

**Sind Anhydromuramylpeptide auch bei *Aeromonas* spp. die Mediatoren für die Induktion der chromosomalen  $\beta$ -Laktamase?**

**Dissertation**

**zur Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)**

**der Mathematisch –Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn**

**vorgelegt von**

**Katrin Westphal**

**aus Hilden**

**Bonn 2003**



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

1. Referent: Prof. Dr. B. Wiedemann

2. Referent: Prof. Dr. H. G. Trüper

Tag der Promotion: 11.12.2003

## Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1. $\beta$ -Laktam-Antibiotika .....	2
1.1.1. Die verschiedenen Klassen von $\beta$ -Laktamen .....	2
1.1.2. Die Bakterienzellwand als Zielstruktur der $\beta$ -Laktam-Antibiotika .....	4
1.1.2.1. Aufbau der Bakterienzellwand .....	5
1.1.2.2. Biosynthese der Bakterienzellwand .....	6
1.1.3. Wirkungsweise der $\beta$ -Laktam-Antibiotika .....	11
1.2. Resistenz gegenüber $\beta$ -Laktam-Antibiotika .....	12
1.2.1. Resistenz aufgrund der Veränderung von Zielstrukturen .....	13
1.2.2. Resistenz aufgrund passiver Zugangsbehinderung .....	13
1.2.3. Resistenz aufgrund enzymatischer Inaktivierung des $\beta$ -Laktams .....	13
1.3. Regulation der $\beta$ -Laktamase-Expression bei <i>Enterobacter cloacae</i> und <i>Citrobacter freundii</i> .....	15
1.4. Zwei-Komponenten-Regulation der chromosomalen $\beta$ -Laktamasen von <i>Aeromonas</i> spp. ....	19
1.5. Zielsetzung .....	23
<b>2. Material &amp; Methoden</b> .....	<b>24</b>
2.1. Material .....	24
2.1.1. Bakterienstämme .....	24
2.1.2. Plasmide .....	24
2.1.3. Chemotherapeutika .....	25
2.1.4. Oligonucleotide .....	25
2.1.5. Nährmedien .....	26
2.1.6. Chemikalien und sonstige Materialien .....	26
2.1.7. Puffer und Lösungen .....	29
2.1.8. Geräte .....	31
2.1.9. Enzyme .....	32
2.2. Mikrobiologische Methoden - Testung der Antibiotika-Empfindlichkeit .....	32
2.3. Proteinchemische Methoden .....	33
2.3.1. Präparation des $\beta$ -Laktamase-Rohextraktes .....	33
2.3.2. Spektralphotometrische Bestimmung der spezifischen $\beta$ -Laktamase-Aktivität .....	33

2.3.3. Proteinbestimmung nach Lowry.....	35
2.3.4. Nachweis von Penicillinbindeproteinen (PBPs) mit biotinyliertem Ampicillin.....	35
2.3.4.1. Herstellung von biotinyliertem Ampicillin (“Bio-Amp”).....	35
2.3.4.2. Präparation von Membranproteinen.....	36
2.3.4.3. Nachweis von PBPs.....	36
2.3.5. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE).....	37
2.3.6. Westernblot.....	37
2.4. Molekularbiologische Methoden.....	38
2.4.1. Präparation von Plasmid-DNA.....	38
2.4.1.1. Plasmidschnellpräparation nach Maniatis et. al. (1989).....	38
2.4.1.2. Plasmid Mini Präparation.....	39
2.4.2. Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	39
2.4.3. Aufreinigung von PCR-Produkten mit dem Qiaquick Purification Kit.....	41
2.4.4. Präparation chromosomaler DNA.....	41
2.4.5. Restriktion und Modifikation von DNA.....	42
2.4.6. Transformation.....	42
2.4.7. Herstellung elektrokompenter Zellen.....	43
2.4.8. Konzentrationsbestimmung von Oligonucleotiden.....	43
2.4.9. Agarose-Gelelektrophorese.....	43
2.4.10. DNA-Sequenzierung.....	44
2.4.11. Herstellung von Transposonmutanten.....	45
2.5. Isolation und Analyse von Muropeptiden.....	46
2.5.1. Präparation der löslichen Muropeptide.....	46
2.5.2. Auftrennung der löslichen Muropeptide mittels HPLC.....	46
<b>3. Ergebnisse.....</b>	<b>47</b>
3.1. Herstellung und Charakterisierung von Transposonmutanten.....	47
3.1.1. blrD PCR.....	47
3.1.2. Klonierung zur Identifizierung des ausgeschalteten Gens.....	48
3.1.3. PCR zur Identifizierung des ausgeschalteten Gens in restlichen Transposon- mutanten.....	52
3.1.4. Nachweis der Penicillinbindeproteine auf Proteinebene.....	54
3.1.5. Phänotypische Charakterisierung der Transposonmutanten.....	56
3.1.5.1. Charakterisierung der Transposonmutanten durch MHK-Bestimmung.....	57

3.1.5.2. Charakterisierung der Transposonmutanten durch Bestimmung der spezifischen $\beta$ -Laktamase-Aktivität.....	59
3.2. Untersuchung des Zellwandstoffwechsels durch HPLC.....	60
3.2.1. Vorversuche für die HPLC: Induktion mit verschiedenen Antibiotika.....	60
3.2.2. HPLC-Analyse der löslichen Muropeptide.....	62
3.3. Einfluß von Bulgecin auf die Induzierbarkeit und Überproduktion der $\beta$ -Laktamase.....	67
<b>4. Diskussion.....</b>	<b>71</b>
<b>5. Zusammenfassung.....</b>	<b>82</b>
<b>6. Literaturverzeichnis.....</b>	<b>84</b>
<b>7. Anhang.....</b>	<b>96</b>

## 1. Einleitung

Die Wirksamkeit der heutigen Antibiotikatherapie wird durch das Auftreten resistenter Mikroorganismen erheblich eingeschränkt. Ein häufiger Resistenzmechanismus ist die enzymatische Inaktivierung des jeweiligen Antibiotikums. So wird die Wirksamkeit der bedeutenden Gruppe der  $\beta$ -Laktam-Antibiotika durch hydrolytische Enzyme bedroht, die den  $\beta$ -Laktamring spalten können. Diese  $\beta$ -Laktamasen sind der häufigste Resistenzmechanismus gegenüber den  $\beta$ -Laktamen.

Unter gramnegativen Bakterien sind speziesspezifische, chromosomal codierte  $\beta$ -Laktamasen weit verbreitet. Diese Enzyme sind überwiegend induzierbar und vermitteln der produzierenden Spezies Resistenz gegenüber einem gewissen Spektrum von  $\beta$ -Laktamen. Eine besondere Bedeutung für die klinische Praxis erlangen diese chromosomalen  $\beta$ -Laktamasen jedoch, da Mutationen, die zu ihrer konstanten Überproduktion führen, mit einer großen Häufigkeit von  $10^{-4}$ - $10^{-7}$  auftreten (Korfmann and Wiedemann, 1988). Stämme mit einer solchen Mutation haben eine deutlich verringerte Empfindlichkeit gegenüber allen  $\beta$ -Laktamen, mit Ausnahme weniger Cephalosporine und der Carbapeneme.

Die Induzierbarkeit der  $\beta$ -Laktamasen gramnegativer Bakterien eröffnet die Möglichkeit, in das Regulationssystem für die  $\beta$ -Laktamase-Expression einzugreifen und durch Unterdrückung der Expression die Wirksamkeit der  $\beta$ -Laktame gegenüber diesen Stämmen wieder herzustellen. Voraussetzung für dieses Vorgehen ist die genaue Kenntnis der Abläufe bei der  $\beta$ -Laktamase-Induktion, damit ein gezielter Eingriff möglich ist. Für einige gramnegative Spezies, wie *Enterobacter* spp. und *Citrobacter freundii*, konnte die Regulation der  $\beta$ -Laktamase-Expression aufgeklärt werden. Eine zentrale Rolle spielt der Zellwandstoffwechsel, der durch die primäre Bindung der  $\beta$ -Laktame in der Weise gestört wird, dass es zu einer vermehrten Freisetzung von Signalmolekülen für die Aktivierung des Transkriptionsfaktors kommt. Bei diesen Signalmolekülen handelt es sich um Zellwandabbauprodukte, sogenannte Anhydromuramylpeptide. Die Vorgänge, die bei *Aeromonas* spp., gramnegative Bakterien, die zu der Gruppe der Nonfermenter zählen, zur  $\beta$ -Laktamase-Induktion führen, sind noch weitgehend unbekannt. Zwar ist die Beteiligung eines Zwei-Komponenten-Systems gesichert, jedoch ist unklar, wie es in Gegenwart von  $\beta$ -Laktam-Molekülen zu dessen Aktivierung kommt. Die vorliegende Arbeit soll zur Klärung dieser Abläufe beitragen und insbesondere die Frage beantworten, ob auch bei *Aeromonas*

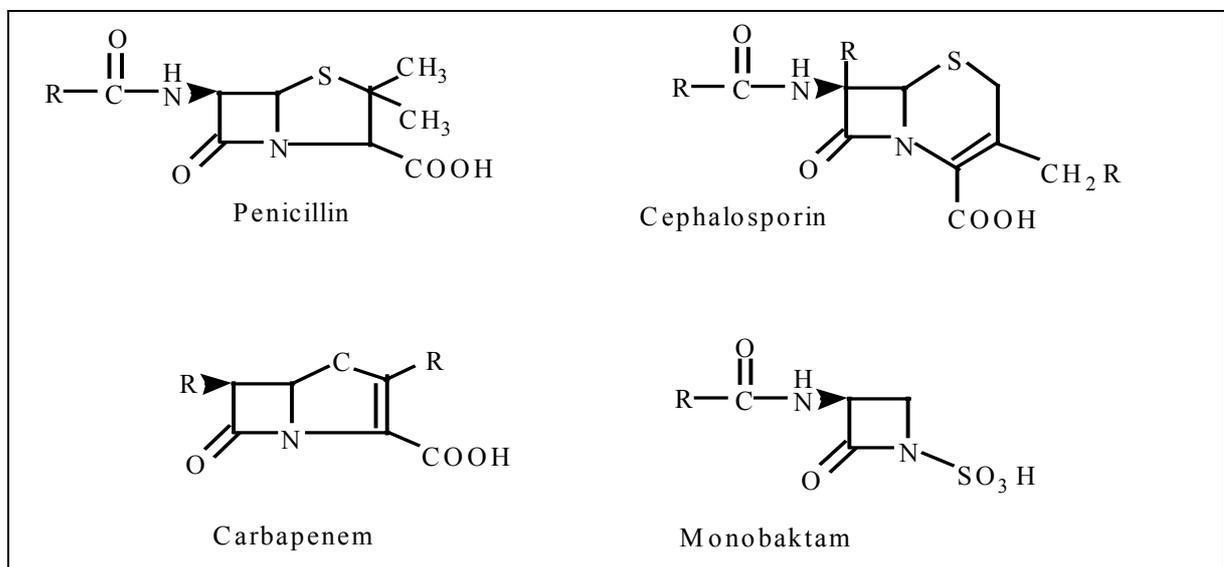
spp. Zellwandabbauprodukte als Signale für die Induktion der chromosomalen  $\beta$ -Laktamase wirken.

## 1.1. $\beta$ -Laktam-Antibiotika

### 1.1.1. Die verschiedenen Klassen von $\beta$ -Laktamen

Die verschiedenen Klassen von  $\beta$ -Laktam-Antibiotika unterscheiden sich durch ihre Grundgerüste. Allen gemeinsam ist jedoch der viergliedrige  $\beta$ -Laktamring.

**Abb. 1.1. Struktur der  $\beta$ -Laktam-Antibiotika**



### Penicilline

Von den natürlich vorkommenden Penicillinen, die aus Kulturen von *Penicillium chrysogenum* isoliert werden, hat nur das Benzylpenicillin (Penicillin G) therapeutische Bedeutung erlangt. Von Penicillin G wird mit Hilfe einer bakteriellen Acyltransferase die 6-Amino-Penicillansäure (6-APS), ein bicyclisches Dipeptid aus Cystein und Valin, abgespalten. Ausgehend von diesem Grundgerüst werden zahlreiche semisynthetische Derivate hergestellt.

Penicillin G entfaltet seine bakterizide Wirkung nur bei grampositiven Bakterien, da es die dünne Mureinschicht der gramnegativen Bakterien nicht erreicht. Viele seiner Derivate besitzen jedoch ein erweitertes Spektrum, das auch Enterobacteriaceen und Pseudomona-

den erfaßt. Zu den Derivaten der 6-APS gehören z. B. die Aminopenicilline Ampicillin und Amoxicillin sowie die Carboxylpenicilline Ticarcillin und Temocillin. Die meisten Penicilline sind aber mehr oder weniger labil gegenüber den  $\beta$ -Laktamasen der gramnegativen Bakterien.

### **Cephalosporine und Cephamyne**

Cephalosporine sind Derivate der 7-Amino-Cephalosporansäure. Das natürlich vorkommende Cephalosporin C, das von Cephalosporium-Arten gebildet wird, ist wegen seiner schwachen antibiotischen Wirksamkeit therapeutisch unbedeutend. Es ist jedoch Ausgangssubstanz für die Herstellung zahlreicher semisynthetischer Derivate, die sich im Vergleich zu den Penicillinen durch ein breiteres Wirkungsspektrum und eine größere  $\beta$ -Laktamasestabilität auszeichnen.

Ähnlich günstige Wirkungseigenschaften zeigen auch die Cephamyne wie Cefoxitin und Cefotetan. Dies sind 7- $\alpha$ -Methoxy-Cephalosporine, die nicht von Schimmelpilzen, sondern von Streptomyces-Arten gebildet werden.

Beispiele für die Cephalosporine verschiedener Generationen sind in Tabelle 1.1. dargestellt.

