

AUS DEM LEHRSTUHL FÜR MEDIZINISCHE MIKROBIOLOGIE UND
HYGIENE
DIREKTOR: PROF. DR. RER. NAT. H. WOLF
DER MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

CHARAKTERISIERUNG DES PUTATIVEN TRANSKRIPTIONSFAKTORS
ROH VON *ENTEROBACTER CLOACAE*

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Medizinischen Fakultät
der Universität Regensburg

Vorgelegt von Sebastian Franz Martin Häusler
aus Regensburg

2008

Dekan:

Prof. Dr. B. Weber

1. Berichterstatter:

Prof. Dr. H.-J. Linde

2. Berichterstatter:

Prof. Dr. B. Salzberger

Tag der mündlichen Prüfung:

17.02.2009

Inhalt

A Zusammenfassung	5
B Einleitung	7
B 1 <i>Enterobacter cloacae</i>	7
B 2 Bakterielle Effluxsysteme und ihre Regulatoren anhand von Beispielen aus <i>Escherichia coli</i>	8
B 2.1 Die Effluxpumpe AcrAB und ihr Substanzspektrum	8
B 2.2 Bedeutung ausgewählter Efflux-Regulatoren in <i>E. coli</i>	9
B 3 Thema - Fragestellung	12
C Materialien und Methoden	14
C 1 Materialien	14
C 1.1 Organismen	14
C 1.2 Kits	14
C 1.3 Enzyme	15
C 1.4 Antibiotika	15
C 1.5 Plasmide	15
C 1.6 Lösungen	16
C 1.7 Nährmedien	17
C 1.8 Primer und DNA-Marker	17
C 1.9 Computerprogramme	18
C 1.10 Geräte	19
C 1.11 Chemikalien und Plastikartikel; sonstiges	19
C 2 Molekularbiologische Methoden	20
C 2.1 DNA-Manipulationen	20
C 2.2 Southern Blot	28
C 2.3 Klonierung	35
C 2.4 Phänotypische Testverfahren	39
D Ergebnisse	42
D 1 Suche nach <i>roh</i> in verschiedenen Klinikisolaten von <i>Enterobacteriaceae</i>	42
D 1.1 Polymerase-Ketten-Reaktion („Standard“-Protokoll)	42
D 1.2 Polymerase-Ketten-Reaktion („touch-down“-Protokoll) ^{43 44 45}	49

D 1.3 Subklonierung der PCR-Produkte	58
D 2 Vorkommen von <i>roh</i> in der Nomenspecies <i>Enterobacter cloacae</i>	61
D 2.1 Suche nach <i>roh</i> mittels „Southern Blot“ in einzelnen Vertretern der durch H. Hoffmann neugruppierten Nomenspecies <i>E. cloacae</i> ³⁹	61
D 2.2 Suche nach <i>roh</i> mittels „touch down“-PCR in einzelnen Vertretern der durch H. Hoffmann neugruppierten Nomenspecies <i>E. cloacae</i> ³⁹	67
D 2.3 Sequenzen und phylogenetischer Zusammenhang der Mustervertreter der Nomenspecies <i>E. cloacae</i> sowie weiterer klinischer Isolate.....	71
D 3 Überexpression von <i>roh</i> in <i>Enterobacter cloacae</i> mittels pUC19.....	74
D 3.1 Generierung von <i>Enterobacter cloacae</i> -Stämmen mit pUC19- <i>lacPr-roh-</i> <i>kana</i>	74
D 3.2 Phänotypische Testverfahren.....	77
D 4 Testung der Resistenz von ^{pUC19-lacPr-roh-kana+} <i>Enterobacter cloacae</i> -Stämmen gegenüber Cadmium-Ionen	83
E Diskussion.....	86
E 1: Suche nach <i>roh</i> in verschiedenen klinischen Isolaten von <i>Enterobacteriaceae</i>	87
E 2: Suche nach <i>roh</i> in den dreizehn Bakterienclustern der Neugruppierung der Nomenspecies <i>Enterobacter cloacae</i> ³⁹ und phylogenetische Zusammenhänge.	91
E 3: Versuche zur phänotypischen Charakterisierung	93
E 4: Ausblick	97
F Anhang.....	100
F 1 ergänzende Tabellen	100
F 1.1 genutzte Bakterienstämme	100
F 1.2 Gensequenzen	102
F 1.3 Abkürzungsverzeichnis.....	113
F 2 Literaturverzeichnis	115
F 3 Danksagung.....	119
F 4 Lebenslauf	120

A Zusammenfassung

Die Resistenzentwicklung von Bakterien gegenüber antimikrobiellen Substanzen stellt den behandelnden Arzt inzwischen vor immer größere Herausforderungen ^{1 2}. Ein phylogenetisch sehr alter Teil an Resistenzmechanismen wird durch ein System bakterieller Effluxpumpen gestellt ³. Die Pumpen transportieren ein großes, überlappendes Spektrum an verschiedenen Substanzen ⁴. Sie unterliegen genauen Regulationsmechanismen durch eine Vielzahl an Transkriptionsfaktoren, wie zum Beispiel MarA, Rob oder SoxS ³. In der vorliegenden Arbeit sollte ein neu entdeckter putativer Transkriptionsfaktor „Roh“ genauer untersucht und charakterisiert werden. Der Name „Roh“ leitet sich aufgrund enger Homologie mit dem bereits bekannten Transkriptionsfaktor Rob von „Rob-homolog“ ab. Roh wurde auf der Suche nach der Ursache unterschiedlicher Minimaler Hemmkonzentrationen (MHK) gegenüber Ciprofloxacin bei zwei vom selben Patienten isolierten Vertretern der Nomenspecies *Enterobacter cloacae* (Stämme # 1919 und # 1920) entdeckt ⁵ (Vorarbeiten der Arbeitsgruppe). Das geänderte Resistenzspektrum der Keime wies wie die Überexpression von *roh* auf Aktivierung des Effluxsystemes hin. Versuche mittels „touch down“-PCR und Southern Blot bestätigten nun das Vorliegen der Gensequenz von Roh in allen untersuchten klinischen Isolaten sowie exemplarischen Vertretern der dreizehn Bakteriencluster der Nomenspecies *Enterobacter cloacae*. Roh zeigte sich in seiner Sequenz hoch konserviert. Ein *roh*-basierter phylogenetischer Stammbaum der Nomenspecies *E. cloacae* ließ sich nicht erstellen. Mit einem neu generierten *high copy*-Plasmid pUC19-*lacPr-roh-kana* konnte *roh* unter der Kontrolle eines *lac*-Promotors überexprimiert werden. Mit pUC19-*lacPr-roh-kana* transformierte *E. cloacae* zeigten zu Wildtyp-Stämmen diskrepante MHK für typischerweise durch Effluxpumpen transportierte Antibiotika, nicht aber gegenüber Lösungsmitteln oder Cadmiumionen.

Die Ergebnisse weisen auf die Rolle von Roh als Transkriptionsfaktor im System bakterieller Effluxpumpen in *E. cloacae* hin.

B Einleitung

B 1 Enterobacter cloacae

Die Gattung *Enterobacter* besteht aus aeroben und fakultativ anaeroben, gramnegativen Stäbchen mit peritricher Begeißelung^{6 7}. Die Vertreter der Gattung sind Katalase-positiv, Oxidase-negativ, betreiben Zuckermetabolisation mittels Fermentation und produzieren Gas⁶. Andere biochemische Merkmale von *Enterobacter* sind Positivität in der Voges-Proskauer-Reaktion, Glukonat-Positivität, langsame Verflüssigung von Gelatine und die Produktion von Ornithin-Decarboxylase⁶. *Enterobacter* finden sich natürlicherweise als Umweltkeime und im menschlichen Darmtrakt^{8 7}. Dem Genus *Enterobacter* wird nach *Escherichia coli* und noch vor *Klebsiella* die zweitwichtigste Bedeutung unter den *Enterobacteriaceae* bei den nosokomialen Krankheitserregern zugemessen⁷. Der klinisch häufigste Vertreter von *Enterobacter* ist der in dieser Untersuchung genauer untersuchte *E. cloacae*⁷. Oftmals werden *Enterobacter* bei Erkrankungen wie Bronchitis, Cholangitis oder Harnwegsinfektionen, seltener bei Sepsis oder Meningitis nachgewiesen⁷. Natürliche Resistenzen sind nach Derepression chromosomaler β -Lactamasen gegen Aminopenicilline wie Ampicillin oder Cephalosporine der Gruppe 3a und b bekannt⁹. Therapiert wird meist mit Chinolonen, Aminoglykosiden oder Carbapenemen^{7 10}. Vor diesem Hintergrund stellt die unter anderem von Linde et al 2002 berichtete Entwicklung von Chinolonresistenz in klinischen *Enterobacter*isolaten eine besorgniserregende Entwicklung dar⁵.

B 2 Bakterielle Effluxsysteme und ihre Regulatoren anhand von Beispielen aus Escherichia coli

B 2.1 Die Effluxpumpe AcrAB und ihr Substanzspektrum

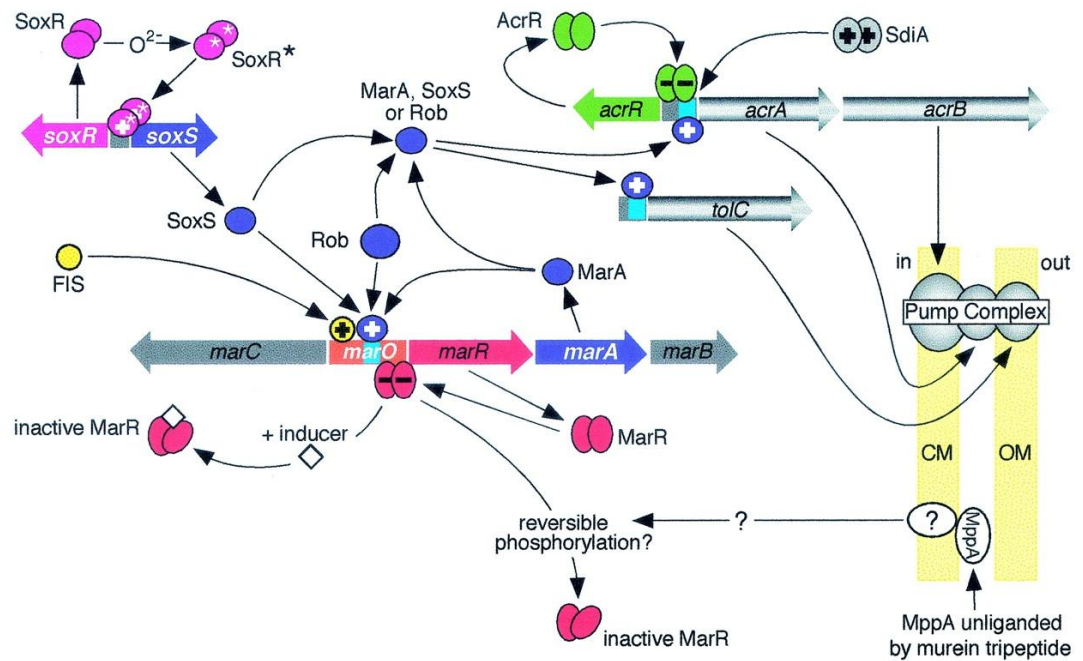
Bei Bakterien wurden bisher hauptsächlich zwei große unter Regulation stehende und an antimikrobieller Resistenz beteiligte Gruppen an Effluxpumpen genauer untersucht³. Sowohl Pumpen der „major facilitator superfamily“ (MFS) als auch der „resistance, nodulation and cell division“ (RND) Superfamilie benötigen zur Energieversorgung transmembrane Wasserstoffionengefälle^{3 11 12}. Eine in *Escherichia coli* besonders gut untersuchte Pumpe stellt AcrAB-TolC aus der Gruppe der RND-Pumpen dar. Die Pumpe besteht aus drei Proteinen. AcrB ist das Protein mit aktiver Transportfunktion³. TolC ist ein Kanalprotein für die äußere Lipidmembran des Bakteriums^{13 3}. AcrA ist das Membranfusionsprotein der Effluxpumpe^{14 3}. Neben den bereits erwähnten Fluorchinolonen^{5 4} können durch diese Pumpe auch Lösungsmittel und viele andere lipophile Antibiotika, wie etwa Chloramphenicol oder Tetracycline, transportiert werden^{3 15 16 17 11}. Mazzariol et al. zeigten 2000 mittels Western Blot-Analysen, dass in neun von zehn klinischen Isolaten von *Escherichia coli* das AcrAB-TolC „multidrug efflux“-System überexprimiert war¹⁸ und unterstrichen somit die Bedeutung des Proteinkomplexes für die Entwicklung antimikrobieller Resistenz.

AcrAB steht unter der Kontrolle von AcrR, eines lokalen Repressors³. Positiv reguliert wird *acrAB* durch ein Protein namens MarA und einer Vielzahl anderer Transkriptionsfaktoren³. Zu den Faktoren zählt auch SdiA, das im Zusammenhang mit „quorum-sensing“ stehen soll¹⁹. SdiA ist also ein Bindeglied zwischen „multidrug efflux“-Pumpen und der Fähigkeit von Bakterien, die Zelldichte ihrer Population abzuschätzen.

Bei *E. coli* wurden neben AcrAB-TolC auch noch weitere Effluxpumpen, wie zum Beispiel YdhE, NorE oder MdfA identifiziert ²⁰. Auch diese wurden durch S. Yang mit „quorum-sensing“ in Verbindung gebracht ²¹. Somit scheinen die MDR-Effluxpumpen neben ihrer aktuellen und klinisch wichtigen Rolle innerhalb der Entwicklung antimikrobieller Resistenz phylogenetisch vor allem eine Bedeutung bei der Zell zu Zell-Kommunikation zu haben.

B 2.2 Bedeutung ausgewählter Efflux-Regulatoren in *E. coli*

Eine enge Regulation von bakteriellen Effluxsystemen ist von besonderer Bedeutung. Es wurde bereits mehrfach gezeigt, dass die Überexpression von Effluxpumpen letal ist. So beschrieben Eckert und Beck schon 1989, dass eine Überexpression von TetA in *E. coli* zum teilweisen Zusammenbruch des Membranpotentials, Wachstumsarrest und schließlich dem Zelltod führte ²². Vor allem den Effekt der unkontrollierten Translokation von Ionen wurde diskutiert ²². Auch Hickman et al. veröffentlichten derartige Effekte ²³. In Bezug auf das gewählte Beispiel der AcrAB-TolC-Effluxpumpe wurden sowohl positive als auch negative Regulationseffekte unter anderem durch MarA (von: *multiple antibiotic resistance*-Aktivator), SoxS (*superoxide response*) und auch durch das wegen seiner ausgeprägten Homologie zu Roh für diese Arbeit besonders bedeutende Rob (*replication origin binding* in *E. coli*) publiziert ³ (vgl. Abbildung 1). Generell zeigen sich für die Efflux-Faktoren MarA, SoxS und dem N-terminalen Ende von Rob ausgeprägte Homologien von 45 % bis 50 % auf DNA-Ebene ²⁴. Die meisten Daten finden sich für MarA, weswegen MarA als erstes Beispiel besprochen wird.

**Abb. 1:**

Übersicht der Regulation von *marRAB*, *acrRAB*, *soxRS* und *tolC* unter spezieller Berücksichtigung von MarA, Rob und SoxS

AcrAB-TolC ist ein Transmembran-Transportkomplex über die cytoplasmatische und die äußere bakterielle Membran („CM“ und „OM“). Überschießende Expression von AcrA und AcrB wird durch den lokalen Repressor AcrR kontrolliert. SdiA, welches bei der Zellteilung eine Rolle spielt, stimuliert die Expression von *acrAB*. Aktivierung von *acrAB* und *tolC* geschieht vor allem durch MarA, SoxS oder Rob. Die Expression von MarA wird über MarR negativ reguliert. Bindung von SoxS, MarA, Rob und Fis an *marO* bewirkt Stimulation, von MarR Repression der Expression von *marRAB*. MarR kann mittels eines Liganden („inducer“) aktiviert und durch reversible Phosphorylierung deaktiviert werden. Die Transkription von *soxS* wird mittels Modifikation von SoxR durch freie Sauerstoffradikale aktiviert.

Abbildung und Beschriftung modifiziert nach Grkovic et al, 2002³

MarA gehört in die Familie der AraC-Transkriptionsfaktoren^{3 25}. Die AraC-Familie wurde bei der Untersuchung des Metabolismus von L-Arabinose entdeckt²⁶.

Übliches Charakteristikum von Mitgliedern der AraC-Familie ist eine Transkriptionsaktivierung als dimerisierte Proteine²⁵. Das für AraC definierende Merkmal ist allerdings eine spezielle, am Carboxyl-Ende des Proteins lokalisierte DNA-Bindungsdomäne²⁵. Rhee et al. entdeckten 1998, dass MarA gleich zwei „helix-turn-helix“ (HTH) -DNA-Bindungsdomänen enthält, welche durch eine lange α -Helix konnektiert sind^{3 27}. Das gleichzeitige Vorhandensein von zwei HTH-Domänen erklärt, dass MarA auch als Monomer seine Wirkung zeigt, da im

bakteriellen Genom für eine spezifische DNA-Bindung zwei dieser 11 bis 12 Basenpaar langen HTH-Motive nötig sind^{3 27}. MarA ist ein Aktivator des *multiple antibiotic resistance* („*mar*“)-Lokus und vieler anderer Gene durch Bindung sogenannter „marboxes“^{28 3}. *Marboxes* sind 20 Basenpaar lange DNA-Abschnitte in unmittelbarer Nähe von Promotoren des Mar-Regulons³. Vor dem Promotor von *acrAB* ist auch eine *marbox* platziert, wodurch die Genexpression über MarA beeinflusst werden kann²⁹. Martin und Rosner veröffentlichten 2001, dass MarA keine Ligandenbindungsdomäne besitzt²⁵. Die Repression der Expression von *marA* geschieht über das Protein MarR^{29 3}. Grkovic et al beschrieben, dass MarR und MarA an einen DNA-Abschnitt *marO* unmittelbar zwischen ihren beiden Transkriptionseinheiten innerhalb von *marRAB* binden. *MarO* enthält seinerseits viele Bindungsstellen für andere regulatorische Proteine enthält³ und gibt damit ein gutes Beispiel für die engmaschige Verzahnung von Transkriptionsfaktoren in bakteriellen Effluxsystemen. MarR selbst kann durch Ligandenbindung, zum Beispiel von Salicylat, aktiviert werden^{30 3}. Auch ist für MarA bekannt, dass es neben seiner Bedeutung für die Transkription von *acrAB* neben mindestens 40 anderen Genen^{31 24} das Gen *micF* aktiviert, welches als „antisense“-RNA die Transkription des Porins OmpF negativ reguliert³². Es gibt also Hinweise dafür, dass MarA nicht nur aktiven Efflux, sondern auch die Aufnahme von Substanzen reguliert. Der *mar*-Lokus besteht neben *marRAB* auch aus dem unterschiedlich transkribierten *marC*³. *MarC* kodiert wie *marB* für ein Protein bislang nicht bekannter Funktion²⁹.

Ein weiterer Transkriptionsfaktor, der *acrAB* positiv beeinflusst, ist SoxS¹⁷. SoxS selbst steht unter Kontrolle des Transskriptionsfaktors SoxR, der seinerseits durch Superoxid ($O_2^{\cdot -}$) zum positiven Regulator wird.³³ So schließt auch bei SoxS eine fehlende Ligandenbindungsdomäne (s.o.) eine Regulation durch externe Substanzen nicht aus.

Rob ist ein weiterer, wenn auch nur mäßig *acrAB* aktivierender Faktor ³⁴. Das Protein enthält an seinem C-terminalen Ende eine zusätzliche Domäne, die mit DNA komplexieren kann ³⁵. Nähere Untersuchungen ergaben, dass offensichtlich durch Bindung der Domäne an einen bisher unbekannten Liganden eine Aktivitätsänderung von Rob bewirkt wird ³⁵. Aktuellere Versuche haben gezeigt, dass Dipyridyl in vitro die C-terminale Domäne binden kann und in vivo zur Aktivitätssteigerung von Rob führt ³⁶. Unklar ist bislang allerdings, ob die Modulation der Wirkung von Rob tatsächlich durch direkte Bindung von Dipyridyl und den Transkriptionsfaktor bewirkt wird, oder ob indirekte Effekte eine Rolle spielen ^{3 36}. Die vermutete Aktivitätsänderung durch Bindung von Substanzen an Rob wird dadurch erklärt, dass die nicht gleichzeitig korrekt an die DNA bindende C- und N-terminalen „helix-turn-helix“-Motive alternativ binden und dadurch auch alternativ aktivieren können ^{25 35 37}.

Sowohl Rob und SoxS, als auch wie erwähnt MarA, können an *marO* (s.o.) binden und hierdurch die Transkription von *marRAB* beeinflussen ³. Sie sind ein weiteres Bild für die enge Verschaltung der an Effluxsystemen beteiligten Transkriptionsfaktoren und Verknüpfung unterschiedlichster Aktivierungs- und Kontrollpfade für die Regulation von Effluxpumpen wie AcrAB-TolC.

B 3 Thema - Fragestellung

Ziel dieser Arbeit war, den im Rahmen von zum Teil bereits publizierten Vorarbeiten der Arbeitsgruppe ⁵ neu entdeckten putativen Transkriptionsfaktor Roh in *E. cloacae* genauer zu charakterisieren und seine Bedeutung für die Regulation von bakteriellen Effluxsystemen zu beleuchten. Um die Rolle des Proteins in Resistenzproblemen des klinischen Alltags abschätzen zu können, sollten zunächst mehrere klinische Isolate sowie Vertreter der einzelnen Cluster der Nomenspecies *E. cloacae* auf das Vorhandensein der Gensequenz überprüft werden. An Methoden wurden hierzu sowohl verschiedene Polymerasekettenreaktionstechniken als auch die

Methode des „Southern Blots“ gewählt. Des Weiteren sollte mittels Vergleich der DNA-Sequenzen von *roh* in den verschiedenen klinischen Isolaten der Konservierungsgrad des Genabschnitts bestimmt und somit Hinweise auf die funktionelle Relevanz des Faktors gewonnen werden. Anschließend wurde ein Plasmid, mit dessen Hilfe *roh* überexprimiert werden konnte, generiert. Nach Transformation in Wildtyp-Bakterien sollten veränderte Resistenz gegenüber typischerweise durch bakteriellen Efflux eliminierte Substanzen wie Cipro-, Nor-, Moxifloxacin, Chloramphenicol, Doxycyclin und Lösungsmitteln provoziert. Hiermit würden Grundlagen für die Betrachtung des putativen Transkriptionsfaktors *roh* als Herausforderung für klinische Infektionstherapie geschaffen werden. Im Rahmen von Vorarbeiten der Arbeitsgruppe Linde wurde gezeigt, dass *roh* zumindest in den ursprünglich betrachteten Bakterienstämmen in unmittelbarer Nähe des Operons einer Cadmium-Pumpe lokalisiert ist. Ebenfalls mittels Überexpression von *roh* sollte nach Unterschieden in der Resistenz gegenüber Cadmium-Ionen geforscht werden. Somit könnte die Regulation von Antibiotikaefflux mit erworbener bakterieller Widerstandsfähigkeit gegenüber Umweltgiften wie Schwermetallen in Verbindung gebracht werden.

C Materialien und Methoden

C 1 Materialien

C 1.1 Organismen

Die verwendeten Bakterienstämme entstammten der Routinediagnostik des Institutes für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene der Universität Regensburg. Zusätzliche für Southern Blot-Versuche und Experimente zur Abklärung phylogenetischer Zusammenhänge verwendete *Enterobacter cloacae*-Stämme wurden freundlicherweise von H. Hoffmann (Ludwig Maximilian Universität, München) zur Verfügung gestellt ³⁹. Einen Überblick über die verwendeten Bakterienstämme bietet die Tabelle 11 im Abschnitt „F Anhang“.

C 1.2 Kits

Für Standardverfahren der DNA-Manipulation wurden kommerziell verfügbare Kits entsprechend der Tabelle 1 verwendet.

Tabelle 1: Übersicht benutzte Kits

Kit	Verwendung	Hersteller
Qiaprep® Spin Miniprep kit	Plasmidisolierung	QIAGEN, Hilden
NucleoSpin® Plasmid Quick Pure	Plasmidisolierung	MACHERY-NAGEL
Qiafilter™ Plasmid kit	Plasmidisolierung	QIAGEN, Hilden
Qiaquick® PCR Purification kit	Aufreinigung DNA-Fragmente aus PCR oder Restriktionsverdau	QIAGEN, Hilden
Qiaquick® Gel Extraction kit	DNA-Extraktion aus Agarosegel	QIAGEN, Hilden
Dneasy® Tissue kit	Isolierung DNA, genomisch	QIAGEN, Hilden
TOPO® Cloning 5-minute PCR Cloning kit	Subklonierung von PCR-Produkten	Invitrogen, Karlsruhe

C 1.3 Enzyme

NEB, Frankfurt/Main, lieferte die benutzten Restriktionsenzyme und die entsprechenden Puffer.

C 1.4 Antibiotika

Ampicillin wurde von Sigma-Aldrich (Steinheim), Kanamycin von Merck (Darmstadt) bezogen. Für die eingesetzten Konzentrationen und Mengen sei auf die einzelnen Versuchsbeschreibungen verwiesen. Die Herstellung erfolgte nach Korrektur für den Anteil der aktiven Substanz.

C 1.5 Plasmide

Das Plasmid pCR4®-TOPO® wurde von Invitrogen erworben. Es wurde als Klonierungsvektor im ebenfalls von Invitrogen erhältlichen Topo® Cloning Kit (s.o.) eingesetzt und enthält eine Ampicillin- wie auch eine Kanamycin-Resistenzkassette und einen *lacZα-ccdB*-Promoter. Das Plasmid für die Überexpression von *roh*,

pUC19, stellte NEB bereit. Es enthält ebenfalls eine Ampicillin-Resistenzkassette und einen *lacZ*-Promotor („*lacPr*“).

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

C 1.6 Lösungen

Tabelle 2 zeigt die in dieser Arbeit verwendeten Lösungen, soweit sie nicht im Rahmen der einzelnen Versuchsbeschreibungen erwähnt sind.

Tabelle 2: Übersicht Lösungen

Ethidiumbromid (Gebrauchslösung)	5 mg/ml	
Lysozym	100 mg/ml in DEPC-H ₂ O	
Protease K	20 mg/ml	
SDS (Stammlösung)	10 mg/ml	
Loading Dye 6×	Saccharose	40 %
	Bromphenolblau	0,25 %
	Xylencyanol	0,25 %
TBE (Stammlösung 10×	Tris	128 g
	Borsäure	55 g
	0,5M EDTA (pH 8)	20 ml
	ad 1l mit H ₂ O bidest auf pH 8,3	
TBE (Gebrauchslösung 0,5×	Stammlösung 1:20	
TE	Tris HCL (pH 8)	0,6 g
	EDTA	0,185 g
	ad 50 ml mit H ₂ O bidest	
	auf pH 8,0	
6× Ladepuffer	60 mM EDTA	
	0,25 % Bromphenolblau	
	30 % Glycin	

Zur Herstellung der für Southern Blot-Techniken benötigten Lösungen wurde entsprechend den im „DIG Application Manual for Filter Hybridisation“ von Roche Molecular Biochemicals empfohlenen Zusammensetzungen verfahren.

C 1.7 Nährmedien

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

Genutzt wurden:

Luria-Bertani-Medium (LB),

flüssig/fest; mit oder ohne entsprechend der nachfolgenden Beschreibungen
hinzugefügten antimikrobiellen Substanzen

Mueller-Hinton-Medium

C 1.8 Primer und DNA-Marker

In der Tabelle 3 wurden die verwendeten Primer mit Nummer (= Name), Sequenz, Zielgen und Schmelztemperatur aufgelistet.

Tabelle 3: Übersicht Primer

Nummer	Sequenz	Ziel	T _m [°C]
239	5'-ATGAAATCTATGCGACTGC-3'	<i>pollut</i>	56,9
240	3'-ACTGACTGTTCCGGGTAGC-5'	<i>pollut</i>	55,6
300	5'-CGACCTTGCGAGAGAAAT-3'	<i>gyrA</i>	53,7
301	3'-GTTCCATCAGCCCTTCAA-5'	<i>gyrA</i>	53,7
441	5'-TTAATGGATGATGACCTGC-3'	<i>roh</i>	45,2
479	3'-TAATAGTGGCATACGGTTCC-5'	<i>roh</i>	47,0
536	5'-GGTGTACTGGAATGGTTGG-3'	<i>roh</i>	49,2
547	3'-GAGTAGTGAGCCGAGATTAGC-5'	<i>roh</i>	47,8
641	5'-ATGATCACAAAACGTATGCG-3'	<i>roh</i>	50,4
642	3'-GGAGAATTTACAAATGTTAATTAA-5'	<i>roh</i>	49,0
788	5'-TCAATGATGGAAAGCAAGTG-3'	<i>roh</i>	48,4
1047	5'-CATCTAGAGCGGTTTTATGGACAGCAAGCG-3'	<i>kana</i>	66,8
1078	3'-CCCTCCATTACTGTTAGAACATGAGGAG-5'	<i>roh</i>	58,6
1079	5'-CTACTTTACTTGTGGAGG-3'	<i>roh</i>	35,8
1080	3'-CCGTAAACAAATCGCCTGGG-5'	<i>roh</i>	56,7
1081	3'-CTGGCTATTCTCGATGGC-5'	<i>roh</i>	47,8
1157	3'-CCGCTCATGAGACAATAACCCTGTCTAGATG-5'	<i>kana</i>	64,5

T_m: Schmelztemperatur

forward-Primer in der Orientierung 5'⇒3'

reverse-Primer in der Orientierung 3'⇒5'

C 1.9 Computerprogramme

Geschrieben wurde diese Arbeit inklusive der Diagramme und Vektorenschemata mit Hilfe von Microsoft® Office® (incl. der Programme Word®, Excel® und PowerPoint®) in den Versionen 2000 und 2007 auf Microsoft® Windows® 98, XP und Vista®. Das Literaturverzeichnis wurde mit Endnote 7 der Firma Thompson™ erstellt. Literaturrecherche erfolgte mittels der Onlinedatenbank PubMed von NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/PubMed/>). Zur Analyse der DNA-Sequenzdateien wurde Lynnon BioSoft DNAMan Version 5.2.9., DNASTar SeqMan™ II und EditSeq™ sowie Lasergene 7 von DNASTar in einer Demoversion der Version 7.2.1 genutzt. An „online“ verfügbaren Programmen wurden die Sequenzbearbeitungsprogramme der „BLAST“-Seite von NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) sowie die HUSAR-Programmsammlung (<http://genome.dkfz-heidelberg.de/menu/biounit/>) des „Deutschen Krebsforschungszentrums“ in Heidelberg genutzt. Fotodateien und Schemata wurden mit Adobe Photoshop Elements 2.0 bearbeitet.

C 1.10 Geräte

Die folgenden Geräte wurden benutzt:

- Centrifuge 5417 R / Eppendorf
- Universal 30 RF (Zentrifuge) / Hettich
- Medifuge 15000 / Heraeus Sepatech
- Thermomixer comfort / Eppendorf
- PTC 200 Peltier ThermalCycler / MJ Research
- Gene Pulser[®] und Küvetten / Biorad
- Elektrophoresekammern / Mechanische Werkstatt der Universität
Regensburg Microcomputer Electrophoresis Power Supply E425 / Consort
- UV-Schirme ($\lambda = 312 \text{ nm}$) / Bachhofer
- UPP-110HP Type II High Density Printing Paper / Sony
- EOS 300D / Canon
- Ultraspec 1000 / Pharmacia Biotech
- VITEK Colorimeter / Firma bio Meriêux Vitek

C 1.11 Chemikalien und Plastikartikel; sonstiges

Folgende Firmen lieferten die einzelnen Chemikalien:

Eppendorf, Roche, NEB, Sigma-Aldrich, Merck, GibcoBRL, AppliChem, J.T. Baker, Oxoid, Roth und USB Corporation. Plastikwaren und restliche Hilfsmittel wurden von Greiner Bio-One, Falcon/Becton Dickinson, Sarstedt, Roth, Eppendorf oder Biozym erworben. Bis auf diejenigen Chemikalien, Plastikartikel oder sonstigen Hilfsmittel, die bereits steril geliefert wurden, wurden vor Nutzung alle bei 120°C / 2 bar

autoklaviert oder mittels Sterilfiltration (Porendurchmesser 0,45 µm, Roth, Karlsruhe) filtriert.

C 2 Molekularbiologische Methoden

C 2.1 DNA-Manipulationen

C 2.1.1 Isolierung genomische DNA („gDNA“)

C 2.1.1.1 Mini-Präparation

Zunächst wurde von den jeweils benötigten Stämmen eine Flüssigkultur hergestellt. Hierzu wurden mittels einer Einmalimpföse eine Kolonie eines Drei-Ösen-Ausstrichs in 7,5 ml flüssiges LB-Medium überimpft und bei 37 °C in einem Schüttler, der auf 200 Umdrehungen pro Minute eingestellt war, über Nacht bebrütet. Die Isolation selbst erfolgte dann entsprechend der Beschreibung auf den Seiten 27 und folgend 17ff des Handbuchs (05/2002), welches dem „Dneasy® Tissue“-Kit des Herstellers QIAGEN beilag.

C 2.1.1.2 Midi-Präparation

Für die Durchführung der Southern Blot-Versuche wurde eine wesentlich höhere Konzentration an isolierter DNA benötigt, als mit der oben beschriebenen Methode der Mini-Präparation zu erhalten war. Die nun benötigten Säulen, Puffer und Lösungen wurden dem „DNeasy®Tissue“-Kit sowie dem „Qiafilter™ Plasmid Midi“-Kit entnommen.

Als erstes wurde zum Puffer B1 die RNase A pipettiert, so dass eine Endkonzentration von 200 g/ml zustande kam. Für die Flüssigkulturen der Stämme, von denen Southern Blot-Versuche durchgeführt werden sollten, wurde wiederum übernacht bei 37 °C im Schüttler (200 U/min) ein LB-Flüssigmedium beimpft und bebrütet. Von diesen Bakteriensuspensionen wurden dann 3 bis 6 ml für 5 bis 10 Min. bei 4 °C mit 5.000 U/min durch Zentrifugation geerntet. Nachdem der

Überstand verworfen worden war, wurde das verbliebene Bakterienpellet in 3,5 ml des wie oben beschrieben präparierten B1-Puffers resuspendiert sowie durch Hinzupipettieren von 80 µl Lysozym (100 mg/ml) und 100 µl Protease für mindestens 30 Min. bei 37 °C lysiert. Nach der folgenden Zugabe von 4 ml Puffer B2 wurde durch Vortexen gemischt. Der Ansatz musste nun, bis das Lysat aufklarte, für wenigstens 30 Min. bei 50 °C inkubiert werden. Währenddessen wurde eine der Anzahl der bearbeiteten Stämme entsprechende Menge an Säulen mit je 4 ml QBT-Puffer äquilibriert. Auf diese wurde dann jeweils das Lysat aufgetragen und zweimal mit je 4,5 ml QC-Puffer gewaschen. Um die DNA zu eluieren, wurde 5 ml QF-Puffer benutzt. Gefällt wurde die DNA darauf mit 3,5 ml Isopropanol. Nachdem die DNA bei 4 °C für 30 Min bei mehr als $15.000 \times g$ abzentrifugiert wurde, wurde das erhaltene Pellet mit 2 ml kalten Ethanol gewaschen und unter einem Laminar-Flow getrocknet. Die Lösung der DNA wurde mit 0,1 ml TE-Puffer entweder über Nacht bei Raumtemperatur oder für eine bis zwei Stunden bei 55 °C durchgeführt.

Zum Schluss wurde die Konzentration der DNA wie in C 2.1.3 beschrieben bestimmt.

C 2.1.2 Reinigung von DNA und PCR-Fragmenten

Mittels des „Qiaquick® PCR Purification“-Kits von Qiagen wurden PCR-Produkte gereinigt, um für Restriktionsverdau, Klonierungsversuche sowie Sequenzanalysen zur Verfügung zu stehen. Die Vorgehensweise entsprach dabei dem Protokoll von Qiagen (Handbuch Seite 18). Als endgültige Eluationsmenge an EB-Puffer wurden standardmäßig 30 µl verwendet.

C 2.1.3 Konzentrations- und Reinheitsgradbestimmung der DNA

Die Konzentration von DNA wurde durch photometrische Messung bei Wellenlängen von $\lambda = 260 \text{ nm}$ und $\lambda = 280 \text{ nm}$ mit einem Spektrometer der Firma Hellma, Jena, untersucht. Die Proben wurden in einer Quarzglasküvette mit einer

Schichtdicke von 10 mm untersucht. Mit der Formel „optische Dichte von 1 bei $\lambda = 260 \text{ nm}$ entspricht $50 \mu\text{g DNA}$ “ wurde auf die jeweilige DNA-Konzentration rückgerechnet. Zur Abschätzung der Reinheit der DNA wurde der Quotient der Werte bei $\lambda = 260 \text{ nm}$ und $\lambda = 280 \text{ nm}$ pro jeweiliger Probe berechnet. Lag das Ergebnis zwischen 1,7 und 1,9, so wurde vom Vorliegen annähernd reiner DNA ausgegangen.

C 2.1.4 Gelelektrophorese

Zur Bestimmung der ungefähren Größe von DNA-Fragmenten wurde das Verfahren der Gelelektrophorese benutzt. Hierfür wurden Agarosegele hergestellt, deren Trennvermögen durch Variation der Konzentration der Agarose von 0,8 % w/v für Fragmente größer als 3 kb bis zu 2 % w/v für kleinere Stücke angepasst wurde. Als Lösungsmittel für die Agarose wurde $0,5 \times \text{TBE-Puffer}$ mit $0,5 \mu\text{g/ml}$ Ethidiumbromid verwendet. Standardmäßig wurden jeweils 50 ml der oben beschriebenen Lösung aufgekocht und in mit Kämmen für die Schaffung der zur Einbringung der Proben benötigten Aussparungen versehenen Gelkammern gegossen. Nach der Auspolymerisation der Gele wurden diese mit $0,5 \times \text{TBE-Puffer}$ überschichtet. Die Proben wurden zuerst zu je 5 Teilen Probe mit 1 Teil $6 \times$ „loading dye“ versehen und dann zusammen mit einem zur erwarteten Fragmentgröße passenden DNA-Längenstandard aufgetragen. Verwendung fanden der „DNA molecular weight marker“ VII (von 359 bis 8.576 bp) und VIII (von 67 bis 1.114 bp) der Firmen Roche sowie der mit Digoxigenin (DIG) markierte Längenstandard III der Firma Roche für Southern Blot Experimente. (Abbildungen 2, 3 und 4)

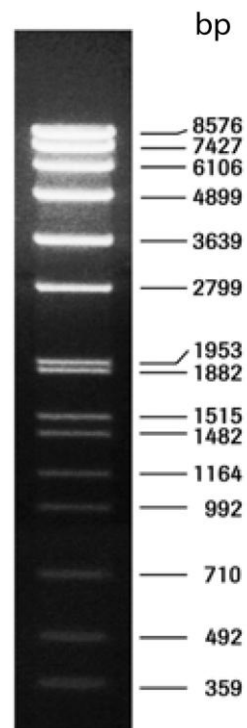


Abb. 2:
„DNA Molecular Weight Marker“ VII (1 % Agarosegel); mod. nach ⁴⁰

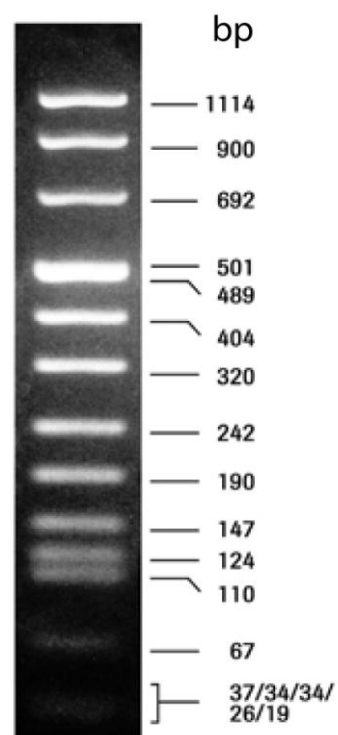


Abb. 3:
„DNA Molecular Weight Marker“ VIII (2 % Agarosegel); mod. nach ⁴¹

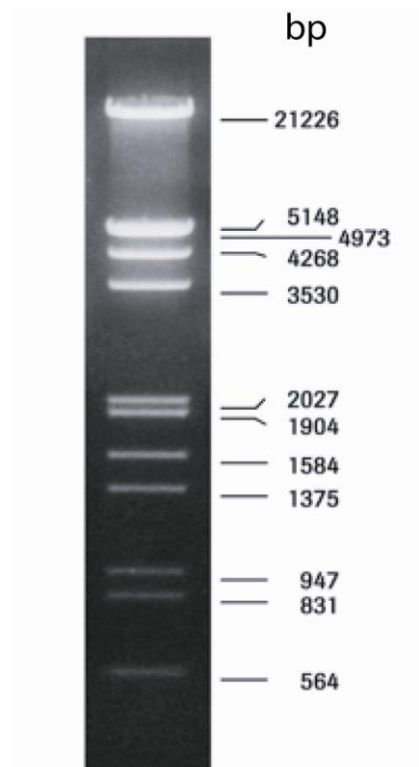


Abb. 4: „DNA Molecular Weight Marker“ III (1 % Agarosegel); mod. nach ⁴²

Die Dokumentation erfolgte durch Abfotografieren der Gele unter UV-Licht mit $\lambda = 312 \text{ nm}$. Für Southern Blot-Experimenten mussten alternative Bedingungen gewählt werden, da sie durch die hohe Energie der Standardbelichtung negativ beeinflusst worden wären. (Zur Dokumentation dieses Verfahrens siehe Abschnitt über Southern Blots C 2.2). Auch für die Extraktion und Weiterverarbeitung von DNA-Fragmenten wurde die Apparatur aus diesem Grund nicht benutzt. Anstatt dessen erfolgte eine Beurteilung unter langwelligem UV-Licht niedrigerer Energie.

Während des gesamten Vorgangs war auf die Mutagenität des verwendeten Ethidiumbromids zu achten.

