

Aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie und Virologie
(Prof. Dr. med. U. Groß)
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

**Effekt der Carbapenemasen Vim1, Ndm1 und
Oxa48 auf die bakterielle Fitness von
*E. coli K12 MG1655***

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizinischen Fakultät der
Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Annika Jeibmann

aus
Datteln

Göttingen 2021

Aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie und Virologie
(Prof. Dr. med. U. Groß)
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

**Effekt der Carbapenemasen Vim1, Ndm1 und
Oxa48 auf die bakterielle Fitness von
*E. coli K12 MG1655***

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizinischen Fakultät der
Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Annika Jeibmann

aus
Datteln

Göttingen 2021

Dekan :

Prof. Dr. W. Brück

Referent:

Prof. Dr. med. U. Groß

Ko-Referent/in:

PD Dr. rer. nat. A. Uhmann

Datum der mündlichen Prüfung:

15.09.2022

Hiermit erkläre ich, die Dissertation mit dem Titel "Effekt der Carbapenemasen Vim1, Ndm1 und Oxa48 auf die bakterielle Fitness von *E. coli* K12 MG1655" eigenständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Göttingen, den
.....
(Unterschrift)

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis.....	II
Tabellenverzeichnis	III
Abkürzungsverzeichnis.....	IV
1 Einleitung.....	1
2 Material und Methoden.....	6
2.1 Material.....	6
2.1.1 Kommerzielle Kits	6
2.1.2 Biomoleküle	6
2.1.3 Bakterienstämme	12
2.1.4 Antibiotika.....	16
2.1.5 Medien und Puffer.....	17
2.1.6 Chemikalien	18
2.1.7 Verbrauchsmaterialien	19
2.1.8 Geräte	20
2.1.9 Software	22
2.2 Molekularbiologische Methoden.....	22
2.2.1 Agarose-Gelelektrophorese	22
2.2.2 DNA-Isolation.....	23
2.2.3 Ligation	26
2.2.4 Polymerase-Ketten-Reaktion	27
2.2.5 Konzentrationsabschätzung.....	29
2.2.6 Restriktionsverdau.....	29
2.2.7 Recombineering nach Court Lab (Sharan et al. 2009).....	30
2.2.8 Sequenzierung	31
2.3 Mikrobiologische Methoden.....	31
2.3.1 Bakterienkultur.....	31
2.3.2 Herstellung chemokompetenter Bakterien	32
2.3.3 Herstellung elektrokompeter Bakterien.....	33
2.3.4 Herstellung der Kulturmedien	33
2.3.5 Klonierungen.....	34
2.3.6 <i>Competition Assays</i> für <i>E. coli</i> modifiziert nach Lenski et al. (1994) / Lind und Andersson (2013).....	36
2.3.7 MHK-Bestimmung.....	37
2.3.8 <i>Plasmid-curing</i>	38
3 Ergebnisse.....	39
3.1 Herstellung der Zielstämme.....	39
3.2 Charakterisierung der verschiedenen resistenten Stämme	47
3.3 Untersuchung von Fitnessunterschieden	60
3.4 Bakterienpools aus verschiedenen Klonen	64
4 Diskussion.....	66
5 Zusammenfassung	74
6 Literatur	76

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 PCR-Produkt zur Vervielfältigung im pDrive Cloning Vector	39
Abbildung 2 Agarose-Gelelektrophorese nach dem <i>Eco</i> RI-Restriktionsverdau der pDrive Cloning Vektoren.....	40
Abbildung 3 Einbringen von Inserts in das pFPV-Plasmid am Beispiel von Vim1	41
Abbildung 4 PCR-Kontrolle des pFPV-Vim1-Plasmids (links) und des pFPV-Ndm1-Plasmids (rechts) in <i>E. coli DH5-alpha</i>	42
Abbildung 5 MHK für Ertapenem der transformierten <i>E. coli DH5-alpha</i> Stämme	42
Abbildung 6 Konstrukt nach Recombineering in den lacZ locus mit dem pFPV Promotor (oben) bzw. zum Ersetzen des lacZ locus (unten)	43
Abbildung 7 Blau-Weiß-Screening auf Kulturmedium mit X-Gal und IPTG.....	44
Abbildung 8 Schematische Darstellung des Lac-Operons (oben), PCR zur Kontrolle nach dem Recombineering (mittig) und Agarose-Gelelektrophoresen von PCR 1 (links unten) und PCR 2 (rechts unten) zur Bestätigung der Klone nach dem Recombineering in <i>E. coli K12 MG1655</i>	45
Abbildung 9 Rot-Weiß-Screening auf Agar mit Arabinose und TTC.....	46
Abbildung 10 Verdopplungszeit der rekombinanten Stämme (oben) und der plasmidkodierte Stämme (unten)	47
Abbildung 11 Wachstumskurve der komplementären <i>E. coli K12 MG1655</i> -Stämme mit und ohne Deletion Δ ara mit den Expressionsplasmiden pFPV-Ndm1 KanR (oben), pFPV-Vim1 KanR (mittig) und pFPV-Oxa48 KanR (unten).....	48
Abbildung 12 E-Test mit Ertapenem der Rekombinanten mit unterschiedlichen Promotoren	50
Abbildung 13 MHK für Ertapenem der rekombinanten Stämme mit unterschiedlichem Promotor	51
Abbildung 14 E-Test mit Ertapenem der plasmidkodierte Carbapenemasebildner	52
Abbildung 15 MHK für Ertapenem aller Stämme mit plasmidkodierte Resistenzgen	53
Abbildung 16 Einfluss von IPTG auf die MHK	54
Abbildung 17 Einfluss von Δ ara auf die MHK.....	54
Abbildung 18 Wachstumskurve der Rekombinanten im Vergleich zum Ausgangs- und Kontrollstamm	55
Abbildung 19 Wachstumskurven der plasmidkodierte Carbapenemasebildner im Vergleich zum Ausgangsstamm mit Kontrollplasmid.....	56
Abbildung 20 Maximale erreichte optische Dichte der Rekombinanten.....	57
Abbildung 21 Maximale optische Dichte der plasmidkodierte Carbapenemasebildner getrennt nach Stämmen mit und ohne Δ ara (oben) sowie gepoolt (unten)	58
Abbildung 22 Vitalität der Rekombinanten in Absolutwerten (oben) und als Relativangabe (unten).....	59
Abbildung 23 Vitalität der plasmidkodierte Carbapenemasebildner getrennt nach Stämmen mit und ohne Δ ara in Absolutwerten (oben) und gepoolt als Relativangabe (unten).....	60
Abbildung 24 Logarithmische Auftragung der <i>Competition Assays</i>	62
Abbildung 25 Vergleichende Betrachtung der Stämme mit und ohne Deletion Δ ara mit dem Expressionsplasmid pFPV-Ndm1	62
Abbildung 26 Vergleichende Betrachtung zur Verdeutlichung interindividueller Unterschiede beispielhaft zwischen den Klonen <i>E. coli K12 MG1655 WT pFPV-Vim1 KanR #1</i> und <i>#2</i>	63

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Kommerzielle Kits	6
Tabelle 2: Primer zur Herstellung von PCR-Produkten mit Restriktionsschnittstellen.....	6
Tabelle 3: Primer zur Herstellung von PCR-Produkten flankiert vom lac-Operator und lacY	7
Tabelle 4: Primer zur Herstellung von PCR-Produkten mit pFPV(Eigenname des Plasmids)-Promotor flankiert von Anteilen aus dem lacZ locus	7
Tabelle 5: Primer zur Kontrolle der richtigen Integration nach Einfügen in den lacZ locus	8
Tabelle 6: Primer zur Kontrolle der richtigen Integration nach Ersetzen des lacZ locus	8
Tabelle 7: Adapter für die Ligation des pFPV Vektors ohne Insert	8
Tabelle 8: Primer zur Kontrolle des Inserts im pFPV Vektor	8
Tabelle 9: Non-Proofreading DNA Polymerasen	9
Tabelle 10: Proofreading DNA Polymerasen	9
Tabelle 11: Restriktionsendonukleasen	10
Tabelle 12: Ligasen.....	10
Tabelle 13: Auftragspuffer und Molekulargewichtsmarker für Gelelektrophorese	10
Tabelle 14: Ausgangsplasmide und Helferplasmide	11
Tabelle 15: Klonierungsvektoren.....	11
Tabelle 16: Expressionsplasmide.....	12
Tabelle 17: Ausgangstämme.....	12
Tabelle 18: Bakterienstämme, die zur Transformation eingesetzt wurden.....	13
Tabelle 19: Transformierte Zellen mit pDrive Cloning Vector ohne funktionelle Expression der Carbapenemasen	13
Tabelle 20: Transformierte Bakterien mit pFPV Plasmid und funktionell exprimierten Carbapenemasen	14
Tabelle 21: Rekombinante Bakterien mit chromosomal integriertem Resistenzgen.....	14
Tabelle 22: Rekombinante Bakterien mit chromosomal integriertem Resistenzgen nach <i>plasmid-curing</i>	15
Tabelle 23: Bakterien, die als Wildtyp bzw. Vergleichsstamm eingesetzt wurden.....	15
Tabelle 24: Antibiotika	16
Tabelle 25: Medien	17
Tabelle 26: Puffer	17
Tabelle 27: Chemikalien.....	18
Tabelle 28: Verbrauchsmaterialien	19
Tabelle 29: Geräte.....	20
Tabelle 30: Software	22
Tabelle 31 PCR-Protokoll für Taq Polymerase	28
Tabelle 32 PCR-Protokoll für Phusion Polymerase	28
Tabelle 33 PCR-Protokoll für HiFi Polymerase	29
Tabelle 34 Faktor der MHK der Rekombinanten im Vergleich zum Wildtyp	51
Tabelle 35 Faktor der MHK für Ertapenem mit plasmidkodierten Carbapenemasen im Vergleich zum Wildtyp.....	53
Tabelle 36 Selektionskoeffizienten basierend auf den linearen Trendlinien der <i>Competition Assays</i>	63
Tabelle 37 Verdopplungszeiten <i>NEB Express Iq Competent E.coli</i> mit Expressionsplasmiden.....	65
Tabelle 38 Mittels E-Test bestimmte MHK für Ertapenem von <i>NEB Express Iq Competent E. coli</i> mit Expressionsplasmiden	65

Abkürzungsverzeichnis

<i>A. baumannii</i>	<i>Acinetobacter baumannii</i>
Amp	Ampicillin
AmpC	<i>ampicillinase class C</i>
bp	<i>base pair</i>
BSA	<i>bovine serum albumin</i>
Cam	Chloramphenicol
CFU	<i>colony forming units</i>
Δ ara	Deletion im L-Arabinose Operon
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
DMF	N,N-Dimethylformamid
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i>
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
<i>DpnI</i>	<i>Diplococcus pneumoniae nuclease I</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>EcoRI</i>	<i>Escherichia coli strain R nuclease I</i>
<i>EcoRV</i>	<i>Escherichia coli strain R nuclease V</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ESBL	<i>extended spectrum betalactamase</i>
E-Test	Epsilomer-Test
<i>HindIII</i>	<i>Hemophilus influenzae strain Rd nuclease III</i>
IMP	<i>Imipenemase</i>
IPTG	Isopropyl-beta-D-thiogalactopyranosid

Abkürzungsverzeichnis

Kan	Kanamycin
KanR	<i>kanamycin resistance cassette</i>
kb	<i>Kilobase</i>
KPC	<i>Klebsiella pneumoniae carbapenemase</i>
<i>K. pneumoniae</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
lacIQ	<i>lac inhibitor Q</i>
lacZ	<i>lactose Z</i>
LB-Medium	<i>lysogeny broth-Medium</i>
MALDI-TOF	<i>matrix-assisted laser desorption/ionisation time-of-flight mass spectrometry</i>
MCR1	<i>mobilized colistin resistance 1</i>
MHB	Müller-Hinton-Bouillon
MHE	Müller-Hinton E
MHK	minimale Hemmkonzentration
<i>NdeI</i>	<i>Neisseria denitrificans nuclease I</i>
Ndm	New Delhi metallo- β -lactamase
NEB	New England Biolabs
OD	optische Dichte
Oxa	<i>Oxacillinase</i>
pFPV	Eigenname des Plasmids pFPV
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
Recomb	<i>Recombineering</i>
Rev	<i>Reverse</i>
rpm	<i>revolutions per minute</i>
rpoB	<i>RNA polymerase beta subunit</i>
T4	<i>enterobacteriophage T4</i>
TA	Tetrazolium-Arabinose
TAE Puffer	TRIS-Acetat-EDTA-Puffer

Abkürzungsverzeichnis

Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TRIS	2-Amino-2-hydroxymethyl-propan-1,3-diol
TTC	Triphenyltetrazoliumchlorid
UV	Ultraviolett
VIM	Verona integron- <i>encoded</i> metallo- β - <i>lactamase</i>
WT	<i>Wildtype</i>
x g	Vielfaches der Erdbeschleunigung g
X-Gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galactopyranosid

1 Einleitung

Carbapeneme sind Antibiotika aus der Gruppe der Betalaktame. Carbapenemasen sind bakterielle Betalaktamasen, die in der Lage sind, Carbapeneme zu hydrolysieren. Aufgrund ihrer molekularen Struktur werden drei verschiedene Klassen von Carbapenemaseenzymen unterschieden. Ambler Klasse A und D sind Serin-Betalaktamasen, Ambler Klasse B sind Metallo-Betalaktamasen, deren Hydrolyseaktivität von Zink abhängt. Neben Carbapenemen hydrolysieren Carbapenemasen auch andere Betalaktamantibiotika. Das Substratprofil ist abhängig vom jeweiligen Enzym. Klasse A-Enzyme werden zu einem gewissen Grad durch Clavulansäure und Borsäure, KPC (*Klebsiella pneumoniae carbapenemase*) auch durch Tazobactam, inhibiert. Klasse B-Enzyme sind am häufigsten vom Typ Oxa (*oxacillinase*). Sie können keine Monobaktame hydrolysieren und werden durch Zink-Chelatoren, EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure) und Dipicolinsäure inhibiert. Da insbesondere Carbapenemase-positive Enterobacteriaceae oft auch andere Resistenzgene, die unter anderem Resistenzen gegen Quinolone, Cotrimoxazol, Nitrofurantoin, Tetrazykline und Aminoglykoside vermitteln, besitzen, weisen sie oftmals einen komplexen Resistenzphänotyp, bis zur Panresistenz, auf (Bartolini et al. 2014; Martínez-Martínez und González-López 2014; Queenan und Bush 2007; Stock 2014).

Die wichtigste Klasse A-Carbapenemase ist KPC. KPC ist vornehmlich in *Klebsiella pneumoniae* (*K. pneumoniae*) zu finden. Wichtigste Vertreter der Klasse B-Carbapenemase sind Vim (Verona integron-*encoded* metallo- β -*lactamase*), IMP (*imipenemase*) und Ndm (New Delhi metallo- β -*lactamase*). Die Metallobetalaktamasen werden vor allem in *Pseudomonas aeruginosa* nachgewiesen. Die Oxacillinasen Oxa48 und verwandte Enzyme sind die relevantesten Vertreter der Klasse D-Carbapenemasen. Oxacillinasen sind vor allem in *Acinetobacter baumannii* (*A. baumannii*) zu finden (Martínez-Martínez und González-López 2014; Queenan und Bush 2007).

Durch eine der vorgenannten Betalaktamasen kann die Ringstruktur des Betalaktamrings nahezu aller Betalaktamantibiotika hydrolysiert und somit funktionsuntüchtig gemacht werden. Aus diesem Grund geht eine Multiresistenz mit dem Vorhandensein einer Carbapenemase einher (Ambler 1980; Anderson et al. 2007; Nordmann et al. 2012). Außerdem tragen Resistenzplasmide häufig weitere Gene, die darüber hinausgehende Antibiotikaresistenzen mit sich bringen, häufig gegen Fluorchinolone und Aminoglykoside (van Loon et al. 2018). Es gibt Varianten der einzelnen Carbapenemasen, die das Aktivitätsspektrum beeinflussen. Diese Varianten unterscheiden sich meist nur in wenigen Aminosäuren. Durch das Akkumulieren vieler kleiner Mutationen wird das

Einleitung

Substratspektrum auf diese Weise erweitert (Sawa et al. 2020).

Die Produktion von Carbapenemasen ist der wichtigste Mechanismus der Carbapenemresistenz in Enterobacteriaceae. Andere Mechanismen sind die Synergie zwischen AmpC (*ampicillinase class C*) oder ESBL (*extended spectrum betalactamase*) mit einer verringerten Membranpermeabilität (Hamprecht et al. 2019). Einige Carbapenemasegene sind in der chromosomalen DNA (*deoxyribonucleic acid*) kodiert, allerdings sind die meisten Carbapenemasen Plasmid-vermittelt (van Loon et al. 2018). Plasmide sind selbstreplizierende genetische Elemente, bestehend aus zirkulärer Doppelstrang-DNA. Plasmide tragen per definitionem keine Gene, die für das Bakterienwachstum essentiell sind (Carattoli 2009). Häufig sind die Resistenzgene in Integrons lokalisiert. Dies treibt die Ausbreitung dieser Resistenzgene voran (Martínez-Martínez und González-López 2014). Außerdem fördert der häufige horizontale Transfer von carbapenemasetragenden Plasmiden die Verbreitung der Carbapenemresistenz (Potter et al. 2016).

Aus infektionsepidemiologischer Sicht sind Carbapenemasen bei Enterobacteriaceae in den vergangenen Jahren zunehmend beschrieben worden (Nordmann et al. 2011; Pascual et al. 2014). Erstmals wurden Carbapenemasen Ende des 20. Jahrhunderts beschrieben. Bereits nach 10 bis 20 Jahren sind Carbapenemasen nun weltweit verbreitet (Lutgring 2019; Oteo et al. 2014).

Carbapenemasen vom Vim-Typ sind weltweit nachgewiesen - mit erhöhter Prävalenz in Südeuropa und Asien. Oxa48 kommt am häufigsten im Mittelmeerraum sowie in Europa und Indien vor. Ebenfalls weltweit ausgebreitet ist die Carbapenemase Ndm1, welche erstmals in Indien, Pakistan und Großbritannien nachgewiesen wurde (Nordmann et al. 2011).

Carbapenemasen finden sich am häufigsten in *K. pneumoniae*. Nächsthäufigere Erreger sind *Escherichia coli* (*E. coli*) und *Enterobacter cloacae* (Zhang et al. 2018). Diese Erreger sind klinisch äußerst relevant, da sie häufige und vielfältige Krankheitsbilder auslösen können (Stock 2014; Thaden et al. 2017).

Infektionen durch Erreger, die Carbapenemasen produzieren, können sich klinisch verschieden äußern. Hauptsächlich verursachte Krankheitsbilder sind Atemwegsinfektionen, Harnwegsinfektionen und Septitiden, auch katheterassoziiert. Diese Infektionen sind in der Regel nosokomial oder zumindest mit dem Gesundheitswesen assoziiert (Paño Pardo et al. 2014; Zhang et al. 2018; Zilberberg et al. 2017). Das Risiko für eine Infektion mit einem carbapenemaseproduzierenden Keim hängt von vielen

Einleitung

Faktoren ab, unter anderem der Liegedauer im Krankenhaus, der Durchführung invasiver Maßnahmen und der Gabe von Antiinfektiva (Paño Pardo et al. 2014; Zilberberg et al. 2017). Infektionen mit carbapenemaseproduzierenden Enterobacteriaceae kommen aber auch im ambulanten Bereich vor (Zilberberg et al. 2017).

Patienten können carbapenemasebildende Bakterien auf unterschiedlichen Wegen akquirieren. Carbapenemasen können endogen durch Selektionsdruck auf das Darm-Mikrobiom im Rahmen einer Antibiotikaexposition hervortreten, exogen können sich Carbapenemasen durch horizontale Transmission verbreiten (Goodman et al. 2016). Als Reservoir sind beschrieben: Abfluss, Patientenbett, Beatmungsausrüstung, medizinisches Personal und medizinische Geräte (van Loon et al. 2018). Die physiologische Flora kann ein Reservoir und Ausgangspunkt zur Entwicklung resistenter Bakterienstämme sein (Sundqvist 2014).

Chromogenes Medium mit niedriger Carbapenemkonzentration hat sich in der klinischen Diagnostik von Pathogenen als zuverlässige Nachweismethode von Carbapenemasebildnern erwiesen. Andere Methoden sind zum Beispiel die Testung mittels PCR (*polymerase chain reaction*) oder die Analyse des Proteoms mittels MALDI-TOF (*matrix-assisted laser desorption/ionisation time-of-flight mass spectrometry*), wobei das Spektrum des intakten Carbapenems mit dem nach Hydrolyse verglichen wird (Bou et al. 2014).

Die häufigsten Genotypen unter den Carbapenemasen sind KPC, Vim, IMP, Ndm und Oxa48. In Deutschland wurden vor allem die Carbapenemasen Oxa48, Vim1 und KPC2 häufig nachgewiesen (Robert-Koch-Institut 2011). Oxa48 ist die häufigste Carbapenemase in Enterobacteriaceae in Deutschland und eine der häufigsten weltweit. Oxa48 wurde auf unterschiedlichen Plasmiden in klinischen Isolaten nachgewiesen. Die Wahrscheinlichkeit des horizontalen Gentransfers war hochgradig abhängig von dem übertragenen Plasmid. Die carbapenemasetragenden Plasmide hatten keinen Einfluss auf Zytotoxizität und Virulenz im Vergleich zum isogenen Empfängerstamm (Hamprecht et al. 2019). *A. baumannii* besitzt eine chromosomal kodierte Oxa Betalaktamase, Oxa-51-like. Diese Betalaktamase kann bei entsprechender genetischer Umgebung ebenfalls eine Carbapenemresistenz vermitteln (Bartolini et al. 2014; Potter et al. 2016). Ähnlich verhält es sich bei *Acinetobacter* Spezies, die eng mit *A. baumannii* verwandt sind. Manche konnten in *A. baumannii* übertragen werden und wurden so zur Grundlage für die übertragbare Carbapenemresistenz in dieser Spezies. Eine Weiterverbreitung durch Übertragung auf Enterobacteriaceae gelang im Fall von Oxa48 (Evans und Amyes 2014).

Einleitung

Vim ist Teil einer Integronstruktur und kann über Transposons in chromosomale und Plasmid-DNA integriert werden (Sawa et al. 2020). Ndm1 wurde in Form von Plasmid-DNA in Klebsiellen und *E. coli* nachgewiesen, jedoch außerhalb einer Integronstruktur (Sawa et al. 2020).

Die Therapie von Infektionen durch Enterobacteriaceae mit der Fähigkeit, Carbapenemase zu produzieren, ist eine wichtige Herausforderung im Bereich der Infektionskrankheiten (Rodríguez-Baño et al. 2014). Die therapeutischen Optionen sind aufgrund der vorgeannt erläuterten Multiresistenz stark eingeschränkt (Pascual et al. 2014; Thaden et al. 2017). Es kann zum Therapieversagen kommen. Infektionen mit carbapenemaseproduzierenden Erregern haben daher generell eine hohe Letalität (Albin et al. 2018; Ferranti et al. 2018; Paño Pardo et al. 2014). Eine Therapieoption bei einer Infektion mit carbapenemasebildenden Bakterien ist die Kombination eines Carbapenems mit einem Carbapenemaseinhibitor. Avibactam ist ein neuer Non-Betalaktam Betalaktamaseinhibitor. Er zeigt eine gute Aktivität gegen Klasse A- und C-Enzyme und Oxa48. Avibactam kann in Kombination mit Ceftazidim, Ceftarolin und Aztreonam eingesetzt werden (Stock 2014). Vim hingegen entgeht allen zur Zeit in der klinischen Standardversorgung eingesetzten Betalaktamaseinhibitoren (El-Ageery und Al-Hazmi 2014). Die zunehmende Antibiotikaresistenz betrifft neben Infektionskrankheiten viele komplexe medizinische Eingriffe wie Organtransplantationen, große chirurgische Eingriffe und Chemotherapien, da diese auf eine effektive Infektionsprophylaxe angewiesen sind (Hernando-Amado et al. 2017). In den letzten Jahren kam es zu einer weiteren Zunahme der Infektionen mit carbapenemresistenten Enterobacteriaceae, wohingegen es über einen Zeitraum von 15 Jahren keine neuen und effektiven Antibiotika gab. Zuletzt konnten neue Therapieoptionen entwickelt werden: Ceftazidim-Avibactam, Fosfomycin, Tigecyclin und Minocyclin. In Entwicklung stehen zur Zeit Meropenem-Vaborbactam, Imipenem-Relebactam, Plazomicin, und Eravacyclin (Thaden et al. 2017). Meropenem-Vaborbactam ist ein neuartiges Kombinationspräparat aus einem Carbapenem und einem Betalaktamaseinhibitor mit einer guten Wirkung gegen Subgruppen von carbapenemresistenten Enterobacteriaceae, deren Resistenz über KPC vermittelt wird (Albin et al. 2018; Lee und Baker 2018).

Es wurde bereits die Koinzidenz von KPC und MCR1 (*mobilized colistin resistance 1*) in *K. pneumoniae* beschrieben. Diese Entwicklung ist kritisch zu verfolgen, da Colistin eines der klinisch eingesetzten Reserveantibiotika bei Carbapenemresistenz ist.

Da die Therapieoptionen limitiert sind, ist es im klinischen Kontext wichtig, Risikopatienten einem Screening zu unterziehen, damit durch Isoliermaßnahmen die Weiterverbreitung

Einleitung

KPC-positiver Klebsiellen verhindert werden kann (Ferranti et al. 2018; Park et al. 2019). Die Selektion resistenter Bakterien geschieht bereits bei äußerst geringen Antibiotikakonzentrationen, hundertfach unter der MHK (minimale Hemmkonzentration). De novo Mutanten oder Bakterien mit vorbestehender Resistenz besitzen einen Selektionsvorteil gegenüber sensiblen Bakterien, obwohl die MHK mehr als hundertfach unterschritten wurde. Dies gibt eine neue Sichtweise auf die Entstehung von Antibiotikaresistenzen und deren Erhalt, da in der Umwelt oftmals Antibiotika in niedrigsten Konzentrationen vorhanden sind (Gullberg et al. 2011).

Antibiotikaresistenz ist generell mit einem negativen Einfluss auf die bakterielle Fitness assoziiert, dadurch dass der resistenzvermittelnde Mechanismus produziert und aufrechterhalten werden muss (Wang et al. 2019). Eine resistenzvermittelnde Mutation tritt typischerweise in Genen auf, die essentielle Zellfunktionen kodieren, da Antibiotika auf diese essentiellen Zellfunktionen abzielen. Es wird daher davon ausgegangen, dass derartige Mutationen in der Abwesenheit von Antibiotika nachteilig für die Bakterien sind (Durão et al. 2018). Nachteile bezüglich der Fitness können typischerweise als reduzierte Wachstumsrate beobachtet werden (Andersson und Hughes 2010).

Das Recombineering ist eine *in vivo* Methode zur gentechnischen Veränderung von *E. coli*. Katalysiert wird die homologe Rekombination von Proteinen eines Bakteriophagen. Die Ziel-Konstrukte werden mittels Elektroporation in die Bakterien eingebracht. Mittels Recombineering können Genausschaltungen, Deletionen und Punktmutationen kontrolliert durchgeführt werden (Sharan et al. 2009).

Die nachfolgende Dissertation befasst sich mit den Auswirkungen der Carbapenemasen Ndm1, Vim1 und Oxa48 auf die bakterielle Fitness. Es wurden standardisiert Bakterienstämme mit chromosomal integriertem Carbapenemasegen der vorgenannten Gruppen in einfacher Kopie im *lacZ* (*lactose Z*) locus mit einem starken und einem schwächeren Promotor mittels Recombineering hergestellt, ebenso wie *low copy* Plasmide mit Resistenzgenen. Die hergestellten Bakterienstämme wurden hinsichtlich ihrer Eigenschaften untersucht und in *Competition Assays* ihre Fitness mit dem jeweiligen Ausgangsstamm verglichen.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Kommerzielle Kits

Tabelle 1: Kommerzielle Kits

Verwendung	Name des Kits	Hersteller
DNA Aufreinigung aus Agarose-Gel	QIAquick PCR purification Kit	QIAGEN, Hilden
DNA Isolation aus Bakterien	QIAamp® DNA Mini Kit	QIAGEN, Hilden
Ligation mit dem pDrive Cloning Vector	QIAGEN PCR Cloning Kit	QIAGEN, Hilden
Plasmid-DNA Isolation aus Flüssigkultur	GenElute™ Plasmid Miniprep Kit	Sigma-Aldrich, Steinheim
	GenElute™ Plasmid Maxiprep Kit	Sigma-Aldrich, Steinheim

2.1.2 Biomoleküle

2.1.2.1 Primer

Tabelle 2: Primer zur Herstellung von PCR-Produkten mit Restriktionsschnittstellen

Bezeichnung	Sequenz 5' → 3'	Annealing-Temperatur
Vim1-NdeI(<i>Neisseria denitrificans</i> nuclease I)-fwd(forward)	TACATATGTTAAAAGTTATTAGTAGTTTATTGG T	55 °C
Vim1-HindIII(<i>Hemophilus influenzae</i> strain Rd nuclease III)-rev(reverse)	ATAAGCTTACTCGGCGACTGAGCGATTTTTG	55 °C
Ndm1-NdeI-fwd	TACATATGGAATTGCCCAATATTATGCAC	71 °C
Ndm1-HindIII-rev	ATAAGCTTAGCGCAGCTTGTCGGCCATGC	71 °C

Primer wurden im kleinstmöglichen Synthesemaßstab bei Sigma-Aldrich, Steinheim

Material und Methoden

bestellt.