**Tab. 1.1. Beispiele für Cephalosporine verschiedener Generationen**

I. Generation	II. Generation	III. Generation	IV. Generation
Cefalotin	Cefazolin	Cefotaxim	Cefepim
Cefradin	Cefotiam	Cefmenoxim	Cefpirom
	Cefuroxim	Ceftizoxim	
	Cefoxitin	Ceftriaxon	
	Cefalexin	Ceftazidim	
	Cefixim	Cefotetan	
		Cefsudolin	

## **Carbapeneme**

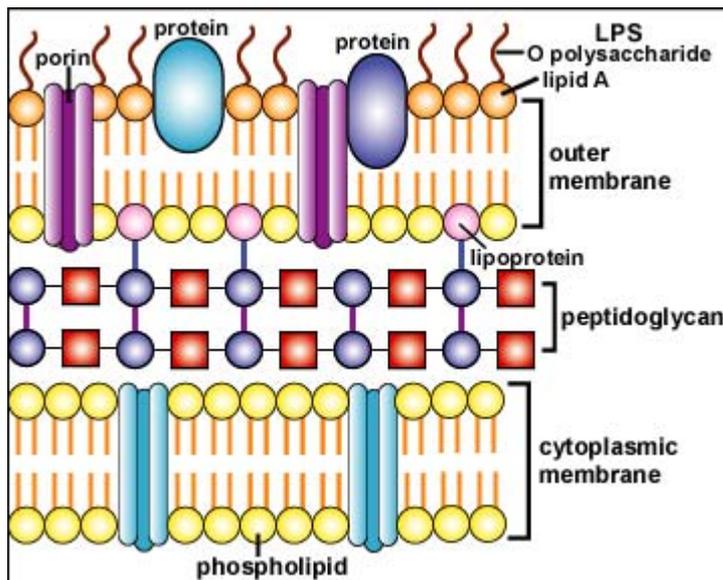
Carbapeneme sind wie die Cephamyne ein natürliches Produkt von Streptomyces-Arten. Sie ähneln in ihrem Grundgerüst den Penicillinen. Der Fünfferring enthält jedoch eine Doppelbindung und das Schwefelatom ist durch ein Kohlenstoffatom ersetzt. Sie besitzen ein sehr breites Wirkungsspektrum, wegen der hohen Ringspannung aber geringe chemische Stabilität. Ihre Empfindlichkeit gegenüber  $\beta$ -Laktamasen ist sehr gering. Zu dieser Klasse gehören Imipenem und Meropenem.

## **Monobaktame**

Monobaktame werden durch gramnegative Bakterien als monozyklische  $\beta$ -Laktam-Antibiotika gebildet. Sie sind vor allem gegen gramnegative Keime wirksam und überwiegend gegenüber deren  $\beta$ -Laktamasen stabil. Aztreonam stellt ein chemisch synthetisiertes Monobaktam dar.

### **1.1.2. Die Bakterienzellwand als Zielstruktur der $\beta$ -Laktam-Antibiotika**

Die Bakterienzellwand ist die Zielstruktur der  $\beta$ -Laktam-Antibiotika. Sie ist eine komplex zusammengesetzte Struktur. Ihr Grundgerüst besteht aus einem Heteropolymer, dem Peptidoglykan (Murein). Dieses umgibt die Zytoplasmamembran sackförmig, verleiht der Bakterienzelle Rigidität und schützt sie gegen osmotische Einflüsse. Die äußere Membran gramnegativer Bakterien, die die Zellwand umgibt, ist über Lipoproteine am Peptidoglykan kovalent verankert.

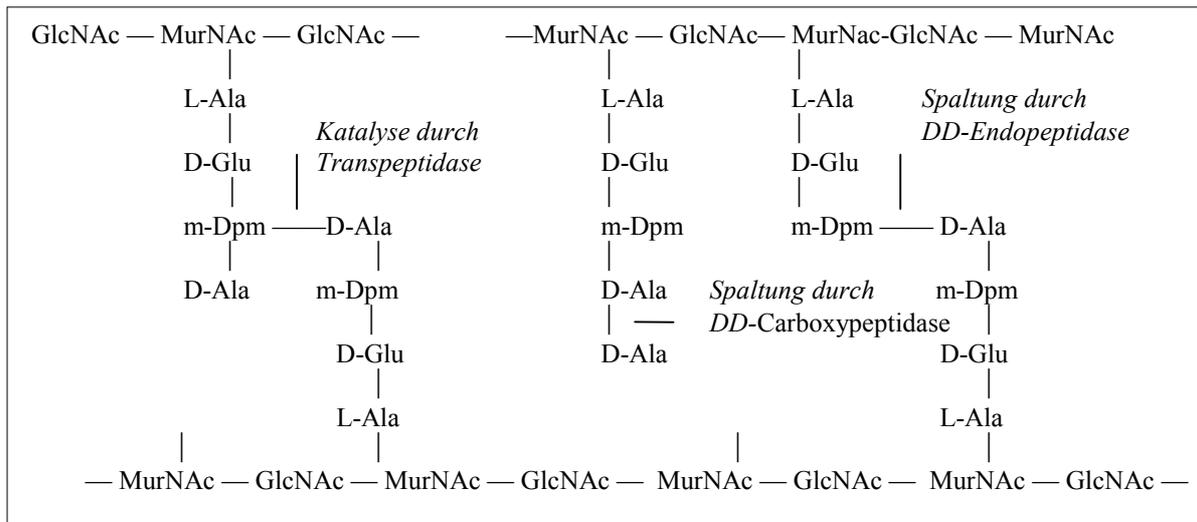
**Abb. 1.2. Schematischer Aufbau der gramnegativen Zellwand**

### 1.1.2.1. Aufbau der Bakterienzellwand

Das Peptidoglycan besteht aus Polysaccharidketten, in denen N-Acetylglucosamin (GlcNAc) und N-Acetylmuraminsäure (MurNAc) alternierend  $\beta$ -1,4-glykosidisch miteinander verknüpft sind. Durch Quervernetzung dieser geraden, unverzweigten Ketten über Peptidbrücken erhält das Murein seinen netzartigen Aufbau. Die Kettenlänge der Glykanstränge variiert bei *E. coli* zwischen einem und 100 Disacchariden, wobei die Mehrzahl der Stränge eine Kettenlänge von fünf bis zehn Polymeren aufweist (Harz et al., 1990).

Die N-Acetylmuraminsäure-Bausteine sind über ihre Lactylgruppe mit einem Tetrapeptid verbunden. Dieses enthält bei gramnegativen Bakterien typischerweise die Aminosäuren L-Alanin, D-Glutaminsäure, meso-Diaminopimelinsäure (m-Dpm) und D-Alanin. Bei grampositiven Bakterien ist die meso-Diaminopimelinsäure häufig durch LL-Diaminopimelinsäure oder L-Lysin ersetzt. Durch Peptidbindung zwischen den Tetrapeptidketten zweier benachbarter Glykanketten werden diese miteinander verknüpft. Dabei spielt die Diaminopimelinsäure bzw. das L-Lysin eine bedeutende Rolle, da beide mit ihrer zusätzlichen Aminogruppe die quervernetzende Peptidbindung ausbilden können. Bei gramnegativen Bakterien ist die häufigste Art der Peptidquervernetzung eine D,D-Bindung zwischen D-Ala und der m-Dpm. Es treten aber auch Verknüpfungen zwischen zwei m-Dpm-Resten auf (Glauner and Schwarz, 1983).

**Abb. 1.3. Struktur des Mureins von *E. coli***



Im 20-40 schichtigen Murein der grampositiven Bakterien findet die Verknüpfung der Tetrapeptidketten häufig nicht direkt statt, sondern über Interpeptidketten (z. B. Pentaglycinketten), die in ihrer Zusammensetzung von Spezies zu Spezies stark variieren.

Das überwiegend einschichtige Murein der gramnegativen Bakterien ist in seiner chemischen Komposition dagegen äußerst homogen (Quintela et al., 1995): Hauptquellen der Variation sind O-Acetylierungen der Zuckerreste und Amidierung der D-Glutaminsäure sowie die Menge des mureingebundenen Lipoproteins, das die äußere Membran an der Zellwand verankert. Als eine weitere Quelle der Variabilität des gramnegativen Mureins identifizierten Quintela et al. (Quintela et al., 1995) den Anteil von LD-Peptidbrücken zwischen zwei m-Dpm-Resten, der bei ihrer Untersuchung verschiedener gramnegativer Bakterienspezies zwischen 0,3 % (*P. putida*) und 15,6 % (*Aeromonas* spp.) schwankte.

### 1.1.2.2. Biosynthese der Bakterienzellwand

Die Biosynthese der Zellwand erfolgt in einem komplexen zweistufigen Prozeß: Zunächst wird durch Enzyme, die im Cytoplasma oder an der inneren Oberfläche der Cytoplasmamembran lokalisiert sind, ein Disaccharid-Peptid-Monomer gebildet. Im zweiten Schritt wird dieses Monomer auf der Außenseite der Cytoplasmamembran in das bereits bestehende Murein eingebaut.

Ausgangspunkt für die Bildung des Monomers im Cytoplasma ist UDP-gebundenes N-Acetylmuraminsäure-Pentapeptid. Dieses wird auf ein lipophiles Trägermolekül, das Un-

decaprenylphosphat (Bactoprenol), übertragen. Zusammen bilden diese beiden Komponenten das sogenannte Lipid I. Im nächsten Schritt wird das Lipid I an der Zellmembran unter Bildung von Lipid II mit N-Acetylglucosamid verknüpft. Der fertige Zellwandbaustein wird unter Abspaltung des Trägermoleküls auf der Zellwandseite der Membran freigesetzt. Hier erfolgt der Einbau in das bereits bestehende Peptidoglykangerüst durch die Bildung von Peptid- und Glykosidbindungen. In Transglykosylasereaktionen wird der Muramylrest mit einem freien N-Acetylglucosamin-Rest des schon bestehenden Mureins verknüpft. Transpeptidasereaktionen erzeugen die quervernetzenden Peptidbrücken. Dabei wird der terminale D-Alanin-Rest der Pentapeptidkette abgespalten und die freigewordene Carboxylgruppe mit der freien Aminogruppe einer benachbarten Peptidkette verknüpft. Von einigen Pentapeptidketten wird durch Carboxypeptidasen lediglich der terminale D-Alanin-Rest abgetrennt. Auf diese Weise wird der Grad der Quervernetzung modelliert.

Transglycosylase-, Transpeptidase- und Carboxypeptidasereaktionen werden durch die sogenannten Penicillinbindeproteine (PBPs) katalysiert. Für *E. coli* sind derzeit zwölf verschiedene PBPs beschrieben, die nach absteigendem Molekulargewicht nummeriert sind (Tabelle 1.2.).

**Tabelle 1.2. Penicillinbindeproteine von *E. coli***

PBP	Gen	MG (kDA)	Anteil an der Gesamt PBP-Menge	Funktion	Phänotyp bei Deletion	Referenz
1a	<i>ponA</i>	94,5	8,9	Transpeptidase/ Transglykosylase	Lyse bei Deletion von PBP1b	(Ishino et al., 1980)
1b	<i>ponB</i>	94,3	5,1	Transpeptidase/ Transglykosylase	Lyse bei Deletion von PBP1a	(Nakagawa et al., 1979)
1c	<i>pbpC</i>	85,1	n.b.	Transpeptidase/ Transglykosylase	Ohne Angabe	(Schiffer and Holtje, 1999)
2	<i>pbpA</i>	70,9	4,8	Transpeptidase	Sphären	(Ishino et al., 1986)
3	<i>ftsI</i>	63,9	5,3	Transpeptidase	Filamente	(Botta and Park, 1981)
4	<i>dacB</i>	51,8	4,8	DD-Carboxypeptidase/ DD-Endopeptidase	kein	(Korat et al., 1991)

Fortsetzung Tabelle 1.2. Penicillinbindeproteine von *E. coli*

PBP	Gen	MG (kDA)	Anteil an der Gesamt PBP-Menge	Funktion	Phänotyp bei Deletion	Referenz
5	<i>dacA</i>	46,9	31,9	DD-Carboxypeptidase	kein	(Broome-Smith et al., 1988)
6a	<i>dacC</i>	44,5	8,9	DD-Carboxypeptidase	kein	(Broome-Smith, 1985)
6b	<i>dacD</i>	43,3	n.b.	DD-Carboxypeptidase	kein	(Baquero et al., 1996)
7	<i>pbpG</i>	31,2	15,6	DD-Endopeptidase	kein	(Romeis and Holtje, 1994)
8		29,5	14,6	Abbauprodukt von PBP7	kein	(Henderson et al., 1994)
AmpH	<i>ampH</i>	40,1	n.b.	unbekannt	kein	(Henderson et al., 1997)

Grundsätzlich unterscheidet man die hochmolekularen von den niedermolekularen PBPs: Die hochmolekularen Penicillinbindeproteine PBP1a, PBP1b, PBP1c, PBP2 und PBP3 sind bei der Mureinsynthese von zentraler Bedeutung.

Bei den ersten beiden handelt sich um bifunktionelle Enzyme, die sowohl Transpeptidase- als auch Transglykosylaseaktivität aufweisen und daher beide für den Einbau des Peptidoglykanmonomers in das vorhandene Murein erforderlichen Reaktionen katalysieren. Während der Verlust beider Proteine letal ist, kann die Zelle die Deletion eines der beiden Gene kompensieren (Suzuki et al., 1978).

PBP1c weist eine hohe Homologie zu PBP1a und PBP1b auf, ist jedoch auch bei Überexpression nicht in der Lage, eine PBP1a/1b-Doppelmutation zu kompensieren. Da es außerdem eine gegenüber PBP1a und PBP1b eingeschränkte Auswahl von  $\beta$ -Laktamen bindet, wird vermutet, dass es *in vivo* nur als Transglykosylase fungiert (Schiffer and Holtje, 1999).