C 2.1.5 Gelextraktion aufgetrennter DNA-Fragmenten

Damit nach der Auftrennung weitere Versuche mit den DNA-Fragmenten durchgeführt werden konnten, wurden diese wieder aus dem Auftrennungs-Gel extrahiert. Gewonnen wurden die Fragmente mittels des „Qiaquick® Gel Extraktion“-

Kits der Firma Qiagen. Die Vorgehensweise entsprach dabei dem auf Seite 23f des mitgelieferten „Qiaquick® Spin Handbook“ (07/2002) beschriebenen Protokoll. Die Eluation der DNA aus der Säule im Schritt 13 erfolgte statt mit 50 µl mit nur 30 µl, um die Konzentration zu erhöhen.

C 2.1.6 Polymerase-Ketten-Reaktionen (PCR)

C 2.1.6.1 „Standard“

Im Folgenden soll nun beschrieben werden, wie die PCR-Reaktionen im Normalfall bewerkstelligt wurden. Als gebrauchsfertig erhältliche Zusammenstellung von hitzestabiler DNA-Polymerase aus *Thermophilus aquaticus*, Nukleotiden und Puffern wurde der „2,5 × PCR MasterMix“ der Firma Eppendorf, Hamburg, benutzt.

In je ein 0,2 ml Reaktionsgefäß wurde pro Reaktion der folgende Ansatz pipettiert:

<i>template</i>	1 µl
2,5 × PCR MasterMix	20 µl
<i>primer forward</i> (100 mM)	1 µl
<i>primer reverse</i> (100 mM)	1 µl
H ₂ O	27 µl
<hr/>	
Gesamt:	50 µl

Als Template wurde die zu untersuchende gDNA oder Plasmid-DNA eingesetzt.

Der Ansatz wurde nun in einen „Thermal Cycler“ eingesetzt, welcher nach folgendem Programm arbeitete:

Denaturierung	94 °C	(5 Min.)
30 Zyklen von:		
Denaturierung	94 °C	(1 Min.)
<i>annealing</i>	x °C	(1 Min.)
Elongation	72 °C	(y Min.)
Abschließende Elongation	72 °C	(7 Min.)
Aufbewahrungsphase	4 °C	(kontinuierlich)

Die DNA-Polymerase wurde durch den ersten Denaturierungsschritt aktiviert. Die *annealing*-Temperatur x wurde abhängig von der Schmelztemperatur T_m der Primer sowie der Verhinderung oder Ermöglichung unspezifischer Bindungen zwischen Primer und DNA zwischen 50 und 55 °C gewählt. Die Elongationszeit y errechnete sich daraus, dass pro 1 kb Länge des erwünschten PCR-Produktes 1 Min. veranschlagt wurden. Im letzten, 7 Min. dauernden Elongationsschritt produziert die DNA-Polymerase die für spätere Klonierungsschritte nötigen Adenosin-Überhänge an den PCR-Fragmenten.

C 2.1.6.2 „touch down“-PCR

Für den Nachweis nicht vollständig mit der jeweiligen Primersequenz übereinstimmender DNA-Bereiche wurde diese Abwandlung des normal gebräuchlichen PCR-Protokolls verwendet. Die Vorgehensweise unterscheidet sich von der unter C 2.1.6.1 beschriebenen in der Programmierung des Thermal Cyclers.

Die erste Version lautete wie folgt:

Denaturierung	94 °C (5 Min.)
15 Zyklen	
Denaturierung	94 °C (1 Min.)
<i>annealing</i>	54 °C (1 Min.)
Elongation	72 °C (<i>y</i> Min.)
15 Zyklen	
Denaturierung	94 °C (1 Min.)
<i>annealing</i>	52 °C (1 Min.)
Elongation	72 °C (<i>y</i> Min.)
15 Zyklen	
Denaturierung	94 °C (1 Min.)
<i>annealing</i>	50 °C (1 Min.)
Elongation	72 °C (<i>y</i> Min.)
Elongation	72 °C (7 Min.)
Aufbewahrungsphase	4 °C (kontinuierlich)

Die Elongationszeit *y* wurde, wie in C 2.1.6.1 beschrieben, bei 1 Min. je 1 kb PCR-Fragment-Länge gewählt.

Die zweite Version unterschied sich nur dadurch von der ersten, dass anstelle von je 15 Zyklen pro Temperaturschritt nur 10 gewählt wurden, da so die falsch positiven Hintergrundreaktionen vermindert werden konnten. Wann welches Protokoll benutzt wurde, wird im Abschnitt „D Ergebnisse“ gesondert erwähnt.

Bei der Erstellung der Protokolle wurden Arbeiten von R.H. Don et al.⁴³, K.H. Roux et al.⁴⁴ und K.H. Hecker et al.⁴⁵ berücksichtigt.

C 2.1.7 Sequenzierung

Für Sequenzanalysen wurden die Reaktionsansätze mit 100 ng DNA (Plasmid oder PCR-Produkt), 100 pg Primer und H₂O bis zu einem Gesamtvolumen von 8 µl der Firma GeneArt, Regensburg, übergeben. Das Programm SeqMan™ II wurde zur Auswertung der erhaltenen Daten benutzt.

C 2.2 Southern Blot

C 2.2.1 Verdau

Um die nach dem in C 2.1.1.2 vorgestellten Protokoll gewonnene gDNA in einzelne Fragmente mit Längen von ungefähr 2–3 kb aufzuspalten, musste sie einem Verdau mit zwei Restriktionsenzymen unterzogen werden.

Hierzu wurde folgender Ansatz erstellt:

gDNA	1-2 µg gDNA (entspricht ca. 40 µl)
<i>Sph</i> I (NEB)	2,5 µl
<i>Hind</i> III	2,5 µl
Puffer 2 (NEB)	5 µl
<hr/>	
Gesamt	50 µl

Es folgte ein Inkubationsschritt über 14 h bei 37 °C.

C 2.2.2 Herstellung einer Digoxigenin (DIG)–markierten Sonde

Zur Herstellung der für das anschließende Detektionsverfahren benötigten Sonde wurde eine PCR mit zum Teil DIG-markierten Thymidin durchgeführt.

Der Ansatz für eine Reaktion lautete:

gDNA von <i>E. cloacae</i> # 1919	1 µl
dATP (2 mM)	1 µl
dCTP (2 mM)	1 µl
dGTP (2 mM)	1 µl
dTTP (2 mM)	0,75 µl
DIG-dTTP (25 nmol/µl)	2,5 µl
Puffer (10 x)	5 µl
Taq-Polymerase	0,25 µl
<i>primer forward</i> (100 mM)	1 µl
<i>primer reverse</i> (100 mM)	1 µl
H ₂ O	35,5 µl
<hr/>	
Gesamt	50 µl

Der Ansatz wurde in einen Thermalcyclor eingesetzt, der nach folgendem Schema programmiert war:

Denaturierung	94 °C	(5 Min.)
30 Zyklen von:		
Denaturierung	94 °C	(1 Min.)
<i>annealing</i>	55 °C	(1 Min.)
Elongation	72 °C	(2 Min.)
Abschließende Elongation	72 °C	(7 Min.)
Aufbewahrungsphase	4 °C	(kontinuierlich)

Die Reinigung der Sonde erfolgte durch Gelextraktion nach C 2.1.5, wobei ein Gel mit 1 % w/v Agarose, dem „DNA molecular weight marker“ VIII von Roche und 50 µl Eluationsvolumen verwendet wurden. Die so erhaltene Sonde wurde bei —20 °C aufbewahrt und musste vor Benutzung zum Southern Blotting noch 10 Min.

aufgekocht sowie unmittelbar anschließend auf Eis gelagert werden, um als DNA-Einzelstränge verfügbar zu sein.

C 2.2.3 Durchführung eines „Dot Blot“

Mittels des „Dot Blot“-Verfahrens wurde die Spezifität und Sensitivität der Sonde überprüft. Zunächst wurden entsprechende, korrespondierende Genabschnitte durch PCR amplifiziert. Die Konzentrationen der entstandenen Amplifikate wurden durch photometrische Messungen nach C 2.1.3 bestimmt. Folgend wurden definierte Verdünnungen mit 100 ng, 10 ng, 1 ng, 100 pg sowie 10 pg der PCR-Fragmente in 10 µl H₂O erstellt. Je 10 µl der Verdünnungslösungen wurden in einer Reihe pro zu untersuchendem Genabschnitt auf eine positiv geladene Nylonmembran aufgetragen und dann in einem „UV-Stratalinker“ im „Autocrosslinking“-Modus bei 1.200×100 µJoules mit UV-Licht bestrahlt. Dadurch wurden die Proben-DNA auf der Nylonmembran fixiert. Die Membran wurde nun aufgerollt und in ein Falcon-Tube verbracht. Im Rahmen einer „Prähybridisierungsphase“ wurden 5 ml Hybridisierungspuffer hinzugegeben. Die Membran inkubierte nun 1 h bei 42 °C. Während dessen wurde die Sonde wie in C 2.2.2 beschrieben für den Versuch vorbereitet. Nach dem Abgießen des Puffers wurde die in 5 ml Hybridisierungspuffer mit einer Konzentration von 100–200 ng/ml gelöste Sonde zugefügt. Die eigentliche Hybridisierung folgte während einer erneuten Inkubation bei 42 °C über Nacht. Am nächsten Tag wurde der Überstand mit gelöster Sonde abgekippt und für spätere Versuche bei –20 °C aufbewahrt. Die im Folgenden erwähnten Puffer wurden nach jedem Schritt wieder verworfen. Die „Detektionsphase“ begann mit einem ersten Waschschrift, bei dem zweimal mit 5 ml $2 \times \text{SSC} / 0,1 \%$ SDS-Puffer über 5 Min. bei Raumtemperatur inkubiert wurde. Der anschließend zweifach durchgeführte zweite Waschschrift bestand in einer Inkubation bei 68 °C über 15 Min. mit 5 ml $0,1 \times \text{SSC} / 0,1 \%$ SDS-Puffer. Die folgenden Bebrütungsschritte wurden alle, falls nicht anders vermerkt, bei Raumtemperatur durchgeführt, die dabei verwendeten

Puffer nach den Schritten abgegossen. Zur Verhinderung weiterer, eventuell unspezifischer Sondenbindungen wurde nun die Membran zweimal für 15 Min. mit je 5 ml „Blocking“-Puffer versehen. Um dann den Kernschritt der Antikörperbindung durchzuführen, wurden die Dot-Blots mit 5 ml eines je 1 µl der Anti-Digoxigenin-Antikörper-Lösung von Roche enthaltenden Konjugatpuffers (entsprechend einer Verdünnung von 1:5.000) über 60 Min. behandelt. Nach wiederum zweimaligen Waschschritten über jeweils 15 Min. mit je 5 ml Waschpuffer und nachfolgend der Äquilibration der Blots über 2–5 Min. mit 5 ml des Assay-Puffers konnte schließlich eine Detektionsreaktion durchgeführt werden. Mittels der Erkennungsreaktion sollten die entstandenen Antigen-Antikörperreaktionen sichtbar gemacht werden. Zunächst wurde 3 ml CSPD/Assay-Puffer-Verdünnung (6 µl CSPD in 3 ml Assay-Puffer; entsprechend einer Verdünnung von 1:500) für 5 Min. im Dunkeln hinzugegeben. Nach Abtropfen wurde das Membranstück in noch feuchtem Zustand in eine Plastikfolie verbracht. Durch die nun stattfindende Chemilumineszenzreaktion konnte Lichtstrahlung emittiert werden. Als Verschiebeschutz wurde die Folie mit Klebeband in einer Röntgenkassette fixiert. In der Dunkelkammer wurde ein Röntgenfilm zwischen 15 Min. und 24 h bei 37 °C der Lichtemission ausgesetzt. Der Film wurde an den Stellen geschwärzt, an denen durch die Bindung der Digoxigenin-markierten Sonde eine lichterzeugende Reaktion stattgefunden hatte. Die Schwärzung konnte somit eine eventuell erfolgte Bindung der Sonde an die aufgetragenen PCR-Produkte nachweisen. Nach Entwicklung der Röntgenfilme wurden die Membranen in den Folien bei –20°C eingefroren. Für erneute Untersuchungen konnten die Blots im Rahmen des sogenannten „Blot-Strippens“ für erneute Untersuchungen wiederaufbereitet werden. Zur Ablösung der Sonde wurde die Membran für 10 Min. in aufgekochtem 0,1 %igem SDS inkubiert. Eine Kontrolle für die noch auf der Blot-Membran haftende DNA konnte mit einer Methylenblaufärbung gemacht werden. Vor erneuter Hybridisierung eventuell noch gebundene „alte“ Sonde musste mittels einer erneuten, wie oben beschrieben

durchgeführten Detektion ausgeschlossen werden. Dem Vorgehen lagen Beschreibungen im „DIG Application Manual for Filter Hybridization“ von Roche Molecular Biochemicals zugrunde.

C 2.2.5 Durchführung eines Kapillarblots



Abb. 5: Apparatur für Kapillarblot

Das zu blottende Gel wurde auf eine mit Transportpuffer getränkte Papierbrücke gelegt. Auf dem Gel wurde eine Nylonmembran platziert. Den oberen Abschluss bilden Filterpapiere und Einmalhandtücher aus Papier, durch deren Sogwirkung Puffer mit zu blottenden DNA-Fragmenten vom Gel auf die Membran gebracht wird. Die Fixierung der Apparatur erfolgte mittels an Stangensystemen befestigter Bechergläser. (vgl. Text, Abbildung 6)

Die hierbei vollzogenen Wasch-, Konjugations-, Blockierung- und Entwicklungsschritte gleichen den in C 2.2.4 beschriebenen Vorgängen. Der Unterschied besteht nur darin, dass jetzt nicht direkt die nachzuweisenden DNA-Lösungen auf die Membran aufgebracht werden, sondern die mittels einer bestimmten Kombination von Restriktionsenzymen fragmentierten und durch Gelelektrophorese aufgetrennten DNA der zu untersuchenden Bakterien. Der

erwähnte Restriktionsverdau erfolgte nach Punkt C 2.2.1. Die erhaltene, nun in Stücken mit je circa 2 bis 3 kbp Länge vorliegende bakterielle DNA musste darauf noch in einem Agarosegelelektrophoreseschritt (vgl. C 2.1.4) aufgetrennt werden. Damit später auf dem Röntgenfilm auch ein Größenstandard sichtbar war, wurde in der elektrischen Auftrennung 50 µg des Digoxigenin-markierten „DNA molecular weight markers“ III der Firma Roche/Böhringer verwandt. Als Vorbereitungsschritte für den Blot wurden die Gele daraufhin zunächst 20 Min. mit vorbereitetem Denaturierungspuffer bedeckt und bei Raumtemperatur mäßig geschüttelt. Die Agarosegele wurden für 20 Min. in Neutralisierungspuffer und bei Raumtemperatur ebenfalls unter geringem Schütteln bebrütet. Nun wurde der im obigen Foto (vgl. Abbildung 5) dokumentierte Aufbau zur Durchführung des eigentlichen Kapillarblots wie nachfolgend beschrieben aufgebaut. Zunächst wurde ein ausreichend großes Styroporbehältnis circa 1 cm hoch mit Transportpuffer befüllt. Eine quaderförmige Plastikschiene wurde in der Mitte des Behälters mit dem Boden nach oben platziert. Als Leitungsmedium für den Puffer wurden vier Filterpapierstreifen von der Breite eines Gels und ausreichender Länge so auf die Plastikschiene gelegt, dass die beiden überhängenden Enden des Papiers in die Flüssigkeit eintauchten. Hierbei war darauf zu achten, dass zum einen die Streifen vorher in $20 \times \text{SSC}$ getränkt wurden und zum anderen zwischen ihnen beim Auflegen keine Luftblasen zurück blieben. Das nach obiger Anleitung vorbereitete Gel wurde mit der Auftragsseite nach unten auf die Konstruktion gesetzt. Darüber wurde die in H_2O getränkte positiv geladene Nylonmembran gelegt, auf welche die DNA gesogen werden sollte. Den Abschluss nach oben bildeten vier weitere Lagen getränkten Filterpapiers gefolgt von einem ausreichenden Stapel saugfähiger Papiertücher. Um zu verhindern, dass durch Überlappung Flüssigkeit an Gel oder Membran vorbei transportiert wurde, waren zum einen diese beiden Schichten mit den Abmaßen eines Gels geschnitten und zum anderen Membran und Gel durch das seitliche Anbringen von Parafilmstreifen gesichert. Auch mussten die Papiertücher zum Aufbau der

Sogwirkung trocken sein. Zur Verhinderung etwaiger Instabilitäten dieses Aufbaus wurde, wie auf dem oben angefügten Foto illustriert, die gesamte Apparatur mithilfe eines an einem Metallständer befestigten Messkolbens eingespannt. Ein Schema des beschriebenen Aufbaus zeigt Abbildung 6.

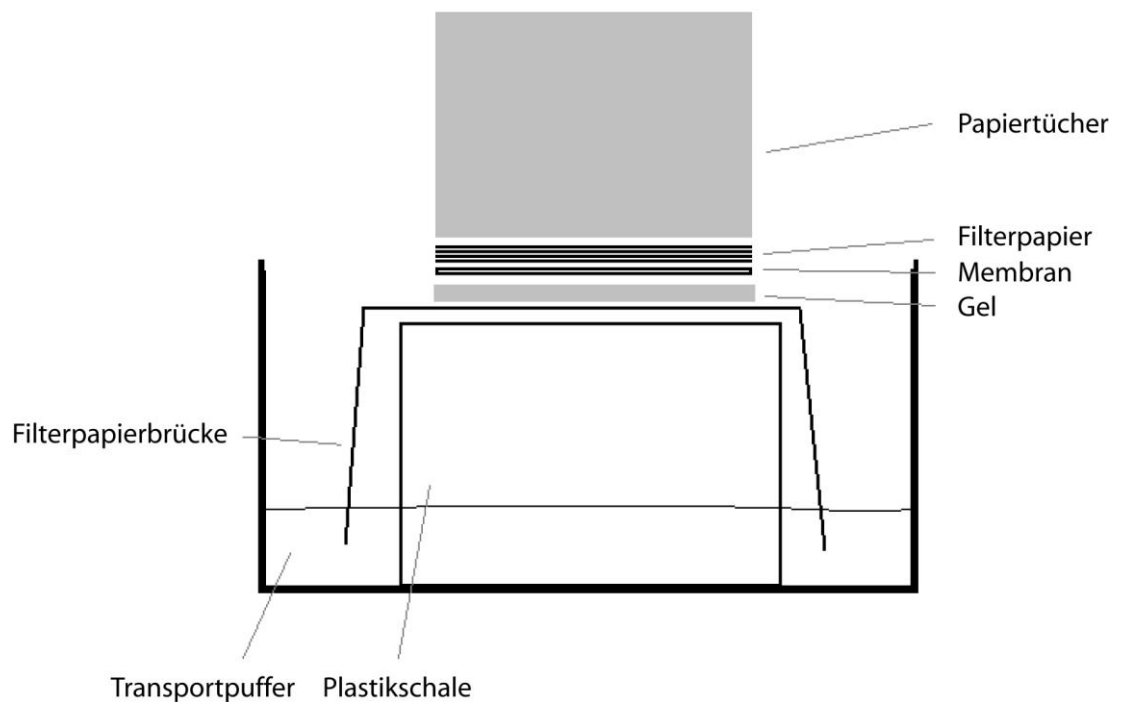


Abb. 6: Schema Aufbau Kapillarblot

Auf ein mit Transportpuffer getränktes Filterpapier wurde das zu blottende Gel gelegt. Eine Nylonmembran wurde über dem Gel platziert. Nach oben hin abschließend wurden Filterpapiere und Papiertücher angefügt. Die Sogwirkung der Papiere beförderte Puffer mit zu blottenden DNA-Fragmenten vom Gel auf die Membran. (vgl. Text, Abbildung 5)

Geblottet wurde über Nacht bei Raumtemperatur. Währenddessen wurden die DNA-Fragmente einschließlich des Größenstandards auf die Membran transferiert. Am nächsten Tag wurde die DNA mittels des „UV-Stratalinker“ im Autocrosslinking-Modus bei $1200 \times 100 \mu\text{Joules}$ mit UV-Licht auf der Nylonmembran fixiert. Die aufgerollte Membran wurde in ein 50 ml Falcon-Tube gegeben. Die folgenden

Schritte glichen den bereits unter C 2.2.4 „Durchführen eines Dot-Blots“ ab dem Stichwort „Prähybridisierungsphase“ erwähnten. Das beschriebene Vorgehen basierte auf dem „DIG Application Manual for Filter Hybridization“ von Roche Molecular Biochemicals.

C 2.3 Klonierung

C 2.3.1 Herstellung elektrokompetenter Zellen

Zuerst mussten sowohl 10 % Glycerin als auch H₂O in ausreichender Menge eisgekühlt vorbereitet werden. Der erste Schritt zur Herstellung elektrokompetenter Zellen für die nachfolgenden Schritte der Transformation mittels Elektroporation begann damit, dass aus einer frischen Übernachtskultur der gewünschten Bakterien eine Kolonie in 100 ml LB-Medium überimpft wurde. Diese Flüssigkultur wurde dann kurzfristig mittels Photometerproben in ihrem Wachstum unter Schütteln bei 37 °C überprüft. Als die optische Dichte bei einer Wellenlänge von 578 nm 0,5 erreicht hatte, wurde die Bakterienkultur für 20 Min. auf Eis platziert. In vorbereitete 2ml-Cups wurden die Bakterien aus 2 ml der Zellsuspension bei 4.500 U/min abzentrifugiert. Der Sammelschritt wurde unter Verwerfen des jeweiligen Überstandes zweimal wiederholt, so dass das Pellet von 6 ml der Bakterienkultur zur Weiterverarbeitung genutzt werden konnte. Es folgte ein zweifacher Waschschrift der Pellets mit je 2 ml kaltem H₂O und ein einfacher mit 1 ml 10 % Glycerin. Nach jedem der Waschvorgänge musste kurz zentrifugiert und der Überstand verworfen werden. Zur Aufbewahrung der so gewonnenen Zellen wurden zu den Bakterienpellets 40 µl 10 %iges kaltes Glycerin hinzugefügt. Das Cup wurde bei —80 °C kryokonserviert (vgl. Dower et al, 1988 ⁴⁶).

C 2.3.2 Isolierung von Plasmiden

Damit gewünschte Plasmide schnell und zuverlässig für weitere Verarbeitung zur Verfügung gestellt werden konnten, wurden Kits der Firma QIAGEN (Nucleospin®

Plasmid Quick Pure) zur Plasmidisolierung genutzt. Die Vorgehensweise folgte den beiliegenden Handbüchern.

C 2.3.3 Verdau

Zur Subklonierung von PCR-Produkten wurden die Plasmide mit entsprechenden Restriktionsenzymen verdaut. Für beide folgenden Vorgehensweisen (Restriktionsanalyse, Restriktionsverdau) wie auch bei Verwendung von zwei Enzymen gleichzeitig wurden die Reaktionsbedingungen wie Bebrütungszeit, Puffer und Addition von BSA entsprechend den Herstellerangaben gewählt.

Restriktionsanalyse:

Plasmid-DNA	1–2 µl
Enzym	1 µl (5–10 Units)
Buffer	1 µl
BSA (optional)	1 µl
H ₂ O	10 µl
Endvolumen	10 µl
Inkubationszeit	1 h

Restriktionsverdau:

Plasmid-DNA	10–20 µl
Enzym	1–3 µl (30–40 Units)
Buffer	1–3 µl
BSA (optional)	1–3 µl
H ₂ O	X µl
Endvolumen	20–30 µl

Inkubationszeit 1,5 h

An die Restriktionsschritte schloss sich zur Erfolgskontrolle eine Auftrennung der gewonnenen Fragmente mittels Agarosegel wie in Abschnitt C 2.1.4 beschrieben an.

C 2.3.4 Alkalische Phosphatase-Reaktion („Cip-en“)

Um zu verhindern, dass die geschnittenen Plasmidenden im unmittelbaren Anschluss wieder religierten, wurden mit Hilfe von De-Phosphatierung die beiden aufgetrennten Enden des Vektors geschützt werden. Hierzu wurden die 30 µl eines Plasmidrestriktionsansatzes (Gewinnung siehe C 2.3.3) mit 2 µl der alkalischen Phosphatase („CIP“) mit 2 µl Puffer 2 (beides von NEB) und 16 µl H₂O versetzt und zunächst eine halbe Stunde bei 37 °C bebrütet. Es wurden nochmals 1 µl CIP hinzugegeben und bei 37 °C eine weitere halbe Stunde inkubiert. Das Ergebnis wurde nach Reinigung mittels des Qiaquick® PCR Purification Kits nach beiliegendem Handbuch aufgereinigt und zur Aufbewahrung bei –20°C eingefroren.

C 2.3.5 Ligation

Folgende Zusammensetzung des Reaktionsansatzes wurde zur Ligation des mit alkalischer Phosphatase behandelten, mit Restriktionsenzymen geschnittenen Vektors mit dem gewünschten, aufgereinigten Insert verwendet:

Vektor	X	μl
Insert	Y	μl
T4-Ligase (NEB)	1	μl
T4-Ligase-Puffer (NEB)	1,5	μl
Endvolumen	15	μl

Der eigentliche Ligation fand über Nacht bei 16 °C in einem Thermoblock statt. Zum Anhalten der Reaktion wurde die Probe für 10 Minuten bei 70 °C gehalten, wodurch die T4-Ligase inaktiviert wurde und somit eine bessere Ausgangsposition für die folgende Transformation gefunden wurde. Das Reaktionsgefäß wurde anschließend auf Eis aufbewahrt.

C 2.3.6 Transformation in elektrokompetente Zellen

Zuerst wurden die wie unter C 2.3.1 beschrieben gewonnenen elektrokompetenten Zellen vorsichtig auf Eis aufgetaut. Im Versuchsansatz für diesen Schritt wurden zuerst 40 μl der Zellsuspension und folgend 1–2 μl des Ligationsansatzes aus C 2.3.5 oder einer Plasmid-Minipreps in eine Elektroporationsküvette gegeben. Die Küvette musste für diesen Schritt ebenfalls eisgekühlt sein. Mit einem auf 2,5 V justierten „GenePulser“ wurde die Transformation durchgeführt. Der Reaktionsansatz wurde unter Schütteln und mit 1 ml LB-Medium vermengt eine

Stunde lang bei 37 °C bebrütet und dann auf Agar ausplattiert. Der genutzte Agar enthielt zur Selektionierung der korrekten Transformanten das jeweils entsprechende Antibiotikum. Als weiteren Überprüfungsschritt wurden die erhaltenen Klone durch Restriktionsanalyse oder Sequenzierung überprüft. Bei Restriktionsanalysen konnte anhand unterschiedlicher Schnittmuster der Restriktionsenzyme die Orientierung der ligierten DNA-Abschnitte unterschieden werden. Bei Sequenzanalysen wurde mit geeigneten Primern die richtige Abfolge und Orientierung der inserierten Fragmente dokumentiert.

C 2.3.7 TOPO[®]-Cloning (Subklonierung von PCR-Produkten)

Für Versuche mit Subklonierung von PCR-Produkten wurde der Vektor pCR4-TOPO[®] von Invitrogen, Karlsruhe genutzt. Der Versuchsablauf orientierte sich am Handbuch des Herstellers („TOPO TA Cloning[®] for Sequencing Version K“). Dabei wurden 4 µl der gewünschten PCR-Fragmente mit 0,5 µl des gebrauchsfertigen pCR4-TOPO[®]-Vektors den Herstellerrichtlinien folgend ligiert und in ebenfalls bereitgestellte *E. coli* OneShot[®] TOP10-Zellen übertragen. Für das Verständnis der Funktionsweise dieses Vektors ist wichtig, dass er am 3'-Ende Thymin als Überhang mit daran kovalent gebundener Topoisomerase besitzt. So können mit Adenin-Überhängen des einzubringenden PCR-Fragments effizienter subkloniert werden.

C 2.4 Phänotypische Testverfahren

C 2.4.1 Etest[®]

Die Durchführung der Testung von bakteriellen Antibiotikaresistenzen erfolgte nach den Vorschriften des „Clinical and Laboratory Standards Institute“ (<http://www.clsi.org>)⁴⁷. Zunächst wurden die zu untersuchenden Stämme in 3 ml LB-Medium angeimpft und bei 37 °C über Nacht in einer auf 200 U/min eingestellten Schüttelapparatur bebrütet. Entstandene Bakteriensuspensionen wurden mit 0,85 % NaCl-Lösung auf eine Dichte von McFarland = 0,5 standardisiert. Die

Proben wurden daraufhin auf Mueller-Hinton-Agar ausplattiert und nach Auflage eines Etest®-Streifens bei 37 °C über Nacht inkubiert. Die Schnittstelle des entstandenen Hemmhofes mit der aufgedruckten Skala zeigte die minimale Hemmkonzentration des getesteten Antibiotikums. Das Vorgehen fußt auf den den Etests mitgelieferten Verfahrensanweisungen der Herstellerfirma AB Biodisk, Solna, Schweden. Die Dokumentation erfolgte sowohl schriftlich als auch fotografisch.

C 2.4.2 Organic solvent tolerance (“OST”)

Mittels der folgenden Versuche konnte nachgewiesen werden, wie empfindlich der untersuchte *E. cloacae*-Stamm gegenüber einer Reihe von Lösungsmitteln ist. Hierbei wurde eine definierte Palette an Substanzen mit unterschiedlichem P_{OW} (Partitionskoeffizient für n-Oktanol und H₂O) benutzt ¹³. Es wurden 10 µl der mit 0,85 % NaCl-Lösung auf McFarland = 0,5 standardisierten Bakteriensuspension auf LB-Agar-Platten pipettiert, ohne diese auszustreichen („Spotten“). Nun wurde der Agar mit dem jeweiligen Lösungsmittel lückenlos überschichtet. Während der dreitägigen Bebrütung bei Raumtemperatur wurden die gläsernen Petrischälchen mit Parafilm verschlossen, um dem Verdunsten des Lösungsmittels entgegenzuwirken. Festgehalten wurde das Ergebnis („Wachstum ja/nein“) sowohl schriftlich-tabellarisch als auch fotografisch.

C 2.4.3 Cadmium-Resistenz

Für die Bestimmung der Cadmium-Resistenz wurde im Rahmen einer Endpunktmessung das Wachstum von Bakterienproben in Gegenwart von Cadmium untersucht. Die aktuell geltenden Richtlinien über den Umgang mit giftigen Substanzen hatten entsprechend den jeweiligen Dienstvorschriften beachtet zu werden. Der Versuch wurde mit Microtiterplatten durchgeführt, in denen jeweils die 100 µl einer auf McFarland = 0,5 standardisierten Bakteriensuspension zu einer Verdünnungsreihe an Cadmium pipettiert wurde. Als Cadmium-Verdünnungslösungen wurden Konzentrationen zu 1 mM, 500 µMol, 250 µMol,

125 μMol , 62,5 μMol , 31,25 μMol , 15,625 μMol und 7,8125 μMol pro Liter LB-Flüssig-Medium verwandt und hiervon je 100 μl in die Vertiefungen einer Microtiterplatte eingesetzt. Als Positiv-Kontrolle wurde anstelle der Cadmiumlösung LB-Flüssigmedium, als Negativkontrolle anstelle der Bakteriensuspension H_2O benutzt. Auswertungskriterium des Versuchs war das makroskopisch sichtbare Wachstum in Form einer Bakterienkolonie. Die Ergebnisse („Wachstum ja/nein“) wurden sowohl tabellarisch als auch fotografisch festgehalten.

D Ergebnisse

D 1 Suche nach roh in verschiedenen Klinikisolaten von Enterobacteriaceae

D 1.1 Polymerase-Ketten-Reaktion („Standard“-Protokoll)

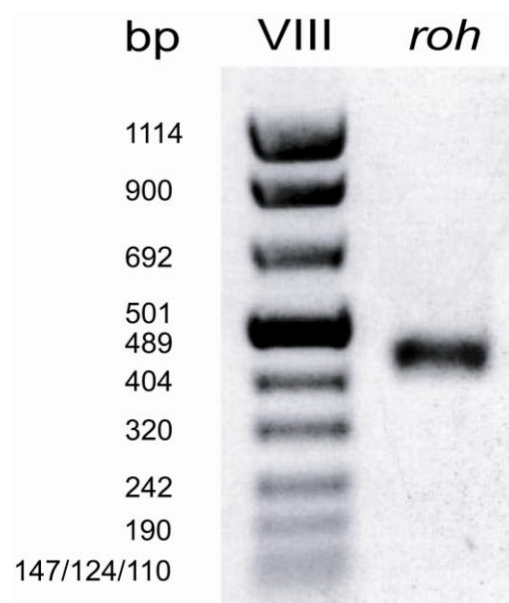


Abb. 7: PCR *roh* aus *Enterobacter cloacae* # 1919 (Primer 641, 642)
Die linke Spur zeigt den „DNA molecular weight marker VIII“ von Roche, die rechte das PCR-Produkt von *roh* aus einer PCR mit den Primern 641 und 642 aus genomischer DNA von *E. cloacae* # 1919

Roh ist ein putativer Transkriptionsfaktor für Efflux-assoziierte Gene. Bisher konnte *roh* nur in einem Bakterienstämmepärchen mit diskrepanter Resistenz gegenüber typischerweise durch Effluxpumpen⁵ transportierten antimikrobiellen Substanzen nachgewiesen werden. Im Folgenden wurde das Vorkommen von *roh* in einem größeren Kollektiv an *Enterobacteriaceae* aus der klinischen Routinediagnostik untersucht. Um das Vorhandensein des Genes für den gesuchten Faktor zu bestätigen, bot sich als erster Schritt eine Polymerase-Ketten-Reaktion an. Hierzu wurden zu Beginn spezifische Primer von Vorarbeiten übernommen (641 und

642⁵). Als Vorversuch wurde getestet, in welchen Konzentrationen jeweils isolierte genomische DNA („gDNA“) in PCR-Reaktionen eingesetzt werden sollte. Die Konzentrationen der gDNA betrugen zwischen 70 µg/ml und 157,5 µg/ml (vgl. Tabelle 4). Es wurden drei verschiedene Verdünnungsstufen der gDNA zum PCR-Reaktionsansatz pipettiert, nämlich je 1 µl von 1:1, 1:10 und 1:50 Verdünnung der gDNA.

Tabelle 4: Konzentrationen gewonnener gDNAs

Stamnummer Jeweils <i>E. cloacae</i>	Absorption bei 260 nm mit Verdünnung 1:50	Absorption bei 280 nm mit Verdünnung 1:50	260/280	$c_{\text{gDNA}} [\mu\text{g/ml}]$ $c = A_{260\text{nm}} \times 50 \times 50$
# 1919	0,031	0,022	1,41	77,5
# 1920	0,034	0,028	1,21	85
# 3264	0,063	0,053	1,20	157,5
# 2284 (Wildtyp)	0,028	0,018	1,56	70
Klinikisolat 1	0,048	0,035	1,37	120
Klinikisolat 2	0,048	0,038	1,26	120
Klinikisolat 3	0,061	0,056	1,10	152,5

Nach Durchführung einer PCR mit den Standard-Amplifikationsbedingungen (vgl. C 2.1.6.1) und Auftrennung mittels Agarosegel war zu sehen, dass alle drei Verdünnungsstufen bei *E. cloacae* # 1919, # 1920 und # 2284 zu einer deutlichen Bande mit der erwarteten Größe von ungefähr 500 bp führten (vgl. Abbildung 8). Bei *E. cloacae* # 3264 und drei weiteren klinischen Isolaten von *E. cloacae* gelang der Nachweis von *roh* mittels PCR nach dem „Standard“-Protokoll nicht.

Wegen des einfacheren Vorgehens wurde in weiteren Versuchen auf Verdünnungen der gDNA verzichtet. Als Kontrolle der DNA sowie der PCR-Bedingungen wurde eine PCR mit Primern für ein hoch konserviertes „house keeping“ Gen durchgeführt

(„pollut“). Alle Ansätze waren positiv für das gesuchte PCR-Produkt (vgl. Abbildung

9). *E. cloacae* # 1919 wurde im Folgenden als Positivkontrolle für *roh* verwendet.

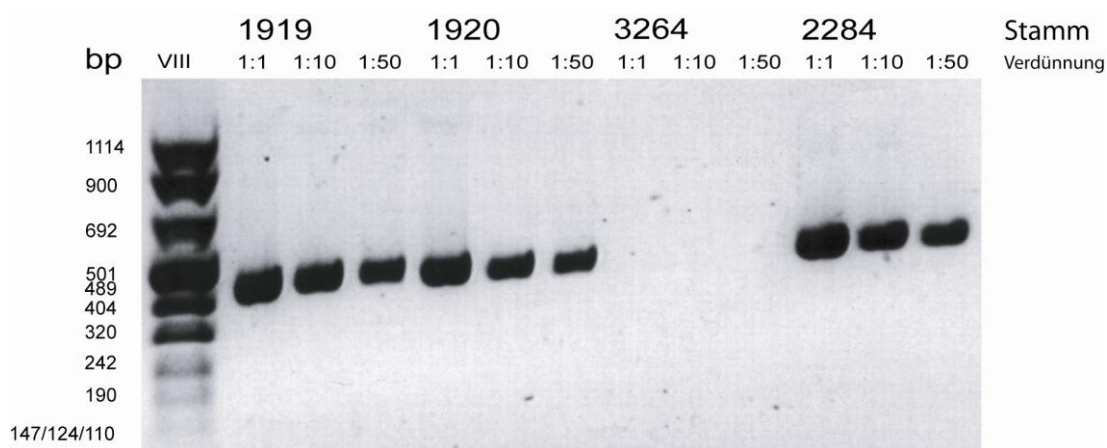


Abb. 8:

PCR auf *roh* (Primer 641, 642);

Die erste Spur zeigt den „DNA molecular weight marker VIII“ von Roche. Die nachfolgenden Spuren zeigen jeweils das Produkt einer PCR nach *roh* mit den Primern 641 und 642. In Gruppen von drei verschiedenen Verdünnungen der gDNA (1:1, 1:10, 1:50) wurden die PCRs für *E. cloacae* # 1919, # 1920, # 3264 und # 2284 aufgetragen. Für # 1919, # 1920 und # 2284 konnte ein PCR-Produkt von *roh* gewonnen werden.

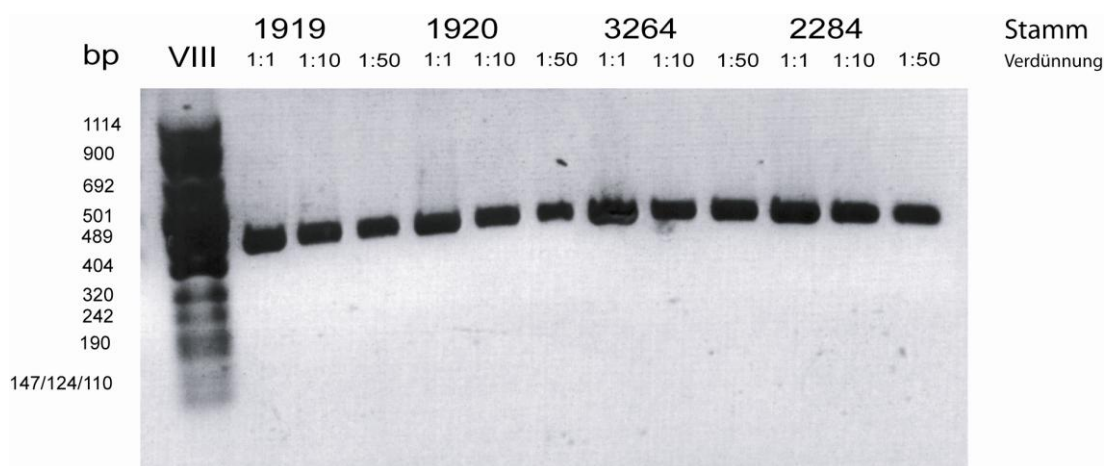


Abb. 9:

Kontroll-PCR auf *pollut* (Primer 239, 240);

Die erste Spur zeigt den „DNA molecular weight marker VIII“ von Roche. Die Spuren zeigen aufeinanderfolgend in Gruppen von drei verschiedenen Verdünnungen der gDNA (1:1, 1:10, 1:50) die PCRs nach *pollut* für *E. cloacae* # 1919, # 1920, # 3264 und # 2284. Für alle Verdünnungsstufen aller *E. cloacae* konnte *pollut* mit den Primern 239 und 240 nachgewiesen werden.

Im Anschluss an diesen Vorversuch sollte nun in einem breiteren, auch über die Spezies *Enterobacter cloacae* hinausgehenden Umfeld an klinischen Isolaten an

Enterobacteriaceae mittels PCR *roh* amplifiziert werden. So wurden zehn verschiedene Stämme von *Escherichia coli*, drei Stämme *Klebsiella oxytoca*, fünf Stämme *Klebsiella pneumoniae* und zwanzig weitere Isolate von *E. cloacae* mit der oben beschriebenen PCR für *roh* untersucht. Als Positivkontrollen für die Amplifikationen wurden bei *Klebsiella* und *Escherichia gyrA* verwendet. Mittels der genutzten PCR-Bedingungen konnte jedoch in keinem dieser Stämme *roh* nachgewiesen werden; lediglich bei drei *E. cloacae*-Stämmen (# 2257, # 2269, # 2299) zeigten sich diskrete diffus nach oben und unten auslaufende Banden (vgl. Abbildung 10). Die zugehörigen Positivkontrollen für den korrekten Ablauf der PCR fielen regelrecht aus (vgl. Abbildung 11).

