo-R	<i>flo</i> -Nachweis und -Sequenzierung	AGAACTCGCCGATCAATG	Keyes et al., 2000
flo-R2	<i>flo</i> -Sequenzierung	GGCCTGCTACCAGTCGTCGG	Diese Arbeit
orfA-F1	<i>orfA</i> -Nachweis	CGGGATCGGGATACTGGTCCG	Diese Arbeit
orfA-F2	<i>orfA</i> -Nachweis	CGACGGTGTGTATGTCGAGC	Diese Arbeit
orfA-R	<i>orfA</i> -Nachweis	CAAACAGACCCAGGAGCAGC	Diese Arbeit
orf4-F	<i>orf4</i> -Nachweis	GCAACAAGTCCGCGAAGCC	Diese Arbeit
orf4-R	<i>orf4</i> -Nachweis	GCACGGTTCGGTAAACTTG	Diese Arbeit
aph(3)-Ia-F	<i>aph(3)-Ia</i> -Nachweis und -Sequenzierung	TTATGCCTCTTCCGACCATC	Ng et al., 1999
aph(3)-Ia-R	<i>aph(3)-Ia</i> -Nachweis und -Sequenzierung	GAGAAAACCTACCGAGGCAG	Ng et al., 1999
aac(3)-Ia-F	<i>aac(3)-Ia</i> -Nachweis	ACCTACTCCCAACATCAGCC	Choi et al., 2002
aac(3)-Ia-R	<i>aac(3)-Ia</i> -Nachweis	ATATAGATCTCACTACGCGGT	Choi et al., 2002
aac(3)-IIc-F	<i>aac(3)-IIc</i> -Nachweis und -Sequenzierung	ACTGTGATGGGATACGCGTC	Choi et al., 2002

Fortsetzung Tab. 2.11 Oligonukleotide

Bezeichnung	Funktion	Sequenz 5'→3'	Herkunft
aac(3)-IIC-R	<i>aac(3)-IIC</i> -Nachweis und -Sequenzierung	CTCCGTCAGCGTTTCAGCTA	Choi et al., 2002
aac(3)-IVa-F	<i>aac(3)-IVa</i> -Nachweis und -Sequenzierung	CTTCAGGATGGCAAGTTGGT	Choi et al., 2002
aac(3)-IVa-R	<i>aac(3)-IVa</i> -Nachweis und -Sequenzierung	TCATCTCGTTCTCCGCTCAT	Choi et al., 2002
aac(6')-Ib-F	<i>aac(6')-Ib</i> -Nachweis und -Sequenzierung	TATGAGTGGCTAAATCGAT	Choi et al., 2002
aac(6')-Ib-R	<i>aac(6')-Ib</i> -Nachweis und -Sequenzierung	CCCCTTTTCTCGTAGCA	Choi et al., 2002
ant(2'')-Ia-F	<i>ant(2'')-Ia</i> -Nachweis	ACACAACGCAGGTCACA	Choi et al., 2002
ant(2'')-Ia-R	<i>ant(2'')-Ia</i> -Nachweis	CATGCGAGCCTGTAGGA	Choi et al., 2002
ant(4')-IIa-F	<i>ant(4')-IIa</i> -Nachweis	ATCGATCGTCTGCGAGA	Choi et al., 2002
ant(4')-IIa-R	<i>ant(4')-IIa</i> -Nachweis	CGACCAGACCCATGCA	Choi et al., 2002
aac(6')-II-F	<i>aac(6')-II</i> -Nachweis	CCSCACATHGTYGARTGGTGGGG	Diese Arbeit
aac(6')-II-R	<i>aac(6')-II</i> -Nachweis	GCCTTCTCRTAGCAGCGWATGGC	Diese Arbeit
strA-F	<i>aph(3'')-I</i> -Nachweis	TGACTGGTTGCCTGTCAGAGG	Kehrenberg und Schwarz, 2001a
strA-R	<i>aph(3'')-I</i> -Nachweis	CCAGTTCTCTTCGGCGTTAGCA	Kehrenberg und Schwarz, 2001a
strB-F	<i>aph(6)-I</i> -Nachweis	ATCGTCAAGGGATTGAAACC	Gebreyes und Altier, 2002
strB-R	<i>aph(6)-I</i> -Nachweis	GGATCGTAGAACATATTG	Gebreyes und Altier, 2002
qnr-F	<i>qnr</i> -Nachweis	GGGTATGGATATTATTGATAAAG	Wang et al., 2003
qnr-R	<i>qnr</i> -Nachweis	CTAATCCGGCAGCACTATTA	Wang et al., 2003

IUB-Code gemischter Basen: M = A+C; S = G+C; R = A+G; Y = C+T; W = A+T; K = G+T; V = A+G+C; H = A+C+T; D = A+G+T; B = G+C+T; N = A+T+C+G

2.1.7.2. DNA-Größenmarker

In Tabelle 2.12 sind die in dieser Arbeit verwendeten DNA-Größenmarker aufgelistet.

Tab. 2.12 DNA-Größenmarker

Größenmarker	Hersteller
100-bp-Leiter	Gibco/BRL, Eggenstein, Deutschland
Smart Ladder	Eurogentec, Seraing, Belgien
Smart Ladder SF (Small Fragment)	Eurogentec, Seraing, Belgien

2.1.8. Puffer und Lösungen

Die verwendeten Puffer und Lösungen sind in Tabelle 2.13 aufgeführt

Tab. 2.13 Puffer und Lösungen

Lösung bzw. Puffer	Zusammensetzung / Hersteller
Beschwererlösung (für DNA-Gelelektrophorese)	0,25% Bromphenolblau, 0,25% Xylencyanol, 15% Ficoll
Coomassie-Färbelösung	0,1% Coomassie-Brilliant-Blau G-250, 25% Methanol, 10% Essigsäure
Coomassie-Entfärbelösung	40% Methanol, 10% Essigsäure
Elektrophoresepuffer für SDS-PAGE	25 mM Tris, 250 mM Glycin, 0,1% SDS
<u>Isoelektrische Fokussierung</u>	
Kathodenpuffer	20 mM Lysin, 20 mM Arginin (Bio-Rad Lab., München)
Anodenpuffer	7 mM Phosphorsäure
Nitrocefin-Lösung	5 mg Nitrocefin in 0,5 ml DMSO, ad 10 ml mit 0,1 M Sörensen-Phosphatpuffer
<u>PCR Purification Kit</u>	Qiagen GmbH, Hilden
QG-Puffer	Lösungspuffer
PB-Puffer	Bindungspuffer
PE-Puffer	Waschpuffer
EB-Puffer	Elutionspuffer (10 mM Tris, pH 8,5)
<u>Plasmid-Präparation-Puffer</u>	
Pub 1	20 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0), 25 ml 1 M Tris (pH 8,0), ad 1000 ml mit Bidest, autoklavieren; 23 ml 40% sterile Glucose, 5 ml RNase A (10mg/ml)
Pub 2 (frisch angesetzt)	4,4 ml Bidest, 100 µl 10 N NaOH, 500 µl 10% SDS
Pub 3	60 ml 5M K-Acetat, 11,5 ml Eisessig, 28,5 ml Bidest
<u>Plasmid-Präparations Kit</u>	Qiagen GmbH, Hilden
Puffer P1 (Resuspensionspuffer)	100 mg/ml RNase A, 50 mM Tris/HCl, 10 mM EDTA pH 8,0
Puffer P2 (Lysispuffer)	200 mM NaOH, 1% SDS
Puffer P3 (Neutralisationspuffer)	3 M K-Acetat pH 5,5
QBT (Äquilibrationspuffer)	750 mM NaCl, 50 mM MOPS pH 7,0, 15% Isopropanol, 0,15% Triton-X-100
QC (Waschpuffer)	1 M NaCl, 50 mM MOPS pH 7,0, 15% Isopropanol, 0,15% Triton-X-100
QF (Elutionspuffer)	1,25 M NaCl, 50 mM TrisHCl pH 8,5, 15% Isopropanol, 0,15% Triton-X-100

Fortsetzung Tab. 2.13 Puffer und Lösungen

Lösung bzw. Puffer	Zusammensetzung / Hersteller
Probenpuffer für Proteine (SDS-PAGE)	62,5 mM TrisHCl pH 6,8; 25% Glycerin, 2% SDS, 0,01% Bromphenolblau
<u>Proteinbestimmung nach Lowry:</u>	
Alkalisches Kupferreagenz	2% Lsg. A, 2% Lsg. B, 96% Lsg. C
Lösung A	3% Na ₂ CO ₃ in 0,1 M NaOH
Lösung B	2% CuSO ₄ x H ₂ O
Lösung C	4% K-Na-Tartrat
<u>Puffer für Proteingele</u>	
Puffer 1 (Lower Tris)	1,5 M TrisHCl; pH 8,8
Puffer 2 (Upper Tris)	0,5 M TrisHCl; pH 6,8
<u>Sequencer Kit</u>	Perkin Elmer Corporation, Foster City, USA
ABI PRISM [®] BigDye [™]	AmpliTaq [®] DNA Polymerase, FS; fluoreszenzmarkierte
Terminator Cycle Sequencing	Didesoxynucleotide; Desoxynucleotide; MgCl ₂ Tris/HCl,
Ready Reaction Mix	pH 9,0
Template supression reagent	PE Applied Biosystems, Foster City, USA
POP 6	PE Applied Biosystems, Foster City, USA
Sequenzierpuffer	PE Applied Biosystems, Foster City, USA
0,1 M Sörensen-Puffer	0,1 M Na ₂ HPO ₄ , 0,1 M KH ₂ PO ₄ ; pH 8,0
STE-Puffer	0,1 M NaCl, 10 mM Tris/HCl pH 8,0; 1 mM EDTA pH 8,0
TAE-Puffer	40 mM Tris-Acetat, 1 mM EDTA pH 8,0
TBE-Puffer, 5x	54,5 g Tris, 27,5 g Borsäure, 3,7 g EDTA, ad 1000 ml mit Bidest ; pH 8,3
TE-Puffer	10 mM Tris/HCl, 1 mM EDTA pH 8,0

2.2. Mikrobiologische Methoden

2.2.1. Identifizierung

Die Identifizierung der Bakterienstämme erfolgte mittels eines kommerziellen Identifizierungs-Systems der Firma MERLIN Diagnostika GmbH, Bornheim. Verwendet wurden Mikrotitrationsplatten des Typs MICRONAUT-E, die für die Identifizierung von Enterobacteriaceae-Taxa und anderen Gram-negativen, Oxidase-negativen Bakterien vorgesehen sind. Die Identifizierung basiert auf 21 unterschiedlichen biochemischen Reaktionen, deren Nachweis über Säure-Indikatoren, Trübung, oder chromogene Substrate erfolgt.

Einzelne Kolonien einer 18-24 Stunden alten Bakterienkultur auf Mueller Hinton II Agar wurden in physiologischer Kochsalzlösung suspendiert, die optische Dichte wurde auf den McFarland-Standard 0,5 ($OD_{560} = 0,120 \pm 0,02$) eingestellt, was einer Keimzahl von ca. 10^8 KBE/ml entspricht. Die Mikrotitrationsplatten wurden mit 100 μ l der Bakteriensuspension pro Vertiefung beimpft. H₂S-Teste (einschl. Kontrollen) enthaltende Vertiefungen wurden mit Parafinöl überschichtet und die Platten anschließend bei 37°C für 18 bis 24 h bebrütet. Nach der Inkubation wurde einzelnen Reaktionen Indol- bzw. TDA-Reagenz zugefügt (Nachweis der β -Glucosidase, bzw. der Tryptophan-Desaminase). Vor dem Ablesen der Mikrotitrationsplatten wurde zur Farbentwicklung mindestens zwei, aber höchstens 30 min gewartet. Die Platten wurden mit dem Multiskan Multisoft^R Photometer abgelesen und über die zugehörige MCN-Computersoftware (Demos Computer, Köln) ausgewertet.

2.2.2. Testung der Antibiotika-Empfindlichkeit

2.2.2.1. Das Mikrodilutionsverfahren

Als Maß für die Antibiotika-Empfindlichkeit wurde die Minimale Hemmkonzentration (MHK) herangezogen, die mit dem Mikrodilutionsverfahren bestimmt wurde. Als MHK bezeichnet man die geringste Konzentration eines Antibiotikums, bei der unter standardisierten Bedingungen kein sichtbares Wachstum des Mikroorganismus erfolgt.

Zur Bestimmung der MHK dienten MICRONAUT-S-Mikrotitrationsplatten der Firma MERLIN Diagnostika GmbH (Bornheim), die Antibiotika in dehydratisierter Form enthielten, welche durch Zugabe einer Bakteriensuspension rehydratisiert wurden.

Für die Durchführung des Tests wurden Kolonien einer 18-24 Stunden alten Agar-Platte in physiologischer Kochsalzlösung suspendiert. Die optische Dichte wurde auf den McFarland-Standard 0,5 ($OD_{560} = 0,120 \pm 0,02$) eingestellt. 50 μ l dieser Bakteriensuspension wurden mit 10 ml Mueller-Hinton-Bouillon gut vermischt. Der Beimpfung der Testplatte mit je 100 μ l dieses Ansatzes pro Vertiefung folgte deren Inkubation für 18-24 h bei 37°C. Die Auswertung erfolgte visuell.

2.2.2.2. Bestimmung der Quecksilber(II)-Resistenz

Zur Bestimmung der Quecksilber(II)-Resistenz wurden Mueller Hinton II Agar-Platten mit jeweils 10 μ g/ml oder 20 μ g/ml $HgCl_2$ gegossen und die zu untersuchenden Stämme darauf ausgestrichen. Als Negativ-Kontrollen dienten die *E.-coli*-Stämme JM109 und ATCC 25922, als Positiv-Kontrollen die Stämme 76 und JC2926 pBR322:Tn21. Von allen Stämmen wurde parallel ein McFarland-Standard 0,5 ($OD_{560} = 0,120 \pm 0,02$) in physiologischer Kochsalzlösung eingestellt. Je 50 μ l dieser Bakteriensuspensionen wurden ebenfalls auf Mueller Hinton II Agar-Platten mit jeweils 10 μ g/ml oder 20 μ g/ml $HgCl_2$ ausgestrichen. Ein Resistenz-Phänotyp wurde bei solchen Stämmen festgestellt, die auf 10 oder 20 μ g/ml $HgCl_2$ wuchsen (Heikkila et al., 1993, Zühlsdorf und Wiedemann, 1992).

2.2.2.3. Bestimmung des Einfluss von MC-207,110 (Phe-Arg- β -Naphthylamid) auf die Minimale Hemmkonzentration (MHK) von Aminoglykosiden, Tetracyclinen, und Chloramphenicol

Der Einfluss des Breit-Spektrum Efflux-Pumpen Inhibitors MC-207,110 (Phe-Arg- β -Naphthylamid, PA β N) auf die MHKs von Aminoglykosiden, Tetracyclinen, und Chloramphenicol wurde mittels des Mikrodilutionsverfahren (vgl. 2.2.2.1.) untersucht. Parallel wurden für die Antibiotika Amikacin, Gentamicin, Kanamycin, Netilmicin, Neomycin, Tobramycin, Streptomycin, Apramycin, Tetracyclin, Doxycyclin, Minocyclin, und Chloramphenicol MHKs einmal ohne und einmal mit 20 mg/l MC-207,110 bestimmt.

2.2.3. Bestimmung der Lösungsmittel-Toleranz auf festem Medium nach Asako et al. (1997)

Von frischen Übernachtskulturen auf LBGMg-Agar wurde ein McFarland-Standard 0,5 ($OD_{560} = 0,120 \pm 0,02$) in physiologischer Kochsalzlösung eingestellt. Dieser wurde anschließend 1:10 in physiologischer Kochsalzlösung verdünnt, um ca. 10^7 Zellen/ml zu erhalten. Von der Verdünnung wurden je 5 μ l auf 3 LBGMg-Agarplatten gegeben und die Platten kurz getrocknet. Eine Platte wurde als Kontrolle unbehandelt gelassen, eine wurde mit 5 ml n-Hexan und eine mit 5 ml n-Pentan überschichtet. Anschließend wurden alle Platten mit mehreren Streifen Parafilm umwickelt, um ein Verflüchtigen der Lösungsmittel zu verhindern. Anschließend wurden die Platten bei 37°C bebrütet und nach 14 Stunden visuell ausgewertet.

Als Referenz diente der *E.-coli*-Stamm WT, dessen *gyrA*-, *parC*- und *marR*-Gene sequenziert sind und keine Resistenz-verursachenden Mutationen beinhalten (Schulte, 2001).

2.2.4. Bestimmung der Keimzahl

Die Anzahl lebensfähiger Zellen einer Bakteriensuspension wurde durch Verdünnung der Suspension in physiologischer Kochsalzlösung ermittelt. Die Verdünnung erfolgte in Schritten von jeweils 1:10. Je 50 μ l der geeigneten Verdünnungsstufen wurden auf Agarplatten ausplattiert. Nach 24stündiger Inkubation bei 37°C wurden die koloniebildenden Einheiten (KBE) ausgezählt und mit dem Verdünnungsfaktor 20 multipliziert. Somit erhält man die KBE pro ml Bakteriensuspension.

2.2.5. Bestimmung der Generationszeit

Das Wachstum einer Bakterienkultur gliedert sich in mehrere Abschnitte: Nach dem Animpfen beginnt die Anlaufphase (lag-Phase), in der sich die Bakterienkultur an das vorliegende Medium und andere Wachstumsbedingungen wie z.B. die Temperatur anpasst. Sie dauert an, bis die maximale Teilungsrate erreicht ist, die den Beginn der exponentiellen Phase (log-Phase) kennzeichnet. Während der exponentiellen Phase vermehrt sich die Bakterienkultur mit ihrer für die vorliegenden Bedingungen charakteristischen konstanten Generationszeit. Sind alle Nährstoffe aufgebraucht, geht die Kultur in die stationäre Phase

über, in der kein Netto-Wachstum mehr stattfindet. Die Kultur kann je nach Empfindlichkeit lange in dieser Phase bleiben, bevor sich die Absterbephase anschließt.

Die Generationszeit von Bakterien wird innerhalb der exponentiellen Phase mit Hilfe folgender Formeln ermittelt:

$$N = N_0 \times 2^n$$

$$\lg N = \lg (N_0 \times 2^n) = \lg N_0 + n \lg 2$$

$$n = \frac{\lg N - \lg N_0}{\lg 2}$$

Teilungsrates v : Anzahl der Zellteilungen pro Zeitintervall

$$v = \frac{n}{(t - t_0)} = \frac{\lg N - \lg N_0}{\lg 2 \times (t - t_0)} \Rightarrow v \times \lg 2 = \frac{\lg N - \lg N_0}{(t - t_0)}$$

$$\frac{\lg N - \lg N_0}{(t - t_0)} = m \Rightarrow v = \frac{m}{\lg 2}$$

Generationszeit g : benötigte Zeit für eine Teilung

$$g = \frac{1}{v} \Rightarrow g = \frac{\lg 2}{m}$$

N : Zellzahl zum Zeitpunkt t

N_0 : Zellzahl zum Zeitpunkt t_0

n : Anzahl der Zellteilungen

m : Steigung der Regressionsgeraden im Bereich der expon. Wachstumsphase bei semilogarithmischer Auftragung der Graphik

Zur Bestimmung der Generationszeit einer Kultur wurde der jeweilige Bakterienstamm aus Dauerkultur auf Mueller Hinton II Agar ausgeimpft, 18 h bei 37°C bebrütet, einmal auf Mueller Hinton II Agar passagiert und erneut 18 h bei 37°C inkubiert. Von dieser Platte wurde ein McFarland-Standard 0,5 ($OD_{560} = 0,120 \pm 0,02$) in physiologischer Kochsalzlösung eingestellt. Dieser wurde anschließend 1: 10000 in 200ml Mueller Hinton II Bouillon verdünnt, so dass eine Ausgangskeimzahl von 10^4 KBE/ml vorlag. Die Kultur wurde im Schüttelinkubator bei 37°C und 120 Upm bebrütet. In Abständen von 15-30 min wurden Proben zur Keimzahlbestimmung entnommen (vgl. 2.2.4.).

Nach der Keimzahlbestimmung wurde durch semilogarithmische Auftragung der Werte eine Graphik erzeugt, eine lineare Regression erzeugt und anhand der obigen Formeln die Generationszeit g errechnet. Die Generationszeitbestimmung wurde für jeden Stamm mindestens drei Mal durchgeführt.

2.2.6. Hämolyse-Nachweis

Zur Bestimmung der Hämolyse der Bakterienstämme wurden die einzelnen Isolate auf Columbia-Agar mit Schafblut überimpft und in einer feuchten Atmosphäre bei 37°C über 72 Stunden inkubiert. Nach 24h, 48h und 72h wurden die Platten auf eine Hämolyse hin untersucht.

2.3. Molekularbiologische Methoden

2.3.1. Konzentrationsbestimmung von Oligonukleotiden

Die Extinktion der 1:250 in H₂O verdünnten Oligonukleotidlösung wurde bei einer Wellenlänge von 260 nm gemessen. Die Konzentration der Oligonukleotide wird nach folgender Formel berechnet:

$$c \text{ [pmol/}\mu\text{l]} = \frac{E_{260} \times \text{Verdünnungsfaktor}}{\text{Anzahl der Nukleotide} \times 0,01}$$

2.3.2. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ist eine *in vitro* Technik, mit der gezielt DNA-Abschnitte, die von zwei bekannten DNA-Sequenzen flankiert werden, vervielfältigt werden können (Saiki et al., 1985). Die PCR stellt ein zyklisches Verfahren dar, bei dem die Anzahl der DNA-Kopien in jeder Runde verdoppelt wird. Um DNA mit Hilfe der PCR amplifizieren zu können, benötigt man zwei Oligonukleotide, sogenannte Primer, die gegenläufig an komplementäre DNA mit bekannter Sequenz binden (vgl. Tab. 2.14.).

In jedem PCR-Zyklus werden folgende Schritte durchlaufen:

1. Denaturierung: Doppelsträngige DNA wird durch Erhitzen auf 94°C in Einzelstränge getrennt.
2. Primeranlagerung (Annealing): Primer binden an die komplementären Sequenzen in der DNA.

3. Synthesephase (Extension): Primer werden durch die thermostabile DNA-Polymerase verlängert.

Zur Herstellung der DNA-Matrize wurden je drei bis fünf Kolonien einer frischen Bakterienkultur (Mueller Hinton II - oder Caso-Agar) in 100 μl H_2O reinst suspendiert. Dieser Ansatz wurde mit Mineralöl überschichtet und 10 min bei 95°C inkubiert. Die Zelltrümmer wurden abzentrifugiert (10 min bei 13000 Upm) und der Überstand, mit gelöster DNA, im PCR-Ansatz als Template eingesetzt.

In Tabelle 2.14 ist der in dieser Arbeit aufgeführte Standard-PCR-Ansatz aufgeführt:

Tab. 2.14 Standard-PCR-Ansatz

Reagenz	Volumen
Template	5 μl
10 x Polymerase-Puffer, MgCl_2 -frei	10 μl
MgCl_2 [25 mM]	6 μl
Primer 1 [10 pmol/ μl]	2 μl
Primer 2 [10 pmol/ μl]	2 μl
dNTPs [2 mM]	2,5 μl
REDTaq DNA-Polymerase [1 U/ μl]	5 μl
H_2O	ad 100 μl

Alternativ zum Aufkochpräparat wurde auch Plasmid-DNA als PCR-Template verwendet. In diesem Fall wurde allerdings 1 μl statt 5 μl auf 100 μl Endvolumen eingesetzt.

Folgendes Temperaturprofil wurde in der Regel benutzt:

1) Initialdenaturierung	94°C	5 min	
2) Denaturierung	94°C	1 min	
3) Annealing	55°C	1 min	
4) Synthese	72°C	1 min	
5) verlängerte Synthesephase	72°C	10 min	
6) Endphase	4°C	∞	

Abweichungen zum Standard-PCR-Ansatz und zum Standard-Temperaturprofil werden in den Tabelle 2.15 und 2.16 aufgeführt. In Tabelle 2.15 sind die in dieser Arbeit durchgeführten PCRs, in Tabelle 2.16 die Mapping PCRs dargestellt.

Als Mapping-PCR werden solche PCRs bezeichnet, bei denen 2 Primer eingesetzt werden, deren Primerbindestellen in unterschiedlichen Genen liegen, so dass eine Amplifikation nur dann stattfindet, wenn die jeweiligen Gene benachbart sind.

Das Vorkommen von Gen-Fragmenten wurde überprüft, indem je 10 µl der Ansätze auf 1 – 2 % Agarose-Gelen (je nach erwarteter Größe) aufgetrennt wurden.

Tab. 2.15 Profile der einzelnen PCRs

PCR	Primer	MgCl ₂ -Konzentration	Primer-Konzentration	dNTP-Konzentration	Annealing-Temperatur	Synthesezeit	Anzahl der Zyklen	Größe des PCR-Produkts
TEM	OT3, OT4	1,5 mM	0,2 µM	50 µM	50°C	1 min	30	858 bp
TEM	TEM T1, TEM T3	1,5 mM	0,2 µM	50 µM	50°C	1 min	30	1082 bp
SHV	NI1, NI2	1,5 mM	0,2 µM	50 µM	59°C	1 min	30	1016 bp
ampC _{hyper}	H1, H2	1,5 mM	0,2 µM	50 µM	50°C	1 min	30	175 bp
ampC _{hyper}	H1, CR4	1,5 mM	0,2 µM	50 µM	50°C	1 min	30	551 bp
ampC _{plasmid}	P1, P2	1,5 mM	0,2 µM	50 µM	57°C	1 min	30	412 bp
ampC _{plasmid}	P1, P4	1,5 mM	0,2 µM	50 µM	57°C	1 min	30	748 bp
ampC _{CMY}	C1, C2	1,5 mM	0,2 µM	50 µM	50°C	1 min	30	1125 bp
CTX-M	CTX-MA, CTX-MB	1,5 mM	0,2 µM	50 µM	52°C	1 min	30	550 bp
gyrA	3-1, 5-1	1,5 mM	0,2 µM	50 µM	55°C	1 min	30	524 bp
parC	ParC S, ParC U	1,5 mM	0,2 µM	50 µM	55°C	1 min	30	236 bp
marOR	ORAB2, RK3	1,5 mM	0,2 µM	50 µM	55°C	1 min	30	589 bp
marOR	marO, marR	1,5 mM	0,2 µM	50 µM	50°C	1 min	35	572 bp
IS1	IS1-F, IS1-R	1,5 mM	0,2 µM	50 µM	55°C	1 min	30	268 bp
tnpA-Tn21	T1, T2	1,5 mM	0,2 µM	50 µM	53°C	1 min	30	628 bp
tnpA-Tn3	T4, T5	1,5 mM	0,2 µM	50 µM	55°C	2 min	35	1500 bp
tnpA-Tn3	T4, T6	1,5 mM	0,2 µM	50 µM	55°C	2 min	35	1723 bp
tnpR-Tn21	tnpR-F, tnpR-R	1,5 mM	0,2 µM	50 µM	62°C	1 min	30	201 bp

Fortsetzung Tab. 2.15 Profile der einzelnen PCRs

PCR	Primer	MgCl ₂ -Konzentration	Primer-Konzentration	dNTP-Konzentration	Annealing-Temperatur	Synthesezeit	Anzahl der Zyklen	Größe des PCR-Produkts
merA	merA-F, merA-R	2 mM	0,5 µM	200 µM	56°C-60°C	1 min	30	1232 bp
merR	merR-F, merR-R	1,5 mM	0,2 µM	50 µM	60°C	1 min	30	177 bp
int1	int1-F, int1-R	2 mM	0,2 µM	50 µM	55°C	1 min	30	280 bp
int2	int2-F, int2-R	3 mM	0,2 µM	50 µM	50°C	1 min	30	233 bp
int3	int3-F, int3-R	3 mM	0,2 µM	50 µM	50°C	1 min	30	600 bp
5'CS-3'CS	5'CS, 3'CS	1,5 mM	0,2 µM	50 µM	55°C	2 min	35	Variabel
int1-3'CS	int1-F, 3'CS	1,5 mM	0,2 µM	50 µM	55°C	2 min	35	Variabel
qacEΔ1	qacEΔ1-F, qacEΔ1-B	1,5 mM	0,2 µM	50 µM	54°C	1 min	30	227 bp
sulI	sulI-F, sulI-B	1,5 mM	0,2 µM	50 µM	64°C	1 min	30	436 bp
sulIII	sulIII-F, sulIII-R	1,5 mM	0,2 µM	50 µM	60°C	1 min	30	700 bp
tet(A)	tet(A)-F, tet(A)-R	3 mM	1 µM	300 µM	55°C	1 min	30	210 bp
tetR(A)	tetR(A)-F, tetR(A)-R	1,5 mM	0,2 µM	50 µM	55°C	1 min	30	205 bp
tet(B)	tet(B)-F, tet(B)-R	4 mM	0,25 µM	300 µM	59°C	1 min	30	659 bp
tet(C)	tet(C)-F, tet(C)-R	4 mM	0,25 µM	300 µM	55°C	1,5 min	35	418 bp
tet(D)	tet(D)-F, tet(D)-R	4 mM	2 µM	300 µM	55°C	1,5 min	35	787 bp
tet(E)	tet(E)-F, tet(E)-R	3 mM	1 µM	300 µM	55°C	1,5 min	35	278 bp
tet(G)	tet(G)-F, tet(G)-R	3 mM	1 µM	300 µM	55°C	1,5 min	35	468 bp
catI	CATI-F, CATI-R	1,5 mM	0,2 µM	50 µM	50°C	1 min	30	585 bp
catII	CATII-F, CATII-R	1,5 mM	0,2 µM	50 µM	50°C	1 min	30	495 bp
catIII	CATIII-F, CATIII-R	1,5 mM	0,2 µM	50 µM	50°C	1 min	30	508 bp
catB	catB-FA, catB-RC	1,5 mM	0,2 µM	50 µM	48°C	1 min	30	280 bp
cml	cml-F, cml-R	2 mM	0,5 µM	200 µM	40°C	1 min	30	698 bp

Fortsetzung Tab. 2.15 Profile der einzelnen PCRs

PCR	Primer	MgCl ₂ -Konzentration	Primer-Konzentration	dNTP-Konzentration	Annealing-Temperatur	Synthesezeit	Anzahl der Zyklen	Größe des PCR-Produkts
flo	flo-F, flo-R	2 mM	0,5 µM	200 µM	57°C	1 min	30	399 bp
flo	flo-F, flo-R2	1,5 mM	0,2 µM	50 µM	61°C	1,5 min	30	1100 bp
orfA	orfA-F1, orfA-R	1,5 mM	0,2 µM	50 µM	55°C	1,5 min	30	1459 bp
orfA	orfA-F2, orfA-R	1,5 mM	0,2 µM	50 µM	55°C	1,5 min	30	907 bp
orf4	orf4-F, orf4-R	1,5 mM	0,2 µM	50 µM	55°C	1 min	30	227 bp
aphA	aph(3)-Ia-F, aph(3)-Ia-R	1,5 mM	0,2 µM	50 µM	57°C	1 min	30	489 bp
aac(3)-Ia	aac(3)-Ia-F, aac(3)-Ia-R	1,5 mM	0,2 µM	50 µM	50°C	1 min	35	158 bp
aac(3)-IIc	aac(3)-IIc-F, aac(3)-IIc-R	1,5 mM	0,2 µM	50 µM	55°C	1 min	30	237 bp
aac(3)-IVa	aac(3)-IVa-F, aac(3)-IVa-R	1,5 mM	0,2 µM	50 µM	50°C	1 min	35	286 bp
aac(6')-Ib	aac(6')-Ib-F, aac(6')-Ib-R	1,5 mM	0,2 µM	50 µM	50°C	1 min	35	395 bp
ant(2'')-Ia	ant(2'')-Ia-F, ant(2'')-Ia-R	1,5 mM	0,2 µM	50 µM	50°C	1 min	35	446 bp
ant(4')-IIa	ant(4')-IIa-F, ant(4')-IIa-R	1,5 mM	0,2 µM	50 µM	50°C	1 min	35	567 bp
aac(6')-II	aac(6')-II-F, aac(6')-II-R	1,5 mM	0,2 µM	50 µM	40°C-54°C	1 min	30	375 bp
strA	strA-F, strA-R	1,5 mM	0,2 µM	200 µM	48°C	1 min	35	650 bp
strB	strB-F, strB-R	1,5 mM	0,2 µM	50 µM	53°C	1 min	35	509 bp
qnr	qnr-F, qnr-R	1,5 mM	0,2 µM	50 µM	50°C	1 min	30	660 bp

Tab. 2. 16 Profile der einzelnen Mapping-PCRs

PCR	Primer	MgCl ₂ -Konzentration	Primer-Konzentration	dNTP-Konzentration	Annealing-Temperatur	Synthesezeit	Anzahl der Zyklen
qacEΔ1-sul1	qacEΔ1-F, sul1-B	1,5 mM	0,2 μM	50 μM	54°C	1 min	30
catI-tet(B)	CATI-F, tet(B)-F	1,5 mM	0,2 μM	50 μM	50°C	1 min	35
	CATI-F, tet(B)-R	1,5 mM	0,2 μM	50 μM	50°C	1 min	35
	CATI-R, tet(B)-F	1,5 mM	0,2 μM	50 μM	50°C	1 min	35
	CATI-R, tet(B)-R	1,5 mM	0,2 μM	50 μM	50°C	1 min	35
flo-tnpA	flo-F, T1	1,5 mM	0,2 μM	50 μM	55°C	2 min	35
	flo-F, T2	1,5 mM	0,2 μM	50 μM	55°C	2 min	35
	flo-R, T1	1,5 mM	0,2 μM	50 μM	55°C	2 min	35
	flo-R, T2	1,5 mM	0,2 μM	50 μM	55°C	2 min	35
flo-sul1	flo-F, sul1-F	1,5 mM	0,2 μM	50 μM	55°C	2 min	35
	flo-F, sul1-B	1,5 mM	0,2 μM	50 μM	55°C	2 min	35
	flo-R, sul1-F	1,5 mM	0,2 μM	50 μM	55°C	2 min	35
	flo-R, sul1-B	1,5 mM	0,2 μM	50 μM	55°C	2 min	35
flo-merA	flo-F, merA-F	1,5 mM	0,2 μM	50 μM	55°C	2 min	35
	flo-F, merA-R	1,5 mM	0,2 μM	50 μM	55°C	2 min	35
	flo-R, merA-F	1,5 mM	0,2 μM	50 μM	55°C	2 min	35
	flo-R, merA-R	1,5 mM	0,2 μM	50 μM	55°C	2 min	35
flo-tet(A)	flo-F, tet(A)-F	1,5 mM	0,2 μM	50 μM	55°C	2 min	35
	flo-F, tet(A)-R	1,5 mM	0,2 μM	50 μM	55°C	2 min	35
	flo-R, tet(A)-F	1,5 mM	0,2 μM	50 μM	55°C	2 min	35
	flo-R, tet(A)-R	1,5 mM	0,2 μM	50 μM	55°C	2 min	35
	flo-F, tet(A)-F2	1,5 mM	0,2 μM	50 μM	55°C	2 min	35
	flo-F2, tet(A)-F3	1,5 mM	0,2 μM	50 μM	56°C	2 min	35
flo-CMY-2	flo-F, P1	1,5 mM	0,2 μM	50 μM	55°C	2 min	35
	flo-F, P4	1,5 mM	0,2 μM	50 μM	55°C	2 min	35
	flo-R, P1	1,5 mM	0,2 μM	50 μM	55°C	2 min	35
	flo-R, P4	1,5 mM	0,2 μM	50 μM	55°C	2 min	35
flo-sul2	flo-F, sulII-F	1,5 mM	0,2 μM	50 μM	55°C	2 min	35
	flo-F, sulII-R	1,5 mM	0,2 μM	50 μM	55°C	2 min	35
	flo-R, sulII-F	1,5 mM	0,2 μM	50 μM	55°C	2 min	35
	flo-R, sulII-R	1,5 mM	0,2 μM	50 μM	55°C	2 min	35

Fortsetzung Tab. 2. 16 Profile der einzelnen Mapping-PCRs

PCR	Primer	MgCl ₂ -Konzentration	Primer-Konzentration	dNTP-Konzentration	Annealing-Temperatur	Synthesezeit	Anzahl der Zyklen
catI-IS1	CATI-F, IS1-F	1,5 mM	0,2 µM	50 µM	50°C	2 min	35
	CATI-F, IS1-R	1,5 mM	0,2 µM	50 µM	50°C	2 min	35
	CATI-R, IS1-F	1,5 mM	0,2 µM	50 µM	50°C	2 min	35
	CATI-R, IS1-R	1,5 mM	0,2 µM	50 µM	50°C	2 min	35
tnpR-int1	tnpR-R, int1-R	1,5 mM	0,2 µM	50 µM	55°C	2 min	35
merA-merR	merA-R, merR-R	1,5 mM	0,2 µM	50 µM	56°C	2 min	35
sul1-merA	sul1-F, merA-F	1,5 mM	0,2 µM	50 µM	60°C	2 min	35
strA-strB	strA-F, strB-R	1,5 mM	0,2 µM	50 µM	50°C	2 min	35
sul2-strB	sul2-F, strB-R	1,5 mM	0,2 µM	50 µM	50°C	2 min	35
tetA(A)-tetR(A)	tet(A)-R, tetR(A)-F	1,5 mM	0,2 µM	50 µM	55°C	2 min	35
tetR(A)-strB	tetR(A)-R, strB-F	1,5 mM	0,2 µM	50 µM	50°C	2 min	35
orfA-orf4	orfA-F2, orf4-R	1,5 mM	0,2 µM	50 µM	55°C	2 min	35
orf4-flo	orf4-F, floR	1,5 mM	0,2 µM	50 µM	55°C	2 min	35

2.3.3. Agarose-Gelelektrophorese

Die Elektrophorese ist ein biochemisches Trennverfahren, welches auf der Wanderung geladener Moleküle im elektrischen Feld beruht (Maniatis et al., 1989). Mit der Agarose-Gelelektrophorese können DNA-Fragmente unterschiedlicher Größen aufgetrennt werden, wobei die DNA aufgrund ihrer negativ geladenen Phosphatgruppen zur Anode wandert.

Das Agarose-Gel bildet dabei eine Art Molekularsieb, wobei die Wanderung größerer Fragmente stärker behindert wird, als die kleinerer Fragmente.

In dieser Arbeit wurden Horizontalapparaturen zur Gelelektrophorese verwendet. Der Agaroseanteil der Gele betrug 0,5% - 2%, abhängig von der erwarteten Größe der aufzutrennenden DNA. Dazu wurde die Agarose in 1 x TAE-Puffer durch Aufkochen gelöst. Nach dem Abkühlen wurden 0,3 µg Ethidiumbromid/ml zugegeben. Ethidiumbromid interkaliert in DNA-Doppelstränge, wodurch diese unter UV-Licht-Bestrahlung sichtbar werden.

Nachdem das Gel polymerisiert war, wurde es mit 1 x TAE-Puffer überschichtet. RED-Taq PCR-Proben wurden direkt auf das Gel aufgetragen, alle anderen Proben wurden zunächst mit 1/5 Vol. Beschwererlösung versetzt und anschließend aufgetragen. Es wurde eine Spannung von 50 Volt angelegt, bis die Proben in das Gel eingelaufen waren, dann wurde die Spannung auf 100 Volt erhöht. Nach dem Lauf wurden die DNA-Banden durch UV-Licht sichtbar gemacht und mit einer Videoanlage dokumentiert. Die Größe und Konzentration der DNA-Banden ließ sich mit Hilfe eines Markers (z.B. Smart Ladder) bestimmen, der ebenfalls auf das Gel aufgetragen wurde.

Zur Auftrennung von Plasmid-DNA wurden auch Gele mit 0,7x TBE-Puffer gegossen. Hier wurde auf die Zugabe von Ethidiumbromid während des Laufs verzichtet, da die Interkalierung die Plasmide beschädigen könnte. Diese Gele wurden während des Laufs mit 0,7x TB-Puffer überschichtet. Nach Beendigung des Laufs wurde das Gel 5 min in einem Ethidiumbromid-Bad gefärbt und anschließend 5 min entfärbt, bevor die DNA-Banden wie beschrieben visualisiert wurden.

2.3.4. Reinigung von PCR-Fragmenten

2.3.4.1. Aufreinigung mit dem QIAquick-PCR Purification KitTM (Qiagen)

Das PCR-Produkt wurde mit 5 x Vol. PB-Puffer gemischt und auf ein QIAquick-Säulchen gegeben, das sich in einem Auffanggefäß befand. Es folgte eine Zentrifugation bei 13000 Upm für 1 min in der Heraeus Biofuge A. Die Durchflußfraktion wurde verworfen, das Säulchen mit 750 µl PE-Puffer gewaschen und anschließend durch zweimalige Zentrifugation (1 min bei 13000 Upm) vom restlichen Puffer befreit. Die Elution der DNA erfolgte mit 30 µl EB-Puffer durch Zentrifugation (1 min bei 13000 Upm) nach 15minütiger Inkubation bei RT.

2.3.4.2. Aufreinigung mit dem MinElute-PCR Purification KitTM (Qiagen)

Das PCR-Produkt wurde mit 5 x Vol. PB-Puffer gemischt und auf ein Minelute-Säulchen gegeben, das sich in einem Auffanggefäß befand. Es folgte eine Zentrifugation bei 13000 Upm für 1 min in der Heraeus Biofuge A. Die Durchflußfraktion wurde verworfen, das Säulchen mit 750 µl PE-Puffer gewaschen und anschließend durch zweimalige Zentrifugation (1 min bei 13000 Upm) vom restlichen Puffer befreit. Die Säule wurde eine Minute getrocknet, um Ethanol-Reste zu entfernen. Die Elution der DNA erfolgte mit 10 µl 50°C

warmen EB-Puffers durch Zentrifugation (1 min bei 13000 Upm) nach 1minütiger Inkubation bei RT.

2.3.4.3. Extraktion von DNA-Banden aus dem Agarose-Gel mittels QIAquick-Kit®

Zur Extraktion von DNA aus einem Agarose-Gel wurde die Bande unter UV-Licht mit einem Skalpell aus dem Gel herausgeschnitten und das Agarosestück in einem Eppendorfgefäß gewogen. Die Zugabe von 300 µl Puffer QG pro 100 mg Agarose-Gel und Inkubation des Gemisches bei 50°C im Wasserbad für 10 min (alle 2 min gut vortexen) führten zu der völligen Auflösung des Agarosestücks. Anschließend wurden 100 µl Isopropanol pro 100 mg Gelmatrix zugesetzt und gevortext. Die Suspension wurde auf ein QIAquick-Säulchen gegeben, welches sich in einem Auffanggefäß befand. Es folgte eine einminütige Inkubation bei RT und anschließende Zentrifugation bei 13000 Upm für 1 min in der Heraeus Biofuge A. Die maximale Kapazität der QIAquick-Säule beträgt 10 µg DNA. Der Durchfluß wurde verworfen und die Säule mit 500 ml Puffer QG versehen. Nach erneutem Zentrifugieren (1 min, 13000 Upm) wurde die Durchflußfraktion verworfen, das Säulchen mit 750 µl PE-Puffer gewaschen und anschließend durch zweimalige Zentrifugation (1 min bei 13000 Upm) vom restlichen Puffer befreit. Die Elution der DNA erfolgte mit 30 µl EB-Puffer durch Zentrifugation (1 min bei 13000 Upm) nach 15minütiger Inkubation bei RT.

2.3.4.4. Extraktion von DNA-Banden aus dem Agarose-Gel mittels MinElute-Kit®

Zur Extraktion von DNA aus einem Agarose-Gel wurde die Bande unter UV-Licht mit einem Skalpell aus dem Gel herausgeschnitten und das Agarosestück in einem Eppendorfgefäß gewogen. Die Zugabe von 300 µl Puffer QG pro 100 mg Agarose-Gel und Inkubation des Gemisches bei 50°C im Wasserbad für 10 min (alle 2 min gut vortexen) führten zu der völligen Auflösung des Agarosestücks. Anschließend wurden 100 µl Isopropanol pro 100 mg Gelmatrix zugesetzt und gevortext. Die Suspension wurde auf ein MinElute-Säulchen gegeben, welches sich in einem Auffanggefäß befand. Es folgte eine einminütige Inkubation bei RT und anschließende Zentrifugation bei 13000 Upm für 1 min in der Heraeus Biofuge A. Die maximale Kapazität der MinElute-Säule beträgt 10 µg DNA. Der Durchfluß wurde verworfen und die Säule mit 500 ml Puffer QG versehen. Nach erneutem Zentrifugieren (1 min, 13000 Upm) wurde die Durchflußfraktion verworfen, das Säulchen mit 750 µl PE-Puffer gewaschen und anschließend durch zweimalige Zentrifugation (1 min bei 13000 Upm) vom

restlichen Puffer befreit. Die Säule wurde eine Minute getrocknet, um Ethanol-Reste zu entfernen. Die Elution der DNA erfolgte mit 10 µl 50°C warmen EB-Puffers durch Zentrifugation (1 min bei 13000 Upm) nach 1minütiger Inkubation bei RT.

2.3.5. Sequenzierung von DNA

Die verwendete Methode zur DNA-Sequenzierung beruht auf dem Kettenabbruchverfahren nach Sanger et al. (1977). Dabei wird der zu sequenzierende DNA-Abschnitt *in vitro* durch eine PCR-Reaktion, das Cycle Sequencing, vervielfältigt. Neben dem DNA-Template, der DNA-Polymerase, einem geeigneten Primer und den vier Desoxyribonukleosidtriphosphaten (dNTPs) enthält der PCR-Ansatz als zusätzliche Komponente 2',3'-Dideoxyribonukleosid-Triphosphate (ddNTPs). Diese sind, wegen des Fehlens der OH-Gruppe am C3-Atom, nicht in der Lage eine Phosphodiesterbindung auszubilden, so dass ihr Einbau zum Kettenabbruch führt. Da dieser Syntheseabbruch statistisch auftritt, kommt es zur Bildung von DNA-Fragmenten aller möglichen Kettenlängen mit (durch den Primer) definiertem 5' Ende.

Im Folgenden werden die DNA-Fragmente in einer Kapillare des automatischen Sequenzers ABI PRISM™ 310 Genetic Analyser (Perkin Elmer Corporation, Foster City, USA) aufgetrennt. Die ddNTPs sind mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markiert und können mit Hilfe eines Lasers detektiert werden. Aus der Abfolge der auftretenden basenspezifischen Farbsignale ergibt sich die Basensequenz der untersuchten DNA-Probe. Die Umsetzung der Farbsignale in die Sequenz erfolgt mit Hilfe eines Computers (Power Macintosh, Apple Computer, Inc.) und der entsprechenden Software (ABI-CE1, Version 3.0, Perkin Elmer Corporation, Foster City, USA).

2.3.5.1. Cycle Sequencing

Folgender Reaktionsansatz wurde für das Cycle Sequencing eingesetzt:

Ready Reaction Mix	4 µl
DNA-Template (aufgereinigtes PCR-Produkt)	100-200 ng
Primer [10 pmol/µl]	1 µl
H ₂ O	ad 20 µl

Es wurde folgendes Temperaturprofil benutzt:

94°C	3 min	
94 °C	10 sec	← 25 x
55 °C *	5 sec	
60 °C	4 min	

* Oder jeweilige andere PCR-Primeranlagerungs-Temperatur

2.3.5.2. Aufreinigung des Reaktionsansatzes mittels Ethanol-Acetat Fällung

Zu jedem Reaktionsansatz wurden 80 µl H₂O, 20 µl 3 M NaAcetat, pH 4,8 und 250 µl 100% Ethanol gegeben. Darauf folgte eine erste 25minütige Zentrifugation bei 15000 Upm und Raumtemperatur (Heraeus Biofuge 28RS, Rotor 3042). Das Pellet wurde mit 400 µl 70 % Ethanol gewaschen, erneut zentrifugiert (5 min bei 15000 Upm und Raumtemperatur) und danach mindestens 10 min bei Raumtemperatur im Dunkeln getrocknet.

2.3.5.3. Aufreinigung des Reaktionsansatzes mittels DyeEx™ Spin Kit (Qiagen)

Zur Aufreinigung des Reaktionsansatzes mittels DyeEx-Säulen wurde zuerst durch kurzes Vortexen das Säulenmaterial resuspendiert. Es folgte eine 3minütige Zentrifugation bei 2300 Upm, um überschüssigen Puffer zu entfernen. Die 20 µl Reaktionsansatz wurden dann auf die Säule gegeben und die Säule in ein sauberes Auffanggefäß überführt. Die Elution der gereinigten DNA erfolgte durch erneutes 3minütiges Zentrifugieren. Anschließend wurde die DNA in der Vakuumzentrifuge (SpeedVac, Savant) 15 min bei 35°C getrocknet.

Vor dem Auftragen auf die Kapillare wurden die getrockneten Proben in 20 µl Template Suppression Reagent aufgenommen und bei 90°C 2 min denaturiert.

2.3.6. Präparation von Plasmid-DNA

2.3.6.1. Plasmidschnellpräparation nach Maniatis et al. (1989)

Die Schnellpräparation von Plasmid-DNA nach Maniatis et al. (1989) stellt eine Modifikation der Methoden von Birnboim & Doly (1979) sowie Ish-Horowicz & Burke (1981) dar.

1,5 ml Übernachtkultur in LB-Medium wurden 1 min bei 13000 Upm in der Heraeus Biofuge A abzentrifugiert. Durch Resuspension des Pellets in STE-Puffer und erneute Zentrifugation wurden Zellwandkomponenten entfernt. Das Pellet wurde dann in 100 µl P1-Puffer aufgenommen. Danach folgte der Zellaufschluss durch Zugabe von 150 µl Lysispuffer P2. Nach 5minütiger Inkubation bei RT und anschließender Zugabe von 150 µl des Neutralisationspuffers P3 wurde 15 min auf Eis inkubiert. Feste Bestandteile wurden durch 15minütige Zentrifugation bei 13000 Upm und 4°C entfernt (Heraeus Biofuge 28RS, Rotor 3042). Zur Extraktion der Proteine wurde der Überstand mit 1 Vol. Phenol/Chloroform versetzt und 5 min bei 13000 Upm zentrifugiert (Heraeus Biofuge A). Dieser Schritt wurde bis zum Erhalt eines klaren Überstands wiederholt. Dieser wurde dann zur Fällung der DNA mit 2 Vol. 100% Ethanol versetzt, 5 min bei RT inkubiert und anschließend 5 min bei 13000 Upm zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 1 ml 70% Ethanol gewaschen und in der Vakuumzentrifuge (SpeedVac, Savant) 10 min getrocknet. Anschließend wurde das Pellet in 60 µl 0,1x TE-Puffer oder H₂O aufgenommen.

2.3.6.2. Plasmidpräparation mit dem HiSpeed™ Plasmid Purification Kit (Qiagen)

5 ml LB-Medium wurden mit dem entsprechenden Bakterienstamm angeimpft und 8-9 h bei 37°C im Rollinkubator inkubiert. Die Starterkultur wurde 1:500 in 150 ml frischem LB-Medium verdünnt und über Nacht bei 37°C im Schüttelinkubator bebrütet.

Die Kultur wurde durch dreimaliges Zentrifugieren für 15 min bei 5300 Upm und 4°C geerntet (Heraeus Biofuge 28RS, Rotor 3751). Das Pellet wurde gründlich in 8 ml P1-Puffer resuspendiert. Dann wurden die Zellen durch Zugabe von 8 ml P2-Puffer und vorsichtigem Invertieren lysiert. Nach 5minütiger Inkubation bei RT und Zugabe von 10 ml kaltem Neutralisationspuffer P3 wurde das Lysat in eine QIAfilter Kartusche gegeben und 10 min bei RT inkubiert. Währenddessen wurde ein HiSpeed Midi „Tip“ mit 4 ml QBT-Puffer äquilibriert. Danach wurde der Kartuscheninhalt in den „Tip“ filtriert. Nachdem der „Tip“ leer getropft war, wurde der „Tip“ mit 20 ml QC-Puffer gewaschen und die DNA mit 5 ml QF-Puffer eluiert. Die DNA wurde durch Zugabe von 3,5 ml Isopropanol und 5 min Inkubation bei RT gefällt. Mit einer 20 ml Spritze wurde die gefällte DNA auf einen QIAprecipitator aufgetragen und mit 2 ml 70% Ethanol gewaschen. Nachdem der QIAprecipitator mehrmals mit einer leeren Spritze getrocknet wurde, erfolgte die zweimalige Elution mit 150 µl H₂O.

2.3.6.3. K-Acetat Plasmidpräparation nach E. Tietze (Robert-Koch-Institut, Wernigerode)

Die K-Acetat Methode der Präparation von Plasmid-DNA nach E. Tietze stellt eine Modifikation der Methode von Maniatis et al. (1989) dar.

2 ml Übernachtskultur in LB-Medium wurden 5 min bei 5000 Upm und RT abzentrifugiert (Heraeus Biofuge A). Das Pellet wurde in 100 µl kaltem Pub1-Puffer gründlich resuspendiert und das Reaktionsgefäß auf Eis gestellt. Dann wurden die Zellen durch Zugabe von 200 µl Pub2-Puffer und sanftes Schwenken lysiert. Nach 5minütiger Inkubation auf Eis wurden 150 µl kalter Pub3-Neutralisationspuffer zugegeben, kurz gevortext und anschließend 10 bis 20 min auf Eis inkubiert. (Dieser und alle nachfolgenden Vortex-Schritte können zur schonenderen Behandlung der DNA auch durch Schwenken ersetzt werden.) Es folgte eine 10minütige Zentrifugation bei 13000 Upm und RT. Zur Extraktion der Proteine wurde der Überstand mit 1 Vol. Phenol/Chloroform versetzt, kurz gevortext und 4 min bei 13000 Upm zentrifugiert. Dieser wurde dann zur Fällung der DNA mit 2 Vol. 100% Ethanol versetzt, 5 min bei RT inkubiert und anschließend 10 min bei 13000 Upm zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 1 ml 70% Ethanol gewaschen und in der Vakuumzentrifuge (SpeedVac, Savant) 5 bis 10 min getrocknet. Anschließend wurde das Pellet in 50 µl 0,1x TE-Puffer + RNase A (10µg/ml) aufgenommen und kurz gevortext. Durch 5minütige Inkubation bei 37°C und anschließendes kurzes Vortexen wurde die verbleibende RNA verdaut und die DNA gelöst.