PBP2 und PBP3 sind monofunktionale Enzyme und zeigen Transpeptidaseaktivität. Der Verlust eines dieser Enzyme ist für die Zelle nicht letal, führt aber zu einer veränderten Zellmorphologie. Diese beiden Enzyme scheinen zu zwei verschiedenen Systemen zu gehören, von denen das eine speziell die Elongation beim Zellwachstum und das andere die

Bildung des Septums bei der Zellteilung bewirkt (Spratt, 1975). PBP2 ist zusammen mit dem integralen Membranprotein RodA für die Mureinsynthese beim Längenwachstum zuständig, sein Verlust führt zu der Bildung von Sphären. PBP3 spielt eine zentrale Rolle bei der Einführung des Septums für die Zellteilung (Wang et al., 1998). Für seine Aktivität benötigt es ebenfalls ein integrales Membranprotein, das eine hohe Homologie zu RodA aufweist (Ikeda et al., 1989). Der Verlust von PBP3 führt zu der Bildung von Filamenten (Botta and Park, 1981); (Spratt, 1977).

Die physiologische Rolle der niedermolekularen PBPs ist nicht eindeutig geklärt. Sie katalysieren Carboxypeptidase- und Endopeptidasereaktionen. Da der Verlust dieser Proteine keine Auswirkungen auf die Zellmorphologie hat (Henderson et al., 1997), werden sie auch als nicht-essentielle PBPs beschrieben. PBPs mit D,D-Endopeptidase-Aktivität sind PBP4, PBP7 und dessen Abbauprodukt PBP8. Die Spaltung der Peptidbrücken zwischen benachbarten Mureinsträngen ist eine Voraussetzung für die Insertion neuer Peptidoglycanvorläufermoleküle. D,D-Carboxypeptidase-Reaktionen werden von PBP4, 5, 6a und 6b katalysiert. Sie spalten den terminalen D-Alanin-Rest vom Pentapeptid ab und nehmen über diese Reifung des Mureins möglicherweise Einfluß auf die Abstimmung von Elongation und Zellteilung (Holtje, 1996).

Da der Mureinsacculus sich als eine kovalent geschlossene Hülle um die Bakterienzelle herum darstellt, sind für das Zellwachstum lytische Reaktionen erforderlich, die den Einbau neuen Materials ermöglichen. Neben den bereits erwähnten D,D-Endopeptidasen sorgt dafür eine weitere Gruppe von Enzymen, die lytischen Transglycosylasen, die die  $\beta$ -1,4-glykosidischen Bindungen zwischen GlcNAc und MurNAc spalten. Dabei übertragen sie den Glykosid-Anteil nicht auf ein Wassermolekül, sondern in einer intramolekularen Glycosyl-Transferase-Reaktion auf die C-6 Hydroxylgruppe der Muraminsäure (Holtje et al., 1975). Als Produkte dieser Reaktion entstehen die sogenannten Anhydromuramylpeptide. Diese bestehen aus einer Disaccharideinheit, zusammengesetzt aus N-Acetylglucosamin und 1,6-Anhydromuraminsäure, und einem Peptidrest. Möglicherweise spielt die spezielle intramolekulare Ringstruktur mit der 1,6-Anhydrofunktion eine Rolle bei der Unterscheidung von Mureinabbauprodukten und -vorläufermolekülen. Tabelle 1.3. zeigt die derzeit bei *E. coli* bekannten lytischen Transglycosylasen.

**Tabelle 1.3. Lytische Transglycosylasen von *E. coli***

Enzym	Gen	MG	Lokalisation	Spaltung	PBP-Wechselwirkung	Referenz
MltA	mltA	38	äußere Membran	exolytisch	1b, 1c, 2, 3	(Lommatzsch et al., 1997); (Vollmer et al., 1999)
MltB	mltB	39	äußere Membran	exolytisch	1a, 1b, 3	(Ehlert et al., 1995)
MltC	mltC	40	äußere Membran	exolytisch	n.b.	(Dijkstra and Keck, 1996)
MltD	mltD	50	äußere Membran	n.b.	n.b.	(Dijkstra, 1997)
Slt35		35	Periplasma	exolytisch	n.b.	(Dijkstra et al., 1995); (Engel et al., 1992)
Slt70	sltY	70	Periplasma	exolytisch	1b, 1c, 2, 3, 7, 8	(Engel et al., 1991)
EmtA	emtA	22	äußere Membran	endolytisch	n.b.	(Kraft et al., 1998)

Es handelt sich überwiegend um exolytische Enzyme, die den Glykanstrang von einem Ende her jeweils um eine Disaccharideinheit verkürzen. MltA, MltB, MltC und MltD sind Lipoproteine, die in der äußeren Membran lokalisiert sind. Die löslichen lytischen Transglycosylasen Slt35 und Slt70 befinden sich im Periplasma. Slt35 ist ein proteolytisches Abbauprodukt von MltB, das katalytisch aktiv ist. Bei der Slt70 handelt es sich um ein ringförmiges Multi-Domänen Protein (Thunnissen et al., 1994), dessen aktives Zentrum auf der Innenseite des Ringes lokalisiert ist (Thunnissen et al., 1995).

Da der Mureinsacculus eine unter starker Spannung stehende Struktur ist, müssen die hydrolytischen und synthetischen Reaktionen beim Zellwachstum gut aufeinander abgestimmt sein, um die Integrität und Stabilität der Zellwand jederzeit zu gewährleisten. Dies gilt insbesondere für das einschichtige Murein der gramnegativen Bakterien.

Koch schlug 1990 dafür die „make-before-break strategy“ vor (Koch, 1990), nach der neu einzufügendes Murein an das bereits bestehende Peptidoglykan gebunden wird, bevor kovalente Bindungen an der Befestigungsstelle des hinzugefügten Materials hydrolysiert werden. Diese Theorie wurde von Höltje in seinem „drei-für-eins Modell“ konkretisiert

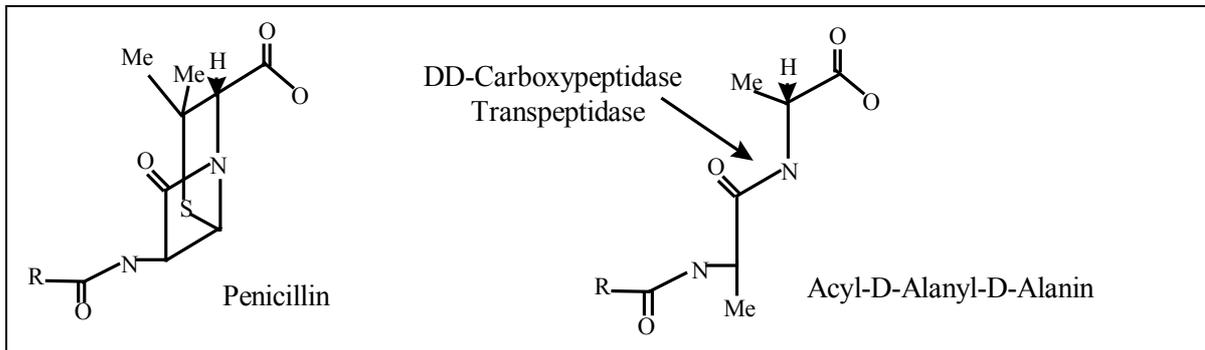
(Holtje, 1993). Danach werden zunächst drei miteinander quervernetzte Glykanstränge synthetisiert. Dieses Murein Tripletts ersetzt dann einen Glykanstrang, den sogenannten Andockstrang, so dass der Sacculus insgesamt um zwei Stränge erweitert wird. Die Verknüpfung der neuen Stränge mit den beiden den Andockstrang umgebenden Glykansträngen erfolgt über die freien Aminogruppen der mDpm in den Querverbindungen auf beiden Seiten des Andockstrangs. Dann wird der Andockstrang durch spezifische Spaltung der D-Ala-mDpm-Peptidbindungen freigesetzt und durch die lytischen Transglykosylasen abgebaut. Das neue Material wird schließlich durch die im Sacculus herrschende Spannung in die bestehende Peptidoglykan-Schicht gezogen.

Es wird angenommen, daß die verschiedenen Schritte der Mureinbiosynthese durch die Organisation der beteiligten Proteine in Multienzym-Komplexen koordiniert werden. Protein-Protein-Interaktionsstudien mittels Affinitäts-Chromatographie haben gezeigt, dass Mureinhydrolasen und –synthasen direkt miteinander interagieren (Tabelle 1.3.).

### **1.1.3. Wirkungsweise der $\beta$ -Laktam-Antibiotika**

$\beta$ -Laktame wirken durch die Störung des komplexen Vorgangs der Zellwandsynthese auf wachsende Zellen bakterizid. Hauptangriffspunkt der  $\beta$ -Laktam-Antibiotika ist die D,D-Transpeptidasereaktion. Der für die  $\beta$ -Laktame charakteristische  $\beta$ -Laktamring ist struktur-analog zu der Peptidbindung zwischen den beiden terminalen D-Alanin-Resten des N-Acetylglucosamin-N-Acetylmuraminsäure-Pentapeptids. Die Transpeptidasen akzeptieren das Antibiotikum daher als Substrat und werden unter Öffnung des  $\beta$ -Laktamrings acyliert. Die kovalente Bindung an den Ring kommt durch Ausbildung eines Esters mit der Hydroxylgruppe des Serins im aktiven Zentrum des Enzyms zustande. Sie ist praktisch irreversibel und blockiert somit die weitere Vernetzung des Peptidoglykans.

**Abb. 1.4. Schematischer Vergleich: Penicillin, Acyl-D-Ala-D-Ala-Ende des Pentapeptids**



Der genaue Mechanismus, der dann zum Zelltod führt, ist noch nicht vollständig geklärt und scheint bei verschiedenen Spezies unterschiedlich zu sein (Bryan and Godfrey, 1991).

Nach dem oben beschriebenen Modell lässt sich die eintretende Zellyse dadurch erklären, daß der Peptidoglykan-Andockstrang durch die lytischen Transglykosylasen abgebaut wird, ohne daß zuvor neusynthetisiertes Material eingeführt wurde.

Auch die D,D-Carboxypeptidasen werden durch  $\beta$ -Laktam-Antibiotika auf die beschriebene Weise gehemmt. Für die antibakterielle Wirkung ist diese Reaktion jedoch von untergeordneter Bedeutung.

## 1.2. Resistenz gegenüber $\beta$ -LaktamAntibiotika

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

Mikroorganismen, die in der Lage sind, sich bei therapeutisch relevanten Konzentrationen eines Antibiotikums zu vermehren, bezeichnet man als klinisch resistent gegenüber dieser Substanz. Von biologischer Resistenz spricht man, wenn sich einzelne Stämme einer Spezies von der übrigen Population durch verminderte Empfindlichkeit gegenüber dem Antibiotikum unterscheiden (Kresken and Wiedemann, 1987).

Die Resistenz gegenüber  $\beta$ -Laktam-Antibiotika kann auf verschiedenen genetischen und biochemischen Mechanismen beruhen.

### **1.2.1. Resistenz aufgrund der Veränderung von Zielstrukturen**

Ein möglicher Resistenzmechanismus gegenüber  $\beta$ -Laktam-Antibiotika besteht in der Veränderung der für die Wirkung verantwortlichen Zielstrukturen, der Penicillinbindeproteine. Mutationen in den Genen für Transpeptidasen und Carboxypeptidasen können eine verringerte Affinität dieser Proteine für  $\beta$ -Laktame zur Folge haben, so daß diese nicht mehr gebunden werden. Eine ähnliche Wirkung wie die Veränderung der Penicillinbindeproteine hat die Bildung eines zweiten, unempfindlichen Targets, das bei Hemmung der ursprünglichen Enzymform deren Funktion übernimmt. Diese Resistenzmechanismen spielen jedoch für die klinisch relevanten Resistenzen der meisten gramnegativen Bakterien gegenüber  $\beta$ -Laktam-Antibiotika nur eine untergeordnete Rolle.

### **1.2.2. Resistenz aufgrund passiver Zugangsbehinderung**

Eine größere Bedeutung hat dagegen die Resistenz aufgrund der Impermeabilität der äußeren Membran durch Verlust oder Veränderung der Porine. Der Verlust des Porins OprD kann z. B. bei *P. aeruginosa* zu einer deutlich verringerten Carbapenem-Aufnahme führen und die Minimalen Hemmkonzentrationen von 1 - 2 mg/L auf 8 - 36 mg/L anheben (Livermore and Yang, 1989).

### **1.2.3. Resistenz aufgrund enzymatischer Inaktivierung des $\beta$ -Laktams**

Wichtigster Resistenzmechanismus von gramnegativen Bakterien gegenüber  $\beta$ -Laktam-Antibiotika ist jedoch die enzymatische Hydrolyse des  $\beta$ -Laktamrings durch  $\beta$ -Laktamasen, die zur Inaktivierung des Antibiotikums führt (Wiedemann et al., 1989).

Mit Ausnahme einiger zinkabhängiger Enzyme erfolgt bei dem überwiegenden Teil der  $\beta$ -Laktamasen die Spaltung des  $\beta$ -Laktamrings über die Ausbildung eines Serinesters. Dabei kommt es zunächst zur nicht-kovalenten Assoziation von Enzym und  $\beta$ -Laktam. In der Folge greift dann die freie Hydroxylgruppe der Seitenkette eines Serins im aktiven Zentrum der  $\beta$ -Laktamase den  $\beta$ -Laktamring unter Bildung eines kovalenten Acylesters an. Die Hydrolyse dieses Esters setzt schließlich das Enzym und das inaktivierte  $\beta$ -Laktam-Antibiotikum frei. Dieser rasch ablaufende Prozeß stellt den grundlegenden Unterschied zu

der Reaktion zwischen  $\beta$ -Laktam und PBP dar, die einen stabilen Serinester ausbilden (Livermore, 1995).

Nach Bush et al. erfolgt die Klassifizierung von  $\beta$ -Laktamasen aufgrund phänotypischer Eigenschaften (Bush et al., 1995): Unter Berücksichtigung von Substratspektrum und Hemmbarkeit durch verschiedene Inhibitoren werden alle bisher beschriebenen  $\beta$ -Laktamasen in vier funktionale Gruppen eingeteilt. Diese Gruppen zeigen eine gute Übereinstimmung mit den von Ambler nach Sequenzähnlichkeit zusammengestellten molekularen Klassen A, B, C und D (Ambler, 1980), Tabelle 1.4.).

