

**Genetische Hintergründe für die
Verbreitung der Extended-Spektrum
Beta-Laktamase Gene *bla*_{CTX-M}
in *Escherichia coli***

Angela Cullik

**Genetische Hintergründe für die Verbreitung der
Extended-Spektrum Beta-Laktamase Gene *bla*_{CTX-M} in
*Escherichia coli***

Von der Fakultät für Lebenswissenschaften

der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina

zu Braunschweig

zur Erlangung des Grades einer

Doktorin der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

genehmigte

D i s s e r t a t i o n

von Angela Cullik, geb. Danschke
aus Wismar

Bibliografische Information der Deutschen Bibliothek

Die Deutsche Bibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.ddb.de> abrufbar.

1. Referentin oder Referent: Prof. Dr. M. Steinert

2. Referentin oder Referent: Prof. Dr. W. Witte

eingereicht am: 03.08.2010

mündliche Prüfung (Disputation) am: 09.11.2010

Druckjahr 2010

Dissertation an der Technischen Universität Braunschweig,
Fakultät für Lebenswissenschaften

Cullik, Angela

Genetische Hintergründe für die Verbreitung der Extended-Spektrum

Beta-Laktamase Gene *bla*_{CTX-M} in *Escherichia coli*

ISBN 978-3-941274-62-4

Alle Rechte vorbehalten

1. Auflage 2010, Göttingen

© Optimus Verlag

URL: www.optimus-verlag.de

Printed in Germany

Das Werk, einschließlich aller seiner Teile, ist urheberrechtlich geschützt. Jede Verwertung außerhalb der engen Grenzen des Urheberrechtsgesetzes in Deutschland ist ohne Zustimmung des Verlages unzulässig und strafbar. Dies gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung und Verarbeitung in elektronischen Systemen.

Vorveröffentlichungen der Dissertation

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Fakultät für Lebenswissenschaften, vertreten durch den Mentor der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

Publikationen

Cullik, A., Pfeifer Y., Prager R., von Baum, H. & Witte, W.: A novel IS26 structure surrounds *bla*_{CTX-M} genes in different plasmids from German clinical *Escherichia coli* isolates. *Journal of Molecular Medicine* 59: 580-587 (2010).

Pfeifer Y., Cullik, A. & Witte, W.: Resistance to cephalosporins and carbapenems in Gram-negative bacterial pathogens. *International Journal of Molecular Medicine* (2010)

Tagungsbeiträge

Pfeifer Y., Danschke, A., von Baum, H. & Witte, W.: Identification of CTX-M extended-spectrum β -Lactamases as leading cause of cephalosporin resistance of nosocomial *Escherichia coli* in a German hospital. (Poster) 59. Jahrestagung der Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie, Göttingen (2007).

Pfeifer Y., Danschke, A., von Baum, H. & Witte, W.: Molecular analysis of CTX-M carrying plasmids in nosocomial *E. coli*. (Poster) 60. Jahrestagung der Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie, Dresden (2008)

Cullik, A. & Witte, W.: Sequencing of low-copy IncN plasmids mediating cephalosporin resistance. (Poster) 4th European Conference on Prokaryotic Genomics, Göttingen (2009)

Cullik, A. & Witte, W.: Identification of a *bla*_{CTX-M-15} duplication in a nosocomial *E. coli* isolate from Germany. (Poster) 20th European Conference on Clinical Microbial and Infectious Diseases, Wien (2010)

Cullik, A. & Witte, W.: Complete nucleotide sequence of plasmids harbouring different CTX-M variants in German clinical isolates of *E. coli*. (Poster) 20th European Conference on Clinical Microbial and Infectious Diseases, Wien (2010)

In Wahrheit, gewiss und ohne Zweifel:
Das Untere ist gleich dem Oberen und das
Obere gleich dem Unteren, zu wirken die
Wunder des einen Dinges.