2.3.7. Restriktionsverdauung von DNA

Zur Größenbestimmung von Plasmidbanden wurde die DNA mit Restriktionsendonukleasen verdaut und anschließend die Größe der einzelnen Fragmente bestimmt.

Restriktionsendonukleasen sind Enzyme, die spezifische Basensequenzen in einer DNA-Doppelhelix erkennen und diese schneiden. Eine Verdauung von Plasmid-DNA führt meistens zu wenigen, definierten Banden, da spezifische Erkennungssequenzen für ein gegebenes Restriktionsenzym relativ selten in einem Plasmid-Molekül vorkommen. Idealerweise nimmt man für eine solche Untersuchung Restriktionsenzyme, deren Erkennungssequenzen relativ lang sind, so dass sie statistisch alle 2000 - 3000 Bp schneiden.

Die Enzymmenge, die für eine vollständige Verdauung der DNA benötigt wird, ist von der DNA-Konzentration und Anzahl der vorhandenen Schnittstellen abhängig und berechnet sich nach folgender Formel:

$$\text{Unit}_{\text{Enzym}} = \frac{\mu\text{g DNA} \times 5 \cdot 10^4 \times S_v}{\text{Bp DNA} \times S_\lambda \times h}$$

S_v = Anzahl der Schnittstellen in der DNA

S_λ = Anzahl der Schnittstellen im λ -Genom

h = Inkubationsdauer

Die Restriktionsverdauung von DNA erfolgte nach folgendem Standard-Reaktionsansatz:

Restriktions-Ansatz:

DNA	x μg
10 x Puffer	1/10 Vol.
BSA (10fach konzentriert)	1/10 Vol
Restriktionsenzym	y U
Aqua dest. ad Endvolumen	z μl

Für die Spaltung der DNA wurde das dreifache der errechneten Menge des Restriktionsenzym BamHI eingesetzt und über Nacht bei 37°C inkubiert.

2.3.8. Übertragung von genetischem Material durch Konjugation

Bei der Konjugation erfolgt durch direkten Zell-Zell-Kontakt ein gerichteter Gentransfer von einem Spender-Stamm (Donor) in einen Empfänger-Stamm (Rezipient). Der Donor zeichnet sich dadurch aus, dass er neben dem zu übertragenden Plasmid auch sogenannte *tra*-Gene besitzt, deren Genprodukte für die Übertragung von DNA-Elementen verantwortlich sind. Zu den Tra-Genprodukten gehören u.a. die F-Pili, Strukturproteine der Zelloberfläche, die Adhärenz des Donors an den Rezipienten vermitteln.

Während der Konjugation wird einer der beiden DNA-Stränge des Plasmids in der Donorzelle durch eines der Tra-Genprodukte enzymatisch gespalten. Über eine Plasmabrücke wird der gespaltene DNA-Plasmidstrang in die Rezipientenzelle geschleust. Hier wird der DNA-Strang wieder kovalent geschlossen. Anschließend werden sowohl in der Donor- als auch in der Rezipientenzelle die Plasmid-DNA-Stränge wieder zu doppelsträngiger DNA synthetisiert.

In dieser Arbeit wurden als Rezipienten die Rifampicin-resistenten Mutanten W3110lac⁻-3a, und MC1061-4 benutzt. Donor und Rezipient wurden in LB-Medium bei 37°C bis auf eine OD₅₄₆ von 0,4–0,5 angezogen. Dann wurden die Kulturen 30 min ohne Schütteln bei 37°C inkubiert. Von Donor und Rezipient wurde jeweils 1 ml abgenommen, 2 min bei 5000 Upm und RT abzentrifugiert (Heraeus Biofuge A), und das Pellet in je 100 µl LB-Medium aufgenommen. Dann wurden je 100 µl Donor und Rezipient gemischt und auf einen sterilen, abgekochten Filter auf einer Agarplatte gegeben. Der Ansatz wurde dann 6 Stunden bei 37°C bebrütet. Anschließend wurden die Bakterien mit steriler, physiologischer NaCl-Lösung vom Filter gewaschen und in geeigneten Verdünnungsstufen (10⁰–10⁻⁴) auf antibiotikahaltigem Agar ausplattiert, der selektiv nur das Wachstum der Transkonjuganten ermöglichte. Als Kontrolle wurden der Donor und der Rezipient einzeln unter den selben Bedingungen inkubiert und anschließend ausplattiert.

2.3.9. Transformation von genetischem Material durch Elektroporation

Bei der Transformation wird freie DNA aus der Umgebung der Bakterienzelle aufgenommen. Um isolierte DNA mittels Transformation in die Zellen einzubringen, muss zuerst die DNA-Aufnahmebereitschaft der Zellen (Kompetenz) erhöht werden.

Zur Herstellung elektrokompenter Zellen wurde eine Übernachtskultur des *E.-coli*-Stammes DH5α 1:100 in 320 ml LB-Medium verdünnt und bei 37°C bis zu einer OD₅₄₆ von 0,4–0,5 geschüttelt. Anschließend wurde die Suspension 20 min bei 37°C im Brutschrank inkubiert und weitere 30 min auf Eis gestellt. Vorsichtig wurden 200 ml auf vier Portionen a 50 ml verteilt und 10 min bei 3000–4000 Upm und 4°C zentrifugiert (Heraeus Biofuge 28RS, Rotor 3751) und der Überstand verworfen. Die Sedimente wurden in den restlichen 100 ml Suspension in vier Portionen a 25 ml resuspendiert und erneut abzentrifugiert. Nachdem der Überstand abermals verworfen wurde, wurden die Sedimente zügig zunächst jeweils mit 50 ml eiskaltem aqua dem., dann zweimal mit 25 ml aqua dem. und schließlich mit 5 ml 10% Glycerin in aqua dem. gewaschen. Die Pellets wurden anschließend in je 160 µl 10% Glycerin in aqua dest. aufgenommen, in Aliquots von 50 µl portioniert und bei –70°C schockgefroren. Die verbleibenden 10 µl wurden für eine Keimzahlbestimmung genutzt.

Die Elektroporation wurde mit 50 µl vorsichtig auf Eis aufgetauten, kompetenten Zellen und 5 µl DNA (40 ng/µl) durchgeführt. Beides wurde vermischt, in 0,2 cm Küvetten gefüllt und 15 min auf Eis inkubiert. Die Küvette wurde in das Gerät eingespannt und die Elektrotransformation mit einem Puls von 2,5 eV, 25 µF, 200 Ω bei 5 ms durchgeführt.

Anschließend wurde der Ansatz mit 1 ml vorgewärmten SOC-Medium aufgefüllt und 1,5 h bei 37°C im Roller inkubiert. Anschließend wurden je 50 µl Zellen in geeigneten Verdünnungsstufen (10^0 – 10^{-4}) auf antibiotikahaltigem Agar ausplattiert. Als Kontrolle wurde die Lebendzellzahl der kompetenten Zellen vor und nach der Transformation auf Mueller Hinton II Agar bestimmt.

2.4. Proteinbiochemische Methoden

2.4.1. Präparation des β -Laktamase-Rohextraktes

Zur Präparation des β -Laktamase-Rohextraktes wurde eine Übernachtskultur des Bakterienstammes 1:100 in Mueller Hinton II Bouillon verdünnt und im Schüttelinkubator bei 37°C und 120 Upm inkubiert, bis eine OD_{600} von 1,0 erreicht wurde. Dann wurden die Zellen durch Zentrifugation von zweimal 40 ml dieser Kultur für 15 min bei 5200 Upm und 4°C geerntet (Heraeus Biofuge 28RS, Rotor 3751). Ein Pellet wurde mit 10 ml eiskaltem 0,1 M Sörensen-Puffer gewaschen und anschließend in 4 ml eiskaltem 0,1 M Sörensen-Puffer aufgenommen, das andere Pellet entsprechend mit 0,01 M Tris-Puffer behandelt. Zur Erleichterung des Zellaufschlusses wurden die Zellen über Nacht bei –20°C eingefroren.

Am nächsten Tag wurden die Zellen dann aufgetaut und mit Hilfe des Ultraschallprozessors im Eisbad aufgeschlossen. Hierzu wurden die Zellen dreimal für je 10 sec beschallt, wobei die Proben zwischendurch für je 30 sec auf Eis abgekühlt wurden. Anschließend wurden die Zelltrümmer durch Zentrifugation für 20 min bei 20000 Upm und 4°C sedimentiert (Heraeus Biofuge 28RS, Rotor 3042). Der klare Überstand, der den β -Laktamase-Rohextrakt darstellt, wurde in 200 µl Portionen aliquotiert und konnte ohne Aktivitätsverlust bei –20°C gelagert werden.

2.4.2. Bestimmung der spezifischen β -Laktamase-Aktivität

Die β -Laktamase-Aktivität des Enzymrohextraktes (vgl. 2.4.1.) wurde spektralphotometrisch nach der Methode von O'Callaghan et al. (1968) bestimmt.

Als Substrat für die β -Laktamase wurde das chromogene Cephalosporin Nitrocefin genommen, dessen Farbe sich bei Hydrolyse des β -Laktamringes durch die β -Laktamase von

gelb zu rot ändert. Dieser Farbumschlag ist durch eine Extinktionszunahme bei 485 nm messbar und kann so zur β -Laktamase-Aktivität in Beziehung gesetzt werden.

Folgender Reaktionsansatz wurde im Spektralphotometer über 3 min in Quarzküvetten gegen Sörensen-Puffer gemessen:

Tab. 2.17 β -Laktamase-Aktivitätstest mit Nitrocefin

0,1 M Sörensenpuffer	900 μ l
1 mM Nitrocefin	50 μ l
β -Laktamase-Rohextrakt in geeigneter Verdünnung	50 μ l

Mit Hilfe des Lambert-Beerschen Gesetzes lässt sich aus den gemessenen Absorptionsänderungen die β -Laktamase-Aktivität bestimmen:

$E = \epsilon \times c \times d$	E = Extinktion
	ϵ = molarer Extinktionskoeffizient des eingesetzten Substrates [$l \times \text{mmol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$]
	c = Konzentration des eingesetzten Substrates [$\text{mmol} \times l^{-1}$]
	d = Schichtdicke der Küvette [cm]

Die Umsatzgeschwindigkeit v eines Enzyms wird definiert als die Änderung der Substratkonzentration Δc pro Zeiteinheit Δt :

$$v = \Delta c / \Delta t \quad [\mu\text{mol} \times \text{ml}^{-1} \times \text{min}^{-1}]$$

Durch Kombination dieser Gleichung mit dem Lambert-Beerschen Gesetz ergibt sich für die Umsatzgeschwindigkeit der β -Laktamase folgende Formel:

$$v = \frac{\Delta E}{\epsilon \times d \times \Delta t} \quad [\mu\text{mol} \times \text{ml}^{-1} \times \text{min}^{-1}]$$

Die Umsatzgeschwindigkeit v der β -Laktamase ist gleich ihrer Aktivität U [Unit; 1 U stellt die Menge Enzym dar, die 1 μmol Substrat in 1 min umsetzt]. Um die Aktivitäten der einzelnen Proben miteinander vergleichen zu können, wurde die spezifische β -Laktamase-Aktivität bestimmt, bei der die Umsatzgeschwindigkeit v auf den Proteingehalt C_P [$\text{mg} \times \text{ml}^{-1}$] der Probe bezogen wird:

$$X = v / C_P \quad [\mu\text{mol} \times \text{min}^{-1} \times \text{mg}^{-1}] = [U \times \text{mg}^{-1}]$$

2.4.3. Bestimmung des Proteingehalts nach Lowry

Die Proteinbestimmung nach Lowry et al. (1951) nutzt die Eigenschaft von Kupfer-II-Ionen, in alkalischer, wässriger Lösung mit den Peptidbindungen und Tyrosinresten von Proteinen rotviolette Komplexsalze zu bilden. Zusätzlich wird durch bestimmte Aminosäuren der Proteine (hauptsächlich Tyrosin und Tryptophan, in geringerem Maße auch Cystein und Histidin) Phosphomolybdat und Phosphowolframat aus dem Folin-Ciocalteau-Reagenz reduziert, was zu einer tiefblauen Färbung der Lösung führt.

Mit Rinderserumalbumin in den Konzentrationen 0–240 $\mu\text{g}/\text{ml}$ wurde eine Eichreihe aufgenommen, mit deren Hilfe die Proteinmengen der Proben ermittelt werden konnten. Dazu wurden 200 μl der entsprechenden Proteinlösung mit 2 ml alkalischem Kupferreagenz vermischt und 10 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden 200 μl Folin-Ciocalteau-Phenol-Reagenz zugegeben, das vorher frisch 1:3 mit aqua dem. verdünnt worden war. Der Ansatz wurde gut vermischt und 20 min bei RT im Dunkeln inkubiert. Es folgte die Messung die Messung der Extinktion der Probe bei 578 nm gegen einen Leerwert. Zur Bestimmung des Proteingehaltes der β -Laktamase-Rohextrakte wurden die Proben 1:20 verdünnt und wie beschrieben behandelt und vermessen. Sowohl von den Eichlösungen als auch von den Proben wurden jeweils Dreifachbestimmungen gemacht und der Proteingehalt aus dem Mittelwert ermittelt.

2.4.4. Elektrophoretische Auftrennung von Proteinen

2.4.4.1. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese dient der Auftrennung von Proteinen nach ihrer elektrophoretischen Beweglichkeit, die von der spezifischen Ladung und Größe der Proteine abhängig ist.

Das Trägermaterial Polyacrylamid wird durch radikalische Copolymerisation von Acrylamid (AA) und dem Vernetzer N,N'-Methylenbisacrylamid (Bis) hergestellt. Als Polymerisationsstarter dient dabei Ammoniumpersulfat (APS), als Katalysator N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED). Es entsteht ein dreidimensionales, mit Bisacrylamid quervernetztes Molekülgerüst. Die Prozentigkeit der Gele und damit die Porengröße sind von der Acrylamid-Konzentration abhängig. Das AA:Bis-Verhältnis wird konstant gehalten und bei zunehmender Acrylamid-Konzentration wird die Porengröße kleiner.

Die Porengröße der Gele wird durch die Acrylamidgesamt-konzentration T und den Vernetzungsgrad C definiert, die nach folgenden Formeln berechnet werden können:

$$T = \frac{\text{g Acrylamid} + \text{g Bis} \times 100}{100 \text{ ml}} \quad [\%]$$
$$C = \frac{\text{g Bis} \times 100}{\text{g Acrylamid} + \text{g Bis}} \quad [\%]$$

g = Gramm Einwaage

Um eine bessere Trennleistung der Elektrophorese zu erreichen, wird häufig mit der diskontinuierlichen Elektrophorese nach Ornstein (1964) gearbeitet, die eine zusätzliche Fokussierung der Proteinbanden ermöglicht. Dabei wird über das engporige Trenngel ein weitporiges Sammelgel gegossen und verschiedene Puffer mit unterschiedlichen pH-Werten kombiniert.

Hier wurde eine Elektrophorese mit diskontinuierlichem pH-Verlauf nach Laemmli (1970) mit dem Tris-Chlorid/Tris-Glycin-System durchgeführt. Dabei enthält das Trenngel 0,375 M Tris-HCl, pH 8,8, das Sammelgel 0,125 M Tris-HCl, pH 6,8. Der pH-Wert des Sammelgels liegt mit 6,8 nahe am isoelektrischen Punkt der Aminosäure Glycin, die im

Elektrophoresepuffer enthalten ist, so dass das Glycin zu Beginn der Trennung nur eine geringe elektrophoretische Mobilität besitzt (Folge-Ionen), während die Chlorid-Ionen eine sehr hohe Mobilität haben (Leit-Ionen). Dazwischen bildet sich ein Gradient aus, in dem die Proteine einen „Stapel“ in der Reihenfolge ihrer Mobilität bilden. Dadurch werden die Proteine aufkonzentriert, was durch einen plötzlich erhöhten Reibungswiderstand am Übergang zum Trenngel verstärkt wird. Im Trenngel lösen sich dann die konzentrierte Proteinbanden auf und die Proteine werden nach Molekülgröße und Ladung aufgetrennt.

Shapiro et al. führten 1967 die SDS-PAGE ein, eine Polyacrylamid-Gelelektrophorese in Gegenwart des anionischen Detergenz Natriumdodecylsulfat (SDS), bei der die Proteine ausschließlich nach ihrer Molekülgröße aufgetrennt werden.

Die Proteine werden durch Kochen mit SDS denaturiert, wobei sich das SDS in einem konstanten Verhältnis an die Aminosäure-Ketten anlagert. Das SDS überdeckt mit seiner negativen Ladung die Eigenladung der Proteine, so dass anionische Micellen entstehen, die eine konstante negative Nettoladung pro Masseneinheit haben und im elektrischen Feld zur Anode wandern. Man erhält bei einer SDS-PAGE mit 0,1% SDS über einen bestimmten Bereich eine lineare Beziehung zwischen dem Logarithmus der Molekulargewichte und den Wanderungstrecken der SDS-Protein-Micellen. Mit Hilfe von Standards lassen sich die Molekulargewichte der Proteine bestimmen.

In dieser Arbeit konnten die Proben nur mit SDS-haltigem Probenpuffer versetzt, nicht aber aufgeköcht werden, da eine Renaturierung der β -Laktamasen für eine anschließende Färbung mit Nitrocefin (vgl. 2.4.4.3.) möglich sein musste. Deswegen kann nicht von einem ganz genauen Verhältnis zwischen SDS und Protein ausgegangen werden.

Die SDS-PAGE in dieser Arbeit bestand aus einem 4%-igen Sammelgel und einem 13%-igen Trenngel, deren Zusammensetzungen in Tabelle 2.18 beschrieben sind. Acrylamid und Bisacrylamid wurden als fertige Mischung aus 30% AA und 0,8% Bis eingesetzt.

Tab. 2.18 Zusammensetzung der SDS-Polyacrylamidgele

A: Sammelgel (4%)

Komponente	Volumen
H ₂ O	3,05 ml
0,5 M TrisHCl, pH6,8	1,25 ml
Acrylamid/Bisacrylamid	0,65 ml
10% SDS	50 µl
APS	20 µl
TEMED	15 µl

B: Trenngel (13%)

Komponente	Volumen
H ₂ O	3,1 ml
1,5 M TrisHCl, pH8,8	2,5 ml
Acrylamid/Bisacrylamid	4,3 ml
10% SDS	100 µl
APS	40 µl
TEMED	20 µl

Für die SDS-PAGE wurde eine Mini-Protean-III-Kammer verwendet, bei der es sich um eine Apparatur für vertikale Gele handelt. In einem Gießstand wurde zwischen zwei Giesplatten zuerst das 13% Trenngel gegossen und mit Wasser überschichtet. Das Wasser verhindert den Kontakt zum Luftsauerstoff, der zum Kettenabbruch der radikalischen Polymerisation führen würde. Nach der Auspolymerisation wurde das Wasser entfernt und das 4%-ige Sammelgel auf das fertige Trenngel gegossen. Zur Ausbildung der Probenaschen wurde ein Kamm eingesetzt. Nach der Auspolymerisation wurde das Gelsandwich in den Elektroden-Träger gespannt und vertikal in die mit 4°C kaltem Elektrophoresepuffer gefüllte Gelkammer gehängt.

Die Proben wurden mit dem Probenpuffer versetzt und vorsichtig in die Probenaschen des Gels geladen. Die Auftrennung der Proteine erfolgte bei 150 V für 2 h. Um die Proteine vor Erwärmung zu schützen, wurde die Kammer während der Elektrophorese auf 4°C gekühlt.

Nach der Elektrophorese wurde das Gel zum Nachweis der β -Laktamasen erst mit Nitrocefin (vgl. 2.4.4.3.) und anschließend zur Gesamtproteinfärbung mit Coomassie gefärbt (vgl. 2.4.4.4.). Für die Nitrocefin-Färbung müssen die β -Laktamasen in aktiver Form vorliegen. Durch das SDS in der SDS-PAGE liegen sie aber in denaturierter Form vor, so dass sie zuerst renaturiert werden müssen. Dazu wurde das Gel 1 h in 4°C kaltem, 2,5%-igem Triton-X-100 langsam geschüttelt. Triton ist ein Detergenz, das SDS von Proteinen lösen kann, so dass relativ unempfindliche Proteine wie β -Laktamasen wieder renaturieren können.

2.4.4.2. Isoelektrische Fokussierung (IEF)

Die isoelektrische Fokussierung dient der Auftrennung von Proteinen nach ihrem isoelektrischem Punkt (pI). In dieser Gel-Elektrophorese wandert das Protein im elektrischen Feld entlang eines pH-Gradienten, bis es an den pH-Wert gelangt, an dem seine Nettoladung, also die Summe aller positiven und negativen Ladungen der Aminosäurereste, gleich Null ist. Dies ist der isoelektrische Punkt des Proteins, an dem es „fokussiert“ wird und anschließend stationär im Gel verbleibt.

Zur isoelektrischen Fokussierung werden meistens großporige Polyacrylamidgele genommen. Der pH-Gradient kann entweder durch immobilisierte Gruppen, die mit dem Gel kovalent vernetzt sind, oder, wie hier verwendet, durch freie Trägerampholyte gebildet werden. Die freien Trägerampholyte sind ein heterogenes Gemisch aus verschiedenen niedermolekularen aliphatischen Oligoamino-Oligocarbonsäuren, die sich in ihren isoelektrischen Punkten unterscheiden. Während der Gel-Elektrophorese bilden sie unter Einfluss des elektrischen Felds einen kontinuierlichen pH-Gradienten aus, in dem sich dann die aufgetragenen Proteine nach ihrem pI anordnen. Zur Bestimmung der isoelektrischen Punkte lässt man Markerproteine mit bekannten pIs mitlaufen.

In dieser Arbeit wurden fertig gegossene Criterion-Gele der Firma Bio-Rad verwendet. Sie sind nicht-denaturierende 3%-ige Polyacrylamid-Gele mit 2% Ampholyten und einem pH-Bereich von pH 3–10. Da ein zu hoher Salzgehalt der Proben die isoelektrische Fokussierung stört, wurden zur Fokussierung die in 2.4.1. mit 0,01 M Tris-Puffer hergestellten β -Laktamase-Rohextrakte eingesetzt. Dazu wurden sie nach dem Auftauen zuerst nochmals für 10 min bei 17000 Upm und 4°C zentrifugiert (Heraeus Biofuge 28RS, Rotor 3042), um eventuell präzipitierte Proteine, die die IEF stören könnten, zu entfernen. Anschließend wurden die Proben mit 30% Glycerin versetzt.

Das vertikale Gel wurde in Criterion-Gelkammer der Firma Bio-Rad eingesetzt und die obere Pufferkammer mit 4°C kaltem Kathodenpuffer, die untere mit 4°C kaltem Anodenpuffer befüllt. Nachdem die Proben vorsichtig in die Probentaschen des Gels geladen worden waren, erfolgte die Gelelektrophorese für 2,5 h mit schrittweise erhöhten Spannungen:

1. 1 h 100 V
2. 1 h 250 V
3. 0,5 h 500 V

Während der Fokussierung wurde die Kammer auf 4°C gekühlt, um die Proteine vor Erwärmung zu schützen.

Anschließend wurde das Gel mit Nitrocefin gefärbt (vgl. 2.4.4.3.), um die β -Laktamasen detektieren zu können.

2.4.4.3. Nitrocefin-Färbung

Nitrocefin ist ein chromogenes Cephalosporin, das bei Spaltung des β -Laktamrings durch β -Laktamasen von gelb nach rot umschlägt. In dieser Arbeit wurde diese Eigenschaft des Nitrocefins ausgenutzt, um β -Laktamasen im Proteingel spezifisch anzufärben.

Dazu wurde das Gel auf eine Folie gelegt und mit einem mit 1 mM Nitrocefin getränktem Filterpapier bedeckt, bis die β -Laktamasen als rotgefärbte Banden sichtbar wurden. Das Filterpapier wurde entfernt und eine zweite Folie möglichst luftblasenfrei auf das Gel gelegt. Anschließend wurde das Gel mit Hilfe eines Scanners dokumentiert.

Sollte das Gel anschließend noch Coomassie-gefärbt werden (SDS-PAGE), wurde es nochmals 30 min in 2,5% Triton-X-100 sanft geschüttelt, um das Nitrocefin zu entfernen.

2.4.4.4. Coomassie-Färbung

Die Coomassie-Färbung ist eine Gesamtproteinfärbung, da der Triphenylmethanfarbstoff Coomassie-Brilliant-Blau unspezifisch an alle Proteine im Gel bindet.

Zur Färbung wurde das Protein-Gel 15 min in der Färbelösung sanft geschüttelt. Anschließend wurde es in frischer Entfärbelösung entfärbt, wobei die Lösung mehrmals gewechselt werden musste. Nach ausreichender Entfärbung wurde das Gel mit Hilfe eines Scanners dokumentiert.

3. Ergebnisse

3.1. Allgemeine Charakterisierung der „Berliner Stämme“

Ein Kollektiv klinischer *E.-coli*-Isolate (n=22) wurde von der Freien Universität Berlin wegen verminderter Empfindlichkeit gegenüber Cephalosporinen zugeschickt. Diese β -Laktam-Resistenz sollte näher charakterisiert werden und anhand ausgewählter multiresistenter Stämme aus diesem Kollektiv sollten die unter 1.4. aufgeführten Fragen beantwortet werden.

3.1.1. Identifizierung

Für das hier untersuchte Stammkollektiv der Freien Universität Berlin konnte die angegebene Spezies bestätigt werden: Alle Stämme wurden mit guter oder sehr guter Zuverlässigkeit als *Escherichia coli* identifiziert.

3.1.2. Resistenzbestimmung

Die MHK-Bestimmung zur Ermittlung der Antibiotika-Empfindlichkeit der 22 *E.-coli*-Stämme wurde für jeden Stamm einmal durchgeführt. Gab es Unstimmigkeiten bei den Ergebnissen oder wichen die MHK-Werte des Kontrollstamms *E. coli* ATCC 25922 von den dokumentierten Werten ab, wurde die MHK-Bestimmung wiederholt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3.1 dargestellt. Die hellgrau markierten MHK-Daten werden als klinisch intermediär, die dunkelgrau markierten MHK-Daten als klinisch resistent eingestuft. Die klinische Beurteilung wurde falls möglich nach DIN vorgenommen (Deutsches Institut für Normung e.V., 2003). Für Kanamycin, Neomycin, Streptomycin, Pefloxacin, Fosfomycin und Rifampicin wurde nach französischem Standard (SFM), für Spectinomycin, Sulfamethoxazol und Teicoplanin nach amerikanischem Standard (NCCLS), und für Trimethoprim und Fusidinsäure nach schwedischem Standard (RAF) beurteilt, da keine Beurteilungskriterien nach DIN vorliegen. Für Dalfopristin und Quinopristin existieren keine klinischen Bewertungskriterien.

Tab. 3.1 MHK-Daten der *Escherichia-coli*-Isolate [$\mu\text{g/ml}$]

Stamm	Amoxicillin	Amoxicillin/ Clavulansäure	Ampicillin/ Tazobactam	Ampicillin/ Sulbactam	Piperacillin	Piperacillin/ Tazobactam	Piperacillin/ Sulbactam	Ticarcillin	Cefazolin	Cefuroxim	Cefotaxim
1	2048	512/2	64/4	128/8	>256	8/4	≤8/8	>128	>64	>32	32
4	512	512/2	128/4	256/8	>256	8/4	≤8/8	>128	>64	>32	16
18	>2048	256/2	>1024/4	>1024/8	>256	>64/4	>32/8	>128	>64	>32	32
19	256	256/2	128/4	64/8	16	8/4	≤8/8	64	64	>32	2
24	256	256/2	64/4	32/8	8	≤4/4	≤8/8	32	>64	>32	1
29	128	128/2	64/4	16/8	8	≤4/4	≤8/8	32	32	32	2
30	>2048	16/2	8/4	8/8	>256	≤4/4	≤8/8	>128	>64	>32	64
31	512	128/2	128/4	128/8	>256	≤4/4	≤8/8	128	64	32	1
36	2048	256/2	256/4	128/8	>256	>64/4	>32/8	>128	>64	>32	64
38	512	256/2	128/4	256/8	>256	16/4	≤8/8	>128	64	>32	2
42	256	256/2	128/4	64/8	16	16/4	≤8/8	64	>64	>32	2
44	256	256/2	128/4	64/8	16	8/4	≤8/8	64	>64	>32	2
45	256	256/2	32/4	16/8	32	16/4	≤8/8	≤16	>64	32	16
48	2048	2/2	4/4	2/8	>256	≤4/4	≤8/8	>128	64	>32	8
49	512	256/2	64/4	128/8	>256	>64/4	>32/8	>128	32	>32	32
50	256	256/2	256/4	128/8	>256	>64/4	>32/8	>128	>64	>32	64
51	>2048	1042/2	>1024/4	>1024/8	>256	>64/4	>32/8	>128	>64	>32	>64
53	>2048	32/2	64/4	128/8	>256	16/4	32/8	>128	16	16	≤0,5
55	256	256/2	32/4	32/8	>256	>64/4	>32/8	>128	>64	>32	>64
56	>2048	256/2	256/4	1024/8	>256	32/4	>32/8	>128	>64	>32	64
57	2048	16/2	4/4	32/8	>256	≤4/4	≤8/8	>128	>64	>32	>64
58	1024	32/2	8/4	256/8	256	≤4/4	16/8	>128	≤8	≤4	≤0,5

Fortsetzung Tab. 3.1 MHK-Daten der *Escherichia-coli*-Isolate [$\mu\text{g/ml}$]

Stamm	Cefotaxim/ Clavulansäure	Ceftazidim	Ceftazidim/ Clavulansäure	Cefpodoxim- Proxetil	Cefoxitin	Ceftriaxon	Cefotetan	Cefepim	Aztreonam	Imipenem	Meropenem
1	16/4	64	16/4	>64	64	32	16	1	16	≤ 2	$\leq 0,0625$
4	8/4	32	16/4	>64	>128	16	32	$\leq 0,5$	8	≤ 2	$\leq 0,0625$
18	$\leq 0,5/4$	32	$\leq 0,5/4$	>64	8	32	0,5	16	16	≤ 2	$\leq 0,0625$
19	2/4	8	8/4	32	64	1	8	$\leq 0,5$	≤ 4	≤ 2	$\leq 0,0625$
24	1/4	4	4/4	16	64	0,25	4	$\leq 0,5$	≤ 4	≤ 2	$\leq 0,0625$
29	1/4	8	4/4	32	32	0,5	4	$\leq 0,5$	≤ 4	≤ 2	$\leq 0,0625$
30	$\leq 0,5/4$	>64	$\leq 0,5/4$	>64	64	>32	8	16	32	≤ 2	0,125
31	1/4	4	4/4	32	32	0,5	4	$\leq 0,5$	≤ 4	≤ 2	$\leq 0,0625$
36	>64/4	>64	>64/4	32	64	2	4	32	>32	16	$\leq 0,0625$
38	2/4	4	4/4	64	32	1	4	$\leq 0,5$	≤ 4	≤ 2	$\leq 0,0625$
42	2/4	16	8/4	32	64	2	8	$\leq 0,5$	8	≤ 2	$\leq 0,0625$
44	1/4	8	8/4	64	64	2	8	$\leq 0,5$	8	≤ 2	$\leq 0,0625$
45	4/4	32	32/4	64	32	16	4	2	≤ 4	≤ 2	$\leq 0,0625$
48	$\leq 0,5/4$	>64	$\leq 0,5/4$	32	16	16	2	>32	>32	>16	$\leq 0,0625$
49	32/4	>64	>64/4	32	64	1	8	16	32	16	$\leq 0,0625$
50	>64/4	>64	>64/4	64	64	2	32	16	>32	>16	$\leq 0,0625$
51	>64/4	>64	>64/4	>64	>128	>32	>64	8	>32	4	0,25
53	$\leq 0,5/4$	32	1/4	8	32	0,5	2	4	≤ 4	≤ 2	0,125
55	>64/4	>64	>64/4	64	64	8	2	>32	>32	>16	$\leq 0,0625$
56	32/4	32	32/4	>64	>128	32	32	$\leq 0,5$	16	≤ 2	0,125
57	$\leq 0,5/4$	2	$\leq 0,5/4$	>64	32	>32	0,25	32	16	≤ 2	$\leq 0,0625$
58	$\leq 0,5/4$	0,25	$\leq 0,5/4$	0,5	8	$\leq 0,0625$	0,25	$\leq 0,5$	≤ 4	≤ 2	$\leq 0,0625$

Fortsetzung Tab. 3.1 MHK-Daten der *Escherichia-coli*-Isolate [$\mu\text{g/ml}$]

Stamm	Amikacin	Gentamicin	Netilmicin	Tobramycin	Kanamycin	Neomycin	Streptomycin	Spectinomycin
1	8	4	32	32	128	2	256	256
4	4	64	4	4	8	2	>256	>256
18	8	2	1	2	4	2	16	8
19	2	128	16	16	>256	128	>256	128
24	2	1	0,5	1	>256	128	256	256
29	2	16	1	64	64	2	64	>256
30	2	8	16	16	>256	64	8	8
31	2	1	1	2	>256	128	128	256
36	2	32	4	2	8	1	256	64
38	4	64	16	8	8	2	256	128
42	2	64	8	8	>256	128	256	128
44	2	1	1	2	>256	64	32	256
45	2	64	16	16	>256	256	256	128
48	4	8	16	32	>256	64	8	8
49	2	1	1	1	256	64	16	64
50	2	1	1	1	4	1	64	256
51	2	0,5	0,5	0,5	>256	64	>256	64
53	1	0,5	0,5	0,5	2	0,5	256	16
55	2	128	16	32	>256	128	>256	128
56	16	8	8	8	>256	256	>256	128
57	1	0,5	0,5	0,5	>256	32	128	8
58	2	0,5	0,5	0,5	2	1	256	16

Fortsetzung Tab. 3.1 MHK-Daten der *Escherichia-coli*-Isolate [$\mu\text{g/ml}$]

Stamm	Pipemidsäure	Norfloxacine	Ofloxacin	Ciprofloxacin	Enoxacin	Fleroxacin	Pefloxacin	Sparfloxacin	Tetracyclin	Doxycycline	Minocycline	Chloramphenicol
1	>128	>64	>32	>32	>32	>32	>32	>32	>64	16	4	16
4	>128	>64	32	>32	>32	>32	>32	>32	>64	16	4	>128
18	2	0,0625	0,0625	$\leq 0,0156$	0,25	0,0625	0,125	$\leq 0,0156$	1	2	0,5	4
19	>128	>64	>32	>32	>32	>32	>32	>32	4	4	4	>128
24	>128	64	32	32	>32	>32	>32	32	>64	16	8	>128
29	>128	32	32	16	>32	32	>32	16	>64	16	8	>128
30	32	2	1	0,25	2	1	2	0,125	4	4	2	>128
31	>128	32	16	8	>32	32	>32	8	4	4	2	>128
36	>128	32	16	8	>32	32	>32	16	>64	>64	16	>128
38	>128	64	16	16	>32	32	>32	16	>64	>64	16	>128
42	>128	>64	>32	>32	>32	>32	>32	>32	4	4	2	>128
44	>128	64	32	32	>32	>32	>32	32	>64	16	8	>128
45	>128	>64	>32	>32	>32	>32	>32	>32	4	4	2	>128
48	16	2	1	0,25	2	1	2	0,125	4	4	4	>128
49	2	0,0625	0,0625	$\leq 0,0156$	0,125	0,0625	0,125	$\leq 0,0156$	>64	8	4	>128
50	4	0,25	0,25	0,0625	0,5	0,25	0,25	0,125	2	2	1	>128
51	>128	>64	>32	>32	>32	>32	>32	>32	>64	>64	64	>128
53	>128	16	16	8	>32	16	32	8	>64	16	4	>128
55	>128	>64	>32	>32	>32	>32	>32	>32	4	4	2	>128
56	>128	64	32	16	>32	32	>32	16	>64	64	16	>128
57	2	0,125	0,0625	$\leq 0,0156$	0,25	0,125	0,125	$\leq 0,0156$	>64	>64	8	8
58	>128	32	16	16	>32	32	>32	16	>64	>64	16	8

Fortsetzung Tab. 3.1 MHK-Daten der *Escherichia-coli*-Isolate [$\mu\text{g/ml}$]

Stamm	Nitrofurantoin	Trimethoprim	Sulfamethoxazol	Cotrimoxazol	Fosfomycin	Rifampicin	Vancomycin	Teicoplanin	Fusidinsäure	Dalfopristin	Quinopristin
1	128	>64	>512	>256	1	>32	>64	>128	>32	>64	>64
4	16	>64	>512	>256	2	16	>64	>128	>32	>64	>64
18	8	>64	>512	>256	2	8	>64	>128	>32	>64	>64
19	16	>64	>512	>256	8	16	>64	>128	>32	>64	>64
24	32	0,25		8	8	16	>64	>128	>32	>64	>64
29	16	1		16	8	8	>64	>128	>32	>64	>64
30	4	0,5	>512	8	8	16	>64	>128	>32	>64	>64
31	16	>64	>512	>256	8	8	>64	>128	>32	>64	>64
36	32	>64	>512	>256	1	16	>64	>128	>32	>64	>64
38	32	>64	>512	>256	32	8	>64	>128	>32	>64	>64
42	16	>64	>512	>256	8	16	>64	>128	>32	>64	>64
44	16	0,125		4	8	16	>64	>128	>32	>64	>64
45	16	>64	>512	>256	8	16	>64	>128	>32	>64	>64
48	4	0,5		8	2	16	>64	>128	>32	>64	>64
49	32	>64	>512	>256	16	8	>64	>128	>32	>64	>64
50	64	0,125		2	1	8	>64	>128	>32	>64	>64
51	8	>64	>512	>256	0,5	16	>64	>128	>32	>64	>64
53	8	>64	>512	>256	2	16	>64	>128	>32	>64	>64
55	16	>64	>512	>256	4	16	>64	>128	>32	>64	>64
56	4	>64	>512	>256	0,5	8	>64	>128	>32	>64	>64
57	32	0,5		8	>256	8	>64	>128	>32	>64	>64
58	32	>64	>512	>256	2	16	>64	>128	>32	>64	>64

3.1.3. Untersuchung der β -Laktam-Resistenz

3.1.3.1. Phänotypische Identifizierung von β -Laktamasen mittels dichotomem Verzweigungsschema (Westphal, 1999)

Mit dem dichotomen Verzweigungsschema (Westphal, 1999) können von einem Isolat exprimierte β -Laktamasen auf Grund der MHK des Stammes gegenüber bestimmten β -Laktam-Antibiotika phänotypisch identifiziert werden. Die phänotypische Identifizierung basierend auf den unter 3.1.2. ermittelten MHK-Daten ergab folgende β -Laktamasen für die untersuchten Stämme:

Tab. 3.2 Ergebnisse der phänotypischen β -Laktamase-Identifizierung

Stamm Nr.	Identifizierung
1	hyperproduziertes AmpC oder Plasmid-kodiertes AmpC
4	hyperproduziertes AmpC oder Plasmid-kodiertes AmpC
18	Extended-Spectrum β -Laktamase (ESBL)
19	hyperproduziertes AmpC oder Plasmid-kodiertes AmpC
24	hyperproduziertes AmpC oder Plasmid-kodiertes AmpC
29	hyperproduziertes AmpC oder Plasmid-kodiertes AmpC
30	Extended-Spectrum β -Laktamase (ESBL)
31	hyperproduziertes AmpC oder Plasmid-kodiertes AmpC
36	hyperproduziertes AmpC oder Plasmid-kodiertes AmpC
38	hyperproduziertes AmpC oder Plasmid-kodiertes AmpC
42	hyperproduziertes AmpC oder Plasmid-kodiertes AmpC
44	hyperproduziertes AmpC oder Plasmid-kodiertes AmpC
45	hyperproduziertes AmpC oder Plasmid-kodiertes AmpC
48	Extended-Spectrum β -Laktamase (ESBL)
49	hyperproduziertes AmpC oder Plasmid-kodiertes AmpC
50	hyperproduziertes AmpC oder Plasmid-kodiertes AmpC
51	hyperproduziertes AmpC oder Plasmid-kodiertes AmpC
53	Extended-Spectrum β -Laktamase (ESBL)
55	hyperproduziertes AmpC oder Plasmid-kodiertes AmpC
56	hyperproduziertes AmpC oder Plasmid-kodiertes AmpC
57	Extended-Spectrum β -Laktamase (ESBL)
58	Original-Spektrum β -Laktamase (OSBL)

3.1.3.2. Genotypische Identifizierung von β -Laktamasen

Die unter 3.1.3.1. ermittelten phänotypischen β -Laktamase-Identifizierungen sollten mittels PCR und Sequenzierung bestätigt und präzisiert werden.

Die Identifizierung „hyperproduziertes AmpC oder Plasmid-kodiertes AmpC“ (AmpC_{hyper} oder AmpC_{Plasmid}) wurde bestätigt, bzw. genauer untersucht, indem zuerst mittels PCR der Promotor-Bereich des chromosomalen *ampC*-Gens des jeweiligen *E.-coli*-Stamms amplifiziert und anschließend sequenziert wurde. Die Methode erlaubt leider nicht die Detektion hyperproduzierter AmpC- β -Laktamasen, wenn die Hyperproduktion auf Gen-Amplifikation beruht. Am häufigsten wurden vier Promotor-Mutationen an den Positionen -42, -18, -1, und +58 gefunden, wie sie auch bei Nelson und Gay Elisha (1999) und Sherwood (2000) beschrieben wurden. Relevant sind die Mutationen bei -42 und -18, die zu Verbesserungen der -35 und -10 Konsensus-Sequenzen führen, wodurch aus dem schwachen Promotor ein starker Promotor wird (Nelson & Gay Elisha, 1999).

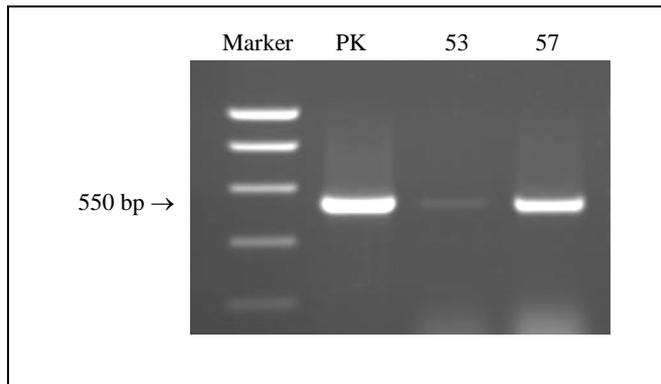
Konnte keine Hyperproduktion festgestellt werden, wurde mit Hilfe degenerierter AmpC-Primer (Sherwood, 2000) die Anwesenheit Plasmid-kodierter AmpC- β -Laktamasen überprüft. Da alle detektierten AmpC- β -Laktamasen zur CMY-Familie der β -Laktamasen gehörten, wurde mittels *ampC*_{Citrobacter}-spezifischen Primern das ganze Gen amplifiziert und sequenziert, um die genaue Identität des Gens zu erhalten. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3.3 zusammengefasst.

Die phänotypische Identifizierung „ESBL“ wurde näher untersucht, indem mit spezifischen Primern die Anwesenheit von TEM- und SHV-Genen in PCRs überprüft wurde. Konnten Gene nachgewiesen werden, wurde das genaue Allel des Gens durch Sequenzierung bestimmt (siehe Tab. 3.3). Dabei wurde eine neue TEM-Variante, TEM-101 beschrieben, deren Sequenz in der GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez>) unter der Accession Number AF495873 hinterlegt wurde. Um Informationen über die allgemeine Verbreitung von TEM-Genen innerhalb des Stamm-Kollektivs zu erhalten, wurde auch versucht, in allen anderen Stämmen TEM-Gene zu amplifizieren.

Bei den Stämmen 53 und 57 konnten mittels TEM- und SHV-Primern keine Gene amplifiziert werden, weswegen nach anderen, in Deutschland selteneren ESBL-Genen, gesucht wurde. 1990 wurde von Bauernfeind et al. eine neue ESBL aus einem *E.-coli*-Isolat beschrieben. Dieses Enzym zeichnete sich durch eine Bevorzugung des Substrats Cefotaxim aus („Cefotaximase“) und gehört zur Familie der CTX-M β -Laktamasen. Seit dem sind über 20 verschiedene CTX-M beschrieben worden, von denen CTX-M-15, CTX-M-16 und CTX-M-

19 auch Ceftazidim hydrolysieren können (Bonnet et al., 2001; Karim et al., 2001; Poirel et al., 2001). Mit CTX-M spezifischen Primern wurde bei den Stämmen 53 und 57 eine PCR durchgeführt. Als Positiv-Kontrolle (PK) diente ein CTX-M-positiver Stamm der freundlicherweise von I. Wiegand zur Verfügung gestellt wurde. Das Ergebnis ist in Abbildung 3.1 dargestellt:

Abb. 3.1 PCR zum Nachweis von CTX-M-Genen in den Stämmen 53 und 57



Bei Stamm 53 ist das Ergebnis etwas unklar. Die Bande ist zwar nicht sehr deutlich, aber spezifisch. Die MHK-Werte deuten auf eine starke Bevorzugung von Ceftazidim (MHK 32 $\mu\text{g/ml}$) gegenüber Cefotaxim (MHK $\leq 0,5 \mu\text{g/ml}$). Stamm 57 ist eindeutig CTX-M-positiv, was auch durch die im Verhältnis zu Ceftazidim (2 $\mu\text{g/ml}$) viel höheren Cefotaxim-MHK ($>64 \mu\text{g/ml}$) bestätigt wird.

Bis auf einen Fall konnte das phänotypische Identifizierungsergebnis auch genotypisch bestätigt werden. Bei Stamm 31 fiel auf, dass trotz einer Identifizierung als $\text{AmpC}_{\text{hyper}}$ oder $\text{AmpC}_{\text{Plasmid}}$ weder Promotor-Mutationen noch ein Plasmid-kodiertes *ampC*-Gen nachgewiesen werden konnte. Statt dessen wurde ein TEM-Gen nachgewiesen, welches nach Sequenzierung als TEM-30, eine Inhibitor-resistente β -Laktamase (IRBL), identifiziert wurde. Das ist die erste Beschreibung einer IRBL in Deutschland. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3.3 zusammengefasst. Die für die Resistenz verantwortlichen Gene sind fett geschrieben.

Tab. 3.3 Ergebnisse der genetischen β -Laktamase-Identifizierung

Stamm Nr.	Phänotypische Identifizierung	Genotypische Identifizierung
1	AmpC _{hyper} oder AmpC _{Plasmid}	Keine Promotor-Mutationen, CMY-7, TEM
4	AmpC _{hyper} oder AmpC _{Plasmid}	AmpC_{hyper} mit 3 Promotor-Mutationen
18	ESBL	SHV-2
19	AmpC _{hyper} oder AmpC _{Plasmid}	AmpC_{hyper} mit 4 Promotor-Mutationen
24	AmpC _{hyper} oder AmpC _{Plasmid}	AmpC_{hyper} mit 4 Promotor-Mutationen
29	AmpC _{hyper} oder AmpC _{Plasmid}	AmpC_{hyper} mit 4 Promotor-Mutationen
30	ESBL	TEM-101
31	AmpC _{hyper} oder AmpC _{Plasmid}	Keine Promotor-Mutationen, TEM-30 (=IRT-2)
36	AmpC _{hyper} oder AmpC _{Plasmid}	AmpC_{hyper} mit 4 Promotor-Mutationen, TEM
38	AmpC _{hyper} oder AmpC _{Plasmid}	AmpC_{hyper} mit 4 Promotor-Mutationen, TEM-1b
42	AmpC _{hyper} oder AmpC _{Plasmid}	AmpC_{hyper} mit 4 Promotor-Mutationen
44	AmpC _{hyper} oder AmpC _{Plasmid}	AmpC_{hyper} mit 4 Promotor-Mutationen, TEM
45	AmpC _{hyper} oder AmpC _{Plasmid}	AmpC_{hyper} mit 4 Promotor-Mutationen, TEM
48	ESBL	TEM-101
49	AmpC _{hyper} oder AmpC _{Plasmid}	AmpC_{hyper} mit 4 Promotor-Mutationen, TEM
50	AmpC _{hyper} oder AmpC _{Plasmid}	AmpC_{hyper} mit 5 Promotor-Mutationen, TEM
51	AmpC _{hyper} oder AmpC _{Plasmid}	3 Promotor-Wobble, CMY-2, TEM
53	ESBL	CTX-M (?)
55	AmpC _{hyper} oder AmpC _{Plasmid}	AmpC_{hyper} mit 4 Promotor-Mutationen, TEM
56	AmpC _{hyper} oder AmpC _{Plasmid}	3 Promotor-Wobble, CMY-2, TEM-1b
57	ESBL	CTX-M
58	OSBL	TEM-1b

3.1.4. Stammauswahl

Aus diesen 22 getesteten Stämmen wurden vier Stämme ausgewählt, mit denen weitere Untersuchungen durchgeführt werden sollten. Das Kriterium für die Auswahl war, dass die Stämme unterschiedliche Multiresistenz-Profile (Antibiotika-Resistenz gegen mehrere Antibiotika-Gruppen) besaßen. Die Stämme exprimierten außerdem unterschiedliche β -Laktamasen: Stamm 30 die neue ESBL TEM-101, Stamm 31 die phänotypisch unerwartete IRBL TEM-30, Stamm 38 ein hyperproduziertes AmpC mit vier Promotor-Mutationen und Stamm 56 ein Plasmid-kodiertes CMY-2. Die MHK-Werte dieser vier Stämme sind in Tabelle 3.4 dargestellt:

Tab. 3.4 MHK-Werte der vier ausgewählten Stämme [$\mu\text{g/ml}$]

	Antibiotikum	30	31	38	56
β -Laktamantibiotika	Amoxicillin	>2048	512	512	>2048
	Amoxicillin/Clavulansäure	16/2	128/2	256/2	256/2
	Ampicillin/Tazobactam	8/4	128/4	124/4	256/4
	Ampicillin/Sulbactam	8/8	128/8	256/8	1024/8
	Piperacillin	>256	>256	>256	>256
	Piperacillin/Tazobactam	$\leq 4/4$	$\leq 4/4$	16/4	32/4
	Piperacillin/Sulbactam	$\leq 8/8$	$\leq 8/8$	$\leq 8/8$	>32/8
	Ticarcillin	>128	128	>128	>128
	Cefazolin	>64	64	64	>64
	Cefuroxim	>32	32	>32	>32
	Cefotaxim	64	1	2	64
	Cefotaxim/Clavulansäure	$\leq 0,5/4$	1/4	2/4	32/4
	Ceftazidim	>64	4	4	32
	Ceftazidim/Clavulansäure	$\leq 0,5/4$	4/4	4/4	32/4
	Cefpodoxim-Proxetil	>64	32	64	>64
	Cefoxitin	64	32	32	>128
	Ceftriaxon	>32	0,5	1	32
	Cefotetan	8	4	4	32
	Cefepim	16	$\leq 0,5$	$\leq 0,5$	$\leq 0,5$
	Aztreonam	32	≤ 4	≤ 4	16
Imipenem	≤ 2	≤ 2	≤ 2	≤ 2	
Meropenem	0,125	$\leq 0,0625$	$\leq 0,0625$	0,125	
Chinolone	Pipemidsäure	32	>128	>128	>128
	Norfloxacin	2	32	64	64
	Ofloxacin	1	16	16	32
	Ciprofloxacin	0,25	8	16	16
	Enoxacin	2	>32	>32	>32
	Fleroxacin	1	32	32	32
	Pefloxacin	2	>32	>32	>32
	Sparfloxacin	0,125	8	16	16

Fortsetzung Tab. 3.4 MHK-Werte der vier ausgewählten Stämme [$\mu\text{g/ml}$]

	Antibiotikum	30	31	38	56
Aminoglykoside	Amikacin	2	2	4	16
	Apramycin	4	2	4	32
	Gentamicin	8	1	64	8
	Netilmicin	16	1	16	8
	Tobramycin	16	2	8	8
	Kanamycin	>256	>256	8	>256
	Neomycin	64	128	2	128
	Streptomycin	8	128	256	>256
	Spectinomycin	8	256	128	>256
Tetra- cycline	Tetracyclin	4	4	>64	>64
	Doxycyclin	4	4	>64	64
	Minocyclin	2	2	16	16
Anti- folate	Sulfamethoxazol	>512	>512	>512	>512
	Trimethoprim	0,5	>64	>64	>64
	Cotrimoxazol (Sulf./Trim.)	8	>256	>256	>256
sonstige	Chloramphenicol	>128	>128	>128	>128
	Florfenicol	16	8	16	256
	Nitrofurantoin	4	16	32	4
	Fosfomycin	8	8	32	0,5
	Rifampicin	16	8	8	8
	Vancomycin	>64	>64	>64	>64
	Teicoplanin	>128	>128	>128	>128
	Fusidinsäure	>32	>32	>32	>32
	Dalfopristin	>64	>64	>64	>64
	Quinopristin	>64	>64	>64	>64

Hellgrau: klinisch intermediär, dunkelgrau: klinisch resistent

3.2. Charakterisierung der vier ausgewählten Stämme

3.2.1. Konjugation der Stämme 30, 31, 38, 56

In Konjugationsexperimenten sollte ermittelt werden, welche Stämme konjugative Plasmide enthielten und welche Antibiotika-Resistenz bei der Konjugation vom Donor-Stamm auf den Rezipienten übertragen werden konnten. Es konnten nur Transkonjuganten bei der Konjugation von Stamm 56 mit *E. coli* MC1061-4 als Rezipient selektiert werden. Bei den anderen drei Stämmen konnte trotz mehrfacher Konjugationsversuche mit sowohl MC1061-4 als auch W3110lac⁻-3a als Rezipient keine Transkonjuganten selektiert werden.