**Tab. 1.4. Korrelation zwischen molekularer und funktionaler Klassifizierung von  $\beta$ -Laktamasen (nach Bush et al., 1995)**

Molekulare Klasse (Ambler)	Funktionale Gruppe (Bush)	Bevorzugtes Substrat	Inhibition durch		Beispiel	
			CLA	EDTA		
Serin $\beta$ -Laktamase	A	Penicilline	+	-	<i>S. aureus</i>	
	2a	Penicilline	+	-		
	2b	Penicilline, Engspektrum-Cephalosporine	+	-	TEM-1, TEM-2, SHV-1	
	2be	Penicilline, Eng- und Breit-spektrum-Cephalosporine	+	-	TEM-3, SHV-2, K1	
	2br	Penicilline	±	-	TEM-30	
	2c	Penicilline, Carbenicillin	+	-	PSE-1, CARB-3	
	2e	Cephalosporine	+	-	<i>Proteus vulgaris</i>	
	2f	Penicilline, Cephalosporine, Carbapeneme	+	-	IMI-1, NMC-A	
	C	1	Cephalosporine	-	-	<i>E. cloacae</i> P99, MIR-1
	D	2d	Penicilline, Cloxacillin	±	-	OXA-1
noch nicht zugeordnet	4	Penicilline	-	?	<i>Pseudomonas cepacia</i>	
Zink $\beta$ -Laktamase	B	3	die meisten $\beta$ -Laktame inklusive Carbapeneme	-	+	L1

Für die mikrobiologische Praxis ist der Codierungsort einer  $\beta$ -Laktamase von Bedeutung, da chromosomale Enzyme für eine bestimmte Spezies charakteristisch sind, während plasmidcodierte  $\beta$ -Laktamasen weniger universell in einer bestimmten Spezies vertreten sind und ihre Ausbreitung Speziesgrenzen überschreitet. Chromosomale  $\beta$ -Laktamasen sind unter den gramnegativen Bakterien weit verbreitet. Als das „typische“ Enzym der *Enterobacteriaceae*, das aber auch in vielen Nonfermentern nachgewiesen wurde, ist die chromosomale AmpC- $\beta$ -Laktamase, eine Cephalosporinase der molekularen Klasse C, anzusehen. Sie ist in der Regel induzierbar und wird nur in Gegenwart von  $\beta$ -Laktamen exprimiert. Eine Ausnahme bilden *E. coli* sowie die Shigellen, bei denen dieses Enzym nicht induzierbar und in für die klinische Resistenz unbedeutenden Mengen gebildet wird (Normark et al., 1980; Sykes and Matthew, 1979).

Für die Spezies *Enterobacter cloacae* und *Citrobacter freundii* ist der Regulationsmechanismus der  $\beta$ -Laktamase-Expression weitgehend aufgeklärt. Er ist eng mit dem Peptidoglykan-Stoffwechsel der Bakterienzelle verknüpft.

### **1.3. Regulation der $\beta$ -Laktamase-Expression bei *Enterobacter cloacae* und *Citrobacter freundii***

Die im Folgenden beschriebenen Gene sind an der Induktion der chromosomalen  $\beta$ -Laktamase von *Enterobacter cloacae* und *Citrobacter freundii* beteiligt:

#### *ampC*

Das Gen *ampC* ist das Strukturgen für die chromosomale  $\beta$ -Laktamase.

#### *ampR*

Die Expression von *ampC* wird durch den Transkriptionsfaktor AmpR kontrolliert. AmpR gehört zu der Familie der LysR-Proteine. Diese DNA-bindenden Proteine zeichnen sich durch ein konserviertes Helix-turn-Helix Motiv aus (Henikoff et al., 1988).

Das *ampR*-Gen liegt direkt stromaufwärts von *ampC* und wird in die entgegengesetzte Richtung abgelesen, da sich die Promotoren der beiden Gene überlappen. AmpR bindet an die intercistronische Region von *ampC* und *ampR*. Dort reprimiert es autoregulatorisch seine eigene Expression und kontrolliert in Abhängigkeit von konformationsändernden

Kofaktoren die Transkription der AmpC- $\beta$ -Laktamase (Lindquist et al., 1989); (Jacobs et al., 1997). Bei diesen Kofaktoren handelt es sich um Peptidoglykan-Vorläufermoleküle. Jacobs konnte in einem in vitro Transkriptionsassay zeigen, daß gereinigtes AmpR die Expression von *ampC* aktiviert (Jacobs et al., 1997). UDP-N-Acetylmuraminsäure-Pentapeptid, das Peptidoglykan-Vorläufermolekül, supprimiert diese grundsätzlich fördernde Wirkung von AmpR. In Anwesenheit von Anhydromuramyltri- und -tetrapeptiden wird AmpR jedoch wieder zu einem Aktivator der *ampC*-Transkription, was eine Verdrängung des Suppressors durch die Peptide vermuten läßt. Die Wirkung von Anhydromuramylpentapeptiden wurde in dieser Studie nicht untersucht. Dietz et al. stellten fest, daß nur die Menge der Anhydromuramylpentapeptide im Cytoplasma mit der  $\beta$ -Laktamase-Menge korreliert (Dietz et al., 1997). Dementsprechend scheinen diese Zellwandbausteine die eigentlichen Signalmoleküle zu sein.

Bakterienspezies wie *E. coli*, deren chromosomale  $\beta$ -Laktamase nicht induzierbar ist, besitzen kein *ampR*. Mutationen in *ampR* können verschiedene Auswirkungen haben. So hat ein Serin-Phenylalanin-Aminosäureaustausch an der Position 35 zur Folge, daß AmpR nicht mehr an die intercistronische Region von *ampC* und *ampR* binden kann (Bartowsky and Normark, 1991). Daraus resultiert ein nicht induzierbarer Phänotyp. Dagegen führt ein Glycin-Glutaminsäure-Austausch an der Position 102 zu konstitutiver Derepression der  $\beta$ -Laktamase-Expression (Bartowsky and Normark, 1991). Offensichtlich hat diese Mutation ein AmpR-Protein zur Folge, dessen Konformation auch in Abwesenheit positiver Effektoren transkriptionsaktivierend wirkt.

### *ampD*

AmpD ist ein cytoplasmatisches Protein (Kopp et al., 1993). Als N-Acetyl-Anhydromuramyl-L-Alanin-Amidase ist es an der intrazellulären Wiederverwertung des Peptidoglykans beteiligt (Holtje et al., 1994; Jacobs et al., 1995). Die Amidase spaltet die Amidbindung von Anhydromuramylpeptiden zwischen der Carboxylgruppe der Anhydromuraminsäure und der  $\alpha$ -Aminogruppe des L-Alanins. Dabei werden die Anhydro-N-Acetyl-Muraminsäure und der Peptidrest freigesetzt (Jacobs et al., 1995). Durch den Abbau der Signalmoleküle wirkt AmpD als negativer Regulator der *ampC*-Expression (Holtje et al., 1994). Mutationen in *ampD* führen daher zu Hyperinduzierbarkeit oder konstitutiver Überproduktion der  $\beta$ -Laktamase.

*ampG*

Das *ampG*-Gen codiert ein integrales Membranprotein, das als Permease für Anhydro-muramylpeptide fungiert (Dietz et al., 1997; Jacobs et al., 1994). Fehlt *ampG*, so akkumulieren diese im Periplasma. Die  $\beta$ -Laktamase-Expression solcher Mutanten ist nicht mehr induzierbar (Korfmann and Sanders, 1989).

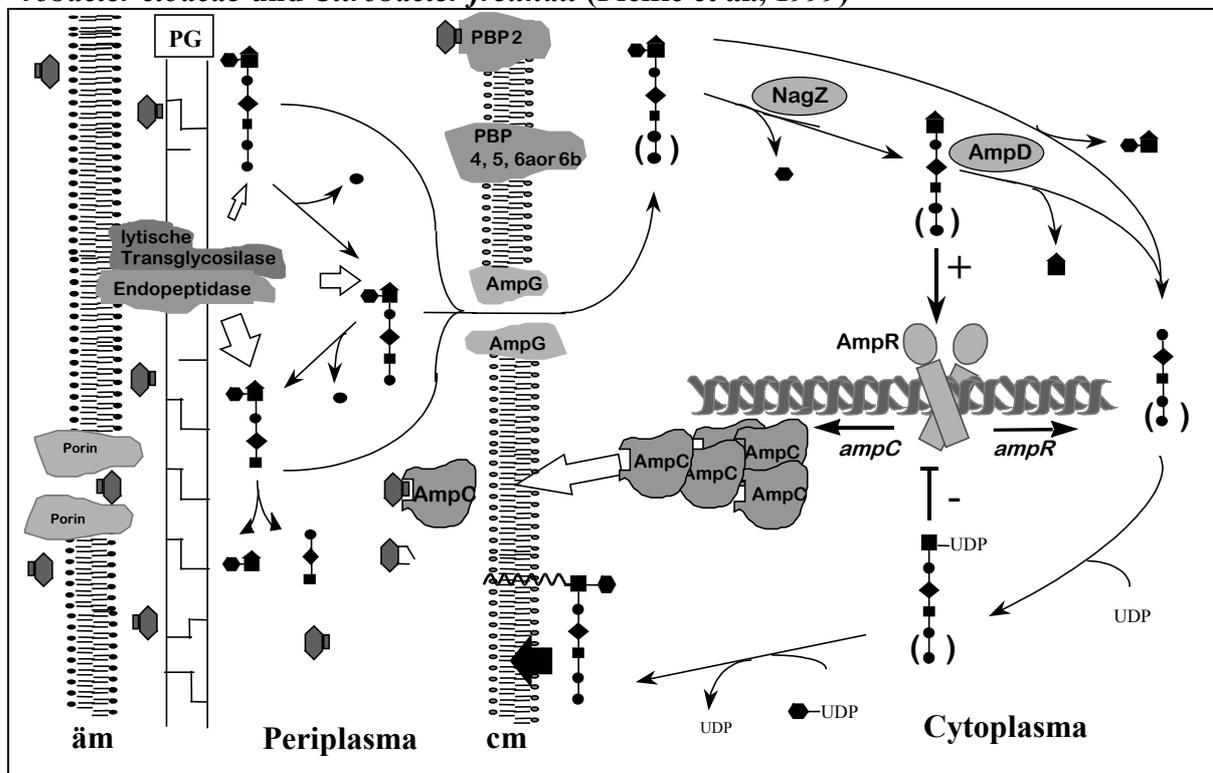
*nagZ*

NagZ ist eine N-Acetyl-Glykosaminidase, die die Anhydro-Disaccharid-Oligopeptide in N-Acetyl-Glucosamin und Anhydro-N-Acetyl-Muraminsäure-Oligopeptide spaltet (Park, 1993).

*pbp2*

Das Penicillinbindeprotein Pbp2 ist bei *E. coli* für die Induktion des klonierten *ampC*-Gens von *Citrobacter freundii* essentiell (Oliva et al., 1989).

**Abb. 1.5. Modell für die Induktion der chromosomalen AmpC  $\beta$ -Laktamase bei *Enterobacter cloacae* und *Citrobacter freundii* (Pfeifle et al., 1999)**



$\beta$ -Laktam  
  Glutaminsäure  
  Diaminopimelinsäure  
  Alanin  
  Disaccharid

Auslöser für die Induktion der chromosomalen  $\beta$ -Laktamase ist die vermehrte Bildung von Zellwandabbauprodukten, den Anhydromuramylpeptiden, als Antwort auf die Hemmung der PBPs durch das  $\beta$ -Laktam-Antibiotikum.

Diese Abbauprodukte gelangen durch die Permease AmpG ins Cytoplasma. Hier wird durch NagZ N-Acetylglucosamin abgespalten. Die so entstandenen Muropeptide spaltet AmpD in 1,6-Anhydromuraminsäure und den entsprechenden Peptidanteil. Die Peptide werden dann dem Peptidoglykan-Metabolismus wieder zugeführt. Durch den vermehrten Abbau der Zellwand ist die Amidase jedoch überlastet. Es kommt zu einer Anreicherung der Anhydromuramylpeptide im Cytoplasma. Durch die Bindung an den Transkriptionsfaktor AmpR verdrängen sie ein Suppressormolekül, das Peptidoglykan-Vorläufermolekül UDP-N-Acetylmuramyl-Pentapeptid. Die darauf erfolgende Konformationsänderung von AmpR ermöglicht die Bindung der RNA-Polymerase und führt so zu der Aktivierung der Transkription von *ampC* (Jacobs et al., 1997).

Untersuchungen an anderen Spezies der *Enterobacteriaceae* deuten darauf hin, daß dieser Regulationsmechanismus unter den gramnegativen Bakterien weit verbreitet ist.

So liegt auch das *ampC*-Gen der chromosomalen, induzierbaren  $\beta$ -Laktamase von *Morganella morganii* in unmittelbarer Nachbarschaft zu einem *ampR*-Gen, welches wie bei *Enterobacter cloacae* in die entgegengesetzte Richtung abgelesen wird (Poirel et al., 1999). Ein ähnlicher Regulationsmechanismus wie bei *Enterobacter* läßt sich außerdem vermuten, da die Transformation eines nicht induzierbaren *M. morganii* Stamms mit einem Plasmid, das *Enterobacter ampD* enthielt, den induzierbaren Phänotyp wiederherstellte.

Auch für *Yersinia enterocolitica*, die ebenfalls eine induzierbare AmpC- $\beta$ -Laktamase produziert, wurde die charakteristische Anordnung von *ampR* und *ampC* gefunden (Seoane et al., 1992). Die Beteiligung von AmpD und AmpG an der Regulation ist allerdings noch nicht nachgewiesen.

Doch nicht nur  $\beta$ -Laktamasen der Klasse C sondern auch induzierbare  $\beta$ -Laktamasen der Klasse A stehen unter der Kontrolle von AmpR-ähnlichen Transkriptionsfaktoren. Dies gilt beispielsweise für die Enzyme von *Proteus vulgaris* (Datz et al., 1994) und *Citrobacter koseri* (Jones and Bennett, 1995). In beiden Fällen konnte auch eine Beteiligung von AmpD und AmpG gezeigt werden.