Tabelle 3: Primer zur Herstellung von PCR-Produkten flankiert vom lac-Operator und lacY

Bezeichnung	Sequenz 5' → 3'
LacZ_50bp-up-Vim1-fwd	TATGTTGTGTGGAATTGTGAGCGGATAACAATTTACACAGGAAACAGC TATGTTAAAAGTTATTAGTAGTTTATTGGTCTACATG
LacZ_50bp-down-Vim1-rev	ATGGATTCCTTACGCGAAATACGGGCAGACATGGCCTGCCCGTTATT ACTACTCGGCGACTGAGCGA
LacZ_50bp-up-Ndm1-fwd	TATGTTGTGTGGAATTGTGAGCGGATAACAATTTACACAGGAAACAGC TATGGAATTGCCCAATATTATGCA
LacZ_50bp-down-Ndm1-rev	ATGGATTCCTTACGCGAAATACGGGCAGACATGGCCTGCCCGTTATT ATCAGCGCAGCTTGTCGG

Primer wurden im kleinstmöglichen Synthesemaßstab bei Sigma-Aldrich, Steinheim bestellt.

Tabelle 4: Primer zur Herstellung von PCR-Produkten mit pFPV(Eigenname des Plasmids)-Promotor flankiert von Anteilen aus dem lacZ locus

Bezeichnung	Sequenz 5' → 3'
lacZ_Recomb(recombination).fwd	CATTTTCCGTGACGTCTCGTTGCTGCATAA ACCGACTACACAAATCAGCGGATCCCGGAG TTCATGCGTGAT
lacZ_Recomb.rev	AAGACTGTTACCCATCGCGTGGGCGTATTC GCAAAGGATCAGCGGGCGCGAGGGTGACGG TGCCGAGGATGA

Primer wurden im kleinstmöglichen Synthesemaßstab bei Sigma-Aldrich, Steinheim bestellt.

Tabelle 5: Primer zur Kontrolle der richtigen Integration nach Einfügen in den lacZ locus

Bezeichnung	Sequenz 5' → 3'
1+lacZ	ATGGCGCTTTGCCTGGTTTC
2-pFPV	GATGGCTTTAGAACGGGTCTTGC
4-lacZ	GTCAATGCGGGTCGCTTCAC
Vim1-fwd	AGTGGTGAGTATCCGACAG
Vim1-rev	ATGAAAGTGCGTGGAGAC
Ndm1-fwd	CTGAGCACCGCATTAGCC
Ndm1-rev	GGGCCGTATGAGTGATTGC

Primer wurden im kleinstmöglichen Synthesemaßstab bei Sigma-Aldrich, Steinheim bestellt.

Tabelle 6: Primer zur Kontrolle der richtigen Integration nach Ersetzen des lacZ locus

Bezeichnung	Sequenz 5' → 3'
lacY-2-rev	CCGAACATCCAAAAGTTTGTGTTT
lac-Operator-1-fwd	TAGCTCACTCATTAGGCAC
Vim1-fwd	AGTGGTGAGTATCCGACAG
Vim1-rev	ATGAAAGTGCGTGGAGAC
Ndm1-fwd	CTGAGCACCGCATTAGCC
Ndm1-rev	GGGCCGTATGAGTGATTGC

Tabelle 7: Adapter für die Ligation des pFPV Vektors ohne Insert

Bezeichnung	Sequenz 5' → 3'
<i>Nde</i> I- <i>Hind</i> III-Adapter-fwd	TATGTAGCCCTGAGGTTAGA
<i>Nde</i> I- <i>Hind</i> III-Adapter-rev	AGCTTCTAACCTCAGGGCTACA

Tabelle 8: Primer zur Kontrolle des Inserts im pFPV Vektor

Bezeichnung	Sequenz 5' → 3'
pFPV-yFPV2-*	ATGAGCGCATTGTTAGATTTTCATA

* Primer wurde bei Microsynth synthetisiert

2.1.2.2 Enzyme

Tabelle 9: Non-Proofreading DNA Polymerasen

Bezeichnung	Hersteller
Taq (<i>Thermus aquaticus</i>) DNA Polymerase 5 U/ μ l	Roche, Mannheim
10x PCR Reaction Buffer	Roche, Mannheim
PCR Grade Nucleotide Mix	Roche, Mannheim

Tabelle 10: Proofreading DNA Polymerasen

Bezeichnung	Hersteller
PCRBIO HiFi Polymerase 2 U/5 μ l	PCR Biosystems, London
5x PCRBIO Reaction Buffer	PCR Biosystems, London
Phusion® HF DNA Polymerase 2000 U/ml	New England Biolabs, Frankfurt
5x Phusion HF Buffer	New England Biolabs, Frankfurt

Tabelle 11: Restriktionsendonukleasen

Bezeichnung	Hersteller
10x <i>EcoRI</i> (<i>Escherichia coli</i> strain R nuclease I) Reaction Buffer	New England Biolabs, Frankfurt
Buffer 2 10x Concentrate	New England Biolabs, Frankfurt
Buffer 3 10x Concentrate	New England Biolabs, Frankfurt
CutSmart 10x Concentrate	New England Biolabs, Frankfurt
Purified BSA (<i>bovine serum albumin</i>) 100x 10 mg/ml	New England Biolabs, Frankfurt
<i>DpnI</i> (<i>Diplococcus pneumoniae</i> nuclease I) 20.000 U/ml	New England Biolabs, Frankfurt
<i>EcoRI</i> 20.000 U/ml	New England Biolabs, Frankfurt
<i>EcoRV</i> (<i>Escherichia coli</i> strain R nuclease V) HF (high fidelity) 20.000 U/ml	New England Biolabs, Frankfurt
<i>HindIII</i> -HF™ 20.000 U/ml	New England Biolabs, Frankfurt
<i>NdeI</i> 20.000 U/ml	New England Biolabs, Frankfurt

Tabelle 12: Ligasen

Bezeichnung	Hersteller
T4 (<i>enterobacteriophage</i> T4) DNA Ligase	Thermo Scientific, Schwerte
T4 Ligase 10x Puffer	Thermo Scientific, Schwerte

2.1.2.3 Auftragspuffer und Molekulargewichtsmarker für Gelelektrophorese

Tabelle 13: Auftragspuffer und Molekulargewichtsmarker für Gelelektrophorese

Beschreibung	Produktname	Hersteller
Auftragspuffer	6x Orange DNA Loading Dye	Thermo Scientific, Schwerte
Auftragspuffer	5x Bromphenolblau	-
Molekulargewichtsmarker	GeneRuler™ 100 bp (<i>base pair</i>) DNA Ladder	Fermentas, Thermo Scientific, Schwerte
Molekulargewichtsmarker	GeneRuler™ 1 kb (<i>kilobase</i>) DNA Ladder	Fermentas, Thermo Scientific, Schwerte

2.1.2.4 Plasmide

Tabelle 14: Ausgangsplasmide und Helferplasmide

Bezeichnung	Selektionsmarker	Größe	Quelle
pDrive Cloning Vector	50 µg/ml Ampicillin Blau-Weiß-Screening mit 80 µg/ml X-Gal und 0,5 mM IPTG (Isopropyl- beta-D- thiogalactopyranosid) möglich	3.850 bp	QIAGEN PCR Cloning Kit, QIAGEN, Hilden
pFPV-Oxa48	50 µg/ml Chloramphenicol 0,25 µg/ml Ertapenem	5.672 bp	Addgene Plasmid 20956: pFPV- mCherry; Olivia Steele-Mortimer, Salmonella-Host Cell Interactions Section, NIH, USA; von AG Bohne im Vorfeld modifiziert
pSIM9	20 µg/ml Chloramphenicol	6.435 bp	beschrieben von Datta et al. (2006)

Tabelle 15: Klonierungsvektoren

Bezeichnung	Selektionsmarker	Größe	Quelle
pDrive Vim1	50 µg/ml Ampicillin	4.660 bp	* ¹
pDrive Ndm1	50 µg/ml Ampicillin	4.672 bp	* ¹

*¹ durch Ligation zwischen pDrive Cloning Vector mit Carbapenemasegen hergestellt

Tabelle 16: Expressionsplasmide

Bezeichnung	Selektionsmarker mit Antibiotikakonzentration	Größe	Quelle
pFPV Vim1 KanR (kanamycin resistance cassette)	50 µg/ml Kanamycin	5.667 bp	* ²
pFPV Ndm1 KanR	50 µg/ml Kanamycin	5.679 bp	* ²
pFPV Oxa48 KanR	50 µg/ml Kanamycin		AG Bohne
pFPV control KanR	50 µg/ml Kanamycin		* ²

*² durch Ligation zwischen pFPV und Carbapenemasegen bzw. Adapter hergestellt

2.1.3 Bakterienstämme

Tabelle 17: Ausgangsstämme

Name	Kulturmedium und Selektionsmarker	Quelle
<i>E. coli</i> Vim1 (162/19)	Columbia Blutagar	Robert-Koch-Institut Wernigerode, FG13 Nosokomiale Infektionserreger und Antibiotikaresistenzen
<i>K. pneumoniae</i> Ndm1 (93/10)		

Tabelle 18: Bakterienstämme, die zur Transformation eingesetzt wurden

Name	Kulturmedium und Selektionsmarker	Quelle
<i>NEB</i> (New England Biolabs) <i>DH5-alpha Competent E. coli (High Efficiency)</i>	-	New England Biolabs, Frankfurt
<i>NEB Express Iq</i> (lac inhibitor Q) <i>Competent E. coli</i>	-	New England Biolabs, Frankfurt
<i>E. coli K12 MG1655 pSIM9</i>	LB-Agar + 20 µg/ml Chloramphenicol	von der Arbeitsgruppe im Vorfeld transformiert
<i>E. coli K12 MG1655 WT (wildtype)</i>	Columbia Blutagar	AG Alex Hall, Theoretical Biology, Institute of Integrative Biology, Department of Environmental Systems Science, ETH Zürich
<i>E. coli K12 MG1655 Δara</i> (Deletion im L-Arabinose operon)	Columbia Blutagar	AG Alex Hall, Theoretical Biology, Institute of Integrative Biology, Department of Environmental Systems Science, ETH Zürich

Tabelle 19: Transformierte Zellen mit pDrive Cloning Vector ohne funktionelle Expression der Carbapenemasen

Name	Kulturmedium und Selektionsmarker	Quelle
<i>E. coli DH5-alpha pDrive Vim1</i>	LB-Agar	*
<i>E. coli DH5-alpha pDrive Ndm1</i>	+ 50 µg/ml Ampicillin	*

Tabelle 20: Transformierte Bakterien mit pFPV Plasmid und funktionell exprimierten Carbapenemasen

Name	Kulturmedium und Selektionsmarker	Quelle
<i>E. coli</i> DH5-alpha pFPV <i>VimI</i> KanR	LB-Agar + 50 µg/ml Kanamycin	*
<i>E. coli</i> DH5-alpha pFPV <i>NdmI</i> KanR		*
<i>E. coli</i> K12 MG1655 WT pFPV- <i>VimI</i> KanR		*
<i>E. coli</i> K12 MG1655 Δ ara pFPV- <i>VimI</i> KanR		*
<i>E. coli</i> K12 MG1655 WT pFPV- <i>NdmI</i> KanR		*
<i>E. coli</i> K12 MG1655 Δ ara pFPV- <i>NdmI</i> KanR		*
NEB Iq Competent <i>E. coli</i> pFPV- <i>Oxa48</i> KanR		von Arbeitsgruppe im Vorfeld transformiert
NEB Iq Competent <i>E. coli</i> pFPV- <i>VimI</i> KanR		*
NEB Iq Competent <i>E. coli</i> pFPV- <i>NdmI</i> KanR		*

Tabelle 21: Rekombinante Bakterien mit chromosomal integriertem Resistenzgen

Name	Kulturmedium und Selektionsmarker	Quelle
<i>E. coli</i> K12 MG 1655 pSIM9 <i>Recomb_VimI.lacZ</i>	LB-Agar + 80 µg/ml X-Gal	*
<i>E. coli</i> K12 MG 1655 pSIM9 <i>Recomb_VimI.lacZpart</i>	0,5 mM IPTG 0,0156 µg/ml Ertapenem	*

Name	Kulturmedium und Selektionsmarker	Quelle
<i>E. coli</i> K12 MG 1655 <i>pSIM9</i> <i>Recomb_Ndm1.lacZ</i>		*
<i>E. coli</i> K12 MG 1655 <i>pSIM9</i> <i>Recomb_Ndm1.lacZpart</i>		*

Tabelle 22: Rekombinante Bakterien mit chromosomal integriertem Resistenzgen nach *plasmid-curing*

Name	Kulturmedium und Selektionsmarker	Quelle
<i>E. coli</i> K12 MG 1655 <i>Recomb_Vim1.lacZ</i>	LB-Agar + 80 µg/ml X-Gal	*
<i>E. coli</i> K12 MG 1655 <i>Recomb_Vim1.lacZpart</i>	0,5 mM IPTG 0,0156 µg/ml Ertapenem	*
<i>E. coli</i> K12 MG 1655 <i>Recomb_Ndm1.lacZ</i>		*
<i>E. coli</i> K12 MG 1655 <i>Recomb_Ndm1.lacZpart</i>		*

Tabelle 23: Bakterien, die als Wildtyp bzw. Vergleichsstamm eingesetzt wurden

Name	Kulturmedium und Selektionsmarker	Quelle
<i>E. coli</i> K12 MG1655		hergestellt durch <i>plasmid-curing</i> von <i>E. coli</i> K12 MG1655 <i>pSIM9</i>
<i>E. coli</i> K12 MG1655 WT <i>pFPV KanR</i>	LB-Agar + 50 µg/ml Kanamycin	*
<i>E. coli</i> K12 MG1655 Δ <i>ara</i> <i>pFPV KanR</i>	LB-Agar + 50 µg/ml Kanamycin	*

* im Rahmen der Doktorarbeit hergestellte Bakterienstämme

2.1.4 Antibiotika

Tabelle 24: Antibiotika

Antibiotikum	Kürzel	Stocklösung	Produktname	Hersteller
Ampicillin	Amp	50 mg/ml in ddH ₂ O	Ampicillin <i>sodium salt</i>	Sigma-Aldrich, Steinheim
Chloramphenicol	Cam	34 mg/ml in Ethanol	Chloramphenicol	Sigma-Aldrich, Steinheim
Ertapenem	Ert	50 mg/ml in ddH ₂ O	Invanz®	MSD Sharp & Dohme, Haar
Ertapenem	Etp	0,002 – 32 mg/l	MIC Test <i>strip</i> Ertapenem	Liofilchem S.r.l., Roseto degli Abruzzi
Kanamycin	Kan	50 mg/ml in ddH ₂ O	Kanamycin	Sigma-Aldrich, Steinheim

2.1.5 Medien und Puffer

Tabelle 25: Medien

Beschreibung	Zusammensetzung nach Herstellerangaben	Produktname	Hersteller
<i>lysogeny broth</i> - Medium (LB-Medium)	10 g/l Bacto Trypton 5 g/l Bacto Hefeextrakt 5 g/l NaCl in ddH ₂ O		
Medium für kompetente Zellen bis 1 h nach Transformation	2 % pflanzliches Pepton, 0,5 % Hefeextrakt, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl ₂ , 10 mM MgSO ₄ , 20 mM Glucose	SOC Outgrowth Medium	New England Biolabs, Frankfurt
MHB (Müller-Hinton- Bouillon)-Medium	2 g/l Rinder-Infus, 1,5 g/l Maisstärke, 17,5 g/l Pepton aus Casein (saurer Hydrolysat), pH 7,4 ± 0,2		

Tabelle 26: Puffer

Beschreibung	Zusammensetzung
50x TAE (TRIS- Acetat-EDTA) Puffer	242 g TRIS (2-Amino-2-hydroxymethyl-propan-1,3-diol) 57,1 ml Essigsäure 100 ml 0,5 M Ethylendiamintetraessigsäure pH 8 mit dH ₂ O auf 1.000 ml auffüllen

2.1.6 Chemikalien

Tabelle 27: Chemikalien

Beschreibung	Produktname	Hersteller
Agar	Bacto™ Agar	BD Biosciences, Heidelberg
Agarose	Agarose NEEO Ultra-Qualität	Carl Roth, Karlsruhe
Arabinose	L-(+)-Arabinose $\geq 99\%$	Sigma-Aldrich, Steinheim
Calciumchlorid	CaCl ₂ $\geq 95\%$, entwässert	Carl Roth, Karlsruhe
DMF	N,N-Dimethylformamid	Merck, Darmstadt
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure	
Ethanol	> 99,9%	Carl Roth, Karlsruhe
	Ethanol absolut zur Synthese	Merck-Schuchardt, Darmstadt
Glycerin	etwa 87 % Glycerin zur Analyse	Merck, Darmstadt
Hefeextrakt	Bacto™ Yeast Extract	BD Biosciences, Heidelberg
IPTG	Isopropyl-beta-D-thiogalactopyranosid	Carl Roth, Karlsruhe
Midori Green	<i>Advanced DNA Staining</i>	Nippon Genetics Europe GmbH, Düren
Natriumchlorid	NaCl	Merck, Darmstadt
PCR H ₂ O	Water PCR Reagent	Sigma-Aldrich, Steinheim
TTC	2,3,5-Triphenyltetrazoliumchloride $\geq 95\%$	Sigma-Aldrich, Steinheim
TRIS	2-Amino-2-hydroxymethylpropan-1,3-diol	
Trypton	Bacto™ Tryptone	BD Biosciences, Heidelberg
X-Gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galactopyranosid	PEQLAB Biotechnologie, Erlangen

2.1.7 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 28: Verbrauchsmaterialien

Beschreibung	Produktname	Hersteller
96-Well-Plate	Nunc™	Nunc, Roskilde, Dänemark
Columbia-Blutagarplatten		bioMérieux, Nürtingen
Einmalküvetten	1,5 ml halbmikro	Brand, Wertheim
Elektroporationsküvetten	GenePulser® Cuvette, 0,1 cm <i>electrode gap</i>	Bio-Rad Laboratories, München
Impfeschlingen	1 µl, weiß; 10 µl, blau	Sarstedt, Nürnbrecht
MHE (Müller-Hinton E)- Agarplatten		bioMérieux, Nürtingen
Mikroreaktionsgefäße	0,5 ml, 1,5 ml	Sarstedt, Nürnbrecht
Parafilm	Parafilm M®	Pechiney Plastic Packaging, Menasha, WI, USA
Petrischalen	92 x 16 mm mit Nocken	Sarstedt, Nürnbrecht
Pipettenspitzen mit Filter:	10 µl, 100 µl, 1000 µl Biosphere®	Sarstedt, Nürnbrecht
Safe-Lock Tubes	1,5 ml	Eppendorf, Hamburg
Spritzen	5 ml, 10 ml, 50 ml Syringe without needle, 6 % Luer, Luer Lock Tip	Terumo, Leuven, Belgien
Sterilfilter	26 mm Syringe Filter Micron Membrane, Porengröße 0,45 µm	Corning, NY, USA
	Filtropur S 0,2, Porengröße 0,20 µm	Sarstedt, Nürnbrecht
Tubes	15 ml Cellstar® Tubes	Greiner bio-one, Kremsmünster, Österreich
	50 ml	Sarstedt, Nürnbrecht
Wägebapier	MN 226 90 x 115 mm	Macherey Nagel, Düren

Beschreibung	Produktname	Hersteller
Zusatz für Wasserbad	BadStabil®	NeoLab, Heidelberg

2.1.8 Geräte

Tabelle 29: Geräte

Beschreibung	Modell	Hersteller
Agarose-Gel Dokumentation	BioDoc II™ Analyze Transilluminator	Biometra, Göttingen
Bakterienbrutschrank	Heraeus® B6200	Thermo Scientific, Schwerte
	Heraeus® FunctionLine B20	Thermo Scientific, Schwerte
Eismaschine	Ziegra Eismaschine	Ziegra, Isernhagen
Elektrische Pipettierhilfe	pipetus®-akku	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt
Elektroporator	Electro Cell Manipulator 600	BTX Electroporation Systems, San Diego/CA, USA
Feinwaage	CP224S	Sartorius, Göttingen
Gelelektrophorese	Gelträger und Kämmе, Laufkammer	
Glaspipetten	1 ml	Brand, Wertheim
	5 ml, 10 ml, 20 ml	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt
	20 ml	witeg Labortechnik, Wertheim
Heizblock	Thermostat™ 5320	Eppendorf, Hamburg
	Thermomixer® compact	Eppendorf, Hamburg
Inkubationsschüttler	TH30, SM30 Control	Edmund Bühler, Hechingen
Kühlschrank: +4 °C	3600 ProfiLine	Liebherr, Biberach an der Riß
Kühltruhen: -20 °C	5203 Comfort	Liebherr, Biberach an der Riß

Material und Methoden

Beschreibung	Modell	Hersteller
-80 °C	6385	GFL, Burgwedel
Mikroliterpipetten: 10 µl, 20 µl, 100 µl, 1.000 µl 200 µl	Reference® 8-Kanal	Eppendorf, Hamburg Eppendorf, Hamburg
Mikrowelle	MC241W R-5975	AEG, Nürnberg Sharp, Hamburg
Netzgerät für Gelelektrophorese	Standard Power Pack P25 E143	Biometra, Göttingen Consort, Turnhout, Belgien
Photometer	Ultrospec 1000	Amersham Pharmacia, Freiburg
Skalpell	22 mm	
Sterilbank	Laminar Flow	BDK, Sonnenbühl- Genkingen
Thermocycler	T3 Thermocycler	Biometra, Göttingen
UV (ultraviolett)-Licht Werkbank	TFX 35 M	Angewandte Gentechnologie Systeme, Heidelberg
Vortexer	Reax Top	Heidolph Instruments, Schwabach
Waage	LP 6200 S	Sartorius, Göttingen
Wasserbad	Et 382312	Dinkelberg Labortechnik, München
	1002	GFL, Burgwedel
	1092	GFL, Burgwedel
Wasserreinigungssystem	Arium pro VF	Sartorius Stedim Biotech, Göttingen
Zentrifugen	Avanti™ J25 Centrifuge	Beckmann Coulter, Krefeld
	Centrifuge 5417R	Eppendorf, Hamburg
	Centrifuge 5424	Eppendorf, Hamburg
	Heraeus Multifuge 3 S-R	Thermo Scientific, Schwerte

2.1.9 Software

Tabelle 30: Software

Beschreibung	Produktname	Hersteller
Agarose-Gel Dokumentation	BioDoc II TM	Biometra, Göttingen
Alignments	Clustal Omega 1.2.1	Conway Institute UCD Dublin, Irland
Sequenzanalyse	EditSeq 4.00 © 1989 – 1999	DNASTAR Inc., Madison, Wisconsin, USA
Erstellen von Abbildungen, Datenauswertung, Schreibprogramm	Microsoft 365	Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA
Literaturverwaltungsprogramm	Zotero 5.0.94	Roy Rosenzweig Center for History and New Media, George Mason University, Virginia, USA

2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.1 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese ist eine Methode, DNA-Fragmente entsprechend ihrer Länge aufzutrennen. Durch die negative Ladung der DNA wandert sie im elektrischen Feld zur positiv geladenen Anode, wobei kleinere Fragmente schneller und weiter laufen als größere.

Für die Vorbereitung des Agarose-Gels wurde Agarose, abhängig von der gewünschten Konzentration 1,5 % bzw. 2 %, abgewogen und in 1 x TAE-Puffer gelöst. Nach dem Aufkochen wurden bei einer Temperatur ab 60 °C 4 µl Midori Green Advanced auf 70 ml Agarosegel zur Färbung der DNA hinzugegeben. Gegossen wurden die Gele in Gelträger, die in Kammern eingespannt und mit einem Kamm zur Formung der Ladetaschen bestückt waren. Sobald das Gel auspolymerisiert war, konnten Größenstandards und die mit Auftragspuffern versetzten Proben in die Geltaschen geladen werden. Bei 90 Volt betrug die Laufzeit 40 bis 50 min. Zur Dokumentation wurden Bilder der Gele mit dem Transilluminator erstellt und ausgedruckt sowie digital gespeichert.

2.2.2 DNA-Isolation

2.2.2.1 Plasmid-Isolation aus Flüssigkultur, Miniprep

Die Plasmid-Isolation aus Flüssigkultur erfolgte nach dem Protokoll aus dem ‚*Experienced User Protocol*‘ 2010 mit dem GenElute™ Plasmid Miniprep Kit von Sigma-Aldrich®.

In vorbereitenden Schritten 1.200 µl aus der Bakteriensuspension in ein Eppendorf Tube überführen. Dieses 30 s bei 13.000 rpm (*revolutions per minute*) anzentrifugieren und den Überstand verwerfen. Dann erneut 30 s bei 13.000 rpm anzentrifugieren und den Überstand abpipettieren. Zur Lyse der Bakterien die Bakterien in 200 µl *Resuspension solution* resuspendieren. Das Resuspendat hoch- und herunterpipettieren zum Mischen. Anschließend 200 µl *Lysis solution* hinzugeben und invertieren, um es zu mischen. Dann maximal 5 min bei Raumtemperatur inkubieren. Das aufgereinigte Lysat durch Zugabe von 350 µl *Neutralisation solution* vorbereiten. Das Eppendorf Tube mit dem Lysat vier bis sechs Mal invertieren und dann 10 min bei 14.000 rpm zentrifugieren. Die Filtersäule in ein 2 ml *collection tube* einsetzen. 500 µl *Column preparation solution* auf die Säule geben und dann für 60 s bei 14.000 rpm zentrifugieren. Das Filtrat verwerfen. Zum Binden der Plasmid-DNA auf den Filter das aufgereinigte Lysat auf den Filter überführen und 90 s bei 13.000 rpm zentrifugieren. Das Filtrat verwerfen. Es folgen Waschschriffe, um Kontaminationen zu entfernen. Zuerst 500 µl *Optional wash solution* auf den Filter pipettieren und 90 s bei 13.000 rpm zentrifugieren. Das Filtrat verwerfen. Danach 750 µl *Wash solution* auf den Filter geben und 90 s bei 13.000 rpm zentrifugieren. Das Filtrat erneut verwerfen. Das *collection tube* für 60 s bei 13.000 rpm zentrifugieren. Zum Eluieren der gereinigten Plasmid-DNA Filtersäule in ein neues 2 ml *collection tube* überführen. 50 µl *Elution solution* auf den Filter geben und 60 s bei Raumtemperatur inkubieren. Danach für 60 s bei 13.000 rpm zentrifugieren. Die Filtersäule verwerfen. Das Plasmid-Isolat wurde anschließend bei -20 °C gelagert.

2.2.2.2 Plasmid-Isolation aus Flüssigkultur, Maxiprep

Die Plasmid-Isolation aus Flüssigkultur erfolgte nach dem Protokoll aus den ‚*Product Information*‘ mit dem GenElute™ Plasmid Maxiprep Kit von Sigma-Aldrich®.

Zum Ernten der Bakterien 100 ml der Übernachtskultur in ein breites Zentrifugenröhrchen pipettieren und 10 min bei 5.000 x g (Vielfaches der Erdbeschleunigung g) zentrifugieren. Den Überstand abnehmen und verwerfen. Bakterien in 6 ml *Resuspension solution* resuspendieren. Hoch- und herunterpipettieren um die Suspension zu mischen bis die Bakterien sich vollständig gelöst haben. Suspension in ein schmales Zentrifugenröhrchen

Material und Methoden

überführen. Bakterien in 6 ml *Lysis Buffer* lysieren. Sechs bis acht Mal invertieren um zu mischen bis die Suspension klar wird. Bis zu 5 min bei Raumtemperatur inkubieren. Anschließend folgt die Vorbereitung des aufgereinigten Lysates. Zelldebris durch Zugabe von 8 ml *Neutralisation/ Binding solution* präzipitieren. Vier bis sechs Mal invertieren. Pelletieren des Zelldebris durch Zentrifugieren für 15 min bei 15.000 x g. Die Filtersäule in ein 50 ml *collection tube* einsetzen. 12 ml *Column preparation solution* auf die Säule geben. Für 2 min bei 4.600 x g zentrifugieren. Filtrat verwerfen. Zum Binden der Plasmid-DNA auf den Filter das aufgereinigte Lysat auf den Filter überführen. 2 min bei 4.600 x g zentrifugieren und das Filtrat verwerfen. Es folgen Waschschrte, um Kontaminationen zu entfernen. 15 ml *Wash solution* auf den Filter geben. 5 min bei 4.600 x g zentrifugieren und das Filtrat verwerfen. Dann erneut für 1 min bei 4.600 x g zentrifugieren. Zum Eluieren der gereinigten Plasmid-DNA die Filtersäule in ein neues 50 ml *collection tube* überführen. 1 ml *Elution Buffer*, vorgewärmt auf 65°C, auf den Filter geben. 10 min bei Raumtemperatur inkubieren. Für 5 min bei 4.600 x g zentrifugieren. Die Filtersäule anschließend verwerfen, die Plasmid-DNA befindet sich im Filtrat und wurde bei -20 °C gelagert.

2.2.2.3 Aufreinigung von genomischer DNA aus Bakterien in Plattenkultur

Die Aufreinigung von genomischer DNA aus Bakterien in Plattenkultur erfolgte nach dem Protokoll aus dem ‚*DNA Mini and Blood Mini Handbook*‘ von QIAamp 06/2012 mit dem QIA® DNA Mini Kit.

Vorbereitend 180 µl *AL Puffer* in Eppendorf Tubes vorlegen. Mit einer Beimpfungsschlinge Kolonien von der Platte abnehmen und im Puffer suspendieren. 20 µl Proteinase K hinzugeben und durch vortexen mischen. Im Wärmeschüttler 2 h bei 56 °C inkubieren. Anschließend die Eppendorf Tubes anzentrifugieren. Nach dem Zentrifugieren 200 µl AL Puffer hinzugeben und durch pulsvortexen für 15 s mischen. 10 min bei 70 °C inkubieren. Anschließend Eppendorf Tubes anzentrifugieren. 200 µl Ethanol (99,9 %) hinzugeben. Durch pulsvortexen für 15 s mischen und anschließend das Eppendorf Tube anzentrifugieren. Die QIAamp Mini *spin column* in ein 2 ml *collection tube* einsetzen. Die Suspension nach der Zugabe von Ethanol einschließlich der Präzipitate aus dem Eppendorf Tube in die QIAamp Mini *spin column* überführen. 1 min bei 8.000 rpm zentrifugieren. Die QIAamp Mini *spin column* in ein sauberes *collection tube* überführen und Filtrat verwerfen. 500 µl Buffer AW1 auf die Säule geben und 1 min bei 8.000 rpm zentrifugieren. Anschließend die QIAamp Mini *spin column* in ein sauberes 2 ml *collection*

tube überführen und das Filtrat verwerfen. Auf die Säule 500 µl Buffer AW2 geben und 3 min bei 14.000 rpm zentrifugieren. Anschließend die QIA Mini *spin column* in ein 1,5 ml Eppendorf Tube überführen. Das Filtrat verwerfen. 200 µl Buffer AE auf die Säule geben und 1 min bei Raumtemperatur inkubieren. Anschließend 1 min bei 8.000 rpm zentrifugieren. Die QIAamp Mini *spin column* verwerfen, die DNA befindet sich im Filtrat. DNA-Isolate wurden bei -20 °C gelagert.