Tabelle 3.5 zeigt die MHK-Daten des Donors, des Rezipienten und der Transkonjuganten für die Konjugation von Stamm 56. Es wurden zwei Typen von Konjuganten isoliert: Typ A (Frequenz $7,9 \times 10^{-6}$) wird vertreten durch den Konjuganten Kan3, der gegenüber Typ-B-

Konjuganten (Tet1, Amp16, Chlor1; Frequenz $1,1 - 5,7 \times 10^{-1}$) zusätzliche β -Laktam- und Aminoglykosid-Resistenzen besitzt. Das Antibiotika-Kürzel im Namen des Transkonjuganten zeigt an, auf welchem Antibiotikum der Transkonjugant selektiert wurde. Die markierten Felder verdeutlichen die Antibiotika, gegen die Resistenz konjugativ übertragen wurde. Die Streptomycin-Resistenz kann bei den Transkonjuganten nicht eindeutig nachgewiesen werden, da der Rezipient MC1061-4 auch Streptomycin-resistent ist.

Tab. 3.5 Analyse der Konjugation des Stamms 56 anhand von MHK-Werten (in $\mu\text{g/ml}$)

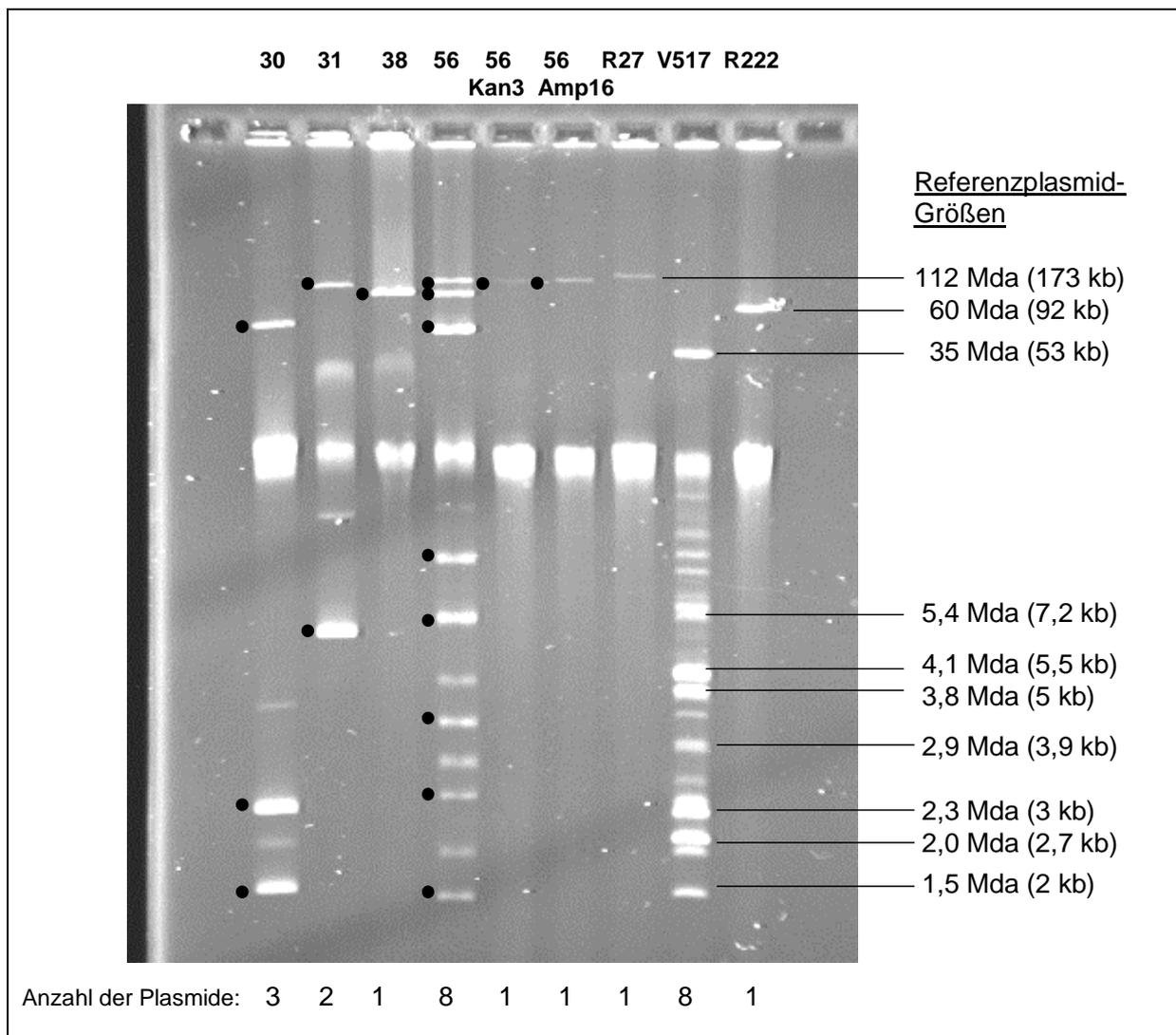
Antibiotikum	56	MC1061-4	Kan3	Tet1	Amp16	Chlor1
Ampicillin	>2048	≤ 2	>2048	32	32	32
Amoxicillin / Clav.	128/2	2/2	128/2	32/2	32/2	32/2
Piperacillin	>128	≤ 1	>128	2	4	4
Piperacillin / Taz.	8/4	$\leq 1/4$	16/4	$\leq 1/4$	$\leq 1/4$	$\leq 1/4$
Ticarcillin	>128	≤ 16	>128	≤ 16	32	32
Cefotetan	32	≤ 4	16	≤ 4	≤ 4	8
Cefpodoxim	>16	$\leq 0,25$	>16	>16	>16	>16
Cefpodoxim / Clav.	>16/4	$\leq 0,25/4$	>16/4	16/4	16/4	16/4
Ceftazidim	8	$\leq 0,25$	8	2	2	2
Ceftazidim / Clav.	4/4	$\leq 0,25/4$	4/4	2/4	2/4	2/4
Cefotaxim	>8	$\leq 0,5$	8	2	2	2
Cefotaxim / Clav.	4/4	$\leq 0,5/4$	4/4	1/4	2/4	2/4
Cefoxitin	>32	≤ 4	>32	16	16	16
Cefepim	0,5	$\leq 0,25$	$\leq 0,25$	$\leq 0,25$	$\leq 0,25$	$\leq 0,25$
Aztreonam	8	≤ 1	4	≤ 1	≤ 1	≤ 1
Imipenem	1	0,5	1	1	1	1
Meropenem	0,5	$\leq 0,25$	$\leq 0,25$	$\leq 0,25$	$\leq 0,25$	$\leq 0,25$
Amikacin	16	4	4	4	4	4
Gentamicin	8	1	1	1	1	1
Tobramycin	8	2	2	2	2	2
Netilmicin	8	2	2	2	2	2
Kanamycin	>256	8	>256	8	8	8
Neomycin	>256	2	128	4	4	2
Streptomycin	>256	>256	>256	>256	>256	>256
Spectinomycin	>256	16	>256	>256	>256	>256
Tetracyclin	>64	2	64	64	32	32
Doxycyclin	64	1	8	8	4	4
Minocyclin	16	1	1	1	1	1
Sulfamethoxazol	>512	4	>512	>512	>512	>512
Trimethoprim	>64	0,0625	>64	>64	>64	>64
Cotrimoxazol	>256	0,25	>256	>256	>256	>256
Nitrofurantoin	8	4	4	4	4	4
Chloramphenicol	>128	2	64	64	64	128
Florfenicol	256	2	64	64	64	64
Ciprofloxacin	>8	0,125	0,125	0,125	0,125	0,125
Ofloxacin	>8	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25

3.2.2. Plasmid-Analysen

3.2.2.1. Nachweis und Größenbestimmung der Plasmide in den Stämmen 30, 31, 38, 56, sowie den Konjuganten Kan3 und Amp16

Plasmide konnten aus allen Stämmen sowohl mit der Methode nach Maniatis et al. (1989) als auch mit der Methode nach Tietze isoliert werden (siehe Abbildung 3.2). Erstaunlicherweise hatten Konjuganten des Typs A (Kan3) und B (Amp16) trotz unterschiedlicher MHK-Werte das selbe Plasmid aufgenommen.

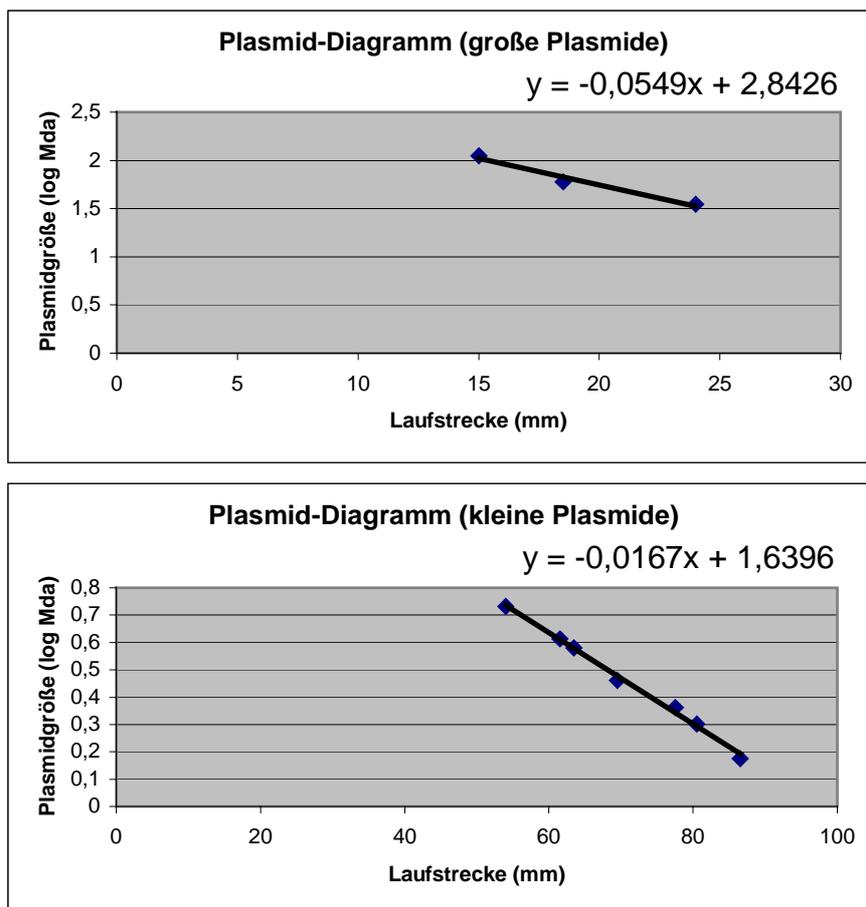
Abb. 3.2 Gelelektrophoretische Auftrennung der Plasmid-Präparationen der ausgewählten Stämme und Konjuganten



Es wurden Plasmid-Präparationen der Stämme 30, 31, 38, 56, sowie der Konjuganten 56 Kan3 und 56 Amp16 aufgetragen. Zum Größenvergleich wurden die Referenz-Plasmide der Stämme R27, V517 und R222 mitgeführt. Die bekannten Größen der Referenz-Plasmide sind in Mda und kb angegeben. Die einzelnen Plasmide der untersuchten Stämme sowie der Konjuganten sind durch schwarze Punkte markiert

Die Größe der Plasmid-Banden kann annähernd durch eine Grafik bestimmt werden, in der semilogarithmisch die Größe der Referenzplasmide gegen die Laufstrecke im Gel aufgetragen wird. Die besten Ergebnisse erhält man, wenn eine Graphik für die großen Plasmide über 50 kb und eine Graphik für die kleinen Plasmide unter 10 kb anfertigt.

Abb. 3.3 Grafiken zur Plasmid-Größenbestimmung



Aus den Grafiken leiten sich folgende Größen für die Plasmid-Banden ab:

Tab. 3.6 Graphisch ermittelte Plasmid-Größen

Plasmid	mm Laufweite	Plasmidgröße (Mda)	Plasmidgröße (kb)
Stamm 30, Bande 1	20,5	52	80
Stamm 30, Bande 2	76,5	2,3	3,5
Stamm 30, Bande 3	86	1,6	2,4
Stamm 31, Bande 1	16	92	142
Stamm 31, Bande 2	56,5	5,0	7,7
Stamm 38	16,5	86	133

Fortsetzung Tab. 3.6 Graphisch ermittelte Plasmid-Größen

Plasmid	mm Laufweite	Plasmidgröße (Mda)	Plasmidgröße (kb)
Stamm 56, Bande 1	15,5	98	151
Stamm 56, Bande 2	17	81	125
Stamm 56, Bande 3	21	49	75
Stamm 56, Bande 4	47,5	7,0	11
Stamm 56, Bande 5	54,5	5,4	8,3
Stamm 56, Bande 6	66,5	3,4	5,2
Stamm 56, Bande 7	75,5	2,4	3,7
Stamm 56, Bande 8	86,5	1,6	2,4
Konjugant Kan3	15,5	98	151
Konjugant Amp16	15,5	98	151

3.2.2.2. Versuch zur Transformation der Plasmide

Transformationsexperimente wurden mit Plasmiden aller Stämme durchgeführt. Es sollte untersucht werden, welche nicht-konjugierbaren, Resistenz-tragenden Plasmide durch Transformation übertragen und vereinzelt werden konnten. Transformationsversuche wurden mehrfach mit verschiedenen DNA-Konzentrationen aus mehreren DNA-Präparationen mittels Elektroporation durchgeführt, jedoch konnten keine Transformanten selektiert werden. Kontroll-Transformationen mit dem Plasmid pBR322 lieferten gute Ergebnisse, so dass von einer Kompetenz der Zellen ausgegangen werden konnte.

3.2.2.3. Versuch zum Verdau der Plasmide aus Stamm 56

Die Größenbestimmung von Plasmiden über mitlaufende Referenzplasmide lässt nur eine Näherung zu. Daher sollte die Größe des größten Plasmides von Stamm 56, welches durch Konjugation übertragbar war, durch Restriktionsverdau genau bestimmt werden. Restriktionsversuche ergaben jedoch immer nur Bandenverläufe, keine analysierbaren Einzelbanden. Es ist zu vermuten, dass die Plasmidbanden durch die Präparation schon Brüche beinhalteten und deshalb nicht nur an den Restriktionsschnittstellen durch die Enzyme geschnitten wurden.

3.2.3. Bestimmung der Generationszeit

Zur Charakterisierung der Isolate und um mögliche durch Plasmide vermittelte Wachstumsvor- oder -nachteile festzustellen, wurden Generationszeiten der vier Stämme und der Konjuganten bestimmt. Als Vergleichsstämme dienten der Rezipient MC1061-4 für die Konjuganten und für die vier klinischen Stämme das klinische Isolat WT (Wildtyp), der keine erworbene Resistenz besitzt und dessen *gyrA*, *parC* und *marR* Gene durchsequenziert sind und keine Mutationen enthalten. Die Ergebnisse der Generationszeitbestimmung sind in Tabelle 3.7 dargestellt. Angegeben ist die durchschnittliche Generationszeit, die sich aus mindestens drei Messungen ergibt.

Tab. 3.7 Durchschnittliche Generationszeiten der vier Stämme, Konjuganten, sowie der Vergleichsstämme

Stamm	Generationszeit
WT	19,8 min
30	20,9 min
31	18,7 min
38	16,8 min
56	20,6 min
56 Kan3	25,7 min
56 Amp16	25,1 min
MC1061-4	25,0 min

Aus den angeführten durchschnittlichen Generationszeiten ist die Tendenz ersichtlich, dass die multiresistenten klinischen Isolate unter Laborbedingungen mindestens so schnell wachsen wie der sensible Wildtyp und dass das konjugative Plasmid aus Stamm 56 keinen Wachstumsnachteil für den Rezipienten MC1061-4 bedeutet.

3.2.4. Serotypisierung (Robert-Koch-Institut, Wernigerode)

Am Robert-Koch-Institut in Wernigerode wurde die Serotypisierung der vier *E.-coli*-Isolate vorgenommen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3.8 dargestellt:

Tab. 3.8 Serotypisierung

Stamm	Serotyp
30	O86 : H25
31	Ont : H
38	O159 : H28
56	Ont : H6

3.2.5. Hämolyse-Test

Zur Überprüfung der Hämolsin-Produktion als Beispiel eines möglichen Virulenzfaktors wurde die Hämolyse auf Schafblut über 72 Stunden hinweg beobachtet (Tab. 3.9).

Tab. 3.9 Ergebnisse des Hämolyse-Test nach 24 h, 48 h, und 72 h

Stamm	24 h	48 h	72 h
30	α -Hämolyse	schwache β -Hämolyse	β -Hämolyse
31	α -Hämolyse	schwache β -Hämolyse	β -Hämolyse
38	α -Hämolyse	schwache β -Hämolyse	β -Hämolyse
56	α -Hämolyse	schwache β -Hämolyse	β -Hämolyse
56 Amp16	γ -Hämolyse	α -Hämolyse	α -Hämolyse
MC1061-4	γ -Hämolyse	γ -Hämolyse	γ -Hämolyse

Alle klinischen Stämme zeigten bereits nach 24 Stunden eine α -Hämolyse (vergrünende Hämolyse). Nach 48 Stunden sind erste Anzeichen einer β -Hämolyse erkennbar, die nach 72 Stunden voll ausgeprägt ist. Versuche mit verschiedenen Passagen der Stämme zeigten, dass die Fähigkeit zur β -Hämolyse mit ansteigender Passagenzahl verloren geht.

Der Konjugant Amp16 zeigt die α -Hämolyse später als der Donorstamm 56 und eine β -Hämolyse war nicht erkennbar. Dies deutet darauf hin, dass Stamm 56 verschiedene Hämolsin-Gene besitzt, wovon nur eins auf dem konjugativen Plasmid liegt.

3.2.6. Charakterisierung der β -Laktam-Resistenz

In 3.1.3.2. wurden die β -Laktamasen der vier ausgewählten Stämme genotypisch identifiziert. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3.10 zusammen gefasst.

Tab. 3.10. Ergebnisse der genetischen β -Laktamase-Identifizierung

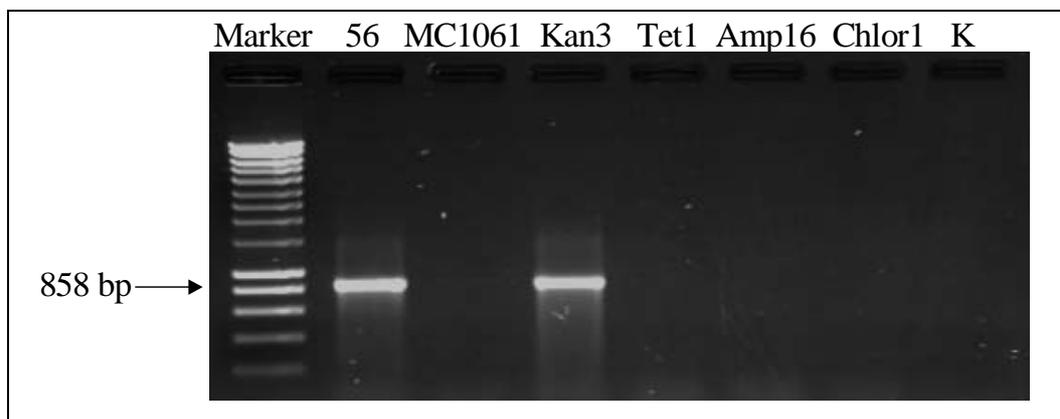
Stamm Nr.	Phänotypische Identifizierung	Genotypische Identifizierung
30	ESBL	TEM-101
31	AmpC _{hyper} oder AmpC _{Plasmid}	Keine Promotor-Mutationen, TEM-30 (=IRT-2)
38	AmpC _{hyper} oder AmpC _{Plasmid}	AmpC_{hyper} mit 4 Promotor-Mutationen, TEM-1b
56	AmpC _{hyper} oder AmpC _{Plasmid}	3 Promotor-Wobble, CMY-2, TEM-1b

Wie schon angesprochen besteht bei Stamm 31 eine Diskrepanz zwischen phänotypischem und genotypischem Identifizierungsergebnis, was näher untersucht werden sollte. Des Weiteren hatte die Konjugation von Stamm 56 zwei verschiedene Konjuganten-Typen mit unterschiedlichen β -Laktam-Resistenzen ergeben, weswegen auch hier die β -Laktam-Resistenz näher charakterisiert werden sollte.

3.2.6.1. Charakterisierung der Lokalisation der TEM- β -Laktamase-Gene

Um mehr Informationen über die TEM- β -Laktamasen in den Stämmen zu erhalten, wurden die TEM-Gene aus allen Stämmen noch einmal mittels PCR amplifiziert. Als Template wurden die unter 3.2.2.1. gezeigten Plasmid-Präparationen eingesetzt. Dabei wurde festgestellt, dass in Stamm 31 das TEM-30-Gen nur von Aufkochpräparaten, die Chromosom enthalten, nicht aber von Plasmid-Präparationen amplifiziert werden konnte. Das Gen muss also auf dem Chromosom kodiert sein. Alle anderen TEM-Gene konnten vom Plasmid amplifiziert werden.

Die Ergebnisse für Stamm 56 und seine Konjuganten sind in Abbildung 3.4 dargestellt:

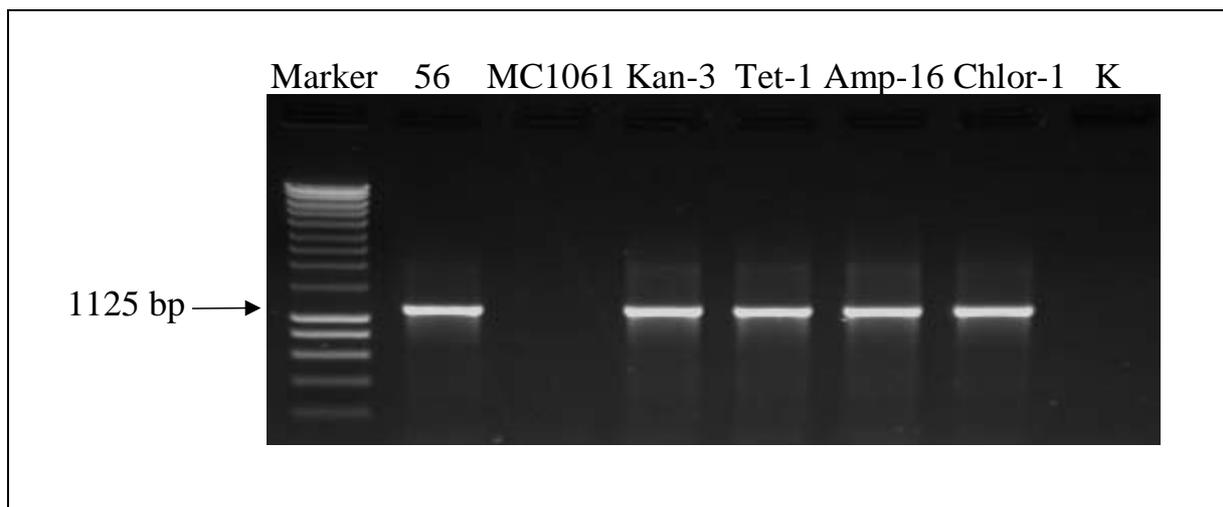
Abb. 3.4 PCR zum Nachweis von *bla*_{TEM} in Stamm 56 und seinen Konjuganten

Das Gen für die TEM- β -Laktamase wurde vom Donor Stamm 56 nur auf Konjuganten des Typs A wie Kan3, nicht aber auf die Typ-B-Konjuganten übertragen. Dieses Ergebnis stimmt mit der Beobachtung überein, dass Typ-A-Konjuganten mehr β -Laktam-Resistenz exprimieren als Typ-B-Konjuganten. Da der Konjugant Kan3 das selbe Plasmid wie die anderen Konjuganten besitzt, ist zu vermuten, dass das TEM-Gen während der Konjugation Plasmid-lokalisiert war und anschließend ins Chromosom inseriert ist.

3.2.6.2. Überprüfung der CMY- β -Laktamase-Gene

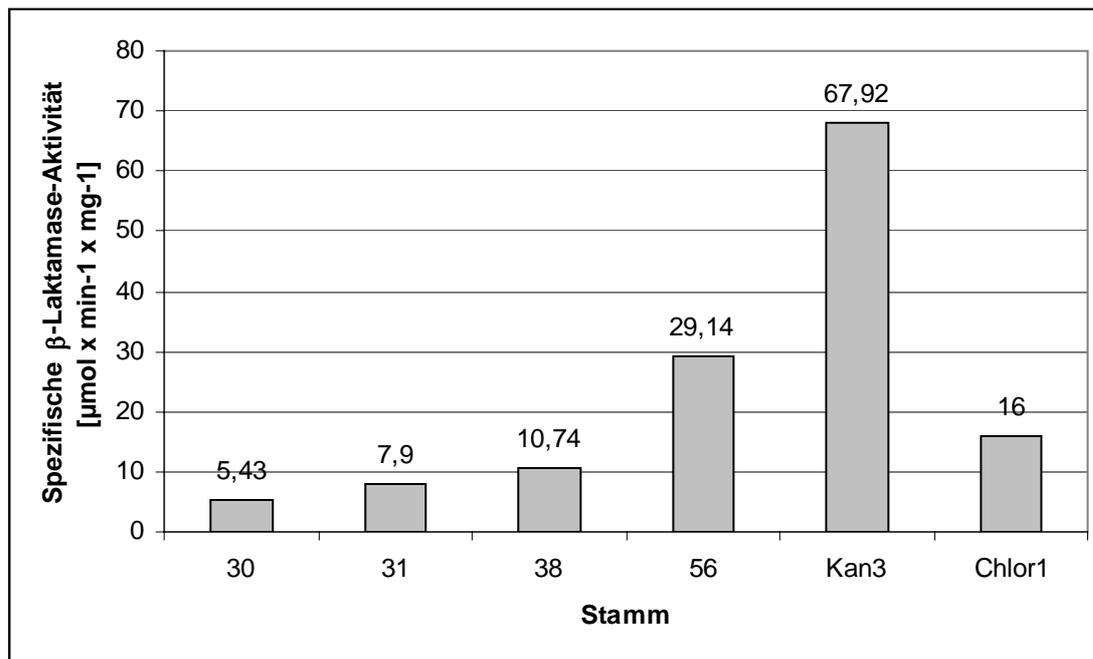
Um die Lokalisierung des CMY-Gens in Stamm 56 und seinen Konjuganten zu überprüfen, wurde eine CMY-spezifische PCR mit Plasmid-Präparationen von Stamm 56 und den Konjuganten durchgeführt. Abbildung 3.5 zeigt, dass das CMY-Gen auf alle Konjuganten übertragen wurde und somit auf dem großen konjugativen Plasmid von Stamm 56 liegt.

Abb. 3.5 PCR-Nachweis von CMY-Genen in Stamm 56 und seinen Konjuganten



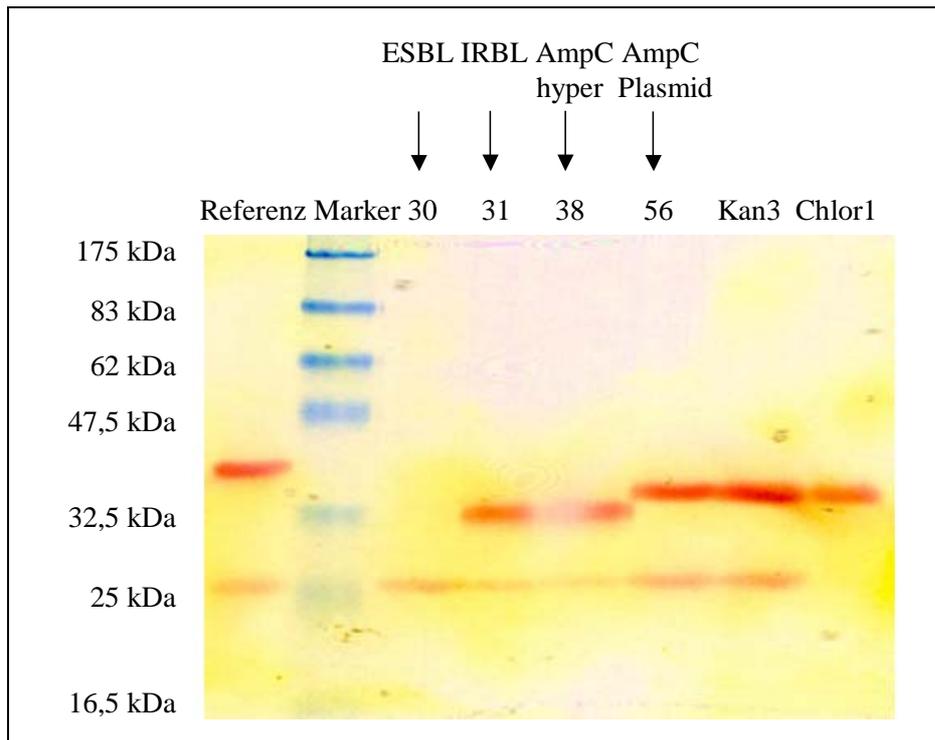
3.2.6.3. Spezifische β -Laktamase-Aktivität

Um die β -Laktamasen auch auf Proteinebene untersuchen zu können, wurden von allen Stämmen sowie zwei Konjuganten von Stamm 56 β -Laktamase-Rohextrakte hergestellt. Die spezifischen β -Laktamase-Aktivitäten sind in Abbildung 3.6 dargestellt. Auffällig ist, dass der Konjugant Kan3 eine wesentlich höhere Aktivität zeigt als der Konjugant Chlor1 und sogar höher liegt als der Donor 56.

Abb. 3.6 Spezifische β -Laktamase-Aktivität [$\mu\text{mol} \times \text{min}^{-1} \times \text{mg}^{-1}$]

3.2.6.4. SDS-PAGE und Detektion der β -Laktamasen durch Nitrocefin

Zur Darstellung der β -Laktamasen wurden die β -Laktamase-Rohextrakte mit Hilfe einer SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend mit Nitrocefin angefärbt. Als Referenz wurde ein Gemisch aus AmpC (39,2 kDa) und TEM-1 (28,9 kDa) mitgeführt. Abbildung 3.7 zeigt die angefärbte SDS-PAGE. Man sieht deutlich, dass die kleineren TEM β -Laktamasen im Gel schneller laufen als die größeren AmpC- β -Laktamasen. Bei Stamm 30 ist ersichtlich, dass die chromosomale AmpC- β -Laktamase von *E. coli* im Normalfall kaum exprimiert wird. Sie ist bei Stamm 30 (ESBL) nicht als Bande erkennbar, man sieht nur die unten liegende TEM-Bande. Auffällig ist jedoch, dass bei Stamm 31 (IRBL) eine deutliche AmpC-Bande sichtbar ist. Sie befindet sich auf der selben Höhe und ist ähnlich stark wie die AmpC-Bande von Stamm 38, von dem durch Sequenzierung bekannt ist, dass er seine chromosomale AmpC- β -Laktamase hyperproduziert. Da die phänotypische Identifizierung für Stamm 31 aber AmpC_{hyper} lautete und die Detektion der IRBL eher unerwartet war, kann man aus diesem Bild schließen, dass Stamm 31 zusätzlich zur IRBL auch das chromosomale AmpC hyperproduziert. Da die Promotor-Sequenzierung keine Mutationen aufzeigte, beruht die Hyperproduktion wahrscheinlich auf einer Gen-Amplifikation. Die SDS-PAGE bestätigt außerdem das unter 3.2.6.1. gezeigte Ergebnis, dass der Typ-A-Konjugant Kan3 eine β -Laktamase mehr exprimiert als die Typ B Konjuganten (hier durch Chlor1 vertreten).

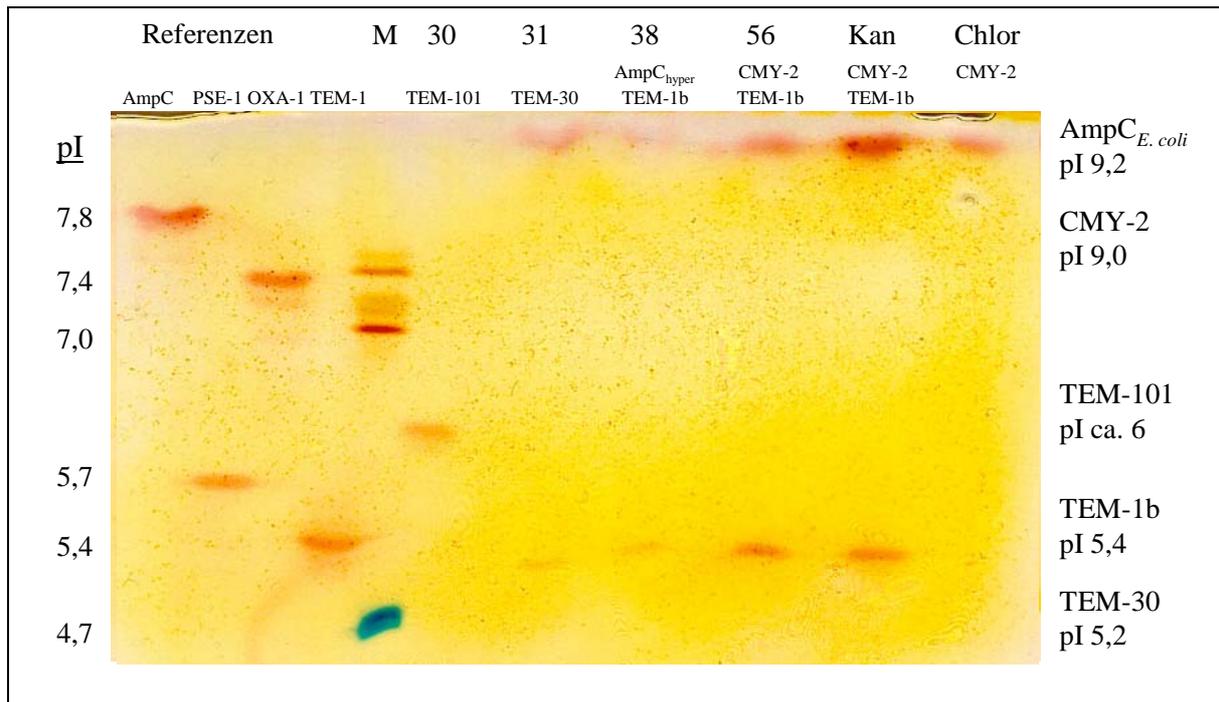
Abb. 3.7 SDS-PAGE mit Nitrocefin-Färbung zur Detektierung der β -Laktamasen

links: Angabe des Molekulargewichts der Markerbanden in kDa

3.2.6.5. Isoelektrische Fokussierung der β -Laktamasen

Zur Bestimmung des isoelektrischen Punkts (pI) der neuen β -Laktamase TEM-101 und zur Überprüfung, ob die untersuchten Stämme zusätzliche β -Laktamasen enthielten, wurde mit den β -Laktamase-Rohextrakten und einigen Referenzstämmen eine isoelektrische Fokussierung mit anschließender Nitrocefin-Färbung durchgeführt. In der in Abbildung 3.7 gezeigten SDS-PAGE können keine verschiedenen TEM- β -Laktamasen voneinander unterschieden werden, da sie die gleiche Größe haben. Auch andere β -Laktamasen wie PSE-1 und OXA-1 würden kaum von TEM unterscheidbar sein, da sie mit 28,5 kDa und 29,2 kDa fast gleich groß sind. In der isoelektrischen Fokussierung werden die Proteine auf Grund ihrer pI-Werte aufgetrennt. Hierbei unterscheiden sich die verschiedenen TEM-Allele, SHV-, PSE- und OXA- β -Laktamasen.

Abbildung 3.8 zeigt die Ergebnisse der isoelektrischen Fokussierung nach Anfärbung mit Nitrocefin. Für TEM-101 lässt sich ein pI von ungefähr 6 bestimmen. Dies stimmt mit dem theoretischen pI-Wert von 5,92 gut überein, der sich nach Abspaltung des Signalpeptids berechnen lässt (<http://www.expasy.org>). Es konnten zusätzlich zu den schon bekannten keine weiteren β -Laktamasen detektiert werden.

Abb. 3.8 Isoelektrische Fokussierung der β -Laktamasen

links: pI-Werte der Referenz- β -Laktamasen, sowie der Markerbanden
rechts: pI-Werte der untersuchten β -Laktamasen

3.2.7. Charakterisierung der Chinolon-Resistenz

3.2.7.1. Untersuchung der QRDRs von *gyrA* und *parC*

Da die Gyrase bei *E. coli* das primäre Ziel der Chinolone ist und Mutationen in der A-Untereinheit die häufigste Ursache für Chinolon-Resistenz sind (Heisig, 1996), wurde die QRDR des *gyrA*-Gens in allen vier Stämmen mit spezifischen Primern in einer PCR amplifiziert und anschließend sequenziert. Das Sekundärziel der Chinolone ist bei *E. coli* die Topoisomerase IV. Da Mutationen in der ParC-Untereinheit zu zusätzlicher Chinolon-Resistenz führen können, wurde auch die QRDR von *parC* in einer PCR amplifiziert und anschließend sequenziert.

Tabelle 3.11 zeigt die Aminosäure-Austausche, die aus den in den Sequenzen detektierten Mutationen der Stämme resultieren, in Relation zur *E. coli* K12-Sequenz. Die Aminosäure-Austausche korrelieren gut mit den gemessenen MHK-Werten. So hat *gyrA* von Stamm 30 eine Mutation, die zu einem Aminosäure-Austausch führt, was sich in der verminderten Ciprofloxacin-Empfindlichkeit widerspiegelt. Die drei Chinolon-resistenten Stämme 31, 38 und 56 haben jeweils drei Punktmutationen, zwei in *gyrA* und eine in *parC*, die zu Aminosäure-Austauschen führen.

Tab. 3.11 Aminosäure-Austausche in den QRDRs von GyrA und ParC der untersuchten Stämme

	Position	Stamm 30	Stamm 31	Stamm 38	Stamm 56
Ciprofloxacin-MHK		0,25 µg/ml	8 µg/ml	16 µg/ml	16 µg/ml
GyrA	Codon Ser83	Ser	Leu	Leu	Leu
	Codon Asp87	Tyr	Asn	Asn	Asn
ParC	Codon Ser80	Ser	Ser	Ile	Ile
	Codon Glu84	Glu	Lys	Glu	Glu

3.2.7.2. Nachweis von *qnr*

Neben der chromosomal kodierten Chinolon-Resistenz durch Mutationen in *gyrA* und *parC* sind in letzter Zeit auch Stämme mit Plasmid-kodierter *qnr*-vermittelter Chinolon-Resistenz beschrieben worden. Um diese Möglichkeit zu untersuchen, wurden alle vier Stämme in eine PCR mit *qnr*-spezifischen Primern eingesetzt. Es konnte allerdings kein *qnr* nachgewiesen werden.

3.2.8. Untersuchung des MAR-Phänotyps

3.2.8.1. Sequenzierung von *marOR*

Die untersuchten Stämme zeigten neben Chinolon-Resistenz auch eine verminderte Empfindlichkeit gegenüber Chloramphenicol und Tetracyclinen auf (vgl. Tab. 3.4.). Um eine mögliche Ursache des MAR-Phänotyps zu untersuchen, wurde der *marOR*-Bereich des *mar*-Operons mit spezifischen Primern in einer PCR amplifiziert und sequenziert.

Abb. 3.9 Amplifikation des *marOR*-Gen-Bereichs in den untersuchten Stämmen

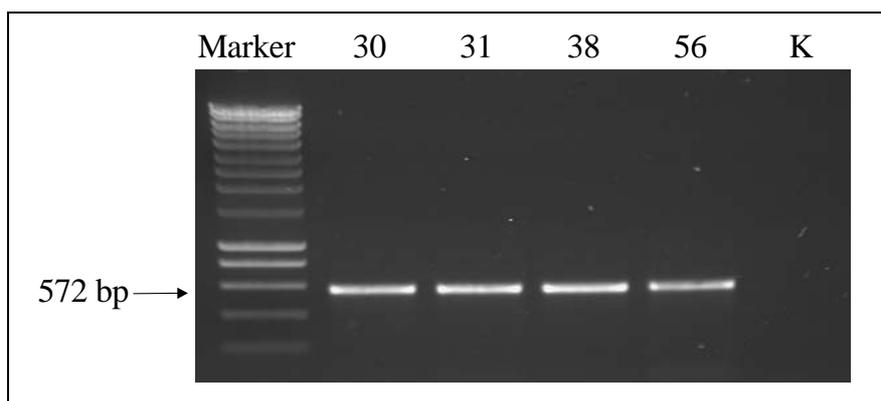


Abbildung 3.9 zeigt die PCR-Ergebnisse des *marOR*-Bereichs. Visuell sind keine Deletionen zu erkennen. Die Sequenzierung der PCR-Produkte ergab ebenfalls keine Deletionen. Es konnten allerdings zwei Mutationen festgestellt werden: Bei Stamm 31 liegt eine Mutation in *marO* an Position -38 des Promotors vor, bei Stamm 38 liegt eine Mutation in *marR* vor, welche zu einem Aminosäure-Austausch an Position 76 führt (Asp → Gly).

Abb. 3.10 MarR-Bindestellen in *marO* (Martin & Rosner, 1995)

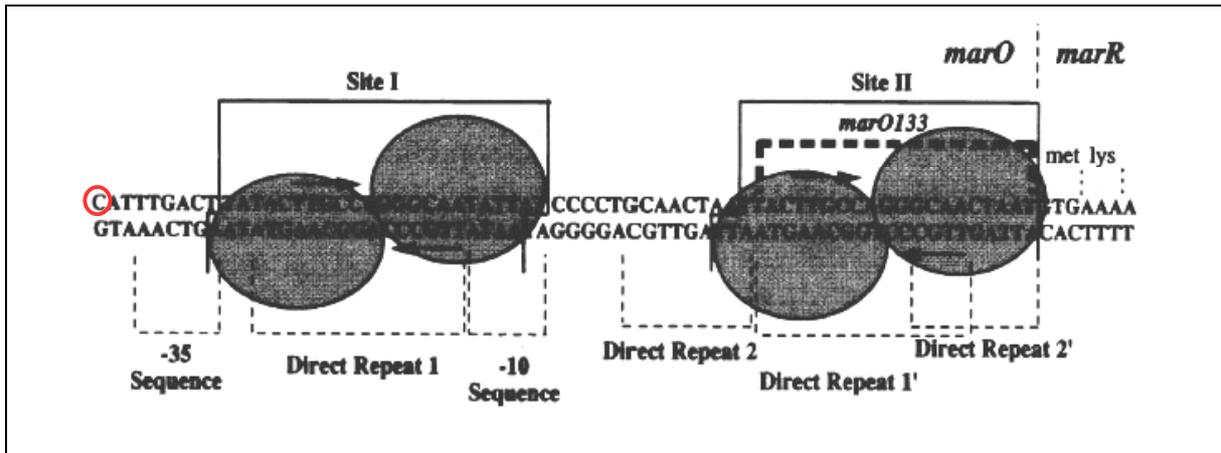


Abbildung 3.10 zeigt den Promotor-Bereich von *marO* mit den MarR-Bindestellen (schwarze Kreise). Das rot markierte Cytosin ist in Stamm 31 durch ein Thymin ersetzt. Die Mutation befindet sich zwar außerhalb der MarR-Bindestelle und der -35-Sequenz des Promotors, eine Rolle bei der Ausprägung des MAR-Phänotyps kann aber auf Grund der unmittelbaren Nähe nicht ausgeschlossen werden.

Abb. 3.11 Helix-Turn-Helix-Motive in MarR (Alekhshun et al., 2000)

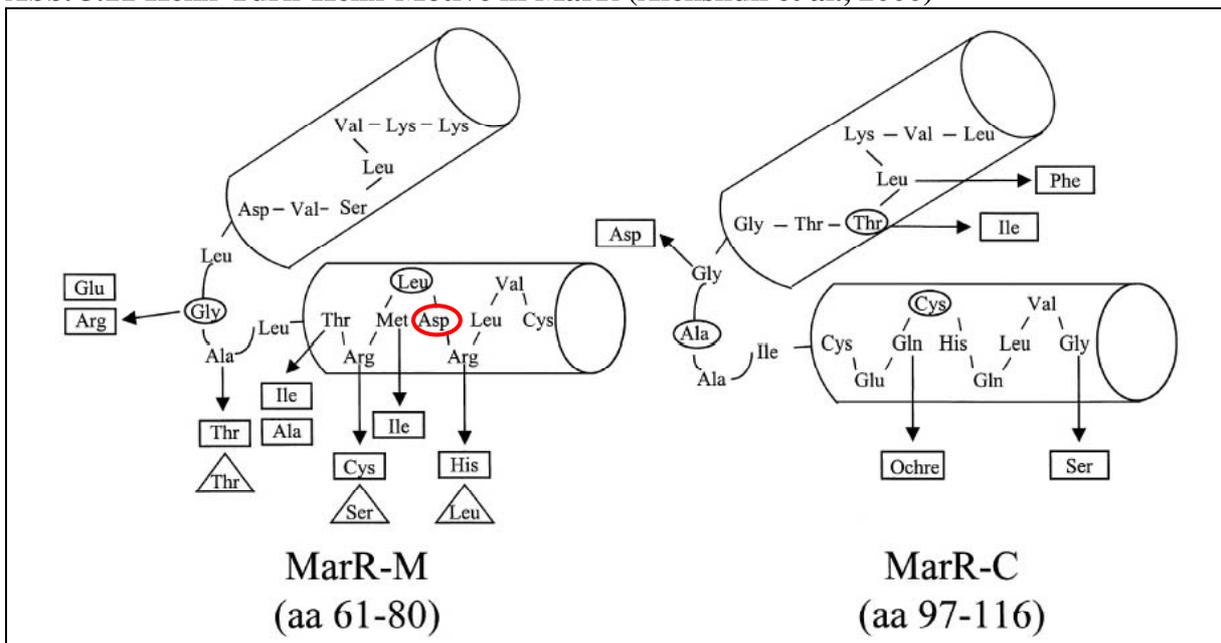


Abbildung 3.11 zeigt die postulierten Helix-Turn-Helix-Bereiche von MarR mit den Aminosäure-Austauschen, von denen bekannt ist, dass sie zum MAR-Phänotyp führen (Kästen oder Dreiecke). Helix-Turn-Helix Motive sind in verwandten Proteinen für die DNA-Bindfähigkeit und somit für die Aktivität von Repressor-Proteinen verantwortlich. Es ist daher wahrscheinlich, dass Mutationen in diesem Bereich von MarR zum MAR-Phänotyp führen, weil MarR nicht mehr an *marO* binden kann und somit *marA* konstitutiv exprimiert wird (Aleksun et al., 2000). Das in Abb. 3.11 rot markierte Aspartat ist in Stamm 38 durch ein Glycin ersetzt. Da sich dieser Aminosäure-Austausch an einer Stelle im Helix-Turn-Helix-Motiv befindet, an der auch andere MAR-relevante Mutationen beschrieben worden sind, ist zu vermuten, dass diese Mutation in Stamm 38 einen MAR-Phänotyp verursacht. Diese Vermutung wird von der Beobachtung von Komp Lindgren et al. unterstützt, die ein multiresistentes *E.-coli*-Isolat mit der Asp76Gly-Mutation fanden, das Lösungsmittel-resistent war (2003).

3.2.8.2. Bestimmung der Lösungsmittel-Toleranz auf festem Medium

Organische Lösungsmittel können für Bakterien toxisch sein. Der Mechanismus der Toxizität ist nicht genau bekannt, aber der Zelltod scheint mit der Akkumulation des Lösungsmittels und der Zerstörung der Zellmembran in Zusammenhang zu stehen. Die Toxizität eines Lösungsmittels ist invers proportional zu dem Logarithmus der Partition in n-Octanol-Wasser ($\log P_{OW}$ -Wert, $P_{OW} = C_{Octanol}/C_{Wasser}$). Das Lösungsmittel mit dem niedrigsten $\log P_{OW}$, bei dem eine Spezies noch wachsen kann, wird als Index-Lösungsmittel für diese Spezies bezeichnet. Für *E. coli* ist das Index-Lösungsmittel n-Hexan ($\log P_{OW}$ 3.9); Cyclohexan ($\log P_{OW}$ 3.4) und n-Pentan ($\log P_{OW}$ 3.3) sind für *E. coli* normalerweise toxisch. Mutationen im *mar*-Locus und anderen Genen, die zur Überexpression der AcrAB-Efflux-Pumpe führen, vermitteln auch Resistenz gegenüber bestimmten organischen Lösungsmitteln wie Cyclohexan und Pentan (Asako et al., 1997; White et al., 1997).

Um die Auswirkung der unter 3.5.4.1. beschriebenen Mutationen im *mar*-Locus zu überprüfen, sowie um zu sehen, ob es noch weitere Mutationen außerhalb von *marOR* geben könnte, wurde die Lösungsmittel-Toleranz auf festem Medium bestimmt. Als Kontrolle wurde das unter 3.2.3. beschriebene sensible klinische Isolat WT mitgeführt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3.12 dargestellt. Von den untersuchten Stämmen zeigten Stamm 38 und 56 ausgeprägte Toleranz gegenüber n-Pentan. Die Mutation in Stamm 31 scheint also keinen Einfluss auf die Bindfähigkeit von MarR und somit auf den MAR-Phänotyp zu haben. Die

Mutation in Stamm 38 dürfte hingegen zum MAR-Phänotyp führen. Des weiteren scheint in Stamm 56 außerhalb von *marOR* eine MAR-verursachende Mutation vorzuliegen.

Tab. 3.12 Lösungsmitteltoleranz-Versuch auf festem Medium

Medium	30	31	38	56	WT
LBGMg-Agar	+++ +++	+++ +++	+++ +++	+++ +++	+++ +++
LBGMg-Agar + n-Hexan	+++ +++	+++ +++	+++ +++	+++ +++	+++ +++
LBGMg-Agar + n-Pentan	+ +	+ +	+++ +++	+++ +++	- -

+++ konfluentes Wachstum, + ≤ 100 Kolonien, - kein Wachstum

3.2.8.3. Bestimmung des Einflusses des Efflux-Pumpen-Inhibitors MC-207,110

Da der MAR-Phänotyp und die damit assoziierte Lösungsmittel-Toleranz unter anderem auf gesteigerten Efflux durch Überexpression der Pumpe AcrAB zurück zu führen ist, sollte auch der Einfluss von Effluxpumpen auf andere Antibiotika untersucht werden. Dazu wurden Versuche mit dem Breitspektrum-Effluxpumpen-Inhibitor MC-207,110 (Phe-Arg- β -Naphthylamid, PA β N) durchgeführt. Der Vergleich der MHK-Werte mit und ohne Inhibitor ist in Tabelle 3.13 dargestellt:

Tab. 3.13 Effluxpumpen-Inhibitor-Versuch (MHK-Werte in $\mu\text{g/ml}$)

Antibiotikum	30	31	38	56	ATCC 25922
Amikacin	4	2	4	16	4
Amikacin + PA β N	4	1	2	8	1
Gentamicin	8	0,5	32	4	0,5
Gentamicin + PA β N	8	0,5	64	2	0,5
Kanamycin	> 256	> 256	4	> 256	2
Kanamycin + PA β N	> 256	> 256	8	> 256	4
Netilmicin	16	0,5	4	4	0,5
Netilmicin + PA β N	16	0,25	8	2	0,5
Neomycin	128	32	2	> 256	1
Neomycin + PA β N	128	32	1	256	1
Tobramycin	8	0,5	2	2	0,25
Tobramycin + PA β N	8	0,25	2	1	0,25

Fortsetzung Tab. 3.13 Effluxpumpen-Inhibitor-Versuch (MHK-Werte in µg/ml)

Antibiotikum	30	31	38	56	ATCC 25922
Apramycin	4	2	4	32	2
Apramycin + PAβN	2	4	4	16	4
Streptomycin	8	64	128	> 256	4
Streptomycin + PAβN	8	32	256	> 256	4
Tetracyclin	2	2	> 64	> 64	1
Tetracyclin + PAβN	2	2	16	16	1
Doxycyclin	4	2	64	32	1
Doxycyclin + PAβN	1	1	32	16	0,5
Minocyclin	2	2	16	16	0,5
Minocyclin + PAβN	0,25	0,25	2	1	0,125
Chloramphenicol	> 128	> 128	> 128	> 128	4
Chloramphenicol + PAβN	64	64	128	64	2

Antibiotika, bei denen eine reproduzierbare Reduktion der MHK mit PAβN zu beobachten ist, sind grau markiert

Es überrascht nicht, dass die MHK-Werte von Tetracyclinen und Chloramphenicol durch Hemmung der Efflux-Pumpen herabgesetzt wurden. Diese Antibiotika werden durch AcrAB aus der Zelle wieder herausgepumpt und bei Hemmung von AcrAB verbleibt mehr Antibiotikum in der Zelle. Bei den Tetracyclinen kommt hinzu, dass der Haupt-Resistenzmechanismus die Ausbildung von Tet-Effluxpumpen ist. Da die Stämme 38 und 56 diese Pumpen exprimieren und die Abnahme bei allen Tetracyclinen hier sehr deutlich ist, scheinen diese Efflux-Pumpen auch durch PAβN hemmbar zu sein. Die Abnahme der MHK um drei Stufen bei Minocyclin + PAβN in allen Stämmen ist allerdings beachtlich. Auffällig ist die reproduzierbare Abnahme der MHK von fast allen Aminoglykosiden + PAβN bei Stamm 56. Hydrophile Aminoglykoside können nicht durch AcrAB aus der Zelle herausgepumpt werden.