Hermes Trismegistos

INHALTSVERZEICHNIS

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	VII
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	IX
1 EINLEITUNG	1
1.1 <i>Escherichia coli</i> als Infektionserreger	1
1.2 Auftreten und Verbreitung Antibiotika-resistenter <i>E. coli</i>	2
1.3 Cephalosporine – Wirkung und Resistenzmechanismen.....	4
1.3.1 Mechanismen für die Verbreitung von <i>bla</i> _{CTX-M}	9
1.4 Zielstellung der Arbeit	15
2 MATERIAL UND METHODEN.....	17
2.1 Software und Datenbanken.....	17
2.2 Geräte.....	19
2.3 Chemikalien	20
2.3.1 Chemotherapeutika	22
2.3.2 Nährmedien	23
2.3.3 Kits	24
2.4 Bakterienstämme	25
2.4.1 Klinische Isolate	25
2.4.2 Labor- und Referenzstämme.....	26
2.4.3 Konjuganten.....	27
2.4.4 Transformanten	27
2.5 Nukleinsäuren	28
2.5.1 Vektoren und Referenzplasmide.....	28
2.5.2 DNA-Größenmarker	29
2.5.3 Oligonukleotide.....	29

2.6 Anzucht von Bakterien	30
2.6.1 Übernachtkultur.....	30
2.6.2 Anlegen und Ausimpfen einer Glycerinkultur	30
2.7 Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration	30
2.7.1 Multiple Resistenz-Bestimmung mittels MHK-Fertigplatte.....	31
2.7.2 ESBL MHK-Bestimmung	32
2.8 Konjugation	33
2.9 Isolierung chromosomaler DNA	34
2.10 Plasmidisolaton	34
2.11 Charakterisierung von DNA	36
2.11.1 Restriktion zur Größenbestimmung und Charakterisierung	36
2.11.2 Agarosegelelektrophorese zur Größenbestimmung	37
2.11.3 DNA-Mengenabschätzung aus Agarosegelen	38
2.11.4 DNA-Quantifizierung mittels Nanodrop UV-Spektrometer.....	38
2.11.5 PicoGreen® -Fluorometrie zur DNA-Quantifizierung	38
2.11.6 Pulsfeld-Gelelektrophorese zur Größen- und Typenbestimmung	39
2.11.6.1 <i>Xba</i> I Typisierung von bakterieller DNA.....	39
2.11.6.2 SI Restriktion zur Größenbestimmung von Plasmiden	41
2.12 Southern-Blot & Hybridisierung	41
2.12.1 Vorbereitung des Gels	42
2.12.2 Kapillarblot.....	42
2.12.3 Vakuumblot	43
2.12.4 Herstellung der Sonde	43
2.12.5 DNA-DNA-Hybridisierung.....	44
2.12.6 Detektion	44
2.12.7 Entfernung der Sonde	44
2.13 PCR	46
2.13.1 ESBL-Multiplex-PCR.....	47

2.13.2 MLST PCR	47
2.13.3 Long-PCR.....	48
2.13.4 One-Primer-Walking PCR	49
2.14 Aufreinigung von PCR-Produkten.....	50
2.14.1 Agarosegelextraktion	50
2.14.2 Aufreinigung von PCR-Produkten mittels Silikamembranen.....	50
2.15 Klonierung und Transformation	50
2.15.1 Vektorette-Ligation	51
2.15.2 TA-Klonierung	51
2.15.3 XL TOPO-Klonierung.....	52
2.15.4 Herstellung chemisch kompetenter Zellen	52
2.15.5 Transformation durch Hitzeschock nach HANAHAN.....	53
2.15.6 Herstellung elektrokompeter Zellen.....	53
2.15.7 Elektroporation	54
2.15.8 Überprüfung positiver Klone.....	54
2.15.8.1 Blau-weiß-Selektion	54
2.15.8.2 Eckhardt-Lyse	55
2.16 Sequenzierung.....	55
2.16.1 Sanger-Sequenzierung von PCR Produkten	55
2.16.2 454-Sequenzierung von Plasmiden	57
3 ERGEBNISSE	59
3.1 Allgemeine Charakterisierung der ESBL-bildenden <i>E. coli</i> Isolate.....	59
3.1.1 Phänotypische Resistenzbestimmung.....	59
3.1.2 Genotypische β -Laktamase-Klassifizierung	63
3.1.3 Phylotypen	64
3.1.4 MLST	65
3.1.5 <i>Xba</i> I-Makrorestriktionsmuster-Analyse (PFGE).....	65
3.1.6 Plasmidprofile	65