2.2.2.4 DNA-Aufreinigung aus Agarose-Gel

DNA-Aufreinigung aus Agarose-Gel erfolgte nach dem Protokoll aus dem ‚QIAquick® *Spin Handbook*‘ von QIAamp 03/2008 mit dem QIAquick Gel Extraction Kit. Es wurde zur Extraktion und Aufreinigung von 70 bp bis 10 kb DNA aus Agarosegelen in TAE oder TBE Puffer angewandt.

Unter UV-Licht die gewünschte Bande aus dem Agarose-Gel herausschneiden und in ein vorbereitetes Eppendorf Tube überführen. Die Gelstücke auf der Feinwaage abwiegen. Dreifaches Volumen an Buffer QG hinzugeben. Bei 50 °C für 10 min inkubieren bis sich das Gel vollständig aufgelöst hat. Während der Inkubation alle 2 bis 3 min vortexen. Farbkontrolle durchführen (pH-Indikator im Buffer QG), ob die Lösung gelblich ist. Bei orangener oder violetter Färbung, 10 µl 3 M Natriumacetat, pH 5,0 hinzugeben und mischen. Eine QIAquick *spin column* in ein 2 ml *collection tube* platzieren. Die Probe auf die Säule pipettieren und bei 13.000 rpm 1 min zentrifugieren. Das Filtrat verwerfen und die QIAquick *spin column* wieder in das entleerte 2 ml *collection tube* einsetzen. In einem Waschschrift 750 µl Buffer PE auf die Säule geben und bei 13.000 rpm 1 min zentrifugieren. Das Filtrat verwerfen und die QIAquick *spin column* erneut in das entleerte 2 ml *collection tube* einsetzen. Anschließend erneut 1 min bei 13.000 rpm zentrifugieren. Die QIAquick *spin column* in ein sauberes 1,5 ml Eppendorf Tube überführen. 30 µl Puffer EB auf den Filter pipettieren. Nach Inkubation für 1 min bei Raumtemperatur bei 13.000 rpm 1 min zentrifugieren. Anschließend Filter verwerfen. Die DNA befindet sich im Filtrat und wurde bei -20 °C gelagert.

2.2.2.5 Aufreinigung eines PCR-Produktes

PCR-Produkte wurden nach dem Protokoll ‚QIAquick *PCR Purification Kit Protocol – using a microcentrifuge*‘ aus dem ‚QIAquick® *Spin Handbook*‘ von QIAamp 03/2008 mit dem QIAquick Gel Extraction Kit aufgereinigt.

Zur Suspension des PCR-Produktes fünffaches Volumen an Puffer PB hinzugeben und durch hoch- und herunterpipettieren mischen. Für einen 50 µl PCR-Ansatz 250 µl Puffer

Material und Methoden

PB einsetzen. Eine QIAquick *spin column* in ein 2 ml *collection tube* einsetzen. Die Suspension auf die Filtermembran überführen. Anschließend für 60 s bei 13.000 rpm zentrifugieren. Das Filtrat verwerfen und die Filtersäule wieder in das *collection tube* einsetzen. Es folgen Waschschritte, um Kontaminationen zu entfernen. Hierzu 750 µl Puffer PE auf die Filtersäule pipettieren und für 60 s bei 13.000 rpm zentrifugieren. Das Filtrat verwerfen und die Filtersäule wieder in das *collection tube* einsetzen. Erneut für 60 s bei 13.000 rpm zentrifugieren und die Filtersäule anschließend in ein neues 1,5 ml Eppendorf Tube überführen. Zum Eluieren 50 µl Puffer EB auf die Membran pipettieren. Nach Inkubation für 1 min bei Raumtemperatur für 60 s bei 13.000 rpm zentrifugieren. Die Filtersäule verwerfen, das PCR-Produkt befindet sich im Filtrat und wurde bei -20 °C gelagert.

2.2.2.6 DNA-Freisetzung aus Bakterienkolonien zur PCR

Zur Resuspension der Bakterienkolonien pro Ansatz 100 µl ddH₂O (doppelt destilliertes Wasser) in ein Eppendorf Tube vorlegen. Eine Kolonie mit der Pipettenspitze abnehmen und in dem vorgelegten doppelt destilliertem Wasser resuspendieren. Zur Freisetzung der DNA für 10 min bei 96 °C im Heizblock kochen. Den Zelldebris pelletieren durch Zentrifugieren für 5 min bei 13.000 rpm. Überstand in ein neues Eppendorf Tube überführen. Die DNA befindet sich im Überstand und wurde bei -20 °C gelagert.

2.2.3 Ligation

2.2.3.1 Ligation mit dem pDrive Cloning Vector inklusive Inkubation mit Taq Polymerase zur Generierung von A-Überhängen

PCR-Produkte zur Ligation in den pDrive Cloning Vector wurden mit Taq Polymerase und dNTPs inkubiert um A-Überhänge zu generieren. Ein Ansatz in einem PCR Tube bestand aus 25µl PCR-Produkt, 3 µl Taq 10x Puffer, 0,5 µl Taq Polymerase und 1 µl dNTPs (Desoxyribonukleosidtriphosphat). Der Ansatz wurde 20 min bei 72 °C im Thermocycler mit Deckelbeheizung auf 105 °C inkubiert. Die Ligation mit dem pDrive Cloning Vector erfolgte nach dem Protokoll ‚QIAGEN *PCR Cloning Kit Ligation Protocol*‘ aus dem ‚QIAGEN® *PCR Cloning Handbook*‘ von QIAamp 03/2001 mit dem QIAGEN PCR Cloning Kit. Ein Ansatz in einem PCR Tube bestand aus 1 µl pDrive Cloning Vector 50 ng/µl, 4 µl PCR-Produkt nach Behandlung mit Taq Polymerase und dNTPs, sowie 5µl 2x Ligation Master Mix. Der Ansatz wurde vorsichtig durch hoch- und herunterpipettieren gemischt und 1 bis 2 Stunden bei 10 °C im Thermocycler inkubiert. Das Plasmid wurde

bei -20 °C gelagert.

2.2.3.2 Ligation mit pFPV-Vektor und T4 Ligase

Für die Ligation mit dem pFPV-Vektor und T4 Ligase wurden unterschiedliche Konditionen angewandt. Der Ligationsansatz wurde im Eppendorf Tube vorbereitet. Er bestand aus 4 µl Vektor, das heißt pFPV-Plasmid nach Behandlung mit den Restriktionsendonukleasen *NdeI* und *HindIII*, 4 µl Insert, dies war Vim1 beziehungsweise Ndm1 nach Restriktionsverdau mit *NdeI* und *HindIII*, dazu 1 µl T4 DNA Ligase und 1 µl T4 Ligase 10x Puffer.

Für die Ligation über Nacht mit angepasstem Temperaturoptimum erfolgte die Inkubation des Ligationsansatzes in einer breiten, mit Trockeneis gefüllten Wägeschale. Da es sich um eine lichtempfindliche Reaktion handelt wurde die Inkubation an einem abgedunkelten Ort durchgeführt. Es erfolgten ebenfalls Ligationen bei Raumtemperatur, wobei der Ligationsansatz wie oben beschrieben für 2 bis 3 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert wurde. Als dritte Möglichkeit wurden Ligationen im Thermocycler über Nacht bei 16 °C durchgeführt.

Für die Herstellung des pFPV-Kontrollplasmides ohne Insert erfolgte das Annealing eines Adapters mit anschließender Ligation. Der Ansatz zum Adapter-Annealing bestand aus 5 µl Oligo 1-F 5 µM, 5 µl Oligo 2-R5 5 µM und 20 µl Puffer bestehend aus TE-Puffer mit 50mM Natriumchlorid. Der Annealing-Ansatz wurde für 10 min bei 90 °C im Heizblock inkubiert und anschließend über 2 Stunden langsam auf Raumtemperatur abgekühlt. Der Ligationsansatz für den Adapter bestand aus 1 µl mit PCR-H₂O 1:10 verdünntem Adapter nach Annealingsbehandlung, 3 µl PCR-H₂O, 4 µl Plasmid Vektor pFPV, 1 µl T4 DNA Ligase und 1 µl T4 Ligase 10x Puffer. Die anschließende Ligation erfolgte nach einem der oben beschriebenen Ligationsprotokolle.

2.2.4 Polymerase-Ketten-Reaktion

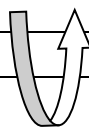
2.2.4.1 PCR-Protokoll für Taq Polymerase

Der PCR-Ansatz für eine PCR mit Taq Polymerase bestand aus 5 µl 10x Puffer, 5 µl *template*-DNA, 1 µl dNTPs, je 5 µl *forward* und *reverse* Primer, sodass beide Primer in einer Endkonzentration von 0,5 µM vorliegen, 0,5 µl Taq Polymerase. Der Ansatz wurde mit PCR-H₂O auf 50 µl aufgefüllt.

Das PCR-Protokoll für eine PCR mit Taq Polymerase im Thermocycler war wie folgt eingestellt:

Tabelle 31 PCR-Protokoll für Taq Polymerase

Schritt Nr.	Temperatur	Zeitangabe	Bezeichnung
1.	95 °C	Pause	Preheating
2.	95 °C	2 min	Anfängliche Denaturierung
3.	95 °C	30 s	Denaturierung
4.	55 °C	30 s	Annealing
5.	72 °C	60 s	Elongation
6.	72 °C	5 min	Abschließende Elongation
7.	4 °C	Pause	Halten



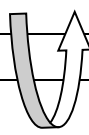
2.2.4.2 PCR-Protokoll für Phusion Polymerase

Der PCR-Ansatz für eine PCR mit Phusion Polymerase bestand aus 10 µl 5x Phusion HF Puffer, 5 µl *template*-DNA, 1 µl dNTPs, sodass dATP (Desoxyadenosintriphosphat), dCTP (Desoxycytidintriphosphat), dTTP (Desoxythymidintriphosphat) und dGTP (Desoxyguanosintriphosphat) in einer Endkonzentration von 200 µM vorliegen, je 5 µl *forward* und *reverse* Primer, sodass beide Primer in einer Endkonzentration von 0,5 µM vorliegen, 0,5 µl PCR-BIO HiFi Polymerase 2 U/5 µl. Der Ansatz wurde mit PCR-H₂O auf 50 µl aufgefüllt.

Das PCR-Protokoll für eine PCR mit Taq Polymerase im Thermocycler war wie folgt eingestellt:

Tabelle 32 PCR-Protokoll für Phusion Polymerase

Schritt Nr.	Temperatur	Zeitangabe	Bezeichnung
1.	98 °C	Pause	Preheating
2.	98 °C	30 s	Anfängliche Denaturierung
3.	98 °C	10 s	Denaturierung
4.	55 °C	30 s	Annealing
5.	72 °C	30 s	Elongation
6.	72 °C	5 min	Abschließende Elongation
7.	4 °C	Pause	Halten



Die Kalkulation der Annealing-Temperatur erfolgte auf www.finnzymes.com. Bei Primern länger als 20 Nukleotide wurde die Elongation um 10 bis 30 s verlängert und die Temperatur 3 °C höher als die des niedrigeren Primers gewählt.

Die Elongationszeit für niedrigkomplexe DNA wie Plasmid-DNA wurde mit 15 s pro 1 kb berechnet. Für hochkomplexe DNA wie genomische DNA wurden 30 s Elongation pro 1

kb berechnet.

2.2.4.3 PCR-Protokoll für HiFi Polymerase

Der PCR-Ansatz für eine PCR mit HiFi Polymerase bestand aus 10 µl 5x PCRBIO *Reaction buffer*, 5 µl *template*-DNA, 1 µl dNTPs, je 5 µl *forward* und *reverse* Primer, sodass beide Primer in einer Endkonzentration von 0,5 µM vorliegen, 0,5 µl PCRBIO HiFi-Polymerase 200 U/0,1 ml. Der Ansatz wurde mit PCR-H₂O auf 50 µl aufgefüllt.

Das PCR-Protokoll für eine PCR mit HiFi Polymerase im Thermocycler war wie folgt eingestellt:

Tabelle 33 PCR-Protokoll für HiFi Polymerase

Schritt Nr.	Temperatur	Zeitangabe	Bezeichnung
1.	95 °C	Pause	Preheating
2.	95 °C	2 min	Anfängliche Denaturierung
3.	95 °C	30 s	Denaturierung
4.	60 °C	30 s	Annealing
5.	72 °C	40 s	Elongation
6.	72 °C	5 min	Abschließende Elongation
7.	4 °C	Pause	Halten

34 x zurück zu 3.
→ insgesamt 35
Zyklen

2.2.5 Konzentrationsabschätzung

Die Konzentrationsabschätzung erfolgte mittels Nanodrop Spektralphotometer oder über Agarose-Gelelektrophorese.

2.2.6 Restriktionsverdau

2.2.6.1 *EcoRI*-Verdau

Für einen Restriktionsverdau mit der Restriktionsendonuklease *EcoRI* wurde ein Ansatz bestehend aus 2 µl 10x *EcoRI* Reaction Buffer, 0,5 µl *EcoRI*, 9,5 µl destilliertes Wasser und 8 µl Plasmid-DNA zusammengestellt. Der Ansatz wurde bei 37 °C für 1 ½ bis 2 h im Brutschrank inkubiert.

2.2.6.2 Doppelverdau mit *NdeI* und *HindIII*

Für einen Restriktionsverdau mit den Restriktionsendonukleasen *NdeI* und *HindIII* wurde ein Ansatz bestehend aus 3 µl 10x Puffer 2, je 1 µl *NdeI* und *HindIII* und 27 µl Plasmid-DNA zusammengestellt. Der Ansatz wurde bei 37 °C für 3 h im Brutschrank inkubiert.

2.2.6.3 *DpnI* Verdau

Für einen Restriktionsverdau mit der Restriktionsendonuklease *DpnI* wurde ein Ansatz bestehend aus 5 µl 10x *Cut Smart Buffer*, 0,5 µl *DpnI* und 8 µl PCR-Produkt zusammengestellt. Mit PCR-H₂O wurde der Ansatz auf 50 µl aufgefüllt. Die Inkubation erfolgte für die Dauer einer Stunde bei 37 °C im Brutschrank.

2.2.7 Recombineering nach Court Lab (Sharan et al. 2009)

Zur Herstellung eines linearen PCR-Produktes mit flankierenden Bereichen des lacZ locus wurde die entsprechende Ziel-DNA-Sequenz mittels PCR amplifiziert. Hierzu wurde eine *Proofreading* DNA-Polymerase, entweder HiFi oder Phusion, eingesetzt. Anschließend wurde ein *DpnI*-Verdau zur Inaktivierung der eingesetzten *template*-Plasmide durchgeführt. Die PCR-Produkte wurden mittels Agarose-Gelelektrophorese aufgetragen, das Ziel-Fragment extrahiert und im letzten Extraktionsschritt in 30 µl PCR-H₂O eluiert. Der Ziel-Bakterienstamm *E. coli* K12 MG1655 *pSIM9* wurde von einer Plattenkultur abgenommen und über Nacht in 5 ml LB-Medium mit 20 µg/ml Chloramphenicol als Selektionsmarker bei 30 bis 32 °C kultiviert. Anschließend erfolgte eine 1:70 Verdünnung der Über-Nacht-Kultur. Die Bakterien wurden für die Dauer von zwei bis vier Stunden in vorgewärmtem LB-Medium bis zu einer gewünschten optischen Dichte bei einer Wellenlänge von 600nm (OD₆₀₀) von 0,4 bis 0,6 erneut kultiviert. Bei Erreichen der Ziel-OD₆₀₀ wurde die Flüssigkultur für 15 min bei einer Temperatur von 42 °C und 150 rpm im Wasserbad inkubiert. Anschließend erfolgte das Abkühlen unter vorsichtigem Schwenken in Eiswasser für mindestens 5 min. Durch die vorgenannten Schritte wurde die Rekombination induziert. Die folgenden Schritte dienen der Herstellung elektrokompenter Bakterien. Die induzierte Kultur in das vorgekühlte *Falcon Tube* überführen und 7 min bei 4.600 x g und 4 °C zentrifugieren. Den Überstand verwerfen und das Pellet in 1 ml eiskaltem ddH₂O vorsichtig resuspendieren. Nach Zugabe von 30 ml eiskaltem ddH₂O vorsichtig invertieren und anschließend 7 min bei 4.600 x g und 4 °C zentrifugieren. Den Überstand erneut verwerfen und gegebenenfalls Reste mit einer Pipette entfernen. Das Pellet in 1 ml eiskaltem ddH₂O resuspendieren. Die resuspendierten Zellen in ein vorgekühltes Eppendorf Tube überführen und 60 s bei 10.000 x g und 4 °C zentrifugieren. Den Überstand abnehmen und die Zellen in 1 ml eiskaltem ddH₂O resuspendieren. Diesen Waschschrift zwei weitere Male wiederholen. Die letzte Resuspension erfolgt in 200 µl ddH₂O. Die so gewonnenen elektrokompenten Bakterien wurden im BTX Electro Cell Manipulator elektroporiert. Die Einstellungen am Gerät

Material und Methoden

lauteten 1,5 kV und 129 Ω . Ein Elektroporationsansatz bestand aus 100 ng PCR-Produkt und 50 μg elektrokompetenter Zellen. Als Kontrollansatz dienten 50 μg Zellen ohne DNA. Die elektroporierten Zellen wurden sofort nach Abschluss der Elektroporation in 1 ml LB-Medium auf Raumtemperatur überführt. Die Erholungsphase dauerte zwei Stunden, in welcher die Bakterien nach der Elektroporation bei 30 bis 32 $^{\circ}\text{C}$ und 200 rpm inkubiert wurden. Anschließend wurden für die nachfolgende Kultivierung serielle 1:10 Verdünnungen bis 10^{-6} angefertigt.

2.2.8 Sequenzierung

Sequenzierungen wurden bei SeqLab durchgeführt. Hierzu wurden 8 μl Plasmid-DNA oder PCR-Produkt mit 4 μl PCR- H_2O in einem Eppendorf Tube verschickt. Es wurden sowohl PCR-Produkte als auch Plasmide im Verlauf der Arbeit sequenziert.

2.3 Mikrobiologische Methoden

2.3.1 Bakterienkultur

2.3.1.1 Flüssigkultur in LB-Medium

Unter dem Abzug wurden 2 ml LB-Medium pro Röhrchen und gegebenenfalls eine entsprechende Menge Antibiotikum in einem Erlenmeyerkolben steril vorgelegt und gemischt. Anschließend wurden von der Mischung je 2 ml in Kulturröhrchen aliquotiert. Für die Kultur wurden Einzelkolonien von Agarplatten abgenommen und in die Kulturröhrchen geimpft. Diese wurden dann über Nacht im Schüttelinkubator bei 37 $^{\circ}\text{C}$ und 200 rpm bebrütet. Die Flüssigkulturen wurden photometrisch gemessen. Hierzu wurde die OD_{600} bestimmt. Der gemessene Wert gibt an, wie getrübt die Bakteriensuspension im Vergleich zum Kulturmedium ohne Bakterien ist. Hieraus kann die Bakterienanzahl abgeschätzt werden. Für *E. coli* wird bei einer OD_{600} von 1 ein Wert von 3×10^8 Bakterien / ml angenommen.

2.3.1.2 Bakterienkultur auf Agarplatten

Für die Bakterienkultur auf Agarplatten wurden Bakterienkolonien oder Proben aus einer Flüssigkultur auf eine neue Agarplatte ausgestrichen. Die Bebrütung erfolgte über Nacht im Inkubator bei 37 $^{\circ}\text{C}$.

2.3.1.3 Konservierung von Bakterienproben als Glycerol-Stock

Zur Konservierung von Bakterienproben als Glycerol-Stock wurden 400 µl LB-Medium mit 30 % Glycerin pro Eppendorf Tube steril vorgelegt. Hierzu wurden die Behälteröffnung und die Pipettenspitze abgeflammt, das Vorlegen erfolgte aus einem sterilen Becherglas und unter der Flow-Sterilwerkbank. Anschließend wurden 400 µl der Bakteriensuspension aus einer Über-Nacht-Flüssigkultur in die Eppendorf Tube gefüllt. Um Kontaminationen zu vermeiden, geschah dieser Schritt unter einem Gasbrenner.

2.3.1.4 Bakterienkulturen zur Messung der Wachstumskurve

Zur Messung der Wachstumskurven wurden die Bakterien nach einem standardisierten Schema kultiviert. Zunächst wurde eine Über-Nacht-Kultur in 3 ml LB-Medium bei 37 °C und 200 rpm inkubiert. Daraus wurde eine Vorkultur bestehend aus 20 ml LB-Medium und einem Aliquot aus 20 µl der Über-Nacht-Kultur abgeleitet. Die Vorkultur wurde für die Dauer von zwei Stunden bei 37 °C und 200 rpm inkubiert. Von dieser Vorkultur wurde die OD₆₀₀ unverdünnt gemessen. Die Zielkultur wurde dann mit 20 ml LB-Medium und einem angepassten Volumen der Vorkultur beimpft, sodass die rechnerische OD₆₀₀ bei 0,01 lag. Es erfolgte anschließend die Inkubation bei 37 °C und 200 rpm für vier bis fünf Stunden, wobei alle 20 min die OD₆₀₀ bestimmt wurde. Die weitere Inkubation erfolgte wie oben beschrieben über Nacht. Nach der Inkubation wurde die maximale OD₆₀₀ gemessen.

2.3.1.5 Vitalitätstestung

Zur Bestimmung der Vitalität wurden die Bakterienkulturen standardisiert zwei Mal 1:100 und zwei Mal 1:20 verdünnt und auf Agarplatten geimpft. Nach Bebrütung über Nacht wurden die Bakterienkolonien ausgezählt, und dementsprechend die *colony forming units* (CFU) pro Milliliter berechnet. Die Vitalität als abstrakte Größe wurde für den Referenzstamm als 1 oder 100 % definiert, die Vitalität der Zielstämme wird im Verhältnis zum Referenzstamm angegeben.

2.3.2 Herstellung chemokompetenter Bakterien

Zur Herstellung chemokompetenter Bakterien wurde als Vorkultur eine Flüssigkultur in 4 ml LB-Medium mit Kolonien von einer Agarplatte beimpft und über Nacht bei 37 °C und 200 rpm inkubiert. Aus dieser Vorkultur wurde eine Flüssigkultur in 10 ml LB-Medium angeimpft, sodass eine rechnerische OD₆₀₀ von 0,05 bis 0,1 besteht. Die Inkubation erfolgte für 65 min bis zu einer OD₆₀₀ von 0,3. Anschließend werden die Zellen in ein *Falcon tube* überführt und für 6 min bei 4.600 x g und 4 °C pelletiert. Den Überstand

Material und Methoden

verwerfen und die Zellen in 5 ml eiskaltem 50 mM CaCl₂ resuspendieren. Anschließende Inkubation für 30 min auf Eis. Nach der Inkubation erneut für 6 min bei 4.600 x g und 4 °C pelletieren. Den Überstand verwerfen und die Zellen in 1 ml eiskaltem 50 mM CaCl₂ resuspendieren. Die Zellen können im Anschluss zur Transformation eingesetzt werden.

2.3.3 Herstellung elektrokompetenter Bakterien

Zur Herstellung elektrokompetenter Bakterien wurden Über-Nacht-Kulturen in 5 ml LB-Medium bei 37 °C und 200 rpm kultiviert. Hieraus wurde eine Vorkultur mit einer 1:70 Verdünnung in LB-Medium hergestellt. Die Vorkultur wurde für 2 bis 4 Stunden bis zu einer OD₆₀₀ von 0,4 bis 0,6 bebrütet. Die Vorkultur anschließend in ein vorgekühltes *Falcon tube* überführen und 7 min bei 4.600 x g und 4 °C zentrifugieren. Den Überstand verwerfen und die pelletierten Zellen in 1 ml eiskaltem ddH₂O vorsichtig resuspendieren. Nach der Resuspension 30 ml eiskaltes ddH₂O hinzufügen und vorsichtig invertieren. Anschließend 7 min bei 4.600 x g und 4 °C zentrifugieren. Den Überstand verwerfen und Reste gegebenenfalls mit einer Pipette entfernen. Erneute Resuspension in 1 ml eiskaltem ddH₂O. Die resuspendierten Zellen in ein vorgekühltes Eppendorf Tube überführen und 60 sec bei 10.000 x g und 4 °C zentrifugieren. Den Überstand verwerfen und die Zellen erneut in 1 ml eiskaltem ddH₂O resuspendieren. Das Pelletieren und Resuspendieren zwei weitere Male wiederholen, bei der letzten Wiederholung Resuspension in 200 µl eiskaltem ddH₂O. Die Zellen können anschließend zur Transformation eingesetzt werden.

2.3.4 Herstellung der Kulturmedien

2.3.4.1 LB-Medium

Zur Herstellung von LB-Medium wurden 10 g/l Bacto Trypton mit 5 g/l Bacto Hefeextrakt und 5 g/l NaCl in ddH₂O gemischt. Das Medium wurde bei 121 °C für 20 min autoklaviert.

2.3.4.2 LB-Agar

Zur Herstellung von LB-Agar wurde 15 g/l Bacto Agar zu LB-Medium hinzugefügt. Der Agar wurde bei 121 °C für 20 min autoklaviert.

Für LB-Agar mit X-Gal und IPTG wurden dem LB-Agar 80 µg/ml X-Gal sowie 0,5 mM IPTG zugesetzt.

Für die X-Gal-Stammlösung mit einer Konzentration von 40 mg/ml wurde 200 mg 5-Brom-4-chlor-3-indoxyl-β-D-galactopyranosid in 5 ml Dimethylformamid (DMF) gelöst. Für die 1 M IPTG Stammlösung wurden 1190 mg Isoprpyl- β-D-thiogalactopyranosid in 5

ml deionisiertem H₂O gelöst.

TA-Agar wurde in 2 Lösungen getrennt autoklaviert, einmal 10 g/l Bacto Trypton mit 1 g/l Bacto Hefeextrakt und 5 g/l NaCl mit 16 g/l Bacto Agar in 500 ml H₂O, und einmal 10 g/l Arabinose in 500 ml H₂O. Nach dem Autoklavieren werden beide Lösungen vermischt und mit 50 mg/l TTC versetzt. Anschließend kann der Agar gegossen werden.

Vor dem Gießen der Agarplatten wird der LB-Agar aufgekocht. Nach dem Aufkochen im Wasserbad auf 60 °C abkühlen lassen. Anschließend können gegebenenfalls angepasste Mengen an X-Gal, IPTG oder Antibiotika hinzupipettiert werden. Das Vermischen der Zusätze mit dem Agar erfolgt durch Schwenken. Unter der Lamina Flow Sicherheitswerkbank werden die Platten, ca. 20 ml / Petrischale, gegossen. Mit halb geöffnetem Deckel kühlen die Platten für 3 Stunden aus. Die Platten werden in verschlossenen Plastiktüten bei +4 °C gelagert.

2.3.5 Klonierungen

2.3.5.1 Transformation in kommerzielle NEB 5-alpha Competent *E. coli*

Die Transformation in kommerzielle NEB 5-alpha Competent *E. coli* erfolgte nach dem ‚*High Efficiency Transformation Protocol*‘ von New England BioLabs. Die NEB 5-alpha Competent *E. coli* werden bei -80 °C gelagert und vor ihrer Verwendung für 10 min auf Eis aufgetaut. Anschließend 5 µl Plasmid-DNA hinzugeben und vorsichtig rühren. Nach 30-minütiger Inkubation auf Eis Hitzeschock bei 42 °C für 30 s. Nach dem Hitzeschock für 5 min weiter auf Eis inkubieren. Anschließend 950 µl raumtemperiertes SOC *Outgrowth Medium* zu den Zellen geben und bei 37 °C und 250 rpm im Wärmeschüttler für 60 min inkubieren. Die Zellen auf warme Selektionsplatten in verschiedenen Konzentrationen ausstreichen und über Nacht bei 37 °C bebrüten. Transformierte Zellen, die nicht sofort ausgestrichen wurden, werden bei +4 °C gelagert.

2.3.5.2 Transformation in elektrokompetente *E. coli*

Die Transformation in elektrokompetente *E. coli* erfolgte mittels Elektroporation. Für die Elektroporation wurde der BTX Electro Cell Manipulator mit den Einstellungen 1,5 kV bei 129 Ω genutzt. Ein Ansatz für die Elektroporation bestand aus 100 ng PCR-Produkt und 50 µg elektrokompetenter Zellen. Als Kontrollansatz dienen 50 µg Zellen ohne DNA. Nach der Elektroporation wurden die Zellen in 1 ml raumtemperiertes LB-Medium überführt. Es folgte eine Erholungsphase für zwei Stunden bei 30 bis 32 °C und 200 rpm. Die Kultur wurde in serieller 1:10 Verdünnung bis 10⁻⁶ angefertigt.

2.3.5.3 Transformation in chemokompetente *E. coli*

Die Transformation in chemokompetente *E. coli* erfolgte mittels Hitzeschock. Zunächst wurden die Plasmide nach der Ligation für 10 min bei 65 °C inkubiert, um die Ligase zu inaktivieren. 10 µl des so behandelten Ligationsansatzes wurden zu 200 µl chemokompetenter *E. coli* hinzugegeben. Nach 30-minütiger Inkubation auf Eis erfolgte der Hitzeschock bei 42 °C für 45 s im Wasserbad. Nach dem Hitzeschock wird 1 ml auf Raumtemperatur angewärmtes LB-Medium zu den Zellen gegeben. In der Erholungsphase werden die Zellen für zwei Stunden bei 37 °C und 200 rpm inkubiert.