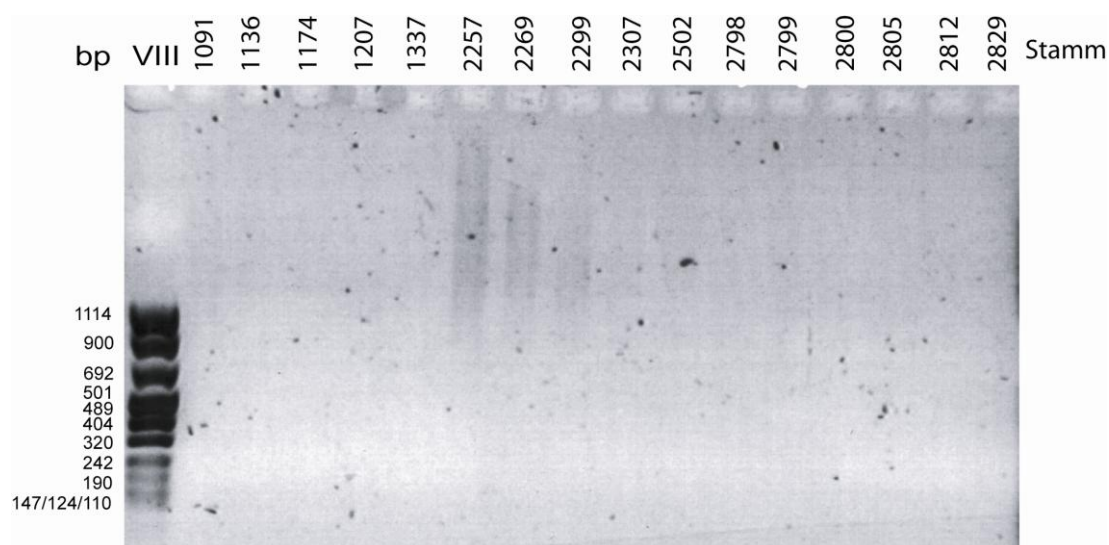


Abb. 10:

PCR *roh* (Primer 641, 642)

Die erste Spur zeigt den „DNA molecular weight marker VIII“ von Roche. Die Spuren 2–16 zeigen verschiedene klinische Isolate von *E. cloacae*. Bis auf diskrete, diffus nach oben und unten auslaufende Banden bei *E. cl.* # 2257, # 2269 und # 2299 konnte kein Produkt einer PCR nach *roh* mit den Primern 641 und 642 dargestellt werden

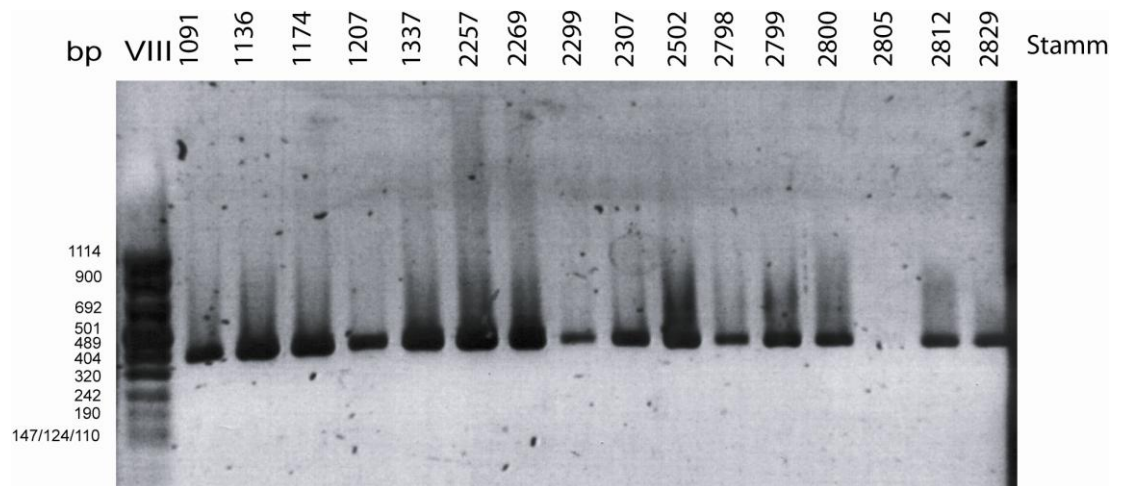


Abb. 11:

PCR *pollut* (Primer 239, 240)

Die erste Spur zeigt den „DNA molecular weight marker VIII“ von Roche. Die restlichen Spuren zeigen PCRs nach *pollut*. Für aller untersuchten *E. cloacae* konnte *pollut* mit den Primern 239 und 240 nachgewiesen werden.

Es wurde eine suboptimale Bindung des Primerpaares durch Mutationen in der Erkennungssequenz vermutet. Mit einem leicht abgeändertem Cyclderprotokoll (vgl. Tabelle 5) wurde nun versucht, durch Reamplifikation aus den bisherigen PCR-Produkten mit niedrigerer Annealing-Temperatur von 50 °C den Nachweis von *roh* zu führen.

Tabelle 5: Modifiziertes Cyclderprotokoll für Reamplifikation von *roh* bei *E. cloacae*

Schritt	Temperatur [°C]	Zeit	
1	94	5 Min.	
2	94	1 Min.	
3	50	1 Min.	
4	72	3 Min.	go to 2 (29×)
5	4	∞	

Bei den Stämmen # 2257 und # 2269 konnte mittels der modifizierten Reamplifikations-PCR *roh* nachgewiesen werden. Die zufällig ausgesuchten *E. cloacae*-Stämme # 05.20-0.20, # 14/452 und # 05.14-08 zeigten ebenfalls nach primär negativer PCR auf *roh* bei Reamplifikation deutliche Banden in der elektrophoretischen Auftrennung (Länge: für # 05.20-0.20 circa 500 bp; für # 14/452 ungefähr 190 bp; für # 05.14-08 120 bp und 500 bp). (vgl. Abbildung 12 und 13)

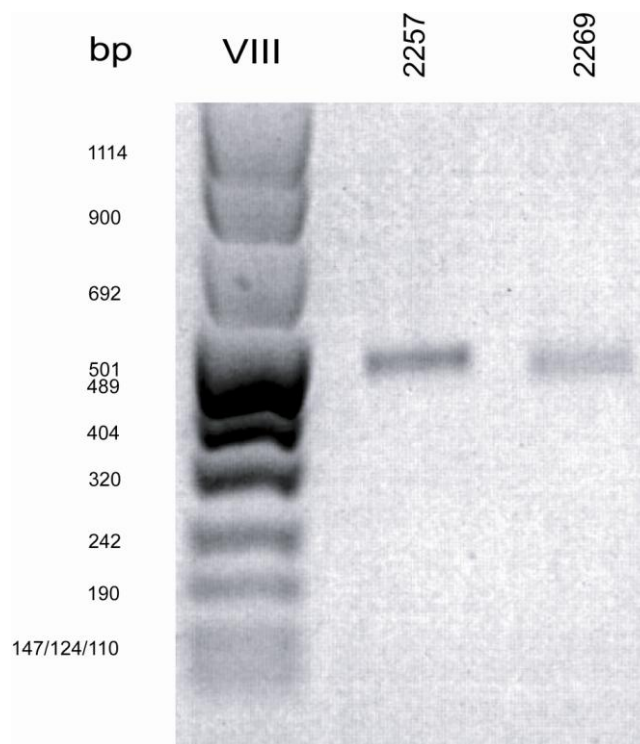


Abb. 12:

Reamplifikation *roh* (Primer 641, 642)

Die erste Spur zeigt den „DNA molecular weight marker VIII“ von Roche. Die Spuren 2 und 3 zeigen das Produkt einer PCR nach *roh* in den Stämmen *E. cloacae* # 2257 und # 2269. Für *E. cloacae* # 2257 und # 2269 konnte *roh* durch eine Bande der erwarteten Größe von circa 500 bp nachgewiesen werden.

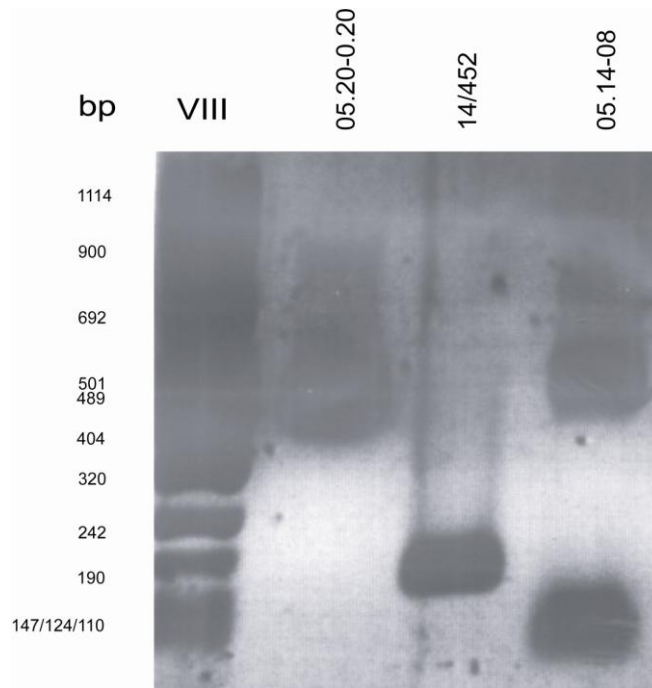


Abb. 13:

Reamplifikation *roh* (Primer 641, 642)

Die erste Spur zeigt den „DNA molecular weight marker VIII“ von Roche. Die Spuren 2, 3 und 4 zeigen das Produkt einer PCR nach *roh* in den Stämmen *E. cloacae* # 05.20-0.20, # 14/452 und # 05.14-08 und # 2269. Für die untersuchten *E. cloacae* konnte mit der Reamplifikations-PCR und den Primern 641 und 642 Banden erzeugt werden. Für # 05.20-0.20 lag das PCR-Fragment wie erwartet bei ungefähr 500 bp. Bei # 14/452 lag das Fragment bei circa 190 bp. Für # 05.14-08 zeigten sich zwei Banden mit Längen von 500 bp und ungefähr 120 bp.

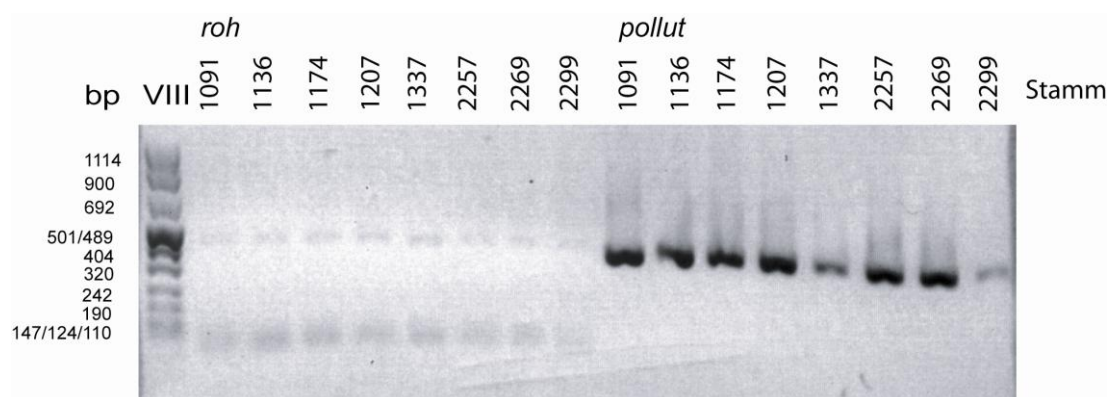
Um zu beweisen, dass die Bande auch *roh* entspricht, wurde das Fragment aus dem Gel extrahiert und sequenziert. Die DNA-Sequenz bestätigte bei *E. cloacae* # 2269 im Vergleich mit der aus eigenen Voruntersuchungen bekannten Basenabfolge, dass es sich bei dem PCR-Fragment um einen Ausschnitt des Gens von *Roh* handelte. Die DNA-Sequenzanalysen der restlichen *E. cloacae* waren auch bei Wiederholungen nicht eindeutig auswertbar.

Somit erhärteten sich durch diese Versuche der Verdacht, dass nicht nur das bereits bekannte *Enterobacter cloacae*-Pärchen # 1919 und # 1920 sondern auch weitere *Enterobacteriaceae* die Gensequenz des putativen Transkriptionsfaktors *Roh* in ihrer genomischen DNA enthalten.

D 1.2 Polymerase-Ketten-Reaktion („touch-down“-Protokoll)^{43 44 45}

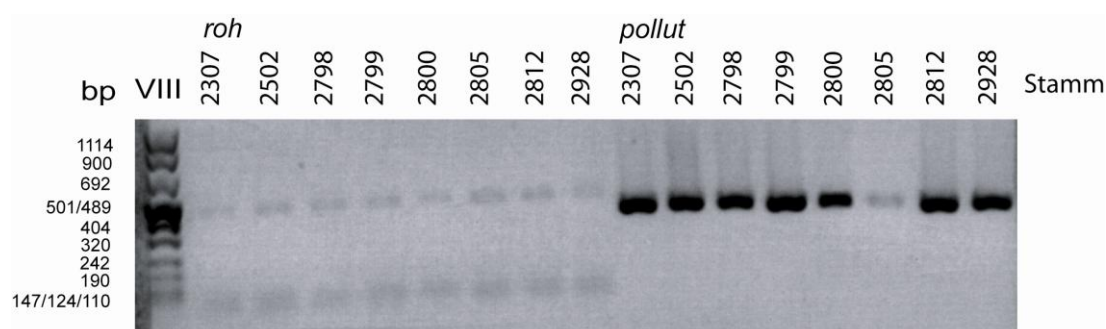
Um durch Mutationen in der Primerbindungssequenz falsch-negativen „Standard“-PCRs zu begegnen, wurden alternative Protokolle gesucht. Zunächst wurde ein „touch-down“-PCR-Protokoll entworfen. Bei einem „touch-down“-Vorgehen wird die Annealing-Temperatur sukzessive über mehrere Zyklen in Richtung der erwarteten Schmelztemperatur T_m der Primer hin abgesenkt. Da sich mit höherer Temperatur die Spezifität von Primerbindungen an DNA erhöht, werden weniger Primer-Dimer oder andere Artefakte gebildet. Vor allem das gewünschte PCR-Produkt wird erzeugt. Dieses Verfahren beruht auf Publikationen von K.H. Hecker et al.⁴⁵, R.H. Don et al.⁴³ und K.H. Roux et al.⁴⁴.

Mit „touch-down“-Polymerase-Ketten-Reaktionen wurde nun nochmals in den in D 1.1 beschriebenen Stämmen von *Enterobacter cloacae* nach *roh* gesucht. Es ließen sich dabei in allen 21 erneut untersuchten Bakterienstämmen mittels des „touch-down“-Protokolls (Cyclereinstellungen: C 2.1.6.2) und der verwendeten Primerkombination 641/642 zumindest schwache Signale im für *roh* erwarteten Größenbereich von circa 500 bp detektieren. (siehe Abbildungen 14, 15 und 16)

**Abb. 14:**

„Touch down“-PCR *roh* / *pollut*;

In der ersten Spur wurde der „DNA molecular weight marker VIII“ von Roche aufgetrennt. Die Spuren 2–9 zeigen die Produkte einer PCR für *roh* mit den Primern 641 und 642 von *E. cloacae* # 1091, # 1136, # 1174, # 1207, # 1337, # 2257, # 2269 und # 2299. Bei allen konnte *roh* nachgewiesen werden. In den Spuren 10–16 wurden die regelrecht ausgefallene Kontroll-PCR für *pollut* mit den Primern 239 und 240 von *E. cloacae* # 1091, # 1136, # 1174, # 1207, # 1337, # 2257, # 2269 und # 2299 aufgetragen.

**Abb. 15:**

„Touch down“-PCR *roh* / *pollut*

In der ersten Spur wurde der „DNA molecular weight marker VIII“ von Roche aufgetrennt. Die Spuren 2–9 zeigen die Produkte einer PCR für *roh* mit den Primern 641 und 642 von *E. cloacae* # 2307, # 2502, # 2798, # 2799, # 2800, # 2805, # 2812 und 2928. Bei allen konnte *roh* nachgewiesen werden. In den restlichen Spuren wurden die regelrecht ausgefallene Kontroll-PCR für *pollut* mit den Primern 239 und 240 von *E. cloacae* # 2307, # 2502, # 2798, # 2799, # 2800, # 2805, # 2812 und 2928 aufgetragen.

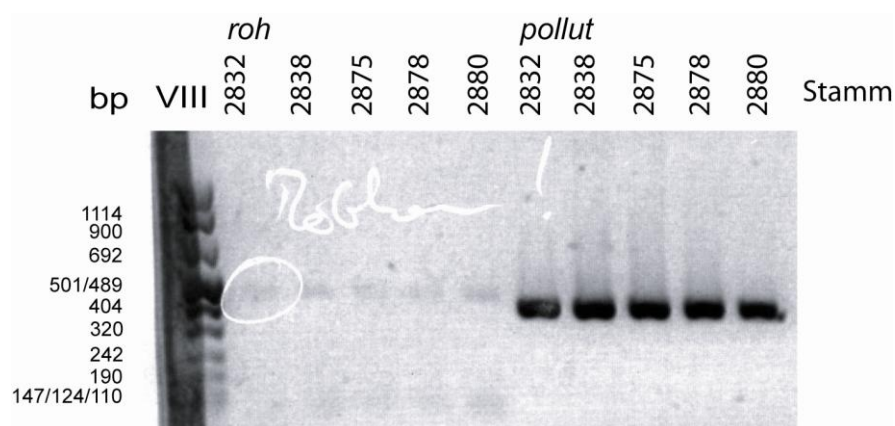


Abb. 16:

„Touch down“-PCR *roh* / *pollut*

In der ersten Spur wurde der „DNA molecular weight marker VIII“ von Roche aufgetrennt. Die Spuren 2–9 zeigen die Produkte einer PCR für *roh* mit den Primern 641 und 642 von *E. cloacae* # 2832, # 2838, # 2875, # 2878 und # 2880. Bei allen konnte *roh* nachgewiesen werden. In den restlichen Spuren wurden die regelrecht ausgefallene Kontroll-PCRs für *pollut* mit den Primern 239 und 240 von *E. cloacae* # 2832, # 2838, # 2875, # 2878 und # 2880 aufgetragen.

Zur endgültigen Bestätigung, dass es sich bei den gewonnenen PCR-Produkten um *roh* handelt, wurden alle 21 *E. cloacae*-Stämme sequenziert. Hierzu mussten die mittels Gelextraktion gewonnenen PCR-Fragmente wegen für Sequenzierungen zu geringer Ausbeute erneut einer „Standard“-PCR zur Reamplifizierung unterzogen werden. Nach Aufreinigung mittels des PCR-Purification-Kits von Qiagen konnten die Proben sequenziert werden. Bei allen den Stämmen *E. cloacae* # 1174, # 1207, # 1337, # 2257, # 2269, # 2299, # 2307, # 2798, # 2799, # 2805, # 2812, # 2829 und # 2878 wurde die Sequenz von *roh* bis auf diskrete Abweichungen gefunden. Bei den restlichen 8 Stämmen konnte keine eindeutige Sequenz gewonnen werden. Die jeweiligen Sequenzen befinden sich in der Tabelle 13 im Abschnitt „F Anhang“.

Es ist also davon auszugehen, dass die in den Abbildungen 13, 14 und 15 gezeigten PCR-Banden auch tatsächlich PCR-Produkte von *roh* sind.

Weiterhin sollte nun überprüft werden, ob das Gen in anderen *Enterobacter cloacae*-Stämmen auch in derselben Umgebung wie in den Stämmen # 1919 und # 1920 lokalisiert ist. Hierzu wurde ein breiteres Primerpanel genutzt, das in

Berücksichtigung der bekannten genomischen Umgebung im Stamm # 1920 entworfen war und zu verschiedenen großen Fragmenten führen sollte. Diese wurden mit den aus der bekannten Basenabfolge des ursprünglich untersuchten Bakterienstämmepärchens erwarteten Größen verglichen und bei Generierung eines PCR-Produktes sequenziert. Benutzt wurden die Primerkombinationen 479 mit 641, 547 mit 641, 642 mit 441, 642 mit 536 und 642 mit 788 (für die Lokalisation der entsprechenden Primerbindungssequenzen vgl. Abbildung 17).

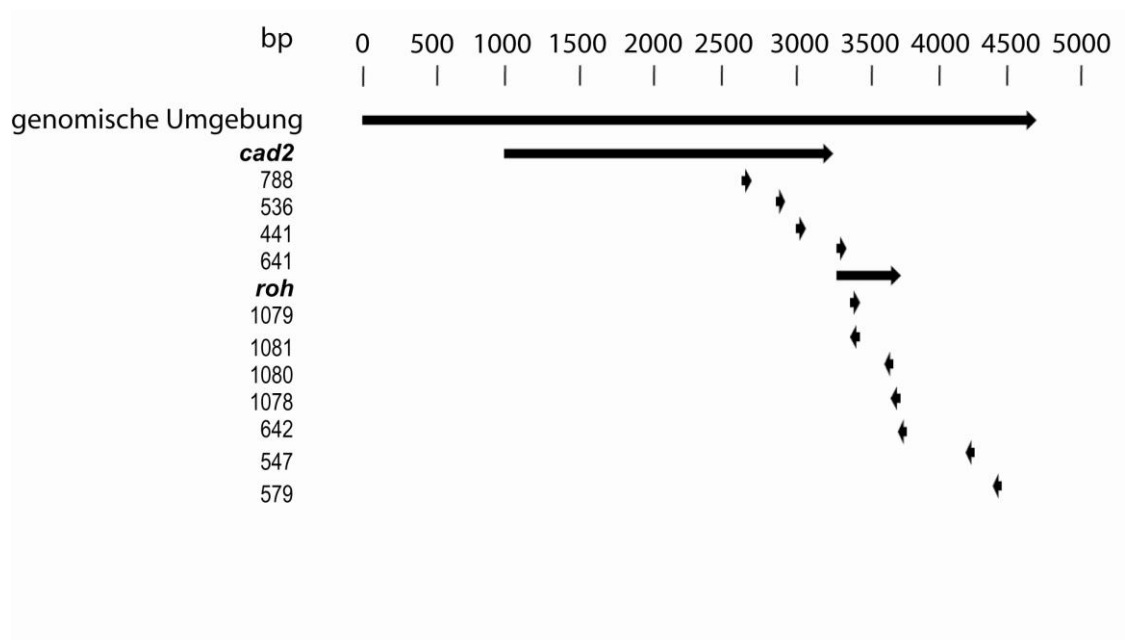
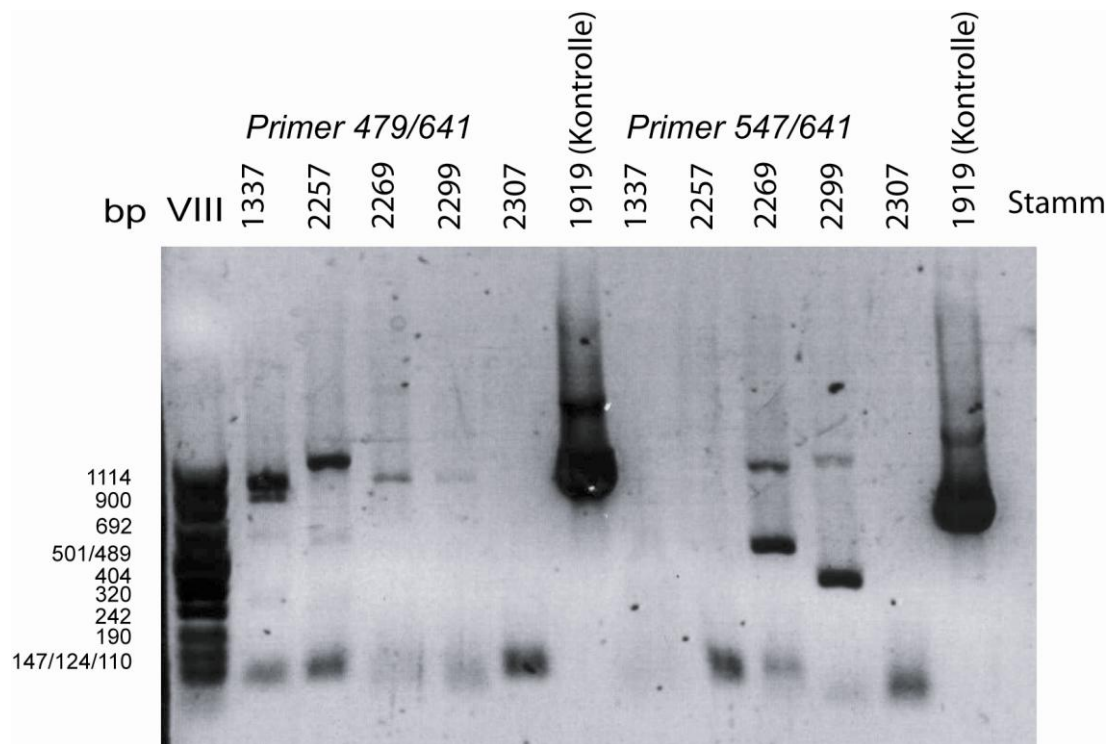


Abb. 17:

Schema der Primerlokalisierungen in der Umgebung von *cad2* und *roh*
 Die Pfeilrichtung entspricht der 5'⇒3'-Orientierung der gezeigten DNA-Fragmente.
 Die einzelnen Primer wurden durch ihre Nummerierung dargestellt (vgl. C 1.8; z.B. „Primer 641“ = „641“). Die Reihenfolge der Fragmente entspricht ihrem Abstand zum fiktiven Startpunkt der gezeigten genomischen Umgebung.

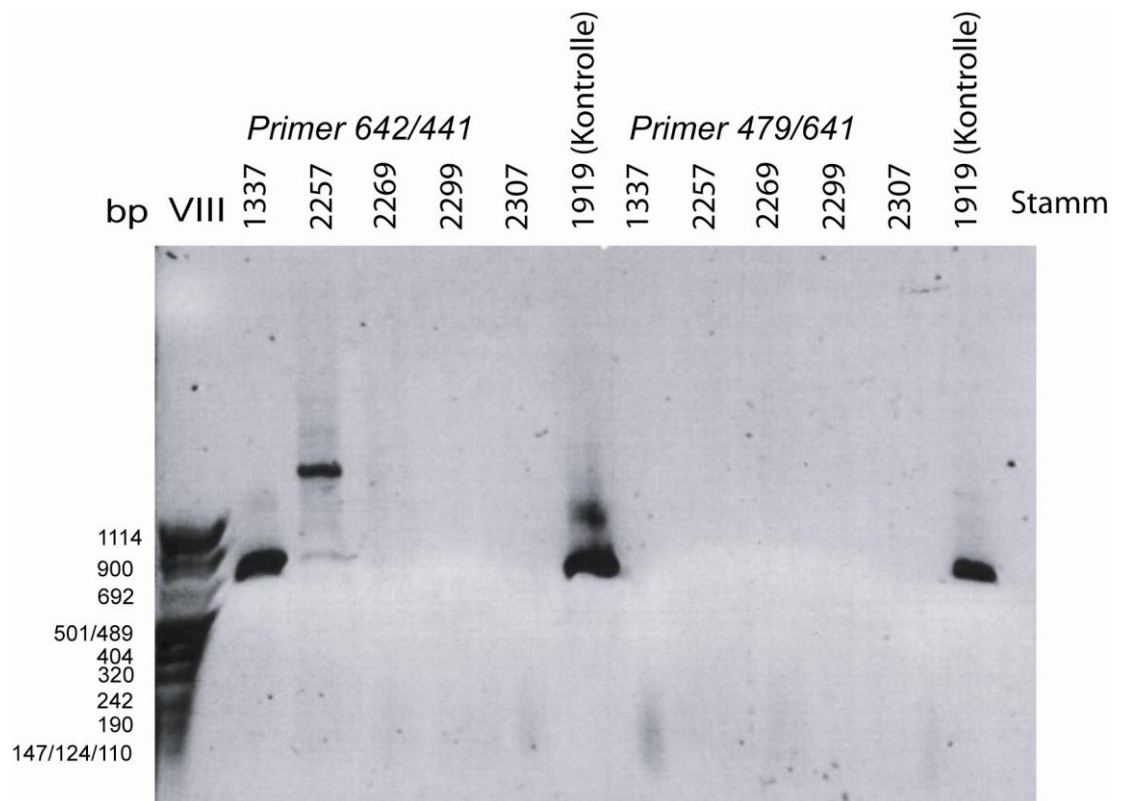
Standard PCR-Protokolle generierten keine Banden in der erwarteten Größe. Unter den oben schon beschriebenen Thermocyclereinstellungen für „touch down“-PCR-Protokolle (vgl. C 2.1.6.2) jedoch gelang es, mehrere deutliche Banden zu erhalten.

**Abb. 18:**

„Touch down“-PCR *roh*: (Primer 479/641 und 547/641)

In der ersten Spur ist der „DNA molecular weight marker VIII“ von Roche aufgetragen. In den Spuren 2–7 befinden sich PCR-Produkte für die Primer 479 und 641 der *E. cloacae* # 1337, # 2257, # 2269, # 2299, # 2307 und als Positivkontrolle # 1919. Für # 1337, # 2257, # 2269 und # 2299 konnten Produkte generiert werden. Für # 1337, # 2269 und # 2299 hatten die kräftigsten Banden die gleiche Länge wie die Positivkontrolle # 1919 von ca. 1.100 bp. # 1337 zeigte eine zusätzliche Bande bei circa 900 bp.

In den Spuren 8–13 wurden PCRs mit den Primern 547 und 641 der *E. cloacae*-Stämme # 1337, # 2257, # 2269, # 2299, # 2307 und erneut als Positivkontrolle # 1919 aufgetragen. Banden zeigten sich bei *E. cloacae* # 2269 mit ca. 1100 bp und 500 bp, bei *E. cloacae* # 2299 bei 1.120 und 400 bp. Die Fragmentlängen für # 2269 und # 2299 unterschieden sich deutlich von der Länge der Positivkontrolle.

**Abb. 19:**

„Touch down“-PCR *roh*: (Primer 642/441 und 479/641)

In der ersten Spur ist der „DNA molecular weight marker VIII“ von Roche aufgetragen. In den Spuren 2–7 befinden sich PCR-Produkte für die Primer 642 und 441 der *E. cloacae* # 1337, # 2257, # 2269, # 2299, # 2307 und als Positivkontrolle # 1919. Für # 1337 und # 2257 konnten Produkte generiert werden (# 1337: circa 900 bp, # 2257: circa 900 bp und 1500 bp; Positivkontrolle circa 900 bp).

In den Spuren 8–13 wurden PCRs mit den Primern 479 und 641 der *E. cloacae*-Stämme # 1337, # 2257, # 2269, # 2299, # 2307 und erneut als Positivkontrolle # 1919 aufgetragen. Banden zeigten sich bei außer bei der Positivkontrolle keine.

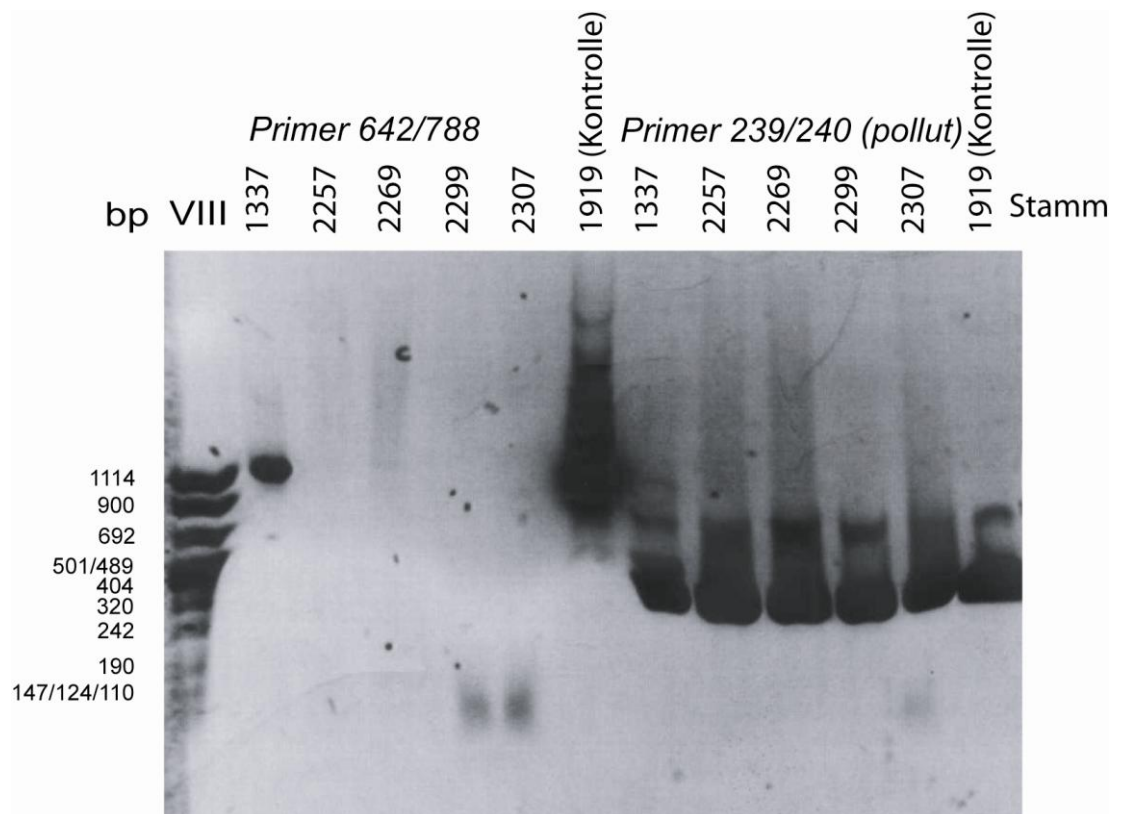


Abb. 20:

„Touch down“-PCR *roh* / *pollut*: (Primer 642/788 und 239/240)

In der ersten Spur ist der „DNA molecular weight marker VIII“ von Roche aufgetragen. In den Spuren 2–7 befinden sich PCR-Produkte für die Primer 642 und 788 der *E. cloacae* # 1337, # 2257, # 2269, # 2299, # 2307 und als Positivkontrolle # 1919. Für # 1337 konnte ein Produkt mit zur Positivkontrolle vergleichbarer Länge von ca. 1200 bp generiert werden.

In den Spuren 8–13 wurden Kontroll-PCRs nach *pollut* mit den Primern 239 und 240 der *E. cloacae*-Stämme # 1337, # 2257, # 2269, # 2299, # 2307 und # 1919 aufgetragen. Banden für *pollut* zeigten sich bei allen *E. cloacae*

Wie die Gelelektrophoresen in den Abbildungen 18, 19 und 20 zeigen, konnten mit der Primerkombination 479 und 641 bei den Stämmen *E. cloacae* # 1337, # 2257, # 2269 und # 2299 PCR-Produkte erzeugt werden. Für *E. cloacae* # 1337, # 2269 und # 2299 hatten die kräftigsten Banden die gleiche Länge wie die Positivkontrolle # 1919 von ca. 1.100 bp. # 1337 zeigte eine zusätzliche Bande bei circa 900 bp. Die Kombination der Primer 547 mit 641 erbrachte Banden mit ca. 1.100 bp und 500 bp für *E. cloacae* # 2269 und mit 1120 bp und 400 bp für *E. cloacae* # 2299. Die Fragmentlängen für *E. cloacae* # 2269 und # 2299 unterschieden sich deutlich von der Länge der Positivkontrolle (circa 700 bp). Mit den Primern 642 und 441 kam es

für *E. cloacae* # 1337 und # 2257 zu gleich großen Banden wie bei der Positivkontrolle aus *E. cloacae* # 1919 bei circa 900 bp. Zusätzlich wurde aus *E. cloacae* # 2257 wurde ein PCR-Produkt generiert, das mit ungefähr 1500 bp größer als das Produkt von # 1919 war. Mit 642 und 536 als Primer wurden bis auf die Positivkontrolle von *E. cloacae* # 1919 keine PCR-Fragmente amplifiziert. Die Primer-Paarung 642 und 788 erzeugte neben der Positivkontrolle bei *E. cloacae* # 1337 ein größengleiches DNA-Fragment mit einer Länge von ungefähr 1.200 bp (vgl. Abbildung 20). Eine Übersicht über die verschiedenen in PCRs nach *roh* positiven *Enterobacter cloacae*-Stämme findet sich in Tabelle 6.

Tabelle 6: „Touch down“-PCRs *roh*-Locus:

Ungefähre Größen von Banden für die *E. cloacae*-Stämme # 1337, # 2257, # 2269, # 2299, # 2307 und # 1919

Stamm-Nummer:	# 1337	# 2257	# 2269	# 2299	# 2307	# 1919 (Kontrolle)
Primer 479/641	1100 bp 900 bp	1100 bp	1100 bp	1100 bp		1100 bp
Primer 547/641			1100 bp 500 bp	1120 bp 400 bp		700 bp
Primer 642/441	900 bp	900 bp 1500 bp				900 bp
Primer 642/788	1200 bp					1200 bp
Primer 239/240 (Kontrolle)	400 bp	400 bp	400 bp	400 bp	400 bp	400 bp

Die gleiche Versuchsanordnung wurde nun unter der Vorstellung, auch hier *roh* mit einer „touch down“-Polymerasekettenreaktion nachweisen zu können, auf weitere *Enterobacteriaceae* erweitert. Als Versuchsstämme wurden die unter D 1.1 beschriebenen Stämme von *E. coli*, *K. pneumoniae* und *K. oxytoca* verwendet. Die PCR-Ergebnisse für *roh* mittels „touch down“-PCR unter den Primern 641 und 642

waren für alle untersuchten Stämme bei regelrechter Positivkontrolle (*E. cloacae* # 1919) negativ (vgl. Abbildung 21).

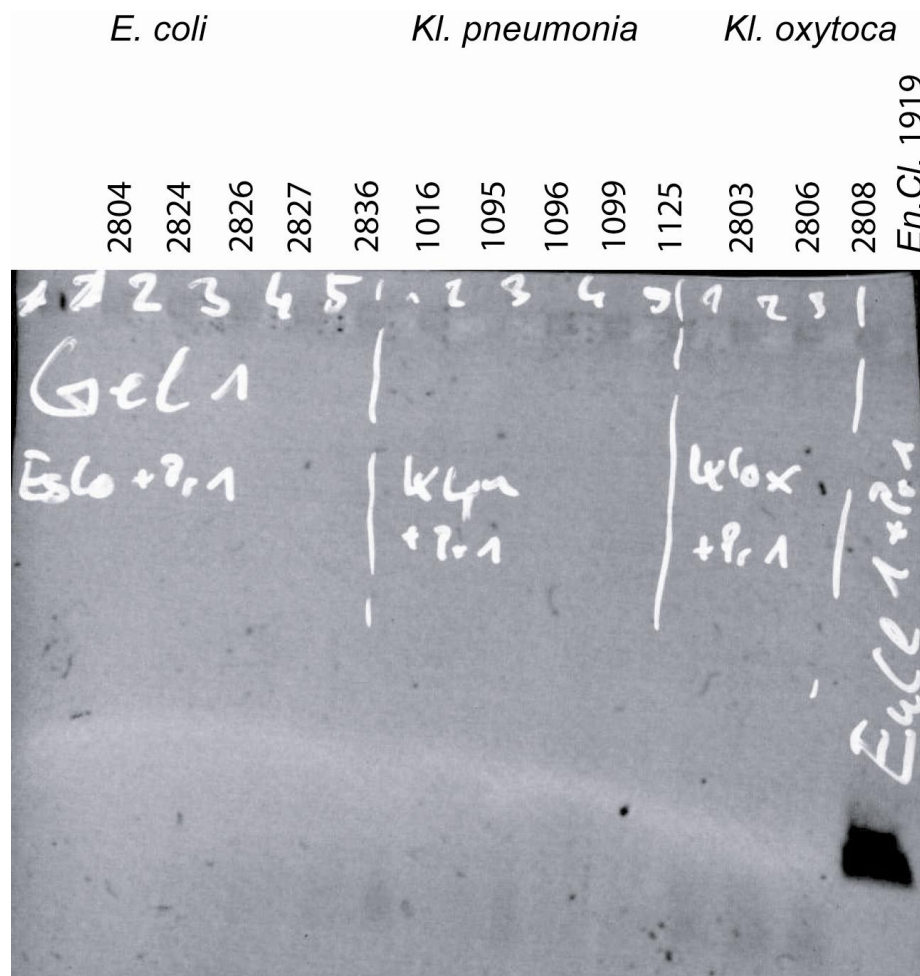


Abb. 21:

„Touch down“-PCR *roh* (Primer 641, 642)

In den ersten fünf Spuren sind die PCR-Produkte für *Escherichia coli* # 2804, # 2824, # 2826, # 2827 und # 2836 zu sehen. Es folgen die Ergebnisse für *Klebsiella pneumoniae* # 1016, # 1095, # 1096, # 1099 und # 1125. Vor der rechts abschließenden regelrechten Positivkontrolle (*E. cloacae* # 1919) befinden sich die Spuren mit PCRs von *Klebsiella oxytoca* # 2803, # 2806 und # 2808. Für die untersuchten *E. coli*, *K. pneumoniae* und *K. oxytoca* konnte auch unter der Verwendung von „touch down“-Verfahren mit den Primern 641 und 642 *roh* nicht nachgewiesen werden.

Es kann also festgehalten werden, dass mit „touch down“-PCR-Protokollen bei verschiedenen Stämmen von *E. cloacae* PCR-Fragmente mit passender Größe zum gesuchten Transkriptionsfaktor *roh* nachgewiesen werden konnten. Auf die unzureichende Nachweisbarkeit mittels konventioneller Cyclereinstellungen und die Diskrepanzen in den Größen der generierten DNA-Fragmente soll im

Diskussionsabschnitt dieser Arbeit genauer eingegangen werden. Bei anderen Bakterien species außerhalb von *Enterobacter cloacae*-Stämmen konnte die Gensequenz von *roh* mit den bislang genutzten Methoden nicht dargestellt werden.