3.2.9. Untersuchung der Aminoglykosid-Resistenz

Die Aminoglykosid-Resistenzen der einzelnen Stämme sind zur Übersicht noch einmal in Tabelle 3.14 dargestellt. Da alle vier Stämme und die beiden Konjuganten-Typen von Stamm 56 unterschiedliche Resistenzprofile haben, ist davon auszugehen, dass sie auch unterschiedliche Gene für Aminoglykosid-modifizierende Enzyme besitzen. Um aber sicher

zu gehen, dass keine nicht exprimierten Gene vorhanden sind, wurden alle PCRs mit allen Stämmen durchgeführt.

Tab. 3.14 Aminoglykosid-Resistenz (MHK-Werte in µg/ml)

	30	31	38	56	Kan3	Amp16
Amikacin	2	2	4	16	4	4
Gentamicin	8	1	64	8	1	1
Netilmicin	16	1	16	8	2	2
Tobramycin	16	2	8	8	2	2
Kanamycin	> 256	> 256	8	> 256	> 256	8
Neomycin	64	128	2	256	128	4
Streptomycin	8	128	256	> 256	> 256	> 256
Spectinomycin	8	256	128	> 256	> 256	> 256

Hellgrau: klinisch intermediär, dunkelgrau: klinisch resistent

3.2.9.1. Aminoglykosid-Multiplex-PCR

Tabelle 3.15 gibt eine Übersicht über die Gene Aminoglykosid-modifizierender Enzyme, die mittels Multiplex-PCR detektiert werden können. Ebenfalls enthalten sind die erwarteten Größen des PCR-Produkts, die Resistenz, die von dem jeweiligen Gen vermittelt wird (Shaw et al., 1993), sowie die Stämme, bei denen dieses Gen auf Grund der MHK vorkommen könnte.

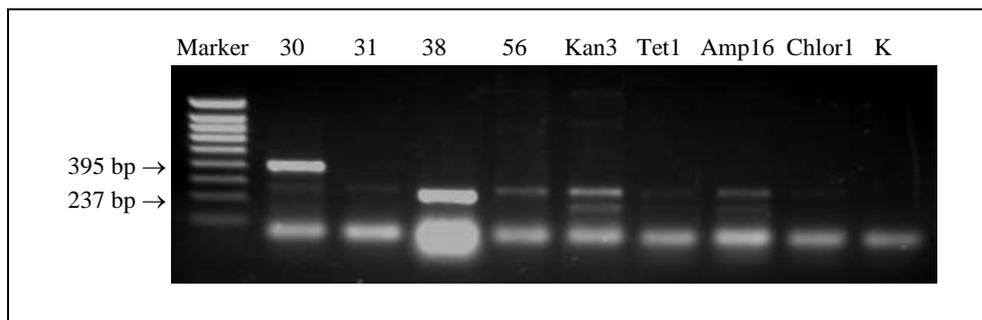
Tab. 3.15 Aminoglykosid-Multiplex-PCR

Gen	Fragment	Resistenz	Stämme			
<i>ant(4′)-IIa</i>	567 bp	Ami ^R , Tob ^R				56
<i>ant(2′′)-Ia</i>	446 bp	Gen ^R , Tob ^R , Kan ^R	30			56
<i>aac(6′)-Ib</i>	395 bp	Ami ^R oder Gen ^R , Tob ^R , Net ^R , Kan ^R	30			56
<i>aac(3)-IVa</i>	286 bp	Gen ^R , Tob ^R , Net ^R	30		38	56
<i>aac(3)-IIIc</i>	237 bp	Gen ^R , Tob ^R , Net ^R	30		38	56
<i>aac(3)-Ia</i>	158 bp	Gen ^R	30		38	56

Die Ergebnisse der Multiplex-PCR sind in Abbildung 3.12 dargestellt. Ein *aac(6′)-Ib*-Gen konnte in Stamm 30 nachgewiesen werden (vgl. 3.2.13.1.), in Stamm 38 wurde ein *aac(3)-II*-Gen detektiert. Die Sequenzierung ergab, dass es sich bei dem *aac(6′)-Ib*-Gen um *aac(6′)-Ib₇*

handelt, einem Gen, welches aufgrund einer Mutation an Aminosäure-Position 119 statt Amikacin-Resistenz Gentamicin-Resistenz vermittelt (Casin et al., 1998). Das Gen in Stamm 38 kann nicht näher bezeichnet werden, da die Bezeichnungen *aac(3)-IIa*, *-IIc*, *aacC2*, *aacC3* recht wahllos für drei verschiedene, verwandte Gene benutzt werden. Es ist aber bis auf einen Wobble identisch mit dem Gentamicin-Resistenz-Gen aus *Serratia marcescens*, das unter der Accession Number L22613 in der GenBank hinterlegt ist (Jung et al., 1994).

Abb. 3.12 Ergebnisse der Aminoglykosid-Multiplex-PCR

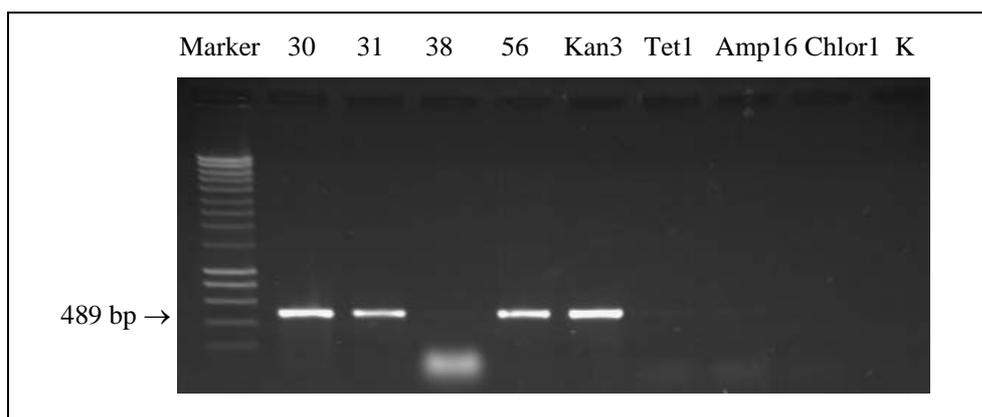


Einzel-PCRs ergaben, dass die Banden in den anderen Stämmen keinem der hier getesteten Gene zugeordnet werden konnten. Es scheint sich um eine unspezifische Bindung der Primer zu handeln.

3.2.9.2. *aph(3')*-I-PCR

Die Stämme 30, 31, 56, sowie der Typ-A-Konjugant von Stamm 56, Kan3, sind Kanamycin- und Neomycin-resistent. Bei Gram-negativen Bakterien wird dieser Phänotyp sehr häufig von der Phosphotransferase *Aph(3')*-I verursacht (Shaw et al., 1993), weswegen mit allen Stämmen eine *aph(3')*-I-PCR durchgeführt wurde. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.13 dargestellt:

Abb. 3.13 Nachweis von *aph(3')*-I in den untersuchten Stämmen



Die Sequenzierung der PCR-Produkte ergab, dass die Stämme 30 und 56 (und Kan3) ein *aph(3')-Ia*-Gen (= *aphA1*) besitzen. In Stamm 31 konnte entweder *aph(3')-Iab* oder *aph(3')-Ic* nachgewiesen werden. Für eine genauere Identifizierung des Gens müsste es vollständig sequenziert werden. Das *aphA1*-Gen wurde vom Donorstamm 56 nur auf Konjuganten des Typs A wie Kan3, nicht aber auf die Typ-B-Konjuganten übertragen. Dieses Ergebnis stimmt mit den beobachteten MHK-Werten überein. Da der Konjugant Kan3 das selbe Plasmid wie die anderen Konjuganten besitzt, ist zu vermuten, dass *aphA1* wie das TEM-1b-Gen während der Konjugation Plasmid-lokalisiert war und anschließend ins Chromosom insertiert ist.

3.2.9.3. *strA*-*strB*-PCR

Zwei weitere Gene, die für Aminoglykosid-modifizierende Enzyme kodieren, sind *strA* (*aph(3'')-Ib*) und *strB* (*aph(6)-Id*), die beide Streptomycin-Resistenz vermitteln. Sie wurden bei Untersuchungen des Plasmids RSF1010 identifiziert (Scholz et al., 1989). Da RSF1010 in vielen Spezies angetroffen werden kann (es gehört zu den sog. „broad-host-range“ Plasmiden), wurden PCRs zur Detektion von *strA* und *strB* in allen Stämmen durchgeführt. Die Ergebnisse sind in den Abbildungen 3.14 und 3.15 dargestellt.

Abb. 3.14 Nachweis von *strA* durch PCR

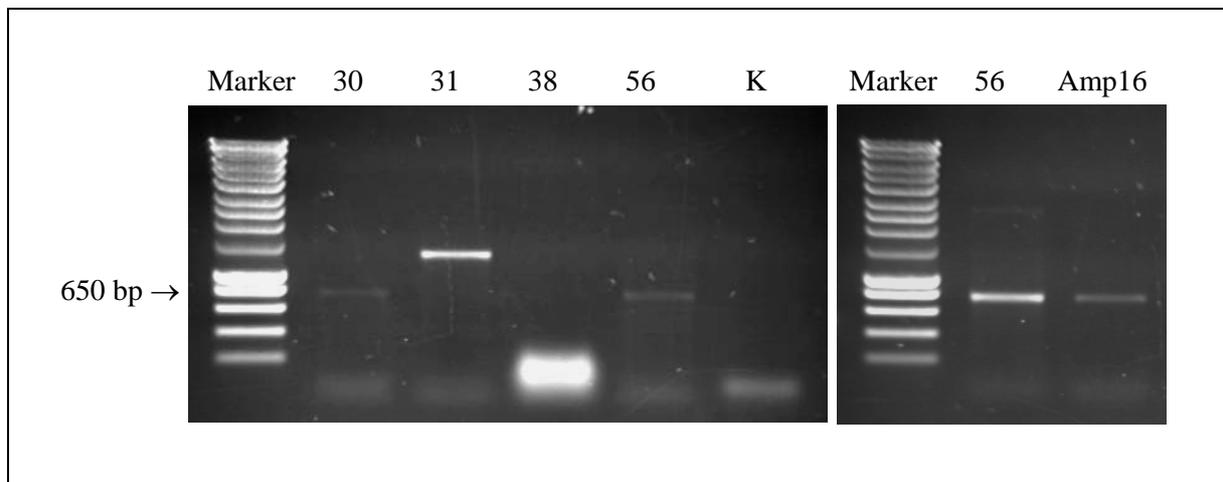
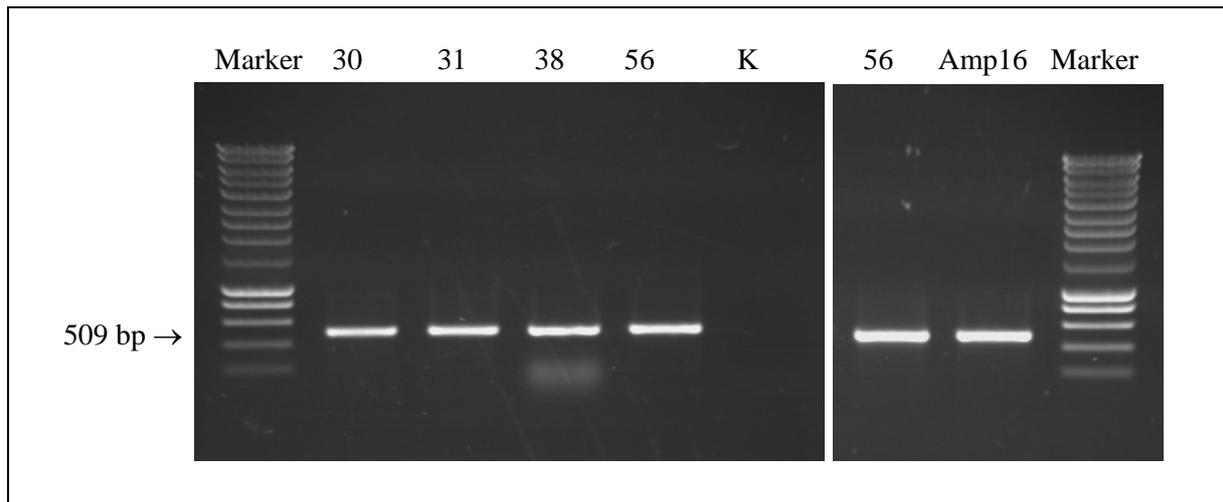
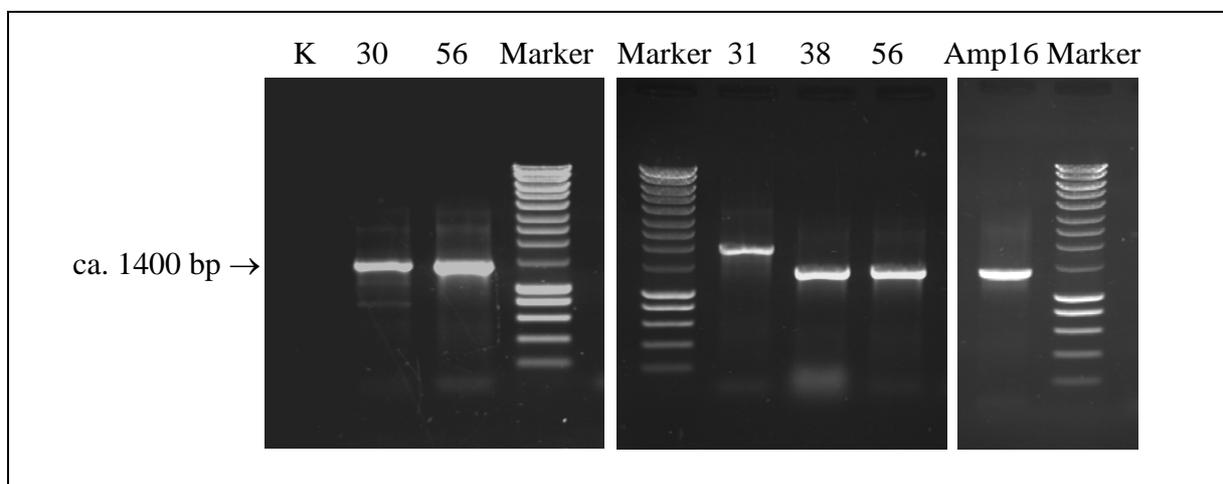


Abb. 3.15 Nachweis von *strB* durch PCR

In den Stämmen 30 und 56 sowie Amp16 (stellvertretend für alle Konjuganten) konnte *strA* nachgewiesen werden. In Stamm 31 konnte auch eine spezifische Bande erzeugt werden, die aber 600 – 700 bp größer als das erwartete PCR-Produkt ist.

Das *strB*-Gen konnte in allen Stämmen und Konjuganten nachgewiesen werden. Auffällig ist, dass beide Gene auch im Streptomycin-empfindlichen Stamm 30 detektiert wurden.

Da die *strA*- und *strB*-Gene fast immer gekoppelt auftreten, wurde eine Mapping-PCR mit dem *strA*-F und *strB*-R Primer in allen Stämmen durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.16 dargestellt. In allen Stämmen konnte eine Kopplung *strA*→*strB* festgestellt werden, sogar in Stamm 38, bei dem *strA* nicht einzeln nachgewiesen werden konnte. Die Größe des PCR-Produkts von ca. 1400 bp entspricht der erwarteten Größe. Bei RSF1010 würde ein PCR-Produkt von 1387 bp entstehen. Bei Stamm 31 ist das PCR-Produkt wie schon bei der *strA*-PCR ca. 700 bp größer.

Abb. 3.16 Ergebnisse der *strA*-*strB*-Mapping-PCRs

3.2.9.4. *ant(3'')*-I-Nachweis

Im Rahmen der Integron-Analysen (vgl. 3.2.13.1.) wurden auch *ant(3'')*-I-Gene nachgewiesen, die Resistenz gegenüber Streptomycin und Spectinomycin vermitteln. In Stamm 31 wurde ein *ant(3'')*-Ia (=aadA1) Gen detektiert, in Stamm 38 *ant(3'')*-Ie (=aadA5), in Stamm 56 und den Konjuganten *ant(3'')*-Ib (=aadA2).

Die Ergebnisse aller Aminoglykosid-Resistenzgen-Nachweise sind in Tabelle 3.16 zusammengefasst:

Tab. 3.16 Aminoglykosid-Resistenz-Übersicht

	30	31	38	56	Kan3	Amp16
Amikacin						
Gentamicin	aac(6')-Ib ₇		aac(3)-II			
Netilmicin	aac(6')-Ib ₇		aac(3)-II			
Tobramycin	aac(6')-Ib ₇	(aph(3')-Iab/c)	aac(3)-II			
Kanamycin	aph(3')-Ia	aph(3')-Iab/c		aph(3')-Ia	aph(3')-Ia	
Neomycin	aph(3')-Ia	aph(3')-Iab/c		aph(3')-Ia	aph(3')-Ia	
Streptomycin	strA, strB	aadA1, strA, strB	aadA5, strA, strB	aadA2, strA, strB	aadA2, strA, strB	aadA2, strA, strB
Spectinomycin		aadA1	aadA5	aadA2	aadA2	aadA2

Hellgrau: klinisch intermediär, dunkelgrau: klinisch resistent

In Stamm 56 konnten keine Gene nachgewiesen werden, die für die Gentamicin-, Netilmicin-, Tobramycin-Resistenz und verminderte Empfindlichkeit gegenüber Amikacin verantwortlich wären. Da die Resistenz aber nicht übertragbar war und die MHK-Werte mit PAßN reproduzierbar um eine Stufe niedriger waren (vgl. 3.2.8.3.), wird sie wahrscheinlich durch chromosomal kodierten Efflux verursacht, eventuell im Rahmen des MAR-Phänotyps.

3.2.10. Charakterisierung der Tetracyclin-Resistenz

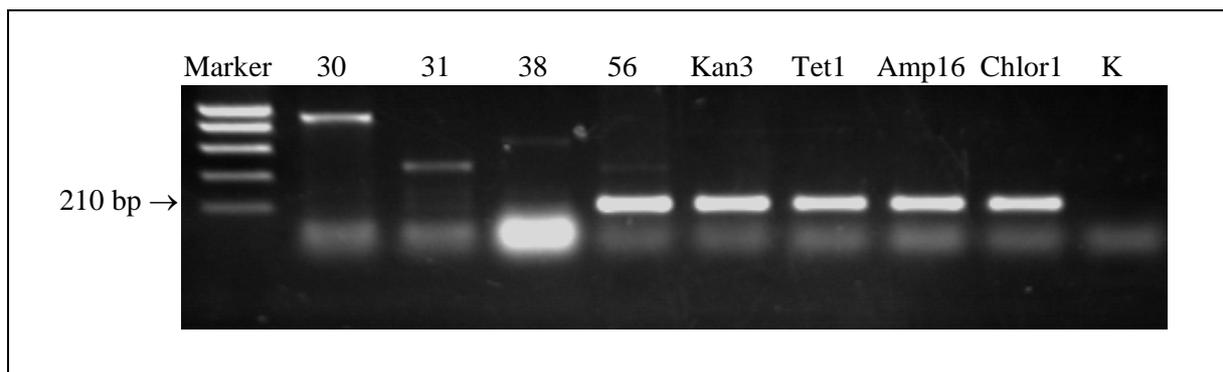
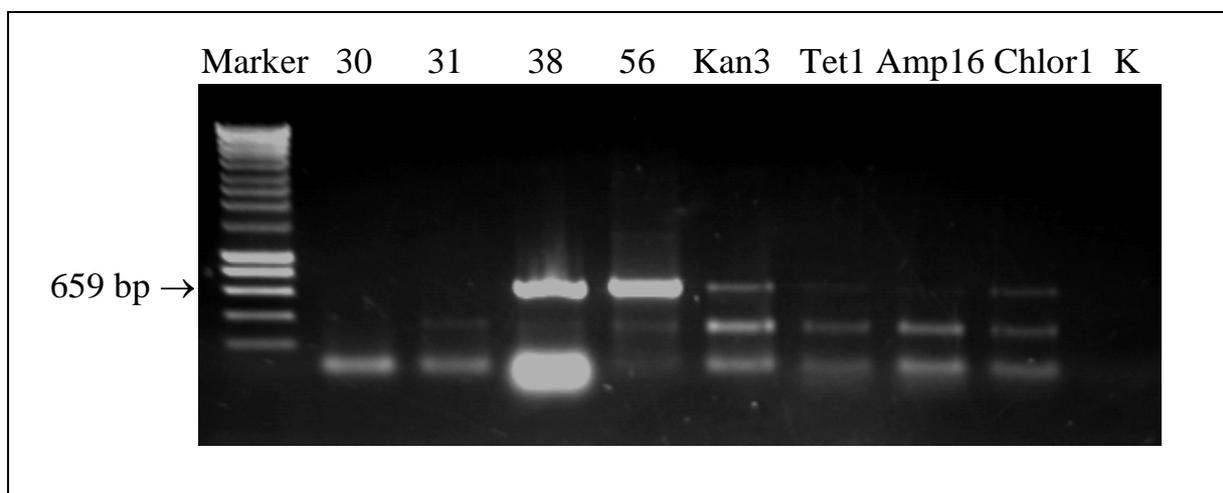
Tabelle 3.17 zeigt eine Übersicht der Tetracyclin-MHK-Werte aller Stämme. Die Tetracyclin-Resistenz ist in den Stämmen 38 und 56 wesentlich stärker ausgeprägt als bei 30 und 31. Da nur ein Teil der Resistenz von Stamm 56 auf die Konjuganten übertragen wird, handelt es sich wahrscheinlich um mindestens zwei Resistenzmechanismen.

Tab. 3.17 Tetracyclin-Resistenz (MHK-Werte in µg/ml)

	30	31	38	56	Kan3	Tet1	Amp16	Chlor1	MC1061-4
Tetracyclin	4	4	> 64	> 64	64	64	32	32	2
Doxycyclin	4	4	> 64	64	8	8	4	4	1
Minocyclin	2	2	16	16	1	1	1	1	1

Hellgrau: klinisch intermediär, dunkelgrau: klinisch resistent

Zur Überprüfung der Resistenzmechanismen wurden zwei Multiplex-PCRs zum Nachweis von *tet*-Efflux-Genen durchgeführt. In der ersten PCR können *tet(B)*, *tet(C)*, und *tet(D)* nachgewiesen werden, in der zweiten *tet(A)*, *tet(E)* und *tet(G)*. Da es Probleme mit unspezifischer Bindung der Primer gab, wurden die PCRs auch einzeln durchgeführt. Nur für *tet(A)* und *tet(B)* konnten spezifische PCR-Produkte amplifiziert werden. Die Ergebnisse sind in den Abbildungen 3.17 und 3.18 dargestellt:

Abb. 3.17 Ergebnisse der *tet(A)*-PCR in den untersuchten Stämmen**Abb. 3.18 Ergebnisse der *tet(B)*-PCR in den untersuchten Stämmen**

Die Stämme 30 und 31 besitzen keine *tet*-Gene, was wegen der niedrigen MHK-Werte (nur eine Stufe höher als die des Laborstamms MC1061-4) zu erwarten war. Stamm 38 hat ein *tet(B)*-Gen, welches Resistenz gegen Tetracyclin, Doxycyclin und Minocyclin verursacht. Stamm 56 besitzt zwei *tet*-Gene, *tet(A)* und *tet(B)*. Resistenz gegenüber Tetracyclin und Doxycyclin wird von beiden Genen vermittelt, Minocyclin-Resistenz nur von *tet(B)* (Chopra et al., 1992). Da nur *tet(A)* auf die Konjuganten übertragen wurde, haben diese weniger ausgeprägte Tetracyclin- und Doxycyclin-Resistenz und keine Minocyclin-Resistenz.

Die Ergebnisse sind in Tabelle 3.18 zusammengefasst:

Tab. 3.18 Tetracyclin-Resistenz-Gene

	30	31	38	56	Kan3	Tet1	Amp16	Chlor1	MC1061-4
Tetracyclin			tet(B)	tet(A), tet(B)	tet(A)	tet(A)	tet(A)	tet(A)	
Doxycyclin			tet(B)	tet(A), tet(B)	tet(A)	tet(A)	tet(A)	tet(A)	
Minocyclin			tet(B)	tet(A), tet(B)					

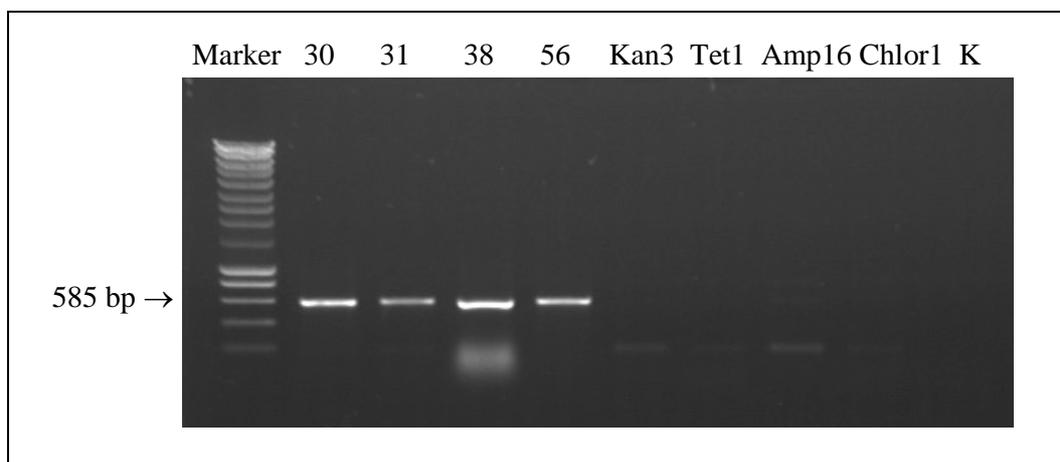
Hellgrau: klinisch intermediär, dunkelgrau: klinisch resistent

3.2.11. Analyse der Chloramphenicol-Resistenz

Da alle vier Stämme und die Konjuganten von Stamm 56 Chloramphenicol-resistent waren, wurden Nachweis-PCRs für *catI*-, *catII*-, *catIII*-, *catB*- und *cml*-Gene geführt, die alle schon in Gram-negativen Bakterien detektiert worden sind und Chloramphenicol-Resistenz verursachen (Vassort-Bruneau et al., 1996; Parent & Roy, 1992; Bissonnette et al., 1991).

In allen Stämmen konnte *catI* nachgewiesen werden, nicht aber in den Konjuganten von Stamm 56 (Abbildung 3.19). Da die Konjuganten aber auch Chloramphenicol-resistent waren, musste es noch einen zweiten Resistenz-Mechanismus geben.

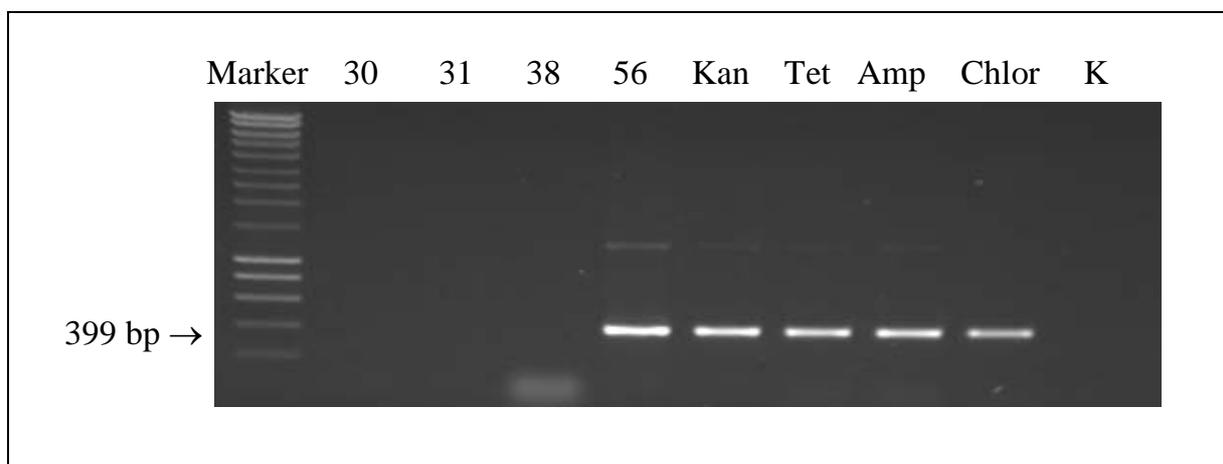
Abb.3.19 Nachweis von *catI* durch PCR in den Stämmen 30, 31, 38 und 56



Die Bestimmung der MHK aller Stämme gegenüber dem in der Veterinärmedizin eingesetzten Chloramphenicol-Derivat Florfenicol ergab, dass Stamm 56 und die Konjuganten neben der Chloramphenicol-Resistenz auch Florfenicol-resistent waren.

Eine PCR zum Nachweis des *flo*-Gens, das Florfenicol- und Chloramphenicol-Resistenz vermittelt, erlaubte die Amplifikation spezifischer Banden in Stamm 56 und den Konjuganten (Abbildung 3.20). Dies ist die erste Beschreibung eines *flo*-Gens in einem *E.-coli*-Isolat menschlicher Herkunft, bisher wurden *flo*-Gene nur in tierischen *E.-coli*-Isolaten nachgewiesen.

Abb. 3.20 Nachweis von *flo* durch PCR in Stamm 56 und seinen Konjuganten



Die Sequenzierung des PCR-Produktes ergab 100% Homologie im sequenzierten Bereich mit dem *flo*-Gen aus einem *E.-coli*-Isolat, das aus einem Kalb mit Diarrhoe isoliert wurde (GenBank AF258855, White et al., 2000)

Die Untersuchungen der Chloramphenicol-Resistenz sind in Tabelle 3.19 zusammengefasst:

Tab. 3.19 Chloramphenicol-Resistenzgene

	30	31	38	56	Kan3	Tet1	Amp16	Chlor1	MC1061-4
Chloramphenicol-MHK (µg/ml)	> 128	> 128	> 128	> 128	64	64	64	128	2
catI-PCR	+	+	+	+	-	-	-	-	-
catII-PCR	-	-	-	-	-	-	-	-	-
catIII-PCR	-	-	-	-	-	-	-	-	-
catB-PCR	-	-	-	-	-	-	-	-	-
cml-PCR	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Florfenicol-MHK (µg/ml)	16	8	16	256	64	64	64	64	2
<i>flo</i> -PCR	-	-	-	+	+	+	+	+	-

3.2.12. Untersuchung der Antifolat-Resistenz

Tabelle 3.20 gibt eine Übersicht über die Antifolat-Resistenz in allen Stämmen:

Tab. 3.20 Antifolat-Resistenz (MHK-Werte in µg/ml)

	30	31	38	56	Kan3	Tet1	Amp16	Chlor1
Trimethoprim	0,5	> 64	> 64	> 64	> 64	> 64	> 64	> 64
Sulfamethoxazol	>512	> 512	> 512	> 512	> 512	> 512	> 512	> 512
Co-trimoxazol	8	> 256	> 256	> 256	> 256	> 256	> 256	> 256

Dunkelgrau: klinisch resistent

Die Trimethoprim-Resistenz wurde im Rahmen der Integron-Analysen untersucht (vgl. 3.2.13.1.). In Stamm 31 wurde *dfr1* (= *dhfrI*, *dfrI*) nachgewiesen, in Stamm 38 *dfr17* (= *dfrXVII*), in Stamm 56 und allen Konjuganten *dfr12* (= *dfrXII*).

Zur Untersuchung der Sulfonamid-Resistenz wurden mit allen Stämmen PCRs durchgeführt, um *sul1*- und *sul2*-Gene nachzuweisen. Die Ergebnisse sind in Abbildungen 3.21 und 3.22 dargestellt:

Abb. 3.21 Ergebnisse der *sul1*-PCRs in den untersuchten Stämmen

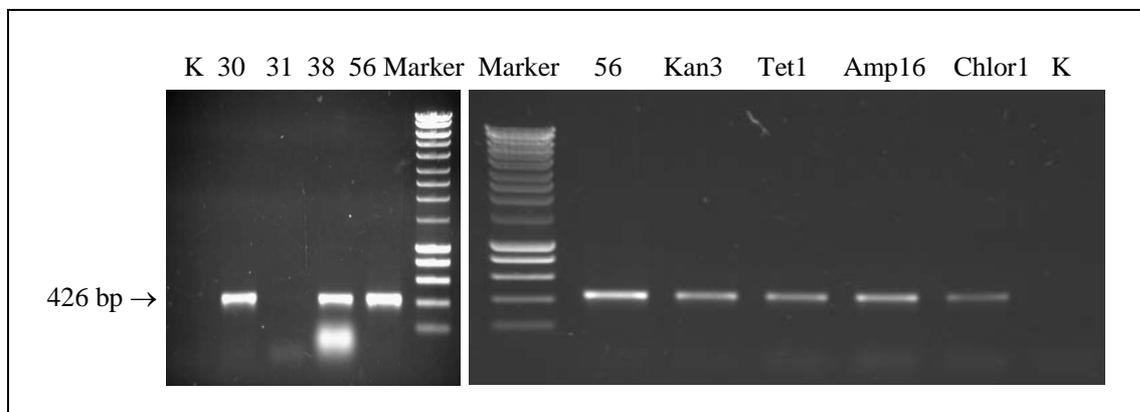
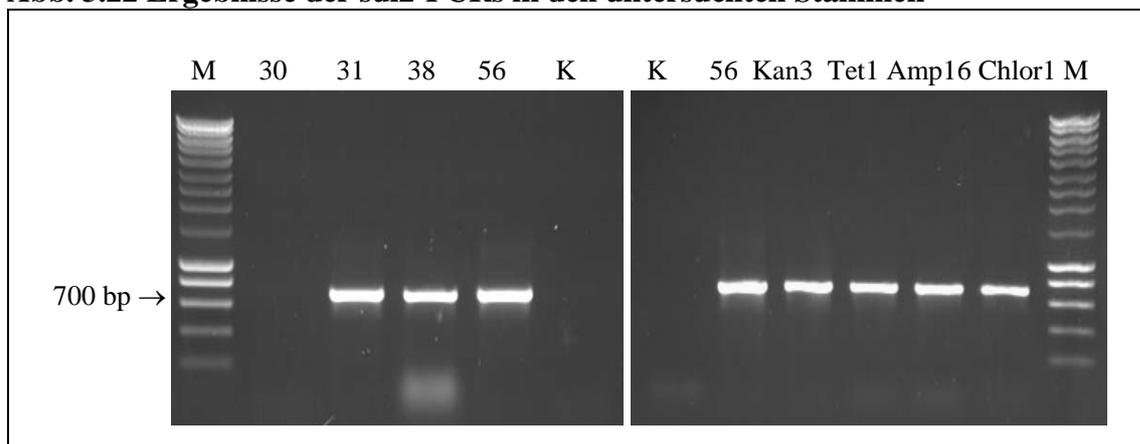


Abb. 3.22 Ergebnisse der *sul2*-PCRs in den untersuchten Stämmen



Da *sul2* häufig mit *strA* und *strB* gekoppelt auftritt und in allen Stämmen *strA* und *strB* nachgewiesen worden war, wurde mittels Mapping-PCRs mit dem *sul2*-F und dem *strB*-R Primer überprüft, ob in einigen Stämmen eine Anordnung *sul2*→*strA*→*strB* vorlag. In allen Stämmen mit *sul2* (31, 38, 56, sowie allen Konjuganten) konnte ein ca. 2200 bp großes PCR-Produkt amplifiziert werden. Bei RSF1010 würde die PCR ein 2251 bp großes Fragment ergeben. Es ist anzumerken, dass das PCR-Produkt bei Stamm 31 wie schon bei der *strA*- und *strA*-*strB*-PCR ca. 700 bp größer ist (vgl. 3.2.9.3).

Die Ergebnisse der Antifolat-Resistenz-Untersuchungen sind in Tabelle 3.21 zusammengefasst:

Tab. 3.21 Antifolat-Resistenz

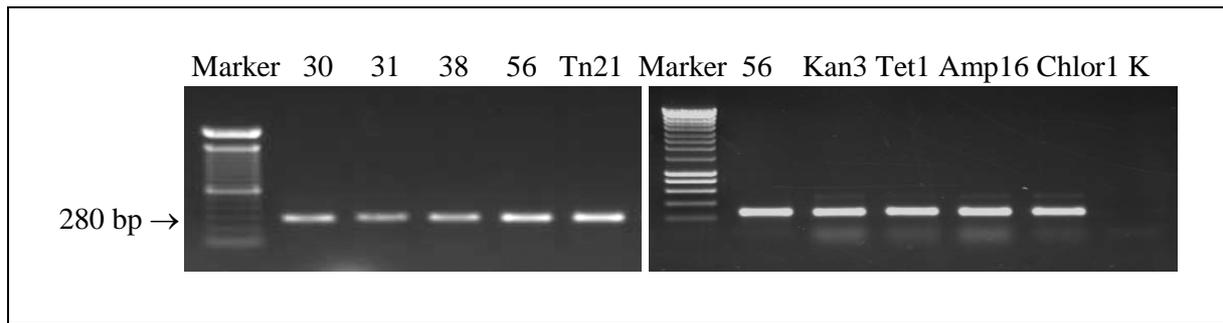
	30	31	38	56	Kan3	Tet1	Amp16	Chlor1
Trimethoprim		<i>dfr1</i>	<i>dfr17</i>	<i>dfr12</i>	<i>dfr12</i>	<i>dfr12</i>	<i>dfr12</i>	<i>dfr12</i>
Sulfamethoxazol	<i>sul1</i>	<i>sul2</i>	<i>sul1</i> <i>sul2</i>	<i>sul1</i> <i>sul2</i>	<i>sul1</i> <i>sul2</i>	<i>sul1</i> <i>sul2</i>	<i>sul1</i> <i>sul2</i>	<i>sul1</i> <i>sul2</i>
Co-trimoxazol		<i>dfr1</i> <i>sul2</i>	<i>dfr17</i> <i>sul1</i> <i>sul2</i>	<i>dfr12</i> <i>sul1</i> <i>sul2</i>	<i>dfr12</i> <i>sul1</i> <i>sul2</i>	<i>dfr12</i> <i>sul1</i> <i>sul2</i>	<i>dfr12</i> <i>sul1</i> <i>sul2</i>	<i>dfr12</i> <i>sul1</i> <i>sul2</i>

Dunkelgrau: klinisch resistent

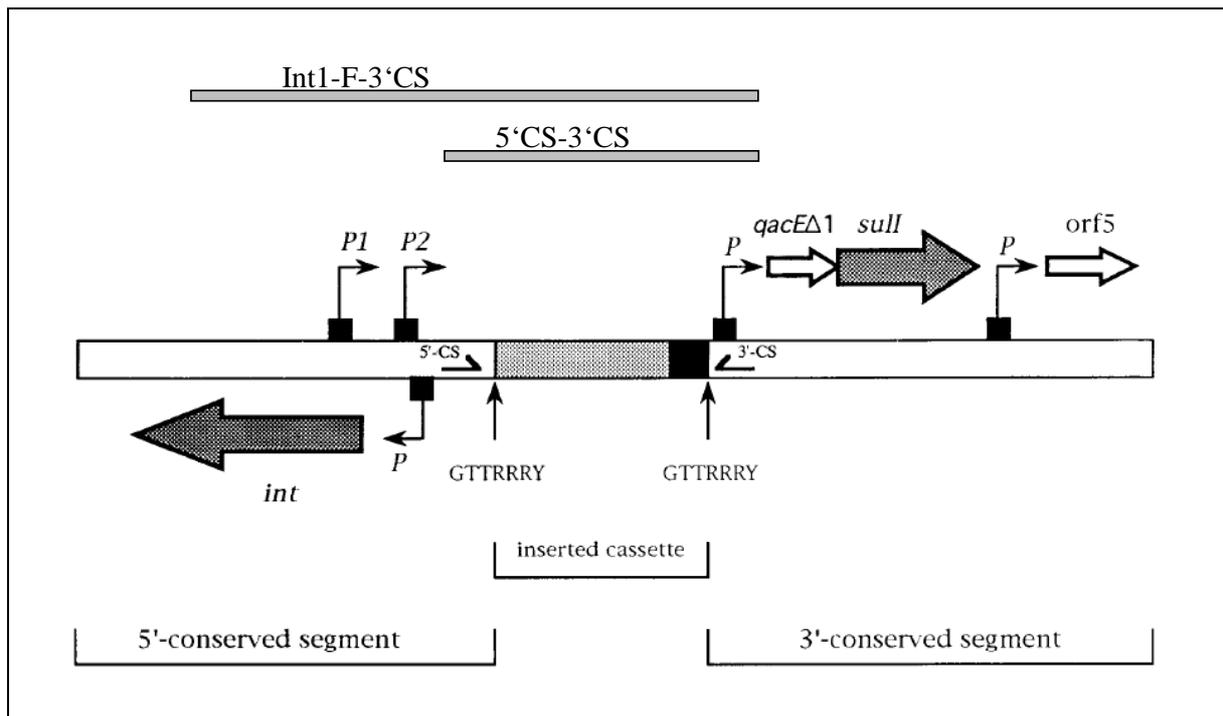
3.2.13. Charakterisierung der Mobilien Elemente

3.2.13.1. Analyse der Integrons

Alle Stämme sollten auf die Anwesenheit von Integrons hin untersucht werden. Dazu wurden PCRs mit Primern durchgeführt, die spezifisch Bereiche der Integrase-Gene der Klasse 1 (*int1*), Klasse 2 (*int2*) oder Klasse 3 (*int3*) amplifizieren. Als Positivkontrolle für Klasse-1-Integrons wurde der *E.-coli*-Stamm JC2926 mit dem Plasmid pBR322:Tn21 verwendet, der als Teil von Tn21 ein Klasse 1 Integron, In2, hat. In allen Stämmen konnten *int1*-Gene nachgewiesen werden, die Ergebnisse sind in Abbildung 3.23 dargestellt:

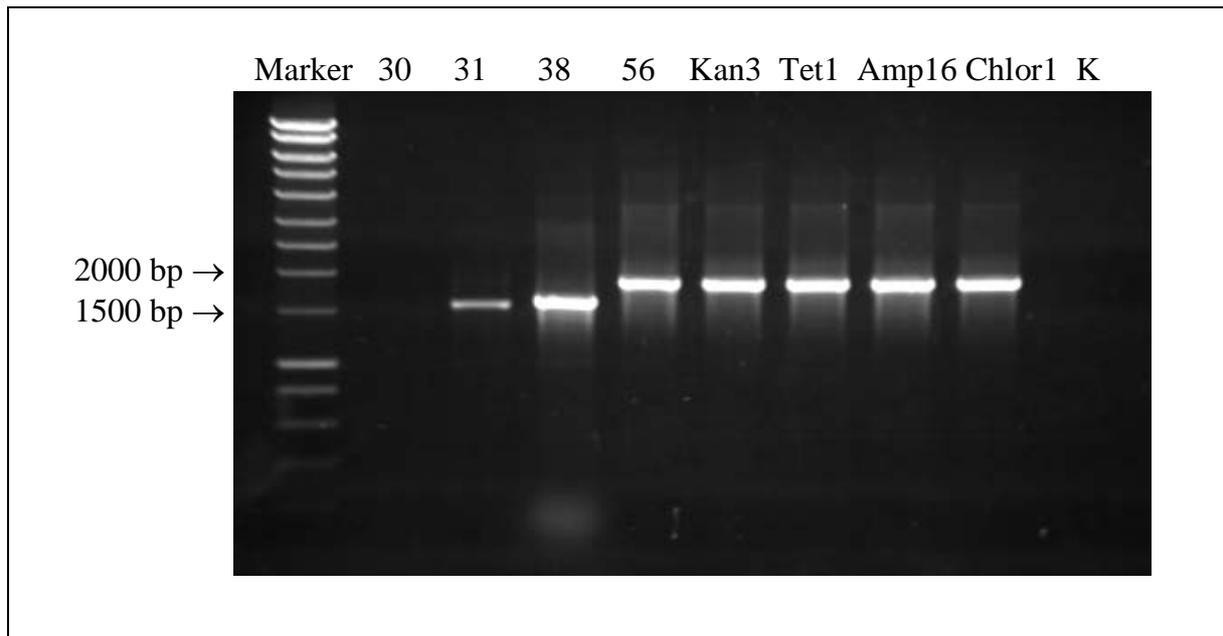
Abb. 3.23 Nachweis von *int1* durch PCR in den untersuchten Stämmen

Um den Genkassetten-Bereich der Integrons zu analysieren, wurde die variable Region des Integrons mit den Primern 5'CS und 3'CS in einer PCR amplifiziert. 5'CS bindet im 5'-konservierten Bereich zwischen *int1* und *att1*, 3'CS im 3'-konservierten Bereich kurz vor Beginn von *qacΔE1* (siehe Abbildung 3.24).

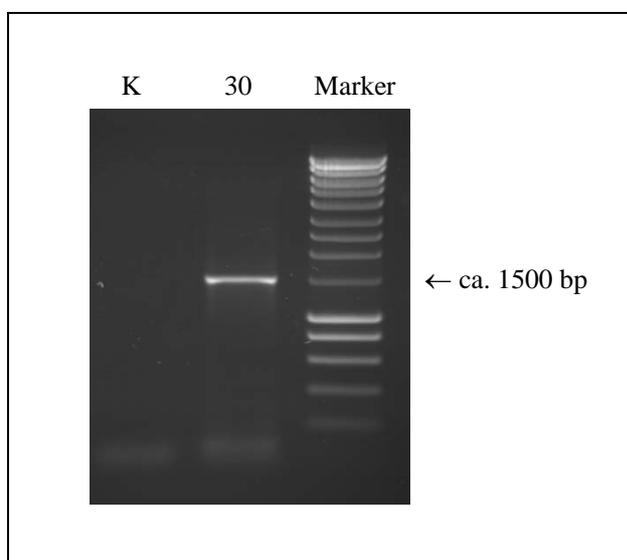
Abb. 3.24 Integron-Struktur mit Primerbindestellen nach Levesque et al., 1995.

Die durch die jeweiligen Primer-Kombinationen entstehenden PCR-Produkte sind als graue Balken dargestellt. P ist der Promotor des Integrase-Gens *int*, P1 ist der Promotor der Genkassetten (wird auch als P_{ant} bezeichnet). In manchen Integrons entsteht durch Mutation ein zweiter, starker Promotor P2 (Collis und Hall, 1995).

Je nach Anzahl und Größe der Genkassetten werden unterschiedlich große PCR-Produkte erwartet. Das Ergebnis der PCR ist in Abbildung 3.25 dargestellt:

Abb. 3.25 Ergebnisse der Genkassetten-PCR

Die PCR-Produkte der Stämme 31 und 38 sind ca. 1600 bp groß, die Produkte von Stamm 56 und seinen Konjuganten ca. 1800 bp. Es ist auffällig, dass kein PCR-Produkt in Stamm 30 amplifiziert wurde, da selbst in Integrons ohne Genkassetten wie In0 ein PCR-Produkt von 152 bp entstehen würde. Eine mögliche Ursache wäre, dass einer der PCR-Primer auf Grund von Deletionen nicht binden kann. Daher wurde mit dem int1-F Primer und dem 3'CS-Primer (siehe Abbildung 3.24) ein zweiter Versuch zur Amplifikation der Genkassetten unternommen. Dieses Mal konnte ein ca. 1500 bp großes Fragment amplifiziert werden (siehe Abbildung 3.26). Es ist daher zu vermuten, dass die 5'CS-Bindestelle im Integron von Stamm 30 nicht vorliegt.

Abb. 3.26 int1-F-3'CS-PCR in Stamm 30

Die Genkassetten-PCR-Produkte aller Stämme wurden zur genaueren Charakterisierung sequenziert. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3.22 zusammengefasst:

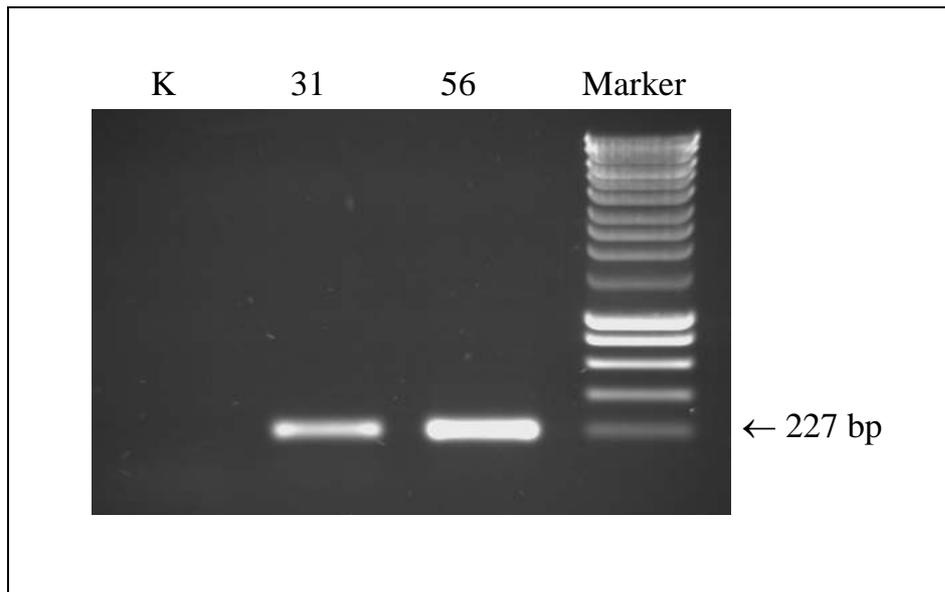
Tab. 3.22 Ergebnisse der Integron-Analysen der untersuchten Stämme

Stamm	<i>int1</i>	Kassette 1	Zwischensequenz	Kassette 2
30	+	-	340 bp	<i>aac(6')-Ib₇</i>
31	+	<i>dfr1</i>	-	<i>aadA1</i>
38	+	<i>dfr17</i>	-	<i>aadA5</i>
56	+	<i>dfr12</i>	<i>orfF/X</i>	<i>aadA2</i>
56 Konjuganten	+	<i>dfr12</i>	<i>orfF/X</i>	<i>aadA2</i>

Die Sequenzierung des Stamm-30-Integrans zeigt, dass 12 Basen nach dem *int1*-Gen und 45 Basen vor der 5'CS-Primerbindestelle die Homologie mit bekannten Integrans aufhört und 340 Basen unbekannter Herkunft folgen, bevor die Gen-Kassette *aac(6')-Ib₇* an letzter Position kommt. Datenbank-Untersuchungen mit den 340 bp unbekannter Sequenz ergaben keine Homologie mit bekannten Sequenzen. Die Homologie beginnt erst unmittelbar mit dem *aac(6')-Ib₇*-Gen.

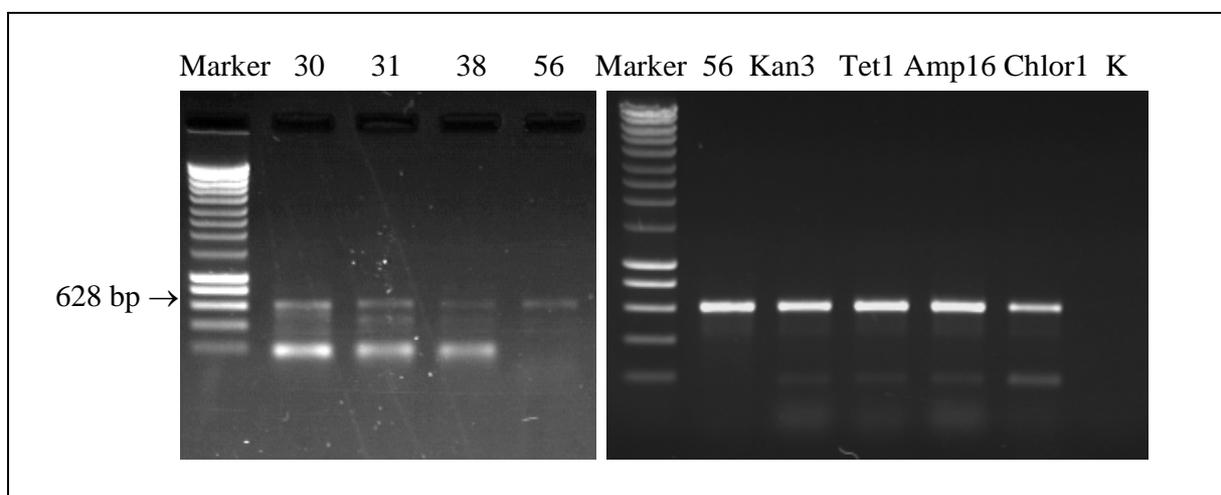
Die Integrans der anderen Stämme bestanden jeweils aus zwei Gen-Kassetten, an erster Position jeweils ein Dihydrofolatreduktase-Gen und an zweiter Position ein Adenyltransferase-Gen. Bei Stamm 56 und den Konjuganten befindet sich zwischen den zwei Genkassetten ein weiterer offener Leserahmen von 300 Basen Länge. Datenbankrecherchen ergaben, dass dieser offene Leserahmen in anderen Integrans als *orfF* oder *orfX* bezeichnet wird und vielleicht ebenfalls eine Genkassette darstellt (Heikkilä et al., 1993).