2.3.5.4 Herstellung von Klon-Pools

Ergänzend zu den Ziel-Stämmen mit Gewinnung von Einzelklonen wurden Klon-Pools mit den Expressionsplasmiden hergestellt. Hierzu wurden im ersten Schritt die pFPV-Plasmide mit den Inserts Vim1 bzw. Ndm1 in die *E. coli*-Stämme von NEB, *NEB Express Iq Competent E. coli*, transformiert. Nach der Transformation wurde auf eine LB-Agarplatte mit 30 µg/ml Kanamycin ausplattiert und über Nacht bebrütet. Am darauffolgenden Tag wurden je Ansatz 45 Einzelkolonien gepickt, und in LB-Medium mit 30 µg/ml Kanamycin sowie 0,25 µg/ml Ertapenem über Nacht bebrütet, um die Resistenzausbildung gegenüber Carbapenemen zu testen. Sind über Nacht Bakterien gewachsen, was einer Trübung entspricht, gilt der Klon als resistent. Aus den positiven Klonen wurde ein Pool aus jeweils 20 Einzelklonen erstellt. Hierzu wurden 200 µl aus den Über-Nacht-Kulturen in einem Falcon-Tube gemischt und mit LB-Medium so weit verdünnt, dass die OD₆₀₀ zwischen 0,1 und 0,6 lag. Aus diesen Werten kann die durchschnittliche optische Dichte der Über-Nacht-Kulturen errechnet werden, um abzuschätzen, bis zu welcher OD₆₀₀ die Bakterien maximal wachsen. Aus dem verdünnten Pool wurde jeweils eine Kultur angesetzt. Gestartet wird mit einer rechnerischen OD₆₀₀ von 0,05 in einem Endvolumen von 35 ml in vorgewärmtem LB-Medium mit 30 µg/ml Kanamycin. Die Ziel-OD₆₀₀ liegt bei > 0,6. Anschließend wurde die Bakterienkultur so verdünnt, dass im Endvolumen von 20 ml eine rechnerische OD₆₀₀ von 0,5 vorlag. Zwecks einer Konservierung als Glycerolstock wurden 3 ml Glycerin 87 % hinzugefügt, zusammen mit einem angepassten Volumen aus der jeweiligen Kultur und aufgefüllt mit LB-Medium auf 20 ml. Die Suspension wurde auf 36 Eppendorf Tubes mit je 400 µl aliquotiert und bei -80 °C eingefroren. Diese Klon-Pools wurden mittels eines Wachstumsversuchs untersucht. Für den Wachstumsversuch werden Kulturen in 15 ml vorgewärmtem LB-Medium mit 30 µg/ml Kanamycin mit 100 bzw. 120 µl (für Oxa48) angeimpft. Der Glycerol-Stock wurde hierzu aufgetaut und danach verworfen. Die Kultur wurde für 2 h bei 37 °C im Schüttler inkubiert. Anschließend

erfolgte die erste OD₆₀₀-Messung, sie sollte im Bereich von 0,05 liegen. Nach weiteren 75 min, ausgehend von einer OD₆₀₀ von 0,05 am ersten Messpunkt sowie einer Verdopplungszeit von ungefähr 25 min, wurde erneut die OD₆₀₀ bestimmt. Die Messergebnisse wurden mit dem Programm Graph Pad Prism ausgewertet. Die Verdopplungszeit des *E. coli* Stammes mit dem Plasmid pFPV control wurde als 100 % definiert, und prozentual dazu die Verdopplungszeit eines Stammes mit Insert im Plasmid angegeben. Diese beträgt beispielsweise 120 %.

2.3.6 Competition Assays für *E. coli* modifiziert nach Lenski et al. (1994) / Lind und Andersson (2013)

Zur Messung der Fitness beziehungsweise von Fitnessunterschieden zwischen einem Ziel-Bakterienstamm und einem Wildtyp- oder Vergleichsbakterienstamm wurden *Competition Assays* durchgeführt. Zur Vorbereitung auf die *Competition Assays* wurden Über-Nacht-Kulturen angefertigt. Jede Über-Nacht-Kultur wurde in 5 ml LB-Medium mit Kolonien beimpft und bei 37 °C inkubiert. Aus diesen Über-Nacht-Kulturen wurden die Vorkulturen beimpft. Für jeden der zwei Stämme eines *Competition Assays* wurden 17,5 ml LB-Medium in einem Glaskolben vorgelegt und auf 37 °C vorgewärmt. Die Übernachtskulturen wurden 1:10 in LB-Medium verdünnt, um die OD₆₀₀ zu messen. Anschließend wurde eine 1:50 Verdünnung der dichteren Über-Nacht-Kultur und ein entsprechend größeres Volumen der weniger dichten Über-Nacht-Kultur in das vorgewärmte LB-Medium übertragen, sodass zu Beginn der Vorkulturen eine gleiche optische Dichte gegeben ist. Die Vorkulturen wurden für ein bis zwei Stunden bei 37 °C und 200 rpm bis zu einer OD₆₀₀ zwischen 0,4 und 0,6 inkubiert. An diesem Punkt startet der *Competition Assay* mit dem Zeitpunkt t_0 . Aus den Vorkulturen ein Aliquot von 1 ml entnehmen, um erneut die OD₆₀₀ zu messen. Der *Competition Assay* wurde in 20 ml in einem Glaskolben angesetzt. Es wurden 50 µl der dichteren Vorkultur, sowie ein entsprechend höheres Volumen der weniger dichten Vorkultur eingesetzt. Nach Beimpfen erfolgte die Entnahme von Aliquot 1 aus dem *Competition Assay*. Anschließend bei 37 °C und 200 rpm für 7 Stunden inkubieren. Anhand der gemessenen optischen Dichte der Vorkulturen wurde die theoretische optische Dichte zum Zeitpunkt t_0 errechnet. Für *E. coli* entspricht eine OD₆₀₀ von $1,3 \times 10^8$ Bakterien / ml. Zum Ausplattieren der Aliquots wurde eine Verdünnung so berechnet, dass 100 Bakterien in einem Volumen von 50 µl bis 200 µl ausplattiert werden können. Hierzu erfolgten serielle 1:10-Verdünnungen mit LB-Medium vor dem Ausplattieren. Als Ausgleich für den Schätzwert bei t_0 wurde bei Aliquot 1 das doppelte des berechneten Volumens eingesetzt. Eine entsprechende Verdünnung des Aliquots wurde

auf LB-Agarplatten mit 80 µg/ml X-Gal und 0,5 mM IPTG für Rekombinante im lacZ locus, beziehungsweise auf TA-Agar für Stämme mit Deletion im Arabinose-Gen, ohne zugesetztes Antibiotikum unter Einsatz von 5 bis 6 Kügelchen in Doppelbestimmung ausplattiert. Diese Agarplatten wurden bei 37 °C über Nacht inkubiert. Parallel dazu erfolgte nach 7-stündiger Inkubation die Entnahme von Aliquot 2 aus dem *Competition Assay*. Hierzu wurde eine 100 µl umfassende Probe 1:10 in LB-Medium verdünnt und hiervon die OD₆₀₀ bestimmt. Eine 1:1.000 Verdünnung der Bakteriensuspension wurde in einem Glaskolben mit frischem LB-Medium hergestellt. 1 ml Aliquot 2 wurde aus dem *Competition Assay* entnommen und wie für Aliquot 1 beschrieben ausplattiert und bebrütet. Parallel wurde erneut der *Competition Assay* bei 37 °C und 200 rpm für 15 bis 16 Stunden über Nacht inkubiert. Die weiteren Entnahmen von Aliquot 3 bis 6 erfolgten wie beschrieben zu t₂ bis t₅, nach 10 bis 15 Stunden, ebenso wie die Verdünnungen zur Fortsetzung des *Competition Assays* und das Ausplattieren der Aliquots.

2.3.7 MHK-Bestimmung

2.3.7.1 MHK-Bestimmung für Ertapenem in Flüssigkultur

Zur Testung der MHK in Flüssigkultur wurden Bakteriensuspensionen verwendet. Je eine Einzelkolonie wurde hierzu in 0,5ml MHB suspendiert und 1:100 verdünnt. Für die MHK-Testung in Flüssigkultur wurden 96-Well-Platten genutzt. Beginnend mit 32 µg/ml Ertapenem in Spalte 1 wurde pro Spalte die Antibiotikakonzentration halbiert, bis zu der geringsten Antibiotikakonzentration in Spalte 11 mit 0,03125 µg/ml. Spalte 12 diente als Kontrolle mit MHB ohne Antibiotikazusatz. Die Platten wurden für 18 bis 24 Stunden bei 37 °C im Brutschrank bebrütet. Jede Platte wurde in Doppelbestimmung angelegt.

2.3.7.2 MHK-Bestimmung mittels Epsilomertest

Für die MHK-Bestimmung mittels Epsilomer-Test (E-Test) wurden Bakterien in Flüssigkultur eingesetzt. Das Kulturmedium hierbei war LB-Medium, die Kulturen wurden bei 37 °C und 200 rpm bis zu einer Ziel-OD₆₀₀ von 0,1 inkubiert. Anschließend wurde die Flüssigkultur auf eine Müller-Hinton-E-Platte ausplattiert. Der Epsilomer-Teststreifen mit Ertapenem wurde aufgelegt, und die Platten anschließend über Nacht bei 37 °C inkubiert.

2.3.8 Plasmid-curing

Für ein *plasmid-curing* wurde eine Flüssigkultur mit LB-Medium mit drei Bakterienkolonien beimpft und über Nacht bei 37 °C und 200 rpm inkubiert. Nach einer 1:1.000 Verdünnung in LB-Medium erfolgte die weitere Inkubation wie oben beschrieben für mindestens weitere vier Stunden. Nach der Inkubation wurde auf LB-Agar mit Zusatz von 0,1 µg/ml Ertapenem ausplattiert und über Nacht inkubiert. Von den gewachsenen Kolonien wurde am Folgetag je eine LB-Agarplatte mit Zusatz von 20 µg/ml Chloramphenicol, welches als Marker für das Plasmid pSIM9 dient, eine weitere mit Zusatz von 0,1 µg/ml Ertapenem, wobei die messbare Ausprägung einer Ertapenemresistenz als Zeichen für ein korrektes Recombineering einer Carbapenemase gewertet wurde, sowie eine Kontrollplatte ohne Antibiotikazusatz beimpft. Wie zuvor erfolgte die Inkubation über Nacht bei 37 °C.

3 Ergebnisse

3.1 Herstellung der Zielstämme

Zur Isolation genomischer DNA aus den Ausgangsstämmen *E. coli Vim1* (162/19) und *K. pneumoniae Ndm1* (93/10) wurden die Bakterien aus einer Kryokultur auf eine Blutagarplatte ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C bebrütet. Von diesen Platten wurden Kolonien zur DNA-Isolierung abgenommen.

Die genomische DNA der Ausgangsstämme wurde mittels einer PCR vervielfältigt. Um Mutationen zu minimieren, wurde hierfür eine Proofreading Polymerase, in diesem Fall für Vim1 die Hifi Polymerase, respektive für Ndm1 die Phusion Polymerase, eingesetzt. Die verwendeten Primer schafften vor und hinter der gewünschten Zielsequenz des Carbapenemasegens eine Restriktionsschnittstelle für *NdeI* beziehungsweise *HindIII*. Dies ist schematisch in Abbildung 1 dargestellt.



Abbildung 1 PCR-Produkt zur Vervielfältigung im pDrive Cloning Vector

Das PCR-Produkt wurde durch Auftragen eines Aliquots auf Agarose-Gel anhand der Größe überprüft. Anschließend wurde das PCR-Produkt mit Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt und aufgereinigt. Zur Generierung von A-Überhängen, die für die Ligation in den pDrive Cloning Vektor notwendig sind, wurde das DNA-Fragment mit Taq Polymerase und dNTPS inkubiert.

Durch Ligation wurde das PCR-Produkt als Insert in den pDrive Cloning Vector eingebracht und anschließend in chemokompetente *E. coli DH5-alpha* kloniert. Aus diesen Bakterien wurde eine Plasmidpräparation angefertigt. Zur Kontrolle des korrekten Inserts im Vektor wurde das Plasmid mit dem Restriktionsenzym *EcoRI* verdaut und die entstandenen Fragmente anhand ihrer Größe, dargestellt in einer Agarose-Gelelektrophorese wie in Abbildung 2, beurteilt. Zusätzlich wurde das entsprechende Insert sequenziert, um Punktmutationen auszuschließen.

Ergebnisse

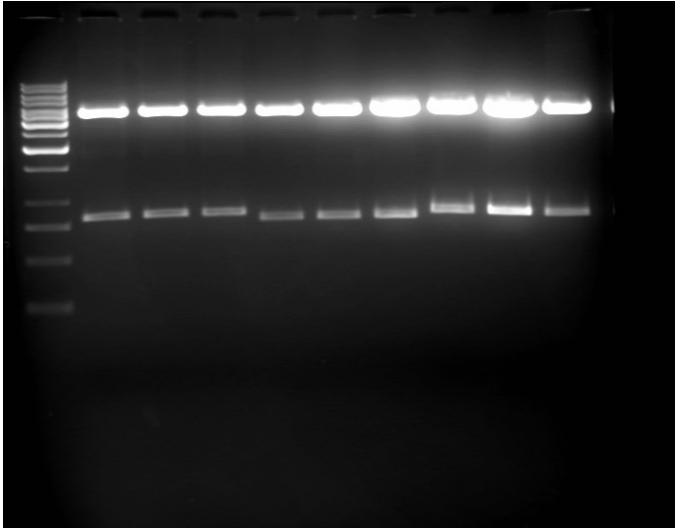


Abbildung 2 Agarose-Gelelektrophorese nach dem *EcoRI*-Restriktionsverdau der pDrive Cloning Vektoren

Beladung: Geltasche 1: Marker, Gene Ruler 1kb DNA Ladder. pDrive Cloning Vector mit Vim1, aus den Klonen #1, #2 und 3# in den Geltaschen 2 bis 4. pDrive Cloning Vector mit Ndm1 aus den Klonen #1, #2 und 3# in den Geltaschen 5 bis 7. pDrive Cloning Vector mit Oxa23 aus den Klonen #1, #2 und 3# in den Geltaschen 8 bis 10. Erwartete Banden: pDrive Cloning Vector linear 3.850 bp, Insert Vim1 810 bp, Insert Ndm1 822 bp, Insert Oxa23 829 bp.

Die pDrive Plasmide wurden anschließend mit zwei Restriktionsenzymen, im Fall von Vim1 und Ndm1 waren die entsprechenden Enzyme *NdeI* und *HindIII*, geschnitten, aufgereinigt und mit Agarose-Gelelektrophorese bestätigt. Die so gewonnenen Inserts mit überhängenden Enden an den Restriktionsschnittstellen, wurden als Insert in einem zweiten Klonierungsschritt mit dem *low copy* Plasmid pFPV KanR verwendet. Abbildung 3 zeigt schematisch die Integration von Inserts in den pFPV-Vektor.

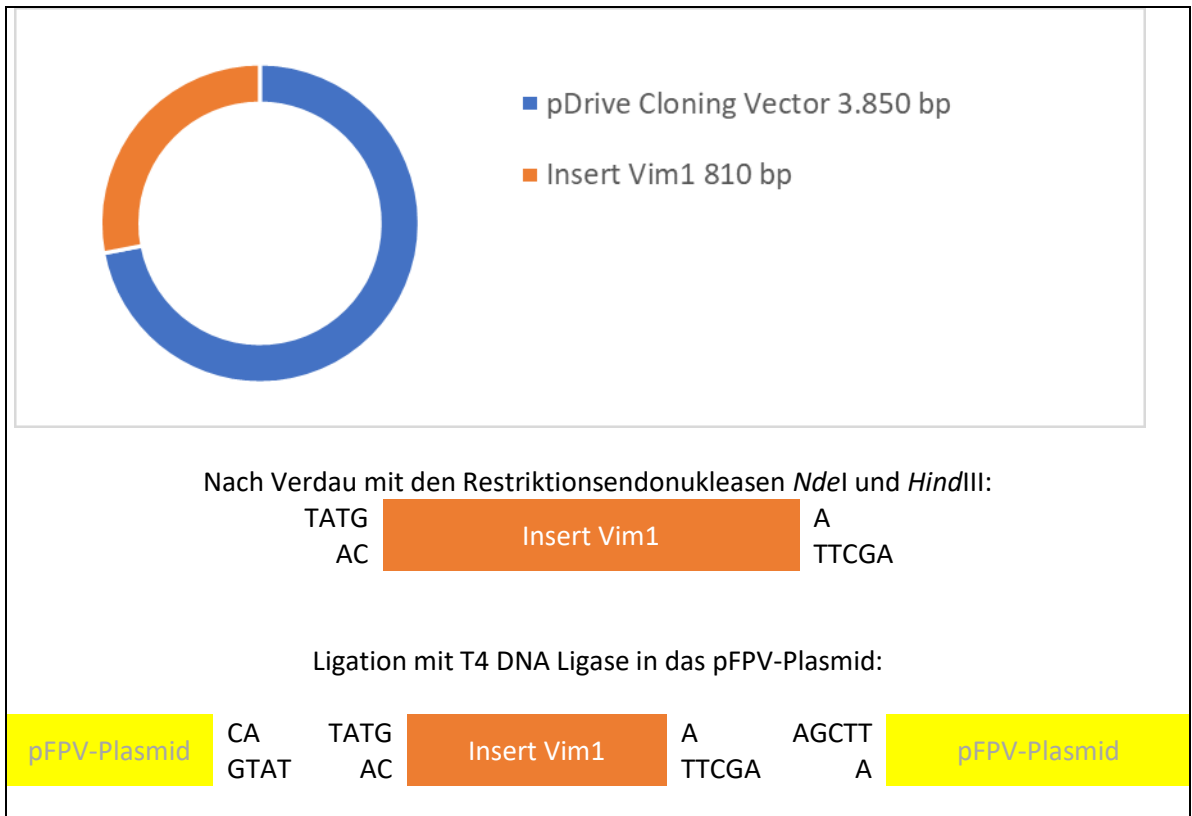
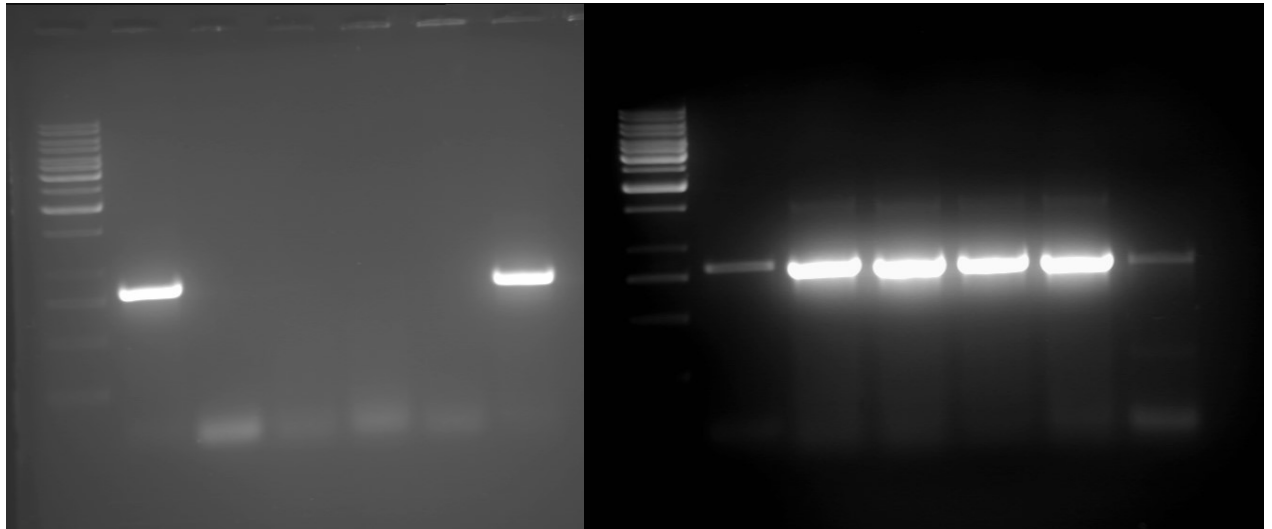


Abbildung 3 Einbringen von Inserts in das pFPV-Plasmid am Beispiel von Vim1

Der Vektor wurde äquivalent vorbereitet. Das Plasmid-Isolat wurde mit den Restriktionsendonukleasen *NdeI* und *HindIII* verdaut, ebenfalls aufgereinigt und mittels Agarose-Gelelektrophorese bestätigt.

Insert und Vektor wurden unter Zuhilfenahme der T4 DNA Ligase ligiert, sodass ein funktionstüchtiges Plasmid mit Insert entstand. Dieses wurde im nächsten Schritt in chemokompetente *E. coli DH5-alpha* transformiert. Kontrolliert wurde das Insert mit einer PCR. Abbildung 4 zeigt Agarose-Gelelektrophoresen entsprechender PCR-Produkte. Die funktionelle Expression der Carbapenemasen wurde durch die Ermittlung der MHK in Flüssigkultur im Vergleich zum ansonsten isogenen Ausgangsstamm gezeigt. Die MHKs des Ausgangsstamms im Vergleich zu den beiden mit pFPV-Plasmid transformierten Stämmen sind in Abbildung 5 dargestellt.

Ergebnisse



Beladung: Geltasche 1: Marker Gene Ruler 1 kb DNA Ladder. *E. coli DH5-alpha pFPV-Vim1 KanR* #1, #2, #3, #4, #5 und #6 in den Geltaschen 2 bis 7.

Beladung: Geltasche 1: Marker Gene Ruler 1 kb DNA Ladder. *E. coli DH5-alpha pFPV-Ndm1 KanR* #7, #8, #9, #10, #11 und #12 in den Geltaschen 2 bis 7.

Abbildung 4 PCR-Kontrolle des pFPV-Vim1-Plasmids (links) und des pFPV-Ndm1-Plasmids (rechts) in *E. coli DH5-alpha*

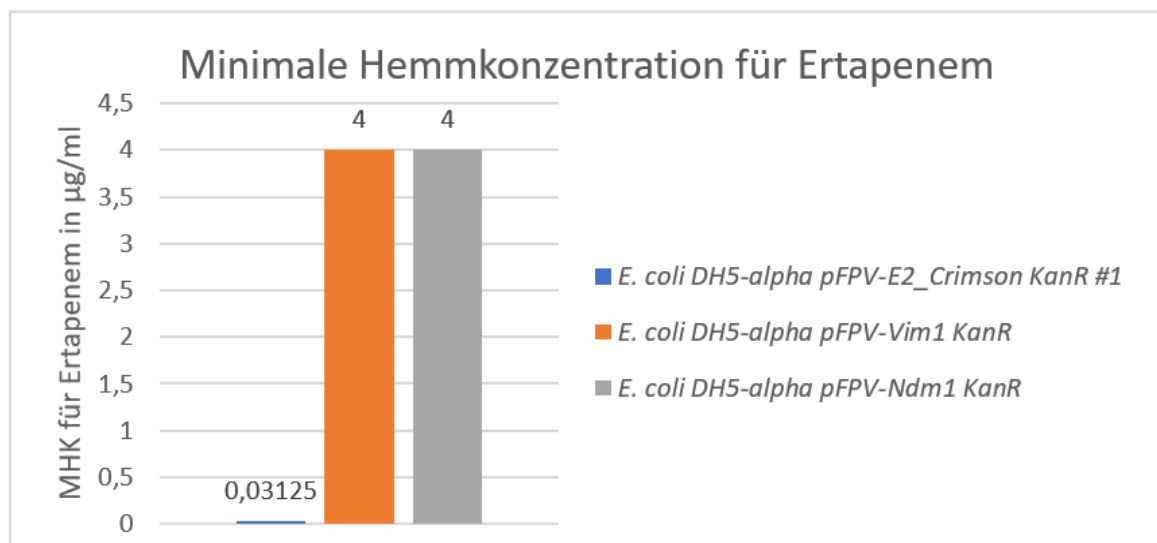


Abbildung 5 MHK für Ertapenem der transformierten *E. coli DH5-alpha* Stämme

Mittels Recombineering wurden die Carbapenemasegene in einfacher Kopie in die chromosomale DNA der Bakterien integriert. Dieser Schritt wurde gewählt, um dafür zu sorgen, dass sich das jeweilige Resistenzgen in einer definierten Kopienanzahl in den Bakterien befindet. So wird sichergestellt, dass in den nachfolgenden *Competition Assays* gemessene Fitnessunterschiede unabhängig von der Anzahl der Kopien und zwischen den verschiedenen Resistenzgenen vergleichbar sind. Um den Einfluss des Promotors messen

Ergebnisse

zu können, wurde für jedes Gen ein Stamm hergestellt, der unter Kontrolle des pFPV-Promotors steht, und einer, der der Regulation des endogenen Promotors aus dem lacZ locus untersteht. Als Integrationsort wurde der lacZ locus ausgewählt. Dieser locus bietet den Vorteil, dass sein Vorhandensein neutral in Bezug auf die Fitness des Bakteriums ist. Darüber hinaus ist so eine einfache Farbselektion zwischen rekombinanten Bakterien und Wildtyp-Bakterien möglich.

Bei vier Stämmen wurde mittels genetischer Rekombination das jeweilige carbapenemasekodierende Gen, Vim1 oder Ndm1, in die chromosomale DNA integriert. Hierzu wurde mit der Vorlage des pFPV-Plasmids inklusive seines entsprechenden Inserts eine PCR durchgeführt. Die so entstandenen DNA-Fragmente wiesen im ersten Fall vor dem pFPV-Promotor und hinter dem Stopp-Codon Anteile des lacZ locus auf. Im zweiten Fall wurde das Carbapenemasegen direkt durch die Endsequenz des lacOperators und die Startsequenz von lacY flankiert. Dies ist schematisch in Abbildung 6 dargestellt.

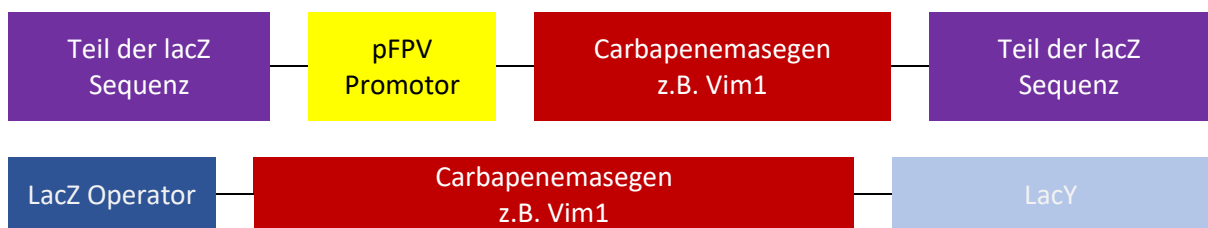


Abbildung 6 Konstrukt nach Recombineering in den lacZ locus mit dem pFPV Promotor (oben) bzw. zum Ersetzen des lacZ locus (unten)

Die PCR-Produkte wurden mit *DpnI* verdaut, um sicherzustellen, dass keine intakten Plasmide in den Transformationsansatz gelangen. Die PCR-Produkte selbst wurden nicht geschnitten, weil *DpnI* abhängig von der Modifikation eines DNA-Fragments arbeitet. Dieser Schritt dient dazu, Plasmid-Transformanten zu vermeiden. Nach dem *DpnI*-Verdau wurde die DNA aufgereinigt und zur Konzentrationsabschätzung auf Agarose-Gel geladen. Zur Rekombination wurde bei dem *E. coli* Stamm *K12 MG 1655 pSIM9* die Induktion der Rekombination über einen Temperaturshift auf 42 °C eingeleitet. Die induzierten Bakterien wurden elektrokompent gemacht und mit dem linearen DNA-Fragment elektroporiert. Eine erste Selektion zwischen Rekombinanten und falschen Rekombinanten bzw. nicht rekombinanten Bakterien geschah durch das Blau-Weiß-Screening, wie in Abbildung 7 dargestellt. Hierzu wurde dem Kulturmedium X-Gal und IPTG zugesetzt.

Ergebnisse

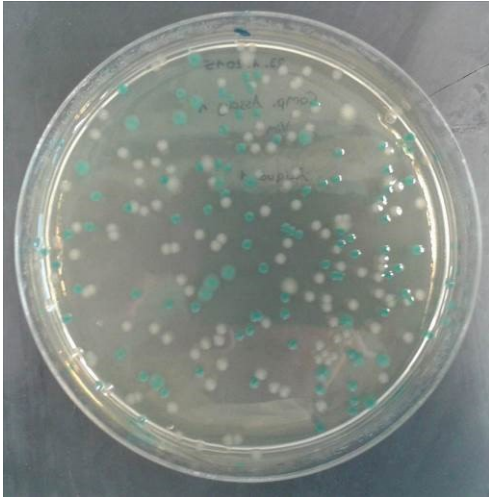
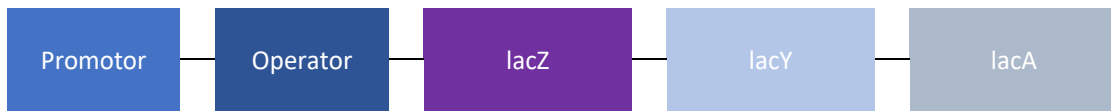


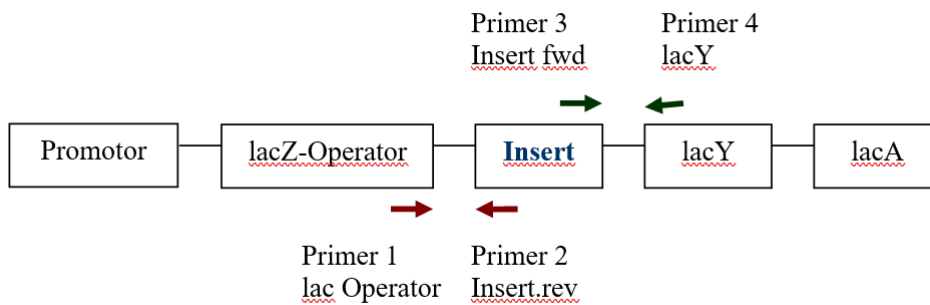
Abbildung 7 Blau-Weiß-Screening auf Kulturmedium mit X-Gal und IPTG

Mehrere weiße Einzelkolonien wurden abgenommen und kultiviert. Eine PCR zur Überprüfung des richtigen Integrationsortes sowie das Vorhandensein einer einfachen Kopie diente als Bestätigung auf molekularbiologischer Ebene. Abbildung 8 zeigt die PCR zur Kontrolle des korrekten Insertionsortes und einer solitären Kopie des Ziel-Genes. Um erneut auszuschließen, dass die Resistenzgene durch Punktmutationen verändert wurden, wurde eine Sequenzanalyse durchgeführt. Mit positiv getesteten Klonen erfolgte ein *plasmid-curing* zur Entfernung des pSIM9-Plasmids. Dies ist notwendig, damit die Resistenz, die in den folgenden MHK-Bestimmungen gemessen wird, auf eine Kopie des Carbapenemresistenzgenes zurückzuführen ist. So können die Effekte einzelner Carbapenemasen miteinander verglichen werden. Eine mögliche Wechselwirkung oder Potenzierung negativer Effekte wird vermieden.