D 1.3 Subklonierung der PCR-Produkte

Um zu bestätigen, dass es sich bei den in D 1.2 gewonnenen Banden um *roh* handelt, wurden die PCR-Fragmente sequenziert. Zuvor musste eine Subklonierung der PCR-Produkte durchgeführt werden, da wegen der entsprechenden schwachen Banden der Amplifikate eine direkte Sequenzierung nicht in Frage kam. Die bereits in D 1.2 verwendete Reamplifizierung wäre als Methode zur Gewinnung größerer Mengen an DNA kontaminationsanfällig und wurde deshalb für diesen Versuch nicht verwendet. Bakterienstämme für die Subklonierungsschritte wurden aus in „touch down“-PCRs für *roh* positiven Stämmen ausgewählt (vgl. D 1.2). In Berücksichtigung der jeweils mit in der genomischen Umgebung von *roh* lokalisierten Primerpaaren signalgebenden PCRs (vgl. Tabelle 6) wurden *Enterobacter cloacae* # 1337, # 2257, # 2269 und # 2299 für Subklonierungsversuche bestimmt. Die verwendeten Primerkombinationen ergaben sich ebenfalls aus den in Tabelle 6 signalgebenden Versionen. Zunächst wurden „touch down“-PCRs zur Gewinnung von *roh* aus *E. cloacae* # 1337 (mit der Primerkombination 641/479, 441/642, 788/642), # 2257 (Primer: 642/479, 441/642), # 2269 (Primer: 641/479, 641/547) und # 2299 (Primer: 641/479, 641/657) durchgeführt. Die Amplifikate wurden mittels „Qia Gel Extraction Kit“ von Qiagen aus Auftrennungsgelen entnommen und von unerwünschtem Beimaterial befreit. Das so gereinigte DNA-Fragment wurde nun in einen pCR4-TOPO®-Vektor mit Ampicillin-Resistenzkassette subkloniert. Zur primären Überprüfung der Plasmide wurde ein Verdauungsschritt mit dem Restriktionsenzym „EcoR1“ mit Auftrennung der Produkte des Verdaus via Gelelektrophorese durchgeführt. Anhand des bekannten Restriktionsmusters des gewünschten Plasmides mit den enthaltenen *roh*-PCR-

Produkten wurden nun passende Klone selektioniert. Nach erneuter Gewinnung des Plasmides wurden die Inserts der Vektoren sequenziert. Mitsequenzierte Vektoranteile wurden mit „NCBI VecScreen“ (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/VecScreen/VecScreen.html>) entfernt. Mittels „NCBI Blast 2 Sequences“ (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/bl2seq/>) konnten nun die einzelnen vervielfältigten DNA-Abschnitte mit der ursprünglich im Stämmepärchen *Enterobacter cloacae* # 1919 und # 1920 aufgefallenen Sequenz verglichen werden. Partielle Übereinstimmungen zwischen den Sequenzen der untersuchten Bakterienstämme und den entsprechenden DNA-Abschnitten aus *E. cloacae* # 1919 ergaben sich bei *E. cloacae* # 1337 (Primerkombinationen 641 / 479 und 788 / 642) und *E. cloacae* # 2257 (Primerkombination 441 / 642) (vgl. Tabelle 7). Die Sequenzen unterschieden sich allerdings zum Teil deutlich von den entsprechenden DNA-Abschnitten aus *E. cloacae* # 1919. Für die Stämme *E. cloacae* # 2269 und # 2299 ergaben sich keine über die Primersequenzen hinausgehenden Homologien. Für die restlichen Stämme konnten keine Klone erzeugt werden.

Die einzelnen gewonnenen Sequenzen können Tabelle 14 im Abschnitt „F Anhang“ entnommen werden.

Tabelle 7: Homologe Bereiche im Vergleich von Sequenzen aus Subklonierungsversuchen mit entsprechenden DNA-Abschnitten aus *E. cloacae* # 1919

<i>E. cloacae</i>	Primer		Homologe DNA-Bereiche							
			auf forward-Primer-Seite				auf reverse-Primer-Seite			
	forw.	rev.	Position [bp]	identities [bp]	gaps [bp]	Hinweis:	Position [bp]	identities [bp]	gaps [bp]	Hinweis:
# 1337	641	479	108–131	24/24 (100 %)	0/24 (0 %)	nur Primer	302–428	106/127 (83 %)	0/127 (0 %)	
# 1337	441	642				keine Homologien	10–35	26/26 (100 %)	0/26 (0 %)	nur Primer
# 1337	788	642	1–568	491/568 (86 %)	0/568 (0 %)		754–971	167/218 (76 %)	0/218 (0 %)	
# 2257	441	642	1–218	196/218 (89 %)	0/218 (0 %)		402–716	239/315 (75 %)	0/315 (0 %)	
# 2269	479	642				keine Homologien	883–906	24/24 (100 %)	0/24 (0 %)	nur Primer
# 2299	641	547	1–21	21/21 (100 %)	0/21 (0 %)	nur Primer	384–404	21/21 (100 %)	0/21 (0 %)	nur Primer

Erläuterungen:

Es wurde die mit den angegebenen *forward*- und *reverse*-Primern aus dem erwähnten Stamm gewonnene Sequenz jeweils mit der durch die selben Primer gewonnenen Sequenz aus *E. cloacae* # 1919 verglichen.

„Position“:	Position des homologen Fragmentes in der Sequenz des zu vergleichenden Stammes (5'⇒3')
„identities (X/Y)“:	„Anzahl der übereinstimmenden Basen X“ / „Anzahl der in diesem Bereich insgesamt möglichen Übereinstimmungen“
„gaps (V/Z)“:	„Anzahl der in <i>E. cloacae</i> # 1919 fehlenden homologen Basen V“ / „Anzahl aller Basen im homologen Bereich Z“
„nur Primer“:	es konnte lediglich die Sequenz des jeweiligen Primers als Übereinstimmung gefunden werden
„keine Homologien“:	es konnte in diesem Bereich keine Übereinstimmung gefunden werden

Durch die beschriebenen Subklonierungsversuche mit folgender Sequenzierung konnte für ausgewählte Stämme nachgewiesen werden, dass in D 1.2 / Tabelle 6 beschriebenen PCR-Signale für in der genomischen Umgebung von *roh* lokalisierte Primerkombinationen auch tatsächlich Ausschnitte von *roh* enthalten.

D 2 Vorkommen von roh in der Nomenspecies Enterobacter cloacae

D 2.1 Suche nach *roh* mittels „Southern Blot“ in einzelnen Vertretern der durch H. Hoffmann neugruppierten Nomenspecies *E. cloacae*³⁹

Mittels der Ergebnissen der folgend beschriebenen Experimente wurde versucht, Korrelationen zwischen Mutationen und Verwandtschaftsgrad in der Sequenz von *roh* herzustellen. Somit sollte weitere Gesichtspunkte für die durch H. Hoffmann/München vorgenommene Neuordnung der Nomenspecies *Enterobacter cloacae* gewonnen werden³⁹. Zuvor musste allerdings *roh* auch in den von H. Hoffmann zur Verfügung gestellten Stämmen nachgewiesen werden. Die bisher genutzten unterschiedlichen PCR-Protokolle waren oftmals nur unzureichend geeignet, PCR-gestützte Nachweise für *roh* eindeutig zu führen (vgl. E 1). Aus diesem Grund sollte die weitere Suche nach *roh* mittels einer cDNA-Sonde und der Technik des „Southern Blots“ geführt werden. Hierbei könnte die längere Erkennungssequenz der Sonde eventuelle Bindungsproblematiken der Primer unter Umständen egalalisieren. Das für die cDNA-Sonde verwandte Primerpaar war wie bei den ersten Sequenzierungsuntersuchungen 641 und 642. Als Template für die Herstellung der Sonde mit Hilfe einer Polymerasekettenreaktion wurde ein mittels des Primerpaares 641 und 642 aus dem Bakterienstamm # 1919 gewonnenes und gereinigtes PCR-Produkt verwandt. Es wurde um unspezifische Amplifikate zu minimieren zur Sondenherstellung nicht direkt gDNA verwendet. Für die Darstellbarkeit der Sonde im Southern Blot wurde während der Generierungs-PCR ein Viertel des dTTPs durch Digoxigenin-markiertes dUTP ersetzt. Anschließend wurde die Sonde mittels des „Gel Extraction Kits“ von Qiagen aufgereinigt.

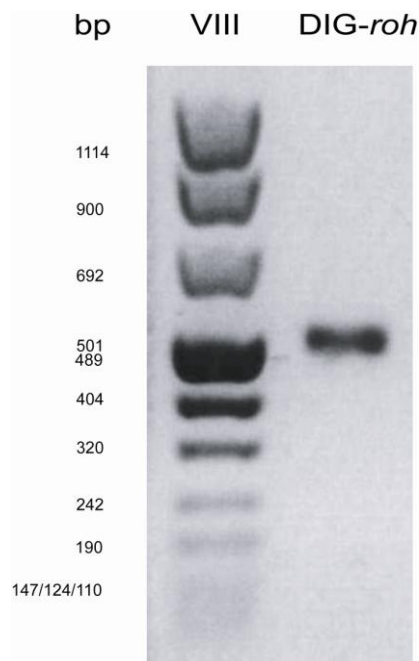


Abb. 22:

PCR DIG-gelabelte Sonde für *roh* (Primer 641, 642)

In der linken Spur wurde der „DNA molecular weight marker VIII“ von Roche aufgetragen. Die rechte Spur zeigt die DIG-markierte cDNA-Sonde für *roh*.

Es wurde mittels semiquantitativen Vergleichs der Sonde im Agarosegel mit dem Größenstandard VIII von Roche festgestellt, dass die Sonde nur in einer Konzentration von maximal 40 ng/μl vorlag. Deswegen wurde bei künftigen Sondenherstellungen auf die exaktere Aufreinigung mittels Gelextraktion verzichtet und stattdessen lediglich durch das „PCR-Purification Kit“ von Qiagen mit entsprechend höherer Ausbeute gereinigt. Im „Southern Blot“ konnte die Sonde durch Zugabe von anti-DIG-Antikörpern, welche mit alkalischer Phosphatase gekoppelt waren, sichtbar gemacht werden, indem zugegebenes CSPD enzymatisch dephosphoryliert wurde und dadurch Licht emittierte. Um vor den eigentlichen Screeninguntersuchungen auf *roh* mögliche Kreuzreaktionen mit den Gensequenzen der verwandten Transkriptionsfaktoren Rob und MarA auszuschließen, wurde zunächst ein Dot Blot mit DNA-Sequenzen von *roh*, *rob* und *marA* angefertigt. Auf eine Nitrozellulosemembran wurden je 10 μl von Produkten aus PCRs von *roh*, *rob* und *marA* in den Konzentrationen 100 ng, 10 ng, 1 ng und 100 pg aufgetragen. Nach Zugabe der Sonde, Waschen, Zugabe der anti-DIG-

Antikörper und erneutem Waschen wurde nach Applikation von CSPD „Hyper-Film ECL“ aufgelegt. Mit der Sonde und dem Versuchsaufbau konnten also PCR-Produktkonzentrationen bis 10 ng problemlos und 1 ng bedingt nachgewiesen werden. Sondenbindungen an *rob* und *marA* wurden nicht beobachtet.

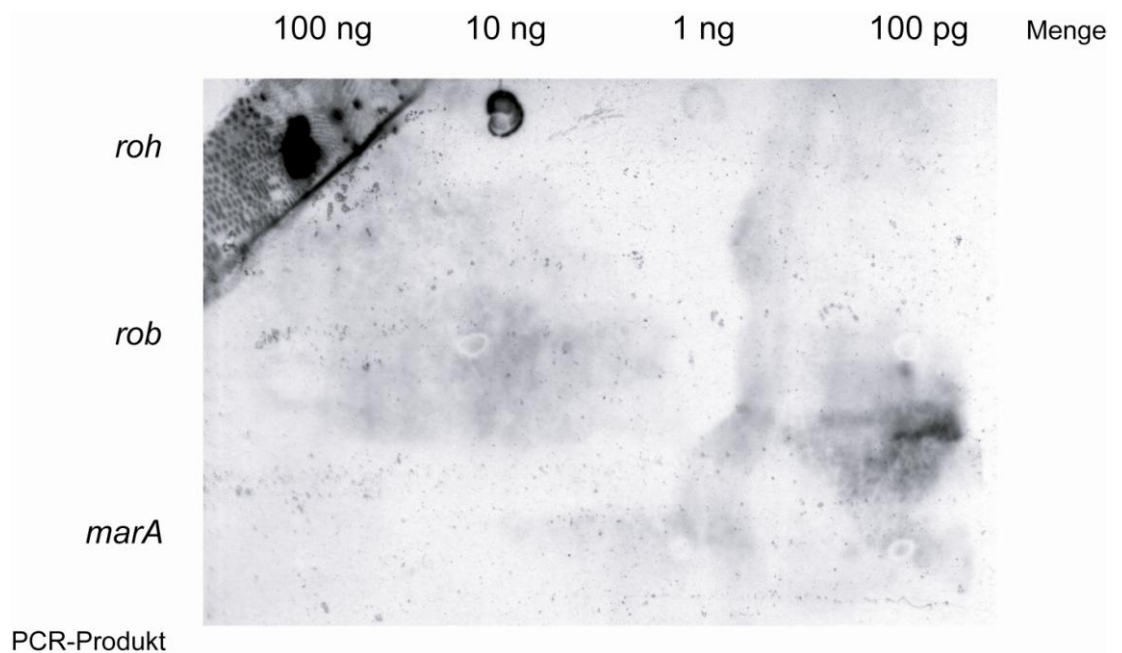


Abb. 23:

Dot Blot mit DIG-markierter Sonde für *roh*

Aufgetragen wurde nach folgendem Muster:

Reihe 1: PCR-Produkt *roh*

Reihe 2: PCR-Produkt *rob*

Reihe 3: PCR-Produkt *marA*

Spalte 1-4: 100 ng, 10 ng, 1 ng, 100 pg der PCR-Produkte

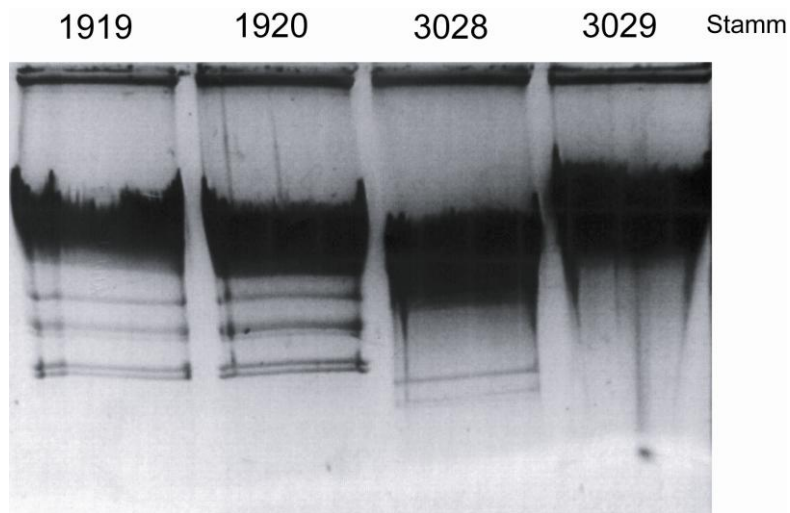
Es können Sondenbindungen an 100 ng, 10 ng und 1 ng *roh* nachgewiesen werden.

An *rob* und *marA* bindet die cDNA-Sonde nicht.

Somit war eine cDNA-Sonde gefertigt, welche für Screeninguntersuchungen nach *roh* in genomischer DNA von Vertretern der Nomenspecies *Enterobacter cloacae* unter weitestgehendem Ausschluss von falsch-positiven Bindungen an *rob*- oder *marA*-DNA-Abschnitten geeignet war.

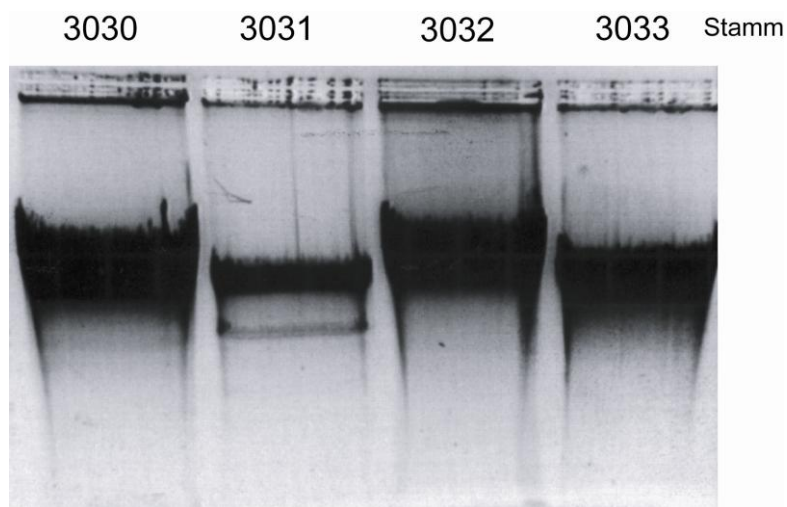
Für weitere Untersuchungen wurden gDNA der von H. Hoffmann zur Verfügung gestellten *Enterobacter cloacae*-Stämme der verschiedenen Cluster (Stämme

3028–# 3041) isoliert. Für den „Southern Blot“ wurde die gDNA mit Restriktionsenzymen behandelt, um das Genom in Größenfragmente zwischen 1 und 4 kbp aufzutrennen. Die Entscheidung fiel dabei auf die Enzyme *Hind* III und *Sph* I von New England Biolabs/USA, die entsprechend den Applikationsempfehlungen des Herstellers eingesetzt wurden. Die genannten Enzyme wurden gewählt, da zum einen beide im selben Puffersystem (Puffer 2 von New England Biolabs) verwendet werden konnten und zum anderen auch beide nicht innerhalb der bis jetzt bekannten DNA-Sequenz von *roh* schneiden würden. Auf Grundlage der bekannten Regionen „up-“ und „downstream“ von *roh* entsteht durch *Hind* III und *Sph* I ein DNA-Fragment mit einer Länge von 1.525 bp. Zur Etablierung der Sonde und besseren Handhabung wurden die zu untersuchenden Stämme auf # 3028 bis # 3033 eingeschränkt. Der oben beschriebene Restriktionsverdau wurde nun für diese Stämme in 1 %-Agarosegel aufgetrennt (vgl. Abbildungen 24 und 25) und auf Nitrozellulosemembranen transferiert. Die „Southern Blots“ dieser Ansätze gemäß den Versuchsbeschreibungen zeigten für alle untersuchten Stämme Signale an der erwarteten Stelle (vgl. Abbildungen 26 und 27) bei circa 500 bp. Durch mehrfache Wiederholung dieser Experimente wurden gleiche Ergebnisse produziert. Somit war der Nachweis für das Vorhandensein von *roh* in den Stämmen # 3028 bis # 3033 gelungen.

**Abb. 24:**

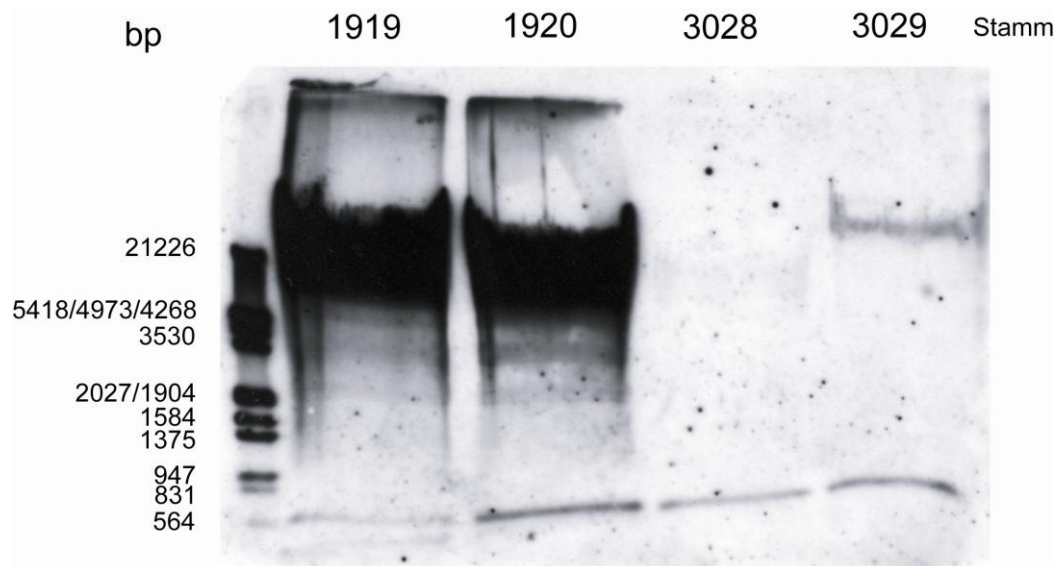
Restriktionsverdau *Hind* III und *Sph* I für „Southern Blot“ in Abbildung 26

In den aufeinander folgenden Spuren wurde von rechts nach links die Restriktionsverdaue der genomischen DNAs von *Enterobacter cloacae* # 1919, # 1920, # 3028 und # 3029 mit *Hind* III und *Sph* I in 1 %-Agarosegel aufgetragen.

**Abb. 25:**

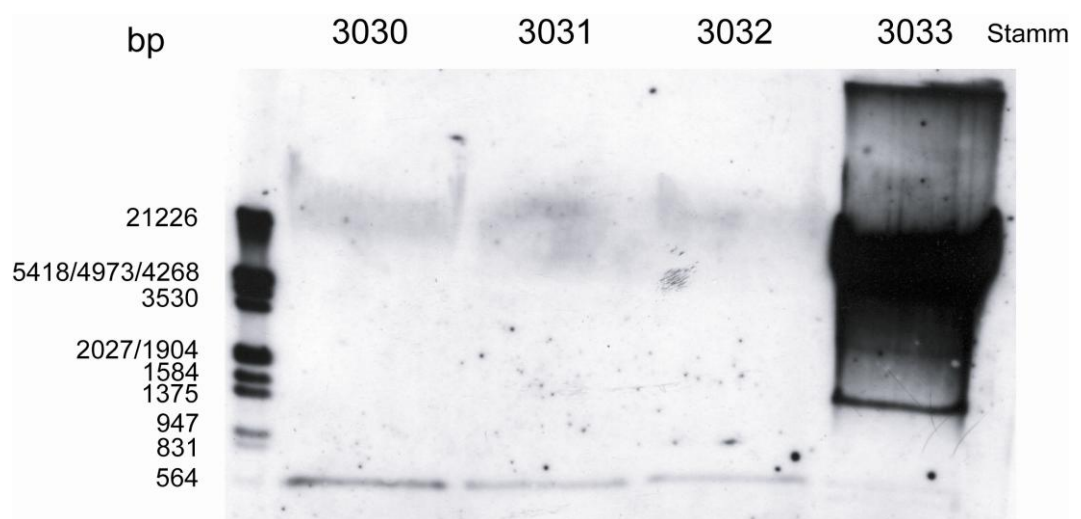
Restriktionsverdau *Hind* III und *Sph* I für „Southern Blot“ in Abbildung 27

In den aufeinander folgenden Spuren wurde von rechts nach links die Restriktionsverdaue der genomischen DNAs von *Enterobacter cloacae* # 3030, # 3031, # 3032 und # 3033 mit *Hind* III und *Sph* I in 1 %-Agarosegel aufgetragen.

**Abb. 26:**

Southern Blot des Restriktionsverdau *Hind* III und *Sph* I aus Abbildung 24 mit DIG-Sonde gegen *roh*

In der ersten Spur ist der DIG-markierte „DNA molecular weight marker III“ von Roche aufgetrennt. Die folgenden Spuren zeigen die Restriktionsverdaue von genomischen DNAs der *E. cloacae* # 1919, # 1920, # 3028 und # 3029 mit *Hind* III und *Sph* I. Die Abbildung zeigt den „Southern Blot“ nach Hybridisierung der cDNA-Sonde gegen *roh* und Sichtbarmachung der jeweiligen Sondenbindungen auf Röntgenfilm. Es kann bei circa 600 bp bei allen untersuchten *E. cloacae*-Stämmen *roh* nachgewiesen werden.

**Abb. 27:**

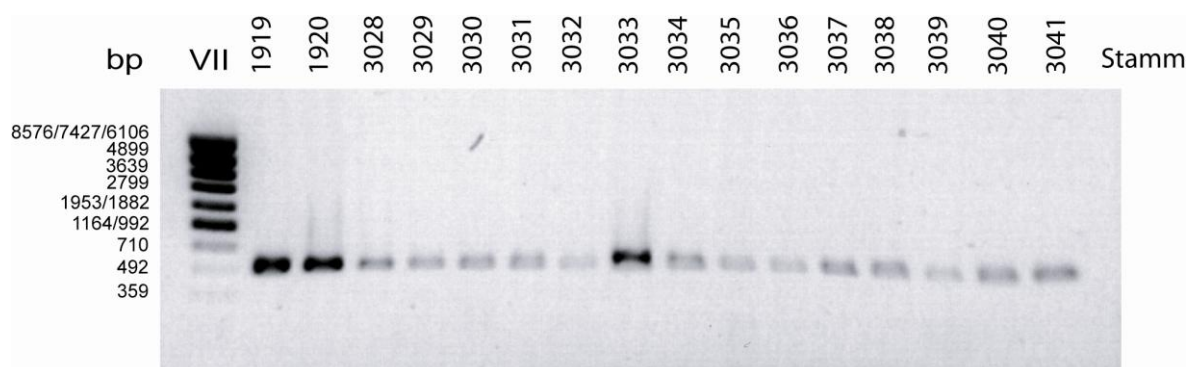
Southern Blot des Restriktionsverdau *Hind* III und *Sph* I aus Abbildung 25 mit DIG-Sonde gegen *roh*

In der ersten Spur wurde der DIG-markierte „DNA molecular weight marker III“ von Roche aufgetrennt. Die folgenden Spuren zeigen die Restriktionsverdaue von genomischen DNAs der *E. cloacae* # 3030, # 3031, # 3032 und # 3033 mit *Hind* III und *Sph* I. Die Abbildung zeigt den „Southern Blot“ nach Hybridisierung der cDNA-Sonde gegen *roh* und Sichtbarmachung der jeweiligen Sondenbindungen auf Röntgenfilm. Es kann bei circa 600 bp bei allen untersuchten *E. cloacae*-Stämmen *roh* nachgewiesen werden.

D 2.2 Suche nach *roh* mittels „touch down“-PCR in einzelnen Vertretern der durch H. Hoffmann neugruppierten Nomenspecies

*E. cloacae*³⁹

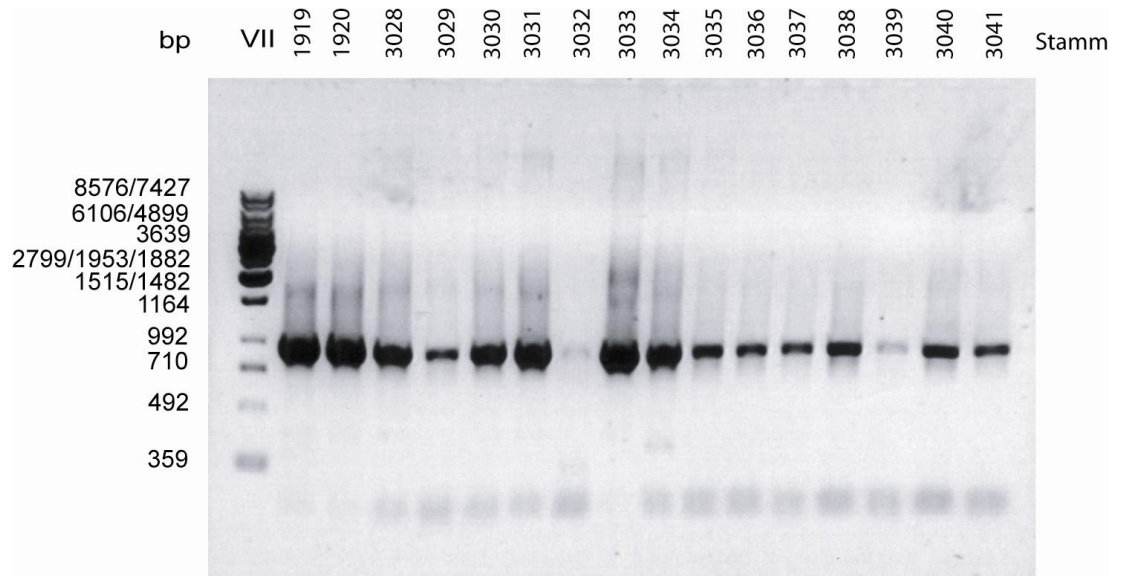
Da der Nachweis der DNA-Sequenz von Roh in allen mittels „Southern Blot“ untersuchten Bakterienclustern nach Hoffmann³⁹ gelungen war, gleichzeitig aber *roh* nicht zuverlässig mittels PCR nachgewiesen werden konnte, musste nun davon ausgegangen werden, dass die bisher verwendeten Primerpaarungen suboptimal binden. Somit wurde ein neues Primerpaar (1078, 1079) entworfen und mit diesem in den Stämmen # 3028–# 3041 Polymerasekettenreaktionen nach *roh* durchgeführt. Wiederum konnten, wie schon unter D 1.1, nach regulären PCR-Protokollen mit Annealing-Temperaturen von 52 °C bis 55 °C und bei regelrechten Kontrollen keine Amplifikationen des für Roh kodierenden Gens nachgewiesen werden. Analog zu den in D 1.2 beschriebenen Versuchen wurde nun mittels der Technik der „touch-down“-PCR durch sukzessives Absenken der Annealing-Temperaturen über die Zyklen der Reaktion versucht, eine etwas spezifischere Bindung der jeweiligen Primer zu bewerkstelligen. Es wurden zunächst 15 Zyklen mit 54 °C gefolgt von jeweils derselben Zyklenzahl mit 52 °C und 50 °C appliziert. Hiermit sollte wiederum Probleme beim Andocken der Primer an die zu untersuchende DNA umgangen werden. Es zeigte sich, dass mit dieser Art des PCR-Protokolls bei allen untersuchten Bakterienstämmen (Stämme # 3028 bis # 3041) PCR-Produkte der erwarteten Größe mittels Gelelektrophorese in 1,8 %-Agarosegelen sichtbar gemacht werden konnten. Die Kontrollen liefen hierbei regelrecht aus. Auch Wiederholungen der Versuche führten zum gleichen Ergebnis.

**Abb. 28:**

„Touch down“-PCR für *roh* (Primer 1078, 1079);

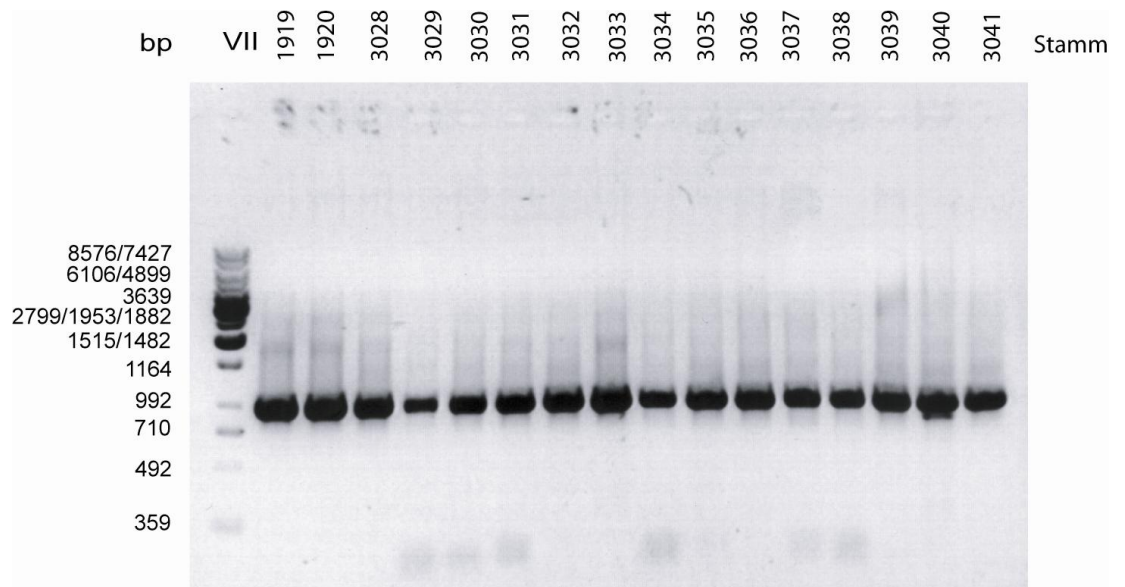
In der ersten Spur wurde der „DNA molecular weight marker VII“ von Roche aufgetrennt. Die folgenden Spuren zeigen die Produkte einer PCR mit den Primern 1078 und 1079 aus den genomischen DNAs der *Enterobacter cloacae* # 1919, # 1920 sowie # 3028 bis # 3041. Bei allen *E. cloacae* konnte *roh* mit den Primern 1078 und 1079 nachgewiesen werden.

Das Ergebnis wurde auch durch eine „touch down“-PCR mit dem neu entworfenen Primer 1080 und dem bekannten Primer 788 bestätigt. Es zeigten sich auch hier bei allen dreizehn Musterstämmen der Nomenspecies *E. cloacae* nach Hoffmann³⁹ PCR-Amplifikate erwarteter Größe. Desweiteren gelangen wie in den Abbildungen 29, 30 und 31 zu erkennen auch Nachweise von *roh* mit den Primerpaarungen 1079/1080 und 1079/479 (zur Positionierung der Primer: vgl. D 1.2, Abbildung 17). Bei allen Versuchen mit den neuen Primerpaarungen zeigten sich die Kontrollen regelrecht (vgl. Abbildung 32).

**Abb. 29:**

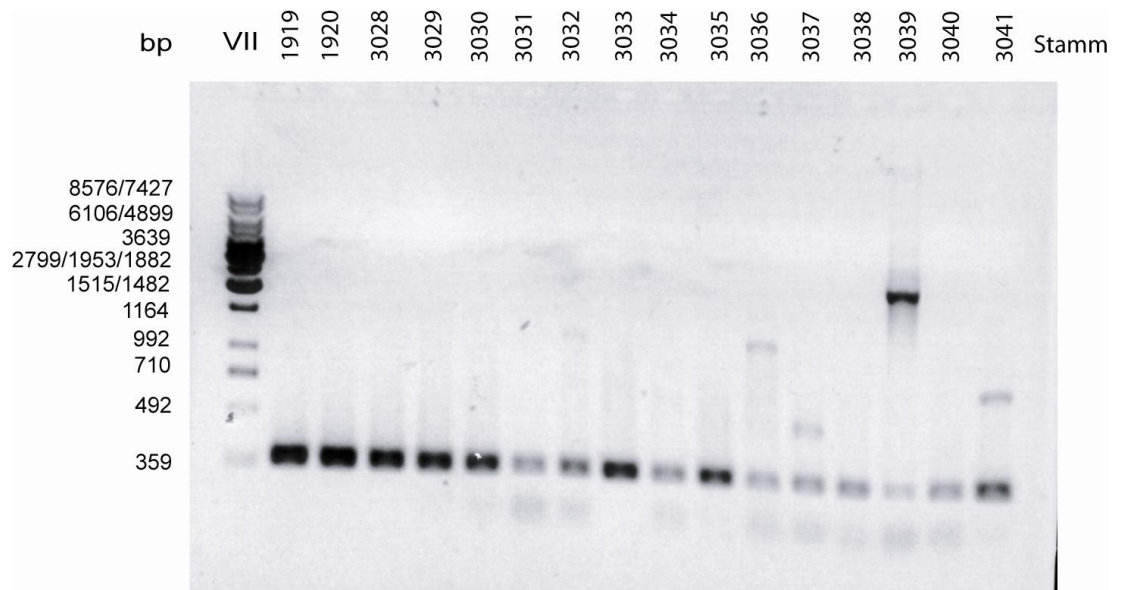
„Touch down“-PCR für *roh* (Primer 788, 1080)

In der ersten Spur wurde der „DNA molecular weight marker VII“ von Roche aufgetrennt. Die folgenden Spuren zeigen die Produkte einer PCR mit den Primern 788 und 1080 aus den genomischen DNAs der *Enterobacter cloacae* # 1919, # 1920 sowie # 3028 bis # 3041. Bei allen *E. cloacae* konnte *roh* mit den Primern 788 und 1080 nachgewiesen werden.

**Abb. 30:**

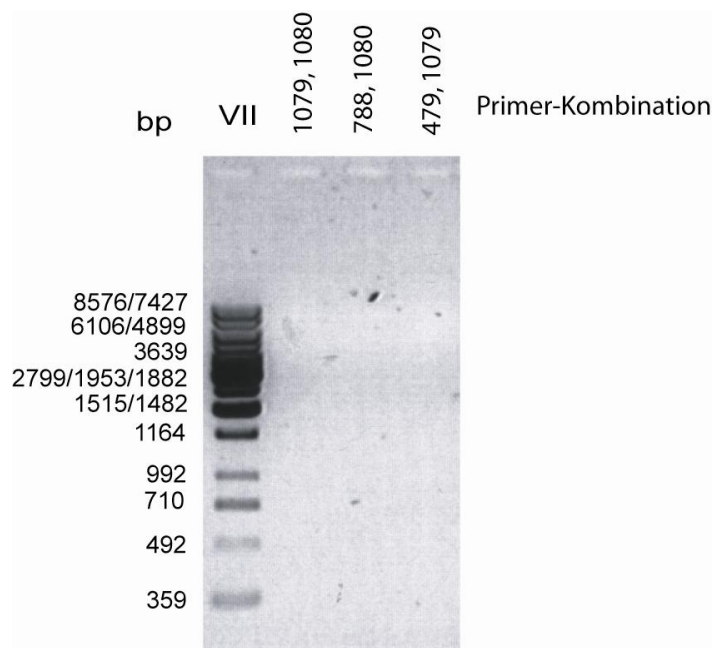
„Touch down“-PCR für *roh* (Primer 1079, 1080);

In der ersten Spur wurde der „DNA molecular weight marker VII“ von Roche aufgetrennt. Die folgenden Spuren zeigen die Produkte einer PCR mit den Primern 1079 und 1080 aus den genomischen DNAs der *Enterobacter cloacae* # 1919, # 1920 sowie # 3028 bis # 3041. Bei allen *E. cloacae* konnte *roh* mit den Primern 1079 und 1080 nachgewiesen werden.

**Abb. 31:**

„Touch down“-PCR für *roh* (Primer 479, 1079);

In der ersten Spur wurde der „DNA molecular weight marker VII“ von Roche aufgetrennt. Die folgenden Spuren zeigen die Produkte einer PCR mit den Primern 479 und 1079 aus den genomischen DNAs der *Enterobacter cloacae* # 1919, # 1920 sowie # 3028 bis # 3041. Bei allen *E. cloacae* konnte *roh* mit den Primern 479 und 1079 nachgewiesen werden.

**Abb. 32:**

„Touch down“-PCR für *roh*, H₂O-Negativkontrollen

In der ersten Spur wurde der „DNA molecular weight marker VII“ von Roche aufgetrennt. Die Spuren 2, 3 und 4 zeigen jeweils H₂O-Negativkontrollen mit den Primerkombinationen 1079/1080, 788/1080 und 479/1079. Alle Kontrollen fielen regelrecht aus.

Festzustellen ist also, dass nun neben der Ergebnisse im Southern Blot auch mittels Polymerasekettenreaktion Hinweise auf das Vorhandensein der Gensequenz von *roh* in allen untersuchten Bakterienstämmen gesammelt werden konnten.

D 2.3 Sequenzen und phylogenetischer Zusammenhang der Mustervvertreter der Nomenspecies *E. cloacae* sowie weiterer klinischer Isolate

Um das Vorhandensein von *roh* in den einzelnen Bakterienclustern nach Hoffmann³⁹ zu bestätigen, wurden die PCR-Produkte sequenziert. Anschließend sollte mittels des webbasierten HUSAR-Programms „TREE“ eine Analyse des Verwandtschaftsgrades und eventuelle Korrelation der Ergebnisse mit der Neueinteilung der Nomenspecies *Enterobacter cloacae*³⁹ durchgeführt werden. Mit diesem Programm können Stammbäume und Verwandtschaftsgrade aus DNA- oder auch Aminosäuresequenzen erstellt werden⁴⁸.

Hierzu wurden zunächst die schon in D 2.2 erläuterten Versuche zu PCR-Amplifikationen von *roh*-Genabschnitten mit den Primerpaarungen 788 / 1080 sowie 470 / 1079 und der gDNA der Bakterienstämme # 1920 und # 3028 bis # 3041 wiederholt. Diese wurden noch einer Reamplifikation unterzogen, um eine höhere Menge an DNA-Fragmenten aus den Polymerasekettenreaktionen zu erhalten. Zum Ausschluss von Kontamination bei der Reamplifikation wurden Negativkontrollen mitgeführt, welche alle regelrecht ausfielen. Folgend wurden die Ansätze noch mittels des PCR-Purification-Kits von Qiagen gereinigt. Durch die Firma GeneArt / Regensburg wurden die Sequenzen der Amplifikate bestimmt.

Dabei ließen sich in allen untersuchten Sequenzen unter Verwendung der Sequenz von # 1919 mit den Primern 641 und 642 als Vergleich *roh* nachweisen. Die Sequenzen wiesen innerhalb der durch die beiden Primer 641 und 642 flankierten Bereich keine Mutationen auf (Für die genauen erhaltenen Sequenzen: siehe

Tabelle 15 in Abschnitt „F Anhang“). Auch die in der genomischen Umgebung von *roh* lokalisierten Primer 788 und 479 lieferten in passenden Primerkombinationen (s.o.) bei *E. cloacae* # 3028 bis 3941 PCR-Signale. Die entsprechenden Sequenzen zeigten Übereinstimmung mit der aus Vorarbeiten der AG Linde aus *E. cloacae* bekannten genomischen Umgebung von *roh*. Es ist also davon auszugehen, dass sich in den Mustervertretern der Nomenspecies *E. cloacae roh* in der gleichen genomischen Umgebung wie bei *E. cloacae* # 1919 befindet.

Innerhalb der durch H. Hoffmann neugruppierten Nomenspecies *Enterobacter cloacae* konnten wegen der exakt gleichen Sequenz für *roh* keine phylogenetischen Zusammenhänge gezogen werden.

Die bisher in D 1.2 gewonnenen Sequenzen der Isolate aus der klinischen Routinediagnostik unterschieden sich in ihrer Sequenz (vgl. D 1.2, Tabelle 13). Im oben erwähnten „Husar TREE“-Programm eingesetzt ergab sich für *E. cloacae* # 1174, # 1207, # 1337, # 2257, # 2269, # 2299, # 2307, # 2798, # 2799, # 2805, # 2812, # 2829 und # 2878 der in Abbildung 33 gezeigte Stammbaum auf Basis von Homologien der jeweiligen Versionen von *roh*⁴⁸.