Da bei Stamm 31 kein *sul1* detektiert worden war, das zum 3'-konservierten Bereich von Klasse-1-Integrans gehört, bestand noch die Frage, wie weit das Integron 3' noch geht. Deswegen wurde versucht, in einer PCR ein Fragment des zwischen den Genkassetten und *sul1* liegenden *qacEΔ1*-Gens zu amplifizieren. Das Plasmid von Stamm 56 wurde in der PCR ebenfalls amplifiziert, da dieser Stamm ein *sul1*-Gen besitzt und davon auszugehen ist, dass *qacEΔ1* ebenfalls vorliegt. Wie in Abbildung 3.27 dargestellt, konnte in beiden Stämmen das *qacEΔ1*-Gen nachgewiesen werden. Das Integron in Stamm 31 ist also bis *qacEΔ1* intakt, erst ab *sul1* ist der 3'-konservierte Bereich atypisch.

Abb. 3.27 Amplifikation von *qacEΔI* durch PCR in den Stämmen 31 und 56**3.2.13.2. Untersuchung der Transposons**

Da in allen Stämmen Integrons und TEM-Gene nachgewiesen wurden, war es auch sinnvoll, die Anwesenheit von Transposons zu überprüfen. Integrons treten häufig als Teil von Transposons der Tn21-Familie auf, TEM-Gene, besonders TEM-1-Gene, sind häufig Tn3-assoziiert.

Mit degenerierten Tn3- und Tn21-Primer-Paaren wurde versucht, Fragmente der Transposase-Gene (*tnpA*) aus der Tn3- und Tn21-Familie nachzuweisen. In allen Stämmen wurden PCR-Produkte mit den Tn21-Familie-Primern T1 und T2 amplifiziert (Abbildung 3.28), so dass davon auszugehen ist, dass in allen Stämmen ein Transposon der Tn21-Familie vorhanden ist.

Abb. 3.28 Ergebnisse der Tn21-Familie *tnpA*-PCR mit den Primern T1 und T2

Das Unvermögen, mit Tn3-spezifischen Primern ein Produkt zu amplifizieren, bedeutet nicht unbedingt, dass keiner der Stämme ein Transposon der Tn3-Subfamilie beinhaltet. Es wäre denkbar, dass die Primer aufgrund von Sekundärstruktur-Ausbildung nicht stabil an das Gen binden können oder dass zu viele Abweichungen zwischen den Primerbindestellen im Gen und den degenerierten Primern bestehen.

Das *tnpA*-Fragment aus Stamm 56 und Amp16 wurde sequenziert und mit Sequenzen in der GenBank verglichen. Das *tnpA* von 56 und Amp16 ist das selbe, das Transposon scheint also wie das Integron auf dem großen konjugativen Plasmid von Stamm 56 zu liegen. Das *tnpA*-Gen von Stamm 56 ist verwandt aber nicht identisch mit dem *tnpA* von Tn21. Im sequenzierten Bereich ist es identisch mit den Transposase-Genen der Tn21-Familie-Transposons Tn5036 (GenBank Y0925) und Tn1626 (Genbank U12338, Partridge et al., 2001). Beide Transposons haben ein *mer*-Operon, Tn1696 hat analog zu Tn21 ein Integron zwischen den Transposon-Genen und den Genen des *mer*-Operons (vgl. Abbildung 3.37).

Da Tn21-Familie-Transposons auch ein Resolvase-Gen (*tnpR*) benötigen und viele Quecksilber-Resistenz in Form des *mer*-Operons (*merD*, *merA*, *merC*, *merP*, *merT* und *merR*) kodieren, wurden PCRs zum Nachweis von *tnpR*, *merA* (Quecksilber-Reduktase) und *merR* (Repressor) durchgeführt (Abbildungen 3.29, 3.30 und 3.31):

Abb. 3.29 Ergebnisse der Tn21-Familie *tnpR*-PCR in den vier untersuchten Stämmen

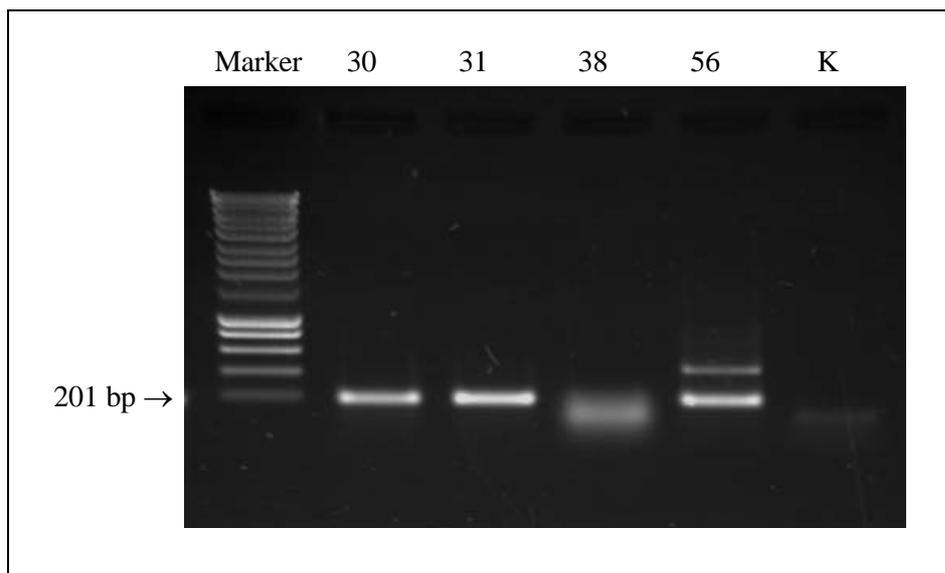
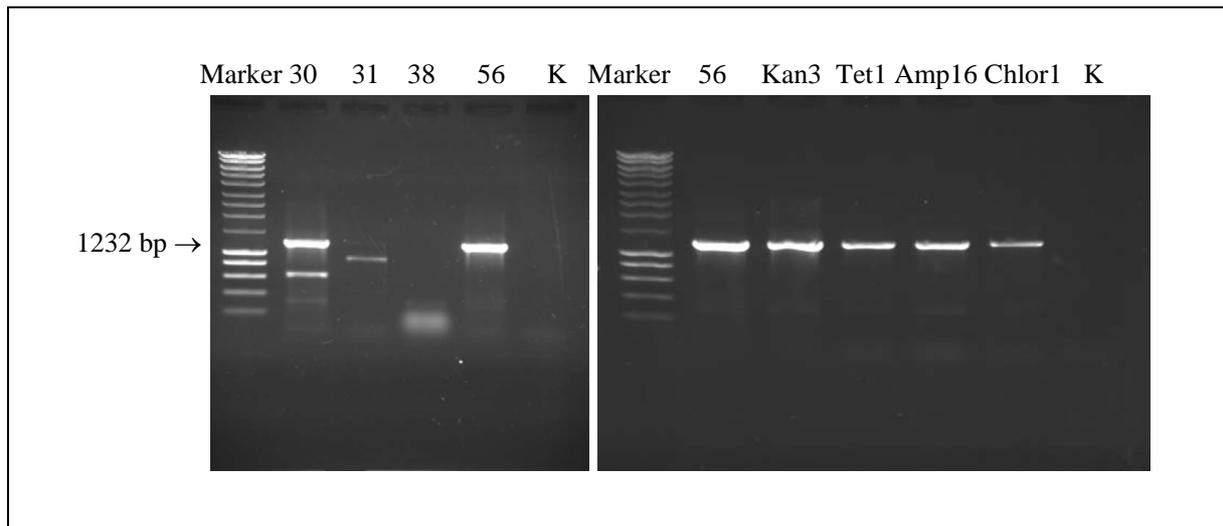
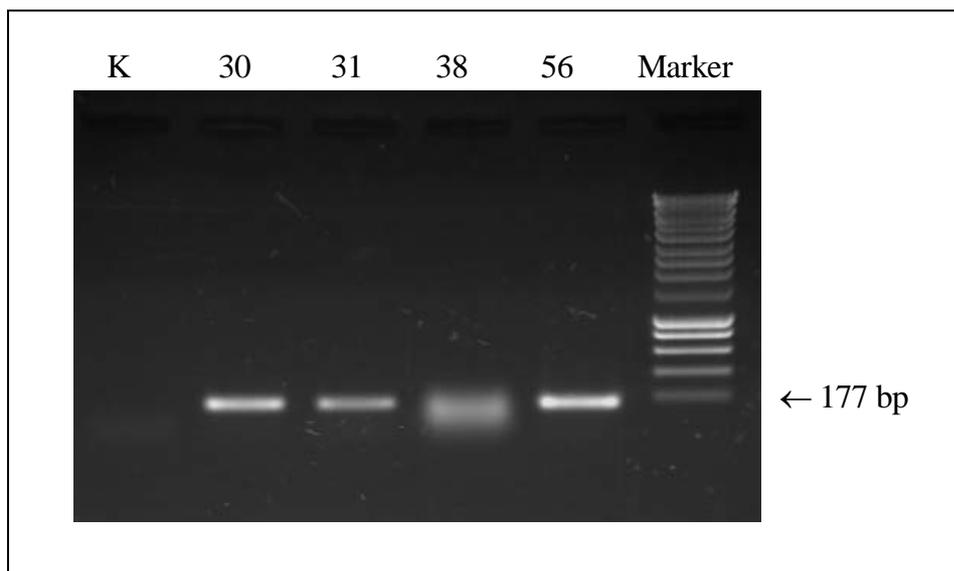


Abb. 3.30 Nachweis von *merA* durch PCR**Abb. 3.31 Nachweis von *merR* durch PCR**

In allen Stämmen außer Stamm 38 scheinen vollständige Tn21-Familie-Transposons mit *mer*-Operon enthalten zu sein. Sequenzierung des *merA*-Fragments von Stamm 56 zeigte keine 100%ige Homologie zu den *merA*-Genen von Tn5036 und Tn1696. Die Gene sind aber nah verwandt. Die größte Ähnlichkeit bestand zu zwei *merA*-Sequenzen aus der GenBank, die eine aus dem Chromosom eines *Pseudomonas putida* Stammes (GenBank AJ418050), die andere von dem Plasmid pDU1358 aus einem *Serratia marcescens* Stamm (GenBank M24940, Z49200 und M15049). In beiden Stämmen wurden keine Bereiche außerhalb des *mer*-Operons sequenziert, so dass leider keine Aussagen über Tn21-Familie-Transposons und eine Verwandtschaft zum Transposon in Stamm 56 gemacht werden können.

Um die Funktionsfähigkeit des *mer*-Operons nachzuweisen, wurden alle Stämme auf Quecksilber-haltigem Agar ausplattiert. Dies ist besonders in Stamm 31 wichtig, da das *merA*-PCR-Produkt dieses Stammes kleiner als üblich war, was auf eine Deletion in der für die Resistenz essentiellen Quecksilber-Reduktase hinweisen könnte. Als Positivkontrollen für Quecksilber-Resistenz wurden die *E.-coli*-Stämme 76 und JC2926 pBR322:Tn21 mitgetestet, als Negativ-Kontrollen die *E.-coli*-Stämme JM109 und ATCC 25922. Außer Stamm 38 konnten alle Stämme auf Quecksilber wachsen, was auf funktionsfähige *mer*-Operons schließen lässt. Das Ergebnis ist in Tabelle 3.23 dargestellt:

Tab. 3.23 Ermittlung der Quecksilber-Resistenz

Stamm	Wachstum auf 10 mg/L HgCl ₂	Wachstum auf 20 mg/L HgCl ₂
30	+	+
31	+	-
38	-	-
56	+	-
76	+	+
JC2926 pBR322:Tn21	+	-
JM109	-	-
ATCC 25922	-	-

3.3. Gen-Mapping des Stammes 56

Tabelle 3.24 zeigt eine Übersicht der in Stamm 56 enthaltenen Resistenzgene. Sie sind in chromosomale und Plasmid-kodierte Gene aufgeteilt, wobei auf Grund der Konjugationsdaten drei Gruppen von wahrscheinlich Plasmid-kodierten Genen gebildet wurden, die als Plasmid 1, Plasmid 2 und Plasmid 3 bezeichnet werden. Plasmid 1 beinhaltet Resistenzgene, die wahrscheinlich Plasmid-kodiert sind, das Plasmid aber weder konjugierbar noch mobilisierbar ist. Plasmid 2 bezeichnet die Gene, die nur in Typ-A-Konjuganten wie Kan3 anzutreffen sind. Sie müssen zumindest während der Konjugation Plasmid-kodiert gewesen sein, die Plasmid-Analysen (vgl. 3.2.2.1.) deuten aber darauf hin, dass sie nach der Konjugation ins Chromosom von Kan3 inseriert sind. Plasmid 3 ist das ca. 150 kb große konjugative Plasmid, das in allen Konjuganten anzutreffen ist und in Typ-B-Konjuganten allein für die Resistenz verantwortlich ist.

Tab. 3.24 Resistenzgene in Stamm 56

	Chromosom	Plasmid 1	Plasmid 2	Plasmid 3
β -Laktame	<i>ampC_{basal}</i>		TEM-1b	CMY-2
Chinolone	2 <i>gyrA</i> , 1 <i>parC</i> , MAR			
Aminoglycoside	MAR		<i>aph(3')-Ia</i>	<i>aadA2</i> , <i>strA</i> , <i>strB</i>
Tetracycline	MAR	<i>tet(B)</i>		<i>tet(A)</i>
Chloramphenicol		<i>catI</i>		<i>flo</i>
Trimethoprim				<i>dfr12</i>
Sulfamethoxazol				<i>sul1</i> , <i>sul2</i>
Quecksilber				<i>merA</i> , <i>merR</i>
Mobile Elemente				Tn, In

Im Rahmen des Gen-Mappings sollte versucht werden, die auf den Plasmiden befindlichen Gene zueinander in Beziehung zu setzen.

3.3.1. *catI*-Mapping

Mit allen Kombinationsmöglichkeiten der *catI*-Primer mit den *tet(B)*-Primern wurden Mapping-PCRs durchgeführt. Da keine Amplifikationsprodukte größer als 400 bp erhalten wurden, ist davon auszugehen, dass die *catI* und *tet(B)* nicht unmittelbar nebeneinander liegen. Das ist in sofern auch nicht verwunderlich, da *catI* häufig wie in Tn9 oder Tn2670 mit IS1 assoziiert ist und *tet(B)* häufig mit IS3 als Tn10 vorliegt.

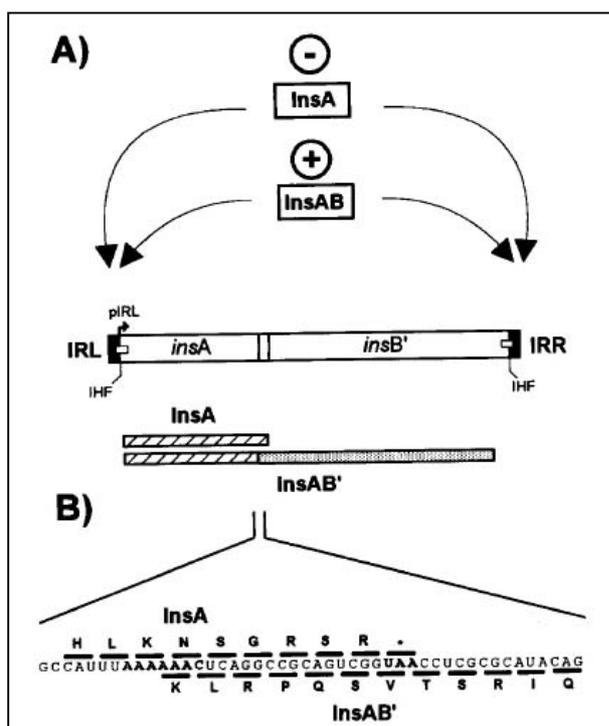


Abb. 3.32 Organisation von IS1 (Mahillon & Chandler, 1998)

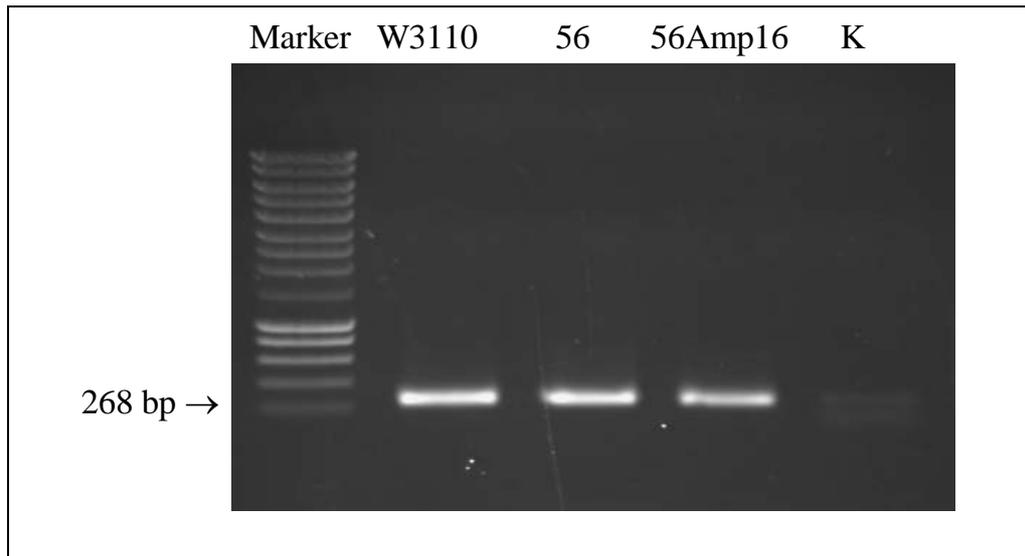
A) IS1 ist mit 768 bp eine der kleinsten Insertions-Sequenzen. Es besteht aus zwei partiell überlappenden Leserahmen, *insA* und *insB'*, die zwei Genprodukte *InsA* und *InsAB'* ergeben. *InsA* hemmt die Transkription und Transposition, *InsAB'* ist die Transposase des IS-Elements.

B) Durch einen translationalen „Frameshift“ im Heptanucleotid A₆C kommt es zur Produktion von *InsAB'* (Mahillon & Chandler, 1998).

Daher wurde untersucht, ob eine Beziehung zwischen *catI* und IS1 feststellbar war. *E. coli* W3110 wurde als Positivkontrolle verwendet, da er die Insertionssequenzen IS1A, IS1B, IS1D, und IS1F beinhaltet (Mahillon & Chandler, 1998), die im Alignment zum Design der Primer verwendet wurden.

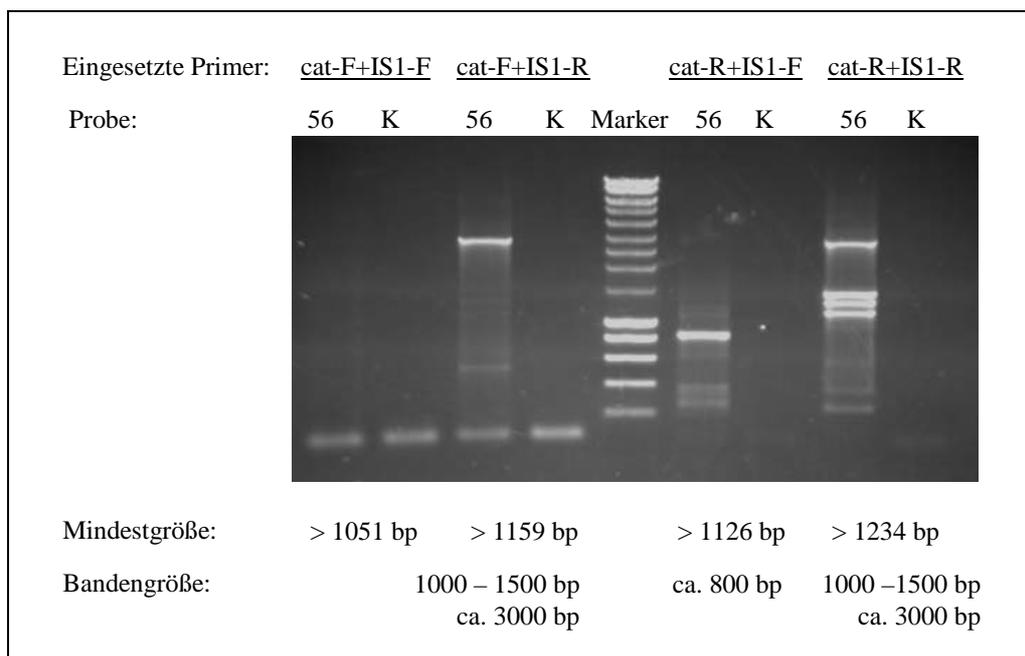
Abbildung 3.33 zeigt, dass in Stamm 56 IS1-Sequenzen nachgewiesen werden konnte.

Abb. 3.33 Ergebnisse der IS1-PCR der Stämme W3110, 56, und 56 Amp16



Um nachzuweisen, ob *catI* und IS1 in Stamm 56 gekoppelt vorliegen, wurden Mapping-PCRs mit allen Primerkombinationen durchgeführt. Das Ergebnis ist in Abbildung 3.34 dargestellt.

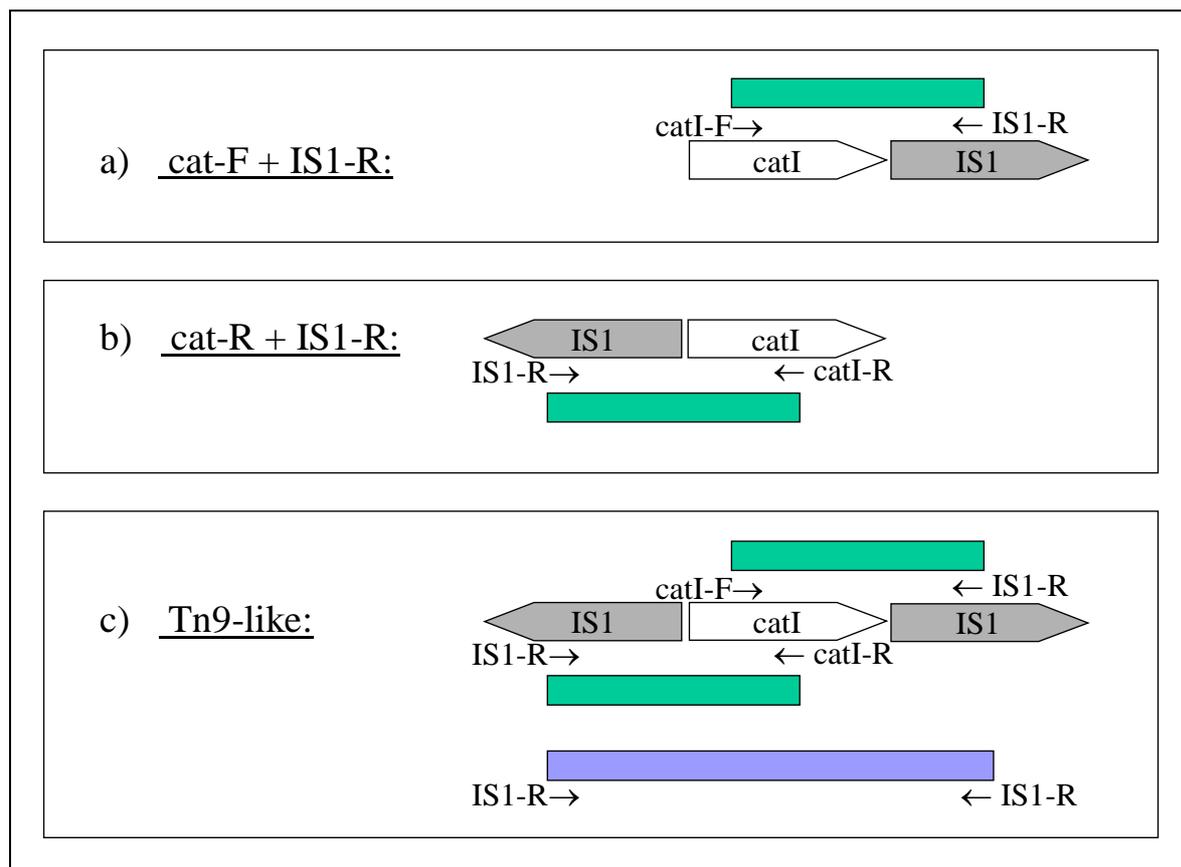
Abb. 3.34 *catI*-IS1-Mapping PCRs



Da bekannt ist, an welcher Position im Gen der jeweilige Primer bindet und wie groß der Abstand zum Ende des Gens ist, kann für jede Primerkombination eine Mindestgröße für das spezifische PCR-Produkt berechnet werden. Ist ein PCR-Produkt kleiner als die Mindestgröße, so ist es höchstwahrscheinlich nicht spezifisch. Ist das Produkt viel größer, liegt wahrscheinlich noch DNA zwischen den Genen.

Die Produkte der Amplifikation mit *catI*-F und IS1-R, sowie mit *catI*-R und IS1-R kommen auf Grund ihrer Größen (jeweils ca. 1500 bp und 3000 bp) als spezifische Amplifikationen in Frage. Eine mögliche Erklärung der Fragmente wäre, dass *catI* von zwei Kopien von IS1 in divergenter Orientierung flankiert wären. In Tn9 sind die flankierenden IS1-Kopien in direkter Orientierung (IS1→*catI*→IS1, vgl. Abb. 4.1). Daher wird die Struktur in Stamm 56 als Tn9-like bezeichnet. Die Anordnung der Gene mit den entstehenden PCR-Produkten ist in Abbildung 3.35 dargestellt:

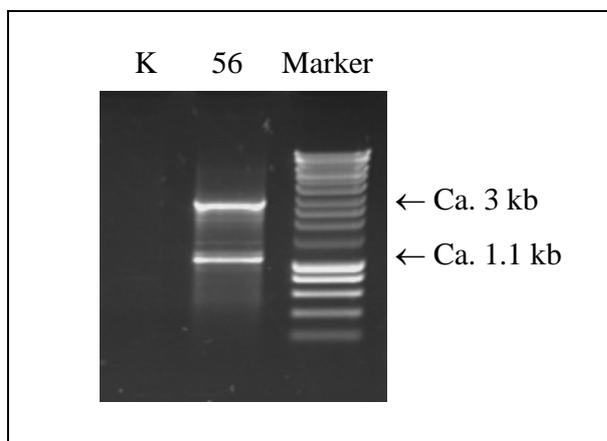
Abb. 3.35 *catI*-IS1-Mapping Analyse



- a) Genanordnung der PCR mit *catI*-F und IS1-R, das PCR-Produkt ist als grünes Kästchen dargestellt
 b) Genanordnung der PCR mit *catI*-R und IS1-R, das PCR-Produkt ist als grünes Kästchen dargestellt
 c) Genanordnung bei Tn9-like, die PCR-Produkte, die mit den oben eingesetzten Primern entstehen würden, sind als grüne Kästchen dargestellt. Ein zusätzliches PCR-Produkt, welches allein durch den Primer IS1-R amplifiziert würde, ist als blaues Kästchen dargestellt.

Abbildung 3.35 zeigt ein PCR-Produkt (blaues Kästchen), das bei Tn9-like allein durch den Primer IS1-R amplifiziert werden würde. Es hätte eine ungefähre Größe von 3000 bp und würde die Produkte dieser Größe in den beiden PCRs erklären. Um dies zu überprüfen, wurde eine PCR mit IS1-R als einzigem Primer durchgeführt, da es bei Vorkommen von Tn9-like wieder die 3000 bp große Bande geben sollte. Das bestätigende Ergebnis ist in Abbildung 3.36 dargestellt. Die zusätzliche Bande von ca. 1100 bp würde entstehen, wenn in der Zelle zwei zusätzliche Kopien von IS1 in divergenter Orientierung ohne ein dazwischen liegendes Gen vorlägen.

Abb. 3.36 Ergebnis der IS1-R-PCR des Stamms 56



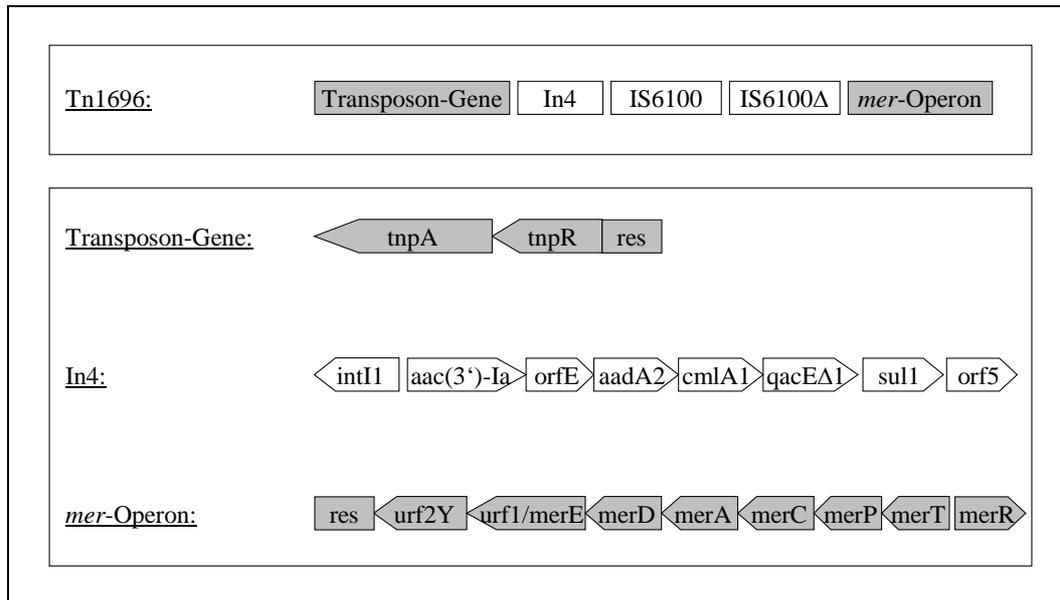
3.3.2. *aph(3')*-Ia-Tem-1b-Mapping

Da das TEM-1b-Gen und *aph(3')*-Ia bei der Konjugation gemeinsam übertragen wurden, liegen die beiden Gene wahrscheinlich relativ nah zusammen auf einem Plasmid. Um diese Kopplung nachweisen zu können, wurden PCRs mit allen Primer-Kombinationen durchgeführt. Es konnten leider keine Amplifikate erstellt werden. Da die benutzte Taq-Polymerase eine Synthese-Begrenzung von ca. 4000 bp hat, ist es zu vermuten, dass die beiden Gene mehr als 4000 bp auseinander liegen.

3.3.3. Transposon-Integron-Mapping

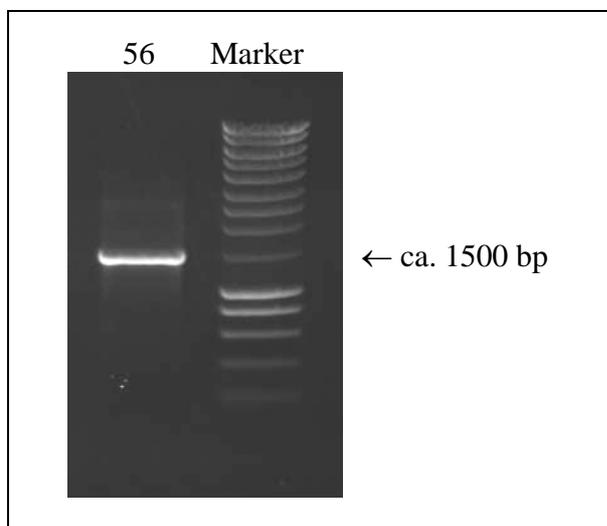
Viele Transposons der Tn21-Familie beinhalten Integrons. Beispiele dafür sind Tn21 (Abb. 1.10) und Tn1696, das im sequenzierten Bereich 100% Homologie mit dem *tnpA*-Gen des Transposons von 56 („Tn56“) hat. Die Struktur von Tn1696 ist in Abbildung 3.37 dargestellt. Ein entscheidender Unterschied zwischen Tn21 und Tn1696 ist die Stelle, an der das Integron in das Transposon inseriert. In2 sitzt im *tnpM/urf2*-Gen hinter der *res*-Site in Tn21, In4 inserierte in die *res*-Site von Tn1696 (Partridge et al., 2001).

Abb. 3.37 Struktur von Tn1696 (nach Genbank U12338 und Partidge et al., 2001. Die Größe der Gene in der Abb. ist nicht proportional zur eigentlichen Gen-Größe)



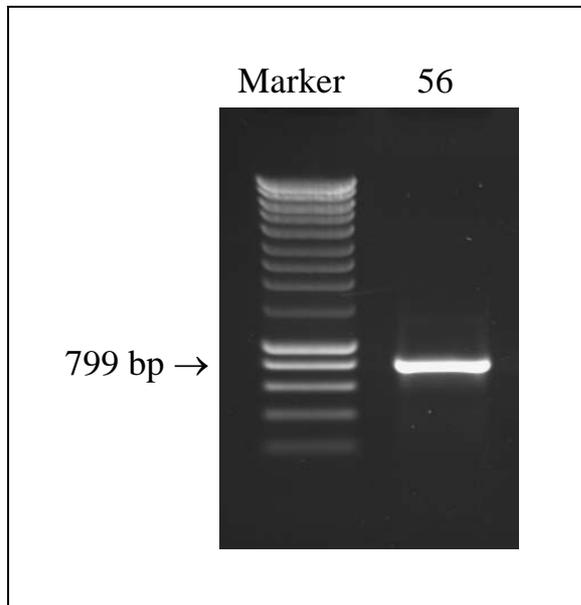
Um nachzuweisen, dass das Integron aus Stamm 56 analog zu Tn1696 und Tn21 im Transposon sitzt, und um zu sehen, an welcher Stelle das Integron wahrscheinlich insertierte, wurde eine Mapping PCR mit dem *tnpR*-R und dem *int1*-R Primern durchgeführt. Bei einer Insertion in der *res*-Site wie in Tn1696 sollte das PCR-Produkt 1462 bp groß sein, bei einer Insertion in *tnpM/urf2* wie in Tn21 sollte das Produkt 1824 bp groß sein. Das Ergebnis der Mapping-PCR ist in Abbildung 3.38 dargestellt. Das PCR-Produkt ist mit ca. 1500 bp wesentlich näher an den 1462 bp von Tn1696 als an den 1824 bp von Tn21, so dass man sagen kann, dass in „Tn56“ das Integron analog zu Tn1696 in die *res*-Site insertiert ist.

Abb. 3.38 *tnpR*-R-*int1*-R-Mapping-PCR des Stamms 56



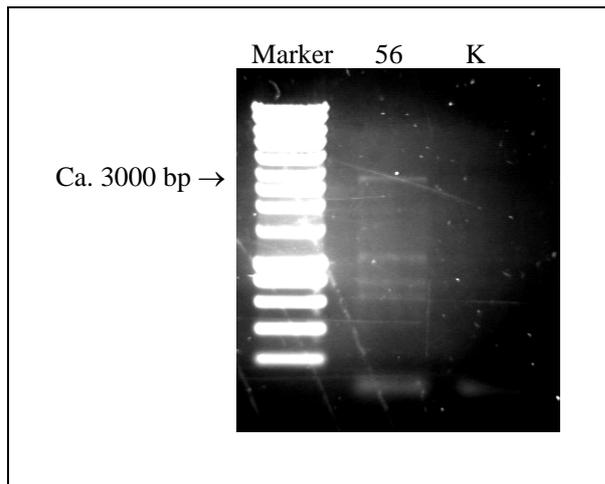
Eine weitere Mapping-PCR wurde zwischen dem *qacEΔ1*- und dem *sul1*-Gen durchgeführt, um nachzuweisen, dass der 3'CS-Bereich des Integrans intakt ist. Abbildung 3.39 zeigt das PCR-Ergebnis:

Abb. 3.39 Ergebnis der *qacEΔ1*-F-*sul1*-B-Mapping PCR des Stamms 56

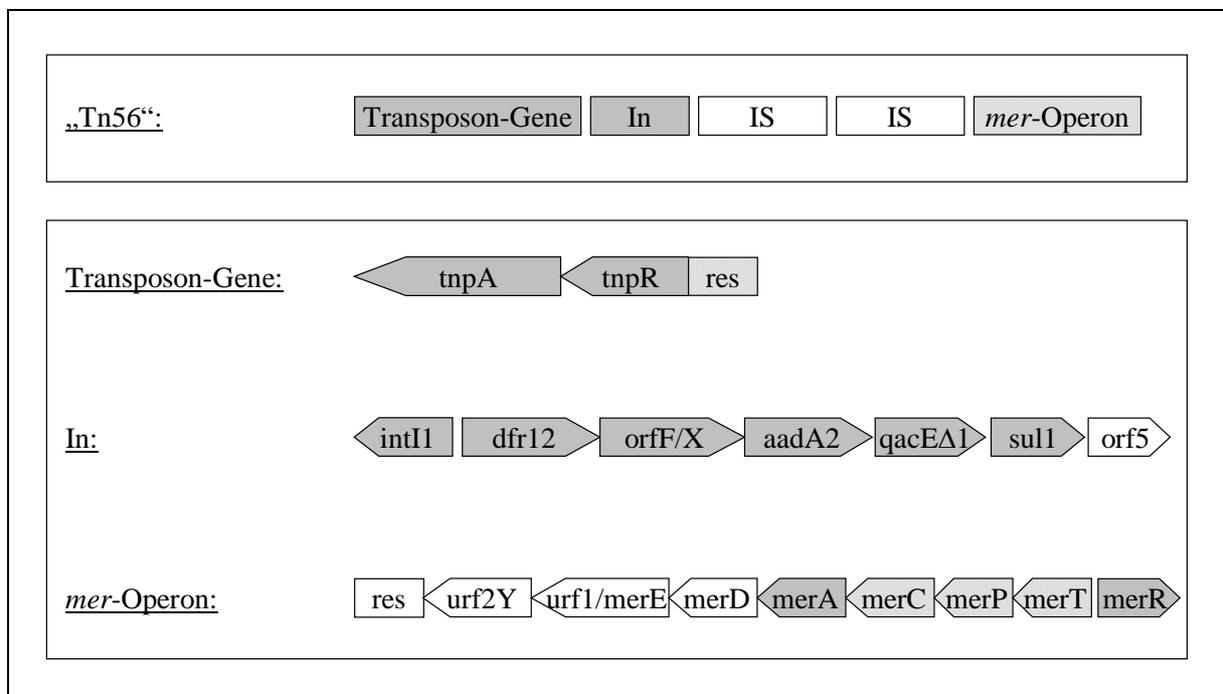


Es wurde ebenfalls versucht, das 3' Ende des Integrans mit dem *mer*-Operon in Beziehung zu setzen. Es war zwar aus der Sequenzierung des *merA*-Fragments bekannt, dass das *mer*-Operon von Stamm 56 nicht identisch mit dem aus Tn1696 war, es könnte aber dennoch an analoger Position des Transposons sein. Das Problem mit der Position ist aber, dass häufig IS-Sequenzen zwischen dem Integron und dem *mer*-Operon sitzen (IS1600 und IS1600Δ in Tn1696), was die Abstände so weit vergrößert, dass Mapping-PCRs in den oberen Bereich der Taq-Synthese-Leistung (ca. 4000 bp) kommen. Das Produkt aus *sul1*-F und *merA*-F würde in Tn1696 ein 5449 bp großes Fragment ergeben. So kann das Unvermögen, mit diesen Primern in 56 ein Amplifikat zu erzeugen, nicht als Beweis gewertet werden, dass in Stamm 56 keine Kopplung aus Integron und *mer*-Operon besteht.

Um neben den *merA*- und *merR*-PCRs und der Quecksilber-Resistenz ein weiteres Beleg für die Anwesenheit des *mer*-Operons in Stamm 56 zu erhalten, wurde eine Mapping-PCR zwischen *merA* und *merR* durchgeführt. Das Ergebnis ist in Abb. 3.40 dargestellt. Die oberste Bande von ca. 3000 bp wäre im Bereich dessen, was zu erwarten wäre (Tn21 würde ein Amplifikat von 3137 bp ergeben).

Abb. 3.40 merA-R-merR-R-Mapping-PCR

Alle Ergebnisse sprechen dafür, dass in Stamm 56 ein komplettes *mer*-Operon vorhanden ist. Es ist relativ wahrscheinlich, dass es 3' des Integrans als Teil des Transposons ist. Abbildung 3.41 zeigt die mögliche Struktur des „Tn56“: Grau-gefärbte Gene sind dieser Position nachgewiesen, für die schraffierte Gene gibt es Anzeichen für ihre Anwesenheit.

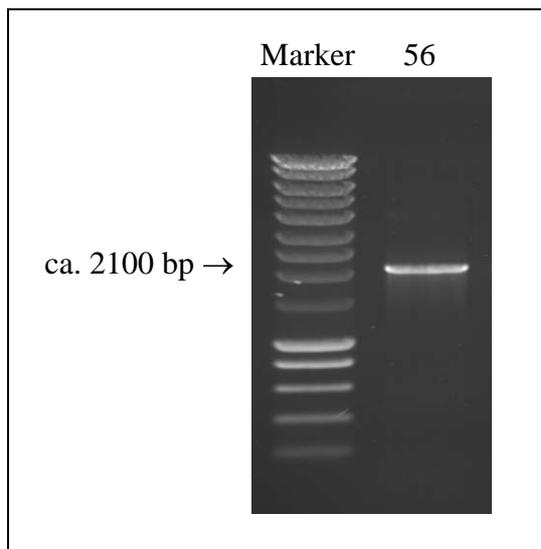
Abb. 3.41 Mögliche Struktur von „Tn56“

3.3.4. flo-Mapping

Die anderen Gene auf dem großen konjugativen Plasmid von Stamm 56 sollten in Beziehung zu einander gesetzt werden. Dabei lag die Betonung auf dem *flo*-Gen, da Informationen

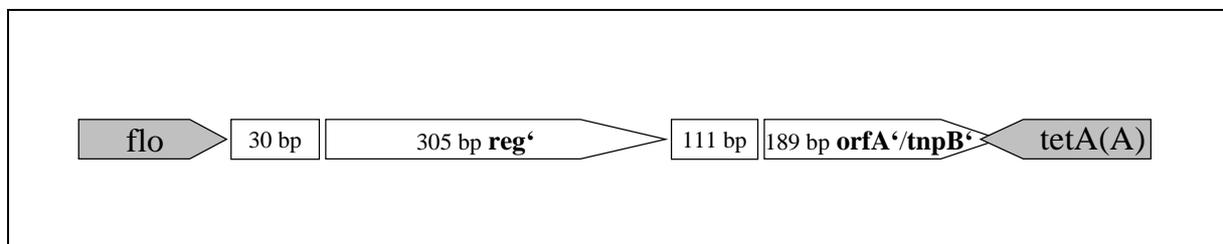
erhalten werden sollten, wie ein bisher nur bei tierischen *E.-coli*-Isolaten (und anderen Bakterien-Spezies tierischen Ursprungs) gefundenes Gen in ein Isolat menschlichen Ursprungs gelangen kann. Dazu wurden Mapping-PCRs in allen Primer-Kombinationen mit den beiden *flo*-Primern und *tnpA*-, *sul1*-, *merA*-, *tet(A)*-, *CMY-2*, und *sul2*-Primern durchgeführt. Ein spezifisches PCR-Produkt konnte mit den Primern *flo-F* und *tet(A)-F* amplifiziert werden und ist in Abbildung 3.42 dargestellt:

Abb. 3.42 Ergebnis der Mapping-PCR mit den Primern *flo-F* und *tet(A)-F*



Sequenzierung des PCR-Produkts mit den Primern *flo-F*, *flo-F2*, *tet(A)-F*, *tet(A)-F2*, und *tet(A)-F3* zeigten zwei offene Leserahmen zwischen *flo* und *tetA(A)*. Die Struktur ist in Abbildung 3.43 dargestellt:

Abb. 3.43 Gen-Strukturen zwischen *flo* und *tetA(A)*

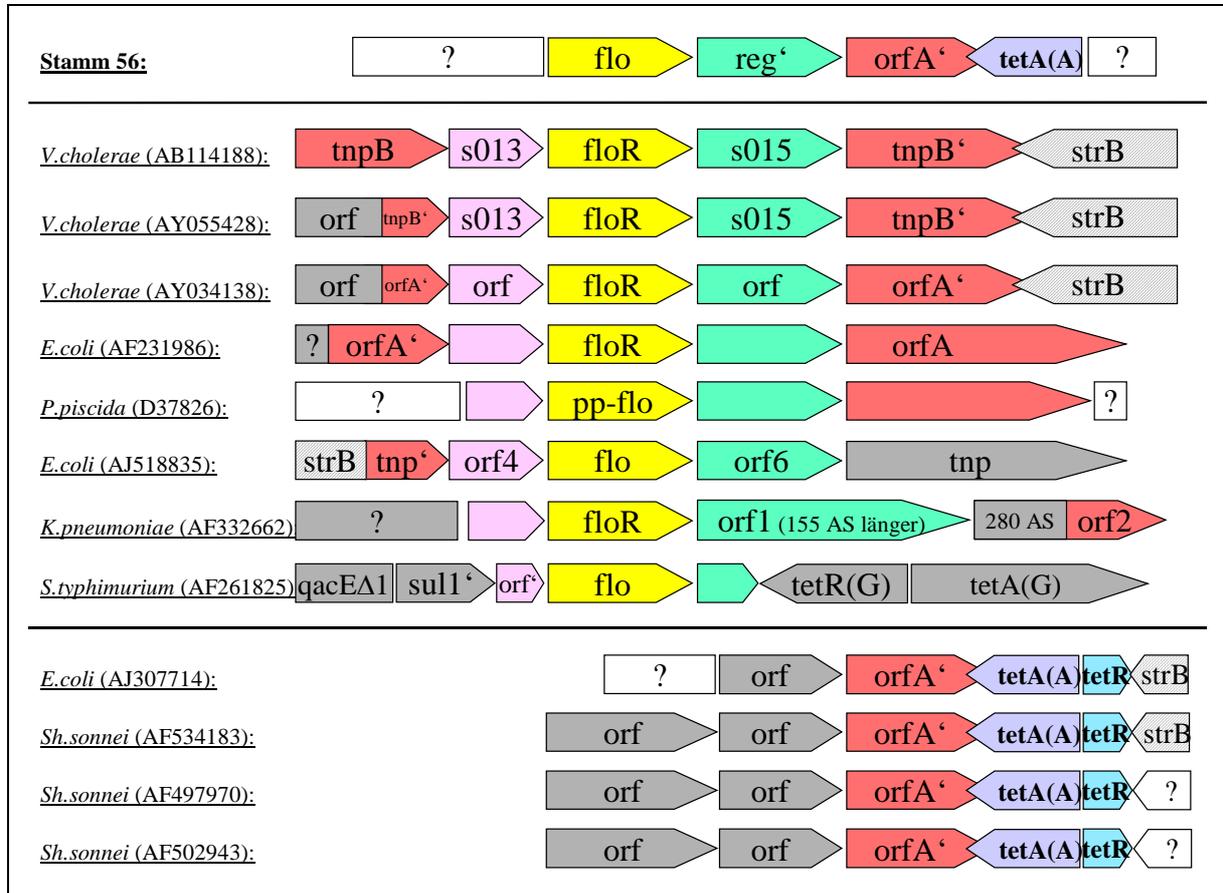


Datenbank-Recherchen ergaben, dass der hier als *reg'* bezeichnete offene Leserahmen die erste Hälfte eines Gens ist, dessen abgeleitete Aminosäure-Sequenz Homologie mit Transkriptions-Regulatoren der LysR-Familie hat (Cloeckert et al., 2001). Eine wahrscheinlich intakte Version des Gens wurde auf dem Plasmid R55 in *Klebsiella pneumoniae* gefunden (siehe Abbildung 3.44, AF332662, *orf1*). Der zweite offene

Leserahmen, der in der Literatur als *orfA'* (Cloeckert et al., 2000) oder *tnpB'* bezeichnet wird (GenBank AB114188 und AY055428), ragt in das Ende von *tetA(A)* rein. Das vollständige Gen *orfA* kodiert für eine Transposase, die mit IS91-Familie-Transposasen und *orf513* aus der „common region“ komplexer Integrons verwandt ist (Partridge & Hall, 2003). Dadurch, dass *orfA'* in *tetA(A)* reinragt, werden die letzten 10 Aminosäuren von TetA(A) verändert, so dass von einer TetA(A)-Variante gesprochen werden kann. Diese Konstellation *orfA':tetA(A)* ist schon in einem *E.-coli*-Isolat (Ojo et al., 2003) und drei *Shigella-sonnei*-Isolaten (GenBank AF497970, AF502943, AF534183) beschrieben worden. Da die Veränderung einen interdomänischen Teil der Efflux-Pumpe betrifft, ist der Efflux von Tetracyclinen noch gewährleistet (Ojo et al., 2003).

Vergleicht man die Sequenz zwischen *flo* und *tetA(A)* in Stamm 56 mit Sequenzen in der GenBank, gibt es eine Reihe ähnlicher Strukturen. Ein Überblick ist in Abbildung 3.44 dargestellt:

Abb. 3.44 Sequenzvergleich des *flo-tetA(A)*-Bereichs aus Stamm 56 mit ähnlichen GenBank-Sequenzen

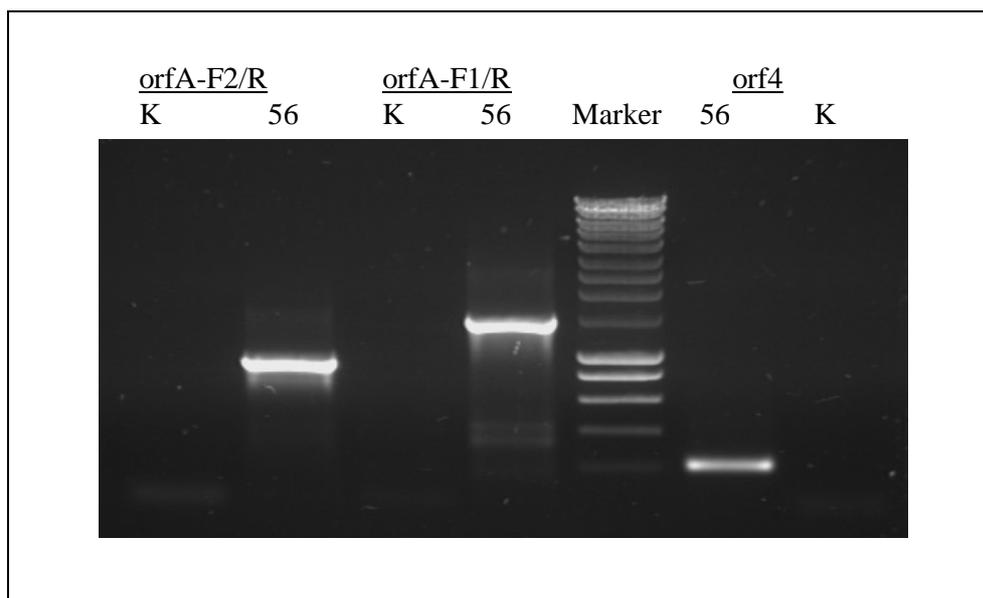


Bereiche mit hoher Sequenz-Homologie werden in der selben Farbe angezeigt, nicht-homologe Bereiche sind

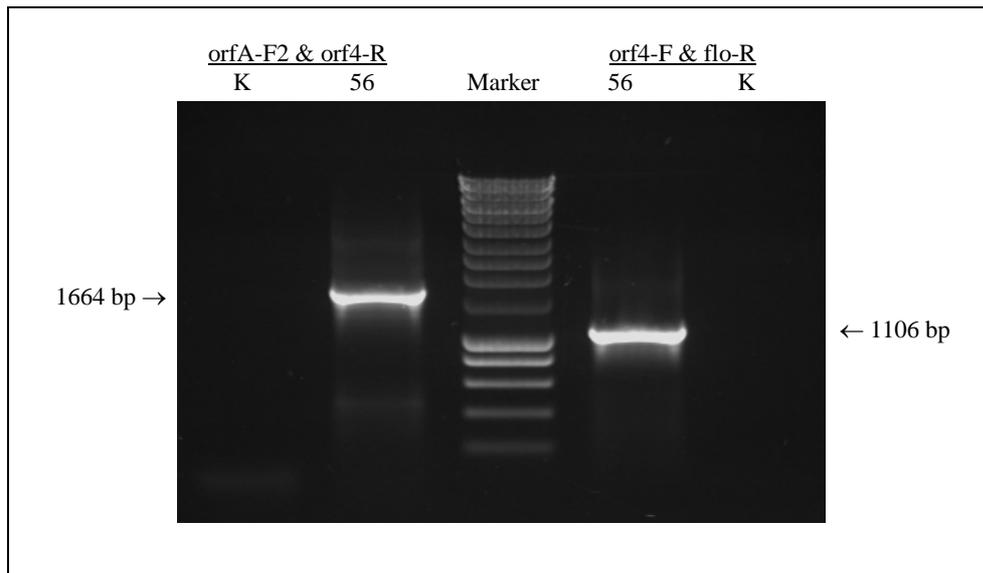
grau markiert. Weiße Kästchen signalisieren, dass dieser Bereich nicht sequenziert oder zumindest nicht in der Sequenz aufgeführt wurde. Die GenBank Accession Number der jeweiligen Sequenz ist in Klammern hinter der Spezies angegeben. Die in der Sequenz verwendeten Namen sind in den Kästchen aufgeführt, wobei die Größe der Kästchen in der Abbildung nicht proportional zur eigentlichen Gen-Größe ist.