3.1.7 Lokalisation der <i>bla</i> _{CTX-M} Gene.....	67
3.2 Selektion und Konjugation von <i>bla</i> _{CTX-M} tragenden Plasmiden	68
3.3 Charakterisierung der Konjuganten.....	69
3.3.1 Phänotypische Resistenzbestimmung.....	69
3.3.2 Genotypische β -Laktamase Identifikation.....	73
3.3.3 Bestimmung der Inkompatibilitätsgruppen	73
3.3.4 Bestimmung der Plasmidgrößen	74
3.3.5 Mit <i>bla</i> _{CTX-M} assoziierte mobile genetische Elemente.....	74
3.3.6 Stammauswahl für weitergehende Untersuchungen	74
3.4 Sequenzuntersuchungen der <i>bla</i> _{CTX-M} tragenden Plasmide	76
3.4.1 Genetische Umgebung der <i>bla</i> _{CTX-M-1} Gene	78
3.4.2 Genetische Umgebung der <i>bla</i> _{CTX-M-15} Gene	79
3.4.3 Genetische Umgebung des <i>bla</i> _{CTX-M-65} Gens	80
3.4.4 Stammauswahl für die Gesamt-Plasmid-Sequenzierung	80
3.5 Plasmidsequenzierungen.....	81
3.5.1 Auswertung der Sequenzen der IncN Plasmide	83
3.5.1.1 Sequenz des Plasmids pKC396.....	83
3.5.1.2 Sequenz des Plasmids pKC394.....	86
3.5.1.3 Plasmidrestriktions-Analysen	90
3.5.2 Auswertung der Sequenzen der IncFII Plasmide	92
4 DISKUSSION	95
4.1 Verwandtschaftsverhältnisse der ESBL-bildenden <i>E. coli</i>	95
4.1.1 PFGE-Makrorestriktionsmuster und Plasmidprofile.....	96
4.1.2 MLST	97
4.1.3 Resistenzmuster und genetischer Zusammenhang.....	99
4.1.3.1 Beta-Laktam-Resistenz	99
4.1.3.2 Sulfonamid-Resistenz	100
4.1.3.3 Fluorchinolon-Resistenz	101

4.1.3.4 Weitere Resistenzen.....	102
4.2 Charakterisierung der <i>bla</i> _{CTX-M} tragenden Plasmide	103
4.2.1 Plasmidgrößen und Transferierbarkeit	103
4.2.2 Inkompatibilitätsgruppen.....	104
4.2.2.1 IncFII Plasmide.....	104
4.2.2.2 IncN-Plasmide.....	105
4.3 Genetische Umgebung der <i>bla</i> _{CTX-M} Gene.....	106
4.3.1 Die neue Variante <i>bla</i> _{CTX-M-65}	106
4.3.2 Ein neues IS26 Transposon bei <i>bla</i> _{CTX-M-1}	107
4.3.3 Erfolgreiche IS-Elemente bei <i>bla</i> _{CTX-M-15}	108
4.3.4 Ungewöhnliche Promotorstrukturen bei <i>bla</i> _{CTX-M-15}	109
4.3.5 Duplikation von <i>bla</i> _{CTX-M-15}	110
4.4 Auswirkungen von <i>bla</i> _{CTX-M} Mutationen auf die Cephalosporin-Resistenz	111
4.4.1 Auswirkungen der <i>bla</i> _{CTX-M-15} Duplikation.....	112
4.4.2 Auswirkungen veränderter <i>bla</i> _{CTX-M-15} Promotorstrukturen	113
4.4.3 Auswirkungen der <i>bla</i> _{CTX-M-65} Allele	114
4.5 Vergleich der Plasmidsequenzen.....	115
4.5.1 Methodische Limitationen bei Plasmidsequenzierungen	115
4.5.2 Verwandtschaftsverhältnisse der IncN Plasmide	117
4.5.3 MGE von pKC396	119
4.5.4 MGE von pKC394	120
4.5.5 Anordnung der MGE innerhalb des IncN Plasmidrückgrats	122
4.6 Ausblick	124
5 ZUSAMMENFASSUNG	127
6 SUMMARY	131
7 LITERATURVERZEICHNIS.....	135
ANHANG.....	163
DANKSAGUNG	173

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Auf die Auflistung deutscher Termini wurde verzichtet, wenn sie dem gängigen Sprachgebrauch entsprechen. Genbezeichnungen sind Tabelle 3.10 zu entnehmen.