Die Expressionskontrolle über einen AmpR-ähnlichen Transkriptionsfaktor ist auch außerhalb der *Enterobacteriaceae* gefunden worden. Die chromosomale AmpC- $\beta$ -Laktamase

von *Pseudomonas aeruginosa* ist ebenfalls über AmpR reguliert: Wie bei *Enterobacter cloacae* befindet sich stromaufwärts von *ampC* das *ampR*-Gen, welches in die entgegengesetzte Richtung abgelesen wird. Die Aminosäuresequenz von AmpR zeigt eine hohe Übereinstimmung mit *Enterobacter cloacae* und *Citrobacter freundii* AmpR (62,5% bzw. 58,3%). Auch die spezifische Bindung von AmpR an die intercistronische Region von *ampC* und *ampR* konnte nachgewiesen werden (Lodge et al., 1993).

Das *ampD* Genprodukt stimmt mit AmpD von *E. cloacae* zu 62% überein und wirkt als negativer Regulator der  $\beta$ -Laktamase Regulation (Langae et al., 1998).

#### **1.4. Zwei-Komponenten-Regulation der chromosomalen $\beta$ -Laktamasen von *Aeromonas* spp.**

Für Spezies der Gattung *Aeromonas*, die ebenfalls den Nonfermentern zugeordnet werden, wurde dagegen ein ganz anderer Kontrollmechanismus für die  $\beta$ -Laktamase-Expression gefunden. Dabei spielt ein Zwei-Komponenten-System eine wesentliche Rolle.

Zwei-Komponenten-Systeme detektieren und transduzieren spezifische Signale zur Anpassung der bakteriellen Zelle an Änderungen in der Umwelt. Sie spielen beispielsweise bei der Adaptation der Zellphysiologie an Sauerstofflimitierung (Iuchi et al., 1990) sowie an Phosphat- oder Stickstoffmangel (Stewart et al., 1989; Wanner, 1993) eine wichtige Rolle und können auch die Umstellung auf eine neue Kohlenstoffquelle vermitteln (Bott et al., 1995).

Der Informationstransfer erfolgt über Phosphorylierungsreaktionen (zur Übersicht: (West and Stock, 2001)). Die Signalerkennung wird durch die Familie der Histidin-Proteinkinasen (Sensorkinasen) geleistet. Dies sind in der Regel integrale Membranproteine mit einer N-terminalen, periplasmatischen Input-Domäne und einer konservierten, cytoplasmatischen "Transmitterdomäne". Bindet das Signal an die periplasmatische Input-Domäne, so katalysiert die Transmitterdomäne unter ATP-Verbrauch die Phosphorylierung einer Histidin-Seitenkette. Phosphohistidin dient dann im Allgemeinen als Donor für die Phosphorylierung eines Aspartat-Restes am sog. *Response Regulator*. Diese zweite Komponente des Regulationssystems ist durch eine konservierte N-terminale Empfängerdomäne charakterisiert, die üblicherweise mit einer Effektorfunktion (Outputdomäne) assoziiert ist. Letztere verfügt häufig über ein Helix-turn-Helix DNA-Bindemotiv. In diesem Fall führt die

Phosphorylierung der Aspartat-Seitenkette in der Empfängerdomäne über die Änderung der Effektor-domäne zu einer Modulation der Transkription eines oder mehrerer Gene.

Die Phosphorylierung sowie die darauf folgende Dephosphorylierung des Aspartat-Restes wird wahrscheinlich durch den Transkriptionsfaktor selbst katalysiert, so daß sein Phosphorylierungsstatus dynamisch ist und einen kontinuierlichen Nachschub von der Sensorkinase erfordert.

Der beschriebene Mechanismus ermöglicht es einer Bakterienzelle, durch veränderte Genexpression auf Änderungen in der Umwelt zu reagieren.

Bei Spezies der Gattung *Aeromonas* induziert die Gegenwart von  $\beta$ -Laktamen die Expression von drei verschiedenen  $\beta$ -Laktamasen. Es handelt sich um eine Penicillinase der molekularen Klasse D, eine Cephalosporinase der Klasse C und eine Carbapenemase der Klasse B (Hayes et al., 1994; Hayes et al., 1996; Walsh et al., 1995). Für die Expression der  $\beta$ -Laktamase-Gene ist ein gemeinsamer Regulationsmechanismus anzunehmen (Walsh et al., 1995), da einzelne  $\beta$ -Laktame die Produktion aller drei Enzyme induzieren. Ein weiterer Hinweis auf eine koordinierte Regulation ergibt sich aus dereprimierten Mutanten, die alle drei  $\beta$ -Laktamasen überproduzieren. Diese entstehen mit einer Frequenz von  $10^{-8}$ - $10^{-7}$ , was der Häufigkeit einer einzigen Punktmutation entspricht (Walsh et al., 1997).

Alksne und Rasmussen beobachteten, daß die Expression der  $\beta$ -Laktamase-Gene von *Aeromonas jandaei* in *E. coli* durch das Gen *blrA* aktiviert wird, dessen Sequenz starke Ähnlichkeit mit Transkriptionsfaktoren von Zwei-Komponenten-Systemen hat (Alksne and Rasmussen, 1997). Insbesondere beträgt die Identität des Genprodukts BlrA mit dem *E. coli* Response Regulator CreB 63 % (Alksne and Rasmussen, 1997).

Bei der Untersuchung der genetischen Umgebung der drei  $\beta$ -Laktamase-Gene von *A. hydrophila* zeigte sich, daß das Gen für den Transkriptionsfaktor BlrA stromaufwärts des Penicillinasegens *ampH* liegt und nur durch ein weiteres Gen von diesem getrennt ist (Avison et al., 1999). Das Produkt des unmittelbar vor *ampH* befindlichen Gens (*blrB*) ist zu 51% identisch mit der *E. coli* Sensorkinase CreC (Avison et al., 2000a). Da zwischen *blrB* und *blrA* kein Transkriptionsterminator zu erkennen ist, scheinen die beiden Gene ein Operon zu bilden (Niumsup, 1998), wie es allgemein für die beiden Komponenten von Zwei-Komponenten-Systemen bekannt ist (Albright et al., 1989). Die Funktion von BlrB als Sensorkinase wird durch eine  $\beta$ -Laktamase-hyperproduzierende *blrB*-Mutante bestätigt,

die eine Punktmutation im für die Kinasefunktion wichtigen Genabschnitt aufweist. Klonierung von *blrB* aus dieser Mutante und Expression in einem Wildtyp-Stamm führen bei diesem zum dereprimierten Phänotyp (Avison et al., 2001).

118 bp stromabwärts von *ampH* liegt ein weiteres Gen, das *blrD*, dessen Produkt zu 35% identisch mit CreD ist, einem weiteren Gen des *E.coli cre*-Operons (Avison et al., 2000a; Niumsup, 1998). Das nach der DNA-Sequenz zu erwartende Protein ist überwiegend hydrophob, es besitzt sechs Transmembran-Domänen, dazwischen eine große periplasmatische Schleife. Die Funktion dieses Proteins ist nicht bekannt. Möglicherweise fördert es als Permease die Aufnahme des spezifischen Signals in die Zelle und tritt damit in Konkurrenz zu dem Signalsensor BlrB (Niumsup, 1998).

Die gleiche genetische Anordnung ist auch in *A. caviae*, *A. jandaei*, *A. mediae*, *A. salmonicida* und *A. veronii* bv. *sobria* nachgewiesen worden (Walsh et al., 1997).

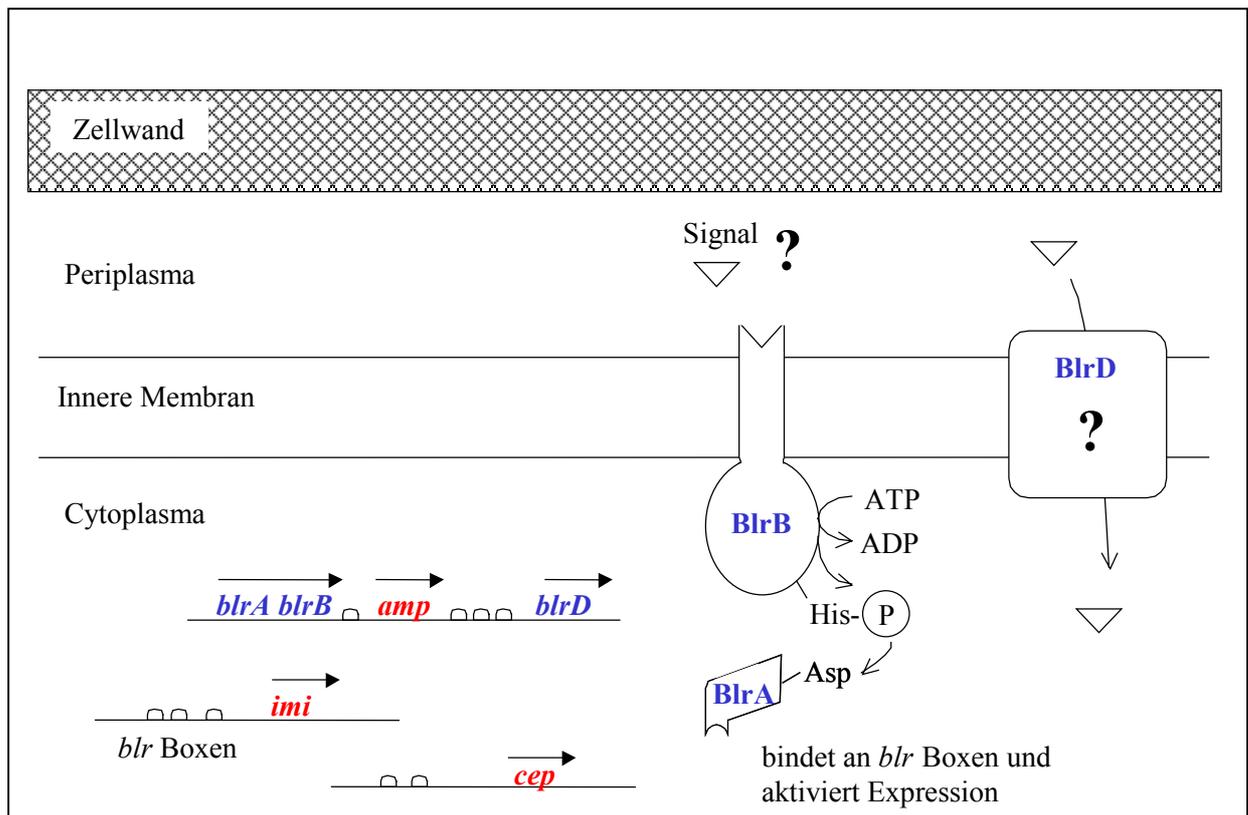
Untersuchungen zur Expression mittels Real-Time-PCR zeigen, daß die RNA-Mengen der drei  $\beta$ -Laktamase-Gene und von *blrD* bei der hyperproduzierenden Mutante gegenüber dem Wildtyp stark erhöht sind (Bennett, 2002). Demnach werden nicht nur die  $\beta$ -Laktamase-Gene sondern auch *blrD* koordiniert reguliert.

Da eine RT-PCR mit RNA von *A. hydrophila* mit einem Primer passend zu *ampH* und dem anderen im *blrD*-Gen kein Produkt lieferte, scheint die Überexpression von *blrD* nicht auf ein Durchlesen vom *ampH*-Transkript zurückzuführen zu sein, sondern umfaßt offenbar eine unabhängige Aktivierung des *blrD*-Promotors (Bennett, 2002).

Eine koordinierte Expression von Genen, die nicht dem gleichen Operon angehören, legt die Vermutung einer gemeinsamen regulatorischen Sequenz nahe. Tatsächlich tritt bei allen vier Genen eine kurze 7-Nukleotid-Sequenz (CTTCACC/A) innerhalb von 70bp vor dem Transkript-Start auf. Dies könnten Bindestellen für den Transkriptionsfaktor BlrA sein (*blr*-Box). Während bei drei der vier Gene mehrere Kopien dieser Sequenz hintereinander geschaltet sind, findet man bei *ampH* nur eine Kopie. Die Stärke der uninduzierten Expression der *blr*-Box-Gene korreliert entgegengesetzt mit der Anzahl der *blr*-Boxen (Avison et al., 2000b). Dies deutet darauf hin, daß die Expression der  $\beta$ -Laktamase-Gene nicht nur durch die Anwesenheit des Signals aktiviert, sondern in dessen Abwesenheit auch unterdrückt wird.

Abbildung 1.6. zeigt ein Modell zur Zwei-Komponenten-Regulation bei der Induktion der Laktamase-Produktion bei *Aeromonas* spp., das die derzeitigen Kenntnisse über den Regulationsmechanismus zusammenfaßt.

**Abb. 1.6.: Modell zur Zwei-Komponenten-Regulation bei der Induktion der Laktamase-Produktion bei *Aeromonas* spp.**



Welches Signalmolekül zur Autophosphorylierung der Sensorkinase führt, ist nicht bekannt. Da das Signal durch die Sensorkinase schon im Periplasma detektiert werden kann, könnte das  $\beta$ -Laktam-Molekül, welches zwar die äußere Membran, nicht aber die Cytoplasmamembran durchdringen kann, grundsätzlich selber als Signal wirken. Dagegen spricht jedoch, daß BlrB keines der typischen Aminosäure-Motive von Penicillinbindete-proteinen oder anderen mit  $\beta$ -Laktamen interagierenden Proteinen besitzt (Niumsüp, 1998). Da  $\beta$ -Laktam-Antibiotika primär eine Störung des Zellwandstoffwechsels durch Inaktivierung der PBPs bewirken, ist zu vermuten, daß es sich bei dem Signal möglicherweise wie bei der  $\beta$ -Laktamase-Induktion von *Enterobacter* spp. um ein Peptidoglykan-Fragment handelt.