Da viele *flo*-enthaltende Sequenzen 5' (in Abb. 3.44 links) des *flo*-Gens intakte oder deletierte Versionen der *orfA/tnpB* und *orf/orf4*-Gene haben, wurde versucht, diese auch in Stamm 56 nachzuweisen. Mit zwei verschiedenen 5'-Primern wurde wurden PCRs durchgeführt, um *orfA* zu amplifizieren: *orfA*-F1 liegt am Gen-Anfang und würde nur bei intaktem Gen ein Produkt ermöglichen, *orfA*-F2 bindet etwas zentraler im Gen und würde auch bei den meisten in der Datenbank gefundenen deletierten Gen-Varianten ein Produkt erzeugen. Abbildung 3.45 zeigt die Ergebnisse der beiden PCRs. Die Größe der PCR-Produkte entspricht denen, die bei *Vibrio cholerae* AB114188 entstehen würden: Für *orfA*-F2/*orfA*-R 907 bp, für *orfA*-F1/*orfA*-R 1459 bp, und für *orf4* 227 bp.

Abb. 3.45 Nachweis von *orfA* und *orf4* in Stamm 56 durch PCR



Um zu überprüfen, dass die beiden Gene wie in den Strukturen in Abbildung 3.44 5' von *flo* sitzen, wurden Mapping-PCRs mit den *orfA*-, *orf4*- und *flo*-Primern durchgeführt (siehe Abbildung 3.46). Die amplifizierten PCR-Produkte entsprechen ebenfalls den aus *V. cholerae* AB114188 erwarteten Größen.

Abb. 3.46 Ergebnisse der *orfA*-F2-*orf4*-R und *orf4*-F-*flo*-R-Mapping-PCRs

Zwei der Sequenzen mit der durch *orfA*' erzeugten *tetA(A)*-Variante haben 3' (in Abb. 3.44 rechts) eine Resistenz-Insel bestehend aus *strB*, *strA* und *sul2* (AF534183 und AJ307714; Ojo et al, 2003; siehe Abbildung 3.44). Bei den anderen zwei Sequenzen wurde dieser Bereich nicht weiter sequenziert, die vorangehende Sequenz ist aber fast identisch, so dass auch hier diese Resistenz-Insel möglich wäre. Zwischen *tetA(A)*_{var} und *strB* liegt noch das Gen *tetA(R)*, welches für den Repressor kodiert. Da in Stamm 56 die *strB-strA-sul2*-Resistenz-Insel auf demselben Plasmid wie *flo* und *tetA(A)*_{var} vorliegt (vgl. 3.2.9.3. und 3.2.12.), wurde versucht, mit Hilfe zweier im *tetA(R)*-Gen bindender Primer die Resistenz-Insel mit der *flo-tetA(A)*-Resistenz-Insel in Beziehung zu setzen. Das Ergebnis ist in Abbildung 3.47 dargestellt. Die PCR-Produkt-Größen entsprechen denen, die bei AF534183 entstehen würden.

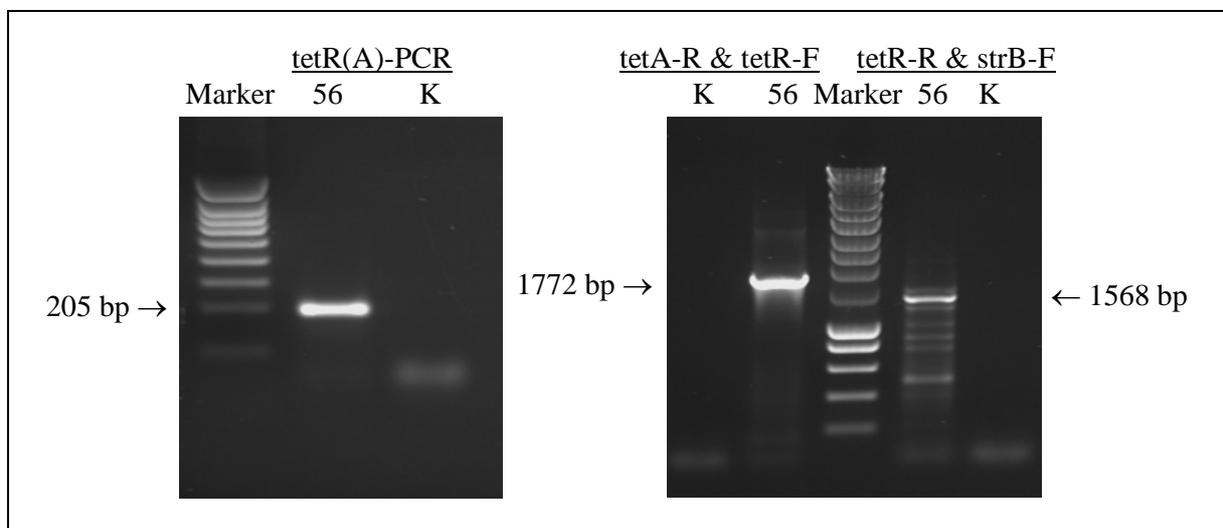
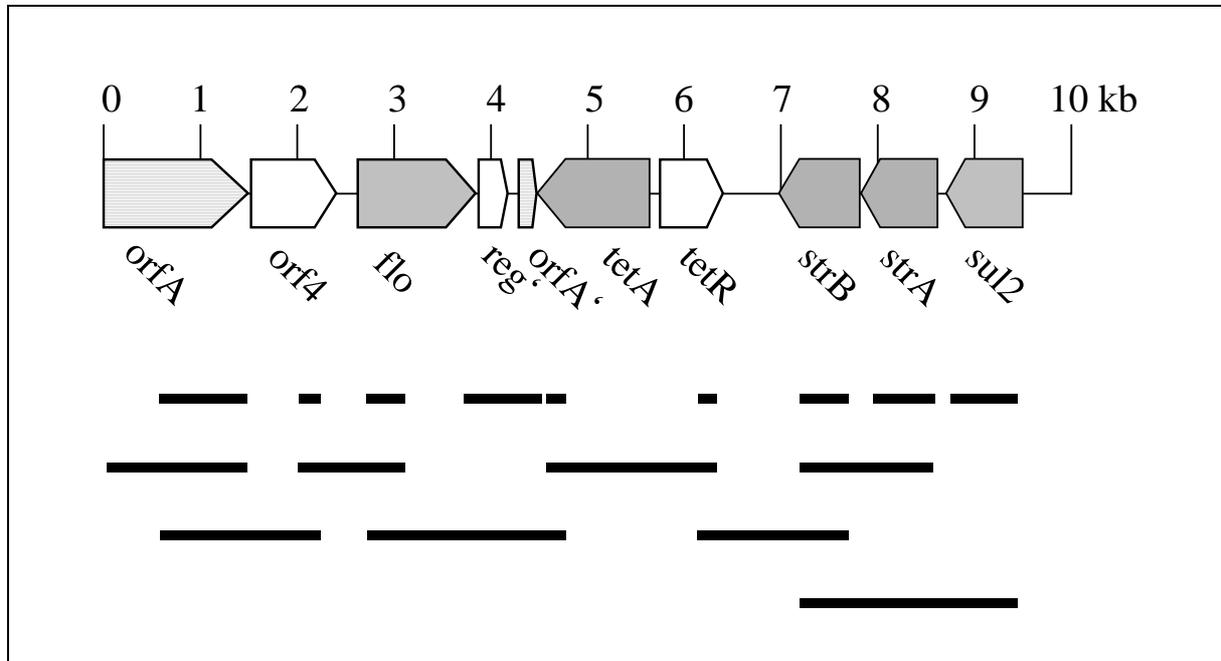
Abb. 3.47 *tetA(R)*-PCR, *tetA*-R-*tetR*-F- und *tetR*-R-*strB*-F-Mapping-PCRs

Abbildung 3.48 zeigt einen Überblick der gesamten Multiresistenz-Insel in Stamm 56 mit den einzelnen Genen und den durchgeführten PCRs. Resistenzgene sind als grau-gefärbte Kästchen dargestellt, schwarze Balken zeigen die durchgeführten PCRs und Mapping-PCRs.

Abb. 3.48 Maßstabgetreue Darstellung der Multiresistenz-Insel in Stamm 56



Die Mapping-PCR-Produkte von orf4-F-flo-R und flo-F-tet(A)-F wurden unter zur Hilfenahme zusätzlicher Primer sequenziert und die Sequenz in der GenBank unter der Accession Number AY775258 abgelegt.

3.4. Evolution von Resistenz-Genen

Ein wichtiger Aspekt bei den Untersuchungen der Evolution der Multiresistenz waren auch die Untersuchungen der Evolution von Resistenzgenen. Dazu wurden zu allen erworbenen Resistenzgenen in den Datenbanken verwandte Gene gesucht, die in ihrem „Wirt“ natürlicherweise vorkommen. Von dort aus können sie dann mit Hilfe von mobilen Elementen mobilisiert und auf andere Stämme übertragen werden, wo sie zu erworbener Resistenz beitragen. Neben der Sequenz-Verwandtschaft gibt auch der GC-Gehalt eines Gens Auskunft über seine Herkunft. *E. coli* hat zum Beispiel einen durchschnittlichen GC-Gehalt von 51%, *Proteus mirabilis* einen von 38-41% und *Aeromonas sp.* einen von ca. 60%.

3.4.1. β -Laktam-Resistenz

In den hier untersuchten Stämmen spielen zwei Gruppen Plasmid-kodierter β -Laktamasen eine Rollen, zum einen die TEM-, zum anderen die AmpC- β -Laktamasen.

Die Plasmid-kodierten AmpC- β -Laktamasen der *Citrobacter freundii* Gruppe sind sehr gut untersucht. Barlow und Hall bestätigten 2002 mit phylogenetischen Analysen die schon länger gehegte Vermutung, dass Plasmid-kodierte AmpC- β -Laktamasen wie CMY-2 von chromosomalen AmpC- β -Laktamasen von *Citrobacter freundii* abstammen. Zwischen CMY-2 und den AmpCs von *C. freundii* besteht über 94% Aminosäure-Identität, wobei manche wesentlich ähnlicher sind. Dies spiegelt sich auch im GC-Gehalt der Gene wieder: Das CMY-2-Gen hat einen GC-Gehalt von 53,8%, „Sequenz-nahe“ *C. freundii ampC*-Gene haben einen GC-Gehalt von 53,2 - 53,7%. Insgesamt streuen die GC-Gehalte der *ampC*-Gene zwischen 50,5 und 54,5%. Bei Plasmid-kodierten AmpC- β -Laktamasen der CMY-Familie hat es mindestens zwei Mobilisationen gegeben: Fast alle CMY- β -Laktamasen wurden ohne das Regulations-Gen *ampR* mobilisiert, Miriagou et al. berichteten jedoch 2004 von einem induzierbaren, Plasmid-kodierten CMY-13. Plasmid-Analysen zeigten, dass 4252 bp aus *C. freundii* inklusive *ampC* und *ampR* zwischen zwei Kopien von IS26 mobilisiert worden waren.

Lange Zeit galt das SHV-Enzym als nächster Verwandter von TEM (65% Aminosäure-Identität). Für SHV- β -Laktamasen gilt es als gesichert, dass chromosomale Gene aus *Klebsiella pneumoniae* der Ursprung der Plasmid-kodierten Gene sind. Haeggman et al. (2004) konnten zeigen, dass es drei phylogenetisch verschiedenen Gruppen innerhalb von *K. pneumoniae* gibt und dass die chromosomalen β -Laktamase-Gene mit den drei Gruppen übereinstimmen: Die Gruppe KpI ist immer mit Genen der SHV-Familie assoziiert, KpII mit denen der OKP-Familie, und KpIII mit denen der LEN-Familie. Die Untersuchungen von Ford und Avison (2004) lieferten Argumente dafür, dass es mindestens zwei verschiedene Mobilisierungen von SHV-Genen auf Plasmide gegeben haben muss. Ähnlich wird es sich mit der Herkunft von *bla*_{TEM} zu tragen. 2004 beschrieben Walckenaer et al. ein chromosomales β -Laktamase-Gen *bla*_{PLA-1} im Organismus *Raoultella planticola* (wurde früher als *Klebsiella planticola* bezeichnet). Die β -Laktamase PLA-1 (AY302757) hat 71% Aminosäure-Identität mit TEM, was für eine nähere Verwandtschaft spricht. Es ist anzunehmen, dass der direkte Ursprung von *bla*_{TEM} in einer mit *K. pneumoniae* und *R. planticola* nah verwandten Spezies zu finden ist.

3.4.2. Aminoglykosid-Resistenz

Es ist sehr schwer, Angaben über die Herkunft der Gene Aminoglykosid-modifizierender Enzyme zu machen. Die nächsten Verwandten der in diesen Stämmen detektierten Gene sind auch alle Plasmid-kodiert oder Teil von Transposons und Integrons. Natürlich vorkommende Gene sind in den Streptomyces Gattungen Aminoglykosid-produzierender Bakterien zu finden, haben aber nur geringe Aminosäure-Homologie mit den untersuchten Genen und haben einen viel höheren GC-Gehalt. Es ist dennoch durchaus möglich, dass die Gene in den Streptomyces-Arten ihren Ursprung haben, der Grad der GC-Anpassung lässt aber auf eine lange Zeit der Mobilität und Assoziation mit Gram-negativen Bakterien schließen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3.25 zusammengefasst:

Tab. 3.25 Möglicher Ursprung Aminoglykosid-modifizierender Enzyme

Gen	Mögliche chromosomale Herkunft	Homologie
<i>aac(3')-II</i> (60% GC)	* <i>aac(3')</i> aus <i>Streptomyces griseus</i> (AB028210) * <i>aac(3')-VIIa</i> aus <i>Streptomyces rimosus</i> (M22999)	* 39% AS-Identität, 74% GC * 38% AS-Identität, 73% GC
<i>aac(6')-Ib7</i> (55% GC)	* <i>aac(6')</i> aus <i>Gloebacter violaceus</i> (NC_005125) * <i>aac(6')</i> aus <i>Mesorhizobium loti</i> (NC_002678)	* 52% AS-Identität, 64% GC * 39% AS-Identität, 61% GC
<i>ant(3'')-Ia</i> (<i>aadA1</i> , 53% GC)	* <i>aadA4</i> <i>Bordetella parapertussis</i> (NC_002928, natürlich vorkommend ?) * <i>ant</i> aus <i>Streptomyces coelicolor</i> (AL939119)	* 55% AS-Identität, 73% GC * 43% AS-Identität, 76% GC
<i>ant(3'')-Ib</i> (<i>aadA2</i> , 52% GC)	<i>ant</i> aus <i>Streptomyces coelicolor</i> (AL939119)	39% AS-Identität, 76% GC
<i>ant(3'')-Ie</i> (<i>aadA5</i> , 58% GC)	* <i>aadA4</i> <i>Bordetella parapertussis</i> (NC_002928, natürlich vorkommend ?) * <i>ant</i> aus <i>Streptomyces coelicolor</i> (AL939119)	* 60% AS-Identität, 73% GC * 42% AS-Identität, 76% GC
<i>aph(3')-Ia</i> (<i>aphA1</i> , 44% GC)	* <i>aph(3')-Va</i> aus <i>Streptomyces fradiae</i> (K00432) * <i>aph(3')-Vb</i> aus <i>Streptomyces ribosidificus</i> (M22126)	* 38% AS-Identität, 73% GC * 34% AS-Identität, 70% GC
<i>aph(3'')-Ib</i> (<i>strA</i> , 56% GC)	* <i>aph(3'')</i> aus <i>Sinorhizobium meliloti</i> (AL591790, natürlich vorkommend?) * <i>aph(3'')-Ia</i> aus <i>Streptomyces griseus</i> (X53527)	* 57% AS-Identität, 63% GC * 50% AS-Identität, 75% GC
<i>aph(6)-Id</i> (<i>strB</i> , 56% GC)	* <i>aph</i> aus <i>Mesorhizobium loti</i> (AP003014) * <i>strB</i> aus <i>Agrobacterium tumefaciens</i> (AE009086)	* 56% AS-Identität, 63% GC * 45% AS-Identität, 59% GC

3.4.3. Tetracyclin-Resistenz

Bei Tetracyclin-Resistenz-Genen ist die Frage der Herkunft noch schwerer zu beantworten. In den hier untersuchten Stämmen wurden *tet(A)*- und *tet(B)*-Efflux-Gene nachgewiesen. In der GenBank konnten keine Tetracyclin-Resistenz-Gene gefunden werden, die nicht entweder Plasmid- oder Transposon-lokalisiert waren. Rubin et al. (1990) konnten zeigen, dass Tet(A) und Tet(B) wahrscheinlich einen gemeinsamen Ursprung haben. Es wird vermutet, dass Tet(A), Tet(B) und Tet(C) durch Duplikation eines ca. 600 bp großen Ursprungs-Gens hervorgegangen sind. Das *tetA(A)*-Gen hat einen GC-Gehalt von 63%, was darauf hindeuten könnte, dass das Gen eher in Gattungen mit hohem GC-Gehalt wie *Aeromonas* (60% GC-Gehalt) oder *Pseudomonas* (66% GC-Gehalt) zirkuliert ist. Da *tetA(B)* mit 43% einen viel geringeren GC-Gehalt hat, würde das eher für ein Vorkommen in low-GC Organismen wie die der *Providencia-Proteus-Morganella*-Gruppe sprechen.

3.4.4. Chloramphenicol-Resistenz

In allen vier hier untersuchten Stämmen wurden *catI*-Gene detektiert. Das Gen *catA1* aus Tn9 (GenBank V00622) hat einen GC-Gehalt von 44,8%, was auf einen Ursprung in der „low GC“ Gruppe der *Enterobacteriaceae* um *Proteus*, *Providencia* und *Morganella* deuten könnte. Tatsächlich wurde bei *Proteus mirabilis* ein chromosomales *cat*-Gen gefunden, das 73% Nukleotid-Identität und 76% Aminosäure-Identität mit *catA1* hat (Charles et al., 1985b). Dieses Gen wurde sowohl in Chloramphenicol-empfindlichen als auch in resistenten Stämmen gefunden, wobei spontane Chloramphenicol-Resistenz mit einer Frequenz von 10^{-4} bis 10^{-5} pro Zelle und Generation selektiert werden kann (Charles et al., 1985a). Dieses Phänomen wird auch bei vielen anderen Plasmid-freien Stämmen der *Proteus-Providencia-Morganella*-Gruppe beobachtet, so dass vermutet werden kann, dass all diese Spezies natürlicherweise *cat*-Gene beherbergen, auch wenn außer bei *P. mirabilis* keine Sequenzen in den GenBanken abgelegt worden sind. Es ist möglich, dass das evolutive Vorgänger-Gen von *catI* bei Sequenzierungen in dieser Bakterien-Gruppe gefunden werden könnte.

Das in Stamm 56 gefundene *flo*-Gen hat einen GC-Gehalt von 58,3%. In der Literatur wird die Chloramphenicol-Efflux-Pumpe CmlA mit 47% Aminosäure-Identität als nächster Verwandter angegeben (Kim & Aoki, 1996). Der GC-Gehalt von *cmlA* ist mit 55,4% auch recht ähnlich, jedoch werden *cmAI*-Gene fast immer als Gen-Kassetten in Integrons gefunden

[*cmlA* in In4 (M64556), *cmlA1* in In28 (AF313472), *cmlA5* in In53 (AF205943), *cmlA4* in In52 (AF156486), und *cmlA2/cmlB* in In40 (AF034958)], wodurch sie als Ursprung von *flo* nicht in Frage kommen. Eine Datenbanksuche fand aber im Chromosom des α -Proteobakteriums *Sinorhizobium meliloti* das Gen für ein putatives Transmembran-Transportprotein (AL591791), das mit 65% Aminosäure-Identität und einem GC-Gehalt von 62% als Ursprung in Frage kommen könnte. In der Nähe des Gens konnten keine Gene für mobile Elemente gefunden werden, so dass dieses Gen hier wahrscheinlich natürlicherweise vorkommt. Ein weiteres chromosomales Gen wurde im β -Proteobakterium *Burkholderia sp.* gefunden und das davon kodierte Transmembran-Protein (AACY01120349) hätte mit Flo eine Aminosäure-Identität von 57% und einen GC-Gehalt von 68%. Je mehr Genom-Sequenzierungen auch von nicht-pathogenen Spezies durchgeführt werden, desto wahrscheinlicher ist es, dass ein direkter Vorfahre des *flo*-Gens gefunden wird.

3.4.5. Antifolat-Resistenz

Trimethoprim-Resistenz wird in den hier untersuchten Stämmen durch Plasmid-kodierte *dfr*-Gene vermittelt. Wie in 1.2.5. schon angesprochen wurde, sind diese *dfr*-Gene sehr unterschiedlich. Sundström et al. (1995) und Sköld (2001) konnten zeigen, dass die Dihydrofolat-Reduktasen in Verwandtschafts-Bäumen sehr verteilt sind, was darauf hinweist, dass die Gene unterschiedlichen Ursprungs sind und aus einer Vielzahl von Organismen stammen.

Datenbank-Recherchen mit *dfr1* aus Stamm 31 (40% GC-Gehalt) ergab als nächsten chromosomalen Verwandten ein *dfr* aus *Anopheles gambiae* (XM_306060). Der GC-Gehalt war mit 36% recht ähnlich, es bestand aber nur 40% Aminosäure-Identität. Der nächste bakterielle Verwandte war Fola aus *Coxiella burnetii* (γ -Proteobacteria) mit 37% Aminosäure-Identität und einem GC-Gehalt von 40%.

Für *dfr12* aus Stamm 56 (GC-Gehalt 51%) lieferten Suchen ein *dfr* aus *Vibrio cholerae* (AE004131) als nächsten Verwandten. Das Gen hat einen GC-Gehalt 50% und resultierende Aminosäure-Sequenz hätte 44% Identität.

Das *dfr17*-Gen aus Stamm 38 (35% GC-Gehalt) zeigte mit 41% Aminosäure-Identität die größte Übereinstimmung mit einem chromosomalen *dfr* aus *Clostridium acetobutylicum* (AE007797, GC-Gehalt 29%).

Bei allen drei Genen kann man auf Grund der nur niedrigen Aminosäure-Identität des Gen-Produkts nur von einer entfernten Verwandtschaft sprechen. Die Organismen, in denen die Vorläufer-Gene als Hauskeeping-Gene vorliegen, müssen noch identifiziert werden.

Bei der Sulfonamid-Resistenz ist die Situation ähnlich, auch wenn es sich hier nur um drei Dihydropteroat-Synthetase Gene *sul1*, *sul2* und *sul3* handelt. Auch hier ist der Ursprung wahrscheinlich in chromosomalen, *folP* genannten Hauskeeping-Genen anderer Mikroorganismen zu suchen. Bei Datenbank-Recherchen wurde für *sul1* (62% GC-Gehalt) ein chromosomales *folP* aus *Bordetella pertussis* (BX640414, GC-Gehalt 69%) mit 39% Aminosäure-Identität als höchste Homologie gefunden. Für *sul2* (61% GC-Gehalt) hatte ein *folP*-Gen aus dem Cyanobakterium *Gloeobacter violaceus* (AP006569, 62% GC-Gehalt) mit 43% Aminosäure-Identität die größte Übereinstimmung.

3.4.6. Quecksilber-Resistenz

Quecksilber-Resistenz wird meistens vom *mer*-Operon kodiert, mindestens das Gen für die Quecksilber-Reduktase MerA wird benötigt.

GenBank-Recherchen mit dem *merA*-Gen fanden keine *merA*-Sequenzen, wo einwandfrei festgestellt werden konnte, dass *merA* nicht Teil eines Transposons war. Selbst Spezies wie *Thiobacillus ferrooxidans*, die als natürlicherweise Quecksilber-resistent gelten, zeigten bei genauer Betrachtung, dass die Resistenz irgendwann im Laufe der Evolution wahrscheinlich als Teil eines Transposons erworben worden ist (Inoue et al., 1989; Inoue et al., 1991).

Untersuchungen an 8000 – 10000 Jahre alten sibirischen Permafrost-Proben entdeckten ein Quecksilber-Resistenz Transposon Tn5060, das sich an nur 4 Basen von Tn21 ohne die In2-Insertion unterscheidet (Kholodii et al., 2003). Die Assoziation von Quecksilber-Resistenz-Genen mit Transposons scheint also sehr alt und ökologisch wichtig zu sein.

4. Diskussion

In Abb. 1.11 wurde eine Hypothese zur Evolution von Resistenzgenen vorgestellt. In dieser Arbeit sollten anhand ausgewählter multiresistenter *E.-coli*-Isolate Spuren dieser Evolution nachgewiesen werden. Die Überlebensfähigkeit ausgewählter Isolate wurde als Maß für ihre Fitness untersucht. Dies sollte Auskunft geben, ob durch die Multiresistenz verursachte Wachstumsnachteile bestehen und ob ein Selektionsdruck besteht, diese durch Modifikation der genetischen Strukturen zu kompensieren. Durch Analysen der multiresistenten Stämme auf molekularer Ebene sollten die einzelnen Resistenzgene nachgewiesen werden und ihre umgebenden Strukturen identifiziert werden. Die Untersuchung der Beziehung der Resistenzgene zu mobilen Elementen sollte Aufschluss darüber geben, ob Deletionen in den Transposon-Strukturen stattgefunden haben. Diese werden in Abb. 1.11 zur Optimierung und damit Stabilisierung der Genstrukturen im Zielorganismus postuliert. Mit Hilfe von Datenbank-Recherchen sollte die Herkunft der Resistenzgene ermittelt werden, die bei *E. coli* als erworbene Resistenz gefunden wurden. Das Vorkommen der Gene im Ursprungsorganismus ist gewissermaßen der Ausgangsort der in Abb. 1.11 beschriebenen Evolution.

4.1. Untersuchungen des Stamm-Kollektivs

Tabelle 4.1 gibt eine Übersicht des untersuchten *E.-coli*-Kollektivs „Berliner Stämme“ aufgeteilt in die jeweils identifizierten β -Laktamasen. Bis auf einen Fall gab es eine gute Übereinstimmung zwischen der phänotypischen und genotypischen Identifizierung der β -Laktamasen. Stamm 30 wurde phänotypisch als AmpC_{hyper} identifiziert, Untersuchungen mittels PCR fanden aber ein TEM-30-Gen (IRBL), was einen anderen Phänotyp verursachen sollte. Detailliertere Analysen identifizierten zusätzlich zur IRBL eine AmpC-Hyperproduktion, die den Phänotyp der IRBL überdeckt (vgl. 4.2.2.1.), so dass auch in diesem Fall letzten Endes die genotypische Identifizierung mit der phänotypischen Identifizierung übereinstimmte.

Auffällig ist der hohe Anteil (73%) der AmpC- β -Laktamasen an der β -Laktam-Resistenz, wovon der Großteil auf Hyperproduktion der chromosomalen AmpC- β -Laktamase beruht. Sanders und Sanders beschrieben 1992, dass der Großteil der Ampicillin-Resistenz, die in 50% der *E.-coli*-Isolate beobachtet wird, von TEM-1 verursacht wird. Es wäre daher naheliegend zu vermuten, dass erweiterte Cephalosporin-Resistenz bei *E. coli* hauptsächlich

von ESBLs vermittelt wird, die durch Punktmutation aus TEM-1 entstanden sind. Diese Vermutung kann zumindest an diesem Stamm-Kollektiv nicht bestätigt werden. Der Anteil der ESBLs an der Cephalosporin-Resistenz lag unter 25% und nur zwei der Enzyme waren TEM-1-Derivate. Die Verbreitung der TEM-Gene war aber mit 64% sehr hoch (in 14 von 22 Stämmen konnten *bla*_{TEM}-Gene nachgewiesen werden).

Tab. 4.1 Identifizierte β -Laktamase der „Berliner Stämme“

Identifizierung	AmpC _{hyper}	AmpC _{Plasmid}	ESBL	IRBL	OSBL
Phänotypisch	16 (73%)		5 (23%)	0 (0%)	1 (4%)
Genotypisch	13 (59%)	3 (14%)	5 (23%)	1 (4%)	1 (4%)

4.2. Untersuchungen der vier Stämme

Aus dem *E.-coli*-Kollektiv wurden vier multiresistente Stämme für die weiteren Untersuchungen ausgewählt: Stamm 30 hatte neben der β -Laktam-Resistenz Aminoglykosid-, Chloramphenicol- und Sulfamethoxazol-Resistenz. Stamm 31 war gegen β -Laktame, Chinolone, Aminoglykoside, Chloramphenicol und Antifolate resistent. Die Stämme 38 und 56 zeigte ausgeprägte aber unterschiedliche Resistenz gegenüber β -Laktamen, Chinolonen, Aminoglykosiden, Tetracyclinen, Chloramphenicol und Antifolaten.

4.2.1. Überlebensfähigkeit der Stämme

4.2.1.1. Plasmid-Analysen und Konjugation

In allen Stämmen konnten durch Plasmid-Präparationen und anschließende Gelelektrophorese Plasmide in unterschiedlicher Größe und Anzahl nachgewiesen werden. Auffällig war, dass von allen Plasmiden unter Laborbedingungen nur das ca. 150 kb große Plasmid aus Stamm 56 durch Konjugation übertragbar war. Da aber die anderen Stämme auch eine Vielzahl wahrscheinlich Plasmid-kodierter Resistenzgene besitzen, ist davon auszugehen, dass in der Natur auch einige Plasmide der anderen Stämme eine Konjugation vermitteln.

Das Konjugationsergebnis von Stamm 56 wirft einige Fragen auf. Es konnten zwei verschiedene Konjuganten-Typen mit unterschiedlicher Konjugationsfrequenz und unterschiedlichen Resistenzen isoliert werden, Typ-A- und Typ-B-Konjuganten besaßen aber

beide nur das eine, ca. 150 kb große Plasmid. Die zusätzlichen Resistenz-Determinanten der Typ-A-Konjuganten (Kan³; zusätzliche Aminoglykosid- und β -Laktam-Resistenz) scheinen nach der Konjugation ins Chromosom inseriert zu sein. Zwei mögliche Szenarien sind vorstellbar: Ein Plasmid mit der zusätzlichen Aminoglykosid- und β -Laktam-Resistenz wurde durch Konjugation übertragen, war aber im Rezipienten instabil und ging verloren. Es konnten nur Konjuganten selektiert werden, in denen ein zusätzliches Transpositions-Ereignis stattgefunden hatte, wobei die Gene auf einem Transposon liegend vom Plasmid ins Chromosom inseriert sind. Dieses zweite nötige Ereignis würde die vergleichsweise niedrige Konjugationsrate von $7,9 \times 10^{-6}$ (versus $1,1 - 5,7 \times 10^{-1}$ für den anderen Konjuganten-Typ) erklären, welche eigentlich aus Konjugationsfrequenz und Transpositionsfrequenz bestehen würde.

Ein anderes mögliches Szenario wäre, das die zusätzliche Aminoglykosid- und β -Laktam-Resistenz in Stamm 56 Teil eines sog. konjugativen Transposons ist, das entweder chromosomal oder Plasmid-kodiert sein kann. Während der Konjugation des 150 kb großen Plasmides lag das Transposon als DNA-Ring vor, der auch durch Konjugation übertragen wurde. Anschließend linearisierte das Transposon wieder und inserierte ins Chromosom des Konjuganten.

Konjugative Transposons wurden ursprünglich in Gram-positiven Bakterien beschrieben. Ein Beispiel ist Tn916 aus *Enterococcus faecalis*, welches Resistenz gegenüber Minocyclin vermittelt und 18 kb groß ist (zur Übersicht: Rice, 1998). In Laborversuchen konnte Tn916 konjugativ in *E. coli* transferiert werden und dort ins Chromosom integrieren, es ist aber bis jetzt in keinem klinischen Isolat der *Enterobacteriaceae* nachgewiesen worden.

1997 beschrieben Hochhut et al. ein selbst-übertragbares („self-transmissible“), 100 kb großes Element CTnscr94 in *Salmonella senftenberg*. Da es auch durch Konjugation übertragen wird und danach ins Chromosom inseriert, kann es zu den konjugativen Transposons gezählt werden. Dieses Element kann mit einer Konjugationsfrequenz von 10^{-6} bis 10^{-5} auf *E. coli* übertragen werden, wo es ins Chromosom integriert. Es galt als die erste Beschreibung eines konjugativen Transposons in *Enterobacteriaceae*. Schon 1995 gab es erste Anzeichen, dass das „IncJ Plasmid“ R391 aus *Providencia rettgeri* auch Ähnlichkeiten mit konjugativen Transposon hat (Murphy & Pembroke, 1995). R391 ist 88,5 kb groß und vermittelt Kanamycin- und Neomycin-Resistenz. Inzwischen gilt R391 als Archetyp der IncJ-Klasse der mobilen Elemente, da gezeigt werden konnte, dass keine Plasmid-Replikationsgene vorhanden sind (Böltner et al., 2002). R391 ist mit dem SXT-Element aus *Vibrio cholerae* verwandt. Beide kodieren fast identische Integrasen, die für die

chromosomale Integration, Excision und extra-chromosomale Zirkularisierung nötig sind (Hochhut et al., 2001).

Es ist möglich, dass solche Strukturen auch in Stamm 56 für die zusätzliche Aminoglykosid- (Kanamycin- und Neomycin-Resistenz!) und β -Laktam-Resistenz verantwortlich sind, die durch Konjugation übertragen wurde und dann ins Chromosom insertierte.

4.2.1.2. Analyse der Generationszeit

Für die Untersuchungen der Überlebensfähigkeit der Bakterien mit Multiresistenz war die Bestimmung der Generationszeit der Stämme sehr wichtig. Diese sollte als Maß für die Fitness der einzelnen Stämme gelten und anzeigen, ob die Resistenz-Plasmide einen Wachstumsnach- oder sogar -vorteil für die Stämme bedeuten.

Einige Studien haben gezeigt, dass Resistenz-Plasmide einen Fitness-Verlust in Form einer langsameren Wachstums-Geschwindigkeit für ihren Wirt bedeuten können. Dieser Nachteil kann in manchen Fällen durch Mutationen im Chromosom des Wirts im Laufe der Zeit kompensiert werden (Helling et al., 1981; Bouma & Lenski, 1988; McDermott et al., 1993).

Die Versuche mit den Stämmen 30, 31, 38 und 56 zeigten, dass die klinischen Isolate mit ihren Plasmiden mindestens so schnell wuchsen wie der sensible Wildtyp ohne Plasmid. Falls durch die Resistenzgene auf den Plasmiden Wachstumsnachteile entstanden waren, sind diese im Laufe der Evolution kompensiert worden. Stamm 38 war sogar reproduzierbar schneller als der Wildtyp, so dass die Möglichkeit besteht, dass das einzige Plasmid von Stamm 38 einen Wachstumsvorteil bescheren könnte.

Die Konjuganten von Stamm 56 waren in ihrer Wachstumsgeschwindigkeit mit dem Rezipienten *E. coli* MC1061-4 vergleichbar. Es kann also davon ausgegangen werden, dass das 150 kb große konjugative Plasmid von Stamm 56 trotz der vielen Resistenzgene keinen Wachstumsnachteil für die Zelle bedeutet. Auch der Konjugant Kan3, der wahrscheinlich ein konjugatives Transposon im Chromosom integriert hat, wuchs nicht langsamer als der Rezipient ohne zusätzliche mobile Elemente. Beide Fälle deuten darauf hin, dass, falls das Plasmid oder das mobile Elemente früher einen Wachstumsnachteil verursacht hat, dieser kompensiert worden ist.

Enne et al. beschrieben 2004 das Plasmid p9123, welches 4% Fitness-Vorteil für seinen klinischen *E.-coli*-Wirt und Laborstämme vermittelt. p9123 ist zwar nur 6,2 kb groß, es kodiert aber wie das 150 kb große konjugative Plasmid von Stamm 56 die Gene *sul2*, *strA* und *strB*. Restriktions-Mapping von p9123 ergab ebenfalls Ähnlichkeiten mit den *E.-coli*-

Plasmiden pBP1 und pTOJ01 (AJ307714), sowie dem Plasmid pKKTET7 aus *Shigella sonnei* (AF497970). Die Plasmide pTOJ01 und pKKTET7 kodieren beide ein zusätzliches *tet(A)*_{var} und besitzen hohe Homologie mit dem 3'-Bereich der *flo*-Multiresistenz-Insel von Stamm 56. Es wäre vielleicht denkbar, dass ein ähnliches, Fitness-verbesserndes Plasmid im Laufe der Evolution Teil des Plasmides von Stamm 56 geworden ist und durch andere Resistenzgene verursachte Wachstumsnachteile kompensiert. Ähnliches könnte den Wachstumsvorteil von Stamm 38 erklären.

4.2.1.3. Serologie

Zur weiteren Charakterisierung der vier Stämme wurde im Robert-Koch-Institut in Wernigerode eine Serotypisierung durchgeführt.

Für Stamm 30 wurde der Serotyp O86:H25 ermittelt. Literatur- und Internet-Recherchen fanden keine vorherige Beschreibung dieses Serotyps. Verwandte Serotypen, die auch das somatische Antigen O86 vorweisen, wurden als Erreger von Septicaemien in Kälbern und Schafen identifiziert. In Menschen sind O86-Serotypen isoliert worden, die zu den EaggEC (enteroaggregative *E. coli*; O86:H-) und EPEC (enteropathogene *E. coli*; O86:H27, O86:34, O86:H-) gehören (Universität Birmingham, <http://ecoli.bham.ac.uk/path/sero.html>). In Neuseeland wurde von O86:H40 Isolaten berichtet, die zu den STEC (Shiga-Toxin produzierenden *E. coli* = Verotoxin produzierende *E. coli* = VTEC) gehören und bei Menschen hämolytisch urämisches Syndrom (HUS) hervorgerufen haben (Lake et al., 2002). STEC-Stämme, die beim Menschen gastrointestinale Krankheiten verursachen, werden auch als enterohämorrhagische *E. coli* oder EHEC bezeichnet. HUS entsteht fast immer als Folge von hämorrhagischer Colitis (HC), einer gastrointestinalen Krankheit, so dass nach diesen Daten O86:H40 als EHEC einzuordnen wäre. STEC werden häufig in Rindern und Schafen gefunden, die als Nahrung für Menschen dienen. Für den Menschen pathogene STEC-Stämme exprimieren meistens zusätzlich zu den Shiga-Toxin-Genen (*stx1* und *stx2*) andere Virulenz-Gene wie das Intimin-Gen (*eae*) oder das Enterohämolysin-Gen (*ehxA*). Sie werden auch als komplexe STEC (cSTEC) bezeichnet (Djordjevic et al., 2004).

Die für die Stämme 31, 38 und 56 ermittelten Serotypen werden ebenfalls mit STEC assoziiert. Ont:H- (Stamm 31) ist kein genau definierter Serotyp [Ont bedeutet, dass dem Isolat kein bekanntes O-Antigen zugeordnet werden konnte (nt = non-typable)]. So bezeichnete Stämme scheinen aber relativ weit verbreitet zu sein: Ont:H- Stämme wurden aus neuseeländischen Rindern isoliert und haben in Neuseeland auch beim Menschen vereinzelt Krankheiten hervorgerufen (Lake et al., 2002). Ont:H- konnte in Australien als Ursache von

sporadischen Fällen von HUS in Kindern identifiziert werden (Elliot et al., 2001). Untersuchungen an australischen Schafen identifizierten Ont:H- cSTEC mit den Genkombinationen *stx1* und *ehxA*, bzw. *stx1*, *stx2*, *eae* und *ehxA* (Djordjevic et al., 2004). Ebenfalls aus Schafen konnte dieser „Serotyp“ in Brasilien isoliert werden (Vettorato et al., 2003). In Spanien sind *E.-coli*-Stämme mit dem Ont:H- „Serotyp“ wiederholt aus Rindern, Schafen, rohem Fleisch und Menschen mit HUS isoliert worden (Blanco et al., 2003). Es kann leider keine Aussage gemacht werden, ob es sich bei all diesen Stämmen um das selbe bislang unbekannt O-Antigen handelt.

O159:H28 (Stamm 38) ist in Spanien aus Rindern, aber noch nie aus Menschen isoliert worden (<http://www.lugo.usc.es/ecoli/serotiposbov.htm>).

Ont:H6 (Stamm 56) ist ähnlich wie Ont:H- kein genau definierter Serotyp. Stämme mit dieser Bezeichnung sind aber in Neuseeland aus Menschen isoliert worden. Isolate mit diesem Serotypisierungsergebnis haben Krankheiten hervorgerufen, es existieren aber keine Berichte über Ausbrüche oder Fälle von HUS (Lake et al., 2002). Ont:H6 ist auch in Brasilien nachgewiesen worden. Der „Serotyp“ wurde wiederholt aus Kaninchen mit Durchfall isoliert. Untersuchungen detektierten das Intimin-Gen *eae*, aber keine Gene für Shiga-Toxine (Penteado et al., 2002).

Da für alle vier Stämme auf Schafblutagar eine α -Hämolyse und nach 48h sogar eine β -Hämolyse zu beobachten ist, spricht einiges dafür, dass alle vier Stämme ein Hämolysin-Gen exprimieren. Dies wäre kongruent mit den Ergebnissen der Serotypisierung, wonach drei von vier Stämmen zu den STEC gehören und auch der vierte mit Krankheiten assoziiert worden ist. Stamm 56 könnten zwei Hämolysin-Gene besitzen, da der getestete Konjugant Amp16 ein schwächeres Hämolyse-Bild verursachte als der Donor, was darauf hin deutet, dass nur ein Teil der Fähigkeit zur Hämolyse übertragen wurde.

4.2.2. Charakterisierung der Resistenzmechanismen

Tabelle 4.2 zeigt eine Übersicht der in den untersuchten Stämmen gefundenen Resistenzgene und mobilen Elemente, die anschließend diskutiert werden sollen.

Tab. 4.2 Resistenzmechanismen in den vier ausgewählten Stämmen

	30	31	38	56	Kan3	Amp16	
β-Laktame	TEM-101	AmpC _{hyper} TEM-30	AmpC _{hyper}	TEM-1b	TEM-1b	CMY-2	
			TEM-1b	CMY-2	CMY-2		
Chinolone	1 <i>gyrA</i>	2 <i>gyrA</i> 1 <i>parC</i>	2 <i>gyrA</i> 1 <i>parC</i>	2 <i>gyrA</i> 1 <i>parC</i>	-	-	
			MAR	MAR			
Aminoglykoside	<i>aac(6')-Ib₇</i> <i>aph(3')-Ia</i> <i>strA, strB</i>	<i>aph(3')-Iab/c</i> <i>aadA1,</i> <i>strA, strB</i>	<i>aac(3)-II</i> <i>aadA5,</i> <i>strA, strB</i>	MAR	<i>aph(3')-Ia</i>	<i>aadA2,</i> <i>strA, strB</i>	
				<i>aph(3')-Ia</i>			<i>aph(3')-Ia</i>
				<i>aadA2,</i> <i>strA, strB</i>			<i>aadA2,</i> <i>strA, strB</i>
Tetracycline	-	-	MAR	MAR	<i>tet(A)</i>	<i>tet(A)</i>	
			<i>tet(B)</i>	<i>tet(B)</i> <i>tet(A)</i>			
Chloramphenicol	<i>catI</i>	<i>catI</i>	<i>catI</i>	<i>catI</i> <i>flo</i>	<i>flo</i>	<i>flo</i>	
Trimethoprim	-	<i>dhfrI</i>	<i>dfr17</i>	<i>dfr12</i>	<i>dfr12</i>	<i>dfr12</i>	
Sulfamethoxazol	<i>sulI</i>	<i>sul2</i>	<i>sulI</i> <i>sul2</i>	<i>sulI</i> <i>sul2</i>	<i>sulI</i> <i>sul2</i>	<i>sulI</i> <i>sul2</i>	
Quecksilber	<i>merA</i>	<i>merA</i>	-	<i>merA</i>	<i>merA</i>	<i>merA</i>	
Mobile Elemente	Tn, In	Tn, In	Tn, In	Tn, In	Tn, In	Tn, In	

Grau schattierte Resistenzgene sind wahrscheinlich chromosomal kodiert, weiße Resistenzgene sind wahrscheinlich Plasmid-kodiert

4.2.2.1. β-Laktam-Resistenz

Die Untersuchung der β-Laktam-Resistenz in Stamm 30 ergab eine neue ESBL der TEM-Familie, TEM-101. Die MHK-Werte sind für einen Stamm mit einer ESBL typisch, weswegen die β-Laktamase phänotypisch eindeutig zugeordnet werden konnte. TEM-101 unterscheidet sich von TEM-1 an den Positionen 39 (Gln→Lys), 238 (Gly→Ser) und 240 (Glu→Lys), wobei fast alle ESBLs einen Aminosäure-Austausch an Position 238 oder 240 haben, so dass diese Austausche maßgeblich für den ESBL-Phänotyp verantwortlich sind (<http://www.lahey.org./studies/temtable.asp>). Die Charakterisierung der β-Laktamase auf Protein-Ebene zeigte eine durchschnittliche spezifische β-Laktamase-Aktivität. Das Ergebnis für den isoelektrischen Punkt des Enzyms korrelierte sehr gut mit dem theoretischen Wert. Das Gen für TEM-101 konnte zwar nicht durch Konjugation oder Transformation übertragen werden, eine Plasmid-Lokalisation ist dennoch für das Gen wahrscheinlich, da alle PCRs

zufriedenstellend mit Plasmid-Präparationen als Template verliefen und TEM-Gene in den meisten Stämmen Plasmid-kodiert vorliegen.

Die Untersuchungen der β -Laktam-Resistenz von Stamm 31 führten zu dem Sonderfall, dass die phänotypische β -Laktamase-Identifizierung anfänglich nicht mit der genotypischen übereinstimmte: Die β -Laktamase wurde phänotypisch als AmpC_{hyper/Plasmid} identifiziert, PCRs und Sequenzierungen führten aber zum ersten Nachweis einer IRBL in Deutschland, TEM-30. Diese Diskrepanz zwischen Phänotyp und Genotyp wurde durch Proteinanalysen aufgeklärt, bei denen gute Belege für die zusätzliche Hyperproduktion der chromosomalen AmpC- β -Laktamase des Stammes 31 gefunden wurden. In einer PCR, in der der Bereich vom Promotor bis in den kodierenden Bereich des Gens amplifiziert wurde, konnte die Hyperproduktion nicht nachgewiesen werden. Es ist daher wahrscheinlich, dass die Hyperproduktion durch Amplifikation des ganzen Gens inklusive des Promotors entstanden ist. Normark et al. beschrieben 1977 AmpC-Hyperproduzenten, die sie im Labor erzeugt hatten und die mit einem Mutationsereignis 9 Kopien von *ampC* hinzugewonnen hatten. Diese Kopienzahl ließ sich in weiteren Selektionsrunden erhöhen. Die β -Laktam-Resistenz in Stamm 31 scheint vollständig chromosomal kodiert zu sein. Die *ampC*-Amplifikation fand im Chromosom statt und das TEM-30-Gen scheint auch chromosomal zu sein, da es nicht von Plasmid-Präparationen in PCRs amplifiziert werden konnte. Dieser seltene Fall eines TEM-Gens im Chromosom könnte eine Folge der Evolution sein, in der durch Transposition ins Chromosom und Verlust des ursprünglichen Plasmids die Fitness des Stamms verbessert wurde.

Die β -Laktam-Resistenz in Stamm 38 wird von einem chromosomal kodierten Gen, *ampC*, und einem Plasmid-kodierten Gen, *bla*_{TEM-1b}, vermittelt. Der Hauptanteil der Resistenz wird durch Hyperproduktion von AmpC verursacht. Die erhöhte Expression entsteht durch vier Mutationen im *ampC*-Promotor, die aus dem normalerweise schwachen Promotor einen starken Promotor machen.

Die Untersuchungen der β -Laktam-Resistenz in Stamm 56 ließen anfangs vermuten, dass es zwei Plasmid-kodierte β -Laktamasen in diesem Stamm gibt, die AmpC- β -Laktamase CMY-2 und die OSBL TEM-1b. CMY-2 ist maßgeblich für die Resistenz verantwortlich, wobei TEM-1b schon einen signifikanten Anteil an der Resistenz hat, was man daran erkennen kann, dass Typ-A-Konjuganten (Kan3) mit CMY-2 und TEM-1b für bestimmte β -Laktame höhere MHK-Werte hatten als die Konjuganten mit nur CMY-2 (Typ-B-Konjuganten wie Amp16). Da es möglich war, CMY-2 auch separat von TEM-1b durch Konjugation zu übertragen, wurde vermutet, dass die Gene auf zwei verschiedenen Plasmiden liegen mussten. Dieses

Ergebnis wurde davon gestützt, dass beide Gene aus Plasmid-Präparationen nachgewiesen werden konnten. Gegen diese Theorie spricht aber, dass in Typ-A-Konjuganten kein zusätzliches Plasmid nachgewiesen werden konnten. Analysen der Plasmid-Präparationen zeigten, dass dieses durch chromosomale DNA verunreinigt waren (chromosomale Hauskeeping-Gene wie *gyrA* konnten auch von der Plasmid-Präparation aus amplifiziert werden). Unter 4.2.1.1. wurde besprochen, dass mobile Strukturen wie konjugative Transposons oder IncJ-Elemente dieses Ergebnis erklären könnten. Das TEM-1b-Gen von Stamm 56 könnte auf einer solchen Struktur chromosomal kodiert vorliegen und dennoch wie auf einem Plasmid durch Konjugation übertragen werden.

4.2.2.2. Chinolon-Resistenz

Die Chinolon-Resistenz ist in allen vier Stämmen rein chromosomal kodiert und nicht übertragbar: Stamm 30 hat nur eine Punktmutation in *gyrA*, die anderen drei Stämme haben jeweils zwei *gyrA*- und eine *parC*-Punktmutation, was sich in deutlich höheren Chinolon-MHK-Werten äußert. Bei den Stämmen 38 und 56 wird die Chinolon-Resistenz zusätzlich zu den Zielgen-Mutationen auch durch erhöhten Efflux und verringerten Influx im Rahmen des MAR-Phänotyps beeinflusst. In Stamm 56 konnte zwar keine Mutation in *marO* oder *marR* detektiert werden, auf Grund der ausgeprägten Lösungsmittel-Resistenz muss aber von einem MAR-Phänotyp ausgegangen werden. Mutationen, die zu einer Überexpression von *soxS*, *robA*, oder *acrAB* führen, würden auch einen MAR-Phänotyp verursachen (Greenberg et al., 1990; Nakajima et al., 1995; und White et al., 1997). Der Anstieg der Chinolon-Resistenz ist erfahrungsgemäß nicht sehr groß (zwei bis drei MHK-Stufen, Cohen et al., 1993). Es ist aber möglich, dass die *mar*-Mutationen in Stamm 38 und 56 die Evolution der Chinolon-Resistenz in diesen Stämmen entscheidend beeinflusst haben: 1989 berichteten Cohen et al., dass *mar*-Mutanten leichter zu hoher Chinolon-Resistenz mutierten als Stämme ohne *mar*-Mutation. Kern et al. beobachteten, dass bei der schrittweisen Selektion von Chinolon-Resistenz auf die erste *gyrA*-Mutation an Position 83 oder 87 eine Mutation im *mar*-Operon folgte, bevor weitere Mutationen in *gyrA* und *parC* selektiert werden konnten (Kern et al., 2000).

4.2.2.3. Aminoglykosid-Resistenz

In den vier hier untersuchten Stämmen konnten insgesamt neun verschiedenen Gene für Aminoglykosid-modifizierende-Enzyme nachgewiesen werden, wobei in jedem Stamm vier

Gene detektiert wurden. In allen Stämmen wurde eine Kopplung der beiden Phosphotransferase-Gene *strA* und *strB* vorgefunden, wobei der Einfluss auf die Streptomycin-Resistenz in den einzelnen Stämmen schwer einschätzbar ist: In Stamm 30 konnten die Gene trotz Anwesenheit keine Streptomycin-Resistenz vermitteln, in den anderen drei Stämmen sowie den Konjuganten von Stamm 56 ist jeweils ein zusätzliches Adenyltransferase-Gen (*aadA*) vorhanden, welches Resistenz gegenüber Streptomycin und Spectinomycin vermittelt und somit einen eventuellen Effekt von *strA* und *strB* überdeckt.

Stamm 30 besitzt neben *strA* und *strB* auch *aph(3')-Ia*, welches Resistenz gegenüber Kanamycin und Neomycin vermittelt, und *aac(6')-Ib₇*, das Resistenz gegenüber Gentamicin, Netilmicin und Tobramycin verursacht. Der Resistenz-Phänotyp des Aac(6')-Ib-Enzyms ist auffällig, da diese Acetyltransferasen gewöhnlicherweise Amikacin statt Gentamicin modifizieren. Untersuchungen von Rather et al. (1992) zeigten aber, dass ein Aminosäure-Austausch Leu→Ser an Position 119 des Proteins zur Änderung der Substrat-Spezifität führt. Die betroffene Aminosäure befindet sich in der Aminoglykosid-Bindedomäne des Enzyms. Die Gen-Variante *aac(6')-Ib₇* wurde das erste Mal von Casin et al. (1998) in *Citrobacter freundii* beschrieben. Das Gen war auch dort Teil eines Integrons, allerdings nicht an letzter Position.