AGE	Agarosegelelektrophorese
Ala	Alanin
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
Arg	Arginin
Asn	Asparaginsäure
Asp	Aspartat
dH ₂ O	Aqua bidest (hochreines, doppelt deionisiertes Wasser).
AMK	Amikacin
AMP	Ampicillin
AS	Aminosäure
BHI	<i>brain-heart-infusion</i> , Hirn-Herz-Glucose Bouillon
<i>bla</i>	Beta-Laktamase Gen
bp	Basenpaare
CTM	Cefotiam
CAZ	Ceftazidim
CTX	Cefotaxim
CIP	Ciprofloxacin
CPD	Cefpodoxim
CMP	Chloramphenicol
DR	<i>direct repeat</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
ddNTP	Didesoxynukleosidtriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EtBr	Ethidiumbromid
ESBL	Extended-Spektrum Beta-Laktamase
et al.	<i>et alii</i> (und andere)
FOX	Cefoxitin
GCG-Agar	Galle-Chrysoidin-Glycerol-Agar
Gly	Glycin
Glu	Glutamin
In	Integron
Inc	Inkompatibilitätsgruppe
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
IR	<i>inverted repeat</i>
IS	Insertionselement

IST-Bouillon	Isosensitest-Bouillon
Lys	Lysin
KAN	Kanamycin
kb	Kilo-Basenpaare
KBE	Kolonie-bildende Einheiten
LB-Agar	Luria-Bertani-Agar
MGE	mobiles genetisches Element
MLST	Multilokus-Sequenztypisierung
MZL	Mezlocillin
MSU	Mezlocillin/Sulbactam
MH-Agar	Müller-Hinton-Agar
MHK	Minimale Hemmkonzentration
NAL	Nalidixinsäure
NCBI	<i>National Center for Biotechnology</i>
NCTC	<i>National Collection of Type Cultures</i>
OD _{nm}	Optische Dichte (Index gibt die Wellenlänge an)
ORF	<i>open reading frame</i>
OTE	Oxytetracyclin
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PFGE	Pulsfeldgel-Elektrophorese
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
S.	Serovar
SSC	<i>Saline sodium citrate</i>
SDS	<i>Sodium dodecyl sulphate</i>
Ser	Serin
ST	Sequenztyp
STL	Stammlösung
SMZ	Sulfamerazin
SNP	<i>Single nucleotide polymorphism</i>
SXT	Sulfamerazin + Trimethoprim
STR	Streptomycin
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBE	Tris-Borat-EDTA
TE	Tris-EDTA
Tn	Transposon
Tris	<i>tris</i> -(Hydroxymethyl-)Aminomethan
Tween	<i>Polyoxyethylene sorbitan monolaurat</i>
ÜNK	Über-Nacht-Kultur
UV	ultraviolett
Val	Valin
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indolyl-β-D-galactosid
Δ	Deletion