### **1.5. Zielsetzung**

Das Bild von der Zwei-Komponenten-Regulation bei *Aeromonas veronii* soll vervollständigt werden. Insbesondere ist zu klären, welche Vorgänge in Gegenwart von  $\beta$ -Laktamen zur Autophosphorylierung der Sensorkinase führen. Zu diesem Zweck sollen zum einen mittels Transposonmutagenese weitere an der Regulation beteiligte Komponenten identifiziert werden. Ausgehend von der Annahme, daß auch bei *Aeromonas* spp. die Störung des Zellwandstoffwechsels durch die Bindung des  $\beta$ -Laktams an Penicillinbindeteine und die darauf folgende erhöhte Freisetzung von Abbauprodukten eine wesentliche Rolle für die Induktion der chromosomalen  $\beta$ -Laktamasen spielen, ist zum anderen eine eingehende Untersuchung des Zellwandstoffwechsels vorgesehen. Insbesondere durch Analyse der Zusammensetzung der löslichen Muropeptide bei basaler und erhöhter Expression soll der Zusammenhang zwischen Zellwandstoffwechsel und  $\beta$ -Laktamase-Expression aufgeklärt werden.

## 2. Material & Methoden

### 2.1. Material

#### 2.1.1. Bakterienstämme

Der Stamm *Aeromonas veronii* bv. Sobria 163a (Stammsammlung: X-8-52) ist ein klinisches Isolat aus dem Hammersmith Hospital, London (Walsh et al., 1995). Durch Selektion mit Cefotaxim wurde daraus der Stamm *Aeromonas veronii* bv. Sobria 163a M (Stammsammlung: X-8-53) hergestellt (Walsh et al., 1995).

Diese beiden Stämme wurden freundlicherweise von der Arbeitsgruppe Bennett, Institute for Pathology and Microbiology, University of Bristol, zur Verfügung gestellt.

Neben diesen Stämmen wurden die in Tabelle 2.1 aufgeführten *E. coli* K-12 Laborstämme verwendet.

**Tab. 2.1. *E. coli* K-12 Laborstämme**

<b>E. coli Stamm</b>	<b>Genotyp</b>	<b>Beschreibung</b>	<b>Referenz</b>
DH5 $\alpha$	supE44, hsdR17, recA1, gyrA96, thi-1, F-, endA1, deoR, lambda-	Wirtsstamm für die Klonierung	(Brown, 1991)
S17 $\lambda$ pir	Tp <sup>r</sup> Sm <sup>r</sup> thi pro hsd <sup>r</sup> M <sup>+</sup> recA RP4-2 Tc::Mu Km::Tn7	Spenderorganismus für die Transposonmutagenese	(de Lorenzo and Timmis, 1994)

#### 2.1.2. Plasmide

Tabelle 2.2. zeigt die zur Anwendung gekommenen Plasmide.

**Tab. 2.2 . Plasmide**

<b>Plasmid</b>	<b>Größe</b>	<b>Marker</b>	<b>Referenz</b>
pSU18	2300 bp	Cm <sup>R</sup>	(Martinez et al., 1988)
pUTkm2	7055 bp	Amp <sup>R</sup> , Km <sup>R</sup>	(de Lorenzo et al., 1990)

### 2.1.3. Chemotherapeutika

In Tabelle 2.3. sind die in dieser Arbeit verwendeten Antibiotika aufgeführt.

**Tab. 2.3. Liste der verwendeten  $\beta$ -Laktam-Antibiotika**

Antibiotikum	Bezugsquelle
Ampicillin	Bayer, Leverkusen
Ampicillin (zur Herstellung von BioAmp)	Sigma, Deisenhofen
Cefotaxim	Hoechst, Frankfurt
Cefoxitin	MSD, München
Chloramphenicol	Boehringer, Mannheim
Imipenem	MSD, München
Kanamycin	Ursapharm, Bübingen
Nalidixinsäure	Sterling Winthrop, England
Rifampicin	Grünenthal, Aachen

Zur Bestimmung von Minimalen Hemmkonzentrationen wurden vorgefertigte Mikro-titrationsplatten der Firma Merlin Diagnostika GmbH, Bornheim-Hersel, verwendet.

### 2.1.4. Oligonucleotide

Die in dieser Arbeit verwendeten Oligonucleotide (Tab. 2.4.) wurden überwiegend die Firma Sigma-ARK, Darmstadt, hergestellt.

**Tab. 2.4. Oligonucleotide**

Bezeichnung	Sequenz	Schmelztemperatur (nach Herstellerang.)
DAPE+VE	5' GAGATGTGGTGAAGAACG	56.4
KNR2+	5' GCACACCTCAGCGCTATT	60.7
BlrD-	5' CAGTTCTCCTGCCCCGCTG	67.3
BlrD+	5' ACCATGGTCAAACAGATA	53.2
K2-2+	5' GACAACCTCTATGCCGAT	57.5
KNR 3-	5' GTATGAGTCAGCAACACC	54,0

### 2.1.5. Nährmedien

Tabelle 2.5. zeigt die verwendeten Nährmedien. Diese wurden entsprechend den Herstellerangaben eingewogen, in Aqua dem. gelöst und 15 min. bei 121°C autoklaviert.

**Tab. 2.5. Nährmedien**

Medium	Hersteller
Chinablau-Lactose-Agar	OXOID, Basingstoke, England
Isosensitest Bouillon	OXOID, Basingstoke, England
Isosensitest-Agar	OXOID, Basingstoke, England
LB-Medium	10 g Pepton aus Casein, 10g NaCl, 5g Hefeextrakt, pH 7
M9-Salze (5 x)	10,5 g/l K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 4,5 g/l KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 1 g/l (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , 2,5 g/l NaCitrat x 2H <sub>2</sub> O
M9-Medium	1 x M9-Salze, 0,2% Glucose, 50 µg/ml Uracil, 1 µg/ml Thiamin, 5 µg/ml Nicotinsäure, 0,001 mM CaCl <sub>2</sub> , 0,1 % Casoaminosäuren, 1 mM MgSO <sub>4</sub>
Müller-Hinton II Bouillon cation adjusted	Becton Dickinson, USA
Standard-No.I Nährbouillon	Merck, Darmstadt, Deutschland
Standard-No.I-Nähragar	Merck, Darmstadt, Deutschland

### 2.1.6. Chemikalien und sonstige Materialien

Tabelle 2.6. zeigt die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien und sonstige Materialien.

**Tab. 2.6. Chemikalien und sonstige Materialien**

Chemikalien	Hersteller
Affi-Gel <sup>R</sup> 102 Gel (Aminoalkyl Agarose)	BioRad Lab., München
100-bp-Leiter	Gibco,/BRL, Eggenstein
1-kb-Leiter	Gibco,/BRL, Eggenstein
Agarose	Gibco,/BRL, Eggenstein
Ammoniumpersulfat	BioRad Lab., München

**Fortsetzung Tab. 2.6. Chemikalien und sonstige Materialien**

<b>Chemikalien</b>	<b>Hersteller</b>
Biotinamidocaproate N-Hydroxysuccinimidester	Sigma, Deisenhofen
30% Acrylamid/Bisacrylamid	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Borsäure	Merck, Darmstadt
BSA	Serva, Heidelberg
Bulgecin	Takeda Chemical Industries, Japan
Calciumchlorid	Merck, Darmstadt
Chloroform	Merck, Darmstadt
CTAB	Merck, Darmstadt
dNTP	Promega, Madison, USA
Meso-2,6-[3,4,5- <sup>3</sup> H]-Diaminopimelinsäure (25 Ci/mmol)	Amersham, Frankreich
Ethidiumbromid	Biomol, Hamburg
Ethanol	Merck, Darmstadt
Filterpapier	BioRad Lab., München
Folin-Ciocalteus-Phenolreagenz	Merck, Darmstadt
D(+) Glucose-Monohydrat	Merck, Darmstadt
Hyperfilm ECL	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Immun-Blot <sup>TM</sup> PVDF-Membran	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Indol-Reagenz	MERLIN Diagnostika GmbH, Bornheim
IPTG	Sigma, Deisenhofen
Isoamylalkohol	Sigma, Deisenhofen
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
di-Kaliumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Magermilchpulver	Uelzena Milchwerke, Uelzen
Magnesiumchlorid	Promega, Madison, USA
MCN-E-Identifizierungsplatte	MERLIN Diagnostika GmbH, Bornheim
Methanol HPLC grade	Merck, Darmstadt
Mineralöl	Sigma, Deisenhofen
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt

**Fortsetzung Tab. 2.6. Chemikalien und sonstige Materialien**

<b>Chemikalien</b>	<b>Hersteller</b>
Natriumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
di-Natriumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Nitrocefin	Glaxo, Greenford, UK
Paraffinöl	MERLIN Diagnostika GmbH, Bornheim
Phenol	Merck, Darmstadt
Phosphorsäure, 85 %	Merck, Darmstadt
Proteinmarker biotinyliert	NewEngland Biolabs, Frankfurt/Main
QIAquick PCR Aufreinigungskit	Qiagen, Hilden
Qiagen Plasmid Kit	Qiagen, Hilden
Röntgenfilm Entwickler	Tetenal Photowerk GmbH & Co KG, Nordstedt
Röntgenfilm Fixierer	Tetenal Photowerk GmbH & Co KG, Nordstedt
CNBr-aktivierte Sepharose <sup>TM</sup> 4B	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
SDS	Roth, Karlsruhe
Smartladder	Eurogentec
Streptavidin-HRP-Konjugat	Perbio, Bonn
TEMED	BioRad Lab., München
Thiamin	Merck, Darmstadt
TrisHCl	Sigma, Deisenhofen
TrisMaleat	Sigma, Deisenhofen
Trizma Base	Sigma, Deisenhofen
Tween 20	Merck, Darmstadt
TDA-Reagenz	MERLIN Diagnostika GmbH, Bornheim

### 2.1.7. Puffer und Lösungen

Die verwendeten Puffer und Lösungen sind in Tabelle 2.7. aufgeführt.

**Tab. 2.7. Puffer und Lösungen**

<b>Lösung bzw. Puffer</b>	<b>Zusammensetzung</b>
Alkalisches Kupferreagenz	2 % Lsg. A, 2 % Lsg. B, 96 % Lsg. C 2% CuSO <sub>4</sub> (Lsg. C) 4 % K-Na-Tartrat (Lsg.B) 3 % Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> in 0,1 M NaOH (Lsg. A)
BCA-Reagenz A	Perbio, Bonn
BCA-Reagenz B	4 % CuSO <sub>4</sub> x 5 H <sub>2</sub> O
Beschwererlösung	0,25% Bromphenolblau, 0,25% Xylencyanol, 15%Ficoll
Blockierlösung	5 % Milchpulver in 0,01M PBS, 0,1 % Tween 20
Coomassie G 250 Färbelösung	BioRad Lab., München
ECL Reagent <sup>TM</sup> Lösung I Lösung II	NEN, Boston, USA Renaissance Enhanced Luminol Reagent Renaissance Oxidizing Reagent
HPLC-Elutionspuffer	Puffer A: 0,05 M Na-Phosphat, pH 4,31 Puffer B: 0,075 M Na-Phosphat, pH 4,95; 15 % Methanol
SDS-Laufpuffer	190 mM Glycin, 25mM Tris, 0,1 % SDS
MgCl <sup>-</sup> -freier Polymerase Puffer	Promega, Madison, USA
Nitrocefin	5 mg Nitrocefin in 0,5 ml DMSO ad 10 ml mit 0,1 M Phosphatpuffer
PBS-Puffer (10 x)	0,58 M Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 0,17 M NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 0,68 M NaCl; pH 7,3
Puffer für Proteingele Sammelgelpuffer Trenngelpuffer	0,5 M TrisHCl, pH 6,8 1,5 M TrisHCl, pH 8,8
SDS-Probenpuffer	0,5 M TrisHCl, 10 % Glycerin, 5 % β-Mercaptoethanol, 2 % SDS, 0,001% Bromphenolblau; pH 8

## Fortsetzung Tab. 2.7. Puffer und Lösungen

Lösung bzw. Puffer	Zusammensetzung
Sörensenpuffer	0,1 M Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 0,1 M NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , pH 7.0
PCR Puffer II, MgCl <sub>2</sub> -frei	Roche, Mannheim
<u>PCR Purification Kit</u> <sup>TM</sup>	Qiagen, Hilden
PE-Puffer	ohne Angabe
PB-Puffer	ohne Angabe
<u>Plasmid Kit</u> <sup>TM</sup>	Qiagen, Hilden
STE-Puffer	100mM NaCl, 10mM Tris/HCl, 1mM EDTA, pH 8,0
Puffer P1	100µg/mL RNaseA, 50mM Tris/HCl, 10mM EDTA pH8,0
Puffer P2	200 mM NaOH, 1%SDS
Puffer P3	3M KAc pH 5,5
TAE-Puffer	40mM Tris-Acetat, 1mM EDTA pH8,0
TBE-Puffer	89 mM Tris, 89 mM Borsäure, 2,5 mM EDTA, pH8,0
TE-Puffer	10mM Tris/HCl, 1mM EDTA pH8,0
Transferpuffer	50 mM TrisBase, 50 mM Borsäure, 10 % Methanol
Waschpuffer	0,01M PBS, 0,1 % Tween 20
<u>Sequencer Kit</u>	PE Applied Biosystems, Foster City, USA
ABI PRISM <sup>®</sup> BigDye <sup>TM</sup> Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit	AmpliTaq <sup>®</sup> DNA Polymerase, FS; fluoreszenzmarkierte Didesoxynucleotide; Desoxynucleotide; MgCl <sub>2</sub> Tris/HCl, pH 9,0
Template supression reagent	PE Applied Biosystems, Foster City, USA

### 2.1.8. Geräte

Folgende Geräte sind bei dieser Arbeit zum Einsatz gekommen (Tab. 2.8.):

**Tab. 2.8. Geräte**

<b>Gerät</b>	<b>Hersteller</b>
ABI PRISM 310 Genetic Analyzer	PE Applied Biosystems, Foster City, USA
Analog pH-Meter CG711	Schott-Geräte, Hofheim
Biofuge A	Heraeus, Osterode
Biofuge 28RS	Heraeus, Osterode
Thermocycler 9700	PE Applied Biosystems, Foster City, USA
Gelelektrophorese-Apparatur	Gibco/BRL, Eggenstein
Gene Pulser	BioRad Lab., München
Labsystems Multiskan Multisoft® Photometer	Labsystems, Helsinki, Finnland
Rollinkubator	Schütt, Göttingen
Schüttelinkubator	New Brunswick Scientific Co., Edison, USA
Sonifier Cell Disruptor B12	Branson Sonic Power Company, Danbury, USA
Spectrophotometer Novaspec® II	Pharmacia Biotech, Freiburg
Spektralphotometer Hitachi 150-200	Tokio, Japan
Speedvac SC 100	Savant, USA
PCR Uno-Thermoblock	Biometra, Göttingen
PCR icycler	BioRad Lab., München
Protean II Mini-Gelkammer	BioRad Lab., München
Reinstwasseranlage Easy Pure LF	Barnstead
Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell	BioRad Lab., München
UV-Link	Biometra, Göttingen
Videodokumentationsanlage	INTAS, Göttingen

### 2.1.9. Enzyme

Tabelle 2.9. zeigt die zum Einsatz gekommenen Enzyme.