Die Untersuchungen von Stamm 31 zeigten neben *strA* und *strB* auch *aadA1*, ein Streptomycin-Resistenzgen, das als Genkassette im Integron von Stamm 31 lokalisiert ist. Des Weiteren wurde ein Gen der *aph(3')-I*-Familie detektiert. Diese Phosphotransferasen vermitteln üblicherweise Kanamycin- und Neomycin-Resistenz, aber keine Tobramycin-Resistenz. Stamm 31 hat aber für Tobramycin eine MHK von 2 µg/ml, was als klinisch intermediär gewertet wird. Es konnten keine weiteren Gene detektiert werden, die für diesen Phänotyp verantwortlich sein konnten. Ein Anzeichen, dass die Anwesenheit des *aph(3')-I*-Gens für die verminderte Tobramycin-MHK verantwortlich ist, ergab sich aus zwei MHK-Bestimmungen, in der für einige Aminoglykoside in Stamm 31 unterschiedliche MHK-Werte ermittelt werden konnten. In Tabelle 3.1 wurden für Neomycin eine MHK von 128 µg/ml und Tobramycin eine MHK von 2 µg/ml bestimmt, in Tabelle 3.13. für Neomycin 32 µg/ml und für Tobramycin 0,5 µg/ml, eine Reduktion der MHK-Werte um zwei Stufen. Die Kanamycin-MHK lag bei beiden Messungen bei >256 µg/ml, so dass keine Aussage getroffen werden kann, ob es auch hier bei der zweiten Messung eine Reduktion der MHK gab. Diese Ergebnisse deuten darauf, dass bei der ersten Messung *aph(3')-I* stärker exprimiert wurde als bei der zweiten. Diese Theorie wird von der Beobachtung von Menard et al. (1993) gestützt, dass Hyperproduktion von Aph(3')-I zu Tobramycin-Resistenz in *E. coli* führt. Der Resistenz-

Mechanismus scheint auf Komplex-Bildung zwischen Tobramycin und dem Enzym zu beruhen. Stamm 31 scheint in der ersten Messung genug Aph(3')-I produziert zu haben, um das Tobramycin zu binden und die MHK zu erhöhen. Die variablen Enzym-Mengen könnten auf schwankenden Kopienzahlen des Plasmids beruhen, auf dem *aph(3')-I* wahrscheinlich kodiert ist.

Bei Stamm 38 konnten die Aminoglykosid-Resistengene *strA*, *strB*, *aadA5* und *aac(3')-II* nachgewiesen werden. Das *aadA5*-Gen ist eine Genkassette im Stamm-38-Integron, *aac(3')-II* konnte nicht genau lokalisiert werden, eine Plasmid-Lokalisation ist aber zu vermuten, da alle PCRs aus Plasmid-Präparationen zufriedenstellend verliefen.

Die Aminoglykosid-Resistenz in Stamm 56 wird sowohl vom Chromosom als auch von Plasmiden kodiert. Die Streptomycin-Resistenzgene *strA*, *strB* und *aadA2* werden vom 150 kb großen, konjugativen Plasmid kodiert. Das Kanamycin- und Neomycin-Resistenzgen *aph(3')-Ia* wurde nur bei Typ-A-Konjuganten wie 56 Kan3, nicht aber bei Typ-B-Konjuganten wie 56 Amp16 nachgewiesen, was ursprünglich für eine Lokalisation auf dem konjugativen Plasmid 2 (Tab. 3.24) zusammen mit dem TEM-1b-Gen sprach. Da aber keine Plasmid-Unterschiede zwischen Typ-A- und Typ-B-Konjuganten nachgewiesen werden konnten, wird postuliert, dass *aph(3')-Ia* zusammen mit *bla_{TEM-1b}* auf einem konjugativen Transposon oder IncJ-Element liegt, was nach der Konjugation ins Chromosom inserierte (vgl. 4.2.1.1.). Die Aminoglykosid-Resistenz in Stamm 56 hat aber auch eine nicht-übertragbare Komponente: Die MHK-Werte für Amikacin, Gentamicin, Netilmicin, Neomycin, Tobramycin und Apramycin werden durch Zugabe des Efflux-Pumpen-Inhibitors PAßN reproduzierbar um eine Stufe reduziert (Tab. 3.13), wodurch Stamm 56 gegenüber Gentamicin, Netilmicin und Tobramycin nicht mehr klinisch resistent ist. Dies spricht für eine chromosomale, Efflux-vermittelte Resistenz im Rahmen des MAR-Phänotyps. Anzeichen für eine Rolle des MAR-Phänotyps gab es in diesem Stamm schon durch die erhöhte Lösungsmittel-Toleranz (Tab. 3.12). Es stellt sich allerdings die Frage, wie genau durch den MAR-Phänotyp die Aminoglykosid-MHK-Werte beeinflusst werden. Es ist bekannt, dass in MAR-Mutanten das Efflux-System AcrAB überexprimiert wird (Ma et al., 1995) und maßgeblich an der entstehenden Chinolon-, Tetracyclin-, und Chloramphenicol-Resistenz beteiligt ist (Okuso et al., 1996). Durch AcrAB werden nur hydrophobe Substanzen rausgepumpt. Die meisten Aminoglykoside sind aber stark hydrophil. 2000 beschrieben Rosenberg et al., dass ein mit AcrB verwandtes Protein, AcrD, in der Lage ist, Aminoglykoside wie Amikacin, Gentamicin, Tobramycin, Kanamycin und Neomycin zu pumpen. Im Vergleich zu einem AcrD-negativen Stamm waren die MHK-Werte der Antibiotika um ein bis zwei Stufen erhöht, was dem in

Stamm 56 gemessenen Efflux-Einfluß entsprechen würde. Es ist zu diesem Zeitpunkt unbekannt, ob der MAR-Phänotyp die Expression von AcrD beeinflusst, oder ob es sich bei der in Stamm 56 vermuteten AcrD-Hyperproduktion um ein separates Phänomen handelt. Ein Einfluss wäre aber denkbar, da zum einen AcrB und AcrD nah genug verwandt sind, dass Domänen ausgetauscht werden können, zum anderen eine mögliche Interaktion von AcrA mit AcrD wie bei dem Efflux-System AcrAB nachgewiesen worden ist (Elkins & Nikaido, 2002). Barbosa und Levy (2000) konnten bei konstitutiver MarA-Expression nur eine gesteigerte AcrA-Expression beobachten. Die AcrB-Mengen blieben konstant. Wenn gesteigerte AcrA-Expression im Rahmen des MAR-Phänotyps für gesteigerte AcrAB-Produktion verantwortlich ist, könnte es auch zu einer gesteigerten AcrAD-Produktion und somit zu erhöhter Aminoglykosid-Resistenz in Stamm 56 kommen.

4.2.2.4. Tetracyclin-Resistenz

Die Untersuchung der Tetracyclin-Resistenz in den vier Stämmen fand ausgeprägte Resistenz in den Stämmen 38 und 56, die durch Tetracyclin-Efflux verursacht wird.

In Stamm 38 wurde das *tetA(B)*-Efflux-Gen detektiert, welches spezifischen Tetracyclin-, Doxycyclin- und Minocyclin-Efflux vermittelt.

In Stamm 56 konnten die Efflux-Gene *tetA(A)* und *tetA(B)* nachgewiesen werden. Das *tetA(A)*-Gen wird vom 150 kb großen, konjugativen Plasmid kodiert und vermittelt Resistenz gegenüber Tetracyclin und Doxycyclin, *tetA(B)* wird wahrscheinlich von einem nicht-konjugativen Plasmid kodiert und vermittelt Resistenz gegenüber Tetracyclin, Doxycyclin und Minocyclin.

In beiden Stämmen existiert zusätzlich zum Tetracyclin-spezifischen Efflux auch noch eine unspezifische Efflux-Komponente, die durch den MAR-Phänotyp verursacht wird.

Bei allen vier Stämmen war auffällig, wie groß der natürliche Anteil von Efflux an der Doxycyclin- und Minocyclin-MHK war. Der Effekt wurde durch die Reduktion der MHK-Werte durch PAßN sichtbar gemacht und war bei Minocyclin mit drei bis vier Stufen Reduktion stärker ausgeprägt als bei Doxycyclin (ein bis zwei Stufen, siehe Tab. 3.13). Eine Erklärung ist, dass bei intaktem Regulationssystem das *mar*-Operon durch bestimmte Substanzen wie Tetracycline induziert wird (Hächler et al., 1991), so dass es zur Expression von MarA kommt und die AcrAB-Produktion hochreguliert wird. Des Weiteren wird immer eine bestimmte Grundmenge AcrAB aktiv in der Zelle vorhanden sein und Tetracycline rauspumpen können. Dafür würde auch sprechen, dass dieser Effekt auch im Kontrollstamm

E. coli ATCC 25922 zu beobachten ist. Es ist allerdings nicht erklärbar, weshalb dieser Effekt nicht auch bei Tetracyclin sichtbar ist. Durch PA β N-hemmbarer Efflux von Tetracyclin wurde nur in den Stämmen 38 und 56 beobachtet, die einen MAR-Phänotyp exprimieren. Da diese beiden Stämme aber auch Tetracyclin-spezifische Efflux-Pumpen haben und die MHK-Reduktion durch PA β N in diesen Stämmen besonders ausgeprägt war, kann nicht genau gesagt werden, welchen Anteil Tet-Proteine und welchen Anteil MAR an dem jeweiligen Efflux haben.

4.2.2.5. Chloramphenicol-Resistenz

In allen Stämmen konnte *catI*-vermittelte Chloramphenicol-Resistenz detektiert werden. Es ist auffällig, dass Resistenz gegenüber einem Antibiotikum, was seit Jahren nicht mehr in der Therapie von *E.-coli*-Infektionen eingesetzt wird, so weit verbreitet ist. Man würde normalerweise annehmen, dass aus Effizienzgründen die unnötige Resistenz-Determinante ohne Selektionsdruck schnell verloren gehen würde. Das *catI*-Gen wird aber in diesen Stämmen wahrscheinlich beibehalten, weil andere, evolutionär vorteilhafte Resistenzgene mit *catI* auf dem selben Plasmid liegen und somit für die Co-Selektion von *catI* verantwortlich sind.

Ähnlich könnte es bei dem *flo*-Gen in Stamm 56 sein. Es befindet sich auf dem 150 kb großen konjugativen Plasmid, auf dem auch *bla_{CMY-2}*, *dfr12*, *sul1*, *sul2*, *tet(A)*, *aadA2*, *strA*, und *strB* kodiert sind und das Resistenz gegenüber β -Laktamen, Co-trimoxazol, Tetracyclinen und Aminoglykosiden vermittelt. Eine andere Erklärung könnte aber auch sein, dass dieses Isolat ursprünglich aus Tieren stammt, wo Florfenicol in der Therapie eingesetzt wird. Dafür würde auch das Serotypisierungsergebnis sprechen: *E. coli* Ont:H6 Isolate sind schon als STEC in Neuseeland beschrieben worden, wo sie für blutige Durchfälle verantwortlich waren (Lake et al., 2002). STEC werden regelmäßig aus Tieren isoliert und es ist zu vermuten, dass ein Großteil der STEC-Infektionen in Menschen durch Verzehr von rohem oder nicht ausreichend gekochtem Fleisch verursacht werden. Die ersten dokumentierten Fälle von EHEC-Infektionen waren mit dem Verzehr unzureichend gegarter Hamburger assoziiert (Riley et al., 1983).

In allen Stämmen hat die Chloramphenicol-Resistenz auch eine Efflux-vermittelte Komponente, die sich in einer MHK-Reduktion durch PA β N um mindestens ein bis zwei Stufen äußert. In den Stämmen 38 und 56 ist dies auf Grund des MAR-Phänotyps zu erwarten, bei Stamm 56 kommt *flo*-vermittelter spezifischer Chloramphenicol-Efflux hinzu,

von dem allerdings nicht bekannt ist, ob er durch PAßN hemmbar ist. Eine Reduktion der Chloramphenicol-MHK um eine Stufe war aber auch beim Kontrollstamm *E. coli* ATCC 25922 zu beobachten, so dass es sich hierbei wahrscheinlich um die Grund-Expression von AcrAB handelt.

4.2.2.6. Antifolat-Resistenz

Die Untersuchung der Antifolat-Resistenz in den vier Stämmen gliederte sich die Untersuchung der Trimethoprim- und der Sulfamethoxazol-Resistenz.

In den vier untersuchten Stämmen konnten drei verschiedene *dfr*-Gene detektiert werden (siehe Tab. 3.21). Die Gene waren jeweils als Genkassette an Position 1 des jeweiligen Integrons lokalisiert. Die Integrons in den Stämmen 31 und 38 sind wahrscheinlich Plasmid-kodiert, das Integron von Stamm 56 ist nachweislich ein Teil des 150 kb großen konjugativen Plasmids.

In allen Stämmen konnte mindestens ein *sul*-Gen nachgewiesen werden, in den Stämmen 38 und 56 sogar *sul1* und *sul2* zusammen im selben Stamm. Da Stamm 38 nur ein Plasmid besitzt, kann davon ausgegangen werden, dass *sul1* und *sul2* auf dem selben, ca. 130 kb großen Plasmid lokalisiert sind. Konjugationsversuche haben gezeigt, dass *sul1* und *sul2* in Stamm 56 auch auf dem 150 kb großen konjugativen Plasmid kodiert sind. Die Anwesenheit von *sul1* auf großen, (im Fall von 38 wahrscheinlich) konjugativen Plasmiden ist nicht unerwartet, da *sul1* ein Teil des 3'-konservierten Bereichs von Integrons ist und diese häufig auf großen konjugativen Plasmiden anzutreffen sind. Das Vorkommen von *sul2* auf diesen Plasmiden ist auffälliger, da *sul2* meistens nur auf kleinen, nicht-konjugativen Plasmiden wie pBP1 und RSF1010 angetroffen wird. Eines der wenigen großen, konjugativen Plasmide, auf welchem *sul2* kodiert wird, ist pGS05 und es wurde spekuliert, dass pGS05 durch Fusion eines großen konjugativen Plasmides mit einem pBP1-ähnlichen Plasmid entstanden ist (Radstrom & Swedberg, 1988). Ein ähnliches Ereignis ist auch in den Stämmen 38 und 56 denkbar. In Stamm 56 ist es sehr wahrscheinlich, dass die Multiresistenz-Insel um *flo*, *tet(A)*, *strB*, *strA* und *sul2* durch Rekombinations-Ereignisse entstanden ist (vgl. 4.3.).

Die Kombination aus *dfr*- und *sul*-Genen ist für *E.-coli*-Stämme von Vorteil, da *E. coli* häufig Verursacher von Harnwegsinfekten ist und das Mittel der Wahl lange Co-trimoxazol war, ein Kombinationspräparat aus Trimethoprim und Sulfamethoxazol. Das Vorhandensein beider Gene, besonders eng verbunden in der Struktur eines intakten Klasse 1 Integrons, verleiht Resistenz gegenüber diesem Präparat.

4.2.2.7. Mobile Elemente

Die Untersuchungen der mobilen Elemente konzentrierten sich hauptsächlich auf Transposons der Tn3- und Tn21-Familie, sowie auf Integrons. Auf Insertionssequenzen wird beim Gen-Mapping von Stamm 56 näher eingegangen (vgl. 4.3.).

In keinem der vier Stämme konnten Transposons der Familie Tn3 nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis ist in so fern etwas unerwartet, da in allen vier Stämmen Gene nachgewiesen wurden, die für TEM-1 oder TEM-1-Derivate kodieren. TEM-1a wird von Tn3 selber, TEM-1b vom nah verwandten Tn2, und TEM-2 von Tn1 kodiert (Chen & Clowes, 1987; Goussard & Courvalin, 1991). Es wäre daher zu vermuten, dass alle TEM-Derivate auch Teil von Tn3-Familie-Transposons wären. Gerlach und Wiedemann führten 1985 die erste epidemiologische und molekularbiologische Studie zur Verknüpfung von Tn3 und *bla_{TEM}* in *E. coli* durch. In 50 % der Fälle konnte eine Transposition von *bla_{TEM}* detektiert werden. In den untersuchten nicht-transposablen Strukturen wurden Punktmutationen oder Deletionen in den Transposon-Genen nachgewiesen, was zum Schluss führte, alle TEM-Gene in Gram-negativen Bakterien seien von Tn3-ähnlichen Strukturen abgeleitet. Seit dem sind nur wenige Untersuchungen zu dieser Thematik durchgeführt worden. Jacoby und Sutton untersuchten 1991 ESBLs auf die Anwesenheit von Transposon-Strukturen. Es konnte bei keiner ESBL Transposon-Aktivität nachgewiesen werden, mit TEM-3, TEM-4, TEM-6, TEM-7, TEM-8 (CAZ-2), TEM-9, sowie TEM-12 (You-2) konnten allerdings *tnpR*-Gene assoziiert werden. In den meisten Fällen sind bei der Beschreibung neuer TEM-ESBLs oder -IRBLs keine Transposon-Analysen durchgeführt worden. Zu den Ausnahmen gehören die Beschreibungen der ESBL TEM-21, einem TEM-2-Derivat, welches auf einem trunkierten Tn3-Familie Transposon liegt (Dubois et al., 2002), und der IRBL TEM-67, die sich ebenfalls von TEM-2 ableitet und deren Gen in einer Tn1-Struktur liegt (Naas et al., 2003). Es ist daher schwer einzuschätzen, wie die negativen Ergebnisse der Tn3-PCR zu werten sind: Sie könnten ein Beleg dafür sein, dass im Laufe der Evolution die Transposon-Strukturen deletiert worden sind, um die Resistenz-Strukturen zu optimieren. Die PCR könnte aber auch auf Grund von Sekundärstrukturen oder defekten Primern falsch-negativ sein und die TEM-Gene der vier Stämme könnten zumindest zum Teil mit Tn3-assoziiert sein.

In allen vier untersuchten Stämmen konnten Tn21-Familie-Transposons nachgewiesen werden. Die *tnpA*-PCRs waren für alle Stämme positiv, ein *tnpR*-Gen konnte nur in den Stämmen 30, 31, und 56, sowie den Konjuganten von 56 detektiert werden. Wie schon oben für TEM-21 beschrieben wurde, können manche Transposon-Bestandteile im Laufe der

Evolution deletiert werden, was meistens mit dem Verlust der Transponierbarkeit einher geht. So könnte es beim Transposon in Stamm 38 der Fall sein. Dafür würde auch sprechen, dass keine *merA*- und *merR*-Gene in diesem Stamm nachgewiesen werden konnten, wobei nicht alle Tn21-Familie-Transposons ein Quecksilber-Resistenz-Operon kodieren. Ein Beispiel wäre Tn1721, welches statt eines *mer*-Operons *tetR(A)* und *tetA(A)* kodiert (Schmitt et al., 1979). Es wäre theoretisch denkbar, dass das *tnpR*-Gen so unterschiedlich zu den übrigen Tn21-Familie-Genen ist, dass die Primer nicht an das Gen binden und es amplifizieren können. Dagegen spricht aber, dass die *tnpR*-Gene innerhalb der Tn21-Familie stärker konserviert sind als die *tnpA*-Gene (Grinsted et al., 1990).

In den Stämmen 30, 31, 56, sowie den Konjuganten von Stamm 56 konnten neben den eigentlichen Transposon-Genen *tnpA* und *tnpR* auch die Gene *merA* und *merR* des Quecksilber-Resistenz-Operons nachgewiesen werden, die häufig Teil von Tn21-Familie-Transposons sind. Wachstumsversuche auf Quecksilber-haltigem Agar konnten die Funktionalität des Operons nachweisen.

Die Sequenzierung der *tnpA*- und *merA*-Gene aus Stamm 56 zeigten, dass es sich bei „Tn56“ nicht um ein bereits beschriebenes Transposon der Tn21-Familie handelt. Die Größte Ähnlichkeit besteht zu den Quecksilber-Resistenz-Transposons Tn5036 und Tn1626 (Partridge et al., 2001), deren *tnpA*-Gene im sequenzierten Bereich mit „Tn56“ 100% homolog sind. Geringe Unterschiede bestehen in den *merA*-Sequenzen, so dass von einer nahen Verwandtschaft ausgegangen werden kann. Ähnliche *merA*-Gene wurden in einem *Pseudomonas-putida*-Isolat und auf dem Plasmid pDU1358 gefunden, wobei leider keine entsprechenden Transposon-Sequenzen zur Verfügung stehen. Die Mapping-Versuche zeigten, dass analog zu Tn21 und Tn1626 das Integron von Stamm 56 ein Bestandteil von „Tn56“ ist (vgl. 4.3.).

Integron-Analysen konnten in allen vier Stämmen Klasse-1-Integrone detektieren.

Das Integron in Stamm 30 ist atypisch, da ein Teil des 5'-konservierten Bereichs, der normalerweise in allen Integrone vorkommt, fehlt. Das Integrase-Gen *int1* und der Genkassetten-Promotor $P_{ant}/P1$ (siehe Abb. 3.24) sind zwar vollständig, aber der Integrase-Promotor P sowie die *attI*-Site fehlen. Anstelle dessen liegt zwischen *int1* und der Genkassette *aac(6')-Ib₇* ein Bereich von 340 Basenpaaren ohne bekannte Funktion. Bei Datenbank-Recherchen konnte keine Homologie zu bekannten Sequenzen gefunden werden.

Der Promotor P_{ant} liegt in der schwächsten Form vor (Collis & Hall, 1995) und der Bereich eines potentiellen starken $P2$ -Promotors liegt im fehlenden 5'CS-Bereich. Daher ist es

unwahrscheinlich, dass P_{ant} für die Expression von *aac(6')-Ib₇* ausreicht. Eventuell gibt es in den 340 bp Sequenzen, die als zusätzlicher Promotor dienen. Ohne Integrase-Promotor und *attI*-Site ist es unwahrscheinlich, dass neue Genkassetten in das Integron eingefügt werden können. Das Integron kann aber trotz des Defektes Selektionsvorteile bringen, da es Resistenz gegenüber drei Aminoglykosiden und Sulfonamiden vermittelt. Interessant ist die Frage nach der Entstehung dieser Integron-Struktur. Da die unbekannte Sequenz so nah am Integrase-Gen und nicht an der *attI*-Site anfängt, ist Int1 wahrscheinlich nicht für die Integration der 340 bp verantwortlich. Int1 bevorzugt die *attI*-Site als Integrations-Ort (Recchia et al., 1994). Eine andere Möglichkeit für die Entstehung des atypischen Bereichs im Integron ist durch homologe Rekombination. Dabei lagern sich zwei DNA-Stränge zusammen, die an mindestens einer Stelle homologe Sequenzbereiche haben. In einem RecA-abhängigen Schritt wird dann ein Einzelstrang des ersten DNA-Moleküls mit dem Komplementärstrang des zweiten Moleküls verknüpft, so dass es zu einem Komplementärstrang-Austausch kommt. Gibt es zwei homologe DNA-Bereiche, kann es zu dem alleinigen Austausch der Sequenz zwischen den beiden homologen Bereichen kommen (zur Übersicht: Kowalczykowski, et al., 1994). Die Herkunft der 340 bp bleibt aber unbekannt. Es kann nur vermutet werden, dass die DNA bakteriellen Ursprungs ist. Auf Grund der benötigten Homologie ist sie eventuell Teil eines unbekanntes Integrons oder Plasmids mit einem *aac(6')-Ib₇*-ähnlichen Gen.

Das Integron in Stamm 31 besteht aus zwei Gen-Kassetten, *dfr1* und *aadA1 (ant(3'')-Ia)*, und ist identisch mit einem Klasse 1 Integron, was aus einem *Salmonella enterica* serovar Bredeney Stamm isoliert wurde (GenBank, AF382145). Leider wurde der 3'CS-Bereich von diesem Integron nicht sequenziert, so dass nicht gesagt werden kann, ob auch hier das *sulI*-Gen fehlt. Wäre das der Fall, müsste es sich wahrscheinlich um das selbe Integron handeln.

Stamm 38 besitzt ebenfalls ein Integron mit zwei Gen-Kassetten, *dfr17* und *aadA5 (ant(3'')-Ie)*. Zwei Sequenz-identische Integrons (GenBank AF169041 und AF170088) wurde 2000 von White et al. und Chang et al. (*aadA5* wurde in der Veröffentlichung irrtümlicherweise als *aadA4* bezeichnet) zeitgleich beschrieben. Beide Integrons stammen aus *E. coli* Stämmen, die aus Harnwegsinfektionen isoliert wurden, AF169041 in Australien, AF170088 in Taiwan. Das australische Integron scheint chromosomal-kodiert zu sein, das taiwanesisches Integron befindet sich auf einem konjugativen Plasmid. Ein weiteres Integron mit einer Base Unterschied wurde in einem unkultivierten Bakterium aus Klärschlamm sequenziert (GenBank AY139591). Zwei weitere sehr ähnliche Integrons wurden in *Klebsiella pneumoniae*-Isolaten detektiert (GenBank AF180469 und AF220757). Die Integrons in AY139591, AF180469 und AF220757 sind dem Integron in Stamm 38 so ähnlich, dass es

sich wahrscheinlich um Sequenzierfehler oder Punktmutationen innerhalb eines Integrans handelt.

Das Integron aus Stamm 56 besteht aus den Genkassetten *dfr12* und *aadA2*. Dazwischen befindet sich der offene Leserahmen *orfF*, der auf Grund der umliegenden Sequenz auch eine Genkassette sein könnte. Heikkilä et al. beschrieben 1993 als erstes ein Integron mit der Struktur *dfr12-orfF-aadA2* aus einem *E.-coli*-Isolat in Finnland. Es ist Sequenz-identisch mit dem Integron aus Stamm 56. Seitdem sind Sequenz-identische Integrans aus einem *Shigella-flexneri*-Stamm aus Vietnam, *Shigella-sonnei*-Stämmen aus Thailand (Heikkilä et al., 1993), sowie *E.-coli*-Stämmen aus Australien (White et al., 2001) und den Niederlanden (Peters et al., 2001) beschrieben worden. In der GenBank sind ebenfalls identische Sequenzen aus *Serratia marcescens* in Polen (AF284063) und *Citrobacter freundii* in Dänemark (AF175203) hinterlegt worden. Es existiert dort auch eine Vielzahl von *dfr12*-Sequenzen, von denen nicht das vollständige Integron sequenziert wurde, aber die im sequenzierten Bereich identisch sind und bei denen es sich ebenfalls um das identische Integron handeln könnte. Heikkilä et al. (1993) konnten feststellen, dass das Integron aus dem finnischen *E.-coli*-Stamm Teil eines Plasmid-kodierten Tn21-ähnlichen Elements war. Die Verbindung des Integrans mit einem Transposon auf einem Plasmid würde die Verbreitung des Integrans erheblich begünstigen. Das Plasmid ist mit 70 kb allerdings kleiner als das Plasmid in Stamm 56 und das Integron ist auch an etwas anderer Stelle ins Transposon insertiert als das Stamm-56-Integron in „Tn56“. Bei den drei oben beschriebenen *dfr*-enthaltenden Integrans ist auffällig, dass das jeweilige *dfr*-Gen immer mit einem spezifischen *aadA*-Gen (bzw. im Falle von *dfr12* mit *orfF* und *aadA2*) assoziiert und an Position 1 im Integron gefunden wird. Die *aadA*-Gene werden auch in Kombination mit anderen Genkassetten in Integrans gefunden, wobei sie eine starke Präferenz für die letzte Position im Integron haben. Dieses spricht dafür, dass die Integration von *aadA*-Genen in der Entwicklung der Integrans früh stattgefunden hat, da neue Genkassetten an der *attI*-Site hinter dem *intI*-Gen integriert werden (Recchia et al., 1994). Die drei hier gefundenen *dfr*-Gen-Kassetten konnten bei Datenbank-Recherchen immer nur in Kombination mit „ihrer“ *aadA*-Genkassette gefunden werden, in keinem Fall wurde ein *dfr*-Gen mit einer anderen Genkassette detektiert. Da auch die Bereiche zwischen den Genkassetten identisch sind, liegt die Vermutung nahe, dass es sich um die Verbreitung jeweils eines Integrans handelt. Im Fall des Stamm-56-Integrans würde es sich um eine weltweite Ausbreitung des Integrans handeln. 1999 untersuchten Martinez-Freijo et al. Integrans aus verschiedenen Regionen Europas und postulierten, dass einmal insertierte Genkassetten und Promotor-Regionen in Integrans konserviert und stabil sind. Resistenzgene

würden häufiger als gesamte Integron-Struktur als als einzelne Genkassetten übertragen werden.

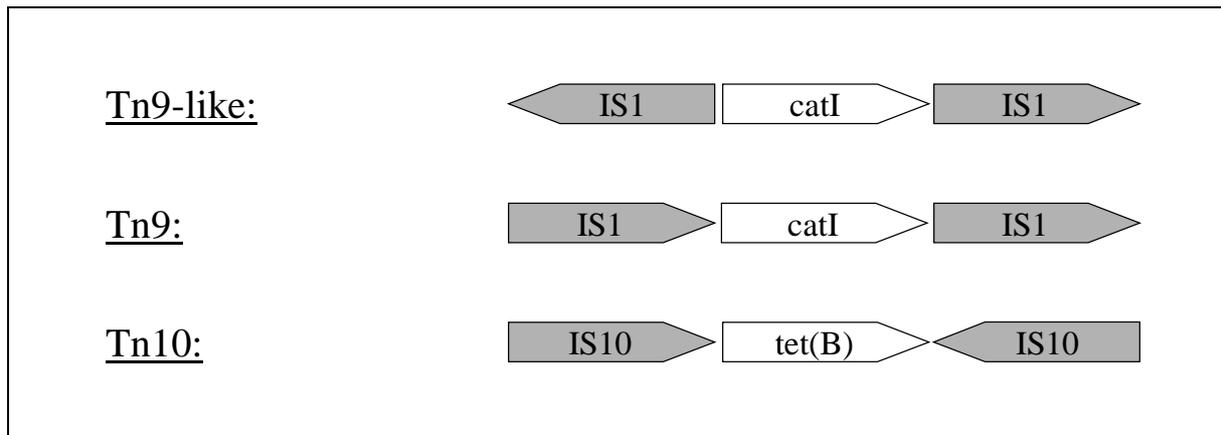
Die Assoziation des jeweiligen *dfr*-Gens mit einem Integron ist wegen der schon unter 4.2.2.6. angesprochenen Kombination mit *sulI* und der damit verbundenen Co-trimoxazol-Resistenz eine „evolutiv sinnvolle“ Struktur. Es ist aber unbekannt, wieso eine vorteilhafte Struktur nicht durch Integration weiterer Genkassetten verbessert wird. Es könnte höchstens sein, dass die Integration weiterer Gen-Kassetten das *dfr*-Gen zu weit vom gemeinsamen Promotor entfernen würde, wodurch die Expression verringert würde (Collis & Hall, 1995) und dass gegen dieses Ereignis ein Selektionsdruck herrscht.

4.3. Anordnung von Resistenzgenen in Stamm 56

Da in Stamm 56 mit 17 Genen die meisten Resistenzgene nachgewiesen werden konnten und das Konjugationsmuster interessante Einblicke ermöglichte, wurde beschlossen, diesen Stamm näher zu untersuchen, um weitere Spuren für die Evolution der Multiresistenz nachweisen zu können. Dazu mussten Informationen über die Umgebung von Resistenzgenen gesammelt werden, was mit Hilfe der Mapping-PCRs durchgeführt wurde.

Es wurde versucht, die drei Gruppen von Resistenzgenen (in Tab. 3.24 als Plasmid 1, Plasmid 2 und Plasmid 3 bezeichnet) zu einander in Beziehung zu setzen und ihre Assoziation mit mobilen Elementen zu beleuchten.

In der Gruppe „Plasmid 1“ befinden sich die Gene *catI* und *tet(B)*. Sie sind wahrscheinlich Plasmid-kodiert aber nicht übertragbar. Auf Grund der Mapping-PCR-Ergebnisse liegen die beiden Gene wahrscheinlich nicht in unmittelbarer Nachbarschaft. Es konnten aber gute Belege dafür erhalten werden, dass *catI* von zwei divergent orientierten Kopien der Insertions-Sequenz IS1 flankiert wird („Tn9-like“). Diese Struktur ist der des zusammengesetzten Transposons Tn9 (Alton & Vapnek, 1979) sehr ähnlich, wobei die Orientierung eines IS1-Elements um 180° gedreht ist. Beide Strukturen sind in Abbildung 4.1 dargestellt. Ida et al. (1981) beobachteten, dass es bei Anwesenheit von *catI* und IS1 in einer Zelle zur Generierung unterschiedlich zusammengesetzten Transposons kommt. In manchen dieser Strukturen waren die IS1-Elemente wie bei Tn9 in direkter Orientierung, in manchen wie bei Tn9-like in entgegengesetzter Orientierung. Tn9-like könnte also aus Tn9 hervorgegangen sein.

Abb. 4.1 Strukturen zusammengesetzter Transposons

Es wurden zwar außerhalb der Mapping-PCRs keine Untersuchungen der umgebenden Region von *tet(B)* gemacht, es kann aber trotzdem über eine mögliche Umgebung spekuliert werden: *tet(B)* wurde ursprünglich als Teil des zusammengesetzten Transposons Tn10 gefunden (zur Übersicht: Kleckner, 1989; Chalmers et al., 2000). In Tn10 wird *tet(B)* von zwei Kopien der Insertions-Sequenz IS10 flankiert, die in invertierter Orientierung zu einander liegen (vgl. Abb. 4.1). Es gibt nur wenige aktuelle Untersuchungen, bei denen nach Detektion von *tet(B)* auch die Anwesenheit von Tn10 überprüft wurde (Schnabel & Jones, 1999; Sunde & Sorum, 2001; Kehrenberg & Schwarz, 2001b; und Takahashi et al., 2002), in diesen Studien konnte aber nur bei einem *Neisseria-meningitidis*-Stamm die Anwesenheit von Tn10 ausgeschlossen werden. Da *tet(B)* in diesem Stamm aber zwischen chromosomale Gene inseriert ist, kann Tn10 auch in diesem Stamm ursprünglich eine Rolle gespielt haben.

Bei den Genen der Gruppe „Plasmid 2“ handelt es sich um *bla_{TEM-1b}* und *aph(3')-Ia*. Wie schon unter 4.2.1.1. angesprochen wurde, ist die Bezeichnung „Plasmid“ für die Lokalisation dieser Gene wahrscheinlich nur für einen kurzen Zeitraum während der Konjugation zutreffend. Mittels Mapping-PCRs wurde versucht, *bla_{TEM-1b}* mit *aph(3')-Ia* in Beziehung zu setzen. Da keine PCR-Produkte generiert werden konnten, sind die beiden Gene wahrscheinlich mehr als 4 kb von einander entfernt. Das wäre aber kein Widerspruch zur gemeinsamen Lokalisation auf einem konjugativen Transposon oder IncJ-Element, da diese Strukturen eine Größe von 100 kb haben können. Beide Gene können zusätzlich mit weiteren mobilen Elementen assoziiert vorkommen: Tn3 konnte zwar in Stamm 56 nicht nachgewiesen werden, aus den unter 4.2.2.7. genannten Gründen wäre eine Verknüpfung von Tn3 und TEM-1b dennoch möglich. Das *aph(3')-Ia*-Gen wurde ursprünglich als Teil des zusammengesetzten Transposons Tn903 beschrieben, worin *aphA1* von zwei invertiert

orientierten Kopien von IS903 flankiert wird (Grindley & Joyce, 1980; Oka et al., 1981). Seitdem ist *aphA1* in einer Vielzahl von zusammengesetzten Transposons beobachtet worden: In Tn2350 wird *aphA1* analog zu *catI* in Tn9 von zwei Kopien von IS1 flankiert (Clerget et al., 1980), in Tn1525 wird das Gen von zwei IS15-Elementen in direkter Orientierung flankiert (Labigne-Roussel et al., 1983). In Tn6 (=Tn2680) wird *aphA1* von zwei Kopien von IS26 in direkter Orientierung und einer zusätzlichen Kopie von IS903.B benachbart (Mollet et al., 1985), im mit Tn903 nah verwandten Tn602 wird *aphA1* von zwei direkt orientierten Kopien von IS903 (=IS602) flankiert (Stibitz & Davies, 1987). Es gibt auch zwei Berichte von *aph(3')-Ia* als Teil der zusammen gesetzten Transposons Tn4352 und Tn4352B, bei denen das Gen ebenfalls von zwei IS26-Kopien flankiert wird (Wrighton & Strike, 1987; Partidge et al., 2001). Es gibt leider keine aktuellen Studien zur Verbreitung von *aph(3')-Ia* im Rahmen von zusammengesetzten Transposons, so dass keine Aussage gemacht werden kann, ob *aph(3')-Ia* auch ohne Insertions-Sequenz-Assoziation auftritt.

Die dritte Gruppe von Resistenzgenen wird als „Plasmid 3“ bezeichnet. Hierbei handelt es sich um alle Gene, die auf dem 150 kb großen, konjugativen Plasmid lokalisiert sind, also *bla_{CMY-2}*, *aadA2*, *strA*, *strB*, *tet(A)*, *flo*, *dfr12*, *sul1*, *sul2*, sowie *merA*.

Die Integron-Analysen des Stammes 56 und seiner Konjuganten ergaben, dass *dfr12* und *aadA2* beide Genkassetten des Integrons auf diesem Plasmid sind. Mittels Mapping-PCRs konnte gezeigt werden, dass die Gene *qacEΔ1* und *sul1* benachbart sind und zum 3'-konservierten Bereich dieses Integrons gehören. Es konnte ebenfalls mit Mapping-PCRs bewiesen werden, dass das Integron Teil des Tn21-Familie Transposons „Tn56“ ist. Auf Grund der Größe der Amplifikationsprodukte kann auch gesagt werden, dass das Integron innerhalb der *res*-Site in das Transposon insertiert ist, eine Anordnung wie sie auch im nah verwandten Tn1696 vorkommt. Mit Mapping-PCRs war es nicht möglich, die wahrscheinliche Verbindung zwischen „Tn56“ und dem *mer*-Operon nachzuweisen. Eine mögliche Erklärung wäre der zu große Abstand, der häufig zwischen dem 3'-konservierten Bereich des Integrons und dem *mer*-Operon des Transposons liegt. Zwischen *orf5* und den Resten des *tmi*-Moduls werden sehr häufig Insertions-Sequenzen angetroffen. In In0 ist eine Kopie von IS1326, in In2 je eine Kopie von IS1326 und IS1353, in In4 je eine Kopie von IS1600 und IS1600Δ, und in In5 liegt eine Kopie von IS1326 vor (Brown et al., 1996; Partidge et al., 2001). Auffällig ist, dass neben der Häufung von Insertionssequenzen auch die sog. „common region“ komplexer Integrons wie In6, In7 und In34 im Bereich des *orf5* anfängt und der erste Leserahmen, *orf513* Homologie zu dem Transposase-Gen *orfA* hat

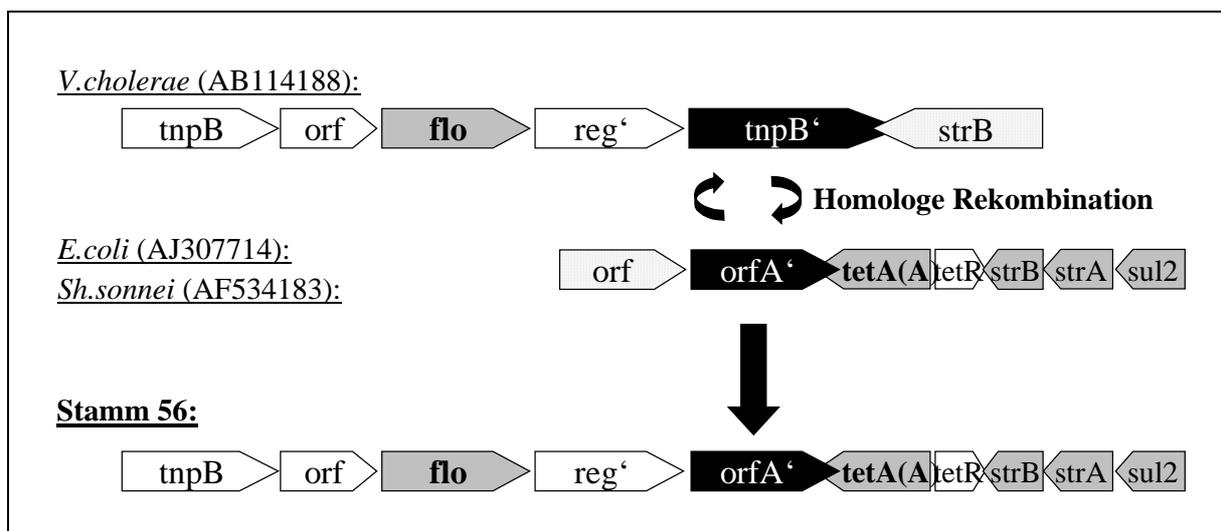
(Partridge & Hall, 2003). Die DNA-Abschnitte um *orf5* scheinen die Insertion von Transposase-ähnlichen Elementen zu begünstigen.

Mittels Mapping-PCRs sollte die Umgebung des *flo*-Gens näher untersucht werden. Als erstes sollte *flo* in Beziehung zu den anderen Resistenz-Genen und mobilen Elementen auf dem Plasmid gesetzt werden. Dabei konnte eine Verknüpfung zwischen *flo* und *tetA(A)* festgestellt werden: Zwischen *flo* und *tetA(A)* befinden sich zwei offene Leserahmen, das eine kodiert für eine trunkeerte Form eines LysR-Transkriptions-Regulators (*reg'*), das andere für den Anfang einer Transposase (*orfA'/tnpB'*). Datenbank-Recherchen mit dieser Sequenz fanden eine Vielzahl verwandter Strukturen (vgl. Abb. 3.44). Auffällig war der hohe Grad der Homologie rund um das *flo*-Gen in den einzelnen Strukturen: alle hatten zumindest einen Teil des offenen Leserahmens vor *flo* (s013/*orf4*, in Abb. 3.44 rosa dargestellt) und des trunkeerten *reg*-Gens hinter *flo* (s015/*orf6*, in Abb. 3.44 grün dargestellt). Da die Homologie sich in vielen Stämmen auch über diese drei Gene/Leserahmen hinaus erstreckte, ist von einem gemeinsamen Ursprung dieser Strukturen auszugehen. In den meisten Stämmen befindet sich jeweils eine mehr oder weniger intakte Kopie des Transposase-Gens *orfA'/tnpB'* vor und hinter den drei konservierten Genen/Leserahmen. Wenn beide Gene intakt wären, würde wahrscheinlich eine Transposon-Aktivität in der Form eines zusammengesetzten Transposons entstehen. Teile der Gene sind zwar in den meisten bis jetzt gefundenen Strukturen deletiert, es ist aber wahrscheinlich, dass *orfA'* eine wichtige Rolle in der Verbreitung des *flo*-Gens auf verschiedene Plasmide gespielt hat. Es ist sogar denkbar, dass *orfA'* an der ursprünglichen Mobilisierung des *flo*-Vorläufergens beteiligt war. Die Umgebung der putativen Transmembran-Transporter-Gene aus *Sinorhizobium meliloti* und *Burkholderia sp.*, die bis jetzt die nächsten Verwandten von *flo* sind, zeigt keinerlei Homologie zu den s013/*orf4*- und *reg*-Sequenzen. Da die Verwandtschaft mit 65%, bzw. 57% Aminosäure-Identität aber nicht sehr nah ist, ist es durchaus möglich, dass das direkte *flo*-Vorläufer-Gen von s013/*orf4*- und *reg*-ähnlichen Sequenzen flankiert wird und das diese bei der ursprünglichen Mobilisierung von *flo* co-mobilisiert wurden.

Neben der Frage nach der Entwicklung der zusammengesetzten Transposon-Struktur um *flo* stellt sich auch die Frage nach der Evolution der Multiresistenz-Insel, wie sie in Stamm 56 vorliegt. Datenbank-Recherchen fanden vier Strukturen, die analog zu der in Stamm 56 eine *tetA(A)*-Variante exprimieren, die durch Insertion von *orfA'* in das Ende von *tetA(A)* entstanden ist (vgl. Abb. 3.44). In Abbildung 4.2 ist eine Hypothese zur Entstehung der Multiresistenz-Struktur dargestellt: Auf Grund der zwei Gruppen von Sequenzen, die mit der Stamm 56 Struktur große Ähnlichkeit besitzen, kann die Stamm-56-Struktur in zwei

Abschnitte unterteilt werden: Im ersten Sequenz-Abschnitt zwischen den beiden Kopien von *orfA/tnpB* ist die Struktur von *V. cholerae* AB114188 der von Stamm 56 am ähnlichsten. Im sequenzierten Bereich von 2380 bp unterscheiden sich die beiden Sequenzen nur in 5 Basen, was für eine sehr nahe Verwandtschaft spricht. Die Sequenzen AJ307714 und AF534183 aus *E. coli* und *Sh. sonnei* sind der zweiten Hälfte der Stamm-56-Struktur (*orfA'* bis *sul2*) auf Grund der PCR-Produkt-Größen auch sehr ähnlich. Die Sequenzen der beiden Gruppen sind im Bereich des *orfA'*-Gens über 300 bp 100% homolog. Wenn nun in einer Zelle eine Sequenz der ersten Gruppe und eine der zweiten zeitgleich vorkommen würden (zum Beispiel auf zwei verschiedenen Plasmiden), so könnte es im Bereich des *orfA'*-Gens zum Sequenz-Austausch im Rahmen von Homologer Rekombination kommen. Ein mögliches Resultat wäre die Struktur, wie sie in Stamm 56 gefunden wird.

Abb. 4.2 Hypothese zur Evolution der Multiresistenz-Insel in Stamm 56



Es konnten keine Informationen über die Umgebung des CMY-2-Gens erhalten werden, welches ebenfalls auf dem 150 kb großen, konjugativen Plasmid lokalisiert ist. Auf Grund der ursprünglichen Mobilisierung des Gens vom *C. freundii*-Chromosom (Barlow & Hall, 2002) ist eine Involvierung mobiler Elemente wie Transposons oder Insertions-Sequenzen wahrscheinlich. In der Literatur sind Verwandte von CMY-2 entweder mit solchen Strukturen assoziiert beschrieben worden, oder es konnte postuliert werden, dass solche Strukturen zu einem Zeitpunkt in der Evolution anwesend gewesen sein mussten: So wurde CMY-3 auf dem Chromosom eines *Proteus mirabilis*-Stammes beschrieben, wo es wahrscheinlich durch ein Transpositions-Ereignis inseriert ist (Bret et al., 1998). CMY-4 wurde in einem *E. coli*-Isolat auf zwei verschiedenen Plasmiden beobachtet, was auch für die Lokalisation des Gens als Teil eines Mobilen Elementes spricht (Stapleton et al., 1999). Die Sequenz der Umgebung des

CMY-5-Gens aus *Klebsiella oxytoca* zeigte 5' ein Transposase-Gen, das entfernt mit IS1247 verwandt ist, 3' erstreckt sich die Homologie mit der *C.-freundii*-Chromosomen-Sequenz um noch zwei Gene, *blc* und *sugE*, was für eine Rolle der Transposase in der Mobilisierung des CMY-Gens spricht (Wu et al., 1999). Miriagou et al. beschrieben 2004 ein neues Cephalosporinase-Gen, CMY-13, das von zwei direkt orientierten Kopien von IS26 flankiert wird. Der Homologie-Bereich mit *C. freundii* erstreckt sich neben CMY auf 6 weitere Gene: auf der einen Seite *ampR*, *frdD*, *frdC* und *ΔfrdB*, auf der anderen Seite *blc* und *sugE*. Der ganze Bereich scheint durch IS26 aus *C. freundii* mobilisiert worden zu sein und ist nun Teil eines zusammengesetzten Transposons. Literacka et al. (2004) fanden bei Untersuchungen eines weit verbreiteten *P. mirabilis* Klons die vier CMY-Varianten CMY-4, CMY-12, CMY-14, und CMY-15. In allen Fällen befand sich ca. 100 bp vor dem Anfang des CMY-Gens das Ende der Insertions-Sequenz ISEcp1. Dieses IS-Element scheint also auch eine Rolle in der Mobilisierung und Verbreitung von CMY-Genen zu spielen.

4.4. Herkunft der Resistenz-Gene

Die Untersuchungen zur Evolution der einzelnen Resistenzgene zeigten, dass es nicht in allen Fällen möglich ist, Aussagen zu treffen, von wo Gene ursprünglich herkommen, die bei *E. coli* erworbene Resistenz vermitteln.

Für die β -Laktamasen CMY-2 und TEM ist es mit relativ großer Sicherheit möglich zu sagen, dass die Gene ihren Ursprung in den chromosomalen β -Laktamasegenen von *C. freundii*, bzw. dem Umfeld von *K. pneumoniae* und *R. planticola* haben. Auch bei *catI* konnten Indizien für einen Ursprung in der Proteus-Providencia-Morganella-Gruppe der *Enterobacteriaceae* gefunden werden. Bei den Suchen nach Verwandten des *flo*-Gens konnten zwei Gene für Transmembran-Proteine in *Sinorhizobium meliloti* und *Burkholderia sp.* gefunden werden, deren Proteine 65% und 57% Aminosäure-Homologie mit Flo hätten. Diese Gene sind zwar mit *flo* verwandt, aber auf Grund der nur mittleren Homologie kann wahrscheinlich nicht von direkten Vorfahren gesprochen werden.

Bei den Aminoglykosid-Resistenzgenen, die mit den Genen der hier untersuchten Stämmen verwandt sind, beläuft sich der Grad der Aminosäure-Homologie zwischen 40% und 60% und es gibt große Unterschiede im GC-Gehalt der Gene. Wesentlich nähere Verwandte sind nur als Teile von Integrons und Transposons zu finden, was auf eine lange Assoziation dieser Gene mit mobilen Elementen spricht. Ähnlich verhält es sich mit den Plasmid-kodierten *dfr* und *sul* Genen, die Trimethoprim- und Sulfonamid-Resistenz vermitteln. Die erfolgreiche

Verbindung eines Gens mit einem mobilen Element erleichtert die Suche nach den Ursprüngen des Gens nicht. So ist die Assoziation von Quecksilber-Resistenzgenen mit Transposons der Tn21-Familie eine lange und stabile Beziehung, die schon seit Jahrtausenden besteht (Kholodii et al., 2003). Es war nicht möglich, *mer*-Gene zu finden, die eindeutig nicht mit Transposons assoziiert waren.

Ein Problem mit der Suche nach verwandten Sequenzen ist die relativ geringe Anzahl an zur Verfügung stehenden Sequenzen ganzer Bakterien-Genome. Die meisten Sequenzierungen wurden an human-pathogenen Spezies durchgeführt. Es verdichten sich aber die Anzeichen, dass die Entwicklung von Hauskeeping-Genen zu Resistenzgenen eher in nicht-pathogenen Spezies stattfindet. Wenn mehr Genom-Sequenzierungen nicht-pathogener Bakterien zur Verfügung stehen, werden hoffentlich genauere Aussagen über die Vorläufergene mancher Resistenzgene möglich sein.

5. Zusammenfassung

Ziel der Arbeit war es, am Model *E. coli* Spuren zu finden, wie im Laufe der Evolution Resistenzgene erworben werden und wie sie im Organismus organisiert werden, so dass es den resistenten oder sogar multiresistenten Stämmen möglich ist, sich gegenüber sensiblen Stämmen nach Wegfall des Selektionsdrucks durchzusetzen.

An den vier untersuchten Stämmen konnten keine durch die Resistenz entstandene Wachstumsnachteile festgestellt werden. Es konnte sogar eine Redundanz an bestimmten Resistenzgenen festgestellt werden: Bei allen Stämmen wurden mehrere Resistenzgene gegen Antibiotika nachgewiesen, die in der Therapie von *E.-coli*-Infektionen seit Jahren nicht mehr eingesetzt werden. Teilweise lagen diese Gene sogar mehrfach vor.

In dieser Arbeit wurden Belege dafür gefunden, dass es eine Entwicklung auf der Ebene der Resistenz-Plasmide gegeben hat, um die durch die Resistenz entstandenen Nachteile zu kompensieren. Dies wird durch die Daten der Stamm-56-Konjuganten verdeutlicht: der Rezipient mit dem Plasmid wächst nicht langsamer als der Rezipient ohne Plasmid, obwohl 150 kb zusätzlicher DNA mit 10 zusätzlichen Resistenzgenen repliziert und exprimiert werden. Die Kompensation auf Plasmid-Ebene hat den Vorteil, dass das optimierte Plasmid jetzt von Stamm zu Stamm verbreitet werden kann, ohne dass die Empfängerzellen zusätzliche Mutationen erwerben müssen, um Wachstumsnachteile zu kompensieren.

Mobile Elemente spielen in allen untersuchten Stämmen eine große Rolle. Sie konnten mit den meisten erworbenen Resistenzgenen in Verbindung gebracht werden. Es ist sehr wahrscheinlich, dass diese Strukturen nicht nur in der Verbreitung der Resistenzgene, sondern auch in ihrer Rekrutierung eine große Rolle spielen und gespielt haben.

Eine weitere interessante Feststellung ist, dass es sich bei den hier untersuchten Stämmen um *E.-coli*-Serotypen handelt, die auch bei Tieren gefunden werden. Die Untersuchung der Multiresistenz-Insel um das *flo*-Gen in Stamm 56 fand Homologien zu genetischen Strukturen, die auch aus tierpathogenen Bakterienstämmen nachgewiesen wurden. Es ist also möglich, dass ein Teil der Entwicklung der Multiresistenz dieses Stammes im Tier stattgefunden hat und das der optimierte Stamm dann vom Tier auf den Menschen übertragen worden ist.

Es war mit Hilfe von Datenbank-Recherchen möglich, Aussagen über die Herkunft einiger Resistenzgene zu machen. Diese Methode wird in der Zukunft bessere Ergebnisse liefern können, wenn mehr Genom-Sequenzierungen auch von nicht-pathogenen Spezies zur Verfügung stehen.