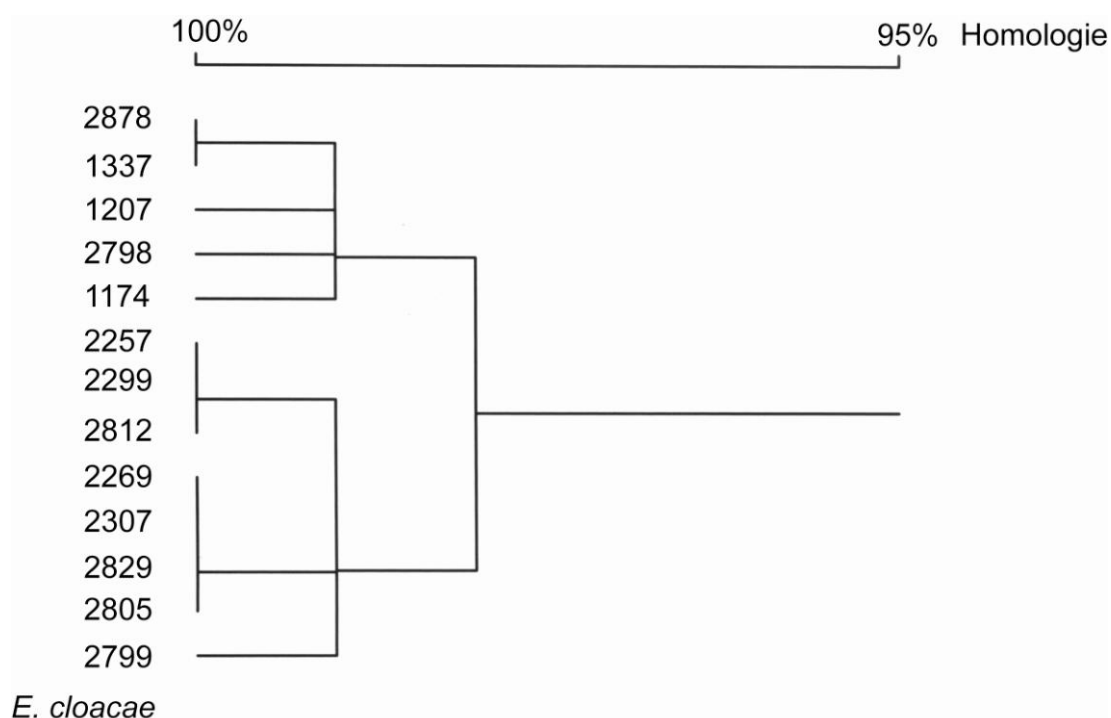


Abb. 33:

„homology tree“-Stammbaum von *E. cloacae* # 1174, # 1207, # 1337, # 2257, # 2269, # 2299, # 2307, # 2798, # 2799, # 2805, # 2812, # 2829 und # 2878. Gezeigt werden die Verwandtschaftsgrade zufällig ausgewählter klinischer Isolate von *E. cloacae* in Prozent an Homologie der jeweiligen Versionen von *roh*.⁴⁸

Zusammenfassend ist zu sagen, dass der Beweis für das Vorliegen der DNA-Sequenz von *roh* in allen Musterstämmen der einzelnen Cluster von *Enterobacter cloacae* in der Neugruppierung von H. Hoffmann³⁹ geführt werden konnte. Eine phylogenetische Gruppierung der Nomenspecies *Enterobacter cloacae* auf Grundlagen von *roh* konnte nicht angefertigt werden. Zufällig ausgewählte klinische Isolate, die aufgrund von bisherigen biochemischen Standardverfahren (vgl. B 1) der Nomenspecies *Enterobacter cloacae* zugeordnet wurden, unterschieden sich in der Sequenz von *roh* diskret. Eine Gruppierung in Abhängigkeit ihrer Homologie von *roh* konnte als Hinweis für phylogenetische Zusammenhänge mittels online verfügbarer Programme durchgeführt werden.

D 3 Überexpression von roh in Enterobacter cloacae mittels pUC19

D 3.1 Generierung von *Enterobacter cloacae*-Stämmen mit pUC19-*lacPr-roh-kana*

Nachdem das Vorkommen der Gensequenz des putativen Transkriptionsfaktors Roh in allen untersuchten *Enterobacter cloacae*-Stämmen nachgewiesen wurde, sollte nun seine Funktion genauer charakterisiert werden. Es wurde versucht, durch Überexpression von Roh die in Linde et al.⁵ mit Roh in Zusammenhang gebrachte Resistenzerhöhung gegenüber vorwiegend durch Multi drug efflux-Pumpen transportierten Antibiotika zu reproduzieren. Hierzu musste ein high copy-Plasmid generiert werden, in dem unter Kontrolle eines Lac-Promoters *roh* überexprimiert werden kann. Da dieses Plasmid in natürlicherweise ampicillinresistente *Enterobacter cloacae*-Stämme transformiert werden sollte, musste neben der im Plasmid schon vorhandenen Ampicillinresistenz eine Kassette für Kanamycinresistenz („*kana*“) eingefügt werden (vgl. Abbildung 34).

Als Ausgangskonstrukt konnte ein pUC19-Plasmid verwendet werden, in dem bereits ein *lac*-Promotor eingefügt worden war. Die Kanamycin-Resistenz-Kassette wurde mit Hilfe der Primer 1047 und 1157 aus einem kommerziell erhältlichen pCR4-Topo-Vektor amplifiziert. Geeignete DNA-Fragmente von *roh* wurden in einer PCR mit den Primern 641 und 642 aus Stamm # 1919 generiert. Passende Ligationsenden der einzelnen Bestandteile wurden erhalten, indem der Vektor pUC19-*lacPr* und *roh* mit *Nde* I und *Xba* I, sowie die Kanamycin-Resistenz-Kassette mit *Xba* I verdaut wurden. Um das Risiko für eine spontane Ligation von *roh* mit dem Vektor ohne die Resistenzkassette zu mindern, wurde das *roh*-Fragment mit dem Enzym „Calf Intestine Phosphatase“ von New England Biolabs / USA behandelt. Es schlossen sich Reinigungsschritte von pUC19-*lacPr*, *roh* und Resistenz-Kassette

durch Gelextraktion an. Die Ligation der drei Bestandteile konnte mittels einer T₄-Ligase von New England Biolabs / USA vollzogen werden.

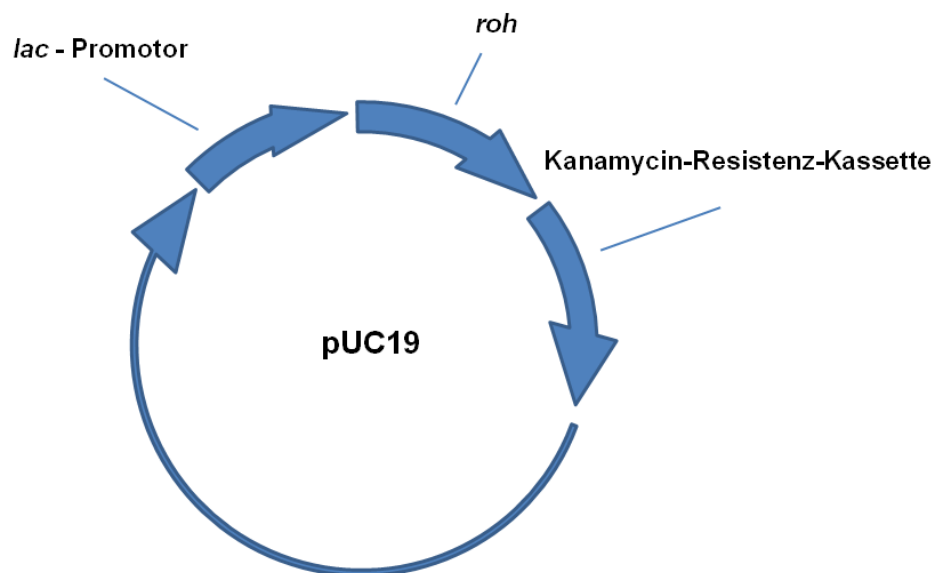


Abb. 34:

Schema des Expressionsvektors pUC19-*lacPr-roh-kana* (3859 bp); Hinter einem *lac*-Promotor wurden in einem pUC19-Plasmid *roh* und eine Kanamycin-Resistenz-Kassette („*kana*“) eingefügt.

Anschließend wurde der neu entstandene Vektor zur Vervielfältigung im Zwischenschritt in elektrokompente *Escherichia coli*-XL1 Blue transformiert. Diesem Laborstamm fehlt zum einen *endA*, eine Endonuklease, und zum anderen *recA*, eine Rekombinase. Das Fehlen von *endA* und *recA* stabilisierte die klonierten Inserts. Außerdem verhindert eine *hsdR*-Mutation den Abbau von klonierter DNA durch das *EcoK*-Endonukleasesystem⁴⁹. Dies sind Voraussetzungen, um das Plasmid in einem zweiten Schritt in Wildtyp-*Enterobacteriaceae* mit intakten Restriktionsmechanismen zu transformieren. Auf das Vorliegen des neu klonierten

Inserts wurde durch Anzüchten in kanamycinhaltigem LB-Flüssigagar ($C = 50 \mu\text{g/ml}$) selektioniert. Um die Orientierung der Kanamycin-Resistenz-Kassette zu überprüfen, wurden mehrere Klone der Bakterienpopulation nochmals einzeln entnommen und eine Plasmidisolierung mit anschließendem Restriktionsverdau mit *Sph* I durchgeführt. Es konnten je nach Orientierung der inserierten Kanamycin-Resistenz-Kassette zwei verschiedene Restriktionsmuster in einer Gelelektrophorese dargestellt werden (vgl. Abbildung 35).

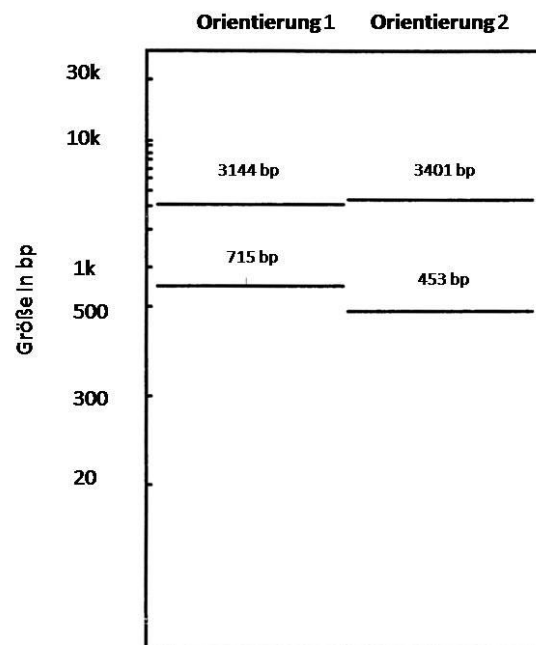


Abb. 35:

Restriktionsanalyse pUC19-*lacPr-roh-kana* mit *Sph* I
 Orientierung 1: gegensinnige Orientierung zu *lacPr-roh*
 Orientierung 2: gleichsinnige Orientierung wie *lacPr-roh*
 Plasmide mit der ersten Orientierung wurden im weiteren Verlauf „Plasmid a“ (von „anti“), Vektoren mit der zweiten Orientierung „Plasmid r“ (von „richtig“) genannt. Die mit den jeweiligen Plasmiden transformierten Stämme erhielten den Namenszusatz „-Plasmid r“ beziehungsweise „-Plasmid a“.

Genutzt wurden für weitere Transformationen ausschließlich Plasmide, in denen die Ausrichtung von *lacPr-roh* in gleichsinniger Orientierung vorlag. Damit wurde sichergestellt, dass im entsprechend transformierten Bakterium auch tatsächlich *roh*

abgelesen wurde, da ja durch Selektion mit Kanamycin auch die hierfür zuständige, hinter *roh* gelegene Kanamycin-Resistenz-Kassette transkribiert werden musste. Für weitere Transformationsversuche wurden nach Dower et al, 1988⁴⁶, elektrokompente *Enterobacter cloacae* aus den Stämmen # 1919, # 1920, # 3028, # 3036 und # 3038 generiert. Diese wurde dann durch Elektroporation mit dem Plasmid pUC19-*lacPr-roh-kana* transformiert und auf kanamycinhaltigem Agar selektioniert. Kontrolliert wurden die Klonierungsergebnisse durch Sequenzierung der isolierten Plasmide.

Es gelang, das Überexpressionsplasmid pUC19 mit der Gensequenz *lacPr-roh-kana* zu klonieren und in *E. coli* TOP10 und klinische Isolate von *Enterobacter cloacae* (# 1919, # 1920, # 3028, # 3036 und # 3038) zu transformieren. Die neu entstandenen Stämme wurden mit der ursprünglichen Stammnummer und als Zusatz „Plasmid r“ für gleichsinnige und „Plasmid a“ für gegensinnige Orientierung von *roh* und *kana* benannt. Für *E. cloacae* konnte kein Klon mit der Orientierung „Plasmid a“ erzeugt werden.

D 3.2 Phänotypische Testverfahren

D 3.2.1 Resistenztestung

Mittels des in D 3.1 angefertigten Plasmides pUC19-*lacPr-roh-kana* konnten nun die Effekte einer Überexpression des putativen Transkriptionsfaktors Roh überprüft werden. Vermutet wurde eine Erhöhung der MHK von typischerweise durch MDR-Effluxpumpen eliminierten Antibiotika^{4 50}. Eine hierfür geeignete Methode ist die Bebrütung eines Bakterienrasens unter Auflegen eines antibiotikumhaltigen Epsilometertest-Streifens (Etest[®], vgl. Abbildung 36). Die jeweiligen Kombinationen aus Bakterium und Antibiotikum wurden wiederholt, um eine höhere Aussagekraft des Ergebnisses zu gewährleisten.

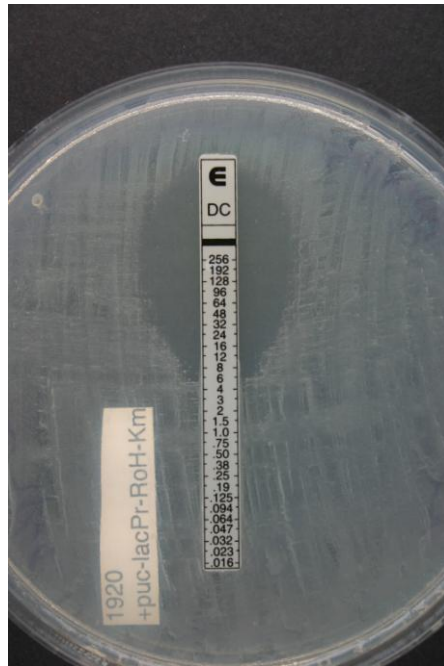


Abb. 36:

Beispiel für Etest®;
 Stamm: *E. cloacae* # 1920 mit pUC19-*lacPr-roh-kana* in der Version „Plasmid r“
 Antibiotikum Doxycyclin;
 MHK: 8 µg/ml

An untersuchten Bakterienstämmen wurden exemplarisch die in D 3.1 gewonnen *Enterobacter cloacae* # 1919, # 1920, # 3028, # 3036 und # 3038 ausgewählt. Für *E. cloacae* # 3028 konnte allerdings kein Klon mit der Plasmidorientierung „Plasmid a“ erzeugt werden (vgl. D 3.1). Die Ergebnisse der Testung wurden in der Tabelle 8 zusammengefasst. Als signifikant wurden diejenigen Testergebnisse erachtet, die sich um mehr als eine Skalierungseinheit auf dem Etest®-Streifen unterschieden.

Tabelle 8: Etest®-Auswertung für *Enterobacter cloacae* # 1919, # 1920, # 3028, # 3036 und # 3038; nicht transformierte versus mit pUC19-*lacPr-roh-kana* transformierte Formen

	Ciprofloxacin [µg/ml]	Moxifloxacin [µg/ml]	Norfloxacin [µg/ml]	Chloramphenicol [µg/ml]	Doxycyclin [µg/ml]
<i>E. cloacae</i> # 1919					
ohne Plasmid	1,5	3	8	8	64
Plasmid r	3	6	16	12	192
Plasmid a	3	6	12	8	192
<i>E. cloacae</i> # 1920					
ohne Plasmid	0,38	0,75	1,5	3	6
Plasmid r	1	2	3	4	16–24
Plasmid a	1	2	3	4	16–24
<i>E. cloacae</i> # 3028					
ohne Plasmid	0,006	0,032	0,047	2	1
Plasmid r	0,064	0,032	0,5	1,5	1,5
<i>E. cloacae</i> # 3036					
ohne Plasmid	0,032	0,094	0,094	2	2
Plasmid r	0,064	0,19	0,5	3	6
Plasmid a	0,032	0,19	0,25	3	6
<i>E. cloacae</i> # 3038					
ohne Plasmid	0,004	0,008	0,032	0,38	0,25
Plasmid r	0,006	0,032—0,047	0,032	0,75	0,38—0,50
Plasmid a	0,006	0,032—0,047	0,032	0,5	0,25

„Plasmid r“: *roh-kana* in gleicher Orientierung

„Plasmid a“: *roh-kana* in gegensinniger Orientierung

Die MHK für Ciprofloxacin steigerte sich unter Überexpression von *roh* durch „Plasmid r“ und „Plasmid a“ bei *E. cloacae* # 1919, # 1920 und # 3028 von 1,5 auf 3 µg/ml, 0,38 auf 1 µg/ml und von 0,006 auf 0,064 µg/ml (hier kein „Plasmid a“ vorhanden). Bei *E. cloacae* # 3036 änderte sich die MHK für Ciprofloxacin nur für die Version „-Plasmid r“ von 0,032 auf 0,064 µg/ml. Für *E. cloacae* # 3038 war für beide Plasmidorientierungen keine signifikante MHK-Änderung für Ciprofloxacin zu beobachten.

Bei der Bebrütung mit Etest®-Streifen für Moxifloxacin nahmen die MHKs bei pUC19-*lacPr-roh-kana*-Transformation in der Version „Plasmid r“ und „Plasmid a“ bei *E. cloacae* # 1920 und # 3038 am deutlichsten zu (0,75 auf 2 µg/ml, 0,008 auf 0,032–0,047 µg/ml). Für die Stämme *E. cloacae* # 1919 und # 3036 konnte bei *roh*-Überexpression durch die Plasmide „r“ und „a“ geringere MHK-Änderungen für Moxifloxacin gegenüber nicht-transformierten Stämmen festgestellt werden (3 auf 6 µg/ml und 0,094 auf 0,19 µg/ml). *E. cloacae* # 3028 zeigte bei Überexpression von *roh* keine MHK-Diskrepanzen für Moxifloxacin.

Im Rahmen der Norfloxacin-Testung zeigte sich gegenüber den nicht transformierten Varianten für *E. cloacae* # 3028 und # 3036 die deutlichsten MHK-Unterschiede zu den Stämmen mit pUC19-*lacPr-roh-kana* (0,047 auf 0,5 µg/ml und 0,094 auf 0,5 µg/ml bzw. 0,25 µg/ml für die Version „-Plasmid a“). Bei *E. cloacae* # 1919 änderte sich die MHK für Norfloxacin nur für die Orientierung „-Plasmid r“ eindeutig von 8 auf 16 µg/ml. *E. cloacae* # 1920 zeigte gegen Norfloxacin sowohl als „-Plasmid r“ als auch als „-Plasmid a“ gegenüber der nicht transformierten Variante eine MHK-Änderung von 1,5 auf 3 µg/ml. Bei *E. cloacae* # 3038 konnte keine MHK-Diskrepanz für Norfloxacin zwischen transformierten und nicht-transformierten Stämmen gesehen werden.

Für Chloramphenicol konnte bis auf *E. cloacae* # 3038 versus *E. cloacae* # 3038-„Plasmid r“ (0,38 auf 0,75 µg/ml) keine eindeutiger MHK-Anstieg durch pUC19-*lacPr-roh-kana* gezeigt werden.

Doxycyclin-Testungen ergaben für *E. cloacae* # 1919, # 1920 und # 3036 deutliche MHK-Anstiege bei *roh*-Überexpression mittels „Plasmid r“ und „Plasmid a“ (64 auf 192 µg/ml, 8 auf 16–24 µg/ml, 2 auf 6 µg/ml). Die Stämmen *E. cloacae* # 3028 und # 3038 hingegen wiesen nur diskrete bis fehlende MHK-Veränderungen für Doxycyclin durch *roh*-Überexpression auf.

Cipro-, Nor-, Moxifloxacin, Chloramphenicol und Doxycyclin werden nach geläufiger Literaturmeinung^{50 4} bevorzugt durch *multi drug-efflux*-Pumpen aus Bakterien befördert. Somit sprechen die Ergebnisse für eine Funktion Rohs in der Signalkaskade zur Aktivierung von unspezifischen Resistenzmechanismen via Aktivierung von MDR-Pumpen.

D 3.2.2 Testung der Resistenz von ^{pUC19-lacPr-roh-kana+}*Enterobacter cloacae*-Stämmen gegenüber organischen Lösungsmitteln

Eine Resistenzerhöhung durch Aktivierung von MDR-Effluxpumpen zeigt sich neben erhöhter Verträglichkeit von bestimmten Antibiotika auch in der Erhöhung von Lösungsmittelresistenz^{51 52}. Es wurde somit ein Versuchsaufbau entworfen, in dem verschiedene Lösungsmittel mit steigender Fähigkeit zur Lösung organischer Moleküle während der Inkubation von Bakterien appliziert wurden. Ausgewählt wurden Dodecan, Octan, Hexan, Cyclohexan und Toluol. Diese wurden wiederum mit den das Plasmid pUC19-*lacPr-roh-kana* enthaltenden Bakterienstämmen (*E. cloacae* # 1919, # 1920, # 3028, # 3036 und # 3038; jeweils in den Versionen „Plasmid r“) inkubiert. Als Kontrolle wurden nicht transformierte Bakterien des gleichen Stamms verwendet. Die Auswertung erfolgte durch Beurteilung des Bakterienwachstums nach drei Tagen Inkubation unter Lösungsmittelzusatz. Die Ergebnisse werden in Tabelle 9 dargestellt. Ein Beispiel für den beschriebenen Versuchsaufbau zeigt Abbildung 37.

Tabelle 9: Auswertung Resistenz gegenüber organischen Lösungsmitteln von transformierten vs. nicht-transformierten *Enterobacter cloacae*-Stämmen

	<i>E. cloacae</i> # 1919		<i>E. cloacae</i> # 1920		<i>E. cloacae</i> # 3036		<i>E. cloacae</i> # 3038	
pUC19- <i>lacPr-roh-kana</i> in Orientierung r	ohne	mit	Ohne	mit	ohne	mit	ohne	mit
Dodecan	+	+	+	+	+	+	+	+
Octan	+	+	+	+	+	+	-	+
Hexan	+	+	+	+	+	+	-	-
Cyclohexan	+	+	-	-	-	-	-	-
Toluol	-	-	-	-	-	-	-	-

„+“: Wachstum

„-“: kein Wachstum

Lediglich bei *Enterobacter cloacae* # 3038 zeigte sich in Gegenwart von Octan Wachstum, wenn das Bakterium pUC19-*lacPr-roh-kana* enthielt und also *roh* überexprimierte. War das Plasmid nicht vorhanden, konnte sich dieser Stamm bei Octanzugabe nicht vermehren. Alle anderen untersuchten Bakterienstämme konnten durch Überexpression von *roh* mittels pUC19-*lacPr-roh-kana* keine entscheidenden Wachstumsvorteile in Gegenwart von verschiedenen Lösungsmitteln erlangen.

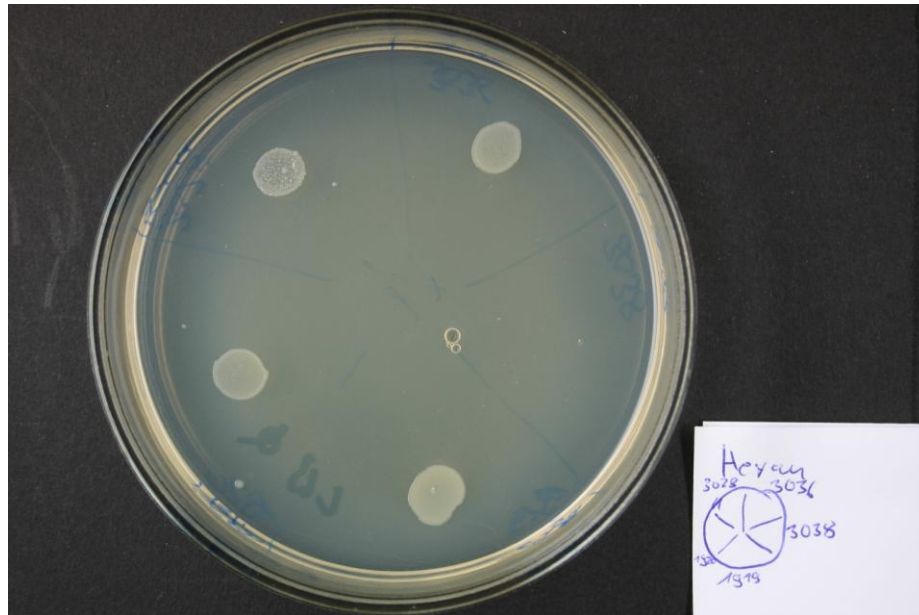


Abb. 37:

Beispiel OST-Bestimmung;

Lösungsmittel: Hexan

Stämme (beginnend bei 18 Uhr, im Uhrzeigersinn): *Enterobacter cloacae* # 1919, # 1920, # 3028, # 3036, # 3038 (alle ohne pUC19-lacPr-roh-kana)

Zur Auswertung wurden nur die Kriterien „kein Wachstum“ und „Wachstum“ herangezogen und in Abhängigkeit von zugesetztem Lösungsmittel und Stammnummer dokumentiert. Im abgebildeten Fall würde somit für *E. cloacae* # 1919, # 1920, # 3028 und # 3036 „Wachstum“, für # 3038 „kein Wachstum“ unter Hexan protokolliert.

D 4 Testung der Resistenz von ^{pUC19-lacPr-roh-kana+}*Enterobacter cloacae*-Stämmen gegenüber Cadmium-Ionen

Auch gegen Cd^{2+} -Ionen wurde eine Efflux-vermittelte Resistenz beschrieben^{53 54 38}.

Desweiteren wurden in Vorarbeiten versucht, die genomische Umgebung von *roh* zu sequenzieren. Im Stämmepärchen # 1919 und # 1920 lag der für Roh kodierende Abschnitt in einem Operon, welches unter anderem Erbgut-Informationen für eine Cd^{2+} -Pumpe enthält. Nun stellte sich die Frage, ob durch Cd^{2+} -Exposition eventuell MHK-Veränderungen von Antibiotika induziert werden können. In diesem Abschnitt soll untersucht werden, ob eventuell Roh auch Resistenz gegenüber Cadmium vermittelt.

Entworfen wurde das Experiment als Endpunktmessung. Bakterienstämme mit und ohne Plasmid-vermittelte Überexpression von *roh* wurden verschiedenen Verdünnungen von CdCl_2 ausgesetzt. Gemessen wurde dann das Wachstum nach drei Tagen Inkubation (vgl. Beispiel in Abbildung 38).

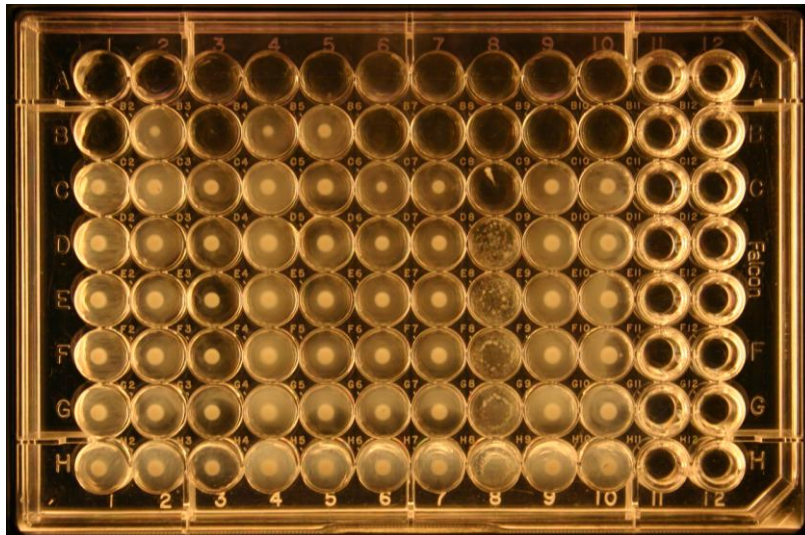


Abb. 38:

Beispiel Bestimmung MHK für Cd^{2+}

Auftragungsschema:

Spalte 1–5: *E. cloacae* # 1919, # 1920, # 3028, # 3036, # 3038 ohne Plasmid;

Spalte 6–10: *E. cloacae* # 1919, # 1920, # 3028, # 3036, # 3038 „-Plasmid r“;

Zeile A–H: $c(\text{Cd}^{2+})$: 1mM, 0,5mM, 0,25mM, 0,125mM, 0,0625mM, 0,03125mM, 0,0156mM, 0,0078mM

Es wurde jeweils diejenige Konzentration von Cd^{2+} vermerkt, bei der der entsprechende Bakterienstamm gerade kein Wachstum mehr zeigte (= MHK). Die Auswertung wurde in Tabelle 10 festgehalten.

Die zu untersuchenden Stämme waren *Enterobacter cloacae* # 1919, # 1920,

3028, # 3036 und # 3038 jeweils als „-Plasmid r“ und „-Plasmid a“ (vgl. D 3.1:

„Plasmid r“: gleichsinnige Orientierung *roh-kana*; „Plasmid a“: gegensinnige

Orientierung *roh-kana*). Von *E. cloacae* # 3028 konnte kein Klon mit

pUC19-*lacPr-roh-kana* in der Orientierung „Plasmid a“ erzeugt werden. Zur Kontrolle

dienten die gleichen Stämme ohne Plasmid. Die Verdünnungen von Cd^{2+} waren

1:2-Verdünnungsreihen von 1 mM bis zu 7,8125 μM . Nach Inkubation und

fotografischer Dokumentation ergab sich Tabelle 10.

Tabelle 10: Übersicht MHK für Cadmium²⁺

	<i>E. cloacae</i> # 1919			<i>E. cloacae</i> # 1920			<i>E. cloacae</i> # 3028			<i>E. cloacae</i> # 3036			<i>E. cloacae</i> # 3038		
Triplikat	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
MHK ohne Plasmid [mg/l]	0,5	0,5	0,5	0,5	1	1	0,5	0,5	0,5	0,5	1	0,5	1	1	1
MHK mit „Plasmid r“ [mg/l]	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
MHK mit „Plasmid a“ [mg/l]	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	-	-	-	0,5	0,5	0,5	0,5	1	0,5

Plasmid: pUC19-*lacPr-roh-kana*

„Plasmid r“: Kanamycinresistenz-Kassette in gleicher Orientierung wie *roh*

„Plasmid a“: Kanamycinresistenz-Kassette in gegenläufiger Orientierung wie *roh*

Für *E. cloacae* # 3028 konnte kein Klon mit pUC19-*lacPr-roh-kana* in der Orientierung

„Plasmid a“ erzeugt werden

Die Untersuchungen zeigten, dass sich mittels Überexpression von *roh* durch Transformation von pUC19-*lacPr-roh-kana* in elektrokompetente *Enterobacter cloacae* keine signifikante Veränderung des Wachstums bei Schwermetallexposition gegenüber zweiwertigen Cadmiumionen hervorrufen ließ.

E Diskussion

Ziel dieser Arbeit war es, den putativen Transkriptionsfaktor Roh genauer zu charakterisieren.

Entdeckt wurde *roh*, als in Vorarbeiten zwei eng miteinander verwandte klinische Isolate von *Enterobacter cloacae* auf neu induzierte Resistenzmechanismen hin untersucht worden waren ⁵. Beide Stämme stammten von derselben Person, zeigten aber diskrepante Sensibilitäten gegenüber Ciprofloxacin. Durch Vorarbeiten wurden als mögliche Ursache Hinweise auf Aktivierung eines bis dahin unbekannten Transkriptionsfaktors mit Assoziation zum System der „multi drug efflux“-Pumpen gefunden. Der Faktor wurde wegen enger Sequenzhomologie mit dem bereits bekannten Transkriptionsfaktor „Rob“ ³ mit „Rob-homolog“ oder kurz „Roh“, seine Gensequenz „*roh*“ benannt.

Die folgenden Fragestellungen sollten untersucht werden:

- Vorkommen von *roh* in verschiedenen klinischen Isolaten von *Enterobacter cloacae*
- Vorkommen von *roh* in einzelnen Vertretern der durch H. Hoffmann neu gruppierten Nomenspecies *Enterobacter cloacae* ³⁹ sowie Erstellen eines phylogenetischen Baums auf Basis von *roh*
- Auswirkung der Überexpression von *roh* in *E. cloacae*-Isolaten auf die MHK für typischerweise durch MDR-Effluxpumpen transportierten Antibiotika
- Auswirkung der Überexpression von *roh* in *E. cloacae*-Isolaten auf ihre „organic solvent tolerance“
- Auswirkung der Überexpression von *roh* in *E. cloacae*-Isolaten auf die MHK gegenüber Cadmium-Ionen

E 1: Suche nach roh in verschiedenen klinischen Isolaten von Enterobacteriaceae

Um Aussagen über die Relevanz des neu entdeckten putativen Transkriptionsfaktors Roh treffen zu können, musste zunächst sein Vorkommen in verschiedenen Isolaten der *Enterobacteriaceae* genauer überprüft werden. Nachdem anfänglich übliche PCR-Schemata nicht zum Erfolg führten, gelang es mit der Methode der sogenannten „touch down“-PCRs, in einigen Stämmen die Gensequenz des putativen Transkriptionsfaktors zu finden. Es befanden sich ausschließlich Vertreter der Nomenspecies *Enterobacter cloacae* unter den Stämmen mit erfolgreichem Nachweis. Bestätigt wurde das Vorhandensein von *roh* in den Stämmen # 1919 und # 1920, welche die beiden Stämme der ursprünglichen Veröffentlichung darstellen ⁵. Darüber hinaus konnte bei einigen der Stämme mit in der aus # 1919 und # 1920 bekannten genomischen Umgebung lokalisierten Primerbindungssequenzen Nachweise von *roh* geführt werden. Kritisch anzumerken wäre, dass die meisten PCR-Versuche eine hohe Zykluszahl bis zur Erzeugung deutlicher Produkte benötigten. Es könnten also minimale Verunreinigungen der Versuchsansätze mit genomischer DNA zu falsch positiven Signalen geführt haben. Dem spricht entgegen, dass Negativkontrollen mit H₂O als Ersatz für die Zugabe genomischer DNA und ansonsten üblichem Ansatz auch nach den benötigt hohen PCR-Zyklen richtig-negativ ausfielen. Somit enthielten zumindest die Lösungen, die als Master Mix für die einzelnen Reaktionen verwendet worden waren, keine Verunreinigungen. Dies schließt natürlich die Kontamination der einzelnen Lösungen genomischer DNA der Bakterien nicht aus. Jedoch minimierte sich das Risiko, hier DNA-Fragmente über alle Versuchsreihen verschleppt zu haben, durch jeweils frische Isolierung der gerade benötigten DNA mit neuen Reagenzien. Ein weiterer Kritikpunkt am Nachweis *rohs* mittels Polymerasekettenreaktion ist, dass es auch durch die hohe Zykluszahl der Reaktionen zu unspezifischen Primerbindungen mit nachfolgender Amplifikatgenerierung im zufällig passenden Größenbereich

gekommen sein könnte. Durch die Modifikationen im Rahmen einer „touch down“-PCR könnten ebenso derartige Fehler erzeugt werden. Um dies zu entkräften, wurden zum einen gewonnene Amplifikate exemplarisch nach Subklonierung sequenziert. Die Subklonierung wurde durchgeführt, weil die Menge der PCR-Produkte für eine direkte Sequenzierung nicht ausreichte. In der Sequenzanalyse bestätigte sich das Vorliegen von *roh*. Zum anderen konnte mittels Southern Blot-Versuchen bei ungleich höherer Anzahl an benötigten komplementären Basenbindungen und damit erniedrigtem Risiko für das Anzeigen von falsch-positiven Signalen ebenfalls das Vorhandensein von *roh* nachgewiesen werden. Ein weiterer Grund für die Durchführung des Southern Blots war die anfängliche Vermutung, dass sich innerhalb der Erkennungssequenz der ursprünglich genutzten Primerpaare 641 und 642 bei den einzelnen untersuchten Bakterienstämmen Abweichungen von der aus # 1919 und # 1920 bekannten Basenabfolge befänden. Somit wäre es möglich, dass diese Primer schlechter binden und damit höhere Zyklenzahlen oder Abwandlungen im Rahmen einer „touch down“-PCR für eine höhere Wahrscheinlichkeit der Bindung an ihre Erkennungssequenz benötigen. Es ist allerdings auch denkbar, dass die ursprünglichen Annealingtemperaturen der Standard-PCR für die gewählten Primerpaare zu nah an den Schmelztemperaturen (T_m) der Primer gewählt wurden. Auch könnten zu deutliche Unterschiede in den T_m der Primerpaarungen eine Bindung und den folgenden Amplifikationsstart erschweren (Für die T_m der einzelnen Primer: vgl. Tabelle 3). Gerade bei einer „touch down“-PCR würden dann die Primerpaare durch unterschiedliche Annealing-Temperaturen mit höherer Wahrscheinlichkeit idealere Bedingungen für komplementäre Bindungen vorfinden. Bei Betrachtung der vorliegenden Sequenzen konnten in den Primerbindungssequenzen keine Mutationen festgestellt werden. Somit würde die Annahme gestützt, dass eher die gewählten Cyclereinstellungen zum Misslingen regulärer PCR-Protokolle beigetragen haben. Eine optimalere

Auswahl der Primersequenzen, -paarungen und Amplifikationsbedingungen könnte zur Verbesserung der Screening-PCRs führen.

Weiterhin wurde mit in der aus # 1919 und # 1920 bekannte Umgebung von *roh* lokalisierten Primern untersucht, ob sich in den neu für *roh* positiven Bakterienstämmen das Gen auch an gleicher Stelle im Genom befindet. Es waren zwar deutliche Banden zu sehen, allerdings mit zum Teil abweichender Größe. Bei einigen Stämmen zeigten sich auch Doppelbanden. Hier könnte man ebenso die schon oben genannten Kritikpunkte der Möglichkeit unspezifischer Produktgenerierung bei Polymerasekettenreaktionen mit entsprechenden Gegenargumenten anführen. Wenn die PCR-Fragmente jedoch real die Lokalisation in der Umgebung von *roh* anzeigen, spricht dies wegen der Größenzu- oder abnahme für Mutationen wie Insertionen oder Deletionen im untersuchten DNA-Abschnitt. Auch wäre eine andere Lokalisation von *roh* in den untersuchten *E. cloacae* denkbar. Zum einen zeigen die PCRs mit in der aus *E. cloacae* # 1919 gewonnen genomischen Umgebung von *roh* gelagerten Primern bei nur wenigen anderen Stämmen Banden; zum anderen konnten in den diesen Banden entnommenen Sequenzen auch nur zum Teil Ausschnitte aus den entsprechenden Abschnitten aus *E. cloacae* # 1919 gefunden werden. Verunreinigungen der Versuchsansätze mit passender DNA wären wegen der unterschiedlichen Größen der gewonnenen Amplifikate eher als unwahrscheinlich zu werten; hierbei müssten sich Produkte gleicher Größe ergeben. Auch sprechen regelrecht ausfallende Kontrollansätze mit reinem Wasser anstelle von genomischer DNA gegen eine Verunreinigung der Reagenzien. Die Abänderungen in der Sequenz um *roh* könnten inhibierende oder aktivierende Wirkung haben und somit einer der Gründe für Wildtyp-Diskrepanzen in der Antibiotikaresistenz einzelner Stämme darstellen. Hierzu bedarf es noch weiterer Abklärungen wie der Subklonierung und Sequenzierung weiterer generierten PCR-Fragmente.

Festzuhalten ist, dass in allen untersuchten klinischen Isolaten aus der Nomenspecies *Enterobacter cloacae* das Gen für den putativen Transkriptionsfaktor Roh nachgewiesen werden konnte. Die Sequenzen wiesen hohe Homologien zueinander auf. Die trotzdem entdeckten Diskrepanzen in den jeweiligen Versionen von *roh* könnten an sich durch einen Prozess der Resistenzentwicklung gegenüber antimikrobieller Medikation bedingt sein. Wenn der Faktor, wie vermutet, Teil eines über Effluxpumpen mediierten Abwehrmechanismus ist, könnte es zum Beispiel für die Stämme nötig sein, bei größtmöglichem Erhalt der Funktion des Transkriptionsfaktors doch Angriffspunkte verschiedener Antibiotika oder sonstiger, schädlicher Substanzen zu verändern. Die Abänderung erhielte dann die Resistenz des Bakteriums gegenüber der Noxe. Ein guter Weg, dies zu bewerkstelligen, sind Sequenzmutationen⁵⁰, wie sie in dieser Arbeit auch in *roh* nachgewiesen wurden. Hierbei bliebe trotz Mutation, also Veränderung der Sequenz und damit des putativen Erkennungsmerkmals für schädliche Stoffe, der meiste Teil des Proteinaufbaus erhalten – wenn es bei dieser genetischen Veränderung nicht zur Generierung von Stopcodons oder ähnlichen transkriptions- oder funktionseinschränkenden Veränderungen kommt. Als Exempel kann die Resistenzentwicklung gegenüber Fluorochinolonen durch Punktmutation im für GyrA kodierenden Genabschnitt angeführt werden, was in der Literatur bereits mehrfach beschrieben worden ist^{55 56, 57}.

Insgesamt spricht der Befund einer gut konservierten Gensequenz in Verbindung mit dem gezeigten Vorkommen in allen untersuchten Bakterien für eine bedeutende funktionelle Relevanz des hierin kodierten Proteins. Andernfalls wären Mutationen innerhalb der Gensequenz schon deshalb wahrscheinlich, da für Bakterien dann kein entscheidender Nachteil in ungenauer Replikation der DNA dieses Abschnitts entstehen würde.⁵⁸ Anzumerken ist aber, dass die meisten Stämme klinischen Isolate waren, also aus einem bereits vorselektionierten Kollektiv entstammten. Denkbar wäre zum Beispiel ein Selektionsdruck in Richtung Konservierung des

Faktors durch gehäufte Antibiotikaapplikation im Rahmen klinischer Aufenthalte. Eine weitere Möglichkeit der Vorselektionierung von Stämmen ist in enger Verbindung hierzu zu sehen: die untersuchten Stämme wurden zumeist aus kranken Individuen gewonnen. Es ist als in erhöhtem Maße davon auszugehen, dass es sich um pathogene Mikroorganismen handelt. Wenn nun *roh* einen Pathogenitätsfaktor darstellen sollte, würde das gehäufte und konservierte Vorkommen auch durch seine Bedeutung in der Krankheitsentstehung erklärt. Bakterien, die diesen nicht hätten, würden klinisch auch weniger auffällig werden und somit in diagnostischer Absicht seltener festgestellt. Um nun die generelle Bedeutung des Faktors genauer zu charakterisieren, wären deswegen auch Screeninguntersuchungen mit nicht aus klinischer Umgebung stammenden Bakterienstämmen durchzuführen.