**Tab. 2.9. Enzyme**

<b>Enzym</b>	<b>Bezugsquelle</b>
Alkalische Phosphatase (Shrimp)	Roche, Mannheim
Lysozym	Sigma, Deisenhofen
Restriktionsendonukleasen:	
EcoRI	Roche, Mannheim
KpnI	
PstI	
SacI	
Sall	
XbaI	
RNaseA	Roche, Mannheim
T4-DNA Ligase	Roche, Mannheim
Taq DNA Polymerase	Promega, Madison, USA
AmpliTaq Gold Polymerase	Roche, Mannheim

### 2.2. Mikrobiologische Methoden - Testung der Antibiotika-Empfindlichkeit

Zur Untersuchung der Antibiotika-Empfindlichkeit wurde die Minimale Hemmkonzentration (MHK) durch Mikrodilution bestimmt. Zur Bestimmung der MHK dienten Mikrotitrationsplatten der Firma MERLIN Diagnostika GmbH (Bornheim), die Antibiotika in getrockneter Form enthalten, welche durch Zugabe einer Bakteriensuspension rehydratisiert werden.

Für die Durchführung des Tests wurde mit Kolonien einer 18-24h alten Agar-Kultur eine Bakteriensuspension in physiologischer Kochsalzlösung hergestellt, deren Trübung photometrisch auf Mc Farland 0,5 eingestellt wurde ( $OD_{560} = 0,120 \pm 0,02$ ).

30 µl dieser Bakteriensuspension wurden mit 30 ml Isosensitest Bouillon gut vermischt. Auf die Beimpfung der Testplatte mit je 100µl dieses Ansatzes pro Vertiefung folgte dann deren Inkubation für 18-24 h bei 37°C.

Die Auswertung wurde einerseits visuell mit Hilfe eines Spiegels, andererseits automatisch mit dem Multiskan Multisoft® Photometer sowie dem angeschlossenen Computer und der dazugehörigen MCN-Software (Merlin Diagnostika GmbH, Bornheim) durchgeführt.

### **2.3. Proteinchemische Methoden**

#### **2.3.1. Präparation des $\beta$ -Laktamase-Rohextraktes**

Eine Übernachtskultur (ÜNK) wurde 1:500 in Standard Nährbouillon No. 1 verdünnt und im Schüttelinkubator bei 37°C bis zu einer  $OD_{560}$  von 0,5 inkubiert. Zur Zellernte wurden 15 ml dieser Kultur bei 4°C 20 min mit 5300 Upm abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 1 ml Sörensenpuffer aufgenommen und bei -20°C eingefroren. Das Einfrieren und das anschließende Auftauen erleichtern den darauf folgenden Zellaufschluß. Dazu wurde die Zellsuspension auf Eis zweimal 10 sec mit Ultraschall behandelt. Durch 20-minütige Zentrifugation bei 22000 Upm wurden dann die festen Zellbestandteile entfernt, der klare Überstand stellt den  $\beta$ -Laktamase Rohextrakt dar und wurde für die Bestimmung der  $\beta$ -Laktamase-Aktivität eingesetzt. Er kann bei -20° C eingefroren werden.

#### **2.3.2. Spektralphotometrische Bestimmung der spezifischen $\beta$ -Laktamase-Aktivität**

Die Bestimmung der  $\beta$ -Laktamase-Aktivität erfolgte durch eine Methode nach O'Callaghan et al. mit Hilfe des chromophoren  $\beta$ -Laktams Nitrocefin, dessen Farbe bei Spaltung seines  $\beta$ -Laktamrings von gelb nach rot umschlägt (O'Callaghan et al., 1968).

Der Versuchsansatz besteht aus folgenden Komponenten:

- 900  $\mu$ l 0,1M Sörensenpuffer
- 50  $\mu$ l 1 mM Nitrocefin
- 50  $\mu$ l  $\beta$ -Laktamase Rohextrakt (evtl. verdünnt)

Aus dem gemessenen Extinktionsanstieg bei 486 nm pro Zeiteinheit läßt sich  $\beta$ -Laktamase-Aktivität berechnen. Die Umsatzgeschwindigkeit  $v$  eines Enzyms ergibt sich aus der Division der Änderung der Substratkonzentration  $\Delta c$  durch die Änderung der Zeit  $\Delta t$ .

$$v = \Delta c / \Delta t \quad (1)$$

Sie wird angegeben in [ $\mu\text{mol} \times \text{ml}^{-1} \times \text{min}^{-1}$ ] bzw. [ $\text{U} \times \text{min}^{-1}$ ]. Die Änderung der Substratkonzentration kann mit dem Lambert-Beerschen Gesetz folgendermaßen beschrieben werden:

$$\Delta c = \frac{\Delta E}{\epsilon \times d} \quad (2)$$

### Abb. 2.1. Lambert-Beersches Gesetz

$E = \epsilon \times c \times d$	E: Extinktion $\epsilon$ : molarer Extinktionskoeffizient [ $\text{l} \times \text{mmol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ ] c: Konzentration [ $\text{mmol} \times \text{l}^{-1}$ ] d: Schichtdicke der Meßküvette [cm]
----------------------------------	---

Der molare Extinktionskoeffizient  $\epsilon$  für das Nitrocefin bei 485nm wurde experimentell ermittelt. Durch Kombination der Gleichungen (1) und (2) ergibt sich die enzymatische Umsatzgeschwindigkeit mit folgender Formel:

$$v = \frac{\Delta E}{\epsilon \times d \times \Delta t}$$

Zur Ermittlung der spezifischen Aktivität der  $\beta$ -Laktamase wird die Umsatzgeschwindigkeit  $v$  durch die Proteinkonzentration  $C_p$  des Enzymextrakts dividiert:

$$x = \frac{v}{C_p} \quad [\text{U} \times \text{mg}^{-1}]$$

### 2.3.3. Proteinbestimmung nach Lowry

Die Proteinbestimmung nach Lowry beruht auf der Bildung von farbigen Komplexsalzen zwischen Kupfer-II-Ionen und den Stickstoffatomen von Aminosäuren in alkalischer Lösung. Daraufhin entsteht eine intensiv blaue Färbung, da einzelne Aminosäuren (Tyrosin, Tryptophan, Cystein, Histidin) ein Phosphomolybdat-Phosphowolframat-Reagenz, das Folin-Ciocalteus-Phenolreagenz reduzieren.

200 µl Probe wurden mit 2 ml alkalischem Kupferreagenz vermischt und 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Dann erfolgte die Zugabe von 200 µl Folin-Ciocalteus-Phenolreagenz, das zuvor 1:3 mit aq. dest. verdünnt worden war. Der Ansatz wurde sofort gut gemischt und im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Daran schloß sich die Messung der Extinktion bei 578 nm gegen den Leerwert. Mittels einer Eichreihe mit BSA-Proben bekannten Proteingehalts konnte von der Extinktion auf die Proteinmenge in den einzelnen Proben geschlossen werden.

### 2.3.4. Nachweis von Penicillinbindepoteinen (PBPs) mit biotinyliertem Ampicillin

#### 2.3.4.1. Herstellung von biotinyliertem Ampicillin ("Bio-Amp")

Zur Herstellung von biotinyliertem Ampicillin wurde 1,9 mg Ampicillin in 180 µl 0,1 M NaP<sub>i</sub> Puffer, pH 7,2, mit 0,6 mg Biotinamidocaproat-NHS-Ester (Sigma) in 24 µl DMSO gemischt. Der Ansatz wurde dann 30 min bei 37°C inkubiert. Der nucleophile Angriff der Aminogruppe des Ampicillins auf die Carbonylgruppe der Esterbindung von N-hydroxysuccinimid-aktiviertem Biotinester führt zur Bildung von biotinyliertem Ampicillin ("BioAmp") unter Freisetzung von N-hydroxysuccinimid (NHS).

Um überschüssiges aktiviertes Biotin zu entfernen, wird der Reaktionsansatz mit 800 µl Affi Gel 102 versetzt, welches zuvor drei mal mit 0,1 M NaP<sub>i</sub> Puffer, pH 7,2 gewaschen wurde. Die Aminogruppen des Affi Gel 102 binden dabei unter Freisetzung von NHS an das NHS-aktivierte Biotin. Nach dreißigminütiger Inkubation bei 37°C wurde kurz zentrifugiert. Der Überstand wurde dann zur Entfernung von überschüssigem Ampicillin mit 200 mg CNBr-aktivierter Sepharose 4B (Pharmacia) in 1 ml 0,1 M NaP<sub>i</sub> Puffer, pH 7,2, versetzt und unter kräftiger Bewegung bei 6°C über Nacht inkubiert. Die Sepharose wurde dafür zuvor in 1 ml 10 mM HCl resuspendiert, für 15 min bei Raumtemperatur stehen gelassen und anschließend drei mal mit 0,1 M NaP<sub>i</sub> Puffer, pH 7,2 gewaschen.

Zur Entfernung der Sepharose und des daran gebundenen Ampicillins wird der Reaktionsansatz abschließend zentrifugiert, der Überstand wird in 50 µl Aliquots bei -20°C eingefroren.

#### **2.3.4.2. Präparation von Membranproteinen**

Zur Präparation der Membranproteine wurde eine Übernachtskultur 1:20 in 1l LB-Medium verdünnt und im Schüttelinkubator bis zu einer  $OD_{600} = 0,5-0,6$  inkubiert. Die Zellen wurden darauf durch zehnmünütige Zentrifugation mit 5000xg bei 4°C geerntet und mit 200 ml 10 mM Trismaleat, pH 7,8 gewaschen. Das Pellet wurde dann in 20 ml Trismaleat aufgenommen und bei -20°C eingefroren.

Der Aufschluß der Zellen erfolgte durch 30-minütige Inkubation mit Lysozym (200µg/ml Endkonzentration) und anschließende, viermalige Behandlung mit 20 sec dauernden Ultraschall-Intervallen. Zur Entfernung unlöslicher Zellbestandteile wurde dann 10 min mit 5300 Upm bei 4°C zentrifugiert. Aus dem Überstand wurden die Membranproteine durch 60-minütige Ultrazentrifugation mit 150000 g bei 4°C niedergeschlagen und anschließend zweimal mit 10 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 6,8 gewaschen. Schließlich wurde das Pellet in 500 µl 50 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 7, mit 10 mM Magnesiumchlorid resuspendiert. Der Proteingehalt wurde mittels BCA-200 Protein Assay Kit (Pierce) entsprechend der Anweisungen des Herstellers ermittelt, dann wurden die Proteine bei -20°C eingefroren.

#### **2.3.4.3. Nachweis von PBPs**

Der Nachweis der PBPs beruht auf einer Methode nach Spratt (Spratt, 1977). Die Membranpräparationen wurden für 30 min bei 37°C mit biotinyliertem Ampicillin inkubiert, welches dann an die PBPs bindet. Dabei wurden 250 µg Protein und 25 µg BioAmp in einem Gesamtvolumen von 35 µl 50 mM Kaliumphosphatpuffer (pH 7) eingesetzt. Ein Teil eines solchen Ansatzes wurde dann in einer zehn- oder 13-prozentigen SDS-PAGE eingesetzt (2.3.5.). Die aufgetrennten Proteine wurden auf eine PVDF-Membran geblottet. Die PBPs wurden dann unter Verwendung eines Streptavidin-Horseradish-Peroxidase-Antikörperkonjugats durch ECL-Detektion auf einem Röntgenfilm sichtbar gemacht (2.4.6.).

### 2.3.5. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur Auftrennung von Proteinen nach ihrer Größe wurde eine diskontinuierliche SDS-PAGE nach Laemmli (Laemmli, 1970), durchgeführt. Dazu fand eine Minigel Kammer der Firma BioRad, München Verwendung. Die Tabellen 2.10. und 2.11. zeigen die Zusammensetzungen von Trenngel (10 % Acrylamid) und Sammelgel (5 % Acrylamid).

**Tab. 2.10. Sammelgelzusammensetzung**

Komponente	Volumen
Acrylamid-stammlösung	1,65 ml
Sammelgelpuffer	2,5 ml
H <sub>2</sub> O	5,75 ml
10 % SDS	100 µl
APS	50 µl
TEMED	25 µl

**Tab. 2.11. Trenngelzusammensetzung**

Komponente	Volumen
Acrylamid-stammlösung	3,3 ml
Trenngelpuffer	2,5 ml
H <sub>2</sub> O	4,1 ml
10 % SDS	100 µl
APS	50 µl
TEMED	25 µl

Vor dem Auftragen wurden die Proteinproben mit 1 Volumen Probenpuffer vermischt und für 5 min in kochendem Wasser inkubiert. Die Auftrennung der Proteine erfolgte für 1h bei 200 Volt. Die aufgetrennten Proteine können durch Anfärben mit Coomassie G 250 sichtbar gemacht werden. Der Vergleich mit den Laufstrecken von Markerproteinen bekannter Größe erlaubte eine Molekulargewichtsbestimmung.