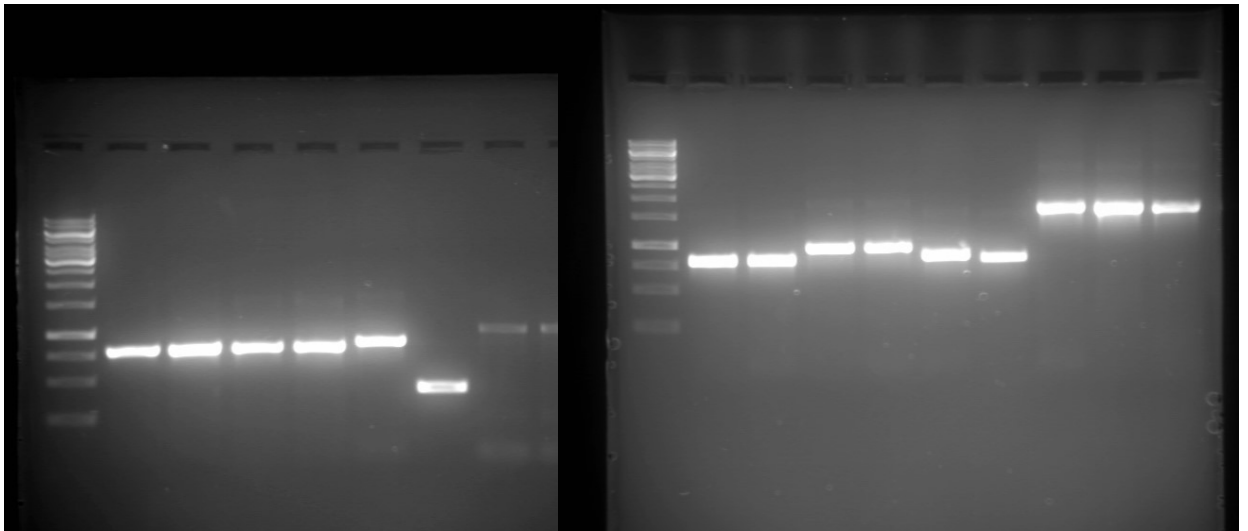
Ergebnisse



PCR 2



PCR 1



Beladung: Marker Gene Ruler 1 kb DNA Ladder in Geltasche 1. Darauf folgen in der genannten Reihenfolge: *E. coli* K12 MG1655 pSim9 Recomb_Oxa23.lacZ #1 und #2, *E. coli* K12 MG1655 pSim9 Recomb_KPC2.lacZ #3 und #4, *E. coli* K12 MG1655 pSim9 Recomb_Ndm1.lacZ #1, *E. coli* K12 MG1655 pSim9 Recomb_Vim1.lacZ #1, *E. coli* K12 MG1655 pSim9 Recomb_Ndm1-pFPV.lacZ #1 und #2, *E. coli* K12 MG1655 pSim9 Recomb_Vim1-pFPV.lacZ #1.

Erwartete Banden für PCR 1: Oxa23 822 bp, KPC2 836 bp, Vim1 428 bp, Ndm1 890 bp, Vim1-pFPV 1.046 bp, Ndm1-pFPV 1.046 bp. Erwartete Banden für PCR 2: Oxa23 831 bp, KPC2 959 bp, Vim1 803 bp, Ndm1 866 bp, Vim1-pFPV 1.615 bp, Ndm1-pFPV 1.716 bp.

Abbildung 8 Schematische Darstellung des Lac-Operons (oben), PCR zur Kontrolle nach dem Recombineering (mittig) und Agarose-Gelelektrophoresen von PCR 1 (links unten) und PCR 2 (rechts unten) zur Bestätigung der Klone nach dem Recombineering in *E. coli* K12 MG1655

Ergebnisse

Parallel dazu wurden die Expressionsplasmide pFPV-Vim1 KanR und pFPV-Ndm1 KanR in die *E. coli*-Stämme mit der Deletion Δ ara sowie den Wildtyp transformiert. Die Bakterienstämme mit der Deletion können keine Arabinose verstoffwechseln, sodass sie auf Agar mit zugesetztem Arabinose als Substrat und TTC als Farbindikator als rote Kolonien imponieren. Der Wildtyp dagegen bildet weiße Kolonien, da Arabinose abgebaut werden kann. Abbildung 9 verdeutlicht das Rot-Weiß-Screening.

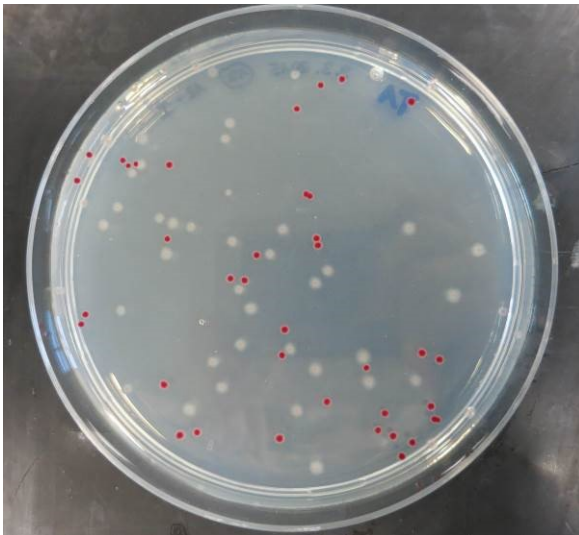


Abbildung 9 Rot-Weiß-Screening auf Agar mit Arabinose und TTC

Zur Generierung eines geeigneten Wildtyps wurde das pFPV-Plasmid anstelle eines Inserts mit einem Adapter, der mehrere Stopp-Codons enthält, ligiert und ebenfalls in beide Stämme, mit und ohne Deletion Δ ara, eingebracht.

Die so hergestellten Bakterienstämme wurden durch Kanamycin im Kulturmedium auf das Vorhandensein des pFPV-Plasmids hin überprüft. Da sich auf diesem Plasmid eine Kanamycin-Resistenzkassette befindet, sind Bakterien, die das Plasmid exprimieren, resistent, wohingegen Bakterien, die das Plasmid verloren haben, sensibel gegen Kanamycin sind und im Wachstum gehemmt werden. Kanamycin übt darüber hinaus einen Selektionsdruck aus, sodass das Plasmid erhalten bleibt. Ergänzend zu den vorgenannten Ziel-Stämmen, bei denen Einzelklone isoliert wurden, wurden Klon-Pools mit den Expressionsplasmiden hergestellt. Für Ndm1 waren hierbei alle Klone positiv für eine Carbapenemresistenz, bei Vim1 etwa die Hälfte. Da mit den so gewonnenen Ziel-Stämmen keine *Competition Assays* durchgeführt werden können, wurde bei den Klon-Pools eine Charakterisierung mittels Wachstumsversuch zur Bestimmung der Verdopplungszeit durchgeführt.

3.2 Charakterisierung der verschiedenen resistenten Stämme

Die Bestimmung der Verdopplungszeit eines Bakterienstammes gibt erste Hinweise auf dessen Fitness. Hierzu wurde in einem Zeitraum von zwei bis drei Stunden mehrmals die OD_{600} einer Bakterienkolonie bestimmt. Durch eine Vorkultur sollten alle Bakterien in diesem Zeitraum in der exponentiellen Wachstumsphase sein. Für jeden Stamm wurde der Versuch mindestens zwei Mal durchgeführt. Außerdem wurde der jeweilige Referenzstamm parallel kultiviert, um einen Messfehler durch schwankende Umgebungseinflüsse einschätzen zu können. Die Verdopplungszeiten der rekombinanten Stämme sowie der plasmidkodierte Stämme sind in Abbildung 10 dargestellt.

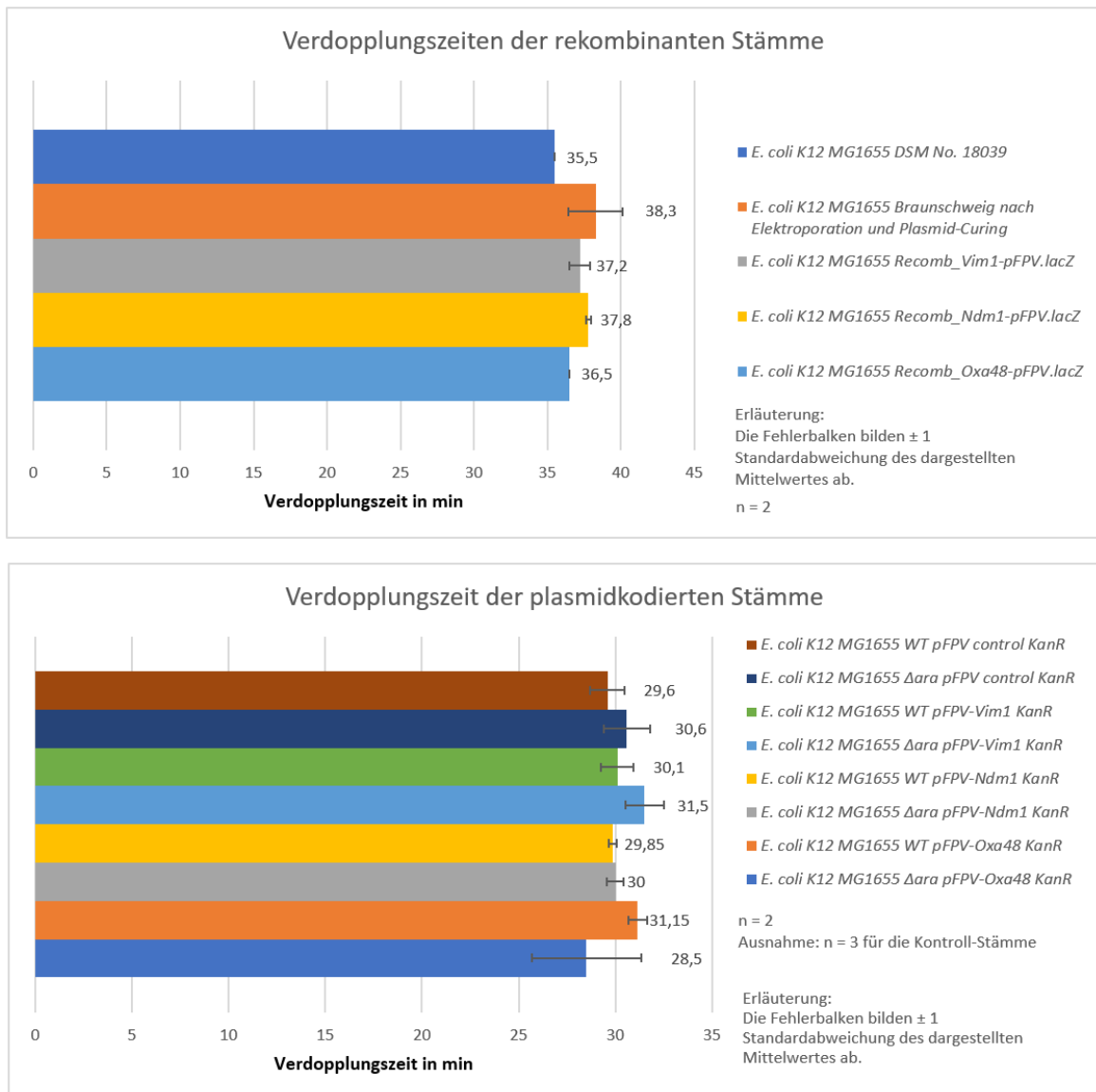


Abbildung 10 Verdopplungszeit der rekombinanten Stämme (oben) und der plasmidkodierte Stämme (unten)

Ergebnisse

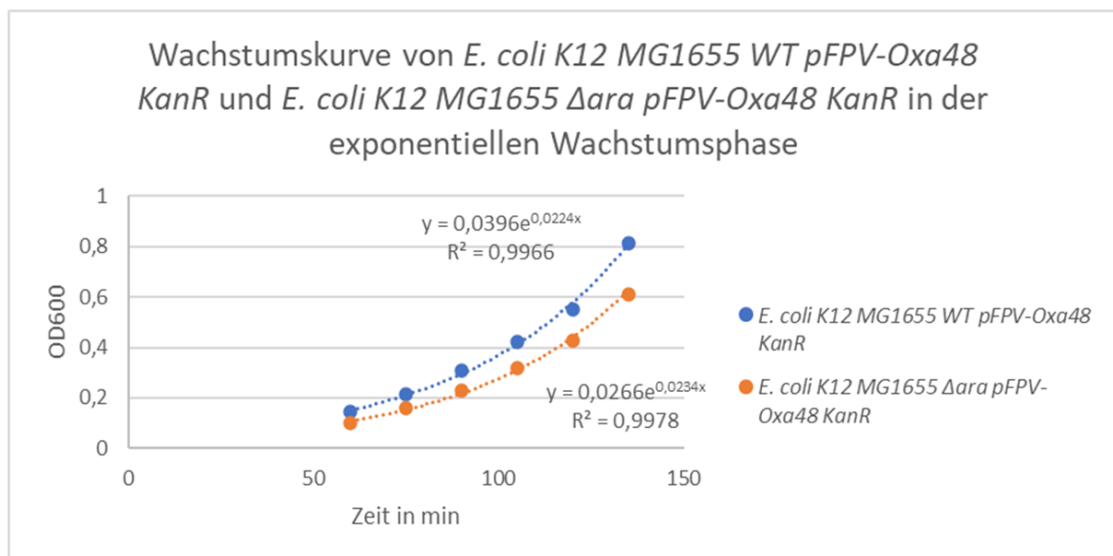
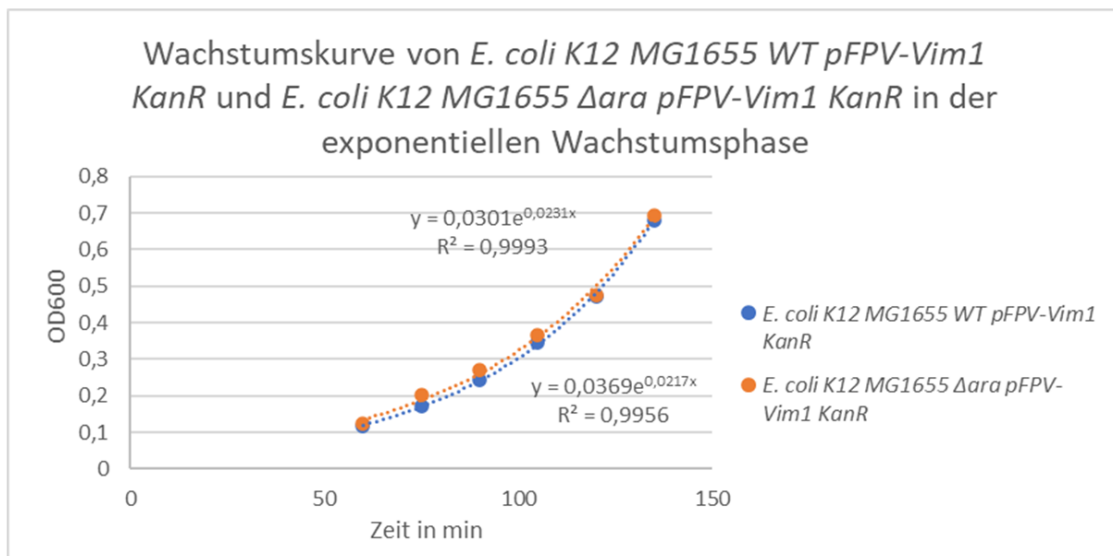
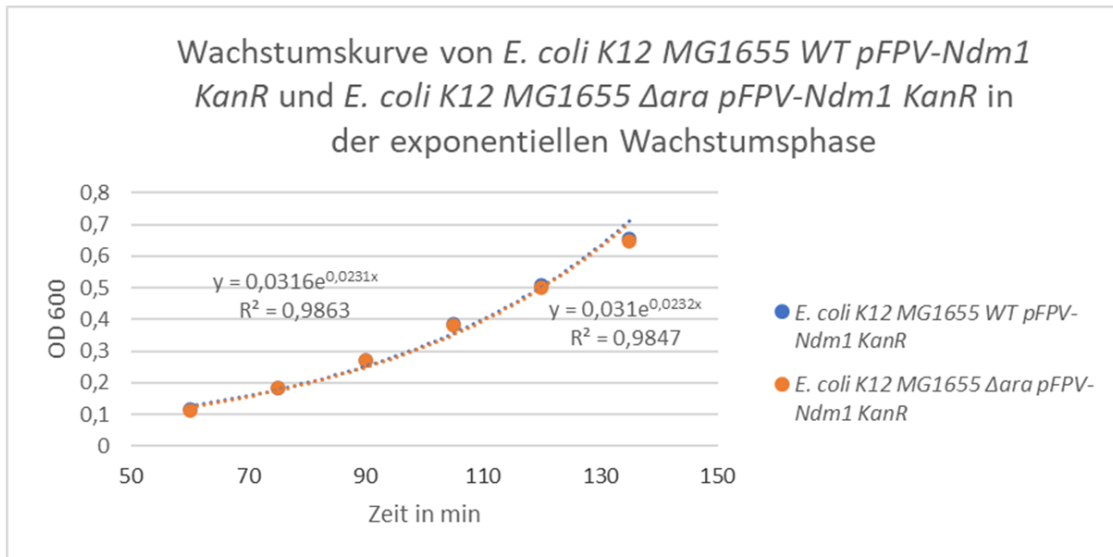


Abbildung 11 Wachstumskurve der komplementären *E. coli* K12 MG1655-Stämme mit und ohne Deletion Δ ara mit den Expressionsplasmiden pFPV-Ndm1 KanR (oben), pFPV-Vim1 KanR (mittig) und pFPV-Oxa48 KanR (unten)

Ergebnisse

Bei der vergleichenden Betrachtung der Verdopplungszeiten jener Bakterienstämme, die das gleiche Plasmid, in diesem Fall pFPV-Oxa48 KanR oder pFPV-Vim1 KanR oder pFPV-Ndm1 KanR, tragen und sich nur im Merkmal, ob sie Wildtyp oder Träger der Deletion Δ ara sind, unterscheiden, lässt sich zeigen, dass die Deletion keinen Einfluss auf die Verdopplungszeit der Bakterien hat. Abbildung 11 zeigt die gegenübergestellten Wachstumskurven für die komplementären Stämme.

Vergleicht man die Ergebnisse aus den Testungen zur minimalen Hemmkonzentration miteinander, stellt man fest, dass sich der Wert der minimalen Hemmkonzentration stark unterscheidet. Einerseits unterscheiden sich die minimalen Hemmkonzentrationen, die die einzelnen Carbapenemasegene im ansonsten identischen genetischen Hintergrund vermitteln, vergleiche diesbezüglich die Darstellung in Abbildung 12, Abbildung 13 und Tabelle 35. Andererseits scheint der Promotor eine wichtige Rolle bezogen auf das Ausmaß der phänotypischen Resistenzausbildung zu haben. Vergleiche hierzu Abbildung 14, Abbildung 15 und Tabelle 35. Vim1 konnte im ansonsten isogenen Hintergrund unter Regulation des lacZ-Promotors nur eine minimale Erhöhung der minimalen Hemmkonzentration bewirken, während Vim1 unter Kontrolle des pFPV-Promotors einen deutlichen Anstieg der minimalen Hemmkonzentration zeigte. Dasselbe Phänomen ließ sich bei Ndm1 beobachten.

Weiter ließ sich zeigen, dass die Carbapenemasegene in den Experimenten funktionsfähig sind und zu einer phänotypischen Resistenzausbildung führen. Der Faktor der MHK-Erhöhung war abhängig von dem Ort der Kodierung, vergleiche die Darstellung in Tabelle 34. Via Recombineering in die Bakterien eingebrachte und chromosomal integrierte Resistenzgene führten zu einem weniger starken Anstieg der minimalen Hemmkonzentration als dies der Fall war für die auf einem Plasmid in die Bakterien eingebrachten Carbapenemasegene.

Ergebnisse

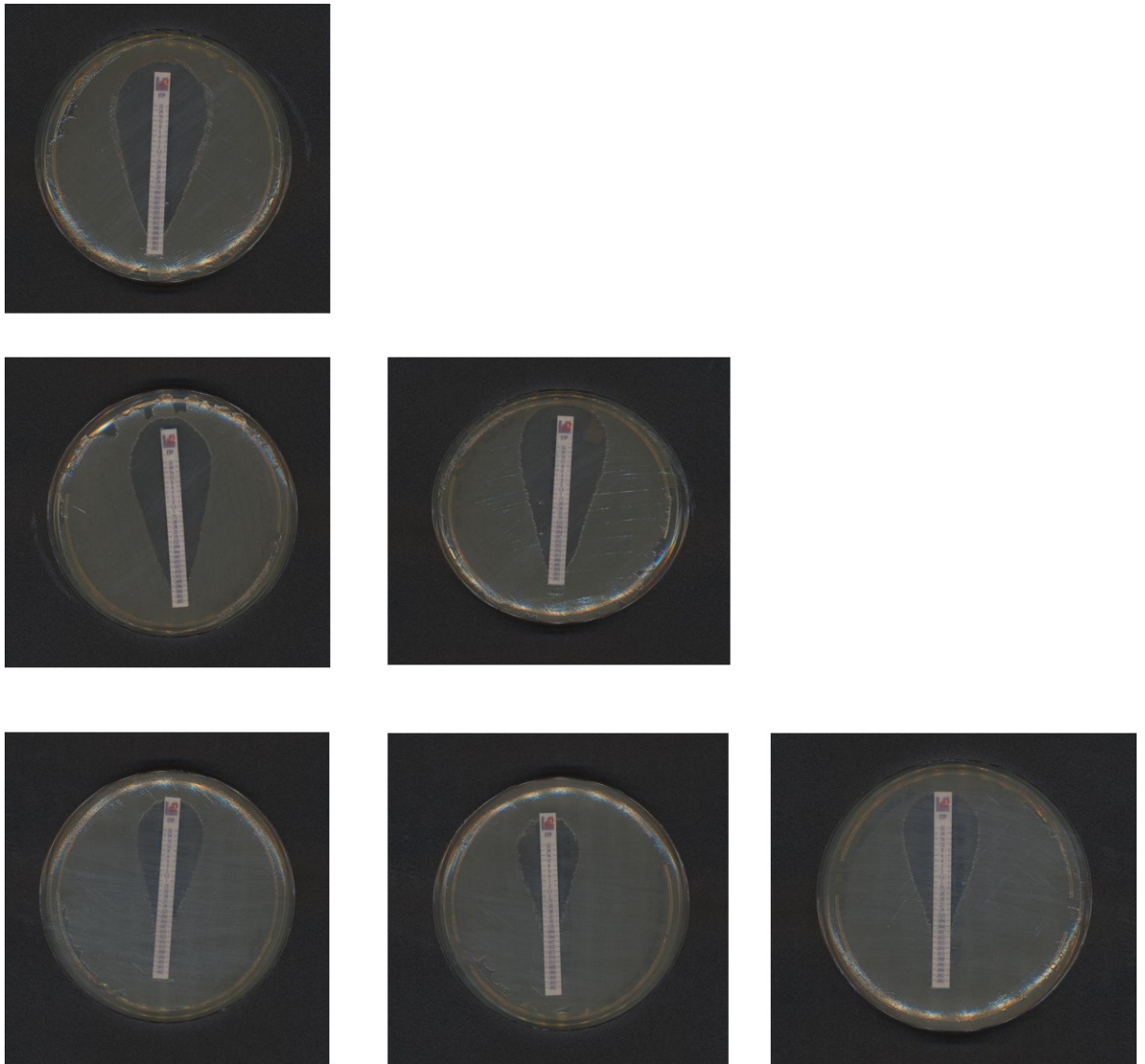


Abbildung 12 E-Test mit Ertapenem der Rekombinanten mit unterschiedlichen Promotoren

E. coli K12 MG1655 DSM No. 18039 (oben), *E. coli* K12 MG1655 *Recomb_Vim1.lacZ* und *E. coli* K12 MG1655 *Recomb_Ndm1.lacZ* (mittig) und *E. coli* K12 MG1655 *Recomb_Vim1-pFPV.lacZ*, *E. coli* K12 MG1655 *Recomb_Ndm1-pFPV.lacZ* und *E. coli* K12 MG1655 *Recomb_Oxa48-pFPV.lacZ* (unten).

Ergebnisse

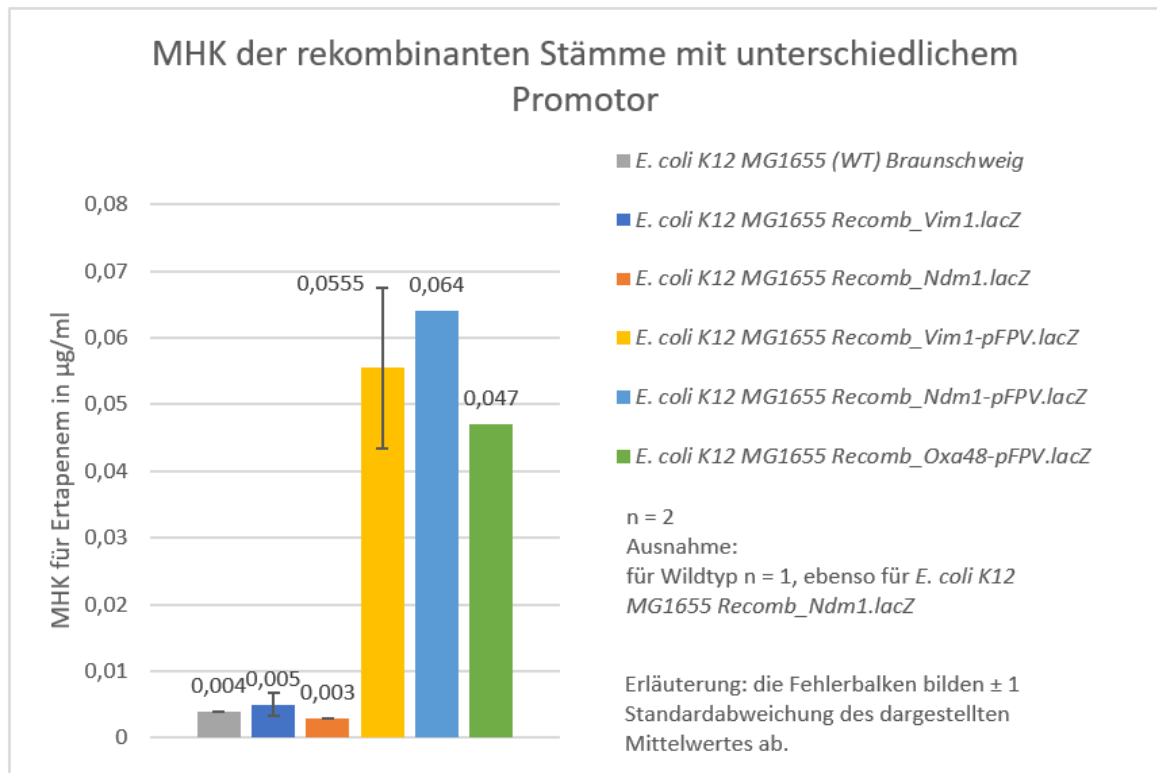


Abbildung 13 MHK für Ertapenem der rekombinanten Stämme mit unterschiedlichem Promotor

Tabelle 34 Faktor der MHK der Rekombinanten im Vergleich zum Wildtyp

Bakterienstamm	Faktor der MHK im Vergleich zum Wildtyp <i>E. coli</i> K12 MG1655 (WT) Braunschweig
<i>E. coli</i> K12 MG1655 Recomb_Vim1.lacZ	1,25
<i>E. coli</i> K12 MG1655 Recomb_Ndm1.lacZ	0,75
<i>E. coli</i> K12 MG1655 Recomb_Vim1-pFPV.lacZ	13,88
<i>E. coli</i> K12 MG1655 Recomb_Ndm1-pFPV.lacZ	16,00
<i>E. coli</i> K12 MG1655 Recomb_Oxa48-pFPV.lacZ	11,75

Ergebnisse

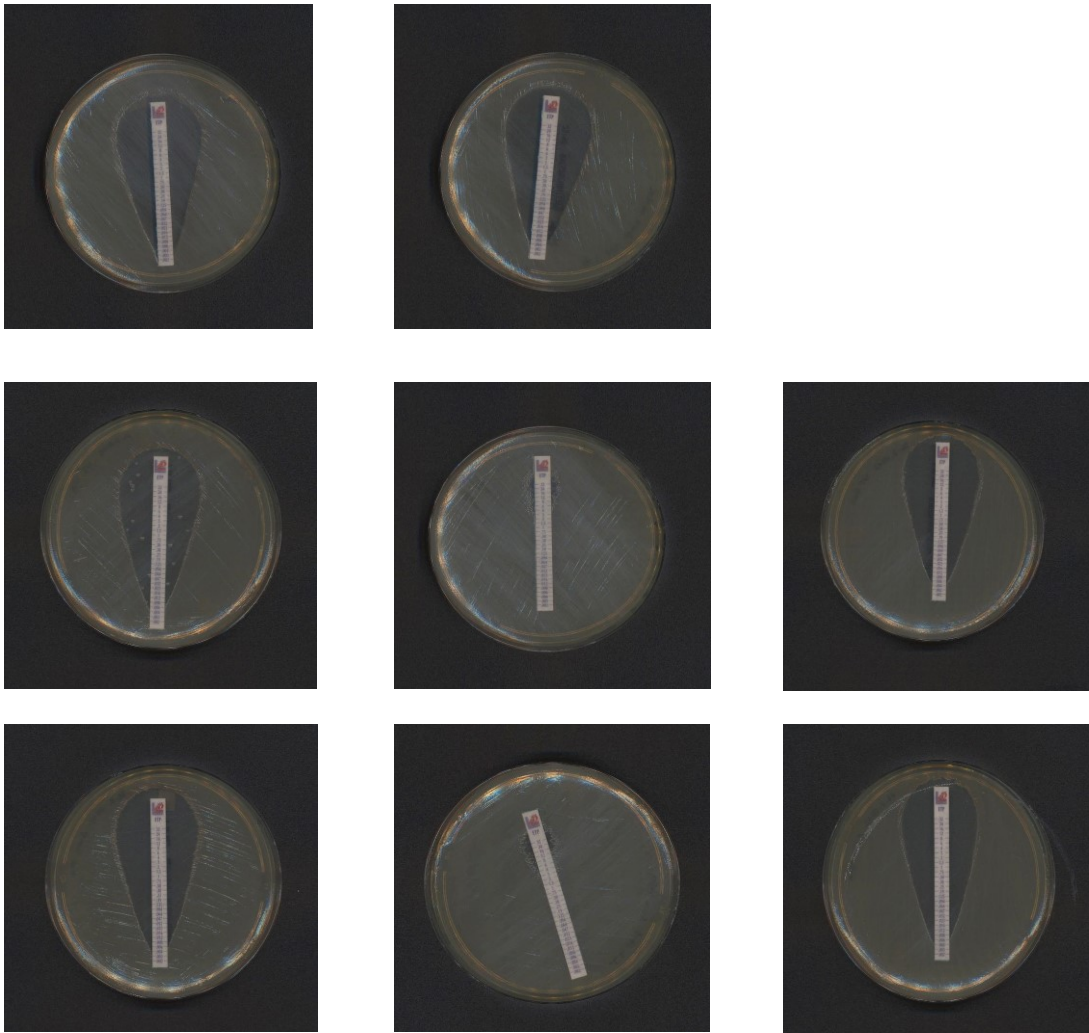


Abbildung 14 E-Test mit Ertapenem der plasmidkodierten Carbapenemasebildner

E. coli K12 MG1655 WT pFPV control KanR und *E. coli* K12 MG1655 Δ ara pFPV control KanR (oben), *E. coli* K12 MG1655 WT mit pFPV-Vim1 KanR, pFPV-Ndm1 KanR bzw. pFPV-Oxa48 KanR (mittig) und *E. coli* K12 MG1655 Δ ara mit pFPV- Vim1 KanR, pFPV-Ndm1 KanR bzw. pFPV-Oxa48 KanR (unten).