E 2: Suche nach roh in den dreizehn Bakterienclustern der Neugruppierung der Nomenspecies *Enterobacter cloacae*³⁹ und phylogenetische Zusammenhänge

Die Verbreitung von *roh* in der durch H. Hoffmann neugruppierten Nomenspecies *Enterobacter cloacae*³⁹ sollte genauer untersucht und durch Vergleiche der einzelnen Sequenzen eventuell phylogenetische Zusammenhänge nachvollzogen werden. Sowohl mit Polymerasekettenreaktion als auch mit Southern Blots gelang es, *roh* zu identifizieren. Ebenso wie bei E 1 sind zunächst methodische Kritikpunkte anzuführen. So könnten die Polymerasekettenreaktionen mit hoher Zykluszahl unspezifische Banden ähnlicher Größe wie die erwarteten generiert haben. Diesem würden zum einen die positiven Southern Blot-Ergebnisse widersprechen. Zum anderen fielen die H₂O-Kontrollen anstelle von genomischer DNA in den PCR-Ansätzen als Überprüfung der Reinheit der Reagenzien ebenfalls richtig-negativ aus. Die Sequenzierungen der amplifizierten Abschnitte verifizierten das Vorliegen von *roh* endgültig.

Auch bei den Musterstämmen der neugruppierten Nomenspecies *E. cloacae* bestätigte der hohe Konservierungsgrad von *roh* die unter E 1 erwähnten Überlegungen zur generellen Bedeutung von *Roh* in *Enterobacter cloacae*. Ein denkbarer Grund für den hohen Konservierungsgrad von *roh* abseits von phylogenetischen Zusammenhängen wäre wiederum Selektionsdruck durch antimikrobielle Therapie (vgl. Sutton, 1997⁵⁸). Hierbei würde der Kontakt der Bakterienstämme mit entsprechenden Medikamenten eine evolutionstechnische Notwendigkeit zur Erhaltung des potentiell resistenzvermittelnden Transkriptionsfaktors darstellen und unabhängig von Verwandtschaftsgraden die exakte Erhaltung von *roh* erklären. Es könnte dem entgegen gehalten werden, dass H. Hoffmann versuchte, in seiner Veröffentlichung 2003 die Wildtyp-Vorkommen an *Enterobacter cloacae*-Stämmen abzubilden. Im Methodenteil der Publikation ist allerdings erwähnt, dass auch dort die meisten Stämme klinische Isolate, wenn auch aus einer breiten internationalen Auswahl an Hospitälern, waren³⁹. Es ist also durchaus eine Verzerrung des Abbildes der natürlichen Population in Richtung typischerweise in klinischer Umgebung vorkommender Bakterienstämme denkbar.

In allen dreizehn Mustervertreterstämmen von *E. cloacae* von H. Hoffmann war die Sequenz von *roh* identisch. Somit konnten auf der Basis von *roh* keine phylogenetischen Beziehungen hergestellt werden. Ein interessanter Befund ist allerdings, dass die vorher bereits sequenzierten *E. cloacae*-Stämme aus der klinischen Routinediagnostik sich in der Basenabfolge von *roh* deutlich unterschieden und auch ein phylogenetischer Stammbaum erstellt werden konnte. Eine mögliche Erklärung wäre, dass die einzelnen klinischen Isolate ursprünglich nur aufgrund von biochemischen Merkmalen der Nomenspecies *Enterobacter cloacae* zugeordnet wurden. Die Heterogenität der Nomenspecies ist allerdings bereits seit längerem Gegenstand intensiver Überlegungen (vgl. Farmer 1985⁵⁹; Weischer, 1993^{60 61}; Clementino, 2001⁶² und Hoffmann, 2003³⁹). Unter Umständen kann mit Hilfe der Sequenzanalyse von *roh* unter den mittels biochemischen

Methoden wie der sogenannten „bunten Reihe“ *E. cloacae* zugeordneten Isolaten eine genauere Differenzierung und vor allem exakte Zuordnung zur Nomenspecies *Enterobacter cloacae* durchgeführt werden. Die Sequenzierung könnte sich dazu eignen, innerhalb von *Enterobacter* Verwandtschaftsgrade durch Erstellung phylogenetischer Stammbäume auf Basis von *roh* zu beleuchten und neue Untergruppen abzugrenzen. Einschränkend muss hierzu erwähnt werden, dass lediglich eine vergleichsweise geringe Anzahl an klinischen Isolaten von *E. cloacae* auf die Sequenz von *roh* gescreent wurde. Für aussagekräftige Analysen der genetischen Zusammenhänge müsste ein größeres Bakterienkollektiv von mehreren Standorten untersucht werden. Die in dieser Arbeit angefertigten phylogenetischen Zusammenhänge können aber die Durchführbarkeit einer solchen Studie bestätigen.

E 3: Versuche zur phänotypischen Charakterisierung

Durch arbeitsgruppeninterne Vorarbeiten waren Vermutungen aufgekommen, dass Roh ein Transkriptionsfaktor im System bakterieller Effluxpumpen sei. Entdeckt wurde dieser bei Untersuchungen eines Bakterienstämmepärchens zwei eng verwandter Isolate von *Enterobacter cloacae*. Diese beiden klinischen Isolate zeigten divergente Resistenz gegenüber Fluorochinolonen. Aktivierung üblicher Resistenzmechanismen konnte bis auf eine des Efflux-Systems nicht nachgewiesen werden. Auch die bisher bekannten Transkriptionsfaktoren waren in ihrer Expression nicht beeinflusst ⁶³.

Bei Betrachtung der Sequenz von *roh* im Vergleich zu der in enger Homologie stehenden von Rob, einem im Rahmen von Effluxpumpen-Aktivierung wichtigen Faktor ³, fällt auf, dass die Sequenzhomologie im putativen DNA-Bindungs Bereich am N-terminalen Ende des Gens lokalisiert ist. Es fehlt bei *roh* aber der C-terminale Bereich, der als Ligandenbindungsdomäne von Rob erachtet wird ^{35 3}. Genauerer Betrachtung durch zukünftige Versuche bedarf sicherlich somit auch die Art der

Aktivierung von Roh. Eine fehlende Ligandenbindungsdomäne spricht nicht unbedingt gegen eine regulatorische Wirkung von externen Substraten wie Antibiotika oder auch Schwermetallen auf die Aktivität von Roh. So ist zum Beispiel bekannt, dass SoxS, unter anderem ein Aktivator des *marRAB*-Operons und von ToIC^{13 17 3}, ebenfalls keine Ligandenbindungsdomäne besitzt. Die Aktivierung von SoxS erfolgt indirekt: SoxR, ein Repressor von SoxS, wird durch freie Sauerstoffradikale inaktiviert und ermöglicht so eine erhöhte Transkription von SoxS⁶⁴. Denkbar wären für Roh ähnlich gelagerte Regulationsmechanismen. Auch könnte durch siRNAs die Expression von *roh* beeinflusst sein⁶⁵. Die substratabhängige Aktivierung des Transkriptionsfaktors käme dann über Regulation der interferierenden RNA zustande, ohne dass eine direkte Ligandenbindungsdomäne an Roh benötigt werden würde.

Ein weiteres Ziel war es neben dem Nachweis des breiteren Vorkommens von *roh* (vgl. E 1 und E 2) auch eine genauere phänotypische Charakterisierung des putativen Transkriptionsfaktors durchzuführen.

Hierzu wurde das Plasmid pUC19-*lacPr-roh-kana* generiert, in dem *roh* unter der Kontrolle eines *lac*-Promotors überexprimiert werden konnte. Dieses Konstrukt enthielt zur besseren Selektionierung der transformierten Klone eine Kanamycin/Neomycin-Resistenzkassette („*kana*“). PUC19-*lacPr-roh-kana* wurde in elektrokompente *Enterobacter cloacae* transformiert. Folgend konnten Versuche zur Veränderung der Resistenz gegenüber typischerweise durch Effluxpumpen transportierten Substanzen durchgeführt werden. Dies sind unter anderem Fluorochinolone⁴ Tetrazykline und Chloramphenicol¹¹ oder organische Lösungsmittel^{15 16 17}.

In der vorliegenden Arbeit wurden die Veränderungen der antimikrobiellen Resistenz nach Überexpression Rohs mittels des beschriebenen Vektors in exemplarischen Bakterienstämmen untersucht. Hierbei konnte bei typischerweise

durch Effluxpumpen transportierten Antibiotika^{4 11} gegenüber von nicht transformierten Kontrollstämmen diskrete Steigerungen der MHK nachgewiesen werden. Dies kann als Hinweis auf die Bedeutung Rohs im System der Effluxpumpen-mediierten Resistenzentwicklung gewertet werden. Kritisch anzumerken ist, dass die beobachteten Unterschiede der MHK eher gering ausfielen. Die Möglichkeit, dass diese Unterschiede zufälliger Natur sind, ist deshalb nicht von der Hand zu weisen. Die Untersuchung der Lösungsmitteltoleranz zeigte ebenso keine deutlichen Diskrepanzen zwischen Roh-überexprimierenden Stämmen und Kontrollen. Dies muss allerdings nicht unbedingt gegen eine Efflux-Pumpenaktivierung sprechen. Die Ansätze zum Beschreiben der antimikrobiellen als auch der Lösungsmittel-Resistenz sind nicht auf die Identifizierung einzelner Pumpensysteme ausgerichtet. Denkbar wären also spezielle Subsets der Effluxpumpen, die durch Roh aktiviert werden. Es könnten Pumpen aktiviert werden, die zwar Antibiotika, nicht aber Lösungsmittel transportieren. Dies lässt Raum für zukünftige Versuche, in denen nach den mit Roh in Zusammenhang stehenden Pumpen gefahndet werden kann. Die vom Betrag her kleinen Diskrepanzen der MHKs gegen antimikrobielle Medikamente lassen sich allerdings auch dadurch erklären, dass der Effekt von Roh nicht isoliert betrachtet werden darf. Ebenso spielen nämlich innerhalb der Regulation der Effluxpumpen diverse andere Faktoren eine bedeutende Rolle. Bei *Escherichia coli* sind dies unter anderem Rob, MarA oder auch SoxS³. Vorstellbar sind gegenregulatorische Bestrebungen innerhalb des Transkriptionsfaktorensystems, die eine zu starke Aktivierung der Effluxpumpen verhindern sollen. Auch eine Aktivierung von siRNAs könnte die erhöhte Expression der Zielgene von Roh unterbinden. Da die Effluxpumpen eine Vielzahl an Substanzen transportieren können⁴ und nicht nur Funktionen innerhalb der Antibiotikaresistenz zu haben scheinen (vgl. Vermutungen zum effluxvermittelten Quorum-Sensing^{3 66} scheint eine engmaschige Kontrolle des Efflux-Systems notwendig zu sein, um die Viabilität der Stämme zu erhalten. Lösungsmöglichkeiten

wären zum einen Untersuchungen der Resistenz mit Vektoren, die nicht wie das pUC19-Plasmid als *high copy*-Form vorliegen⁶⁷ und somit eine besser dosierte Überexpression bewirken. Eine weitere Option wäre Transformation von siRNAs, eventuell als *short hairpin*-RNA gegen *roh*, in ausgewählte Bakterienstämme. Dann könnte über einen Abfall von MHKs gegenüber Antibiotika die Bedeutung von Roh in der Resistenzentwicklung beobachtet werden. Somit würden etwaige durch die unkontrollierte Überexpression von *roh* verursachte Probleme umgangen.

Im Rahmen der phänotypischen Charakterisierung von Stämmen mit Überexpression von *roh* wurden Versuche zum Nachweis eines Zusammenhangs zwischen Schwermetall-, insbesondere gegenüber Cadmium, und antimikrobieller Resistenz durchgeführt. In noch nicht publizierten Vorarbeiten sequenzierte die AG Linde die nähere genomische Umgebung von *roh*. Dabei wurde *downstream* der Gensequenz von Roh diejenige für eine Cadmiumpumpe gefunden. Es drängte sich somit die Frage nach einem Zusammenhang zwischen Effluxsystemen und Schwermetallresistenz auf. Möglicherweise könnte Roh als Bindeglied im in der Literatur berichteten gleichzeitigen Auftreten von Antibiotikaresistenz und Schwermetallbelastung identifiziert werden^{68 38 69}. Die Versuche, durch pUC19-*lacPr-roh-kana*-vermittelte Überexpression *rohs* Cadmiumresistenz oder -suszeptibilität zu verändern, zeigten jedoch nur vernachlässigbar geringe Unterschiede zwischen transformierten und Kontroll-Stämmen. In diesen Versuchen gelang es somit nicht, einen phänotypischen Zusammenhang zwischen Antibiotika- und Cadmiumresistenz zu zeigen. Als Kritikpunkt ist hier sicher anzuführen, dass mit dem Versuchsaufbau nicht die Regulation von Roh durch Cadmiumionen nachgestellt wurde, sondern der direkte Einfluss von Roh auf die Schwermetallresistenz. Andere Versuche wären hier, Stämme mit Cadmium zu behandeln und vor und nach Behandlung mittels quantitativer RT-PCR mRNA-Spiegel von Roh zu messen. Somit könnte der Nachweis einer Cadmium-abhängigen Regulation von Roh geführt werden. Auch sind Optimierungen hinsichtlich der Stärke der

Überexpression von Roh denkbar. So könnte der Transkriptionsfaktor mit Hilfe eines *low copy*-Plasmides besser dosiert überexprimiert und mögliche toxische Effekte durch zu starke Effluxaktivierung umgangen werden. Ein weiterer Ansatz wäre, Bakterienstämme mit typischen Targets von Effluxpumpen ^{4 3} in An- oder Abwesenheit von gegen mRNA von *roh* gerichteten siRNAs zu inkubieren und daraufhin die Cadmiumresistenz mit unbehandelten Stämmen zu vergleichen.

E 4: Ausblick

Die Ergebnisse dieser Arbeit unterstreichen zum einen durch das ubiquitäre Vorkommen von *roh* innerhalb der Nomenspecies *Enterobacter cloacae* und zum anderen durch den hohen Konservierungsgrad der Sequenz die Bedeutung des Genabschnittes für die untersuchten Bakterienstämme. Auch konnten durch die Versuche zur phänotypischen Charakterisierung des durch *roh* kodierten Proteins Hinweise auf seine Funktion als putativer Transkriptionsfaktor im System der bakteriellen Effluxpumpen geliefert werden. Die Arbeit zeigte aber auch, dass zur genaueren Abklärung Rohs weitere Versuche notwendig sind. So müsste die Bedeutung der festgestellten Mutationen innerhalb *rohs* weiter untersucht werden. Vergleichende Untersuchungen der minimalen Hemmkonzentrationen der einzelnen Bakterienstämme gegenüber definierten Antibiotika und deren Korrelation mit den vorliegenden genetischen Abweichungen wären anzuraten. Eventuell könnten somit, ähnlich wie schon bei GyrA in *E. coli* mehrfach publiziert ^{55 56 57}, Zusammenhänge mit Resistenzentwicklung durch Targetmutationen dargestellt werden. Die Bedeutung Rohs selbst für die Abwehr antimikrobieller Agentien müsste ebenfalls noch genauer eingegrenzt werden. Zwei unterschiedliche Ansatzpunkte sind dazu denkbar. Der erste wäre eine Analyse der tatsächlich durch den putativen Transkriptionsfaktor aktivierten Pumpen. Als Vorgehensweise bietet sich eine Suche nach Gensequenzen der Einzelbestandteile der Pumpen über eine Konsensussequenz der jeweils aus *Escherichia coli* bekannten Versionen an.

Folgen müssten Southern Blot-Untersuchungen mit den gefundenen Genen und eine Quantifizierung der Expression der DNA-Abschnitte mittels Real Time-RT-PCR. Damit könnte nach Stimulation durch Überexpression von *roh* (zum Beispiel durch Transformation eines neu generierten *low copy*-Plasmides) die transkribierten mRNA-Mengen mit nicht transformierten Wildtyp-Kontrollen verglichen werden. Auch Western Blot-Untersuchungen könnten nach Stimulation des Regulons von Roh bei bekannten Pumpenproteinen und Antikörpern über Expressionsraten der jeweiligen Pumpensysteme Aufschluss geben. Die Antikörper müssten hierbei eventuell über Experimente zur Identifikation von Kreuzreaktionen mit bekannten Antigenen aus *E. coli* gesucht werden (für Antikörper gegen *E. coli*-Targets vgl. z.B.: Nicoloff et al, 2006 ⁷⁰).

Die zweite Herangehensweise wäre über siRNAs zu bewerkstelligen. Zuerst müssten geeignete siRNAs gegen bakterielle Targets, vor allem *roh*, ausgewählt werden. Hierzu ist eine Vielzahl an netzbasierten Programmen (Linksammlung z.B. unter <http://itb.biologie.hu-berlin.de/~nebulus/sirna/siDesign.htm>) frei zugänglich. Dann könnte zum Beispiel über Transformation von siRNA-Duplexes die Expression von *roh* beeinflusst werden und deren Auswirkung auf die mRNA-Spiegel von Effluxpumpen oder auf die antimikrobielle oder Lösungsmittel-Resistenz der Bakterienstämme untersucht werden.

Eine zusätzliche Möglichkeit zu weiteren Charakterisierung der Funktion von Roh könnte über die Generierung von Roh als Protein sein. Hierzu müsste *roh* in speziellen Zellen -etwa Drosophila Schneider 2-Zellen- transformiert werden, die fremde Proteine exprimieren können ⁷¹. Nach Gewinnung der Proteine und Einbringung in gewünschte Bakterienstämme wären weitere Versuche zur Abklärung der Bedeutung von Roh möglich. Es könnte wiederum gezielt nach Veränderung von MHKs gegenüber Antibiotika oder Lösungsmitteln gefahndet und

so die Bedeutung Rohs als Transkriptionsfaktor im System bakterieller Effluxpumpen unterstrichen werden.

Industrieller Nutzen von gegen Lösungsmittel resistenten Bakterienstämmen wurde bereits in der Vergangenheit diskutiert ⁷². Hierbei wurden vor allem die Wege zur Biokatalyse von schwer wasserlöslichen Schadstoffen betont. Könnten durch weitere Versuche der Nutzen von Roh in Induktion von Lösungsmittelresistenz -eventuell durch exakter dosierte Überexpression von Roh- aufgezeigt werden, wäre auch nach derartigen Applikationsmöglichkeiten der nun lösungsmittelresistenten Bakterienstämmen zu suchen.

Die klinische Bedeutung dieser Arbeit liegt vor allem darin, dass Hinweise auf einen neuen Signalweg für Resistenzentwicklung innerhalb *Enterobacter cloacae* gefunden wurden. Vertreter dieser Nomenpecies könnten unter der Beteiligung von Roh dazu in der Lage sein, antimikrobieller Therapie wirkungsvoll zu entgehen. Somit würde Roh einen Teil der Herausforderung darstellen, der zunehmenden Entwicklung an antimikrobieller Resistenz innerhalb der klinischen Versorgung von Patienten mit bakteriellen Infektionskrankheiten entgegenzugehen ⁷³. Nötig wären Therapeutika, die die Wirkung von Roh effektiv blockieren können. Denkbar wäre so die Fahndung nach inhibitorisch wirksamen Substanzen. Diese könnten dann ähnlich wie Clavulansäure bei Penicillinen zur Umgehung der β -Lactamase ⁷⁴ als zusätzliches Medikament zu typischerweise durch Effluxpumpen transportierten Antibiotika wie Fluorochinolonen ⁴ gegeben werden und somit diesen Mechanismus der Resistenzentwicklung blockieren. Interessant sind auch Ansatzpunkte über die Applikation von RNAi-Produkten gegen Bestandteile der Signalkaskade von Roh. Beispielsweise wurden bereits Ansätze zur Therapie von Staphylokokkeninfektionen mittels gegen bakterielle Koagulase gerichteten siRNAs veröffentlicht ⁷⁵. Die induzierte RNA-Interferenz mit Produkten von *roh* könnte somit zur besseren therapeutischen Handhabung von Infektionen mit *Enterobacter cloacae* beitragen.

F Anhang

F 1 Ergänzende Tabellen

F 1.1 Genutzte Bakterienstämme

Tabelle 11: Genutzte Bakterienstämme

Stammnummer AG Linde	Nomenspecies	Herkunft
# 1016	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	klinische Routinediagnostik
# 1091	<i>Enterobacter cloacae</i>	klinische Routinediagnostik
# 1095	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	klinische Routinediagnostik
# 1096	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	klinische Routinediagnostik
# 1099	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	klinische Routinediagnostik
# 1125	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	klinische Routinediagnostik
# 1136	<i>Enterobacter cloacae</i>	klinische Routinediagnostik
# 1174	<i>Enterobacter cloacae</i>	klinische Routinediagnostik
# 1207	<i>Enterobacter cloacae</i>	klinische Routinediagnostik
# 1337	<i>Enterobacter cloacae</i>	klinische Routinediagnostik
# 1919	<i>Enterobacter cloacae</i>	klinische Routinediagnostik
# 1920	<i>Enterobacter cloacae</i>	klinische Routinediagnostik
# 2257	<i>Enterobacter cloacae</i>	klinische Routinediagnostik
# 2269	<i>Enterobacter cloacae</i>	klinische Routinediagnostik
# 2284	<i>Enterobacter cloacae</i>	klinische Routinediagnostik
# 2299	<i>Enterobacter cloacae</i>	klinische Routinediagnostik
# 2307	<i>Enterobacter cloacae</i>	klinische Routinediagnostik
# 2502	<i>Enterobacter cloacae</i>	klinische Routinediagnostik
# 2798	<i>Enterobacter cloacae</i>	klinische Routinediagnostik
# 2799	<i>Enterobacter cloacae</i>	klinische Routinediagnostik
# 2800	<i>Enterobacter cloacae</i>	klinische Routinediagnostik
# 2803	<i>Klebsiella oxytoca</i>	klinische Routinediagnostik
# 2804	<i>Escherichia coli</i>	klinische Routinediagnostik
# 2805	<i>Enterobacter cloacae</i>	klinische Routinediagnostik
# 2806	<i>Klebsiella oxytoca</i>	klinische Routinediagnostik
# 2808	<i>Klebsiella oxytoca</i>	klinische Routinediagnostik
# 2812	<i>Enterobacter cloacae</i>	klinische Routinediagnostik
# 2824	<i>Escherichia coli</i>	klinische Routinediagnostik
# 2826	<i>Escherichia coli</i>	klinische Routinediagnostik
# 2827	<i>Escherichia coli</i>	klinische Routinediagnostik
# 2829	<i>Enterobacter cloacae</i>	klinische Routinediagnostik
# 2832	<i>Enterobacter cloacae</i>	klinische Routinediagnostik
# 2836	<i>Escherichia coli</i>	klinische Routinediagnostik
# 2838	<i>Enterobacter cloacae</i>	klinische Routinediagnostik
# 2839	<i>Escherichia coli</i>	klinische Routinediagnostik

# 2845	<i>Escherichia coli</i>	klinische Routinediagnostik
# 2851	<i>Escherichia coli</i>	klinische Routinediagnostik
# 2852	<i>Escherichia coli</i>	klinische Routinediagnostik
# 2853	<i>Escherichia coli</i>	klinische Routinediagnostik
# 2875	<i>Enterobacter cloacae</i>	klinische Routinediagnostik
# 2878	<i>Enterobacter cloacae</i>	klinische Routinediagnostik
# 2880	<i>Enterobacter cloacae</i>	klinische Routinediagnostik
# 3028	<i>Enterobacter asburiae</i>	H. Hoffmann/München: ENAS ^I (ATCC 35953 ^T)
# 3029	<i>Enterobacter kobei</i>	H. Hoffmann/München: ENKO ^I (ATCC BAA-260 ^T)
# 3030	<i>Enterobacter cloacae</i>	H. Hoffmann/München: EN114 (DSM ID 01-1214)
# 3031	<i>Enterobacter cloacae</i>	H. Hoffmann/München: EN_19
# 3032	<i>Enterobacter cloacae</i>	H. Hoffmann/München: EN_36
# 3033	<i>Enterobacter cloacae</i>	H. Hoffmann/München: EN_18
# 3034	<i>Enterobacter hormaechei</i>	H. Hoffmann/München: ENHO ^I (ATCC 49162 ^T)
# 3035	<i>Enterobacter cloacae</i>	H. Hoffmann/München: EN_30
# 3036	<i>Enterobacter cloacae</i>	H. Hoffmann/München: EN_25
# 3037	<i>Enterobacter nimipressuralis</i>	H. Hoffmann/München: ENNI ^I (ATCC 9912 ^T)
# 3038	<i>Enterobacter cloacae</i>	H. Hoffmann/München: ENCL ^I (ATCC 13047 ^T)
# 3039	<i>Enterobacter dissolvens</i>	H. Hoffmann/München: ENDI ^I (ATCC 23373)
# 3040	<i>Enterobacter cancerogenosus</i>	H. Hoffmann/München: ENCA ^I (ATCC 33241 ^T)
# 3041	<i>Enterobacter cloacae</i>	H. Hoffmann/München: CU-24
# 3264	<i>Enterobacter cloacae</i>	DSMZ-Stamm
# 05.09-1.54	<i>Enterobacter cloacae</i>	klinische Routinediagnostik
# 05.09-1.62	<i>Enterobacter cloacae</i>	klinische Routinediagnostik
# 05.11-1.58	<i>Enterobacter cloacae</i>	klinische Routinediagnostik
# 05.14-08	<i>Enterobacter cloacae</i>	klinische Routinediagnostik
# 05.20-0.20	<i>Enterobacter cloacae</i>	klinische Routinediagnostik
# 05.21-22	<i>Enterobacter cloacae</i>	klinische Routinediagnostik
# 05.22-3.68	<i>Enterobacter cloacae</i>	klinische Routinediagnostik
# 05.26-7.18	<i>Enterobacter cloacae</i>	klinische Routinediagnostik
# 05.28-1.65	<i>Enterobacter cloacae</i>	klinische Routinediagnostik
# 05.28-4.05	<i>Enterobacter cloacae</i>	klinische Routinediagnostik
# 05.29-1.51	<i>Enterobacter cloacae</i>	klinische Routinediagnostik
# 12U50	<i>Enterobacter cloacae</i>	klinische Routinediagnostik
# 14/452	<i>Enterobacter cloacae</i>	klinische Routinediagnostik
Klinikisolat 1	<i>Enterobacter cloacae</i>	klinische Routinediagnostik
Klinikisolat 2	<i>Enterobacter cloacae</i>	klinische Routinediagnostik
Klinikisolat 3	<i>Enterobacter cloacae</i>	klinische Routinediagnostik

F 1.2 Gensequenzen

Tabelle 12: Aus unpublizierten Vorarbeiten der AG Linde übernommene Sequenzen

Sequenzname	Sequenz
Genomische Umgebung von <i>cad2</i> und <i>roh</i>	<p>gtcgttctCgtgaaaCagagtgTcaaaAGATTAGCTATTTTTCTAGGACCATGATGGCGTAACAC TAAAGAGTTGGACTTGTGTTTCGCCATCACTGAGCTTTTTCTATTAATTAACTTTATACG GAAATACTAATGTACGCCTCCAGATGGTCGGTGGGTACAGTTAGAGGAAGGTCTCT ATCTTCATCTTCAGCTGTCAGaTTTTGGACTATCCACATTCGTCTACGCTACGGTCT GCATTGCAAACATCATTAAGTTCTTGAAGTTGTTTTCTAGCGCTATTAATTCATTAATA CKATGCTGGACATGWGCGAGGTGGGCACTGATTATCGCGTCAATAGGTCCACATTCT TTACCGTTATTATTGATTGCCAGTAGTAATGCGCGGATTTCTCATRCGTCATATCGAG AGAGCGACAGCGTCGGATAAATAACAATTTTTCCAGATGGTTATTATCATAATGGCGA TAATTATTTTCAATATCTCGTAAAGGGGCGCTGAAGTAAACCTTCCTTTTCGTAGTAACG AATAGTTTTCTACTGGGCAACCGGCCCTTACGAGCTAATTCACCAATTTTCATGAATCCC CCTTCATGTGCTTGACCCTGTAGTCAGATCAGGGTCTTTAATCGTCAGTATAGTTAACA GGCGAGGCAATTAATAGAGTGGTTCGGTAAAAAACAGCAAACTCAAGTAAGAGAG GAATCTGCTGGTTGTTGTGAAAAAATTAACCTGATAGTAGGGAGCAAAATGCAGCGTT CTGAAGAACCGGCTAAGGCTCATGGTCACGCACATGACCATAAAGATTGCAGCGCTG AGCTCTCTCATAAGGAGCATGGTCATGGAAGTGACAAACATTTACATCGCGAGCAAG GGCATGTGAAAGGTGGGCATGCACATGAAGGATGCAGCCATGAACATAGTCATACTG ATGAAGAACATGATCATGGTGAGGAAGAACATAGTCATGGCGATCATCAGCATAAGG GGTGTAAACCATGACCACGCTCAGGATGATCAGGCTGATGAACATCATGGACATAGCG GTGACTGCTGCTCAGGTGCGCCAACAAATTTAAGTAATCTAGGTGGTTCTAAAGTTGT AGCTGGTGGGTTACGAACGTAAATACGTATTATGCAGATGGATTGCCCTGTTGAGGAA AATCTCATCAAAAAGAACTGGGGGCAATGACCTCTGTTAAAGAGCTTGATTCAACC TTATGCAGCGTGTTCTGACTGTAACCCATACACCTGATTCGCTTGAACCTATCTTGGTT GCAATTCGCTCCTTGGGATTTCGTACCCGAAGTTTCGGATAACAATGGTGAAAAGAAAA ACATCCAGGAGAAAAAAAAGCCTTGGTGGCCGTTAGCTGCTGGCTGATGGCTGCAC TTGCGGCTGAAGTTATGCACTGGGCTGATATGCCTGACTGGCTTGAAGCGGGATTAG CCTTGATAGCCGTTCTTTGAGTGGTTTGACAACCTATAAGAAAGGTTGGATTTCAATT CGCAATGGTAACCTGAATATAAACGCACTGATGAGTATGCCGTTACCGGGGCTTTGG TTCTTGGGCAATGGCCAGAAGCAGCGATGGTTATGGTTATCTTACCTGATGGTGAAC GATTGAAGCAAAATCACTCGATAGAGCTCGAAATGCCATTGGTTCACTGATGAGCCTG ACCCCTGAAACCGCAATGGTCCAACAACTGATGGATCATGGCAGGAAGTTGATGCC AGCAGCGTACAACCAGGAAGTATTGTAAGGGTAAACCAGGCGAACGAATTGGTCTT GACGGTGAGATTGTTAAAGGTCAAACAACGATTAATCAGGCTGCTGATGGTGAAC GTTTGCCTGTCGATAAAATGGCGGGTACTCCGTGTTTGCCGGGACAATAAACAGT CAGGTTCTTTTGAATATAAAGTCACTGCAGCTGCCAATAACACCACCCTTGCTCGCAT CATTTCATGCTGTTGAGCAGGCGCAAGGCGCCAAAGCAGCTACACAACGTTTTGTTGA CCGCTTTTCCAGATTTACAGCCAGTCGTTATGGGGATTTCGGTTGCTGTTGCTGTA TTGCCACCATTGTTTGGCGCAGGTACATGGCAAGATGGATGCTATTAAGGATAGTCA TGCTTGTCATCGCGTGTCATGTGCGCTGGTTATTTCTACACCAGTAACAATTGTCAG TGGACTTACTGCTGCTGCTCGTAAAGGAATTCTCATTAAAGGCGGTGTTTACCTTGAG CAGGGACGTAAATTAAGGCTTTGGCGCTTGATAAACTGGGACGATTACTCATGGGA AGCCAGTACAAACTGATGTCTGTTTCAATGGGGAAGTGAAGTTGAGTTGCTGATC AGTTGCAGCAAGTCTTGCTAGCTACTCTGATCATCTGTCTCACAGGCCGTTGTGAAT GCTTCTGTTGATTGAAAAAACAGAGTGTGAAAACTTTGAGGCTATTGTAGGTCGAG GTGTGTCATGGTGATTGCCGGCAAGACTTTTATCTTGGTAATTTGCGATTGGCGAGA AGACCTCTGAGTTGCCGTTAGAGGTTAAAGCTACAGTACAAAGTCTGGAAGCCCTA GGTAAACAGTTATTTTGTCAATGATGGAAAGCAAGTGCTTGGGTTATTTGCTGTTG CAGATACTGTCAAGAACACGAGTCGCGAAGCGATTCAACAACCTCCATCACCTTGGTGT CAAGACAGTTATGTTGACTGGGGATAACCCGCATACAGCCAAAGCAATAGCATCTCAG GTCGGTATTGATGAAGCTCGTGGTAGTCAGTTACCTGAGGACAAACATCAAGTAGTTC AAGAGTATTCACGTATTGGTGTTACTGGAATGGTTGGTGATGGCATCAATGATGCGCC GGCACTGGTTGCGGCAGATATAGGTTTTGCTATGGGGCAATGGGTACTGATACGGC AATTGAAACTGCAGATGTGGCCTTAATGGATGATGACCTGCGTAAAAATCCCTGCCCTT GTAAAAATTGCCCCACAGACGTATAGCTTACTCGTGCAAAATATCAGTCTCGCATTAG GTATTAAGACTATTTTCTTGTATTAAACGCTCATGGGAATGGGACTATTGTTGGATGGC GGTATTTGCTGATGTTGGTGCTAGCCTTCTGGTTGAGCAAAATGGTCTGAGATTGTTA CGTAAATAGTATTTCTAGAAAGTTCTTCATGGATGAAGAACTTATATTTTTTTTAGATA AATGTAGAATTTAGTTATAAGGGGACATATGATCACAACAAACGATGCGGATAGTGTG GTTAAAGATATCGTCCAATGGGTGCAAAATTCAGTGACATCTACTTTACTGTGGAGG AAATTGCAGAAAAATCTGGCTATTCTCGATGGCATTTTCAACGCATTTTTAAACACGCA ACGGGAATTGCGTTAGGTGAATATGTTAGAGCCCGACGATTAACCTGTGCTGCAGTA GAGTTGAACTAACTACTAAACAGTTTTGGAAATTGCTCTCCACTATGGTTTTGAATC ACAACAACTTTTACTCGTTCACTTCAAAAAATAAATCCATCTCCACCAGGAAGATACC GTAAACAAATCGCCTGGAATTTGTCTGCACTATGCCCTCCATTACTGTTAGAACATGA GGAGAATTTCACAAATGTTAATTAATGACACTATACTGGTTTCCATGAGCGAAGAAGTT</p>

	GCCAATAAATATATCAAGATGCAGGATGTTTTACTGGATGATGAACCTTGCGTCGACA TCGTACGGGTGATTTATGATTTAGAGCATGCAGTCAAAGAATTTAAAAAAGWATAATA CTTACAGCATATAAATTATTGCCACTCTGGGAATGTGAAGATCCTGATTTACATATTGC ATTAATTGACGATGTGAAAACATTCTTGATTACTTAGAATGAAGTTAAGGAACTAGA ATCAAAAACAGCACTAACCCRTATGAAATATTTTGAGTTTATTTAAAGACATGATCAGA TTAACCGATTTTAGCTACCAGATAGAAAATGATGGATCTTATCCCATACATTTGTATCR AGAAACAGCATGTCTCATGCTTAGGGGGCTAAAACACTTGACCCTGAATCAACTWTAG GGTGTGTAATGGAGCCAATTCGAGAGTAGTGAGCCGAGATTAGCGAGATAAGAATCAT TATCAATTAATTTCTTATCGTGGCATTGAAGCATCACGAATAGCAAATGAGGTCTCCA TGATTAAGCAAAAAACCATCAAAAATAATGTGCAACTAAGTGGTATTGGTTTACATAGC GGCAGCAGCATTATATGAAAATCATGCCCGCTACCGCTAATAGTGGCATACGGTTCC GTAGAACAGATTTAAATCCTTCAGTTGATATTACAGCTTCGAGCTGAGCAGGTTTCATGA CACCATGCTGGCCTGGTTCATAATCCGGTAAAAAACCTCAGCTTTAGATTGAAAAGT CACGGTTGTAACATTATCAGTTTCTTTCTTCAAACCTATAACTTGGAAGTTCTACGTC CGTCCCATGGACGTCTTACTAATTCAAATTCATTCAGCCTGCGAATACGGTATCTTCTC GTG
<i>cad2</i>	CAATAAATATATCAAGATGCAGGATGTTTTACTGGATGATGAACCTTGCGTCGACATC GTACGGGTGATTTATGATTTAGAGCATGCAGTCAAAGAATTTAAAAAAGWATAATACT TCAGCATATAAATTATTGCCACTCTGGGAATGTGAAGATCCTGATTTACATATTGCAT TAATTGACGATGTGAAAACATTCTTGATTACTTAGAATGAAGTTAAGGAACTAGAAT CAAAAACAGCACTAACCCRTATGAAATATTTTGAGTTTATTTAAAGACATGATCAGATT AACCGATTTTAGCTACCAGATAGAAAATGATGGATCTTATCCCATACATTTGTATCRAG AAACAGCATGTCTCATGCTTAGGGGGCTAAAACACTTGACCCTGAATCAACTWTAGG GTTTGTAATGGAGCCAATTCGAGAGTAGTGAGCCGAGATTAGCGAGATAAGAATCATT ATCAATTAATTTCTTATCGTGGCATTGAAGCATCACGAATAGCAAATGAGGTCTCCAT GATTAAGCAAAAAACCATCAAAAATAATGTGCAACTAAGTGGTATTGGTTTACATAGCG GCAGCAGCATTATATGAAAATCATGCCCGCTACCGCTAATAGTGGCATACGGTTCCG TAGAACAGATTTAAATCCTTCAGTTGATATTACAGCTTCGAGCTGAGCAGGTTTCATGACA CCATGCTGGCCTGGTTCATAATCCGGTAAAAAACCTCAGCTTTAGATTGAAAAGTCA CGGTTGTAACATTATCAGTTTCTTTCTTCAAACCTATAACTTGGAAGTTCTACGTCG TCCCATGGACGTCTTACTAATTCAAATTCATTCAGCCTGCGAATACGGTATCTTCTCTG TG
<i>roh</i> mit den Primern 641 und 642	ATGATCACAAAAACGTATGCGGATAGTGTGGTTAAAGATATCGTCCAATGGGTCGAAA ATTCACTGACATCTACTTTACTTGTGGAGGAAATTCAGAAAAATCTGGCTATTCTCGA TGGCATTTCACGCATTTTAAACACGCAACGGGAATTGCGTTAGGTGAATATGTTA GAGCCCGACGATTAACTGTGCTGCAGTAGAGTTGAAACTAACTACTAAAAACAGTTT GGAAATTGCTCTCCACTATGGTTTGAATCACAACTTTTACTCGTTCATTCAAAA ATAAATTCCATCTTCCACCAGGAAGATACCGTAAACAAATCGCCTGGAATTTGTCTGC ACTATGCCCTCCATTACTGTTAGAACATGAGGAGAATTCACAAATGTTAATTA

Alle gezeigten Sequenzen stammen aus *E. cloacae* # 1919

Tabelle 13: In „touch down“-PCRs für *roh* positive *E. cloacae* aus der klinischen Routine-Diagnostik (vgl. D 1.2)

<i>E. cloacae</i>	Sequenz
# 1091	keine Sequenz gewinnbar
# 1136	keine Sequenz gewinnbar
# 1174	GAGATYGTAACATTTGTGAAAATCTCCTCATGTTCTAACAGTAATGGAGGGGCATAGTG CAGACRAAATCCCAGGCGAATTTGTTTACGGTATTCTTCTGGGTGGGAAGAATGGAAA TTTATTTTTGAAATGAACGAGTAAAAGTTTGTGTGATTCAAACCATAGTGAGAGCAA TTTCCAAAACGTGTTTAGTAGTTAGTTTCAACTCTACTGCAGCACAGGTTAATCGTCGGG CTCTAACATATTCACCTAACGCAATTCCTGTTGCGTGTGTTAAAAATGCGTTGAAAATGCC ATCGAGAATAGCCAGATTTTCTGCAATTTCTCCACAAGTAAAGTAGATGTCAGTGAAT TTTGACCCATTGGGACGATATCTTAACCACACTATCCGCATACGTTTTTGTGATCATG GGAAA
# 1207	GGATTATAACATTTGTGAAATCTCCTCATGTTCTAACAGTAATGGAGGGCATAGTGCAG ACAATCCCAGGCGATTTGTTTACGGTATCTTCTGGTGGAGATGGAATTTATTTTTGA ATGAACGAGTAAAAGTTTGTGTGATTCAAACCATAGTGAGAGCAATTTCCAAAACGT TTTTAGTAGTTAGTTTCAACTCTACTGCAGCACAGGTTAATCGTCGGGCTCAACATAT CACCTAACGCAATTCCTGTTGCGTGTGTTAAAAATGCGTTGAAAATGCCATCGAGAATAG CCAGATTTTCTGCAATTTCTCCACAAGTAAAGTAGATGTCAGTGAATTTTCGACCCAT