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1.1:	elektronenmikroskopische Aufnahme von <i>Escherichia coli</i>	1
Abbildung 1.2:	Entwicklung der Resistenzraten von <i>E. coli</i> gegenüber ausgewählten Antibiotika in Deutschland.....	3
Abbildung 1.3:	Anteil der Cephalosporin-resistenten <i>E. coli</i> in Europa (EARSS, 2008).....	4
Abbildung 1.4:	Einordnung der verbreitetsten β -Laktamasen in das Klassifizierungsschema nach AMBLER.....	6
Abbildung 1.5:	3D-Strukturen von CTX-M.....	9
Abbildung 1.6:	weltweite Verbreitung der häufigsten CTX-M Typen (Canton & Coque, 2006).....	9
Abbildung 1.7:	vereinfachter phylogenetischer Stammbaum der CTX-M Gruppen und zugehöriger Varianten	10
Abbildung 1.8:	grafische Darstellung diverser CTX-M umgebende MGE als Genkarten	11
Abbildung 2.1:	Befüllungsschema der Gram-negativen MHK-Mikrotiterplatte.....	31
Abbildung 2.2:	Formel zur Berechnung der Enzymmenge.....	36
Abbildung 2.3:	Formeln zur Berechnung von a) Reinheit und b) Konzentration von Nukleinsäuren	38
Abbildung 2.4:	Versuchsaufbau des Kapillarblots.....	42
Abbildung 2.5:	Probenbehandlung bei der 454 Sequenzierung	58
Abbildung 3.1:	Häufigkeit der ESBL Typen mit entsprechenden Isolaten aufgeschlüsselt nach Gruppen	64
Abbildung 3.2:	<i>Xba</i> I Restriktionsmuster und daraus erstelltes Dendrogramm	66
Abbildung 3.3:	normalisierte Plasmidprofile der 22 ESBL-bildenden <i>E. coli</i> Isolate	67
Abbildung 3.4:	beispielhafte Regressionsdiagramme erstellt aus einem Plasmidgel	67

Abbildung 3.5:	Hybridisierte Southern-Blots von entsprechenden Plasmid-Minipräparationen	68
Abbildung 3.6:	Assoziation der β -Laktamase-Gene mit den Inkompatibilitätsgruppen.....	73
Abbildung 3.7:	schematische Darstellung der ausgewählten Konjuganten für die <i>bla</i> _{CTX-M} Umgebungsuntersuchungen.....	76
Abbildung 3.8:	beispielhafte Produkte aus One-Primer-Walking PCR	77
Abbildung 3.9:	grafische Darstellung der genetischen Umgebung von <i>bla</i> _{CTX-M-1} in Plasmiden verschiedener Inc-Gruppen	79
Abbildung 3.10:	grafische Darstellung der genetischen Umgebung von <i>bla</i> _{CTX-M-15} in Plasmiden verschiedener Inc-Gruppen	79
Abbildung 3.11:	grafische Darstellung der genetischen Umgebung von <i>bla</i> _{CTX-M-65} ...	80
Abbildung 3.12:	Agarosegel der Plasmid-DNA (Midipräparationen) für Sequenzierung	81
Abbildung 3.13:	Genkarte des zirkulär geschlossenen DNA-Moleküls pKC396.....	86
Abbildung 3.14:	Vorgehensweise beim Auffinden des IS26 Transposons und seiner Umgebung im Contig14.....	89
Abbildung 3.15:	Genkarte des zirkulär geschlossenen DNA-Moleküls pKC394.....	90
Abbildung 3.16:	PFGE von S1 linearisierten Plasmid DNA (Minipräparation)	91
Abbildung 3.17:	Restriktionsananlyse der IncN Plasmide.....	91
Abbildung 3.18:	Alignment aller Contigs der IncFII Plasmide gegen pC15-1a als Referenz.....	93
Abbildung 4.1:	MHK-Werte von Isolaten und ihren Konjuganten mit <i>bla</i> _{CTX-M} Mutationen	112
Abbildung 4.2:	Phylogenetische Stammbäume aller vollständig sequenzierten IncN Plasmide	118
Abbildung 4.3:	Vergleich der <i>bla</i> _{CTX-M} umgebenden MGE von pKC396 und pKP96.....	119
Abbildung 4.4:	Umgebung von <i>bla</i> _{CTX-M-1} in pKC394 im Vergleich zu pLMAPR07 ..	121
Abbildung 4.5:	Vergleich aller vollständig sequenzierten IncN Plasmide	123