Ergebnisse

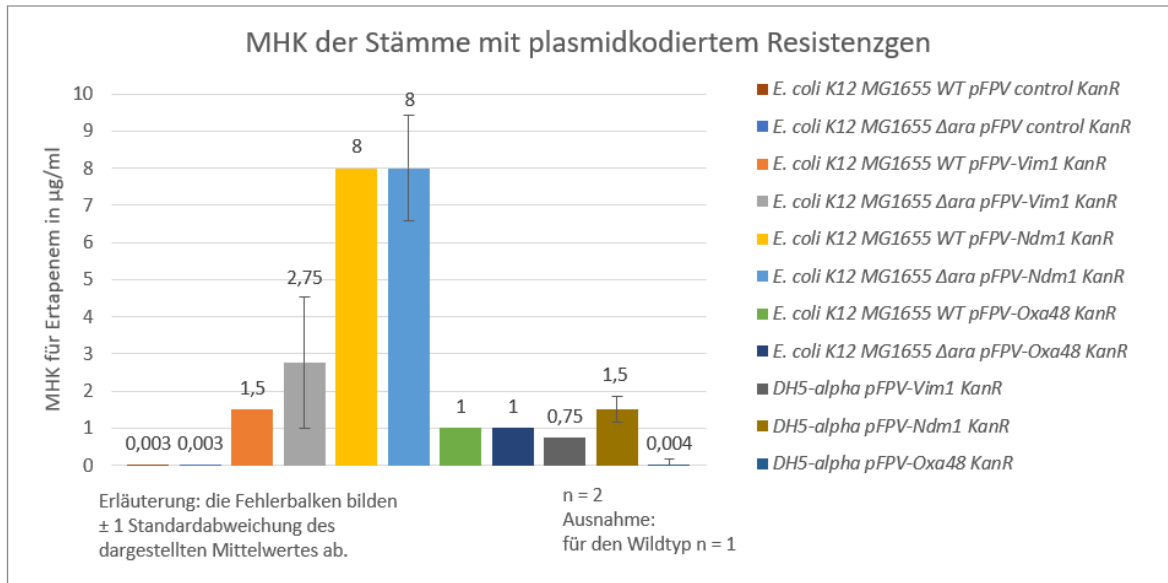


Abbildung 15 MHK für Ertapenem aller Stämme mit plasmidkodiertem Resistenzgen

Tabelle 35 Faktor der MHK für Ertapenem mit plasmidkodierten Carbapenemasen im Vergleich zum Wildtyp

Bakterienstamm	Faktor der MHK im Vergleich zum Wildtyp
<i>E. coli</i> K12 MG1655 WT pFPV-Vim1 KanR	500,00
<i>E. coli</i> K12 MG1655 Δara pFPV-Vim1 KanR	916,67
<i>E. coli</i> K12 MG1655 WT pFPV-Ndm1 KanR	2.666,67
<i>E. coli</i> K12 MG1655 Δara pFPV-Ndm1 KanR	2.333,33
<i>E. coli</i> K12 MG1655 WT pFPV-Oxa48 KanR	333,33
<i>E. coli</i> K12 MG1655 Δara pFPV-Oxa48 KanR	333,33
<i>E. coli</i> DH5-alpha pFPV-Vim1 KanR	250,00
<i>E. coli</i> DH5-alpha pFPV-Ndm1 KanR	500,00
<i>E. coli</i> DH5-alpha pFPV-Oxa48 KanR	1,33

Es wurde ebenfalls der Einfluss versuchsimmanenter Faktoren auf die minimale Hemmkonzentration untersucht. IPTG ist ein synthetischer Induktor des Lac-Operons, während X-Gal chromogenes Substrat der β -Galactosidase ist. Auf Nährmedium mit X-Gal und IPTG weisen blaue Kolonien darauf hin, dass der Galaktose-Stoffwechsel intakt ist. Dies wäre bei Wildtyp-Bakterien mit intaktem lacZ locus oder rekombinanten Bakterien, die in einen anderen locus inseriert haben, der Fall. Weiße Kolonien haben keinen intakten Galaktose-Stoffwechsel. Bakterien, die das jeweilige Resistenzgen in den lacZ locus integriert und somit den lacZ locus funktionell zerstört haben, wachsen folglich weiß auf

Ergebnisse

X-Gal- und IPTG-haltigen Nährböden. Der Zusatz von IPTG zum Farbscreening zeigte keinen Einfluss auf die minimale Hemmkonzentration wie in Abbildung 16 dargestellt. Ebenso beeinflusste die Deletion Δara die minimale Hemmkonzentration nicht, vergleiche hierzu Abbildung 17.

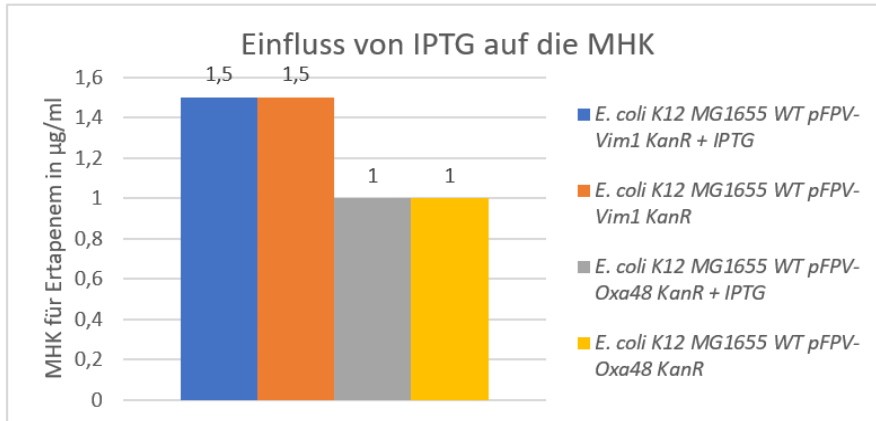


Abbildung 16 Einfluss von IPTG auf die MHK

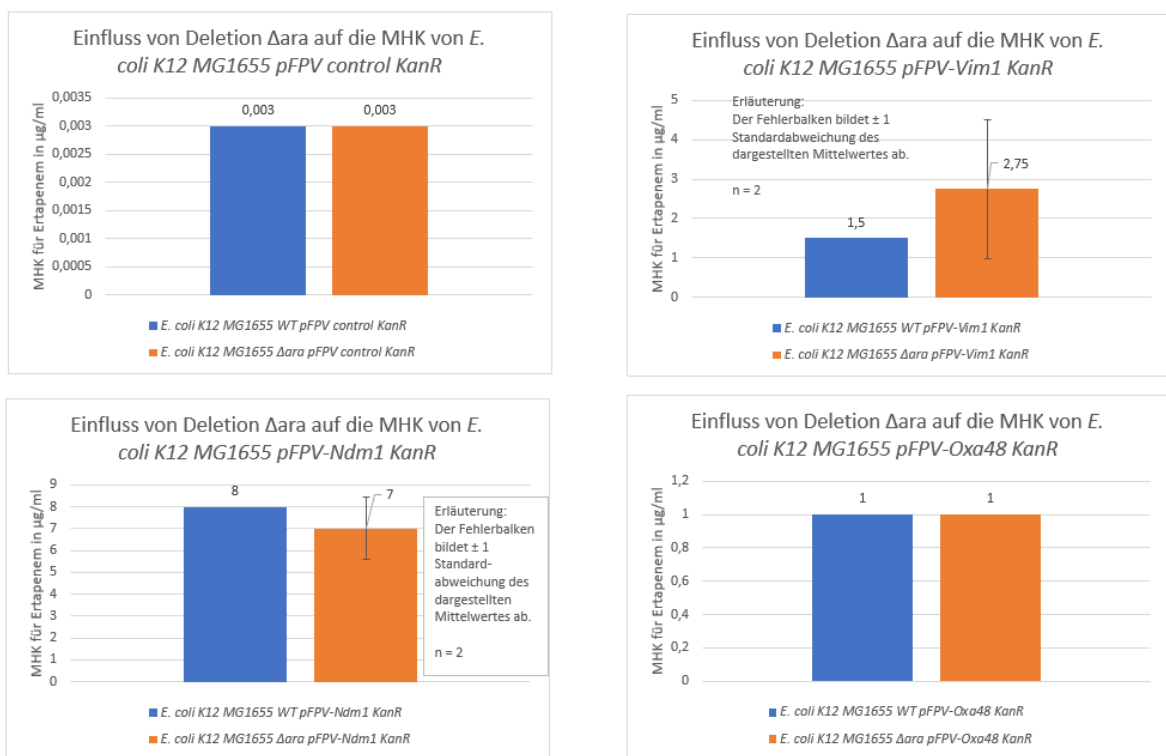


Abbildung 17 Einfluss von Δara auf die MHK

Zur weiteren Charakterisierung wurden die jeweiligen Zielstämme mit ihren Referenzstämmen verglichen. Für die Rekombinanten im lacZ locus war der Referenzstamm *E. coli* K12 MG1655 DSM no. 18039, welcher als ursprünglicher Bakterienstamm für die Herstellung der Zielstämme eingesetzt wurde. Für die plasmidtragenden Carbapenemasebildner in beiden genetischen Hintergründen, Δara und

Ergebnisse

Wildtyp, waren die jeweiligen Ausgangsstämme mit dem Kontrollplasmid pFPV control KanR als Referenzstämme definiert, dies waren *E. coli K12 MG1655 WT pFPV control KanR* und *E. coli K12 MG1655 Δ ara pFPV control KanR*. Um die Resistenzausbildung zu zeigen, sollte der rekombinante wie auch der plasmidtragende Zielstamm gegenüber dem Referenzstamm eine erhöhte minimale Hemmkonzentration für Carbapeneme aufweisen. Tabelle 34 und Tabelle 35 stellen den Anstieg der minimalen Hemmkonzentration im Vergleich zum Referenzstamm dar und belegen die Expression einer funktionstüchtigen Carbapenemase.

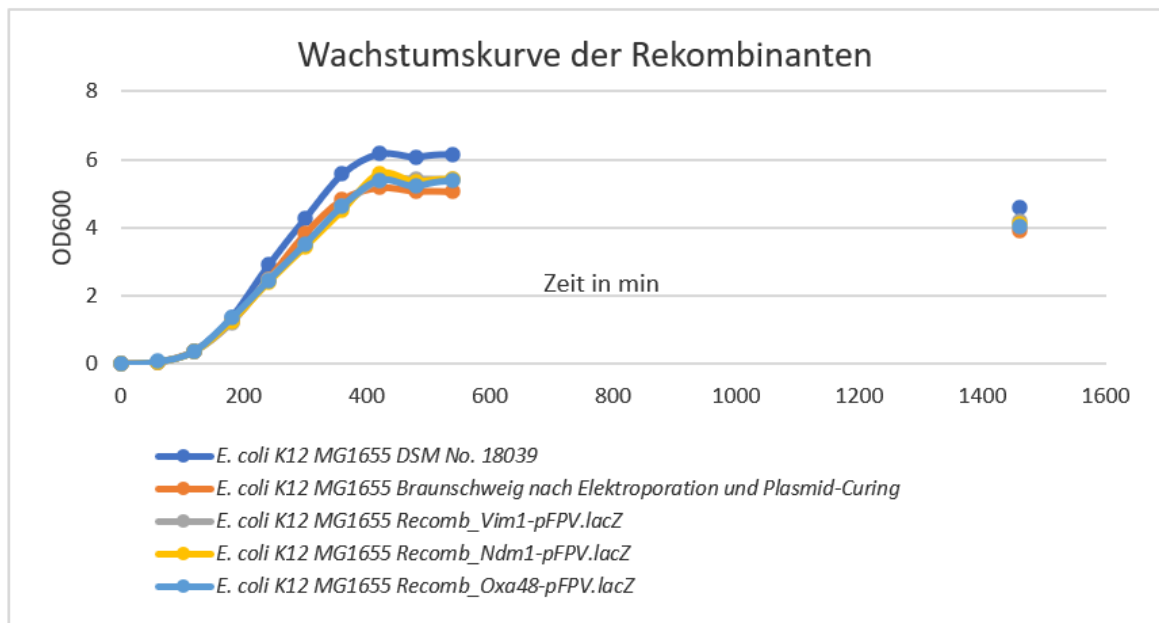


Abbildung 18 Wachstumskurve der Rekombinanten im Vergleich zum Ausgangs- und Kontrollstamm

Als Teilaspekt zur Beurteilung der Fitness wurden Wachstumsversuche durchgeführt. Hierbei wurde untersucht, ob sich das Wachstumsverhalten der mittels Recombineering genetisch veränderten Bakterienstämme oder die Expression einer Carbapenemase auf das Wachstumsverhalten der Bakterien auswirkt. Unter der Fragestellung, ob die Prozedur der Elektroporation einen Einfluss auf das Wachstumsverhalten der Bakterien hat, wurde ebenfalls ein Bakterienstamm der Prozedur der Elektroporation und dem anschließenden *plasmid-curing* unterzogen, jedoch ohne Ziel-DNA-Fragmente, sodass die genetische Ausstattung zum Ausgangsstamm nicht verändert worden war. Die entsprechenden Wachstumskurven für Rekombinante sind in Abbildung 18, diejenigen für plasmidkodierte Carbapenemasebildner in Abbildung 19 dargestellt.

Ergebnisse



Abbildung 19 Wachstumskurven der plasmidkodierte Carbapenemasebildner im Vergleich zum Ausgangsstamm mit Kontrollplasmid

Durch Messung der maximalen optischen Dichte wird die maximale Bakterienkonzentration ermittelt, bis zu der die untersuchten Stämme bei Ressourcenknappheit heranwachsen können. Abbildung 20 zeigt die Ergebnisse für Rekombinanten, Abbildung 21 die Ergebnisse für plasmidkodierte Stämme. Die im Wachstumsversuch erreichte, maximale optische Dichte war bei den Rekombinanten niedriger als bei dem jeweiligen Referenzstamm.

Zur Überprüfung, ob die Prozedur mit Elektroporation und anschließendem *plasmid-curing* Einfluss auf die Fitness in Form der maximalen optischen Dichte hat, wurde ein Ausgangsstamm einer Elektroporation, allerdings ohne Ziel-DNA, und *plasmid-curing*

Ergebnisse

unterzogen. Dieser Bakterienstamm zeigte tatsächlich eine niedrigere maximale optische Dichte im Vergleich zum isogenen Ausgangsstamm. In der Mehrfachbestimmung zeigte sich eine große Varianz der maximalen optischen Dichte, wie sich an den großen Fehlerbalken erkennen lässt. Diese Varianz war bei *E. coli K12 MG1655* postprozedural besonders ausgeprägt. Die plasmidkodierte Carbapenemasebildner erreichen im Wachstumsversuch ebenfalls eine geringere maximale optische Dichte als der Referenzstamm. Für die Auswertung wurden die Werte für die Reihen *E. coli K12 MG1655 WT* und *E. coli K12 MG1655 Δara* zusammengefasst.

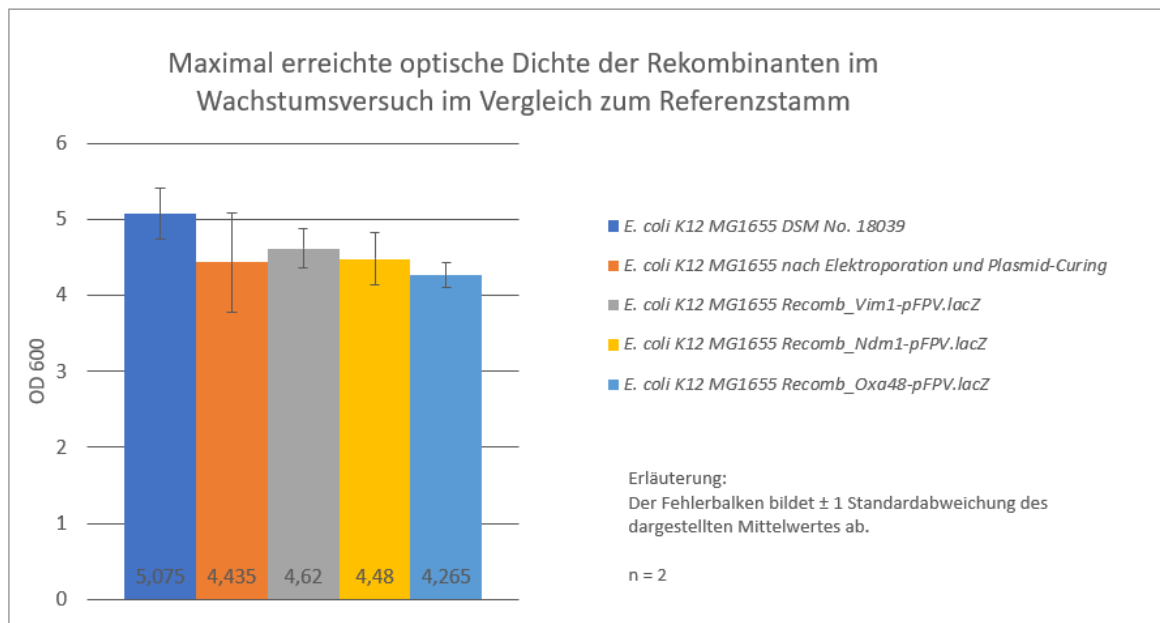


Abbildung 20 Maximale erreichte optische Dichte der Rekombinanten

Ergebnisse

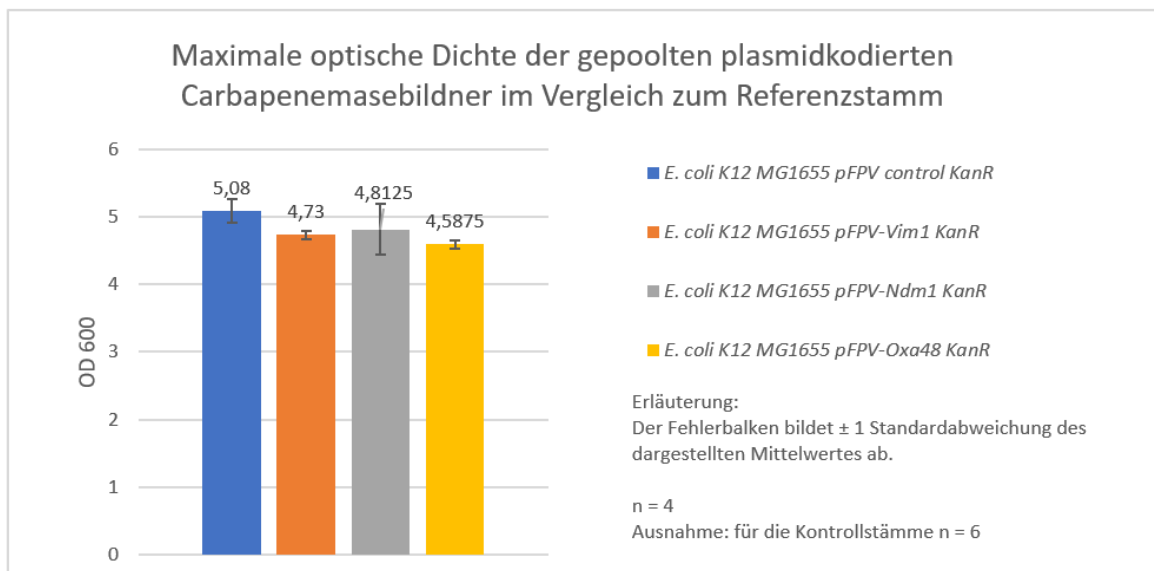
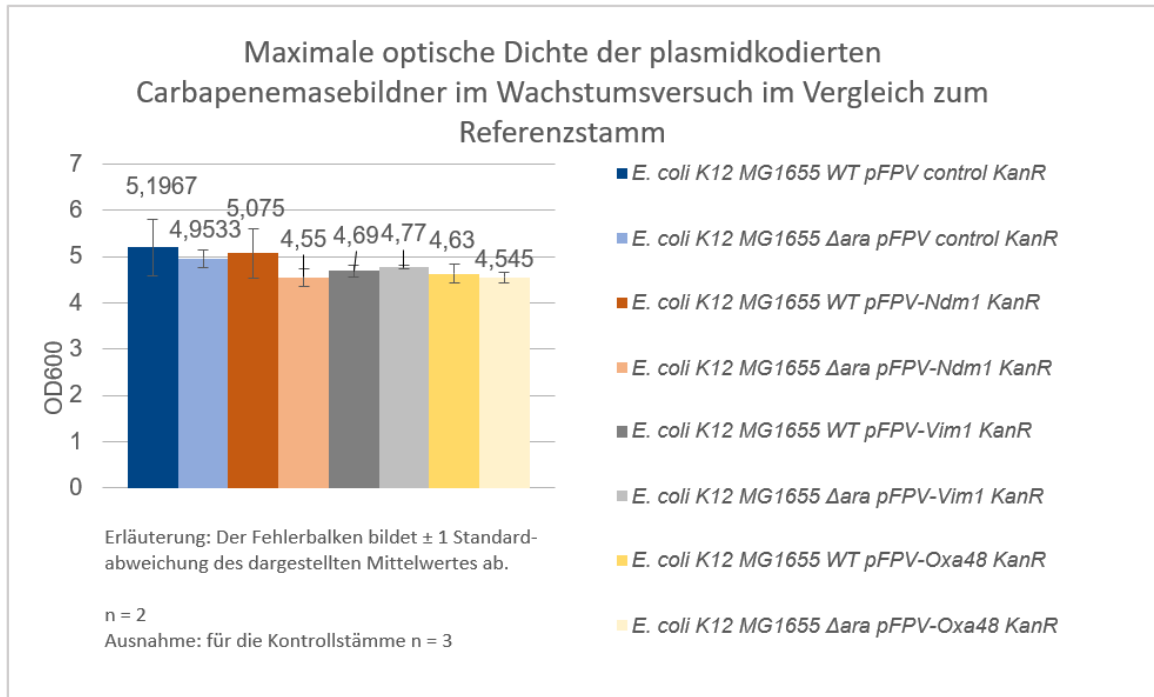


Abbildung 21 Maximale optische Dichte der plasmidkodierte Carbapenemasebildner getrennt nach Stämmen mit und ohne Δara (oben) sowie gepoolt (unten)

Zur weiteren Charakterisierung wurde als weiterer Teilaspekt der Fitness eines Bakteriums die Vitalität untersucht. Dies erfolgte ergänzend, da bei der maximalen optischen Dichte nicht zwischen vitalen und toten Bakterien unterschieden werden kann. Die Varianz der Testergebnisse ist trotz mehrfacher Durchführung sehr hoch. Die Ergebnisse sind in Abbildung 22 für Rekombinante und in Abbildung 23 für plasmidkodierte Stämme dargestellt. Bei den Rekombinanten scheint Vim1 weniger Einfluss auf die Vitalität zu haben als Ndm1 und Oxa48. Bei den plasmidkodierte Carbapenemasebildnern zeigen die

Ergebnisse

Stämme mit Vim1 und Oxa48 eine verminderte Vitalität.