	TGGACGATATCTTTAACCACACTATCCGCATACGTTTTGTGACANGGGNAA
# 1337	GGNGNTTGTAACATTTGTGAAATTCTCCTCATGTTCTAACAGTAATGGAGGGCATAGTG CAGACAAATCCCAGGCGATTTGTTTACGGTATCTTCCTGGTGGAAGATGGAATTTATTTT TGAATGAACGAGTAAAAGTTTGTGTGATTCAAAACCATAGTGGAGAGCAATTTCCAAAA CTGTTTTAGTAGTTAGTTTCAACTCTACTGCAGCACAGGTTAATCGTCGGGCTCTAACAT ATTCACCTAACGCAATTCCTGCGTGTAAAAATGCGTTGAAAATGCCATCGAGAAT AGCCAGATTTTCTGCAATTTCTCCACAAGTAAAGTAGATGTCAGTGAATTTTCGACCC ATTGGACGATATCTTTAACCACACTATCCGCATACGTTTTGTGATCAATGGGAA
# 2257	TAGGATTATTAACATTTGTGAAATTCTCCTCATGTTCTAACAGTAATGGAGGGCATAGTG CAGACAAATCCCAGGCGATTTGTTTACGGTATCTTCCTGGTGGAAGATGGAATTTATTTT TGAATGAACGAGTAAAAGTTTGTGTGATTCAAAACCATAGTGGAGAGCAATTTCCAAAA CTGTTTTAGTAGTTAGTTTCAACTCTACTGCAGCACAGGTTAATCGTCGGGCTCTAACAT ATTCACCTAACGCAATTCCTGCGTGTAAAAATGCGTTGAAAATGCCATCGAGAAT AGCCAGATTTTCTGCAATTTCTCCACAAGTAAAGTAGATGTCAGTGAATTTTCGACCC ATTGGACGATATCTTTAACCACACTATCCGCATACGTTTTGTGATCAATGG
# 2269	CTCTAGGATTAATTAACATTTGTGAAATTCTCCTCATGTTCTAACAGTAATGGAGGGCAT AGTGCAGACAAATCCCAGGCGATTTGTTTACGGTATCTTCCTGGTGGAAGATGGAATTT ATTTTTGAATGAACGAGTAAAAGTTTGTGTGATTCAAAACCATAGTGGAGAGCAATTTTC CAAACTGTTTTAGTAGTTAGTTTCAACTCTACTGCAGCACAGGTTAATCGTCGGGCTCT AACATATTCACCTAACGCAATTCCTGCGTGTAAAAATGCGTTGAAAATGCCATCG AGAATAGCCAGATTTTCTGCAATTTCTCCACAAGTAAAGTAGATGTCAGTGAATTTTC GACCCATTGGACGATATCTTTAACCACACTATCCGCATACGTTTTGTGATCATATGGGA ATTC
# 2299	CTAGGGATTATTAACATTTGTGAAATTCTCCTCATGTTCTAACAGTAATGGAGGGCATAG TGCAGACAAATCCCAGGCGATTTGTTTACGGTATCTTCCTGGTGGAAGATGGAATTTATT TTTGAATGAACGAGTAAAAGTTTGTGTGATTCAAAACCATAGTGGAGAGCAATTTCCAA AACTGTTTTAGTAGTTAGTTTCAACTCTACTGCAGCACAGGTTAATCGTCGGGCTCTAAC ATATTCACCTAACGCAATTCCTGCGTGTAAAAATGCGTTGAAAATGCCATCGAGA ATAGCCAGATTTTCTGCAATTTCTCCACAAGTAAAGTAGATGTCAGTGAATTTTCGAC CCATTGGACGATATCTTTAACCACACTATCCGCATACGTTTTGTGATCAATGGGAATTC
# 2307	ATTAATTAACATTTGTGAAATTCTCCTCATGTTCTAACAGTAATGGAGGGCATAGTGCAG ACAAATCCCAGGCGATTTGTTTACGGTATCTTCCTGGTGGAAGATGGAATTTATTTTGA ATGAACGAGTAAAAGTTTGTGTGATTCAAAACCATAGTGGAGAGCAATTTCCAAAACCTG TTTTAGTAGTTAGTTTCAACTCTACTGCAGCACAGGTTAATCGTCGGGCTCTAACATATT CACCTAACGCAATTCCTGCGTGTAAAAATGCGTTGAAAATGCCATCGAGAATAG CCAGATTTTCTGCAATTTCTCCACAAGTAAAGTAGATGTCAGTGAATTTTCGACCCAT TGGACGATATCTTTAACCACACTATCCGCATACGTTTTGTGATCATATGGGNA
# 2502	keine Sequenz gewinnbar
# 2798	GGATYGTAAACATTTGTGAAAATTCTCCTCATGTTCTAACAGTAATGGAGGGCATAGTGCA GACAAATCCCAGGCGATTTGTTTACGGTATCTTCCTGGTGGAAGATGGAATTTATTTT GAAATGAACGAGTAAAAGTTTGTGTGATTCAAAACCATAGTGGAGAGCAATTTCCAAAAC AACTGTTTTAGTAGTTAGTTTCAACTCTACTGCAGCACAGGTTAATCGTCGGGCTCTAA CATATTCACCTAACGCAATTCCTGCGTGTAAAAATGCGTTGAAAATGCCATCGAGA GAATAGCCAGATTTTCTGCAATTTCTCCACAAGTAAAGTAGATGTCAGTGAATTTTCG ACCCATTGGACGATATCTTTAACCACACTATCCGCATACGTTTTGTGACCATGGG G
# 2799	GNATGATTAACATTTGTGAAATTCTCCTCATGTTCTAACAGTAATGGAGGGCATAGTGCA GACAAATCCCAGGCGATTTGTTTACGGTATCTTCCTGGTGGAAGATGGAATTTATTTTGA AATGAACGAGTAAAAGTTTGTGTGATTCAAAACCATAGTGGAGAGCAATTTCCAAAAC GTTTTAGTAGTTAGTTTCAACTCTACTGCAGCACAGGTTAATCGTCGGGCTCTAACATAT TCACCTAACGCAATTCCTGCGTGTAAAAATGCGTTGAAAATGCCATCGAGAATAG CCAGATTTTCTGCAATTTCTCCACAAGTAAAGTAGATGTCAGTGAATTTTCGACCCAT TGGACGATATCTTTAACCACACTATCCGCATACGTTTTGTGACCATGGGNA
# 2800	keine Sequenz gewinnbar
# 2805	CCAGGATTATTAACATTTGTGAAATTCTCCTCATGTTCTAACAGTAATGGAGGGCATAGT GCAGACAAATCCCAGGCGATTTGTTTACGGTATCTTCCTGGTGGAAGATGGAATTTATTT TTGAATGAACGAGTAAAAGTTTGTGTGATTCAAAACCATAGTGGAGAGCAATTTCCAAA ACTGTTTTAGTAGTTAGTTTCAACTCTACTGCAGCACAGGTTAATCGTCGGGCTCTAACA TATTCACCTAACGCAATTCCTGCGTGTAAAAATGCGTTGAAAATGCCATCGAGAA TAGCCAGATTTTCTGCAATTTCTCCACAAGTAAAGTAGATGTCAGTGAATTTTCGACC CATTGGACGATATCTTTAACCACACTATCCGCATACGTTTTGTGATCATATGGGAATT

# 2812	TCTAGGATTATTAACATTTGTGAAATTCTCCTCATGTTCTAACAGTAATGGAGGGCATAG TGCAGACAAATCCCAGGCGATTTGTTTACGGTATCTTCCTGGTGGAAGATGGAATTTATT TTTGAATGAACGAGTAAAAGTTTGTGTGATTCAAAACCATAGTGGAGAGCAATTTCCAA AACTGTTTATAGTAGTTAGTTTCAACTCTACTGCAGCACAGGTTAATCGTCGGGCTCTAAC ATATTCACCTAACGCAATTCCTGCGTGTGCGTGTGTTAAAAATGCGTTGAAAATGCCATCGAGA ATAGCCAGATTTTTCTGCAATTTCTCCACAAGTAAAGTAGATGTCAGTKAATTTTCGAC CCATTGGACGATATCTTTAACCACACTATCCGCATACGTTTTTGTGATCATATGGGAA
# 2829	CTCTAGGATTAATTAACATTTGTGAAATTCTCCTCATGTTCTAACAGTAATGGAGGGCAT AGTGCAGACAAATCCCAGGCGATTTGTTTACGGTATCTTCCTGGTGGAAGATGGAATTT ATTTTTGAATGAACGAGTAAAAGTTTGTGTGATTCAAAACCATAGTGGAGAGCAATTTT CAAACTGTTTATAGTAGTTAGTTTCAACTCTACTGCAGCACAGGTTAATCGTCGGGCTCT AACATATTCACCTAACGCAATTCCTGCGTGTGCGTGTGTTAAAAATGCGTTGAAAATGCCATCG AGAATAGCCAGATTTTTCTGCAATTTCTCCACAAGTAAAGTAGATGTCAGTGAATTTTC GACCCATTGGACGATATCTTTAACCACACTATCCGCATACGTTTTTGTGATCATATGGGA ATTCAA
# 2832	keine Sequenz gewinnbar
# 2838	keine Sequenz gewinnbar
# 2875	keine Sequenz gewinnbar
# 2878	NAGGATTATAACATTTGTGAAATTCTCCTCATGTTCTAACAGTAATGGAGGGCATAGTGC AGACAAATCCCAGGCGATTTGTTTACGGTATCTTCCTGGTGGAAGATGGAATTTATTTTT GAATGAACGAGTAAAAGTTTGTGTGATTCAAAACCATAGTGGAGAGCAATTTCCAAAAC TGTTTTAGTAGTTAGTTTCAACTCTACTGCAGCACAGGTTAATCGTCGGGCTCTAACATA TTCACCTAACGCAATTCCTGCGTGTGCGTGTGTTAAAAATGCGTTGAAAATGCCATCGAGAATAG CCAGAATTTTTCTGCAATTTCTCCACAAGTAAAGTAGATGTCAGTGAATTTTCGACCC ATTGGACGAATAWCTTTAACCACACTATCCGCATACGTTTTTGTGATCATATGGGA
# 2880	keine Sequenz gewinnbar

Tabelle 14: Sequenzen aus Subklonierungsversuchen in D 1.3

<i>E. cloacae</i>	Primer	Sequenz
# 1337	641- 479	AGGGTTTTCCAGTCACGACGTTGTAAAACGACGGGCCAGTGAATTGTAATACG ACTCACTATAGGGCGAATTGAATTTAGCGGCCGCGAATTCGCCCTTGAATTCC ATATGATCAGAAAAACGTATGCGACTCATGCAAGATGCTTGATGTGTATATCGTA TAAAATCTTGACCCTATATCAACTTCATGGTTTTAATGGAACCAAGTCGAGAGT AGCGAGGACGATGAACAGAGCAATAGGGGGAATCATCAATGGAACCTTGTTGC GGACGTTCTGCCTAGTCGCTAGAGCAACAGAGGTCTCCATGATCAAGCAAAAA ACTATCAAGAAATATTGTTGAATTAACGGTATTGGCTTGATAGCGGTAACCGG TTAACATGAAAATCATGCCTGCTGGTGCTAATAGTGGCATACGGTTCC
# 1337	441- 642	TGCTCTAGATTAATTAACATTTGTGAAATTCTCCTTCGGCTTGCTGAGCCTTGGA TTAGCGATTTCCTCTTCCGTGGCGGGCAAACCTTCAGGAGCGCTTCGGCGTGAA GCGCGTAACCATGGCCTCCGGGATCCTGCTGGGCGTGGGCTTCTTCTGACG GCACATTCAAACAACCTGATGATGCTGTGTTAAGCGCCGGGTGCTGTTGGG TCTGGCGGACGGCGCAGGTTATCTGCTGACGCTGTCTAACTGCGTGAAGTGGT TCCCGGAGCGTAAAGGGCTTATCTCCGCGTTTGCCATTGGTTCATATGGCCTG GGCAGCCTGGGGTTCAAATTCATTGACTCCCATCTGCTGGCCTCGGTTGGGCT TGAGAAAACCTTTATGATCTGGGGCGTGATTGTGCTGGTAATGATCCTCTTCGG CGCCACGCTGATGAAAGATGCGCCGACGAGCAAGTGAAGACCGTTAACGGC GTGGTGGAGAACGATTTACCCTCGCTCAGTCCATGCGTAAGCCGCACTACTG GATGCTGGCGGTGATGTTCTGACGGCCTGCATGAGCGGTCTGTATGTCATCG GTGTGGCGAAAGATATCGCGCAGGGGATGGTAAACTGGACGCGGCGACGGC GGCGAACGCGGTAACGGTCTCTCCATCGCTAACCTCTCGGGTCGTTCTGGTAC TGGGTATCCTGTCTGACAAAATCGCTCGTATCCGTGTGATTACGCTGGGGCAG GTCATCATCCATTAA
# 1337	788-	TCAATGATGGAAGCAAGTGCTTGGGTTGTTGCTGTTGCTGATACTGTTAAAA ACAGCAGCCGTGAAGCGATTGAACAACCTCATGAACCTGGCGTTAAAACTATTA TGCTGACTGGTGATAACCCACATACAGCTAAAGCAATCGCATCTCAGGTTGGAA

	642	TCGATGAGGCTCGAGGGAATCAATTGCCAGAAGATAAACATCGTGCAAGTTGAA GAGCATTACGGATTGAAATCACTGGGATGGTTGGTGATGGTATCAATGATGCA CCGGCTCTGGCTGCAGCTGATATCGGTTTTGCTATGGGCGCAATGGGTACTGA TACGGCGATTGAAACTGCAGATGTAGCCTTAATGGATGATGACCTGCGTAAAT CCCAGCCTTTGTAATAATATCCCGACAAACGTACAGCTTACTCGTGCAAAATATC AGCCTCGCTCTAGGTATTAAGCCGTATTCCTTGACTCACGCTCATGGGAATG GGAAGTATGTGGATGGCTGTATTGCTGATGTTGGTGCCAGTCTTCTGGTTGTG GCAAAATGGCCTGAGGTTATTACGAAAATAAAGAGTTGGTGCCCTGAGTTCTTCA TGGATGACAGGCTCCAGAGACCGTATTCTGGTTTGAATATATTCATAGAATATG GTTTGGGGGGAGAGAATGGACACCCAGGAAATATTCTGAAAGTGTGTCAAAG ATATTTGCAAGTGGGTTGAAAGTTCATTGAATACAACCTTGCCAGTAGAATTTAT TGCTGAGAAGTCTGGGTATTACAGATGGCATTTCACAGTTTTGTTAAACAGAC GACCGGTGTTGCGCTGGGTGAATATGTTCTGCTCGTCGATTATCATGTGCTGC GATTGATCTGAAATTGACTTCCAGAACAGTCCTGGACATTGCATTCAGTATGG TTTTAATTCGCAACAACTTTACGAGAGCTTTAAAAACAAGTTTCATCTTCCTC CCG
# 2257	441- 642	TTAATGGATGATGACCTGCGTAAAAATCCAGCCTTTGTAAAATTATCCCGACAAG CGTACAGCTTACTCGTGCAAAATATCAGCCTCGCTCTAGGTATTAAGCCGTAT TCCTTGACTCACGCTCATGGGAATGGGAAGTGGGATGGCTGTATTTGCTG ATGTTGGTGCCAGTCTTCTGGTTGTGGCAAATGGCCTGAGGTTATTACGAAAT AAAGAGTTGGGTCCCTGAGTTCTTCATGGATGACAGGCTCAGAGACCGTACTCT GGTTTGAATATATTCATAGAACATGGTTTGGGGGGAGAGAATGGACACCAGGAA ATATTCTGAAAGTGTGTCAAAGATATTTGCAAGTGGGTGAAAGTTTCATTGAAT ACAACCTTGCCAGTAGAATTTATTGCTGAGAAGTCTGGGTATTACAGTGGCAT TTTCAACGTTTGTAAACAGACGACCGGTGTTGCGCTGGGTGAATATGTTCTG GCTCGTCGATTATCATGTGCTGCGATTGATCTGAAATTGACTTCCAGAACAGTC CTGGACATTGCACTTCAGTATGGTTTTAATTCGCAACAACTTTACGAGAGCTT TTAAAAACAAGTTTCATCTTCCCTCCCGGTGCGTACCGCAAGCAAGGGAATTGGA ATTTATCAGCGCTGTGTCCATCTTACTTTACAGACTATGAGGAGAATTTACAAAA TGTTAATTAATCTAGAGC
# 2269	641- 479	GGAACCGTATGCCACTATTAAGCGGTGATGGTGCGACACTCGGCGACTAAT CACCGCCCGGCGCGCGCGGGGTGCGCCGGGTTACAGGAGAACATCATGGGC AAGTTCAAGTTTCCCTCCGCTTACACCATCTCTTTTTCTGATTGCCGTGGTTG CCGTGCTGACGTGGATTGTTCCGGCCGGGCGAGTACCATATGGCAATGAACGAG GCGCTCGGTAAGAAAGTCCCGGTTGCTGGCACCTACGCGACGTGGCAGCGC ACCCGCGGGGGCTGGTTTCGGTGCTGATGGCGCCGATTGCGGGGCTGTACGA TCCAGAATCCGGCCAGGCCGGGGCCATCGACGTGGCGCTGTTTATCCTTATCA TCGGGGGGTTCCTCGGGATCGTCACTAAAACCGGGGCGATAGACGCCGGGGA TCGAGCGCGTCACTACCCGACTACGCGGCCGCGAAGAGTGGATGATCCCGGT TCTGAATGGCGCTTGTGTTGCCGCGAGGCGGCACGATTTTACGGCATGGCAGAA AGTCGCTGCCCTTCTATACCTTACTGGTGCCGGTGATGCTGGCGGCGCGGTTT GATCCGGTGTTGCTGCGTCCACCGTGCTGCTCGGCGCGGGGATCGGCACCC TCGGCTCCACCATCAACCGTTTCGCCACGGTGATCGCGCCAACGCCGCGG GATCCCTTACCAACGGCATCATGTTGCGCATCGCGTGCTGGTGATCGGCT GGATCATCTGCGTGCGTGCGTAATGCGCTATGCCCCGAAGGTGCGCAAGGAT CCGTCGCTGTGATCGTGGCGGATAAGCAGGAAGAGAACCGCGCCCACTTCCT CGGCAACAAGGGCGAGCATCGCTGGAGTTTACCCCGGTGCGCATACGTTTTT GTGATCATATGGAATTCC
# 2299	641- 547	GCTAATCTCGGCTCACTACTCATCATCGGCGTTTTGCGATCTGGACGCCCCGACA ATAACGCGCGAGGCCAGCACCTGATTGCCATTCTGATAATAAACAGCGAATAG GCAGGAATGTTACCATGATACCGGTAGACAGCTCACTCGGCAGCAGGCCGAA GCGCTGAATATTTAACGCCAGCACGCCCGCACGCTGAGCAGGCGTTACGTTCA GCCAGTCACGCGTGGCAGGGCCAATCGCGCCATCAGCCCCAAGCCCTTGCCA CGTCTGAAAACGCTTTACCGCATCGACAAGTTCACGATCGTAAGCGCTACGTCC TTCTTTAGCAGATGTACTGACGGTGGACTCCAGCATTCCCGTACGACGCAAAAT TTCACGCAGCGCATACGTTTTTGTGATCATATGGAATTCC

Tabelle 15: Sequenzen der 13 Vertreter der Neugruppierung der Nomenspecies *Enterobacter cloacae* durch H. Hoffmann; mit Kontrolle in Form der Sequenz von *E. cloacae* # 1919. Genutzte Primerpaare zur Gewinnung der Sequenz 788/1080, 479/1079

<i>E. cloacae</i>	
# 3028	<p>ATTCAACAACTCCATCACCTTGGTGTCAAGACAGTTATGTTGACTGGGGATAACCCGCATAC AGCCAAAGCAATAGCATCTCAGGTCGGTATTGATGAAGCTCGTGGTAGTCAGTTACCTGAG GACAAACATCAAGTAGTTCAAGAGTATTCACGTATTGGTGTACTGGAATGGTTGGTGATGG CATCAATGATGCGCCGGCACTGGTTGCGGCAGATATAGGTTTTGCTATGGGGGCAATGGG TACTGATACGGCAATTGAAACTGCAGATGTGGCCTTAATGGATGATGACCTGCGTAAAAATC CCTGCCTTTGTAAAATTGTCCCGACAGACGTATAGCTTACTCGTGCAAAATATCAGTCTCGC ATTAGGTATTAAGCTATTTTCTTGTATTAACGCTCATGGGAATGGGGACTATGTGGATGG CGGTATTTGCTGATGTTGGTGCTAGCCTTCTGGTTGTAGCAAAATGGTCTGAGATTGTTACGT AAATAGTATTTCTAGAAAATTCTTCTCATGGATGAAGAATATATTTTTTTTATGATAAAATGTAGAATTTAGTTATAAGGGG GAATTTAGTTATAAGGGGACATATGATCACAACAAACGTATGCGGATAGTGTGGTTAAAGATA TCGTCCAATGGGTCGAAAATTCAGTGACATCTACTTTACTTGTGGAGGAAATTGCAGAAAAA TCTGGCTATTCTCGATGGCATTTCACGCAATTTTAAACACGCAACGGGAATTGCGTTAGG TGAATATGTTAGAGCCCGACGATTAACTGTGCTGCAGTAGAGTTGAAACTAACTAACTAAAA CAGTTTTGGAATTTGCTCTCCACTATGGTTTTGAATCACAACAACTTTTACTCGTTTCATTCA AAAATAAATTCATCTTCCACCAGGAAGATACCGTAAACAAATCGCCTGGRATTTGTCTGCA CTATGCCCTCCATTACTGTTAGAATGAGGAGAAATTTACAAATGTTAATTAATGACACTAT ACTGGTTTCCATGAGCGAAGAGTTGCCAATAAATATATCAAGATGCAGTTGTTTTACTTGG ATGATGAACCTTGCGTCGACATCGTACGGGTGATTTATGATTTAGAGCATGCAGTCAAAGAA TTTAAAAAAGAATAATACTTCAGCATATAAATTATTGCCACTCTGGGGAATGTGAAGATCCT GATTTACATATTGCATTAATTGACGATGTGAAAACTATCTTGATTACTTAGAATGAAGTTAA GGAACTAGAATCAAAAACAGCACTAACCCATATGAAATATTTTGAATTTTAAAGACATG ATCAGATTAACCGATTTTACTACCAGATAGAAAATGATGGATCTTATCCCATACATTTGTAT CGAGAAACAGCATGTCTCATGCTTAGGGGGCTAAAACACTTGACCTGAATCAACTATAGG GTTTGTAAATGGAGCCAATTCGAGAGTAGTGAGCCGAGATTAGCGAGATAAGAATCATTATC AATTAATTTCTTATCGTGGCATTGAAGCATCACGAATAGCAAATGAGGTCTCCATGATTAA GCAAAAAACCATCAAAAAATAATGTGCAACTAAGTGGTATTGGTTTACATAGCGGCAGCAGCA T</p>
# 3029	<p>ATTCAACAACTCCATCACCTTGGTGTCAAGACAGTTATGTTGACTGGGGATAACCCGCATAC AGCCAAAGCAATAGCATCTCAGGTCGGTATTGATGAAGCTCGTGGTAGTCAGTTACCTGAG GACAAACATCAAGTAGTTCAAGAGTATTCACGTATTGGTGTACTGGAATGGTTGGTGATGG CATCAATGATGCGCCGGCACTGGTTGCGGCAGATATAGGTTTTGCTATGGGGGCAATGGG TACTGATACGGCAATTGAAACTGCAGATGTGGCCTTAATGGATGATGACCTGCGTAAAAATC CCTGCCTTTGTAAAATTGTCCCGACAGACGTATAGCTTACTCGTGCAAAATATCAGTCTCGC ATTAGGTATTAAGCTATTTTCTTGTATTAACGCTCATGGGAATGGGGACTATGTGGATGG CGGTATTTGCTGATGTTGGTGCTAGCCTTCTGGTTGTAGCAAAATGGTCTGAGATTGTTACGT AAATAGTATTTCTAGAAA- GTTCTTCATGGATGAAGAATTTATTTTTTTTTTATGATAAATGTAGAATTTAGTTATAAGGGG ACATATGATCACAACAAACGTATGCGGATAGTGTGGTTAAAGATATCGTCCAATGGGTCGAAA ATTCAGTACATCTACTTTACTTGTGGAGGAAATGCAGAAAAATCTGGCTATTCTCGATGG CATTTTCAACGCATTTTAAACACGCAACGGGAATTGCGTTAGGTGAATATGTTAGAGCCCCG ACGATTAACCTGTGCTGCAGTAGAGTTGAAACTAACTACTAAAAACAGTTTTGGAATTTGCTC TCCACTATGGTTTTGAATCACAACAACTTTTACTCGTTTCAAAAAATTAATCCATCTTCC ACCAGGAAGATACCGTAAACAAATCGCCTGGGATTTGTCTGCACTATGCCCTCCATTACTGT TAGAACATGAGGAGAAATTTACAAATGTTAATTAATGACACTATACTGGTTTCCATGAGCGA AGAAGTTGCCAATAAATATATCAAGATGCAGGATGTTTTACTGGATGATGAACCTTGCGTCG ACATCGTACGGGTGATTTATGATTAGAGCATGCAGTCAAGGAATTTAAAGAAATGATGAATTA CTTCAGCATATAAATTATTGCCACTCTGGGGAATGTGAAGATCCTGATTTACATATTGCATTA ATTGACGATGTGAAAACTATTCTTGATTACTTAGAATGAAGTTAAGGAACTAGAATCAAAAA CAGCACTAACCCATATGAAATATTTTGAATTTATTTAAAGACATGATCAGATTAACCGATTTT AGCTACCAGATAGAAAATGATGGATCTTATCCCATACATTTGTATCGAGAAAACAGCATGTCT CATGCTTAGGGGGCTAAAACACTTGACCTGAATCAACTATAGGGTTTGTAAATGGAGCCAA TTCGAGAGTAGTGAGCCGAGATTAGCGAGATAAGAATCATTATCAATTAATTTCTTATCGTG GCATTTGAAGCATCACGAATAGCAAATGAGGTCTCCATGATTAAAGCAAAAAACCATCAAAAA TAATGTGCAACTAAGTGGTATTGGTTTACATAGCGGCAGCAGCATTCT</p>
# 3030	<p>CAACAACTCCATCACCTTGGTGTCAAGACAGTTATGTTGACTGGGGATAACCCGCATACAG CCAAAGCAATAGCATCTCAGGTCGGTATTGATGAAGCTCGTGGTAGTCAGTTACCTGAGGA CAAACATCAAGTAGTTCAAGAGTATTCACGTATTGGTGTACTGGAATGGTTGGTGATGGCA TCAATGATGCGCCGGCACTGGTTGCGGCAGATATAGGTTTTGCTATGGGGGCAATGGGTA CTGATACGGCAATTGAAACTGCAGATGTGGCCTTAATGGATGATGACCTGCGTAAAAATCCC TGCTTTGTAAAATTGTCCCGACAGACGTATAGCTTACTCGTGCAAAATATCAGTCTCGCAT TAGGTATTAAGCTATTTTCTTGTATTAACGCTCATGGGAATGGGGACTATGTGGATGGCG GTATTTGCTGATGTTGGTGCTAGCCTTCTGGTTGTAGCAAAATGGTCTGAGATTGTTACGTAA ATAGTATTTCTAGAAAATTCTTCATGGATGAAGAATTTATTTTTTTTTTATGATAAATGTAGA ATTTAGTTATAAGGGGACATATGATCACAACAAACGTATGCGGATAGTGTGGTTAAAGATATC GTCCAATGGGTCGAAAATTCAGTGACATCTACTTTACTTGTGGAGGAAATTGCAGAAAAATC</p>

	<p>TGGCTATTCTCGATGGCATTTCACGCGATTTTAAACACGCAACGGGAATTGCGTTAGGTG AATATGTTAGAGCCCGACGATTAACCTGTGCTGCAGTAGAGTTGAACTAACTACTAAAACA GTTTTGGAAATTGCTCTCCACTATGGTTTTGAATCACAACAACTTTTACTCGTTCATTCAA AATAAATTCATCTTCCACCAGGAAGATACCGTAAACAAATCGCCTGGRATTTGTCTGCACT ATGCCCTCCATTACTGTTAGAACATGAGGAGAATTTACAAATGTTAATTAATGACACTATAC TGGTTTCCATGAGCGAAGAAGTTGCCAATAAATATATCAAGATGCAGGATGTTTTACTGGAT GATGAACCTTGCCTCGACATCGTACGGGTGATTATGATTAGAGCATGCAGTCAAGAAT TAAAAAAGAATAATCTCAGCATATAAATTATTGCCACTCTGGGAATGTGAAGATCCTG ATTTACATATTGCATTAATTGACGATGTGAAAATCTTCTGATTACTTAGAATGAAGTTAAG GAACTAGAAATCAAAAACAGCACTAACCCATATGAAATATTTTGGATTTATTTAAAGACATGA TCAGATTAACCGATTTTAGCTACAGATAGAAAATGATGGATCTTATCCCATACATTTGTATC GAGAAACAGCATGTCTCATGCTTAGGGGGCTAAAACACTTGACCTGAATCAACTATAGGG TTTGTAAATGGAGCCAATTCGAGAGTAGTGAGCCGAGATTAGCGAGATAAGAATCATTATCAA TTAATTTCTTATCGTGGCATTGGAAGCATCACGAATAGCAAATGAGGTCTCCATGATTAAGC AAAAACCATCAAAAATAATGTGCAACTAAGTGGTATTGGTTTACATAGCGGCAGCAGCA</p>
# 3031	<p>AGCGATTCAACAACTCCATCACCTTGGTGTCAAGACAGTTATGTTGACTGGGGATAACCCG CATACAGCCAAAGCAATAGCATCTCAGGTGCGGTATTGATGAAGCTCGTGGTAGTCAGTTAC CTGAGGACAAACATCAAGTAGTTCAGAGTATTCACGTATTGGTGTACTGGAATGGTGGT GATGGCATCAATGATGCGCCGGCACTGTTGCGGCAGATAGAGTTTTGCTATGGGGCA ATGGGTACTGATACGGCAATTGAACTGCAGATGTGGCCTTAATGGATGATGACCTGCGTA AAATCCCTGCCTTTGTAATAATTGCCCCGACAGACGTATAGCTTACTCGTCAAAATATCAGT CTCGCATTAGGTATTAAGCTATTTCCCTTGATTAACGCTCATGGGAATGGGGACTATGTG GATGGCGGTATTTGCTGATGTTGGTGCTAGCCTTCTGGTTGAGCAAATGGTCTGAGATTG TTACGTAAATAGTATTTCTAGAACGTTCTTCATGGATGAAGAACTTATTTTTTTAGATA AATGTAGAATTTAGTTATAAGGGGACATATGATCACAACAACTATGCGGATAGTGTGGTTA AAGATATCGTCCAATGGGTGCAAAATTCAGTGACATCTACTTTACTTGTGGAGGAAATGCA GAAAAATCTGGCTATTCTCGATGGCATTTCACGCGATTTTAAACACGCAACGGGAATTGC GTTAGGTGAATATGTTAGAGCCCGACGATTAACCTGTGCTGCAGTAGAGTTGAACTAACTA CTAAACAGTTTTGAAATTGCTCTCCACTATGGTTTTGAATCACAACAACTTTTACTCGTT CATTCAAAAAATAAATCCATCTTCCACCAGGAAGATACCGTAAACAAATCGCCTGGRATTTG TCTGCACTATGCCCTCCATTACTGTTAGAACATGAGGAGAATTTACAAATGTTAATTAATGA CACTATACTGGTTTCCATGAGCGAAGAGTTGCCAATAATATATCAAGATGAGGATGTTT TACTGGATGATGAACCTTGCCTCGACATCGTACGGGTGATTTATGATTTAGAGCATGCAGT CAAAGAATTTAAAAAAGAATAATACCTCAGCATATAAATATTGCCACTCTGGGAATGTGA AGATCCTGATTTACATATTGCATTAATTGACGATGTGAAAATCTTCTGATTACTTAGAATG AAGTTAAGGAACTAGAAATCAAAAACAGCACTAACCCATATGAAATTTTACTGATTTATTAA AGACATGATCAGATTAACCGATTTTAGCTACCAGATAGAAAATGATGGATCTTATCCCATAC ATTTGTATCGAGAAACAGCATGTCTCATGCTTAGGGGGCTAAAACACTTGACCCTGAATCAA CTATAGGGTTTTGTAATGGAGCCAATTCGAGAGTAGTGAGCCGAGATTAGCGAGATAAGAAT CATTATCAATTAATTTCTTATCGTGGCATTGGAAGCATCACGAATAGCAAATGAGGTCTCCAT GATTAAGCAAAAAACCATCAAAAATAATGTGCAACTAAGTGGTATTGGT</p>
# 3032	<p>GCAAAATATCAGTCTCGCATTAGGTATTAAGCTATTTTCCCTTGATTAACGCTCATGGGAAT GGGGACTATGTGGATGGCGGTATTTGCTGATGTTGGTGCTAGCCTTCTGGTTGTAGCAAAT GGTCTGAGATTGTTACGTAAATAGTATTTCTAGAAA- GTTCTTCATGGATGAAGAAGTTATTTTTTTTTTAGATAAATGTAGAATTTAGTTATAAGGGG ACATATGATCACAACAACTATGCGGATAGTGTGGTTAAAGATATCGTCCAATGGGTGCAAA ATTCAGTGACATCTACTTTACTTGTGGAGGAAATTCGCAAAAAATCTGGCTATTTCTCGATG CATTTTCAACGCGATTTTAAACACGCAACGGGAATTGCGTTAGATGATTTGAGAGCCCG ACGATTAACCTGTGCTGCAGTAGAGTTGAACTAACTACTAAAACAGTTTTGGAATTTGCTC TCCACTATGGTTTTGAATCACAACAACTTTTACTCGTTTATTCAAAAAATAATCCATCTTCC ACCAGGAAGATACCGTAAACAAATCGCCTGGRATTTGTCTGCACTATGCCCTCCATTACTGT TAGAACATGAGGAGAATTTACAAATGTTAATTAATGACATATACTGGTTTCCATGAGCGA AGAAGTTGCCAATAAATATATCAAGATGCAGGATGTTTACTGGATGATGAACCTTGCCTCG ACATCGTACGGGTGATTTATGATTTAGAGCATGCAGTCAAAGAATTTAAAAAAGAATAATA CTTCAGCATATAAATATTGCCACTCTGGGGAATGTGAAGATCCTGATTACATATTGCATTA ATTGACGATGTGAAAATCTTCTGATTACTTAGAATGAAGTTAAGGAACTAGAAATCAAAAA CAGCACTAACCCATATGAAATATTTTGAAGTTTATTTAAAGACATGATCAGATTAACCGATTTT AGCTACCAGATAGAAAATGATGGATCTTATCCCATACATTTGTATCGAGAAACAGCATGTCT CATGCTTAGGGGGCTAAAACACTTGACCCTGAATCAACTATAGGGTTTTGTAATGGAGCCAA TTCGAGAGTAGTGAGCCGAGATTAGCGAGATAAGAATCATTATCAATTAATTTCTTATCGTG GCATTTGAAGCATCACGAATAGCAAATGAGGTCTCCATGATTAAGCAAAAAACCATCAAAAA TAATGTGCAACTAAGTGGTATTGGTTTACATAGCGGCAGCAG</p>
# 3033	<p>TTCAACAACTCCATCACCTTGGTGTCAAGACAGTTATGTTGACTGGGGATAACCCGCATACA GCCAAAGCAATAGCATCTCAGGTGCGGTATTGATGAAGCTCGTGGTAGTCAGTTACCTGAGG ACAAACATCAAGTAGTTCAAGAGTATTCACGTATTTGGTGTACTGGAATGGTTGGTGATGGC ATCAATGATGCGCCGGCACTGGcTGGCGCAGATATAGTTTTGCTATGGGGGCAATGGGTA CTGATACGGCAATTTGAACTGCAGATGTGGCCTTAATGGATGATGACCTGCGTAAAAATCCC TGCTTTTGTAAATTTGTCGGACAGACGTATAGCTTACTCGTGCAAAATATCAGTCTCGCAT TAGGTATTAAGCATTTTCTCTGTATTAACGCTCATGGGAATGGGCAATGATGGATGGCG GTATTTGCTGATGTTGGTGCTAGCCTTCTGGTTGTAGCAAATGGTCTGAGATTGTTACGTAA ATAGTATTTCTAGAAAGTTCTTATGGATGAAGAAGTTATTTTTTTTTTTAGATAAATGTAG AATTTAGTTATAAGGGGACATATGATCACAACAACTATGCGGATAGTGTGGTTAAAGATAT CGTCCAATGGGTGCAAAATTCAGTGACATCTACTTTACTGTGGAGGAAATTCAGAAAAAT CTGGCTATTCTCGATGGCATTTCACGCGATTTTAAACACGCAACGGGAATTGCGTTAGGT</p>

	GAATATGTTAGAGCCCCGACGATTAACCTGTGCTGCAGTAGAGTTGAAACTAACTACTAAAAC AGTTTTGGAAATTGCTCTCCACTATGGTTTTGAATCACAACAACTTTTACTCGTTCATTCAA AAATAAATTCCATCTTCCACCAGGAAGATACCGTAAACAAATCGCCTGGRATTGTCTGCAC TATGCCCTCCATTACTGTTAGAACATGAGGAGAATTTACAAATGTTAATTAATGACACTATA CTGGTTTCCATGAGCGAAGAAGTTGCCAATAAATATATCAAGATGCAGGATGTTTTACTGGA TGATGAACCTTGCCTCGACATCGTACGGGTGATTTATGATTTAGAGCATGCAGTCAAAGAAT TTAAAAAAGAATAATACTTCAGCATATAAATTATTGCCACTCTGGGGAATGTGAAGATCCT GATTTACATATTGCATTAATTGACGATGTGAAAACTATTCTTGATTACTTAGAATGAAGTTAA GGAACTAGAATCAAAAACAGCACTAACCCATATGAAATATTTTGAAGTTTAAAGACATG ATCAGATTAACCGATTTTACGTACCAGATAGAAAATGATGGATCTTATCCCATACATTTGTAT CGAGAAACAGCATGTCTCATGCTTAGGGGGCTAAAAACACTTGACCTGAATCAACTATAGG GTTTGAATGGAGCCAATTTCGAGAGTAGTGAGCCGAGATTAGCGAGATAAGAATCATTATC AATTAATTTCTTATCGTGGCATTGGAAGCATCACGAATAGCAAATGAGGTCTCCATGATTAA GCAAAAAACCATCAAAAATAATGTGCAACTAAGTGGTATTGGTTTACATAGCGGCAGCAGCA TT
# 3034	CAACAACCTCCATCACCTTGGTGTCAAGACAGTTATGTTGACTGGGGATAACCCGCATACAG CCAAAGCAATAGCATCTCAGGTCGGTATTGATGAAGCTCGTGGTAGTCAGTTACCTGAGGA CAAACATCAAGTAGTTCAAGAGTATTCACGTATTGGTGTACTGGAATGGTTGGTGATGGCA TCAATGATGCGCCGGCACTGGTTCGGGCAGATATAGGTTTGGCTATGGGGCAATGGGTA CTGATACGGCAATTGAAACTGCAGATGTGGCCTTAATGGATGATGACCTGCGTAAAAATCCC TGCTTTGTAAAATTGTCCCGACAGACGTATAGCTTACTCGTGCAAAATATCAGTCTCGCAT TAGGTATTAAGCTATTTT- CCTTGATTAACGCTCATGGGAATGGGACTATGTGGATGGCGGTATTTGCTGATGTTGGT GCTAGCCTTCTGGTTGTAGCAAATGGTCTGAGATTGTTACGTAAATAGTATTTCTAGAAAGT TCTTCATGGATGAAGAACTTATxTTTTTTTTTTAGATAAATGTAGAATTTAGTTATAAGGGGA CATATGATCAGAAAAACGTATGCGGATAGTGTGGTTAAAGATATCGTCCAAATGGGTGCAAAA TTCACTGACATCTACTTTACTTGTGGAGGAAATTGCAGAAAAATCTGGCTATTCTCGATGGC ATTTTCAACGCATTTTTAAACACGCAACGGGAATTGCGTTAGGTGAATATGTTAGAGCCCGA CGATTAACCTGTGCTGCAGTAGAGTTGAACTAACTACTAAAACAGTTTTGAAATTGCTCT CCACTATGGTTTTGAATCACAACAACTTTTACTCGTTCATTCAAAAAATAAATCCATCTTCC ACCAGGAAGATACCGTAAACAAATCGCCTGGGATTTGCTGCACTATGCCCTCCATTACTGT TAGAACATGAGGAGAATTTACAAATGTTAATTAATGACACTATAGCTGTTTCCATGAGCGA AGAAGTTGCCAATAAATATATCAAGATGCAGGATGTTTTACTGGATGATGAACCTTGCCTCG ACATCGTACGGGTGATTTATGATTTAGAGCATGCAGTCAAAGAATTTAAAAAAGAATAATA CTTCAGCATATAAATTATTGCCACTCTGGGGAATGTGAAGATCTCGATTTACATATTGCATTA ATTGACGATGTGAAACTATTCTTGATTACTTGAAGTGAAGTGAAGAACTAGAATCAAAAA CAGCACTAACCCATATGAAATATTTTGAAGTTATTTAAAGACATGATCAGATTAAACCGATTTT AGCTACCAGATAGAAAATGATGGATCTTATCCCATACATTTGTATCGAGAAACAGCATGTCT CATGCTTAGGGGGCTAAAAACACTTGACCCGTAATCAACTATAGGGTTTGTAAATGGAGCCAA TTCGAGAGTAGTGAGCCGAGATTAGCGAGATAAGAATCATTATCAATTAATTTCTTATCGTG GCATTTGAAGCATCACGAATAGCAAATGAGGTCTCCATGATTAAGCAAAAAACCATCAAAAA TAATGTGCAACTAAGTGGTATTGGTTTACATAGCGGCAGCAGCA
# 3035	CAACAACCTCCATCACCTTGGTGTCAAGACAGTTATGTTGACTGGGGATAACCCGCATACAG CCAAAGCAATAGCATCTCAGGTCGGTATTGATGAAGCTCGTGGTAGTCAGTTACCTGAGGA CAAACATCAAGTAGTTCAAGAGTATTCACGTATTGGTGTACTGGAATGGTTGGTGATGGCA TCAATGATGCGCCGGCACTGGcTGCGGCAGATATAGGTTTTGCTATGGGGCAATGGGTAC TGATACGGCAATTGAAACTGCAGATGTGGCCTTAATGGATGATGACCTGCGTAAAAATCCCT GCCTTTGTAAAATTGTCCCGACAGACGTATAGCTTACTCGTGCAAAATATCAGTCTCGCAT AGGTATTAAGCTATTTTCTTGTATTAACGCTCATGGGAATGGGACTATGTGGATGGCG GTATTTGCTGATGTTGGTGCTAGCCTTCTGGTTGTAGCAAATGGTGTAGATTGTTACGTAA TAGTATTTCTAGAAAGTCTTTCATGGATGAAGAACTTATATTTTTTTTTTAGATAAATGTAGA ATTTAGTTATAAGGGGACATATGATCAGAAAAACGTATGCGGATAGTGTTGTTAAAGATATC GTCCAATGGGTGCAAAAATCTACTGACATCTACTTTACTTGTGGAGAAATGCGAAGAAATC TGGCTATTCTCGATGGCATTTTCAACGCATTTTTAAACACGCAACGGGAATTGCGTTAGGTG AATATGTTAGAGCCCGACGATTAACCTGTGCTGCAGTAGAGTTGAACTAACTACTAAAACA GTTTTGGAATTTGCTCTCCACTATGGTTTTGAATCACAACAACTTTTACTCGTTCATTCAAA AATAAATCCATCTTCCACCAGGAAGATACCGTAAACAAATCGCCTGGGATTTGTCTGCACT ATGCCCTCCATTACTGTTAGAACATGAGGAGAATTTACAAATGTTAATTAATGACACTATAC TGGTTTCCATGAGCGAAGAAGTTGCCAATAAATATATCAAGATGCAGGATGTTTTACTGGAT GATGAACCTTGCCTCGACATCGTACGGGTGATTTATGATTTAGAGCATGCAGTCAAAGAAT TAAAAAAGAATAATACTTCAGCATATAAATTATTGCCACTCTGGGGAATGTGAAGATCCTG ATTTACATATTGCATTAATTGACGATGTGAAAACTATTCTTGATTACTTAGAATGAAGTTAAG GAACTAGAATCAAAAACAGCACTAACCCATATGAAATATTTTGAAGTTTATTTAAAGACATGA TCAGATTAACCGATTTTACTACCAGATAGAAAATGATGGATCTTATCCCATACATTTGTATC GAGAAACAGCATGTCTCATGCTTAGGGGGCTAAAAACACTTGACCTGAATCAACTATAGGG TTTGTAAATGGAGCCAATTCGAGAGTAGTGAGCCGAGATTAGCGAGATAAGAATCATTATCAA TTAATTTCTTATCGTGGCATTGGAAGCATCACGAATAGCAAATGAGGTCTCCATGATTAAGC AAAAAACCATCAAAAATAATGTGCAACTAAGTGGTATTGGTTTACATAGCGGCAGCAGC
# 3036	TTCAACAACCTCCATCACCTTGGTGTCAAGACAGTTATGTTGACTGGGGATAACCCGCATACA GCCAAAGCAATAGCATCTCAGGTCGGTATTGATGAAGCTCGTGGTAGTCAGTTACCTGAGG ACAAACATCAAGTAGTTCAAGAGTATTCACGTATTGGTGTACTGGAATGGTTGGTGATGGC ATCAATGATGCGCCGGCACTGGTTCGGGCAGATATAGGTTTTGCTATGGGGGCAATGGGTA CTGATACGGCAATTGAAACTGCAGATGTGGCCTTAATGGATGATGACCTGCGTAAAAATCCC TGCTTTGTAAAATTGTCCCGACAGACGTATAGCTTACTCGTGCAAAATATCAGTCTCGCAT