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1.1:	Gruppen der β -Laktame mit Beispielen und Strukturformeln	5
Tabelle 1.2:	Assoziation häufiger <i>bla</i> _{CTX-M} Gene mit Plasmiden bestimmter Inc-Gruppen in <i>E. coli</i>	13
Tabelle 1.3:	Übersicht über vollständig sequenzierte IncN Plasmide und ihrer Eigenschaften	15
Tabelle 2.1:	verwendete Software	17
Tabelle 2.2:	verwendete Online-Ressourcen	18
Tabelle 2.3:	verwendete Geräte und deren Hersteller	19
Tabelle 2.4:	verwendete Chemikalien und Enzyme sowie deren Bezugsquelle	20
Tabelle 2.5:	verwendete Chemotherapeutika	22
Tabelle 2.6:	verwendete Nährmedien	23
Tabelle 2.7:	verwendete Kits.....	24
Tabelle 2.8:	Herkunft und Patientendaten der als ESBL-Bildner eingesandten <i>E. coli</i> Isolate	25
Tabelle 2.9:	Charakteristika der in dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme ...	26
Tabelle 2.10:	im Rahmen dieser Arbeit hergestellte Konjuganten.....	27
Tabelle 2.11:	Übersicht über die verwendeten Vektoren	28
Tabelle 2.12:	verwendete DNA-Größenmarker	29
Tabelle 2.13:	MHK-Richtwerte [$\mu\text{g/mL}$] für <i>Enterobacteriaceae</i> und cut-off-Werte für <i>E. coli</i>	33
Tabelle 2.14:	typisches Pipettierschema einer Restiktionsspaltung	36
Tabelle 2.15:	PCR-Standardtemperaturprofil.....	46
Tabelle 2.16:	klassisches Pipettierschema für PCR	47
Tabelle 2.17:	Pipettierschema für die Long-PCR	48
Tabelle 2.18:	Temperaturprofil für die Long-PCR.....	49
Tabelle 2.19:	Temperaturprofil der One-Primer-Walking PCR.....	49

Tabelle 2.20: Temperaturprofil für das Cycle Sequencing	56
Tabelle 2.21: Pipettierschema für Cycle Sequencing	56
Tabelle 2.22: zur Ringschließung verwendete Primer und erhaltene Produkte.....	58
Tabelle 3.1: MHK-Werte [$\mu\text{g/mL}$] der nosokomialen <i>E. coli</i> gegenüber 17 ausgewählten Antibiotika	61
Tabelle 3.2: MHK-Werte [$\mu\text{g/mL}$] der klinischen <i>E. coli</i> Isolate für ausgewählte Cephalosporine mit und ohne Inhibitor	62
Tabelle 3.3: Sequenzunterschiede der ermittelten <i>bla</i> _{CTX-M} Gene	64
Tabelle 3.4: MHK-Werte [$\mu\text{g/mL}$] der Rezipienten- und Konjugantenstämme in vorgefertigter Mikrotiterplatte.....	71
Tabelle 3.5: MHK-Werte [$\mu\text{g/mL}$] der CTX-M-bildenden Konjuganten ggü. ausgewählten Cephalosporinen mit und ohne Inhibitor	72
Tabelle 3.6: Charakteristika der klinischen Isolate (Donor) und Konjuganten im Vergleich.....	75
Tabelle 3.7: Akzessionsnummern und Größen der mittels One-Primer-Walking aufgeklärten Sequenzen	78
Tabelle 3.8: Ausbeuten und zur Sequenzierung versendete Mengen von Plasmid-DNA.....	82
Tabelle 3.9: Übersicht der Rohdaten der sequenzierten Plasmide	82
Tabelle 3.10: Gegenüberstellung der Positionen aller ORFs in pKC394 und pKC396 ..	84
Tabelle A.1: in dieser Arbeit hergestellte Transformanten	163
Tabelle A.2 in dieser Arbeit verwendete Oligonukleotide.....	164
Tabelle A.3 Berechnung der Plasmidgrößen von Gel1	168
Tabelle A.4 Berechnung der Plasmidgrößen von Gel2	169
Tabelle A.5 Berechnung der Plasmidgrößen von Gel3	170
Tabelle A.6 Berechnung der Plasmidgrößen von Gel4	171
Tabelle A.7 Berechnung der Plasmidgrößen von Gel5	171
Tabelle A.8 Berechnung der Plasmidgrößen von Gel6	172
Tabelle A.9 Berechnung der Plasmidgrößen von Gel7	172