Vergleicht man die in dieser Arbeit erhaltenen Resultate mit der in Abb. 1.11 formulierten Hypothese zur Evolution der Resistenz, so können nur Teile der Hypothese bestätigt werden: Es konnten Belege für die Optimierung der Gene in den Chromosomen natürlicher Organismen gefunden werden, die dann mit Hilfe von mobilen Elementen auf Plasmide gelangen. Dahingegen konnten nur wenige Indizien dafür gefunden werden, dass die Resistenzgene bevorzugt ins Chromosom insertieren und die Strukturen der mobilen Elemente später wieder deletiert werden. Das Vorkommen vieler redundanter Resistenzgene und mobiler Elemente spricht eher dafür, dass es keinen Selektionsdruck für die Komprimierung der Strukturen gibt. Dies ist ein weiterer Hinweis, dass die Evolution der Multiresistenz maßgeblich durch Optimierung der Plasmid-Strukturen stattgefunden hat. Der Mangel an Selektionsdruck durch die Evolution der Resistenz-Plasmide hat zur Folge, dass es sehr schwer sein wird, einmal entstandene und mobilisierte Resistenzgene wieder aus dem Pool der Multiresistenz zu entfernen.

6. Literaturverzeichnis

Abu Mraheil, M. 1999.

Entwicklung eines Luciferase-Reportergensystems zur Bestimmung des Superspiralisierungsgrads in Bakterien.

Diplomarbeit, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn.

Alekshun, M.N., Y.S. Kim, und S.B. Levy. 2000.

Mutational analysis of MarR, the negative regulator of *marRAB* expression in *Escherichia coli*, suggests the presence of two regions required for DNA binding.

Molec. Microbiol. 35: 1394 – 1404.

Alekshun, M.N. und S.B. Levy. 1997.

Regulation of chromosomally mediated multiple antibiotic resistance: the *mar* regulon.

Antimicrob. Agents Chemother. 41: 206 – 2075.

Alton, N.K. und K. Vapnek. 1979.

Nucleotide sequence analysis of the chloramphenicol resistance transposon Tn9.

Nature 282: 864 – 869.

Arlet, G., G. Brami, D. Decre, A. Flippo, O. Gaillot, P.H. Lagrange, und A. Phillipon. 1995.

Molecular characterisation by PCR- restriction fragment length polymorphism of TEM β -lactamases.

FEMS Microbiol. Lett. 134: 203 – 208.

Asako, H., H. Nakajima, K. Kobayashi, M. Kobayashi, und R. Aono. 1997.

Organic solvent tolerance and antibiotic resistance increased by overexpression of *marA* in *Escherichia coli*.

Appl. Env. Microbiol. 63: 1428 – 1433.

Bagel, S. 1998.

Untersuchung des Superspiralisierungsgrads der DNA von *E. coli* Mutanten mit erhöhter 4-Chinolonresistenz.

Dissertation, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn.

Barbosa, T.M., und S.B. Levy. 2000.

Differential expression of over 60 chromosomal genes in *Escherichia coli* by constitutive expression of MarA.

J. Bacteriol. 182: 3467 – 3474.

Barlow, M. und B.G. Hall. 2002.

Origin and evolution of the AmpC β -lactamases of *Citrobacter freundii*.

Antimicrob. Agents Chemother. 46: 1190 – 1198.

Bass, L., C.A. Liebert, M.D. Lee, A.O. Summers, D.G. White, S.G. Thayer, und J.J. Maurer. 1999.

Incidence and characterization of integrons, genetic elements mediating multiple-drug resistance, in avian *Escherichia coli*.

Antimicrob. Agents Chemother. 43: 2925 – 2929.

Bauernfeind, A., H. Grimm, und S. Schweighart. 1990.

A new plasmidic cefotaximase in a clinical isolate of *Escherichia coli*.
Infection 18: 294 – 298.

Birnboim, H.C., und J. Doly. 1979.

A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA.
Nucleic Acid Res. 7: 1513 – 1533.

Bissonnette, L. und P.H. Roy. 1992.

Characterization of In0 of *Pseudomonas aeruginosa* plasmid pVS1, an ancestor of integrons of multiresistance plasmids and transposons of Gram-negative bacteria.
J. Bacteriol. 174: 1248 – 1257.

Bissonnette, L., S. Champetier, J.-P. Buisson, und P.H. Roy. 1991.

Characterization of the nonenzymatic chloramphenicol resistance (*cmlA*) gene of the In4 integron of Tn1696: similarity of the product to transmembrane transport proteins.
J. Bacteriol. 173: 4493 – 4502.

Blanco, J., M. Blanco, J.E. Blanco, A. Mora, E.A. Gonzalez, M.I. Bernadez, M.P. Alonso, A. Coira, A. Rodriguez, J. Rey, J.M. Alonso, und M.A. Usera. 2003.

Verotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC) in Spain: prevalence, serotypes and virulence genes of O157:H7 and non-O57 VTEC in ruminants, raw beef products, and humans.
Exp. Biol. Med. 228: 345 – 351.,

Böltner, D., C. MacMahon, J.T. Pembroke, P. Strike, und A.M. Osborn. 2002.

R391: a conjugative integrating mosaic comprised of phage, plasmid, and transposon elements.
J. Bacteriol. 184: 5158 – 5169.

Bolton, L.F., L.C. Kelley, M.D. Lee, P.J. Fedorka-Cray, und J.J. Maurer. 1999.

Detection of multidrug-resistant *Salmonella enterica* serotype *typhimurium* DT104 based on a gene which confers cross-resistance to florfenicol and chloramphenicol.
J. Clin. Microbiol. 37: 1348 – 1351.

Bonnet, R., C. Dutour, J.L.M. Sampaio, C. Chanal, D. Sirot, R. Labia, C. De Champs, und J. Sirot. 2001.

Novel cefotaximase (CTX-M-16) with increased catalytic efficiency due to substitution Asp-240 to Gly.
Antimicrob. Agents Chemother. 45: 2269 – 2275.

Bouma, J.E. und R.E. Lenski. 1988.

Evolution of a bacteria/plasmid association.
Nature 335: 351 – 352.

Bret, L., C. Chanal-Claris, D. Sirot, E.B. Chaibi, R. Labia, und J. Sirot. 1998.

Chromosomally encoded AmpC-type β -lactamase in a clinical isolate of *Proteus mirabilis*.
Antimicrob. Agents Chemother. 42: 1110 – 1114.

Brock, T.D., M.T. Madigan, J.M. Martinko, und J. Parker. 1994.

Biology of Microorganisms. Seventh Edition.
Prentice Hall, Inc., Englewood Cliffs, USA.

Brown, H.J., H.W. Stokes, und R.M. Hall. 1996.

The integrons In0, In2, and In5 are defective transposon derivatives.
J. Bacteriol. 178: 4429 – 4437.

Casin, I., F. Bordon, P. Bertin, A. Coutrot, I. Podglajen, R. Brasseur, und E. Collatz. 1998.

Aminoglycoside 6'-N-acetyltransferase variants of the Ib Type with altered substrate profile in clinical isolates of *Enterobacter cloacae* and *Citrobacter freundii*.
Antimicrob. Agents Chemother. 42: 209 – 215.

Chalmers, R., S. Sewitz, K. Lipkow, und P. Crellin. 2000.

Complete nucleotide sequence of Tn10.
J. Bacteriol. 182: 2970 – 2972.

Chang, C.-Y., L.-L. Chang, Y.-H. Chang, T.-M. Lee, Y.-H. Li, und S.-F. Chang. 2000.

Two new gene cassettes, *dfr17* (for trimethoprim resistance) and *aadA4* (for spectinomycin/streptomycin resistance), inserted in an *Escherichia coli* class 1 integron.
J. Antimicrob. Chemother. 46: 87 – 89.

Charles, I.G., S. Harford, J.F.Y. Brookfield, und W.V. Shaw. 1985a.

Resistance to chloramphenicol in *Proteus mirabilis* by expression of a chromosomal gene for chloramphenicol acetyltransferase.
J. Bacteriol. 164: 114 – 122.

Charles, I.G., J.W. Keyte, und W.V. Shaw. 1985b.

Nucleotide sequence analysis of the *cat* gene of *Proteus mirabilis*: comparison with the type I (Tn9) *cat* gene.
J. Bacteriol. 164: 123 – 129.

Chen, S.-T., und R.C. Clowes. 1987.

Variations between the nucleotide sequences of Tn1, Tn2, and Tn3 and expression of β -lactamase in *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli*.
J. Bacteriol. 169: 913 – 916.

Choi S., D. Lee, J. Choi, J. Yoo, W. Shin, und M. Kang. 2002.

Detection of genes encoding aminoglycoside modifying enzymes using multiplex PCR in *Escherichia coli*.
42nd Interscience Conference on Antimicrob. Agents Chemother., Poster C2-713.

Chopra, I. und M. Roberts. 2001.

Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology and epidemiology of bacterial resistance.
Microbiol. Mol. Biol. Rev. 65: 232 – 260.

Chopra, I., P.M. Hawkey, und M. Hinton. 1992.

Tetracyclines, molecular and clinical aspects.
J. Antimicrob. Chemother. 29: 245 – 277.

Clerget, M., M. Chandler, und L. Caro. 1980.

Isolation of an IS1 flanked kanamycin resistance transposon from R1drd19.
Mol. Gen. Genet. 180: 123 – 127.

Cloeckaert, A., S. Baucheron, und E. Chaslus-Dancla. 2001.

Nonenzymatic chloramphenicol resistance mediated by IncC plasmid R55 is encoded by a *floR* gene variant.

Antimicrob. Agents Chemother. 45: 2381 – 2382.

Cloeckaert, A., S. Baucheron, G. Flaujac, S. Schwarz, C. Kehrenberg, J.-L. Martel, und E. Chaslus-Dancla. 2000.

Plasmid-mediated florfenicol resistance encoded by the *floR* gene in *Escherichia coli* isolated from cattle.

Antimicrob. Agents Chemother. 44: 2858 – 2860.

Cohen, S.P., H. Hächler, und S.B. Levy. 1993.

Genetic and functional analysis of the multiple antibiotic resistance (*mar*) locus in *Escherichia coli*.

J. Bacteriol. 175: 1484 – 1492.

Cohen, S.P., L.M. McMurry, D.C. Hooper, J.S. Wolfson, und S.B. Levy. 1989.

Cross-resistance to fluoroquinolones in multiple-antibiotic-resistant (*mar*) *Escherichia coli* selected by tetracyclines or chloramphenicol: decreased drug accumulation associated with membrane changes in addition to OmpF reduction..

Antimicrob. Agents Chemother. 33: 1318 – 1325.

Collis, C.M., und R.M. Hall. 1995.

Expression of antibiotic resistance genes in the integrated cassettes of integrons.

Antimicrob. Agents Chemother. 39: 155 – 162.

Deutsches Institut für Normung e. V. 2003.

Methoden zur Empfindlichkeitsprüfung von mikrobiellen Krankheitserregern gegen Chemotherapeutika. Bewertungsstufen der minimalen Hemmkonzentration, MHK-Grenzwerte von antibakteriellen Wirkstoffen. DIN 58940, Teil 4, Beiblatt1. Beuth Verlag, Berlin.

Deutsches Institut für Normung e. V. 1995.

Methoden zur Empfindlichkeitsprüfung von bakteriellen Krankheitserregern (außer Mykobakterien) gegen Chemotherapeutika. Grenzwerte von Antibakteriellen Wirkstoffen für die Bewertung der minimalen Hemmkonzentration (MHK). DIN 58940, Teil 4, Beiblatt1. Beuth Verlag, Berlin.

Djordjevic, S.P., V. Ramachandran, K.A. Bettelheim, B.A. Vanselow, P. Holst, G. Bailey, und M. A. Hornitzky. 2004.

Serotypes and virulence gene profiles of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from feces of pasture-fed and lot-fed sheep.

Appl. Env. Microbiol. 70: 3910 – 3917.

Dove, S.L., und C.J. Dormann. 1994.

The site-specific recombination system regulating expression of the type 1 fimbrial subunit of *Escherichia coli* is sensitive to changes in DNA supercoiling.

Mol. Microbiol. 14: 975 – 988.

Drlica, K., und X. Zhao. 1997.

DNA gyrase, topoisomerase IV, and the 4-quinolones.
Microbiol. Mol. Biol. Rev. 61: 377 – 392.

Dubois, V., C. Arpin, P. Noury, und C. Quentin. 2002.

Clinical strain of *Pseudomonas aeruginosa* carrying a *bla_{TEM-21}* gene located on a chromosomal interrupted TnA type transposon.
Antimicrob. Agents Chemother. 46: 3624 – 3626.

Edgar, R., und E. Bibi. 1997.

Mdfr, an *Escherichia coli* multidrug resistance protein with an extraordinarily broad spectrum of drug recognition.
J. Bacteriol. 179: 2274 – 2280.

Elkins, C.A. und H. Nikaido. 2002.

Substrate specificity of the RND-type multidrug efflux pumps AcrB and AcrD of *Escherichia coli* is determined predominately by two large periplasmic loops.
J. Bacteriol. 184: 6490 – 6498.

Elliott, E.J., R.M. Robins-Browne, E.V. O'Loughlin, V. Bennett-Wood, J. Bourke, P. Henning, G.G. Hogg, J. Knight, H. Powell, D. Redmond; Contributors to the Australian Paediatric Surveillance Unit. 2001.

Nationwide study of haemolytic uraemic syndrome: clinical, microbiological, and epidemiological features.
Arch. Dis. Child. 85: 125 – 131.

Enne, V.I., P.M. Bennett, D.M. Livermore, und L.M. Hall. 2004.

Enhancement of host fitness by the *sul2*-coding plasmid p9123 in the absence of selective pressure.
J. Antimicrob. Chemother. 53: 958 – 963.

Ford, P.J. und M.B. Avison. 2004.

Evolutionary mapping of the SHV β -lactamase and evidence for two separate IS26-dependent *bla_{SHV}* mobilization events from the *Klebsiella pneumoniae* chromosome.
J. Antimicrob. Chemother. 54: 69 – 75.

Gebreyes, W.A. und C. Altier. 2002.

Molecular characterization of multidrug resistant *Salmonella enterica* subsp. *Enterica* serovar *Typhimurium* isolates from swine.
J. Clin. Microbiol. 40: 2813 – 2822.

George, A.M., und R.M. Hall. 2002.

Efflux of chloramphenicol by the CmlA1 protein.
FEMS Microbiol. Lett. 209: 209 – 213.

George, A.M., und S.B. Levy. 1983.

Amplifiable resistance to tetracycline, chloramphenicol, and other antibiotics in *Escherichia coli*: involvement of non-plasmid-determined efflux of tetracycline.
J. Bacteriol. 155: 531 – 540.

Georgopapadakou, N.H. 1993.

Penicillin-binding proteins and bacterial resistance to β -lactams.
Antimicrob. Agents Chemother. 37: 2045 – 2053.

Gerlach, B.A., und B. Wiedemann. 1985.

Tn3 as the molecular basis of ampicillin resistance in *E. coli* – an epidemiological survey.
Zbl. Bakt. Hyg. 260: 139 – 150.

Goldstein, C., M.D. Lee, S. Sanchez, C. Hudson, B. Phillips, B. Register, M. Grady, C. Liebert, A.O. Summers, D.G. White und J.J. Maurer. 2001.

Incidence of class 1 and 2 integrases in clinical and commensal bacteria from livestock, companion animals, and exotics.
Antimicrob. Agents Chemother. 45: 723 – 726.

Goussard, S., und P. Courvalin. 1991.

Sequences of the genes *blaT-1B* and *blaT-2*.
Gene 102: 71 – 73.

Greenberg, J.T., P. Monarch, H.J. Chou, P.D. Josephy, and B. Dimple. 1990.

Positive control of a global antioxidant defense regulon activated by superoxide-generating agents in *Escherichia coli*.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 6181 – 6185.

Grindley, N.D. und C.M. Joyce. 1980.

Genetic and DNA sequence analysis of the kanamycin resistance transposon Tn903.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 7176 – 7180.

Grinsted, J., F. De La Cruz, und R. Schmitt. 1990.

The Tn21 subgroup of bacterial transposable elements.
Plasmid 24: 163 – 189.

Hächler, H., S.P. Cohen, und S.B. Levy. 1991.

marA, a regulated locus which controls expression of chromosomal multiple antibiotic resistance in *Escherichia coli*.
J. Bacteriol. 173: 5532 – 5538.

Haeggman, S., S. Lofdahl, A. Paauw, J. Verhoef, und S. Brisse. 2004.

Diversity and evolution of the class A chromosomal beta-lactamase gene in *Klebsiella pneumoniae*.
Antimicrob. Agents Chemother. 48: 2400 – 2408.

Hahn, H., D. Falke, S.H.E. Kaufmann, und U. Ullmann. 1999.

Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie.
Springer Verlag, Berlin und Heidelberg.

Hall, R.M., und C.M. Collis. 1995.

Mobile gene cassettes and integrons: capture and spread of genes by site-specific recombination.
Molec. Microbiol. 15: 593 – 600.

Heikkilä, E., M. Skurnik, L. Sundström und P. Huovinen. 1993.

A novel dihydrofolat reductase cassette inserted in an integron borne on a Tn21-like element. Antimicrob. Agents Chemother. 37: 1297 – 1304.

Heisig, P. 1997.

Mechanismen und Epidemiologie hoher Fluorchinolonresistenz bei *Escherichia coli* und anderen Gram-negativen Bakterien. Habilitationsschrift, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn.

Heisig, P. 1996

Genetic evidence for a role of *parC* mutations in development of high-level fluoroquinolone resistance in *Escherichia coli*. Antimicrob. Agents Chemother. 40: 879 – 885.

Heisig, P. 1994.

Mechanismen bakterieller Resistenz gegenüber Antibiotika. Arzneimittelther. 12: 203 – 218.

Helling, R.B., T. Kinney, und J. Adams. 1981.

The maintenance of plasmid-containing organisms in populations of *Escherichia coli*. J. Gen. Microbiol. 128: 129 – 141.

Hochhut, B., J.W. Beaber, R. Woodgate, und M.K. Waldor, 2001.

Formation of chromosomal tandem arrays of the SXT element and R391, two conjugative chromosomally integrating elements that share an attachment site. J. Bacteriol. 183: 1124 – 1132.

Hochhut, B., K. Jahreis, J.W. Lengeler, und K. Schmid. 1997.

CTnscr94, a conjugative transposon found in enterobacteria. J. Bacteriol. 179: 2097 – 2102.

Höltje, J.-V. 1989.

Das autolytische System von Bakterien: Eine Möglichkeit für eine gezielte antimikrobielle Chemotherapie. Forum Mikrobiologie. 12: 156 – 161.

Hüllen, V., P. Heisig und B. Wiedemann. 1998.

Bedeutung von *marR*-Mutationen für die Fluorchinolon-Resistenz bei *E. coli*. Chemotherapie J. 7: 33 – 34.

Huovinen, P. 2001.

Resistance to trimethoprim-sulfamethoxazole. Clin. Infect. Dis. 32: 1608 – 1614.

Inoue, C., K. Sugawara, T. Shiratori, T. Kusano, und Y. Kitagawa. 1989.

Nucleotide sequence of the *Thiobacillus ferrooxidans* chromosomal gene encoding mercuric reductase. Gene 84: 47 – 54.

Inoue, C., K. Sugawara, und T. Kusano. 1991.

The *merR* regulatory gene in *Thiobacillus ferrooxidans* is spaced apart from *mer* structural genes.

Mol. Microbiol. 11: 2707 – 2718.

Ish-Horowicz, D., und J.F. Burke. 1981.

Rapid and efficient cosmid cloning.

Nucleic Acids Res. 9: 2989.

Jacoby, G.A., und A.A. Medeiros. 1991.

More extended-spectrum- β -lactamases.

Antimicrob. Agents Chemother. 35: 1697 – 1704.

Jacoby, G.A., und L. Sutton. 1991.

Properties of plasmids responsible for production of extended-spectrum β -lactamases.

Antimicrob. Agents Chemother. 35: 164 – 169.

Jaffe, A., Y.A. Chabbert, und O. Semonin. 1982.

Role of porin proteins *OmpF* and *OmpC* in the permeation of β -lactams.

Antimicrob. Agents Chemother. 22: 942 – 948.

Jung, J.S., T.C. Cheong, M.S. Cho, Y.C. Hah, und J.H. Chung. 1994.

Nucleotide sequence and expression of a gentamicin resistance gene isolated from the R plasmid in *Serratia marcescens*.

Biochem. Biophys. Res. Commun. 198: 1084 – 1089.

Karim, A., L. Poirel, S. Nagarajan, und P. Nordmann. 2001.

Plasmid-mediated extended-spectrum β -lactamase (CTX-M-3 like) from India and gene association with insertion sequence *ISEcp1*.

FEMS Microbiol. Lett. 201: 237 – 241.

Kato, J.-I., Y. Nishimura, R. Imamura, H. Niki, S. Hiraga, und H. Suzuki. 1990.

New topoisomerase essential for chromosome segregation in *E. coli*.

Cell 63: 393 – 404.

Kayser, F.H., K.A. Bienz, J. Eckert und R.M. Zinkernagel. 1998.

Medizinische Mikrobiologie.

Thieme Verlag, Stuttgart.

Kehrenberg, C. und S. Schwarz. 2001a.

Occurrence and linkage of genes coding for resistance to sulfonamides, streptomycin and chloramphenicol in bacteria of the genera *Pasteurella* and *Mannheimia*.

FEMS Microbiol. Lett. 205: 283 – 290.

Kehrenberg, C. und S. Schwarz. 2001b.

Molecular analysis of tetracycline resistance in *Pasteurella aerogenes*.

Antimicrob. Agents Chemother. 45: 2885 – 2890.

Kern, W.V., M. Oethinger, A.S. Jellen-Ritter, und S.B. Levy. 2000.

Non-target gene mutations in the development of fluoroquinolone resistance in *Escherichia coli*.

Antimicrob. Agents Chemother. 44: 421 – 424.

Keyes, K., C. Hudson, J.J. Maurer, S. Thayer, D.G. White, und M.D. Lee. 2000.

Detection of florfenicol resistance genes in *Escherichia coli* isolated from sick chickens.

Antimicrob. Agents Chemother. 44: 814 – 820.

Kholodii, G., S. Mindlin, M. Petrova, und S. Minakhina. 2003.

Tn5060 from the Siberian permafrost is most closely related to the ancestor of Tn21 prior to integron acquisition.

FEMS Microbiol. Lett. 226: 251 – 255.

Kim, E. und T. Aoki. 1996.

Sequence analysis of the florfenicol resistance gene encoded in the transferable R-plasmid of a fish-pathogen, *Pasteurella piscida*.

Microbiol. Immunol. 40 (9): 665 – 669.

Kleckner, N. 1989.

Transposon Tn10.

In: D.E. Berg und M.M. Howe (ed.), Mobile DNA, American Society for Microbiology, Washington, D. C., p. 227 – 268.

Koeck, J.-L., G. Arlet, A. Philippon, S. Basmaciogullari, H.V. Thien, Y. Buisson, und J.-D. Cavallo. 1997.

A plasmid-mediated CMY-2 β -lactamase from an Algerian clinical isolate of *Salmonella senftenberg*.

FEMS Microbiol. Lett. 152: 255 – 260.

Komp Lindgren, P., A. Karlsson, und D. Hughes. 2003.

Mutation rate and evolution of fluoroquinolone resistance in *Escherichia coli* isolates from patients with urinary tract infections.

Antimicrob. Agents Chemother. 47: 3222 – 3232.

Kowalczykowski, S.S., D.A. Dixon, A.K. Eggleston, S.D. Lauder, und W.M. Rehrauer. 1994.

Biochemistry of homologous recombination in *Escherichia coli*.

Microbiol. Rev. 58: 401 – 465.

Labigne-Roussel, A., S. Briaux-Gerbaud, und P. Courvalin. 1983.

Tn1525, a kanamycin R determinant flanked by two direct copies of IS15.

Mol Gen. Genet. 189: 90 – 101.

Laemmli, U.K. 1970.

Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.

Nature 227: 680 – 685.

Lake, R., A. Hudson, and P. Cressey. 2002.

Risk profile: Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in red meat and meat products.
Client Report FW0154. New Zealand Food Safety Authority Contract for Scientific Services,
Institute of Environmental Science & Research Limited, Christchurch Science Centre.

Laraki, N., M. Galleni, I. Thamm, M.L. Riccio, G. Amicosante, J.-M. Frere, und G.M. Rossolini.

Structure of In31, a *bla*_{IMP}-containing *Pseudomonas aeruginosa* integron phyletically related to In5, which carries an unusual array of gene cassettes.
Antimicrob. Agents Chemother. 43: 890 – 901.

Levesque, C., L. Piche, C. Larose, und P.H. Roy. 1995.

Mapping of integrons reveals several novel combinations of resistance genes.
Antimicrob. Agents Chemother. 39: 185 – 191.

Liebert, C.A., R.M Hall und A.O. Summers. 1999.

Transposon Tn21, flagship of the floating genome.
Microb. Molec. Biol. Rev. 63: 507 – 522.

Literacka, E., J. Empel, A. Baraniak, E. Sadowy, W. Hryniewicz, und M. Gniadkowski. 2004.

Four variants of the *Citrobacter freundii* AmpC-type cephalosporinases, including novel enzymes CMY-14 and CMY-15, in a *Proteus mirabilis* clone widespread in Poland.
Antimicrob. Agents Chemother. 48: 4136 – 4143.

Livermore, D.M. 1995.

β-Lactamases in laboratory and clinical resistance.
Clin. Microbiol. Rev. 8: 557 – 584.

Lowry, O.H., N.J. Rosenbrough, A.L. Farr, und A. Randall. 1951.

Protein measurement with the folin phenol reagent.
J. Biol. Chem. 193: 265 – 275.

Ma, D., D.N. Cook, M. Alberti, N.G. Pon, H. Nicaido, und J.E. Hearst. 1995.

Genes *acrA* and *acrB* encode a stress-induced efflux system of *Escherichia coli*.
Mol. Microbiol. 16: 45 – 55.

Mahillon, J. 1998.

Transposons as gene haulers.
APMIS 106 (Suppl. 84): 29 – 36.

Mahillon, J. und M. Chandler. 1998.

Insertion sequences.
Microb. Molec. Biol. Rev. 62: 725 – 774.

Maneewannakul, K. und S.B. Levy. 1996.

Identification of mar mutants among quinolone-resistant clinical isolates of *Escherichia coli*.
Antimicrob. Agents Chemother. 40: 1695 – 1698.

Maniatis, T., E.F. Frisch, und J. Sambrook. 1989.

Molecular cloning, a laboratory manual.
Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

Martin, R.G. und J.L. Rosner. 1995.

Binding of purified multiple antibiotic-resistance repressor protein (MarR) to *mar* operator sequences.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 92: 5456 – 5460.

Martinez-Freijo, P., A.C. Fluit, F.-J. Schmitz, J. Verhoef, und M.E. Jones. 1999.

Many class I integrons comprise distinct stable structures occurring in different species of *Enterobacteriaceae* isolated from widespread geographic regions in Europe.
Antimicrob. Agents Chemother. 43: 686 – 689.

Martinez-Martinez, L., A. Pascual, I. Garcia, J. Tran, und G.A. Jacoby. 2003.

Interaction of plasmid and host quinolone resistance.
J. Antimicrob. Chemother. 51: 1037 – 1039.

Martinez-Martinez, L., A. Pascual, und G.A. Jacoby. 1998.

Quinolone resistance from a transferable plasmid.
Lancet 351: 797 – 799.

McDermott, P.J., P. Gowland, und P.C. Gowland. 1993.

Adaption of *Escherichia coli* growth rates to the presence of pBR322.
Lett. Appl. Microbiol. 17: 139 – 143.

Menard, R. C. Molinas, M. Arthur, J. Duval, P. Courvalin, und R. Leclercq. 1993.

Overproduction of 3'-aminoglycoside phosphotransferase type I confers resistance to tobramycin in *Escherichia coli*.
Antimicrob. Agents Chemother. 37: 78 – 83.

Mingeot-Leclercq, M.P., Y. Glupczynski und P.M. Tulkens. 1999.

Aminoglycosides: activity and resistance.
Antimicrob. Agents Chemother. 43: 727 – 737.

Miriagou, V., L.S. Tzouveleki, L. Villa, E. Lebessi, A.C. Vatopoulos, A. Carattoli, und E. Tzelepi. 2004.

CMY-13, a novel inducible cephalosporinase encoded by an *Escherichia coli* plasmid.
Antimicrob. Agents Chemother. 48: 3172 – 3174.

Mollet, B., M. Clerget, J. Meyer, und S. Iida. 1985.

Organization of the Tn6-related kanamycin resistance transposon Tn2680 carrying two copies of IS26 and an IS903 variant, IS903.B.
J. Bacteriol. 163: 55 – 60.

Murphy D.B., und J.T. Pembroke. 1995.

Transfer of the IncJ plasmid R391 to recombination deficient *Escherichia coli* K12: evidence that R391 behaves as a conjugal transposon.
FEMS Microbiol. Lett. 134: 153 – 158.

Naas, T., M. Zerbib, D. Girlich, und P. Nordmann. 2003.

Integration of a transposon Tn1-encoded inhibitor-resistant β -lactamase gene, *bla*_{TEM-67} from *Proteus mirabilis*, into the *Escherichia coli* chromosom.
Antimicrob. Agents Chemother. 47: 19 – 26.

Nakajima, H., K. Kobayashi, M. Kobayashi, H. Asako, und R. Aono. 1995.

Overexpression of the *robA* gene increases organic solvent tolerance and multiple antibiotic and heavy metal ion resistance in *Escherichia coli*.
Appl. Env. Microbiol. 61: 2302 – 2307.

Nataro, J.P., und J.B. Kaper. 1998.

Diarrheagenic *Escherichia coli*.
Clin. Microbiol. Rev. 11: 142 – 201.

Nelson, E.C. und B. Gay Elisha. 1999.

Molecular basis of AmpC hyperproduction in clinical isolates of *Escherichia coli*.
Antimicrob. Agents Chemother. 43: 957 – 959.

Ng, L.-K, I. Martin, M. Alfa, und M. Mulvey. 2001.

Multiplex PCR for the detection of tetracycline resistance genes.
Molecular and Cellular Probes. 15: 209 – 215.

Ng, L.-K, M.R. Mulvey, I. Martin, G.A. Peters, und W. Johnson. 1999.

Genetic characterization of antimicrobial resistance in Canadian Isolates of *Salmonella* serovar Typhimurium DT104.
Antimicrob. Agents Chemother. 43: 3018 – 3021.

Normark, S., T. Grundstrom und S. Bergstrom. 1980.

Susceptibility to penicillins and cephalosporins in β -lactamase producing strains of *E. coli* and relative amount of β -lactamase produced by these strains.
Scand. J. Infect. Dis. 25: 23 – 29.

Normark, S., T. Edlund, T. Grundström, S. Bergström, und H. Wolf-Watz. 1977.

Escherichia coli K-12 mutants hyperproducing chromosomal beta-lactamase by gene repetitions.
J. Bacteriol. 132: 912 – 922.

Nüesch-Inderbinnen, M.T., H. Hächler, und F.H. Kayser. 1996.

Detection of genes coding for extended-spectrum SHV beta-lactamases in clinical isolates by a molecular genetic method, and comparison with the E test.
Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 15: 398 – 402.

O'Callaghan, C.H., E.W. Muggleton, und G.W. Ross. 1968.

Effects of beta-lactamases of gram-negative organisms on cephalosporins and penicillins.
In: G.L. Hobby (ed.), Antimicrob. Agents Chemother. ASM, Bethesda, p. 57 – 63.

Ojo, K.K., C. Kehrenberg, H.A. Odelola, und S. Schwarz. 2003.

Structural analysis of the tetracycline resistance gene region of a small multiresistance plasmid from uropathogenic *Escherichia coli* isolated from Nigeria.
J. Antimicrob. Chemother. 52: 1043 – 1044.

Oka, A., H. Sugisak, und M. Takanami. 1981.

Nucleotide sequence of the kanamycin resistance transposon Tn903.
J. Mol. Biol. 147: 217 – 226.

Okusu, H., D. Ma, and H. Nikaido. 1996.

ArcAB efflux pump plays a major role in the antibiotic resistance phenotype of *Escherichia coli* multiple-antibiotic-resistance (Mar) mutants.
J. Bacteriol. 178: 306 – 308.

Ornstein, L. 1964.

Disc electrophoresis. I. background and theory.
Ann. N. Y. Acad. Sci. 121: 321 – 349.

Parent, R. und P. Roy. 1992.

The chloramphenicol acetyltransferase gene of Tn2424: a new breed of *cat*.
J. Bacteriol. 174: 2891 – 2897.

Partridge, S.R. und R.M. Hall. 2003.

In34, a complex In5 family class 1 integron containing orf513 and *dfrA10*.
Antimicrob. Agents Chemother. 47: 342 – 349.

Partridge, S.R., H.J. Brown, H.W. Stokes, und R.M. Hall. 2001.

Transposons Tn1696 and Tn21 and their integrons In4 and In2 have independent origins.
Antimicrob. Agents Chemother. 45: 1263 – 1270.

Paulsen, I.T., T.G. Littlejohn, P. Radstrom, L. Sundstrom, O. Skold, G. Swedberg, und R.A. Skurray. 1993.

The 3' conserved segment of integrons contains a gene associated with multidrug resistance to antiseptics and disinfectants.
Antimicrob. Agents Chemother. 37: 761 – 768.

Penteado, A.S., L.A. Ugrinovich, J. Blanco, M. Blanco, J.E. Blanco, A. Mora, J.R.C. Andrade, S.S. Coreia, und A.F. Pestana de Castro. 2002.

Serotypes and virulence genes of *Escherichia coli* strains isolated from diarrheic and healthy rabbits in Brazil.
Vet. Microbiol. 89: 41 – 51.

Perreten, V. und P. Boerlin. 2003.

A new sulfonamide resistance gene (*sul3*) in *Escherichia coli* is widespread in the pig population of Switzerland.
Antimicrob. Agents Chemother. 47: 1169 – 1172.

Peters, E.D.J., M.A. Leverstein-Van Hall, A.T.A. Box, J. Verhoef, und A.C. Fluit. 2001.

Novel gene cassettes and integrons.
Antimicrob. Agents Chemother. 45: 2961 – 2964.

Phillipon, A., G. Arlet, und G.A. Jacoby. 2002.

Plasmid-determined AmpC-type β -lactamases.
Antimicrob. Agents Chemother. 46: 1 – 11.

Poirel, L., T. Naas, I. Le Thomas, A. Karim, E. Bingen, und P. Nordmann. 2001.

CTX-M-type extended-spectrum β -lactamase that hydrolyzed ceftazidime through a single amino acid substitution in the omega loop.

Antimicrob. Agents Chemother. 45: 3355 – 3361.

Radstrom, P., G. Swedberg und O. Skold. 1991.

Genetic analyses of sulfonamid resistance and its dissemination in gram-negative bacteria illustrate new aspects of R plasmid evolution.

Antimicrob. Agents Chemother. 35: 1840 – 1848.

Radstrom, P., und G. Swedberg. 1988.

RSF1010 and a conjugative plasmid contain *sulIII*, one of two known genes for plasmid-borne sulfonamide resistance dihydropteroate synthase.

Antimicrob. Agents Chemother. 32: 1684 – 1692.

Rather, P.N., H. Munayyer, P.A. Mann, R.S. Hare, G.H. Miller, and K.J. Shaw. 1992.

Genetic analysis of bacterial acetyltransferases: identification of amino acids determining the specificities of the aminoglycoside 6'-N-acetyltransferase Ib and IIa proteins.

J. Bacteriol. 174: 3196 – 3203.

Recchia, G.D., H.W. Stokes, und R.M. Hall. 1994.

Characterization of specific and secondary recombination sites recognized by the integron DNA integrase.

Nucleic Acids Res. 22: 2071 – 2078.

Rice, L.B. 1998.

Tn916 family of conjugative transposons and dissemination of antimicrobial resistance determinants.

Antimicrob. Agents Chemother. 42: 1871 – 1877.

Riley, L.W., R.S. Remis, S.D. Helgerson, H.B. McGee, J.G. Wells, B.R. Davis, R.J. Hebert, E.S. Olcott, L.M. Johnson, N.T. Hargrett, P.A. Blake, und M.L. Cohen. 1983.

Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotype.

N. Engl. J. Med. 308: 681 – 685.

Rosenberg, E.Y., D. Ma, und H. Nikaido. 2000.

AcrD of *Escherichia coli* is an aminoglycoside efflux pump.

J. Bacteriol. 182: 1754 – 1756.

Rubin, R.A., S.B. Levy, R.L. Henrikson, und F.J. Kezdy. 1990.

Gene duplication in the evolution of the two complementing domains of gram-negative bacterial tetracycline efflux proteins.

Gene 87: 7 – 13.

Saiki, R.K., S.J. Scharf, F. Faloona, K.B. Mullis, G.T. Horn, H.A. Erlich, und N. Arnheim. 1985.

Enzymatic amplification of β -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia.

Science 230: 1350 – 1352.

Sanders, C. C., und W. E. Sanders. 1992.

β -Lactam resistance in gramnegative bacteria: global trends and clinical impact.
Clin. Infect. Dis. 15: 824 – 839.

Sandvang, D. 1999.

Novel streptomycin and spectinomycin resistance gene as a gene cassette within a class 1 integron isolated from *E. coli*.
Antimicrob. Agents Chemother. 43: 3036 – 3038.

Sandvang, D., F.M. Aarestrup, und L.B. Jensen. 1997.

Characterization of integrons and antibiotic resistance genes in Danish multiresistant *Salmonella enterica* Typhimurium DT104.
FEMS Microbiol. Lett. 157: 177 – 181.

Sanger, F., S. Nicklen, und A.R. Coulson. 1977.

DNA sequencing with chain-terminating inhibitors.
Proc. Nat. Acad. Sci. 74: 5463 – 5467.

Schmitt, R. E. Bernhard, und R. Mattes. 1979.

Characterisation of Tn1721, a new transposon containing tetracycline resistance genes capable of amplification.
Mol. Gen. Genet. 172: 53 – 65.

Schnabel, E.L. und A.L. Jones. 1999.

Distribution of tetracycline resistance genes and transposons among phylloplane bacteria in Michigan apple orchards.
Appl. Environ. Microbiol. 65: 4898 – 4907.

Schulte, A. 2001.

Stabilität hoher Fluorchinolonresistenz bei Enterobakterien ohne Selektionsdruck.
Dissertation, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn.

Scholz, P., V. Haring, B. Wittmann-Liebold, K. Ashman, M. Bagdasarian, und E. Scherzinger. 1989.

Complete nucleotide sequence and gene organization of the broad-host-range plasmid RSF1010.
Gene 75: 271 – 288.

Simon, C. und W. Stille. 2000.

Antibiotika-Therapie in Klinik und Praxis.
Schattauer Verlagsgesellschaft, Stuttgart.

Shaw, K.J., P.N. Rather, R.S. Hare und G.H. Miller. 1993.

Molecular genetics of aminoglycoside resistance genes and familial relationships of the aminoglycoside-modifying enzymes.
Microbiol. Rev. 57: 138 – 163.

Shapiro, A.L., E. Vinuela, und J.V. Maizel Jr. 1967.

Molecular weight estimation of polypeptide chains by electrophoresis in SDS-polyacrylamide gels.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 28: 815 – 820.

Sherwood, K.J. 2000.

Molekulare Mechanismen der Multiresistenz bei *Escherichia coli*.
Diplomarbeit, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn.

Skold, O. 2001.

Resistance to trimethoprim and sulfonamides.
Vet. Res. 32: 261 – 273.

Stapleton, P.D., K.P. Shannon und G.L. French. 1999.

Carbapenem resistance in *Escherichia coli* associated with plasmid-determined CMY-4 β -lactamase production and loss of an outer membrane protein.
Antimicrob. Agents Chemother. 43: 1206 – 1210.

Stibitz, S. und J.E. Davies. 1987.

Tn602: a naturally occurring relative of Tn903 with direct repeats.
Plasmid 17: 202 – 209.

Stock, I. 1999.

Die natürliche Antibiotika-Empfindlichkeit der Enterobacteriaceae.
Dissertation, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn.

Sunde, M. und H. Sorum. 2001.

Self-transmissible multidrug resistance in *Escherichia coli* of the normal intestinal flora of healthy swine.
Microb. Drug Resist. 7: 191 – 196.

Sundström, L., C. Jansson, K. Bremer, E. Heikkilä, B. Olsson-Liljequist, und O. Sköld. 1995.

A new *dhfrVIII* trimethoprim resistance gene, flanked by IS26, whose product is remote from other dihydrofolate reductases in parsimony analysis.
Gene 154: 7 – 14.

Swedberg G. und O. Skold. 1980.

Characterization of different plasmid-borne dihydropteroate synthases mediating bacterial resistance to sulfonamides.
J. Bacteriol. 142: 1 – 7.

Takahashi, H., H. Watanabe, T. Kuroki, Y. Watanabe, und S. Yamai. 2002.

Identification of *tet(B)*, encoding high-level tetracycline resistance, in *Neisseria meningitidis*.
Antimicrob. Agents Chemother. 46: 4045 – 4046.

Tipper, D.J. und J.L. Strominger. 1965.

Mechanism of action of penicillin: a proposal based on their structural similarity to acyl-D-alanyl-D-alanine.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 54: 1133 – 1141.

Tomasz, A. 1979.

The mechanism of the irreversible antimicrobial effects of penicillin: how the beta-lactam antibiotics kill and lyse bacteria.
Ann. Rev. Microbiol. 33: 113 – 137.

Tran, J.H. und G.A. Jacoby. 2002.

Mechanism of plasmid-mediated quinolone resistance.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 99: 5638 – 5642.

Vassort-Bruneau, C., M.-C. Lesage-Descauses, J.-L. Martel, J.-P. Lafont, und E. Chalus-Dancla. 1996.

CATIII chloramphenicol resistance in *Pasteurella haemolytica* and *Pasteurella multocida* isolated from calves.
J. Antimicrob. Chemother. 38: 205 – 213.

Vettorato, M.P., L. Leomil, B.E. Guth, K. Irino., und A.F. Pestana de Castro. 2003.

Properties of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) isolates from sheep in the state of Sao Paulo, Brazil.
Vet. Microbiol. 95: 103 – 109.

Walckenaer, E., L. Poirel, V. Leflon-Guibout, P. Nordmann, und M.-H. Nicolas-Chanoine. 2004.

Genetic and biochemical characterization of the chromosomal class A β -lactamases of *Raoultella* (formerly *Klebsiella*) *planticola* and *Raoultella ornithinolytica*.
Antimicrob. Agents Chemother. 48: 305 – 312.

Wang, M., J.H. Tran, G.A. Jacoby, Y. Zhang, F. Wang, und D.C. Hooper. 2003.

Plasmid-mediated quinolone resistance in clinical isolates of *Escherichia coli* from Shanghai, China.
Antimicrob. Agents Chemother. 47: 2242 – 2248.

Waters, V.L. 1999.

Conjugative transfer in the dissemination of β -lactam and aminoglycoside resistance.
Frontiers Biosci. 4: 433 – 456.

Westphal, K. 1999.

Entwicklung und Anwendung eines Systems zur phänotypischen Bestimmung von β -Laktamasen.
Diplomarbeit, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn.

White, D.G., C. Hudson, J.J. Maurer, S. Ayers, S. Zhao, M.D. Lee, L. Bolton, T. Foley, und J. Sherwood. 2000.

Characterization of chloramphenicol and florfenicol resistance in *Escherichia coli* associated with bovine diarrhea.
J. Clin. Microbiol. 38: 4593 – 4598.

White, D.G., J.D. Goldman, B. Demple, und S.B. Levy. 1997.

Role of the *acrAB* locus in organic solvent tolerance mediated by expression of *marA*, *soxS*, or *robA* in *Escherichia coli*.
J. Bacteriol. 179: 6122 – 6126.

White, P.A. und W.D. Rawlinson. 2001.

Current status of the *aadA* and *dfr* gene cassette families.
J. Antimicrob. Chemother. 47: 495 – 496.

White, P.A., C.J. McIver, Y.-M. Deng, und W.D. Rawlinson. 2000.

Characterisation of two new gene cassettes, *aadA5* and *dfrA17*.
FEMS Microbiol. Lett. 182: 265 – 269.

White, P.A., C. J. McIver, und W.D. Rawlinson. 2001.

Integrans and gene cassettes in *Enterobacteriaceae*.
Antimicrob. Agents Chemother. 45: 2658 – 2661.

Wiedemann, B. und P. Heisig. 1999.

Bakterielle Resistenz gegenüber Chinolonen (Ciprofloxacin).
Chemotherapie J. 8: 99 – 107.

Wiedemann, B., C. Kliebe, und M. Kresken. 1989.

The epidemiology of β -lactamases.
J. Antimicrob. Chemother. 24 (Suppl. B): 1 – 22.

Wiegand, I. 2001.

Zielstrukturen für die Hemmung der Induktion chromosomal kodierter AmpC β -Laktamasen.
Dissertation, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn.

Wrighton, C.J. und P. Strike. 1987.

A pathway for the evolution of the plasmid NTP16 involving the novel kanamycin resistance transposon Tn4352.
Plasmid 17: 37 – 45.

Wu, S.W., K. Dornbusch, G. Kronvall, und M. Norgren. 1999.

Characterization and nucleotide sequence of a *Klebsiella oxytoca* cryptic plasmid encoding a CMY-type β -lactamase: confirmation that the plasmid-mediated cephamycinase originated from the *Citrobacter freundii* AmpC β -lactamase.
Antimicrob. Agents Chemother. 43: 1350 – 1357.

Zühlsdorf, M.T., und B. Wiedemann. 1992.

Tn21-specific structures in Gram-negative bacteria from clinical isolates.
Antimicrob. Agents Chemother. 36: 1915 – 1921.

7. Anhang

7.1. Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
AAC	Aminoglykosid-Acetyl-Transferase
AAD	Aminoglykosid-Nukleotidyl-Transferase
Abb.	Abbildung
Ala	Alanin
AME	Aminoglykosid-modifizierendes Enzym
Amp16	auf Ampicillin selektierter Konjugant des Stamm 56
AmpC hyper	hyperproduzierte AmpC- β -Laktamase
AmpC plasmid	Plasmid-kodierte AmpC- β -Laktamase
ANT	Aminoglykosid-Nukleotidyl-Transferase
APH	Aminoglykosid-Phospho-Transferase
APS	Ammoniumpersulphat
aqua dem.	demineralisiertes Wasser
aqua dest.	destilliertes Wasser
Arg	Arginin
Asn	Asparagin
Asp	Aspartat
ATP	Adenosintriphosphat
B	Guanin + Cytosin + Thymin (IUB-Code)
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
C	Cytosin
CAT	Chloramphenicol-Acetyltransferase
Chlor1	auf Chloramphenicol selektierter Stamm 56 Konjugant
Clav.	Clavulansäure
CML	Chloramphenicol-Efflux-Pumpe
Cys	Cystein
D	Guanin + Adenin + Thymin (IUB-Code)
DAEC	diffus adhaerierende <i>E. coli</i>
DHFR	Dihydrofolat-Reduktase

DHPS	Dihydropteroat-Synthetase
DIN	Deutsches Institut für Normung e.V.
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DR	direct repeats
E _{Index}	Extinktion bei [Index] nm Wellenlänge
EaggEC	enteroaggregative <i>E. coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EHEC	enterohämorrhagische <i>E. coli</i>
EIEC	enteroinvasive <i>E. coli</i>
EPEC	enteropathogene <i>E. coli</i>
ESBL	extended-spectrum- β -lactamase
EtBr	Ethidiumbromid
ETEC	enterotoxinogene <i>E. coli</i>
eV	Elektronen-Volt
g	Gramm
G	Guanin
Gln	Glutamin
Glu	Glutamat
Gly	Glycin
h	Stunde
H	Cytosin + Adenin + Thymin (IUB-Code)
HgCl ₂	Quecksilber(II)chlorid
His	Histidin
HUS	hämolytisch urämisches Syndrom
Ile	Isoleucin
IN	Integron
IRBL	Inhibitor-resistente β -Laktamase
IR	inverted repeats
IS	Insertions-Sequenz
K	Guanin + Thymin (IUB-Code)
K	Negativkontrolle
Kan3	auf Kanymcin selektierter Stamm 56 Konjugant

kb	Kilobasen
KBE	Kolonien bildende Einheit
l	Liter
Lac+/-	Laktose positiv/negativ
Leu	Leucin
Lys	Lysin
m	Meter
M	molar
M	Adenin + Cytosin (IUB-Code)
MAR	multiple Antibiotika-Resistenz
Mda	Mega-Dalton
Met	Methionin
μ F	Micro-Farad
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MHK	minimale Hemmkonzentration
min	Minute
n	Anzahl
N	Adenin + Cytosin + Guanin + Thymin (IUB-Code)
NCCLS	National Community of Clinical Laboratory Standards
Ochre	Stop-Codon
OD _{Index}	optische Dichte bei [Index] nm Wellenlänge
orf	Offener Leserahmen
OSBL	original-spectrum- β -lactamase
PA β N	MC-207,110 (Phe-Arg- β -Naphtylamid)
PBP	Penicillin-Bindeprotein
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PEG	Paul-Ehrlich Gesellschaft für Chemotherapie e.V.
Phe	Phenylalanin
pI	Isoelektrischer Punkt
PK	Positivkontrolle
QRDR	quinolon-resistance determining region
R	Adenin + Guanin (IUB-Code)
RAF	Referenzgruppen für Antibiotikafrågor
Rif ^r	Rifampicin-resistent

RT	Raumtemperatur
S	Cytosin + Guanin (IUB-Code)
Ser	Serin
SFM	Société Française de Microbiologie
spp.	Spezies (Plural)
STEC	Shiga-Toxin produzierende <i>E. coli</i> (=VTEC)
Str ^r	Streptomycin-resistent
Sulf.	Sulfamethoxazol
T	Thymin
Tab.	Tabelle
Taz.	Tazobactam
Tet1	auf Tetracyclin selektierter Stamm 56 Konjugant
Thr	Threonin
Tn	Transposon
Tn56	Tn21-Familie Transposon aus Stamm 56
Trim.	Trimethoprim
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Trizma Base)
tRNA	Transfer-Ribonukleinsäure
Tyr	Tyrosin
U	Unit
Upm	Umdrehungen pro Minute
V	Adenin + Cytosin + Guanin (IUB-Code)
V	Volt
Val	Valin
vgl.	vergleiche
Vol.	Volumenteile
VTEC	Vero-Toxin produzierende <i>E. coli</i> (=STEC)
W	Adenin + Thymin (IUB-Code)
WT	Wildtyp
Y	Cytosin + Thymin (IUB-Code)
z.B.	zum Beispiel
3'CS.	3'-konservierter Bereich von Integrans
5'CS.	5'-konservierter Bereich von Integrans
Ω	Ohm

7.2. Lebenslauf

Name: Kimberley Jane Sherwood

Geburtstag: 06.07.1976

Geburtsort: Bonn, Deutschland

Wohnort: 53881 Euskirchen, Rosenpfad 46 (1. Wohnsitz)
53121 Bonn, Röckumstr. 33 (2. Wohnsitz)

Grundschule:

1982-1986 Gemeindegrundschule Odendorf, Odendorf, Deutschland

Gymnasium:

1986-1992 Emil-Fischer-Gymnasium, Euskirchen, Deutschland

1992-1993 Sir Wilfred Laurier Collegiate Institute, Scarborough, Ontario, Canada

1993-1995 Emil-Fischer-Gymnasium, Euskirchen, Deutschland

12.06.1995 Emil-Fischer-Gymnasium, Euskirchen, Deutschland
Abitur (Englisch, Chemie, Geschichte, Biologie)

Hochschule:

1995-1996 University of Guelph, Guelph, Ontario, Canada

1996-2000 Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität, Bonn, Deutschland
Diplomstudium Biologie

05.09.2000 Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität, Bonn, Deutschland
Biologie-Diplom (Mikrobiologie, Genetik, Biochemie)

Diplomarbeit in der Pharmazeutischen Mikrobiologie der Universität Bonn bei Herrn Prof. Dr. B. Wiedemann. Thema:
„Molekulare Mechanismen der Multiresistenz bei *Escherichia coli*“

2000-2004 Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität, Bonn, Deutschland
Promotion in der Pharmazeutischen Mikrobiologie unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. B. Wiedemann. Thema:
„Evolution der Multiresistenz bei *Escherichia coli*“

7.3. Danksagung

Herrn Prof. Dr. B. Wiedemann möchte ich für die Möglichkeit danken, diese Dissertation in seiner Abteilung anfertigen zu können. Darüber hinaus bedanke ich mich für seine Unterstützung und stete Diskussionsbereitschaft, sowie die Möglichkeit, die Ergebnisse der Arbeit auf internationalen Kongressen präsentieren zu können.

Herrn Prof. Dr. Dr. H. G. Trüper möchte ich für die freundliche Übernahme des Koreferats danken.

Frau Dr. med. J. Wagner von der Freien Universität Berlin danke ich für die Bereitstellung der Bakterienstämme.

Prof. Dr. H. Tschäpe und Dr. E. Tietze möchte ich für die Möglichkeit und die Unterstützung danken, die Plasmid-Präparationen am Robert-Koch-Institut in Wernigerode durchführen zu können. Des weiteren gilt ihnen mein Dank für die Serotypisierung der vier *E. coli* Stämme.

Bei allen Mitgliedern der Abteilung bedanke ich mich ganz herzlich für ihre Hilfsbereitschaft, die Diskussionen und die freundliche Arbeitsatmosphäre. Besonders danke ich Frau S. Burak für die Hilfe bei der Einarbeitung in die Protein-Biochemie.

Allen, die mir beim Korrekturlesen dieser Arbeit geholfen haben, gilt mein herzlicher Dank

Frau B. Bugdaci und ihren Vertretern danke ich für die Bereitstellung der sterilen Glassachen und das Autoklavieren der Nähmedien.

Ein großer Dank gilt auch Frau S. Mendel für ihre große Hilfsbereitschaft.

Ich möchte mich auch besonders bei meiner Familie und Herrn J. Illigen für ihre Unterstützung bedanken.

Der Pinguin-Stiftung, Düsseldorf danke ich für die finanzielle Förderung.