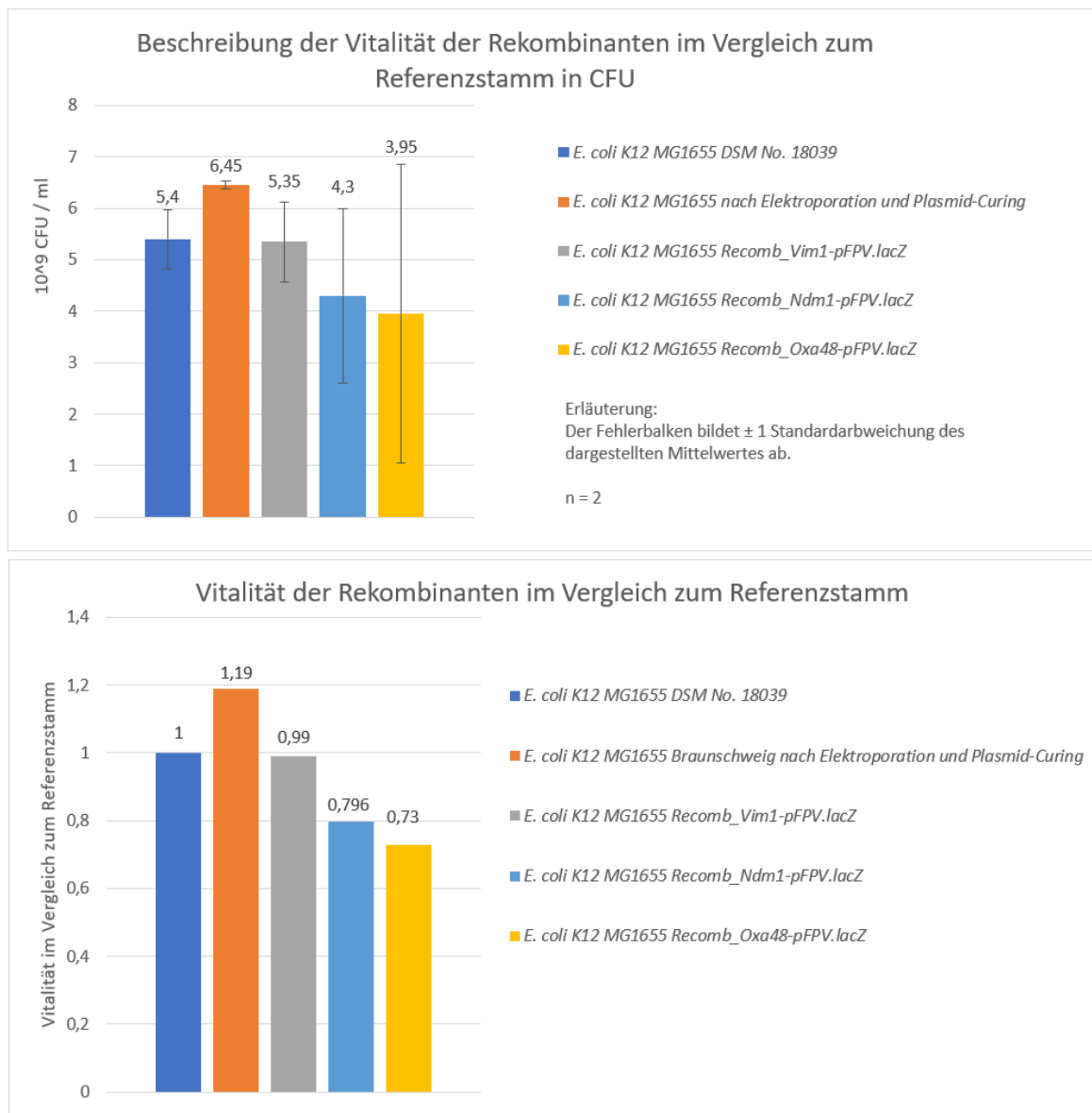


Abbildung 22 Vitalität der Rekombinanten in Absolutwerten (oben) und als Relativangabe (unten)

Ergebnisse

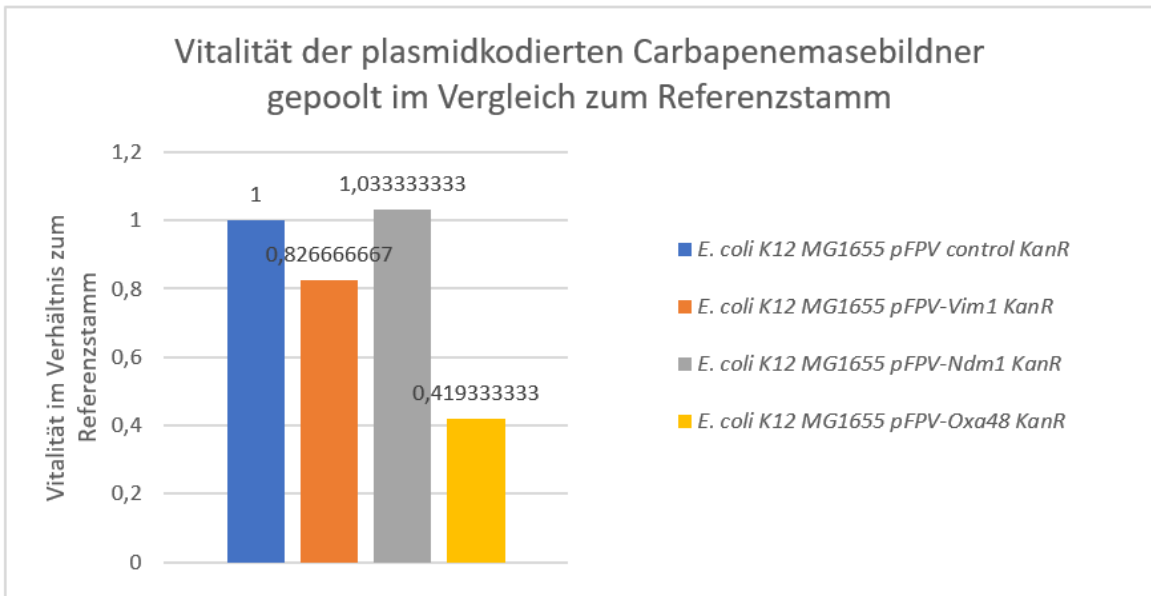
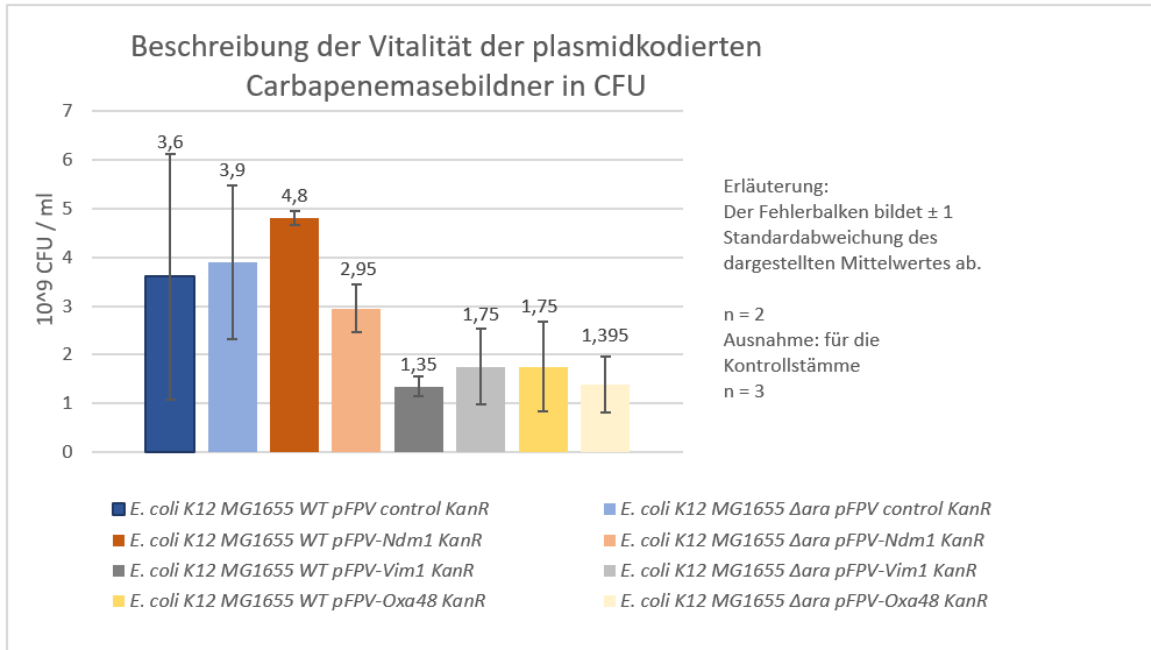
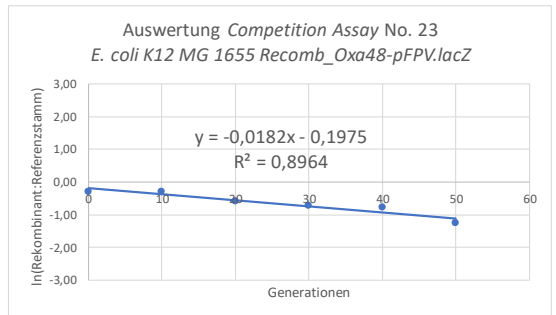
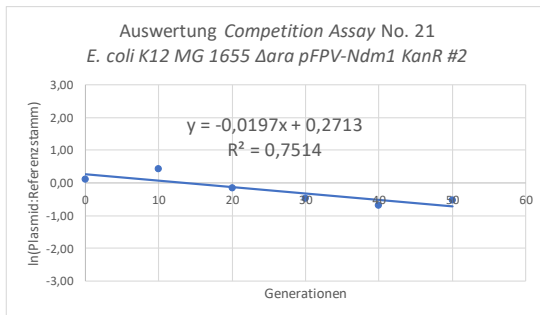
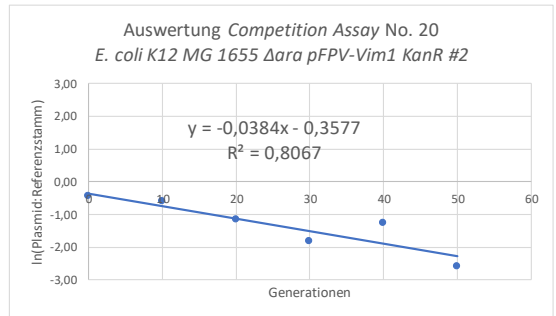
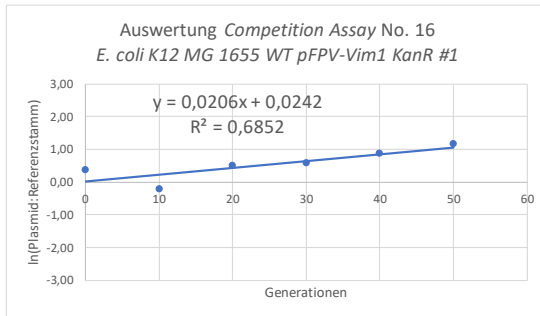
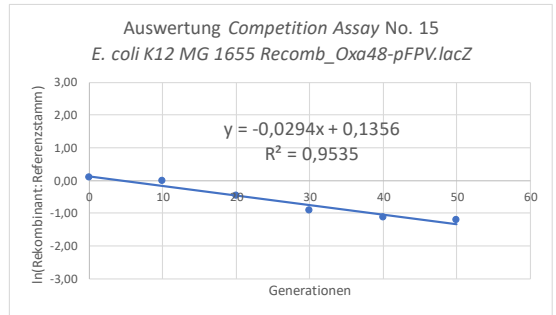
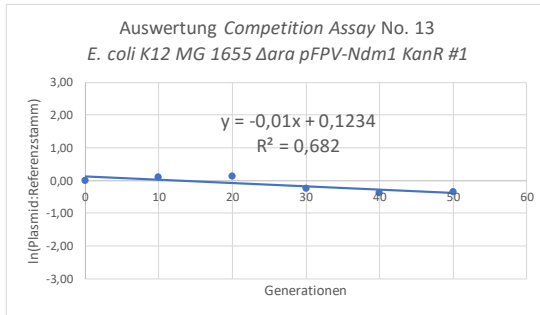
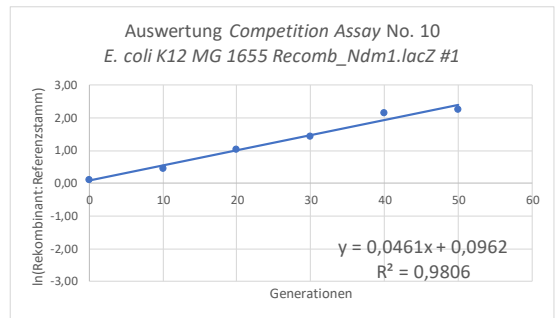
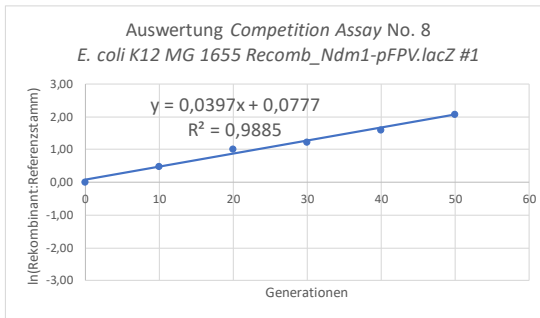
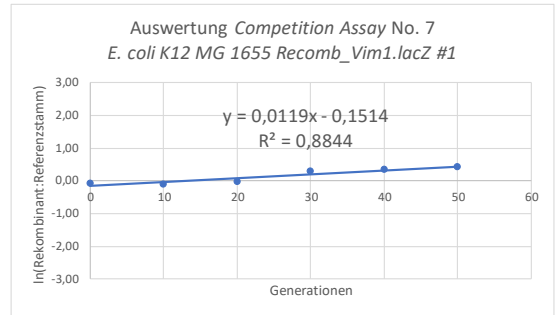
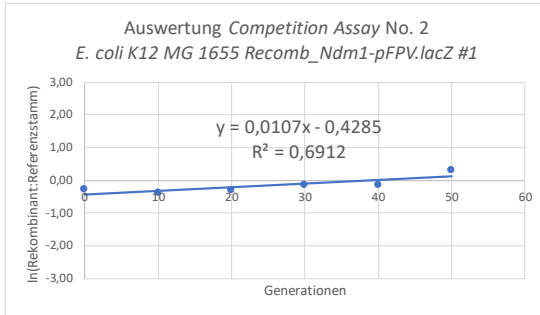


Abbildung 23 Vitalität der plasmidkodierte Carbapenemasebildner getrennt nach Stämmen mit und ohne Δ ara in Absolutwerten (oben) und gepoolt als Relativangabe (unten)

3.3 Untersuchung von Fitnessunterschieden

Zur Auswertung der *Competition Assays* wurde ein Cut-off Wert von 0,6 des Bestimmtheitsmaßes R gewählt. Die *Competition Assays* mit dem Expressionsplasmid pFPV-Oxa48 werden als nicht auswertbar angesehen, da sich das Bestimmtheitsmaß R nur in einem der Fälle oberhalb des Cut-off Wertes von 0,6 befindet. Abbildung 24 stellt die Ergebnisse der *Competition Assays* mit einem $R > 0,6$ dar.

Ergebnisse



Ergebnisse

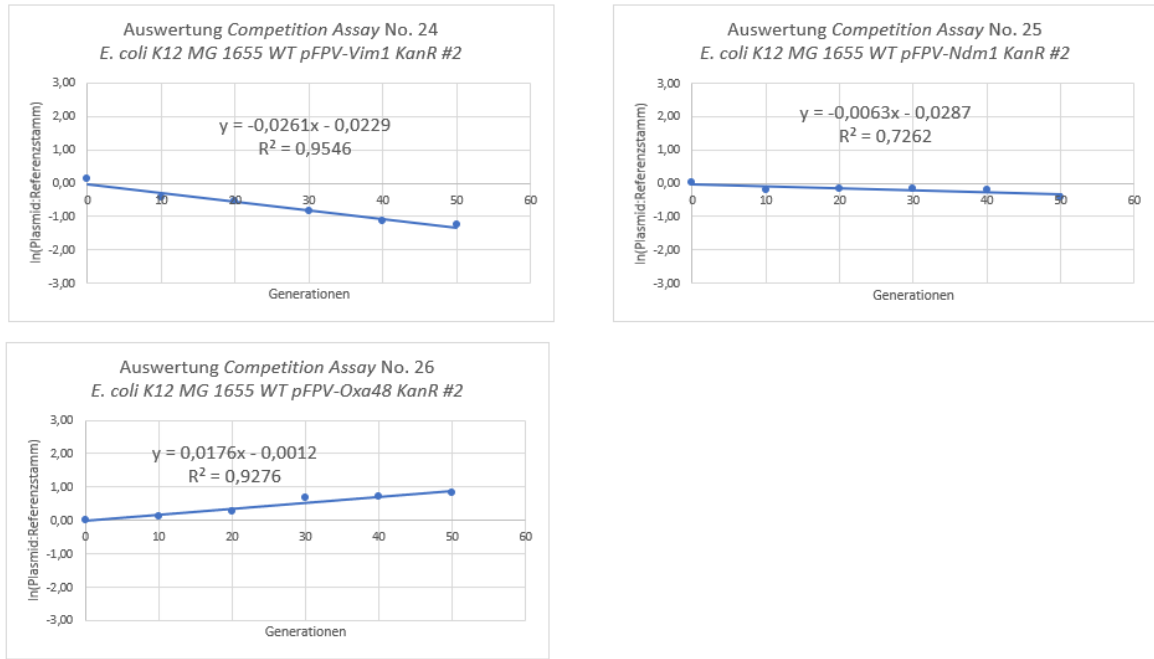


Abbildung 24 Logarithmische Auftragung der *Competition Assays*

Die reproduzierbaren Ergebnisse mit einem hohen Bestimmtheitsmaß R der Durchführungen mit *E. coli K12 MG1655 Recomb_Oxa48-pFPV.lacZ* untermauern die grundsätzliche Konfidenz des *Competition Assays* in seinem Aufbau und seiner Durchführung.

Die Ergebnisse der *Competition Assays* zeigen, dass die Deletion Δara keinen Einfluss auf die Selektionskoeffizienten hat, wie die vergleichende Betrachtung der Stämme mit und ohne Deletion Δara mit dem Expressionsplasmid pFPV-Ndm1 in Abbildung 25 exemplarisch zeigt.

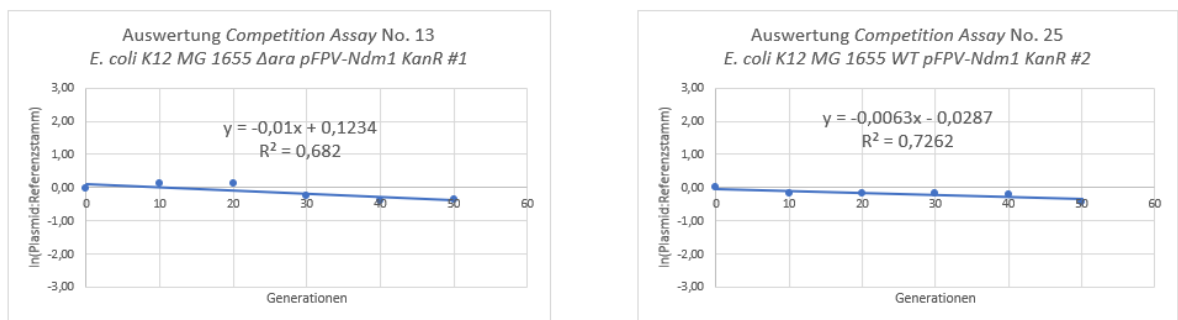


Abbildung 25 Vergleichende Betrachtung der Stämme mit und ohne Deletion Δara mit dem Expressionsplasmid pFPV-Ndm1

Es werden daher für die Auswertung die Ergebnisse für die jeweiligen Expressionsplasmide aus den gegenläufigen Versuchen mit *E. coli K12 MG1655 Δara* und *E. coli K12 MG1655 WT* zusammengefasst, um eine bessere Aussagekraft für die Selektionskoeffizienten einer Carbapenemase zu erreichen.

Ergebnisse

In den *Competition Assays* mit dem Expressionsplasmid pFPV-Ndm1 liegen 3 Versuche oberhalb des Cut-off Wertes. Es zeigt sich eine deutliche Variabilität zwischen den als isogen angenommenen Klonen. Diese Variabilität innerhalb eines Klons ist reproduzierbar. Die *Competition Assays* mit pFPV-Vim1 zeigen ebenfalls eine starke individuelle Komponente. Die Gegenüberstellung von als isogen angenommenen Klonen ist in Abbildung 26 zu sehen.

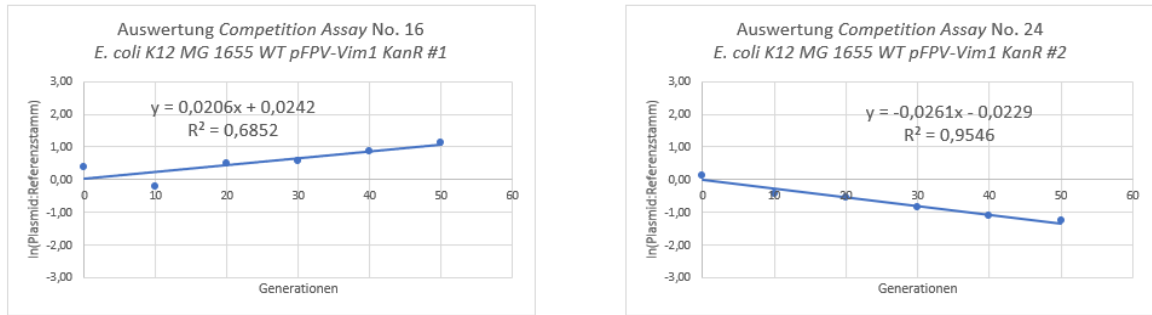


Abbildung 26 Vergleichende Betrachtung zur Verdeutlichung interindividueller Unterschiede beispielhaft zwischen den Klonen *E. coli* K12 MG1655 WT pFPV-Vim1 KanR #1 und #2

Im Zuge der statistischen Aufarbeitung und Auswertung der *Competition Assays* wurden zu jedem Versuch die Selektionskoeffizienten s berechnet. Ein negativer Wert bedeutet einen Fitness-Nachteil, ein positiver Wert einen Fitness-Vorteil. Der Selektionskoeffizient wird pro Generation angegeben. Die Ergebnisse sind in Tabelle 36 dargestellt.

Tabelle 36 Selektionskoeffizienten basierend auf den linearen Trendlinien der *Competition Assays*

Bakterienstamm	Selektionskoeffizient		Effekt
<i>E. coli</i> K12 MG1655 Recomb_Vim1.lacZ	+ 0,0119		Fitness-Vorteil
<i>E. coli</i> K12 MG1655 Recomb_Ndm1.lacZ	+ 0,04		Fitness-Vorteil
<i>E. coli</i> K12 MG1655 Recomb_Ndm1-pFPV.lacZ	+ 0,01	+ 0,0397	Fitness-Vorteil
<i>E. coli</i> K12 MG1655 Recomb_Oxa48-pFPV.lacZ	- 0,0294	- 0,0182	Fitness-Nachteil
<i>E. coli</i> K12 MG1655 WT pFPV-Vim1 KanR	+ 0,0206	- 0,0261	
<i>E. coli</i> K12 MG1655 Δ ara pFPV-Vim1 KanR	- 0,0384		Fitness-Nachteil
<i>E. coli</i> K12 MG1655 WT pFPV-Ndm1 KanR	- 0,0063		Fitness-Nachteil
<i>E. coli</i> K12 MG1655 Δ ara pFPV-Ndm1 KanR	- 0,01	- 0,197	Fitness-Nachteil
<i>E. coli</i> K12MG1655 WT pFPV-Oxa48 KanR	+ 0,0176		Fitness-Vorteil

Ergebnisse

Bei der Berechnung zeigt sich, dass die Rekombinanten mit Vim1 sowie Ndm1 unabhängig vom Promotor und somit der Expressionsstärke entgegen den Erwartungen sogar einen Fitness-Vorteil gegenüber dem Referenzstamm haben. Die Rekombinanten mit Oxa48 unter pFPV-Promotor haben einen Fitness-Nachteil gegenüber dem Referenzstamm, was sich an den negativen Selektionskoeffizienten erkennen lässt. Unter den plasmidkodierten Carbapenemasebildnern haben die Plasmide mit Vim1 und Ndm1 einen Fitness-Nachteil. Hingegen hat hier der Stamm mit dem Oxa48-Plasmid einen Vorteil in Bezug auf die Fitness.

3.4 Bakterienpools aus verschiedenen Klonen

Da sich in den vorangegangenen Experimenten zeigte, dass sich teils starke interindividuelle Unterschiede in einzelnen Klonen eines Bakterienstammes finden lassen, wurde anschließend mit Pools aus mehreren Klonen gearbeitet. Es erfolgte die Transformation der Expressionsplasmide pFPV-Oxa48, pFPV-Vim1 und pFPV-Ndm1 in *NEB Express Iq Competent E. coli*. Als Kontrollstamm diente *NEB Express Iq Competent E. coli pFPV-control*. Durch Zusatz von 30 µg/ml Kanamycin wurde sichergestellt, dass das Expressionsplasmid mit der enthaltenen Resistenzkassette in den Bakterien vorhanden ist. Bei Wachstum in Über-Nacht-Kulturen mit 0,25 µg/ml Ertapenem wurde die Expression einer Carbapenemase angenommen. Aus den als positiv, das heißt resistent gegenüber Kanamycin und Ertapenem, getesteten Klonen wurde ein Pool aus 20 Einzelkolonien hergestellt. Für Ndm1 konnten insgesamt 2 solcher Pools, für Vim1 einer angefertigt werden. Diese Pools wurden für Wachstumsversuche zur Bestimmung der Verdopplungszeit eingesetzt. Die Verdopplungszeiten werden in Tabelle 37 aufgeführt.

Tabelle 37 Verdopplungszeiten *NEB Express Iq Competent E.coli* mit Expressionsplasmiden

Bakterienpool	Verdopplungszeit in min (Mittelwert, n=4)	Standardabweichung
<i>E. coli NEB Express Iq Competent pFPV-control KanR</i>	29,43	1,22
<i>E. coli NEB Express Iq Competent pFPV-Oxa48 KanR</i>	32,67	1,99
<i>E. coli NEB Express Iq Competent pFPV-Vim1 KanR</i>	30,55	2,72
<i>E. coli NEB Express Iq Competent pFPV-Ndm1 KanR</i>	28,79	1,70

Das Expressionsplasmid mit Ndm1 hat einen positiven Effekt auf die Verdopplungszeit im Vergleich zum Referenzstamm. Die Bakterienpools mit Vim1 und Oxa48 haben eine längere Verdopplungszeit als der Referenzstamm, wobei dieser Effekt bei Oxa48 ausgeprägter ist als bei Vim1.

Im Anschluss wurde zur Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration ein E-Test mit Ertapenem durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 38 aufgeführt.

Tabelle 38 Mittels E-Test bestimmte MHK für Ertapenem von *NEB Express Iq Competent E. coli* mit Expressionsplasmiden

Bakterienpool	MHK für Ertapenem
<i>E. coli NEB Express Iq Competent pFPV-Oxa48 KanR</i>	0,5 µg/ml
<i>E. coli NEB Express Iq Competent pFPV-Vim1 KanR</i>	0,6 µg/ml
<i>E. coli NEB Express Iq Competent pFPV-Ndm1 KanR</i>	20 µg/ml

Die minimale Hemmkonzentration für Ertapenem betrug beim Expressionsplasmid pFPV-Oxa48 0,5 µg/ml, für pFPV-Vim1 0,6 µg/ml und für pFPV-Ndm1 20 µg/ml. Der Faktor zwischen Oxa48 und Ndm1 beträgt 40.

4 Diskussion

Um den Einfluss von Carbapenemasen auf die bakterielle Fitness systematisch zu untersuchen, wurde in dieser Arbeit sowohl mit Stämmen gearbeitet, die die Carbapenemasegene durch Recombineering stabil in das Chromosom eingebaut hatten, als auch mit Stämmen, die plasmidkodierte Carbapenemasen exprimierten. Beim Recombineering erfolgte nach erfolgreicher Rekombination ein *plasmid-curing*, um die verwendeten pSIM9 Helferplasmide zu entfernen. Dies ist notwendig, damit die Resistenz, die in den folgenden MHK-Bestimmungen gemessen wird, sicher auf eine Kopie des Carbapenemresistenzgenes zurückzuführen ist. Auf diese Weise können die Effekte einzelner Carbapenemasen miteinander verglichen werden. In den Versuchsreihen mit plasmidkodierten Carbapenemasen wurden die Expressionsplasmide in *E. coli* Stämme mit und ohne Deletion im *ara* locus eingebracht. Dies erlaubte eine einfache Unterscheidung zwischen den Kolonien zweier Stämme in *Competition Assays*, da Δ ara Stämme auf Agar mit zugesetzter Arabinose als Substrat und TTC als Farbindikator als rote Kolonien imponieren. Der Wildtyp dagegen bildet weiße Kolonien, da Arabinose abgebaut werden kann.

Da sich zwischen den theoretisch identischen Klonen der hergestellten Zielstämme in den *Competition Assays* zum Teil deutliche Unterschiede zeigten, wurde in einer weiteren Versuchsreihe mit Klonpools aus mehreren Einzelkolonien gearbeitet. Mit diesen Klon-Pools waren die Ergebnisse reproduzierbar und bezogen auf ein Expressionsplasmid auch vergleichbar unter zwei Klon-Pools.

Es zeigte sich ein deutlicher Unterschied zwischen den Zielstämmen bezüglich der phänotypisch ausgebildeten Carbapenemresistenz gemessen an der minimalen Hemmkonzentration. Für rekombinante Zielstämme war die MHK deutlich niedriger als bei plasmidkodierten Carbapenemasebildnern. Einerseits unterscheiden sich die minimalen Hemmkonzentrationen, die die einzelnen Carbapenemasegene im ansonsten identischen genetischen Hintergrund vermitteln. Andererseits scheint der Promotor eine wichtige Rolle bezogen auf das Ausmaß der phänotypischen Resistenzausbildung zu haben. Der *lacZ*-Promotor scheint eine wesentlich schwächere Expression erzielen zu können als der pFPV-Promotor. Dazu passend ist in der Literatur beschrieben, dass Carbapenemasen eine geringe Expression haben können und dadurch nur gering erhöhte MHKs aufweisen (Bartolini et al. 2014). IPTG als Induktor des *lacZ* locus hatte in den durchgeführten Versuchen keine Auswirkungen auf die Expression von Carbapenemasen unter Kontrolle des *lacZ*-Promotors. Auch die minimale Hemmkonzentration, die ein Carbapenemasegen

Diskussion

vermittelt, war abhängig vom Bakterienstamm. In unterschiedlichen Bakterienstämmen variierte der Anstieg der minimalen Hemmkonzentration durch die Carbapenemase zwischen 1,3- und > 2.500-fach. Grundsätzlich wurde in der Literatur beschrieben, dass KPC zu einer gering ausgeprägten Carbapenemresistenz führt (Anderson et al. 2007). Insbesondere bei KPC-Enzymen wurde beschrieben, dass die Kombination von KPC mit weiteren zellulären Veränderungen wie dem Verlust von Porinen die minimale Hemmkonzentration stark erhöht (Anderson et al. 2007). Die MHK-Erhöhung begründet sich also nicht alleinig auf die Carbapenemase, sondern manifestiert sich in klinisch relevantem Maße unter Umständen erst durch Kombination mit weiteren Mutationen und zellulären Veränderungen. Adler et al. (2013) untersuchten die Resistenzentwicklung in *E. coli*. *E. coli* kann durch verminderte Expression von Porinen und erhöhte Expression von Betalaktamasen eine verminderte Suszeptibilität für Carbapeneme entwickeln. Der vollständige Verlust der Porine entspricht einer Reduktion der Fitness von 20 %. Das bedeutet, dass nur Mutationen, die die Porinexpression bis zu einem gewissen Grad vermindern, einen Überlebensvorteil in einer natürlichen Umgebung haben, nicht jedoch solche, die Porine vollständig verlieren. Erhöhte Expression der Betalaktamasen durch spontane Genamplifikation auf dem Plasmid wird als ein häufiger Faktor für eine erhöhte Resistenz beschrieben.

Bartolini et al. (2014) beschrieb ebenfalls, dass dieselbe Carbapenemase in unterschiedlichen Bakterienspezies bezogen auf das gleiche Carbapenem eine unterschiedliche MHK vermittelt. Die vermittelte MHK unterscheidet sich ebenfalls in Abhängigkeit von dem betrachteten Carbapenem. Eine Steigerung der MHK ist durch das gleichzeitige Vorliegen von zwei Carbapenemasen möglich. Die Autoren weisen darauf hin, dass die MHK der Wildtyppopulation ebenfalls sehr variabel ist. Sood (2014) untersuchte Isolate von *K. pneumoniae*. Zwischen 5 und 10 % dieser Isolate können Metallobetalaktamasen und KPC gleichzeitig exprimieren.

Grundsätzlich kann sich eine reduzierte Fitness in einer verminderten Wachstumsrate oder Invasivität des Bakteriums äußern. Deshalb wurden die Zielstämme im Rahmen dieser Arbeit in verschiedenen Wachstumsversuchen auf Verdopplungszeit, Vitalität und maximale optische Dichte hin untersucht.

Lee et al. (2020) transformierten aus *K. pneumoniae* isolierte Resistenzplasmide mit Ndm1 und Oxa232 in *E. coli DH5-alpha*. Sie fanden heraus, dass Bakterien mit beiden Plasmiden eine verbesserte Fitness und Virulenz im Vergleich zum Ausgangsstamm besitzen. Plasmide und auch Resistenzgene können also sowohl negative als auch positive Effekte

Diskussion

auf die Fitness eines Bakteriums haben. Göttig et al. (2016) untersuchten hierzu die Effekte auf die Fitness eines Ndm1 tragenden Plasmids mit Hilfe von *Competition Assays* im Vergleich zum ansonsten isogenen Ausgangsstamm bei *E. coli* und *K. pneumoniae*. Es gab keine Unterschiede in der Wachstumskinetik. Allerdings konnten Defizite bezogen auf die Fitness bei Ndm1-tragenden Stämmen nachgewiesen werden. Dieser Effekt war bei *E. coli* ausgeprägter als bei *Klebsiella*. Auf Zytotoxizität oder Virulenz zeigte das Ndm1-Plasmid keinen Einfluss.