	<p>TAGGTATTAAGCTATTTTCCTTGATTAAACGCTCATGGGAATGGGGACTATGTGGATGGxxx TTTTTTTTTTAGATAAATGTAGAATTTAGTTATAAGGGGACATATGATCACAAAAACGTATG CGGATAGTGTGGTTAAAGATATCGTCCAATGGGTGCAAAATTCATGACATCTACTTTACTT GTGGAGGAAATTGCAGAAAAATCTGGCTATTCTCGATGGCATTTTCAACGCATTTTAAACA CGCAACGGGAATTGCGTTAGGTGAATATGTTAGAGCCCGACGATTAACTGTGCTGCAGTA GAGTTGAAACTAACTACTAAAAACAGTTTGGAAATTGCTCTCCACTATGGTTTTGAATCACAA CAAACTTTTACTCGTTTCATTCAAAAATAAATTCATCTTCCACCAGGAAGATACCGTAAACAA ATCGCCTGGRATTTGTCTGCACTATGCCCTCCATTACTGTTAGAACATGAGGAGAATTTAC AAATGTTAATTAATGACACTATACTGGTTCCATGAGCGAAGAAGTTGCCAATAAATATATCA AGATGCAGGATGTTTTACTGGATGATGAACCTTGCGTCGACATCGTACGGGTGATTATGAT TTAGAGCATGCAGTCAAAGAATTTAAAAAAGAATAAATCTCAGCATATAAATTATTGCCAC TCTGGGGAATGTGAAGATCCTGATTACATATTGCATTAATTGACGATGTGAAAACTATTCTT GATTACTTAGAATGAAGTTAAGGAACTAGAATCAAAAACAGCACTAACCCATATGAAATATT TTGAGTTTATTTAAAGACATGATCAGATTAACCGATTTTAGCTACCAGATAGAAAATGATGGA TCTTATCCCATACATTTGTATCGAGAAACAGCATGTCTCATGCTTAGGGGGCTAAAAACACTT GACCTGAATCAACTATAGGGTTTGAATGGAGCCAATTGAGAGTAGTGAGCCGAGATTA GCGAGATAAGAATCATTATCAATTAATTTCTATCGTGGCATTGGAAGCATCACGAATAGCAA ATGAGGTCTCCATGATTAAGCAAAAAACCATCAAAAATAATGTGCAACTAAGTGGTATTGGT TTACATAGCGGCAGCAGCAT</p>
# 3037	<p>CAACAACCTCCATCACCTTGGTGTCAAGACAGTTATGTTGACTGGGGATAACCCGCATACAG CCAAAGCAATAGCATCTCAGGTGCGGTATTGATGAAGCTCGTGGTAGTCAGTTACCTGAGGA CAAACATCAAGTAGTTCAAGAGTATTCACGTATTGGTGTACTGGAATGGTTGGTGATGGCA TCAATGATGCGCCGGCACTGGTTCGGGCAGATATAGTTTTGCTATGGGGCAATGGGTA CTGATACGGCAATTGAAACTGCAGATGTGGCCTTAATGGATGATGACCTGCGTAAAAATCCC TGCTTTGTAAAATTGTCCCGACAGACGTATAGCTTACTCGTGCAAAATATCAGTCTCGCAT TAGGTATTAAGCTATTTTCCTTGATTAAACGCTCATGGGAATGGGGACTATGTGGATGGCG GTTTTGCTGATGTTGGTGCTAGCCTTCxxxCTTATATTTTTTTTTAGATAAATGTAGAATTTA GTTATAAGGGGACATATGATCACAAAAACGTATGCGGATAGTGTGTTAAAGATATCGTCCA ATGGGTCGAAAATTCAGTACATCTACTTTACTTGTGGAGGAAATTCAGAAAAATCTGGCT ATTCTCGATGGCATTTCACCGCATTTTTAAACACGCAACGGGAATTGCGTTAGGTGAATAT GTTAGAGCCCGACGATTAACCTGTGCTGCAGTAGAGTTGAACTAACTACTAAAAACAGTTTT GGAATTGCTCTCCACTATGGTTTTGAATCACAAACAAATTTTACTCTTCAAAAATTA ATTCCATCTTCCACCAGGAAGATACCGTAAACAAATCGCCTGGRATTTGTCTGCACTATGCC CTCCATTACTGTTAGAACATGAGGAGAATTTACAAATGTTAATTAATGACACTATACTGGTT TCCATGAGCGAAGAAGTTGCCAATAAATATATCAAGATGCAGGATGTTTTACTGGATGATGA ACCTTGCGTCGACATCGTACGGGTATTTAGATTAGACATGCGTTAAAGAATTTAAAA AAAGAATAATACTTCAGCATATAAATATTGCCACTCTGGGGAATGTGAAGATCCTGATTAC ATATTGCATTAATTGACGATGTGAAAACTATTCTTGATTACTTAGAATGAAGTTAAGGAACT AGAATCAAAAACAGCACTAACCCATATGAAATATTTGAGTTTATTTAAAGACATGATCAGAT TAACCGATTTTAGCTACCAGATAGAAAATGATGGATCTTATCCCATACATTTGTATCGAGAAA CAGCATGTCTCATGCTTAGGGGGCTAAAAACACTTGACCTGAATCAACTATAGGGTTTGTA TGGAGCCAATTCGAGAGTAGTGAGCCGAGATTAGCGAGATAAGAATCATTATCAATTAATTT CTTATCGTGGCATTGGAAGCATCACGAATAGCAAATGAGGTCTCCATGATTAAGCAAAAAAC CATCAAAAATAATGTGCAACTAAGTGGTATTGGTTTACATAGCGGCAGCAGCA</p>
# 3038	<p>CAACAACCTCCATCACCTTGGTGTCAAGACAGTTATGTTGACTGGGGATAACCCGCATACAG CCAAAGCAATAGCATCTCAGGTGCGGTATTGATGAAGCTCGTGGTAGTCAGTTACCTGAGGA CAAACATCAAGTAGTTCAAGAGTATTCACGTATTGGTGTACTGGAATGGTTGGTGATGGCA TCAATGATGCGCCGGCACTGGcTcGGGCAGATATAGTTTTGCTATGGGGCAATGGGTAC TGATACGGCAATTGAAACTGCAGATGTGGCCTTAATGGATGATGACCTGCGTAAAAATCCCT GCCTTTGTAAAATTGTCCCGACAGACGTATAGCTTACTCGTGCAAAATATCAGTCTCGCATT AGGTATTAAGCTATTTTCCTTGATTAAACGCTCATGGGAATGGGGACTATGTGGATGGCG GTTTTGCTGATGTTGGTGCTAGCCTTCTGTTGTAGCAAATGGTCTGAGATTGTTACGTAA ATAGTATTTCTAGAAA- GTTCTTCATGGATGAAGAACCTATATTTTTTTTTTTAGATAAATGTAGAATTTAGTTATAAGGG GACATATGATCACAAAAACGTATGCGGATAGTGTGGTTAAAGATATCGTCCAATGGGTGCA AAATTCAGTACATCTACTTTACTTGTGGAGGAAATTCAGAAAAATCTGGCTATTCTCGAT GGCATTTCACCGCATTTTTAAACACGCAACGGGAATTGCGTTAGGTGAATATGTTAGAGCC CGACGATTAACCTGTGCTGCAGTAGAGTTGAACTAACTACTAAAAACAGTTTTGGAATTGC TCTCCACTATGGTTTTGAATCACAAACAACTTTTACTCGTTTCATTCAAAAATAAATTCATCTT CCACCAGGAAGATACCGTAAACAAATCGCCTGGGATTTGCTGCACTATGCCCTCCATTAC TGTTAGAACATGAGGAGAATTTCAAAATGTTAATTAATGACACTATACTGGTTTCCATGAGC GAAGAAGTTGCCAATAAATATATCAAGATGCAGGATGTTTTACTGGATGATGAACCTTGCCT CGACATCGTACGGGTGATTTATGATTAGAGCATGCAGTCAAGAATTTAAAAAAGAATAA TACTTCAGCATATAAATATTGCCACTCTGGGGAATGTGAAGATCCTGATTTACATATTGCAT TAATTGACGATGTGAAAACTATTCTTGATTACTTAGAATGAAGTTAAGGAACTAGAATCAAA AACAGCACTAACCCATATGAAATATTTGAGTTTATTTAAAGACATGATCAGATTAACCGATT TTAGCTACCAGATAGAAAATGATGGATCTTATCCCATACATTTGTATCGAGAAACAGCATGT CTCATGCTTAGGGGGCTAAAAACACTTGACCTGAATCAACTATAGGGTTTGTAAATGGAGCC AATTCGAGAGTAGTGAGCCGAGATTAGCGAGATAAGAATCATTATCAATTAATTTCTATCG TGGCATTGGAAGCATCACGAATAGCAAATGAGGTCTCCATGATTAAGCAAAAAACCATCAAA ATAATGTGCAACTAAGTGGTATTGGTTTACATAGCGGCAGCAGCATT</p>

# 3039	<p>ATTCAACAACCTCCATCACCTTGGTGTCAAGACAGTTATGTTGACTGGGGATAACCCGCATAC AGCCAAAGCAATAGCATCTCAGGTCGGTATTGATGAAGCTCGTGGTAGTCAGTTACCTGAG GACAAACATCAAGTAGTTCAAGAGATTTCACGTATTGGTGTACTGGAATGGTTGGTGATGG CATCAATGATGCGCCGGCACTGGCTGCGGCAGATATAGGTTTTGCTATGGGGGCAATGGG TACTGATACGGCAATTGAAACTGCAGATGTGGCCTTAATGGATGATGACCTGCGTAAAAATC CCTGCCTTTGTAATAATTGTCCCGACAGACGTATAGCTTACTCGTGCAAAATATCAGTCTCGC ATTAGGTATTAAGCTATTTTCCTTGTATTAACGCTCATGGGAATGGGACTATGTGGATGG CGGTATTTGCTGATGTTGGTGCTAGCCTTCTGGTTGTAGCAAAATGGTCTGAGATTGTTACGT AAATAGTATTTCTAGAAAGTTCTTCTMTGGATGAAGAAGTTATATTTTTTTTTAGATAAATGT AGAATTTAGTTATAAGGGGACATATGATCACAAAAACGTATGCGGATAGTGTGGTTAAAGAT ATCGTCCAATGGGTCGAAAATTTCACTGACATCTACTTTACTTTGTGGAGGAAATTCAGAAAA ATCTGGCTATTCTCGATGGCATTTCACACGCATTTTAAACACGCAACCGGGAATTCGCTTAG GTGAATATGTTAGAGCCCGACGATTAACCTGTGCTGCAGTAGAGTTGAACTAACTACTAAA ACAGTTTTGGAATTTGCTCTCCACTATGGTTTTGAATCACAAACAACTTTTACTCGTTCATTTC AAAAATAAATTCATCTTCCACCAGGAAGATACCGTAAACAAATCGCCTGGGATTTGTCTGC ACTATGCCCTCCATTACTGTTAGAACATGAGGAGAATTTCAAAAATGTTAATTAAGACACTA TACTGGTTTCCATGAGCGAAGAAGTTGCCAATAAATATATCAAGATGCAGGATGTTTTACTG GATGATGAACCTTGCCTGACATCGTACGGGTGATTTATGATTTAGAGCATGCAGTCAAAAG AATTTAAAAAAGAATAACTTCCAGCATATAAATTTATGCCCCTCTGGGGAATGTGAAGATC CTGATTTACATATTGCATTAATTGACGATGTGAAAACATTTCTTGATTAGATGAATGAGATC AAGGAACTAGAATCAAAACAGCACTAACCCATATGAAATATTTTGAAGTTATTTAAAGACA TGATCAGATTAACCGATTTTACGTACCAGATAGAAAATGATGGATCTTATCCCATACATTTGT ATCGAGAAACAGCATGTCTCATGCTTAGGGGGCTAAAACACTTGACCCTGAATCAACTATA GGGTTTGAATGGAGCCAATTCGAGAGTAGTGAGCCGAGATTACGAGATAAGAATCATTATA TCAATTAATTTCTTATCGTGGCATTGGAAGCATCACGAATAGCAAATGAGGTCTCCATGATTA AGCAAAAAACCATCAAAAATAATGTCGAACCTAAGTGGTATTGTTTACATAGCGGCAGCAGC AT</p>
# 3040	<p>ATTCAACAACCTCCATCACCTTGGTGTCAAGACAGTTATGTTGACTGGGGATAACCCGCATAC AGCCAAAGCAATAGCATCTCAGGTCGGTATTGATGAAGCTCGTGGTAGTCAGTTACCTGAG GACAAACATCAAGTAGTTCAAGAGATTTCACGTATTGGTGTACTGGAATGGTTGGTGATGG CATCAATGATGCGCCGGCACTGGCTGCGGCAGATATAGGTTTTGCTATGGGGGCAATGGGT ACTGATACGGCAATTGAAACTGCAGATGTGGCCTTAATGGATGATGCGTACGTAATAATCC CTGCCTTTGTAATAATTGTCCCGACAGACGTATAGCTTACTCGTGCAAAATATCAGTCTCGCA TTAGGTATTAAGCTATTTTCCTTGTATTAACGCTCATGGGAATGGGACTATGTGGATGGC GGTATTTGCTGATGTTGGTGCTAGCCTTCTGGTTGTAGCAAAATGGTCTGAGATTGTTACGTA AATAGxxxTTTTTTTTTATGATAAATGTAGAATTTAGTTATAAGGGGACATATGATCACAAAA CGTATGCGGATAGTGTGGTTAAAGATATCGTCCAATGGGTGCAAAATTTCACTGACATCTACT TTACTTGTGGAGGAAATTCAGAAAAATCTGGCTATTCTCGATGGCATTTCACACGCATTTT AAACACGCAACGGGAATTCGCTTAGGTGAATATGTTAGAGCCCGACGATTAACCTGTGCTG CAGTAGAGTTGAACTAACTACTAAAACAGTTTTGGAATTTGCTCTCCACTATGGTTTTGAAT CACAAACAACTTTTACTCGTTTCACTTCAAAAATAAATTCATCTCCACCAGGAAGATACCGTA AACAAATCGCCTGGGATTTGTCTGCACTATGCCCTCCATTACTGTTAGAACATGAGGAGAAT TTCACAAATGTTAATTAATGACACTATACTGGTTTCCATGAGCGAAGAAGTTGCCAATAAATA TATCAAGATGCAGGATGTTTTACTGGATGATGAACCTTGCCTGACATCGTACGGGTGATTT ATGATTTAGAGCATGCAGTCAAAAGATTTAAAAAAGAATAAATTAATCTCAGCATATAAATTT GCCACTCTGGGGAATGTGAAGATCCTGATTTACATATTGCATTAATTGACGATGTGAAAAC ATTCTTGATTACTTAGAATGAAGTTAAGGAACTAGAATCAAAAACAGCACTAACCCATATGA AATATTTTGAAGTTTAAAGACATGATCAGATTAACCGATTTTACGTACCAGATAGAAAAAT GATGGATCTTATCCCATACATTTGTATCGAGAAACAGCATGTCTTACCTAGGGGGCTAAA ACACTTGACCCTGAATCAACTATAGGGTTTGAATGGAGCCAATTCGAGAGTAGTGAGCCG AGATTAGCGAGATAAGAATCATTATCAATTAATTTCTTATCGTGGCATTGGAAGCATCACGAA TAGCAAATGAGGTCTCCATGATTAAGCAAAAAACCATCAAAAATAATGTCGAACCTAAGTGGT ATTGGTTTACATAGCGGCAGCAGC</p>
# 3041	<p>ATTCAACAACCTCCATCACCTTGGTGTCAAGACAGTTATGTTGACTGGGGATAACCCGCATAC AGCCAAAGCAATAGCATCTCAGGTCGGTATTGATGAAGCTCGTGGTAGTCAGTTACCTGAG GACAAACATCAAGTAGTTCAAGAGATTTCACGTATTGGTGTACTGGAATGGTTGGTGATGG CATCAATGATGCGCCGGCACTGGCTGCGGCAGATATAGGTTTTGCTATGGGGGCAATGGG TACTGATACGGCAATTGAAACTGCAGATGTGGCCTTAATGGATGATGACCTGCGTAAAAATC CCTGCCTTTGTAATAATTGTCCCGACAGACGTATAGCTTACTCGTGCAAAATATCAGTCTCGC ATTAGGTATTAAGCTATTTTCCTTGTATTAACGCTCATGGGAATGGGACTATGTGGATGG CGGTATTTxxxTTTTTTTTTATGATAAATGTAGAATTTAGTTATAAGGGGACATATGATCACAAAA CGTATGCGGATAGTGTGGTTAAAGATATCGTCCAATGGGTGCAAAATTTCACTGACATCTACT TTACTTGTGGAGGAAATTCAGAAAAATCTGGCTATTCTCGATGGCATTTCACACGCATTTT AAACACGCAACGGGAATTCGCTTAGGTGAATATGTTAGAGCCCGACGATTAACCTGTGCTG CAGTAGAGTTGAACTAACTACTAAAACAGTTTTGGAATTTGCTCTCCACTATGGTTTTGAAT CACAAACAACTTTTACTCGTTTCACTTCAAAAATAAATTCATCTTCCACCAGGAAGATACCGTA AACAAATCGCCTGGGATTTGTCTGCACTATGCCCTCCATTACTGTTAGAACATGAGGAGAAT TTCACAAATGTTAATTAATGACACTATACTGGTTTCCATGAGCGAAGAAGTTGCCAATAAATA TATCAAGATGCAGGATGTTTTACTGGATGATGAACCTTGCCTGACATCGTACGGGTGATTT ATGATTTAGAGCATGCAGTCAAAAGATTTAAAAAAGAATAAATTAATCTCAGCATATAAATTT GCCACTCTGGGGAATGTGAAGATCCTGATTTACATATTGCATTAATTGACGATGTGAAAAC ATTCTTGATTACTTAGAATGAAGTTAAGGAACTAGAATCAAAAACAGCACTAACCCATATGA AATATTTTGAAGTTTAAAGACATGATCAGATTAACCGATTTTACGTACCAGATAGAAAAAT GATGGATCTTATCCCATACATTTGTATCGAGAAACAGCATGTCTTACCTAGGGGGCTAAA ACACTTGACCCTGAATCAACTATAGGGTTTGAATGGAGCCAATTCGAGAGTAGTGAGCCG</p>

	AGATTAGCGAGATAAGAATCATTATCAATTAATTTCTTATCGTGGCATTTGAAGCATCACGAA TAGCAAATGAGGTCTCCATGATTAAGCAAAAAACCATCAAAAAATAATGTGCAACTAAGTGGT ATTGGTTTACATAGCGGCAGCAGCAT
# 1919	ATTCAACAACTCCATCACCTTGGTGTCAAGACAGTTATGTTGACTGGGGATAACCCGCATAC AGCCAAAGCAATAGCATCTCAGGTCGGTATTGATGAAGCTCGTGGTAGTCAGTTACCTGAG GACAAACATCAAGTAGTTCAAGAGTATTCACGTATTGGTGTACTGGAATGGTTGGTGATGG CATCAATGATGCGCCGGCACTGGTTGCGGCAGATATAGGTTTTGCTATGGGGGCAATGGG TACTGATACGGCAATTGAACTGCAGATGTGGCCTTAATGGATGATGACCTGCGTAAATC CCTGCCTTTGTAAAATTGTCCCGACAGACGTATAGCTTACTCGTGCAAAATATCAGTCTCGC ATTAGGTATTAAGCTATTTT- CCTTGATTAAACGCTCATGGGAATGGGGACTATGTGGATGGCGGTATTTxxxTTTTTTTAGAT AAATGTAGAATTTAGTTATAAGGGGACATATGATCACAAAAACGTATGCGGATAGTGTGGTT AAAGATATCGTCCAATGGGTCGAAAAATTCAGTGACATCTACTTTACTTGTGGAGGAAATTGC AGAAAAATCTGGCTATTCTCGATGGCATTTTCAACGCATTTTAAACACGCAACGGGAATTG CGTTAGGTGAATATGTTAGAGCCCGACGATTAACCTGTGCTGCAGTAGAGTTGAAACTAAC TACTAAACAGTTTTGGAAATTGCTCTCCACTATGGTTTTGAATCACAACAACTTTTACTCG TTCATTCAAAAATAAATTCATCTCCACCAGGAAGATACCGTAAACAAATCGCCTGGGATT TGTCTGCACTATGCCCTCCATTACTGTTAGAACATGAGGAGAATTTACAAATGTTAATTAAT GACACTATACTGGTTTCCATGAGCGAAGAAGTTGCCAATAAATATATCAAGATGCAGGATGT TTTACTGGATGATGAACCTTGCGTCGACATCGTACGGGTGATTTATGATTTAGAGCATGCAG TCAAAGAATTTAAAAAAGAATAATACTTCAGCATATAAATTATTGCCACTCTGGGGAATGTG AAGATCCTGATTTACATATTGCATTAATTGACGATGTGAAACTATTCTTGATTACTTAGAAT GAAGTTAAGGAACTAGAATCAAAAAACAGCACTAACCATATGAAATATTTGAGTTTATTTA AAGACATGATCAGATTAACCGATTTTAGCTACCAGATAGAAAATGATGGATCTTATCCCATA CATTTGTATCGAGAAACAGCATGTCTCATGCTTAGGGGGCTAAAACACTTGACCTGAATCA ACTATAGGGTTTGTAATGGAGCCAATTCGAGAGTAGTGAGCCGAGATTAGCGAGATAAGAA TCATTATCAATTAATTTCTTATCGTGGCATTTGAAGCATCACGAATAGCAAATGAGGTCTCCA TGATTAAGCAAAAAACCATCAAAAAATAATGTGCAACTAAGTGGTATTGGTTTACATAGCGGC AGCAGCAT

Anmerkung: xxx steht für Bereiche, in denen keine Sequenz gewonnen werden konnte

F 1.3 Abkürzungsverzeichnis

Tabelle 16: Abkürzungen

°C	Grad Celsius
µl, ml, l	Mikro-, Milli-, Liter
Abb.	Abbildung
AG	Arbeitsgruppe
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
ATP	Adenosintriphosphat
bidest.	zweifach destilliert
BLAST	<i>Basic Linear Alignment Search Tool</i>
bp	Basenpaar
BSA	Bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CIP	alkalische Phosphatase
CLIS	Clinical and Laboratory Standards Institute
CM	<i>cytoplasmatic membrane</i>
cm	Zentimeter
CSPD	<i>Chloro-5-substituted adamantyl-1,2-dioxetane phosphate (C₁₈H₂₀ClO₇PNa₂)</i>
dATP	desoxyAdenintriphosphat
dCTP	desoxyCytosintriphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dGTP	desoxyGuanintriphosphat
DIG	Digoxigenin
DNA	<i>Desoxyribonucleic acid</i>
dNTP	desoxyNukleotidtriphosphat
dTTP	desoxyThymidintriphosphat
<i>E. cloacae</i>	<i>Enterobacter cloacae</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
f	folgend
<i>forw.</i>	<i>forward</i>
gDNA	genomische DNA
h	Stunde
H ₂ O	Wasser
HTH	<i>helix-turn-helix</i>
<i>K. oxytoca</i>	<i>Klebsiella oxytoca</i>
<i>K. pneumoniae</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
<i>kana</i>	Kanamycin-Resistenzkassette
kb	Kilobasenpaare
<i>lac</i>	Gen des Lactose-Operons
<i>lacPr</i>	Promotor des <i>lac</i> -Operons
LB	Luria-Bertani

M	Molar
MDR	<i>multi drug resistance</i>
MFS	<i>major facilitator superfamily</i>
MHK	minimale Hemmkonzentration
Min.	Minute
mM	Millimolar
mm	Millimeter
mMol	Mikromolar
mod.	modifiziert
NaCl	Natriumchlorid
nm	Nanometer
OD	Optische Dichte
OM	<i>outer membrane</i>
OST	<i>organic solvent tolerance</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
pg, ng, µg, mg, g	Pico-, Nano-, Mikro-, Milli-, Gramm
pH	<i>pondus hydrogenii</i>
Pr	Promotor
rev.	<i>reverse</i>
RNA	<i>ribonucleic acid</i>
RNAse	Ribonuklease
RND	<i>resistance, nodulation and cell division</i>
roh	Gen des Roh-Operons
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	<i>real time-PCR</i>
s.o.	siehe oben
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i>
Sec	Sekunde
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
SSC	<i>saline sodium citrate</i>
Taq-Polymerase	<i>Thermophilus aquaticus</i> -DNA-Polymerase
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TE	Tris-EDTA-Puffer
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminoethan
U/min	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
V	Volt
vgl.	Vergleiche
w/v	<i>weight per volume</i>
z.B.	zum Beispiel

für die im Rahmen von Kits verwendeten Reagenzien: siehe beiliegende Handbücher

F 2 Literaturverzeichnis

1. Low, D.E. Antimicrobial drug use and resistance among respiratory pathogens in the community. *Clin Infect Dis* **33 Suppl 3**, S206-213 (2001).
2. Woods, C.R. Antimicrobial resistance: mechanisms and strategies. *Paediatr Respir Rev* **7 Suppl 1**, S128-129 (2006).
3. Grkovic, S., Brown, M.H. & Skurray, R.A. Regulation of bacterial drug export systems. *Microbiol Mol Biol Rev* **66**, 671-701 (2002).
4. Van Bambeke, F., Balzi, E. & Tulkens, P.M. Antibiotic efflux pumps. *Biochem Pharmacol* **60**, 457-470 (2000).
5. Linde, H.J., et al. Increase in MICs of ciprofloxacin in vivo in two closely related clinical isolates of *Enterobacter cloacae*. *J Antimicrob Chemother* **49**, 625-630 (2002).
6. Barrow, G.I., Feltham, R.K.A. Cowan and Steel's Manual for the Identification of Medical Bacteria, 1993, Cambridge, Press Syndicate of the University of Cambridge, 3rd edition.
7. Hof, H.D., Dörries, R. Medizinische Mikrobiologie, 2002, Stuttgart, Georg Thieme Verlag GmbH, 2., korr. Auflage.
8. Madigan, M.M., Martinko J M., Brock, T.D., Thomm, M. Brock Mikrobiologie, 2006, München, Pearson Studium, 11. überarb. Auflage.
9. Pitout, J.D., Moland, E.S., Sanders, C.C., Thomson, K.S. & Fitzsimmons, S.R. Beta-lactamases and detection of beta-lactam resistance in *Enterobacter spp.* *Antimicrob Agents Chemother* **41**, 35-39 (1997).
10. Herold, G. Innere Medizin, 2004, Köln, Herold, Auflage 2004.
11. Paulsen, I.T., Brown, M.H. & Skurray, R.A. Proton-dependent multidrug efflux systems. *Microbiol Rev* **60**, 575-608 (1996).
12. Putman, M., van Veen, H.W. & Konings, W.N. Molecular properties of bacterial multidrug transporters. *Microbiol Mol Biol Rev* **64**, 672-693 (2000).
13. Aono, R., Tsukagoshi, N. & Yamamoto, M. Involvement of outer membrane protein TolC, a possible member of the mar-sox regulon, in maintenance and improvement of organic solvent tolerance of *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol* **180**, 938-944 (1998).
14. Husain, F., Humbard, M. & Misra, R. Interaction between the TolC and AcrA proteins of a multidrug efflux system of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **186**, 8533-8536 (2004).
15. Saier, M.H., Jr. & Paulsen, I.T. Phylogeny of multidrug transporters. *Semin Cell Dev Biol* **12**, 205-213 (2001).
16. Ramos, J.L., et al. Mechanisms of solvent tolerance in gram-negative bacteria. *Annu Rev Microbiol* **56**, 743-768 (2002).
17. White, D.G., Goldman, J.D., Demple, B. & Levy, S.B. 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 (1997).
18. Mazzariol, A., Tokue, Y., Kanegawa, T.M., Cornaglia, G. & Nikaido, H. High-level fluoroquinolone-resistant clinical isolates of *Escherichia coli* overproduce multidrug efflux protein AcrA. *Antimicrob Agents Chemother* **44**, 3441-3443 (2000).
19. Rahmati, S., Yang, S., Davidson, A.L. & Zechiedrich, E.L. Control of the AcrAB multidrug efflux pump by quorum-sensing regulator SdiA. *Mol Microbiol* **43**, 677-685 (2002).
20. Yang, S., Clayton, S.R. & Zechiedrich, E.L. Relative contributions of the AcrAB, MdfA and NorE efflux pumps to quinolone resistance in *Escherichia coli*. *J Antimicrob Chemother* **51**, 545-556 (2003).

21. Yang, S., Lopez, C.R. & Zechiedrich, E.L. Quorum sensing and multidrug transporters in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 2386-2391 (2006).
22. Eckert, B. & Beck, C.F. Overproduction of transposon Tn10-encoded tetracycline resistance protein results in cell death and loss of membrane potential. *J Bacteriol* **171**, 3557-3559 (1989).
23. Hickman, R.K., McMurtry, L.M. & Levy, S.B. Overproduction and purification of the Tn10-specified inner membrane tetracycline resistance protein Tet using fusions to beta-galactosidase. *Mol Microbiol* **4**, 1241-1251 (1990).
24. Martin, R.G. & Rosner, J.L. Genomics of the marA/soxS/rob regulon of *Escherichia coli*: identification of directly activated promoters by application of molecular genetics and informatics to microarray data. *Mol Microbiol* **44**, 1611-1624 (2002).
25. Martin, R.G. & Rosner, J.L. The AraC transcriptional activators. *Curr Opin Microbiol* **4**, 132-137 (2001).
26. Sheppard, D. & Englesberg, E. Positive control in the L-arabinose gene-enzyme complex of *Escherichia coli* B/r exhibited with stable merodiploids. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **31**, 345-347 (1966).
27. Rhee, S., Martin, R.G., Rosner, J.L. & Davies, D.R. A novel DNA-binding motif in MarA: the first structure for an AraC family transcriptional activator. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 10413-10418 (1998).
28. Martin, R.G., Jair, K.W., Wolf, R.E., Jr. & Rosner, J.L. Autoactivation of the marRAB multiple antibiotic resistance operon by the MarA transcriptional activator in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **178**, 2216-2223 (1996).
29. Alekshun, M.N. & Levy, S.B. Regulation of chromosomally mediated multiple antibiotic resistance: the mar regulon. *Antimicrob Agents Chemother* **41**, 2067-2075 (1997).
30. Alekshun, M.N. & Levy, S.B. Alteration of the repressor activity of MarR, the negative regulator of the *Escherichia coli* marRAB locus, by multiple chemicals in vitro. *J Bacteriol* **181**, 4669-4672 (1999).
31. Barbosa, T.M. & Levy, S.B. Activation of the *Escherichia coli* nfnB gene by MarA through a highly divergent marbox in a class II promoter. *Mol Microbiol* **45**, 191-202 (2002).
32. Delihias, N. & Forst, S. MicF: an antisense RNA gene involved in response of *Escherichia coli* to global stress factors. *J Mol Biol* **313**, 1-12 (2001).
33. Nunoshiba, T., Hidalgo, E., Amabile Cuevas, C.F. & Demple, B. Two-stage control of an oxidative stress regulon: the *Escherichia coli* SoxR protein triggers redox-inducible expression of the soxS regulatory gene. *J Bacteriol* **174**, 6054-6060 (1992).
34. Tanaka, T., et al. RobA-induced multiple antibiotic resistance largely depends on the activation of the AcrAB efflux. *Microbiol Immunol* **41**, 697-702 (1997).
35. Kwon, H.J., Bennik, M.H., Demple, B. & Ellenberger, T. Crystal structure of the *Escherichia coli* Rob transcription factor in complex with DNA. *Nat Struct Biol* **7**, 424-430 (2000).
36. Rosner, J.L., Dangi, B., Gronenborn, A.M. & Martin, R.G. Posttranscriptional activation of the transcriptional activator Rob by dipyrindyl in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **184**, 1407-1416 (2002).
37. Jair, K.W., et al. Transcriptional activation of promoters of the superoxide and multiple antibiotic resistance regulons by Rob, a binding protein of the *Escherichia coli* origin of chromosomal replication. *J Bacteriol* **178**, 2507-2513 (1996).
38. Sabry, S.A., Ghozlan, H.A. & Abou-Zeid, D.M. Metal tolerance and antibiotic resistance patterns of a bacterial population isolated from sea water. *J Appl Microbiol* **82**, 245-252 (1997).

39. Hoffmann, H. & Roggenkamp, A. Population genetics of the nomenspecies *Enterobacter cloacae*. *Appl Environ Microbiol* **69**, 5306-5318 (2003).
40. webmaster. DNA Molecular Weight Marker VII. Vol. 2008 (Roche Diagnostics Corporation).
41. webmaster. DNA Molecular Weight Marker VIII. Vol. 2008 (Roche Diagnostics Corporation).
42. webmaster. DNA Molecular Weight Marker III. Vol. 2008 (Roche Diagnostics Corporation).
43. Don, R.H., Cox, P.T., Wainwright, B.J., Baker, K. & Mattick, J.S. 'Touchdown' PCR to circumvent spurious priming during gene amplification. *Nucleic Acids Res* **19**, 4008 (1991).
44. Roux, K.H. Using mismatched primer-template pairs in touchdown PCR. *Biotechniques* **16**, 812-814 (1994).
45. Hecker, K.H. & Roux, K.H. High and low annealing temperatures increase both specificity and yield in touchdown and stepdown PCR. *Biotechniques* **20**, 478-485 (1996).
46. Dower, W.J., Miller, J.F. & Ragsdale, C.W. High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Res* **16**, 6127-6145 (1988).
47. Institute, C.a.L.S. CLSI home. Vol. 2008 (2008).
48. Feng, D.F. & Doolittle, R.F. Progressive sequence alignment as a prerequisite to correct phylogenetic trees. *J Mol Evol* **25**, 351-360 (1987).
49. Stratagene. online manual - XL1-Blue Competent Cells.
50. Tenover, F.C. Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. *Am J Med* **119**, S3-10; discussion S62-70 (2006).
51. Seeger, M.A., et al. Structural asymmetry of AcrB trimer suggests a peristaltic pump mechanism. *Science* **313**, 1295-1298 (2006).
52. Kallman, O., Fendukly, F., Karlsson, I. & Kronvall, G. Contribution of efflux to cefuroxime resistance in clinical isolates of *Escherichia coli*. *Scand J Infect Dis* **35**, 464-470 (2003).
53. Nies, D.H. & Silver, S. Ion efflux systems involved in bacterial metal resistances. *J Ind Microbiol* **14**, 186-199 (1995).
54. Sharma, R., Rensing, C., Rosen, B.P. & Mitra, B. The ATP hydrolytic activity of purified ZntA, a Pb(II)/Cd(II)/Zn(II)-translocating ATPase from *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **275**, 3873-3878 (2000).
55. Lee, Y.J., et al. Fluoroquinolone resistance and gyrA and parC mutations of *Escherichia coli* isolated from chicken. *J Microbiol* **43**, 391-397 (2005).
56. Pasquali, F., Rossi, M., Manfreda, G. & Zanoni, R. Complete nucleotide sequence of the gyrA gene of *Helicobacter pullorum* and identification of a point mutation leading to ciprofloxacin resistance in poultry isolates. *Int J Antimicrob Agents* **30**, 222-228 (2007).
57. Nishizawa, T., et al. Rapid detection of point mutations conferring resistance to fluoroquinolone in gyrA of *Helicobacter pylori* by allele-specific PCR. *J Clin Microbiol* **45**, 303-305 (2007).
58. Sutton, K.A. & Wilkinson, M.F. Rapid evolution of a homeodomain: evidence for positive selection. *J Mol Evol* **45**, 579-588 (1997).
59. Farmer, J.J., 3rd, et al. Biochemical identification of new species and biogroups of *Enterobacteriaceae* isolated from clinical specimens. *J Clin Microbiol* **21**, 46-76 (1985).
60. Weischer, M. & Kolmos, H.J. Ribotyping of selected isolates of *Enterobacter cloacae* and clinical data related to biotype, phage type, O-serotype, and ribotype. *Apmis* **101**, 879-886 (1993).
61. Weischer, M., Kolmos, H.J., Kaufmann, M.E. & Rosdahl, V.T. Biotyping, phage typing, and O-serotyping of clinical isolates of *Enterobacter cloacae*. *Apmis* **101**, 838-844 (1993).

62. Clementino, M.M., *et al.* PCR analyses of tRNA intergenic spacer, 16S-23S internal transcribed spacer, and randomly amplified polymorphic DNA reveal inter- and intraspecific relationships of *Enterobacter cloacae* strains. *J Clin Microbiol* **39**, 3865-3870 (2001).
63. Linde, H.J., *et al.* In vivo increase in resistance to ciprofloxacin in *Escherichia coli* associated with deletion of the C-terminal part of MarR. *Antimicrob Agents Chemother* **44**, 1865-1868 (2000).
64. Grkovic, S., Brown, M.H. & Skurray, R.A. Transcriptional regulation of multidrug efflux pumps in bacteria. *Semin Cell Dev Biol* **12**, 225-237 (2001).
65. Chu, C.Y. & Rana, T.M. Small RNAs: regulators and guardians of the genome. *J Cell Physiol* **213**, 412-419 (2007).
66. Chan, Y.Y., *et al.* Control of quorum sensing by a *Burkholderia pseudomallei* multidrug efflux pump. *J Bacteriol* **189**, 4320-4324 (2007).
67. Hornig, A. Gebrauchsanweisung pUC19 DNA. (Carl Roth GmbH und Co KG, 2006).
68. Ferreira da Silva, M., Vaz-Moreira, I., Gonzalez-Pajuelo, M., Nunes, O.C. & Manaia, C.M. Antimicrobial resistance patterns in *Enterobacteriaceae* isolated from an urban wastewater treatment plant. *FEMS Microbiol Ecol* **60**, 166-176 (2007).
69. Bertolatti, D., O'Brien, F.G. & Grubb, W.B. Characterization of drug-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from poultry processing plants in Western Australia. *Int J Environ Health Res* **13**, 43-54 (2003).
70. Nicoloff, H., Perreten, V., McMurry, L.M. & Levy, S.B. Role for tandem duplication and Ion protease in AcrAB-TolC- dependent multiple antibiotic resistance (Mar) in an *Escherichia coli* mutant without mutations in marRAB or acrRAB. *J Bacteriol* **188**, 4413-4423 (2006).
71. Kim, K.R., Kim, Y.K. & Cha, H.J. Recombinant baculovirus-based multiple protein expression platform for Drosophila S2 cell culture. *J Biotechnol* **133**, 116-122 (2008).
72. Sardesai, Y.N. & Bhosle, S. Industrial potential of organic solvent tolerant bacteria. *Biotechnol Prog* **20**, 655-660 (2004).
73. Martinez, J.L., Baquero, F. & Andersson, D.I. Predicting antibiotic resistance. *Nat Rev Microbiol* **5**, 958-965 (2007).
74. Saudagar, P.S., Survase, S.A. & Singhal, R.S. Clavulanic acid: A review. *Biotechnol Adv* **26**, 26 (2008).
75. Yanagihara, K., *et al.* Effects of short interfering RNA against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* coagulase in vitro and in vivo. *J Antimicrob Chemother* **57**, 122-126 (2006).

F 3 Danksagung

An erster Stelle möchte ich Herrn PD Dr. Hans-Jörg Linde für Unterstützung und Betreuung in allen Bereichen von Laborarbeit über Auswertung bis hin zum Erstellen dieser Arbeit bedanken.

Auch der gesamten AG Linde ein herzliches Dankschön: Christine Irtenkauf für die technische und moralische Hilfe, Dr. Matthias Arnold für Beistand und Rat bei Planungs-, Durchführungs- und Auswertungsfragen und auch allen meinen Mit-Doktorandinnen und –diplomandinnen: Ulrike Theisen, Steffi Kandler, Sylvia Jayasinghe, Anne Rößger und Christine Morgenroth für das angenehme und produktive Arbeitsklima.

Zuletzt natürlich auch meiner Frau für das Unterstützen und Ertragen meiner selbst.

; -)

F 4 Lebenslauf

Name: Sebastian Franz Martin Häusler

Geboren: 21.06.1980 in Regensburg

1986 — 1990: Grundschule Königswiesen, Regensburg

1990 — 1999: Von-Müller-Gymnasium, Regensburg;

Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

1999 — 2000: Zivildienst als Rettungssanitäter, Malteser Hilfsdienst gGmbH,
Regensburg

2000 — 2006: Studium der Humanmedizin an der Universität Regensburg;

Abschluss: Staatsexamen

Oktober 2006 Approbation als Arzt

Seit 2006 Wissenschaftlicher Angestellter mit ärztlichen Aufgaben an der
Universitätsfrauenklinik Würzburg