Betrachtet man die epidemiologische Fitness von Bakterien kommt diese zu Stande als Zusammenwirken von Wachstumsrate, Übertragungsfähigkeit, Selektion und Persistenz ohne Selektionsdruck (Sundqvist 2014). Im Rahmen dieser Dissertation konnte nur auf einen Teilaspekt dieses Zusammenspiels eingegangen werden.

In den durchgeführten *Competition Assays* zeigte sich teils nicht der erwartete negative Effekt auf die bakterielle Fitness. Zum Teil lag, wie bei den Rekombinanten, sogar ein positiver Selektionskoeffizient vor.

Dieses Phänomen wurde ebenfalls in anderen experimentellen Studien beobachtet. Bei Hamprecht et al. (2019) hatte das für Resistenzbildung ausschlaggebende, nachgewiesene Plasmid mit Oxa48 keinen Einfluss auf Wachstum oder Fitness der Bakterien. Di Luca et al. (2017) haben Plasmide mit KPC2 und Vim1 aus *K. pneumoniae* in *E. coli* transformiert. In *Competition Assays* fand man eine geringe bis moderate Reduktion der Fitness in den plasmidtragenden Stämmen. Interessanterweise waren die Auswirkungen des gleichen KPC2-Plasmids in verschiedenen genetischen Stämmen unterschiedlich ausgeprägt. Die Effekte von Vim1 auf die bakterielle Fitness waren in allen getesteten Stämmen identisch hoch. Überdies wurden unterschiedliche Effekte von KPC2 und Vim1 auf die Fitness bei gleichem genetischem Hintergrund beobachtet. Dies zeigt, dass die Effekte auf die Fitness eine Spezifität sowohl für das Plasmid als auch für das Bakterium zeigen.

In den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Wachstumsversuchen mit einem Klon-Pool konnte für Ndm1 kein negativer Effekt auf die Fitness gezeigt werden. Die Verdopplungszeit war vergleichbar oder sogar kürzer als die des Referenzstamms mit dem Kanamycin-Kontrollplasmid. In der Literatur ist eine Studie zu finden, in der Ndm5 und MCR1 aus klinischen Isolaten in Transkonjugaten auf ihre Fitness hin untersucht wurden. Es bestand kein messbarer Effekt (Zhang et al. 2017).

In den durchgeführten Experimenten im Rahmen dieser Dissertation ist die alleinige Existenz einer Carbapenemase untersucht worden. Wie bereits in der Einleitung erläutert, besitzen die meisten Carbapenemasebildner in der natürlichen Umgebung jedoch eine

Diskussion

Vielzahl weiterer Resistenzen. Hier besteht potenziell die Möglichkeit für eine Vielzahl an negativen Effekten, da durch mehrere sich nachteilig auf die Fitness auswirkende Genexpressionen die Kompensationsmechanismen ebenfalls interferieren können. Möglich wäre auch ein positiver Effekt auf die Fitness durch multiple Mutationen mit positivem Gesamteffekt. Für *Mycobacterium tuberculosis* konnte gezeigt werden, dass Multiresistenz mit negativen Auswirkungen auf die Fitness einhergeht (Kodio et al. 2019). Zu Bedenken ist ebenfalls, dass nach dem Beimpfen statischer Bakterien in frisches Medium es zunächst eine Verzögerungsphase gibt, in der sich die Bakterien an die veränderten Wachstumsbedingungen anpassen. Dabei werden Bakterien selektiert, die sich schneller an neue Umweltbedingungen anpassen können. Es folgt dann die exponentielle Wachstumsphase, welche anhält, bis ein Bestandteil des Mediums sich limitierend auswirkt. In dieser Phase werden Bakterien selektiert, die sich bei optimalen Wachstumsbedingungen schneller teilen als andere (Dykhuisen 2003). Diese Selektionsprozesse könnten die Ergebnisse aus den *Competition Assays* beeinflussen. Interessanterweise wurde in der Literatur auch beschrieben, dass der in Wachstumsversuchen erzeugte Selektionsdruck ebenfalls zu einer Weitergabe von Expressionsplasmiden führen kann (Sundqvist 2014). Diese Möglichkeit wurde in den im Rahmen dieser Dissertation durchgeführten *Competition Assays* nicht weiter untersucht. In der Literatur wurde beschrieben, dass Bakterien nachteilige Auswirkungen auf ihre Fitness durch Akquirieren weiterer kompensatorischer Mutationen ausgleichen können (Durão et al. 2018). Möglich ist deshalb auch, dass durch die Carbapenemase negative Effekte auf die Fitness entstehen, die schnell durch weitere kompensatorische Mutationen ausgeglichen werden und deshalb nicht konstant bestehen bleiben oder in den durchgeführten Versuchen nicht messbar sind. In einem weiterführenden Schritt könnte zur weiteren Charakterisierung eine Genomsequenzierung des Bakteriums unmittelbar nach Einbringen der Carbapenemase mit einem Stadium nach mehreren Generationen verglichen werden und gezielt nach Mutationen oder Kompensationsmechanismen gesucht werden. Agashe et al. (2016) beschrieben hierzu, dass es dem Bakterium *Methylobacterium extorquens* nach entstandenen negativen Effekten auf seine Fitness unter Laborbedingungen durch vorteilhafte Punktmutationen gelang, seine vorherige Fitness wiederherzustellen.

Effekte auf die Fitness können nicht nur durch Mutationen ausgeglichen werden. Die Expressivität des mutierten Proteins kann negative Effekte maskieren, indem beispielsweise ein mutiertes Protein vermehrt gebildet wird und so den Funktionsnachteil

Diskussion

im Vergleich zum Wildtyp-Protein ausgleicht. Untersucht wurde dies am Beispiel von *hisA* in *Salmonella enterica*. Die Auswirkungen auf die Fitness werden dadurch beeinflusst, inwieweit das Protein limitierend für die Wachstumsrate ist (Lundin et al. 2018). Der Fitnessseffekt einer Mutation wird also beeinflusst von weiteren Mutationen. Resistente Bakterien akquirieren zusätzliche vorteilhafte Mutationen, die selbst keinen Einfluss auf die Resistenz haben, jedoch die Fitnessseffekte anderer Mutationen beeinflussen. Dies wurde auch für plasmidkodierte Resistenzen beschrieben (Angst und Hall 2013). Mutationen, die eine Antibiotikaresistenz vermitteln, sind typischerweise in der Abwesenheit des entsprechenden Antibiotikums mit negativen Auswirkungen auf die bakterielle Fitness verbunden. Moura de Sousa et al. (2017) beschreiben, dass sich durch genetische Interaktion die Kompensation eines einfach resistenten Stammes grundlegend von der Kompensation eines multiresistenten Stammes unterscheidet. Sie berichten, dass multiresistente Stämme ihre Nachteile bezüglich ihrer Fitness schneller ausgleichen. Die Autoren vermuten, dass möglicherweise genetische Interaktionen zwischen verschiedenen Resistenzmutationen, die zu einer deutlichen Verringerung der Fitness führen, alternative Wege für eine schnellere kompensatorische Anpassung ermöglichen. Diese Kompensationsmechanismen könnten Multiresistenzen mit großem Einfluss auf die Fitness in Bakterienpopulationen stabilisieren.

Mutationen treten ununterbrochen auf. Die Fähigkeit, direkt nach bestimmten Phänotypen zu selektieren - in diesem Fall die Kanamycinresistenz - und die PCR-Bestätigung, kann auch zur Detektion von Mutanten ohne funktionelle Expression des gesuchten Gens führen. Bei Baba et al. (2006) wurden beispielsweise Mutanten mit einem mutierten Suppressor des Gens beschrieben.

Im Rahmen der Dissertation wurden zur MHK-Bestimmung einerseits Verdünnungsreihen mit Ertapenem in Flüssigkultur und andererseits E-Tests mit Ertapenem durchgeführt. Die Tests ergaben vergleichbare Ergebnisse. Dagegen haben E-Tests mit Imipenem eine geringere Spezifität, sodass auch Stämme ohne Carbapenemase als positiv getestet wurden. Andererseits wiesen auch Bakterien, die im E-Test unauffällig waren, in der PCR-Analyse einen positiven Befund auf. Die von den Autoren angenommene Erklärung ist eine schwache Genexpression der Carbapenemase (El-Ageery und Al-Hazmi 2014). In einer weiteren Studie wird die Testung auf Carbapenemempfindlichkeit mit Ertapenem erneut als sensitiver gegenüber der Testung mit Meropenem oder Imipenem bewertet (Anderson et al. 2007). Eine mögliche andere Ursache für eine verminderte Expression der getesteten Carbapenemasen kann sein, dass die Gene nicht in ihrem ursprünglichen genetischen

Diskussion

Kontext getestet wurden. Zum Beispiel liegt KPC meist plasmidkodiert vor und kommt in Klebsiellen und *Pseudomonas aeruginosa* vor (Sawa et al. 2020). Das Recombineering verändert die Umgebung des Gens durch Integration in die chromosomale DNA. Außerdem wurde im Rahmen der Dissertation das Enzym in *E. coli* getestet, nicht in den Bakterienspezies, in denen es am häufigsten in klinischen Isolaten beobachtet wird. Dies mag einen Einfluss auf Expression, Funktionalität und Wechselwirkungen haben. Der überwiegende Teil der Forschung im Bereich der Plasmide wurde an kleinen, synthetisch hergestellten Plasmiden mit standardisierten Laborbakterienstämmen durchgeführt. Dies trifft auch für die im Rahmen dieser Dissertation durchgeführten Experimenten zu. Buckner et al. (2018) fanden in diesem Fall heraus, dass nach Einbringen solcher synthetisch hergestellter Plasmide Mutationen sowohl der chromosomalen DNA als auch der Plasmid-DNA auftraten, um daraus entstehende negative Effekte auf die Fitness zu kompensieren. Dahingegen zeigten Klebsiellen nach Transfektion mit einem natürlich vorkommenden, großen Plasmid, keinerlei genomische Veränderungen. Die kompensatorischen Anpassungen der Bakterien auf dieses Plasmid erfolgten durch eine veränderte Genexpression. Die Autoren gehen davon aus, dass die veränderte Genexpression wahrscheinlich ausreichend war, die durch das Plasmid entstandenen nachteiligen Effekte bezüglich der Fitness wieder auszugleichen. Diese aus klinischen Isolaten gewonnenen großen Plasmide wurden auch ohne Selektionsdruck behalten.

Unter der Annahme, dass bei einer Antibiotikaresistenz Nachteile dadurch entstehen, dass der jeweilige Resistenzmechanismus aufrechterhalten werden muss, sollte der Wildtyp die resistenten Bakterien in einer antibiotikafreien Umgebung verdrängen. Die klinische Erfahrung zeigt jedoch, dass dieser Vorgang nur sehr langsam vor sich geht und teils ganz unterbleibt. Die Autoren sehen an diesem zunächst unerwarteten Trend unter anderem Regulationen beteiligt, die die Expression der Resistenzgene in der Abwesenheit des entsprechenden Antibiotikums unterdrücken (Hernando-Amado et al. 2017; Wang et al. 2019). Im Umkehrschluss kann der Zusatz eines Induktors helfen, durch negative Effekte auf die Fitness, die Verdrängung resistenter Bakterien zu beschleunigen (Wang et al. 2019). Außerdem bleibt zu bedenken, dass bereits subklinische Antibiotikaresten in der Umwelt zur Persistenz von Antibiotikaresistenzen in Bakterienpopulationen beitragen können (Sundqvist 2014). Manche Stämme scheinen dennoch Resistenzplasmide ohne Nachteile bezogen auf die Fitness behalten zu können. Dunn et al. (2019) beschrieben, dass dies durch kompensatorische Mutationen und Gene, die für den anaeroben Stoffwechsel benötigt werden, beeinflusst wird. Manche Plasmide haben außerdem Mechanismen

Diskussion

entwickelt, welche die Weitervererbung in Tochterzellen kontrollieren und Tochterzellen ohne das Plasmid zerstören. Dies führt dazu, dass Plasmide auch unabhängig vom Selektionsdruck beibehalten werden (Carattoli 2009). Ähnliches untersuchte auch Dutta (2013). Sie beschrieb, dass Mutanten oft weitere Mutationen akquirieren, die die entstandenen negativen Auswirkungen auf die Fitness kompensieren. Durch die Vorteile über die Antibiotikaresistenz hinaus wird auch die Antibiotikaresistenz ohne Selektionsdruck persistieren. In der Studie wurden *Competition Assays* mit antibiotikaempfindlichen *Salmonella typhi* und labortechnisch hergestellten Resistenten über 15 Tage durchgeführt. Ein Teil der Mutanten konnte den sensiblen Stamm verdrängen. Daraus wurde gefolgert, dass einige Mutanten unabhängig vom Vorteil der Antibiotikaresistenz auch Wachstumsvorteile in einer antibiotikafreien Umgebung hatten. Die Autoren geben zu bedenken, dass eine direkte Übertragung von diesen Laborstämmen auf Wildstämmen nicht gegeben sein muss.

Lin et al. (2018) postulieren, dass sich Antibiotikaresistenz durch eine chromosomale Mutation häufig nachteilig auf die bakterielle Fitness auswirkt. In ihrer Studie untersuchten sie rifampicinresistente Stämme im Vergleich zu Wildtyp-Bakterien. Unter optimalen Wachstumsbedingungen war der Wildtyp überlegen. Bei schlechteren Wachstumsbedingungen waren die Unterschiede der Fitness geringer ausgeprägt. Insbesondere die Differenz in der metabolischen Aktivität zwischen resistentem Stamm und Wildtyp war bei schlechten Wachstumsbedingungen signifikant geringer. Die Autoren folgern, dass suboptimale Wachstumsbedingungen durch die Reduktion der Fitnessunterschiede dazu beitragen, dass resistente Bakterienstämme persistieren. Ebenso sehen Agashe et al. (2016) die Beziehung zwischen Antibiotikaresistenz und Wachstumsfitness als ein umstrittenes Thema. Sie zeigten, dass einige Mutationen, die zu einer Antibiotikaresistenz führen, *in vitro* eindeutig messbar negativen Einfluss auf die Fitness haben. Es wird jedoch kritisch darauf hingewiesen, dass die Übertragung *in vivo* dagegen nicht unveränderlich möglich ist. Als möglichen Grund führen die Autoren an, dass Fitness-Effekte *in vitro* zumeist in nährstoffreichen Medien und unter optimalen Wachstumsbedingungen demonstriert wurden. *In vivo* sind Pathogene jedoch oftmals mit Mangelzuständen von Sauerstoff, Eisen, Kohlenstoff und Phosphat konfrontiert. In der vorliegenden Studie wurde die Fitness von rifampicinresistenten Bakterien mit *rpoB* (*RNA polymerase beta subunit*)-Mutation untersucht. Die Fitnesskosten wurden in *E. coli* unter optimalen Wachstumsbedingungen und vier unterschiedlichen Nährstoffangeboten untersucht. Unter optimalen Wachstumsbedingungen hatten die Resistenten eine stark

Diskussion

verminderte Fitness, wohingegen bei schlechteren Wachstumsbedingungen die Mutationen neutrale oder sogar positive Effekte auf die Fitness der Bakterien zeigten. Als Résumé ziehen die Autoren, dass Effekte auf die Fitness unter Einbezug der klinischen Umwelt beurteilt werden sollten (Maharjan und Ferenci 2017).

5 Zusammenfassung

Klinisch sind Antibiotikaresistenzen ein wichtiges Thema. Carbapeneme gehören zu den wichtigen klinischen Reserveantibiotika, die schweren Infektionen und kritisch kranken Patienten vorbehalten sind. Eine Carbapenemresistenz kann durch die eingeschränkten Therapiemöglichkeiten zu letal verlaufenden Infekt komplikationen führen.

Die Effekte einer Antibiotikaresistenz auf die bakterielle Fitness werden in der gegenwärtigen Literatur kontrovers diskutiert. Es wird grundsätzlich davon ausgegangen, dass Antibiotikaresistenzen mit Effekten auf die Fitness einhergehen. Diese sind *in vitro* zum Großteil als negative Effekte beschrieben worden.

Die vorliegende Dissertation befasst sich mit den Effekten der unterschiedlichen Carbapenemasen Vim1, Ndm1 und Oxa48 auf die bakterielle Fitness.

Zur Untersuchung der Fitness wurden verschiedene Ziel-Stämme mit definierten Antibiotikaresistenzen in *E. coli* Bakterien hergestellt. Die Carbapenemasen Vim1, Ndm1 und Oxa48 wurden mittels einer gentechnischen Methode, dem Recombineering, in einen definierten Ort in die chromosomale bakterielle DNA integriert, wobei als Ziel-DNA-Abschnitt der lacZ locus gewählt wurde. Eine Gruppe von Ziel-Stämmen wurde mit einem externen starken Promotor, dem pFPV-Promotor, in den lacZ locus integriert. Eine zweite Gruppe Ziel-Stämme unterstand der Regulation des schwächeren, endogenen lacZ Promotors. Außerdem wurden Expressionsplasmide mit Vim1, Ndm1 und Oxa48 im pFPV-Plasmid hergestellt und ebenfalls in *E. coli* Stämme transformiert.

Als Einzelaspekte der Fitness wurden die minimale Hemmkonzentration gegenüber Ertapenem, die Verdopplungszeit, die Wachstumskurve, die maximale optische Dichte und die Vitalität der Bakterien betrachtet.

Bei allen Rekombinanten war die Verdopplungszeit, unabhängig vom Carbapenemasegen, verlängert im Vergleich zum Referenzstamm. Bei den Plasmid-Stämmen war die Veränderung der Verdopplungszeiten abhängig vom Carbapenemasegen.

Die minimale Hemmkonzentration gegenüber Ertapenem war in Rekombinanten, bei denen die Carbapenemase unter Kontrolle des pFPV-Promotors stand, um den Faktor 10 bis 20 erhöht. Stämme, bei denen die Carbapenemase unter der Kontrolle des endogenen lacZ Promotors stand, zeigten eine unveränderte MHK gegenüber Ertapenem. Obwohl IPTG ein Induktor des lacZ locus ist, hatte es keinen Einfluss auf die gemessene MHK. Bei den plasmidkodierte Stämmen zeigte sich eine ausgeprägtere MHK-Erhöhung um den Faktor 250 bis 2.500.

Zusammenfassung

Die maximale optische Dichte war bei allen Bakterienstämmen im Vergleich zum jeweiligen Referenzstamm erniedrigt, unabhängig davon, ob es sich um rekombinante oder plasmidkodierte Stämme handelt.

Bezüglich der Vitalität lieferten Versuchsreihen die reproduzierbarsten Ergebnisse, bei denen nach erfolgreicher Transformation mit den Expressionsplasmiden ein Bakterienpool aus 10 bis 20 Kolonien gebildet wurden. Hierdurch wurden klonspezifische Abweichungen ausgeglichen. Mit dieser Methode konnten Effekte auf die Fitness, die abhängig von der jeweilig exprimierten Carbapenemase waren, nachgewiesen werden. Ndm1 Expression führte zu einer kürzeren Verdopplungszeit im Vergleich zum Referenzstamm, wohingegen Vim1 und Oxa48 Expression zu einer längeren Verdopplungszeit führten.

Zusammenfassend ist der Effekt der untersuchten Carbapenemasen abhängig von der Expressivität des Enzyms und beeinflusst durch den genetischen Kontext. Die Versuchsreihen zeigen, dass sich auch bei funktioneller Expression der Carbapenemase nicht zwingend ein nachteiliger Effekt auf die bakterielle Fitness ergeben muss. Dies unterstreicht die besondere Bedeutung eines besonnenen Antibiotikaeinsatzes, präventiver Maßnahmen gegen die Weiterverbreitung von Antibiotikaresistenzen und der Weiterentwicklung therapeutischer Optionen.

6 Literatur

- Albin OR, Patel TS, Kaye KS (2018): Meropenem-vaborbactam for adults with complicated urinary tract and other invasive infections. *Expert Rev Anti Infect Ther* 16, 865–876
- Anderson KF, Lonsway DR, Rasheed JK, Biddle J, Jensen B, McDougal LK, Carey RB, Thompson A, Stocker S, Limbago B, Patel JB (2007): Evaluation of methods to identify the *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase in Enterobacteriaceae. *J Clin Microbiol* 45, 2723–2725
- Andersson DI, Hughes D (2010): Antibiotic resistance and its cost: is it possible to reverse resistance? *Nat Rev Microbiol* 8, 260–271
- Angst DC, Hall AR (2013): The cost of antibiotic resistance depends on evolutionary history in *Escherichia coli*. *BMC Evol Biol* 13, 163
- Baba T, Ara T, Hasegawa M, Takai Y, Okumura Y, Baba M, Datsenko KA, Tomita M, Wanner BL, Mori H (2006): Construction of *Escherichia coli* K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: the Keio collection. *Mol Syst Biol* 2, 2006.0008
- Bartolini A, Frasson I, Cavallaro A, Richter SN, Palù G (2014): Comparison of phenotypic methods for the detection of carbapenem non-susceptible Enterobacteriaceae. *Gut Pathog* 6, 13
- Bou G, Vila J, Seral C, Castillo FJ (2014): Detection of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in various scenarios and health settings. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 32, 24–32
- Carattoli A (2009): Resistance Plasmid Families in Enterobacteriaceae. *Antimicrob Agents Chemother* 53, 2227–2238
- Durão P, Balbontín R, Gordo I (2018): Evolutionary Mechanisms Shaping the Maintenance of Antibiotic Resistance. *Trends Microbiol* 26, 677–691
- Dykhuisen D (2003): Experimental Studies Of Natural Selection In Bacteria. *Annu Rev Ecol Syst* 21, 373–398
- El-Ageery SM, Al-Hazmi SS (2014): Microbiological and molecular detection of VIM-1 metallo beta lactamase-producing *Acinetobacter baumannii*. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 18, 965–970
- Evans BA, Amyes SGB (2014): OXA β -lactamases. *Clin Microbiol Rev* 27, 241–263
- Ferranti M, Schiaroli E, Palmieri MI, Repetto A, Vecchiarelli A, Francisci D, Mencacci A, Monari C (2018): Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae isolates resistant to last-line antibiotics in an Italian general hospital. *New Microbiol* 41, 274–281
- Goodman KE, Simner PJ, Tamma PD, Milstone AM (2016): Infection control implications of heterogeneous resistance mechanisms in carbapenem-resistant Enterobacteriaceae (CRE). *Expert Rev Anti Infect Ther* 14, 95–108

Literatur

- Gullberg E, Cao S, Berg OG, Ilbäck C, Sandegren L, Hughes D, Andersson DI (2011): Selection of Resistant Bacteria at Very Low Antibiotic Concentrations. *PLoS Pathog* 7(7), e1002158
- Hamprecht A, Sommer J, Willmann M, Brender C, Stelzer Y, Krause FF, Tsvetkov T, Wild F, Riedel-Christ S, Kutschenreuter J, et al. (2019): Pathogenicity of Clinical OXA-48 Isolates and Impact of the OXA-48 IncL Plasmid on Virulence and Bacterial Fitness. *Front Microbiol* 10, 2509
- Hernando-Amado S, Sanz-García F, Blanco P, Martínez JL (2017): Fitness costs associated with the acquisition of antibiotic resistance. *Essays Biochem* 61, 37–48
- Koch-Institut R (2011): *Epidemiologisches Bulletin* 32/2011. August 10
- Kodio O, Georges Togo AC, Sadio Sarro Y dit, Fane B, Diallo F, Somboro A, Degoga B, Kone M, Coulibaly G, Tolofoudje M, et al. (2019): Competitive Fitness of *Mycobacterium tuberculosis* in vitro. *Int J Mycobacteriology* 8, 287–291
- Lee H, Shin J, Chung Y-J, Park M, Kang KJ, Baek JY, Shin D, Chung DR, Peck KR, Song J-H, Ko KS (2020): Co-introduction of plasmids harbouring the carbapenemase genes, blaNDM-1 and blaOXA-232, increases fitness and virulence of bacterial host. *J Biomed Sci* 27(1), 8
- Lee YR, Baker NT (2018): Meropenem-vaborbactam: a carbapenem and beta-lactamase inhibitor with activity against carbapenem-resistant Enterobacteriaceae. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis Off Publ Eur Soc Clin Microbiol* 37, 1411–1419
- Lundin E, Tang P-C, Guy L, Näsval J, Andersson DI (2018): Experimental Determination and Prediction of the Fitness Effects of Random Point Mutations in the Biosynthetic Enzyme HisA. *Mol Biol Evol* 35, 704–718
- Maharjan R, Ferenci T (2017): The fitness costs and benefits of antibiotic resistance in drug-free microenvironments encountered in the human body. *Environ Microbiol Rep* 9, 635–641
- Martínez-Martínez L, González-López JJ (2014): Carbapenemases in Enterobacteriaceae: types and molecular epidemiology. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 32, 4–9
- Nordmann P, Naas T, Poirel L (2011): Global spread of Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Emerg Infect Dis* 17, 1791–1798
- Nordmann P, Gniadkowski M, Giske CG, Poirel L, Woodford N, Miriagou V, European Network on Carbapenemases (2012): Identification and screening of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis* 18, 432–438
- Oteo J, Miró E, Pérez-Vázquez M, Navarro F (2014): Evolution of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae at the global and national level: what should be expected in the future? *Enferm Infecc Microbiol Clin* 32, 17–23
- Paño Pardo JR, Serrano Villar S, Ramos Ramos JC, Pintado V (2014): Infections caused by carbapenemase-producing Enterobacteriaceae: risk factors, clinical features and prognosis. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 32, 41–48

Literatur

- Park JY, Heo ST, Kwon KT, Song DY, Lee KJ, Choi JA (2019): MCR1 and KPC2 Co-producing *Klebsiella pneumoniae* Bacteremia: First Case in Korea. *Infect Chemother* 51, 399–404
- Pascual Á, Pintado V, Rodríguez-Baño J, Miró JM (2014): Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae: the end of the antibiotic era? *Enferm Infecc Microbiol Clin* 32 Suppl 4, 1–3
- Potter RF, D'Souza AW, Dantas G (2016): The rapid spread of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae. *Drug Resist Updat Rev Comment Antimicrob Anticancer Chemother* 29, 30–46
- Queenan AM, Bush K (2007): Carbapenemases: the Versatile β -Lactamases. *Clin Microbiol Rev* 20, 440–458
- Rodríguez-Baño J, Cisneros JM, Gudiol C, Martínez JA (2014): Treatment of infections caused by carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 32 Suppl 4, 49–55
- Sawa T, Kooguchi K, Moriyama K (2020): Molecular diversity of extended-spectrum β -lactamases and carbapenemases, and antimicrobial resistance. *J Intensive Care* 8, 13
- Sharan SK, Thomason LC, Kuznetsov SG, Court DL (2009): Recombineering: A Homologous Recombination-Based Method of Genetic Engineering. *Nat Protoc* 4, 206–223
- Stock I (2014): [Infectious diseases caused by carbapenemase-producing Enterobacteriaceae--a particular challenge for antibacterial therapy]. *Med Monatsschr Pharm* 37, 162–172; quiz 173–174
- Sundqvist M (2014): Reversibility of antibiotic resistance. *Ups J Med Sci* 119, 142–148
- Thaden JT, Pogue JM, Kaye KS (2017): Role of newer and re-emerging older agents in the treatment of infections caused by carbapenem-resistant Enterobacteriaceae. *Virulence* 8, 403–416
- van Loon K, Voor In 't Holt AF, Vos MC (2018): A Systematic Review and Meta-analyses of the Clinical Epidemiology of Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae. *Antimicrob Agents Chemother* 62(1), e01730-17
- Wang T, Kunze C, Dunlop MJ (2019): Salicylate Increases Fitness Cost Associated with MarA-Mediated Antibiotic Resistance. *Biophys J* 117, 563–571
- www.finnzymes.com, abgerufen am 20.10.2014
- Zhang Y, Liao K, Gao H, Wang Q, Wang X, Li H, Wang R, Wang H (2017): Decreased Fitness and Virulence in ST10 *Escherichia coli* Harboring bla_{NDM-5} and mcr-1 against a ST4981 Strain with bla_{NDM-5}. *Front Cell Infect Microbiol* 7, 242
- Zhang Y, Wang Q, Yin Y, Chen H, Jin L, Gu B, Xie L, Yang C, Ma X, Li H, et al. (2018): Epidemiology of Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae Infections: Report from the China CRE Network. *Antimicrob Agents Chemother* 62(2), e01882-17

Literatur

Zilberberg MD, Nathanson BH, Sulham K, Fan W, Shorr AF (2017): Carbapenem resistance, inappropriate empiric treatment and outcomes among patients hospitalized with Enterobacteriaceae urinary tract infection, pneumonia and sepsis. *BMC Infect Dis* 17, 279

Danksagung

Ich bedanke mich bei meinem Doktorvater, Prof. Dr. med. Uwe Groß, und meinem Betreuer, Dr. rer. nat. Wolfgang Bohne, für die Betreuung meiner Dissertationsarbeit und ihre konstruktive Kritik.

Ebenso gilt mein Dank dem gesamten Institut für Mikrobiologie und Virologie an der Universitätsmedizin Göttingen.

Lebenslauf

Mein Name ist Annika Jeibmann. Ich bin am 29.03.1992 in Datteln geboren. 2011 absolvierte ich mein bilinguales deutsch-französisches Abitur am Theodor-Heuss-Gymnasium in Waltrop. Im Wintersemester 2011 begann ich mein Studium der Humanmedizin an der Georg-August-Universität Göttingen. Im Wintersemester 2014/2015 führte ich den experimentellen Teil der vorliegenden Dissertation im Rahmen eines Freisemesters am Institut für Medizinische Mikrobiologie der Universitätsmedizin Göttingen mit Prof. Dr. Groß als meinem Doktorvater und unter Betreuung von Dr. Bohne durch. Anschließend setzte ich das Studium der Humanmedizin fort. Das dritte Staatsexamen und die Approbation erhielt ich 2018. Seitdem bin ich als Assistenzärztin am Klinikum Wilhelmshaven in der Kardiologie tätig.