### 2.3.6. Westernblot

In dieser Arbeit wurde die Trans-Blot SD Kammer verwendet, um gelelektrophoretisch aufgetrennte Proteine aus der Polyacrylamidmatrix auf eine PVDF-Membran zu übertragen und für eine Immunodetektion zugänglich zu machen.

Zu diesem Zweck wurde das Proteingel im Anschluß an die Gelelektrophorese zur Äquilibriumierung 15 min in Transferpuffer geschüttelt. Die Membran wurde für 10 sec in Methanol getaucht und anschließend für 10 min ebenfalls in Transferpuffer äquilibriert.

Für den Transfer der Proteine wurde auf der Platinanode der Transferkammer ein Blot-sandwich aufgebaut: Die Membran wurde dazu auf ein extradickes in Transferpuffer getränktes Filterpapier gelegt und luftblasenfrei mit dem Proteingel bedeckt; dieses wurde dann mit einem weiteren getränkten Filterpapier belegt. Der Transfer erfolgte für 1 h bei 15 Volt. Anschließend wurde die Membran zur Kontrolle des Transfers 1 min in Ponceau-Lösung gefärbt und mit Wasser wieder entfärbt.

Zur Abdeckung unspezifischer Bindestellen auf der Membran wurde diese 1 h in Blockierlösung geschüttelt. Anschließend wurde die Membran in Waschpuffer einmal 5 min, einmal 15 min und abschließend wieder 5 min bei RT gewaschen. Es folgte eine einstündige Inkubation in Streptavidin-HRP-Konjugat, 1:3000 in Waschpuffer verdünnt. Ungebundenes Streptavidin wurde dann durch mehrere Waschgänge mit Waschpuffer entfernt, und zwar: kurz RT, 2 x 15 min 40°C, 5 min 40°C, 5 min RT.

Die Detektion des spezifisch gebundenen Streptavidins erfolgte über eine Chemilumineszenzreaktion: Die mit dem Streptavidin verknüpfte Meerrettich-Peroxidase oxidiert ein zugegebenes Substrat unter Lichtemission, die durch Zugabe eines Verstärkers noch gesteigert wird. Die Membran wurde dazu mit einer Mischung aus je 0,5 ml Lösung I und Lösung II des ECL-Kits überschichtet und dann mit einer Klarsicht-Folie bedeckt. Durch Auflegen eines Röntgenfilms für 10 –90 sec wurde markierte Proteine dann sichtbar gemacht.

## **2.4. Molekularbiologische Methoden**

### **2.4.1. Präparation von Plasmid-DNA**

#### **2.4.1.1. Plasmidschnellpräparation nach Maniatis et. al. (1989)**

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

1,5 ml ÜNK in N1-Medium wurden 30 sec bei 13000U/m abzentrifugiert. Durch Resuspension des Pellets in STE-Puffer und erneute Zentrifugation wurden Zellwandkomponenten entfernt. Das Pellet wurde dann in 100 µl P1-Puffer aufgenommen. Danach folgte der Zellaufschluß durch Zugabe von 150 µl Lysispuffer P2. Nach 5-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur und anschließender Zugabe von 150 µl des Neutralisationspuffers P3 wurde erneut 5 min bei 13000 Upm zentrifugiert. Zur Extraktion der Proteine wurde der

Überstand mit 1 Vol. Phenol/Chloroform versetzt und 2 min bei 13000 Upm zentrifugiert. Dieser Schritt wurde bis zum Erhalt eines klaren Überstands wiederholt. 2 Vol. EtOH abs. dienten dann zur Fällung der DNA. Nach 5-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde 2 min bei 13000 Upm zentrifugiert, das Pellet wurde mit 70 % EtOH gewaschen und anschließend 10 min in der Vakuumzentrifuge getrocknet. Danach wurde es in 100µl 0,1 x TE-Puffer + RNase A (20µg/ml) aufgenommen und bei -20°C eingefroren.

#### **2.4.1.2. Plasmid Mini Präparation**

3 ml einer ÜNK wurden 15 sec bei 13000 Upm zentrifugiert, das Pellet wurde in 150 µl S1-Puffer resuspendiert. Dann folgte der Aufschluß der Zellen durch 5-minütiges Einwirken von 150 µl Lysispuffer S2. Nach der Zugabe von 150 µl eiskaltem Neutralisationspuffer S3 wurde 15 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden feste Zellbestandteile durch 15-minütige Zentrifugation bei 4°C und 16000 Upm entfernt. Notfalls wurde ein zweites Mal zentrifugiert, um einen ganz klaren Überstand zu erhalten. Dieser wurde dann mit 2 Vol. 100% Ethanol versetzt und 2 min bei Raumtemperatur inkubiert. Dann folgte eine 25-minütige Zentrifugation bei 16000 Upm. Das Pellet wurde mit 70 % Ethanol gewaschen und in der Vakuumzentrifuge ca. 5 min getrocknet, schließlich in 100µl 0,1 x TE-Puffer + RNase A (20µg/ml) aufgenommen und bei -20°C eingefroren.

#### **2.4.2. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)**

Die Polymerase-Kettenreaktion ist eine *in-vitro* Methode zur selektiven, enzymatischen Amplifikation von DNA-Sequenzen, die von zwei bekannten DNA-Abschnitten flankiert sind. Zwei synthetische Oligonucleotide (Primer), die zu jeweils einem dieser äußeren Abschnitte komplementär sind, ermöglichen die Vervielfältigung des zwischen ihnen liegenden Bereichs durch eine thermostabile Polymerase. Die Reaktion verläuft in mehreren Zyklen. In jedem Zyklus verdoppelt sich die Anzahl der DNA-Kopien.

Folgende Schritte wurden in jedem Zyklus durchlaufen:

1. Denaturierung: Die DNA wurde durch Erhitzen auf 94°C in Einzelstränge zerlegt.
2. Primeranlagerung (Annealing): Primer binden an die komplementären Sequenzen.
3. Synthesephase (Extension): Verlängerung der Primer durch die thermostabile DNA-Polymerase.

Der Einsatz der PCR bei den Transposonmutanten erfolgte zur Bestimmung des Insertionsortes der Kanamycin-Kassette im Chromosom, nachdem zwei Insertionsorte durch Klonierung und Sequenzierung ermittelt worden waren. Dazu wurden spezifische Primer, komplementär einerseits zur inserierten Kassette, andererseits zum vermuteten Insertionsort, verwendet.

Zur Herstellung einer DNA-Matrize wurden 3-5 Kolonien einer ÜNK in 100 µl H<sub>2</sub>O suspendiert, mit Mineralöl überschichtet und 15 min bei 95°C inkubiert. Nach 5 min Zentrifugation bei 13000 Upm wurde der Überstand in dem folgenden PCR-Ansatz als DNA-Matrize eingesetzt.

PCR-Ansatz:

DNA-Matrize	1 µl
10 x Polymerase-Puffer, MgCl <sub>2</sub> frei	10 µl
MgCl <sub>2</sub>	4 µl
Primer I [10 pmol]	2 µl
Primer II [10 pmol]	2 µl
dNTPs	2,5 µl
Taq-Polymerase	0,5 µl
H <sub>2</sub> O	ad 100 µl

Folgendes Temperaturprofil fand bei PCR Anwendung:

1. Initialdenaturierung	94 °C	4 min	
2. Primeranlagerung	variabel	1 min	} 30 x
3. Synthesephase	72 °C	1 min	
4. Denaturierung	94 °C	1 min	
5. Primeranlagerung	variabel	1 min	
6. Verlängerte Synthesephase	72 °C	7 min	
7. Endphase	4 °C	Pause	

5 µl des Ansatzes wurden in einem 1% Agarosegel aufgetrennt, um PCR-Produkte sichtbar zu machen.

### **2.4.3. Aufreinigung von PCR-Produkten mit dem Qiaquick Purification Kit**

Der PCR-Reaktionsansatz wurde mit 5 Vol. PB-Puffer gemischt und auf eine Qiaquick-Säule gegeben. Diese wurde mit einem Auffanggefäß bei 13000 Upm für 30 bis 60 sec. zentrifugiert, nach Entfernung der Durchflußfraktion mit 750 µl PE-Puffer gewaschen und anschließend durch zweimalige Zentrifugation (1 min, 13000Upm) vom restlichen Puffer befreit. Die Elution der DNA erfolgte mit 30 µl 0,1 x TE-Puffer durch Zentrifugation für 1 min bei 13000 Upm.

### **2.4.4. Präparation chromosomaler DNA**

1,5 ml Übernachtskultur in NI-Bouillon wurden für 2 min bei 13000 Upm zentrifugiert (RT). Das Pellet wurde in 564 µl TE Puffer (pH 8) resuspendiert und zum Zellaufschluß mit 30 µl 10 % SDS und 6 µl Proteinase K (10 mg/ml) gut vermischt. Es folgte eine einstündige Inkubation bei 37°C. Anschließend wurde der Ansatz zunächst 100 µl 5 M NaCl, dann mit 80 µl CTAB/NaCl versetzt und jeweils gut gemischt. Nach zehnminütiger Inkubation bei 65°C wurden dann 780 µl Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) zugegeben, gut gemischt und schließlich 5 min zentrifugiert.

Die obere Flüssigkeit, die die chromosomale DNA enthält, wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt (dabei fand eine abgeschnittene Pipettenspitze Verwendung, um ein Scheren der DNA zu verhindern). Dort wurde 1 Vol. Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) zugegeben. Nach erneuter Zentrifugation wurde der Überstand mit 6/10 Volumen Isopropanol versetzt. Das entstehende weiße DNA-Präzipitat wurde durch Zentrifugation niedergeschlagen und das Isopropanol wurde entfernt. Das Präzipitat wird mit 70% Ethanol gewaschen, in der Vakuumzentrifuge getrocknet und schließlich in 100 µl H<sub>2</sub>O aufgenommen.

### 2.4.5. Restriktion und Modifikation von DNA

Restriktionsendonuclease-Reaktionen wurden über Nacht bei 37°C durchgeführt. Der Reaktionsansatz setzte sich aus folgenden Komponenten zusammen:

DNA	200-2000 ng
10 x Reaktionspuffer	50 µl
Restriktionsenzym	4 µl
steriles, destilliertes Wasser	ad 500 µl

Die Reaktion wurde durch zehnmütiges Erhitzen auf die erforderliche Temperatur gestoppt. Eine Vorbehandlung der Vektor-DNA mit alkalischer Phosphatase aus Shrimps verhinderte eine Religation des linearisierten Vektors während der Ligation. Dabei wurden die terminalen Phosphatreste abgespalten. Die Vektor-DNA wurde zunächst in einem Reaktionsgesamt volumen von 100 µl verdaut. Dann wurden 10 µl Phosphatase und 10 µl Reaktionspuffer zugegeben, und der Ansatz wurde 15 min bei 37°C inkubiert. Nach dem Reaktionsstopp durch fünfminütige Inkubation bei 80°C erfolgte die Aufreinigung. Dazu wurde der Ansatz auf 500 µl aufgefüllt und mit 1 Volumen Chloroform gewaschen. Die DNA wurde dann durch Zugabe von 1 Vol. Isopropanol gefällt, anschließend mit 1 Vol. 100 % Ethanol gewaschen, schließlich getrocknet und in sterilem destillierten Wasser aufgenommen.

Bei der Ligation der geschnittenen DNA fand T4 DNA Ligase mit dem vom Hersteller mitgelieferten Puffer Verwendung. Die Reaktion wurde in einem Gesamtvolumen von 20 µl über Nacht bei RT durchgeführt. Das Vektor:Insert Verhältnis betrug 1:3.

### 2.4.6. Transformation

Zur Transformation der elektrokompetenten Zellen wurde die Plasmid-DNA zunächst mit Hilfe eines Milipore 0,0025 µm Filters gegen steriles Wasser dialysiert, um störende Salze zu entfernen. Dann wurde sie zu 50 µl kompetenten Zellen gegeben, die zuvor auf Eis aufgetaut worden waren. Nach vorsichtigem Mischen wurde der Inhalt des Reaktionsgefäßes in eine Elektroporationsküvette übertragen und diese in der Halterung des Gene Pulser (Biorad) einem elektrischen Puls ausgesetzt (25 mF, 2,5 V, 400 Ohm). Unmittelbar anschließend wurde die Küvette mit 1 ml auf 37°C vorgewärmter Bouillon aufgefüllt und die

Zellsuspension in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Vor dem Ausplattieren auf den geeigneten Selektionsagar wurden die Zellen für eine Stunde bei 37°C geschüttelt.

#### 2.4.7. Herstellung elektrokompenter Zellen

Eine Übernachtskultur wurde 1:50 in 200 ml LB-Bouillon verdünnt und im Schüttelinkubator bis zu einer OD<sub>546</sub> von 0,4-0,5 inkubiert. Die Zellen wurden durch zehnmünütige Zentrifugation mit 4000 Upm bei 4°C geerntet und 2 x mit 100 ml eiskaltem Reinstwasser und 1x mit 25 % Glycerin gewaschen. Das Pellet wurde in ca. 400 µl 25 % Glycerin aufgenommen. Die Zellsuspension wurde in 50 µl Portionen aliquotiert, in -70°C kaltem Methanol schockgefroren und dann bei -70°C gelagert.

#### 2.4.8. Konzentrationsbestimmung von Oligonucleotiden

Die Extinktion der 1:250 verdünnten Primerlösung wurde bei einer Wellenlänge von 260 nm gemessen. Die Konzentration der Oligonucleotide errechnet sich nach folgender Formel:

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

#### 2.4.9. Agarose-Gelelektrophorese

Als Elektrophorese bezeichnet man die Wanderung geladener Moleküle in einem elektrischen Feld. DNA wandert aufgrund ihrer negativ geladenen Phosphatgruppen zur Anode. Das Agarose-Gel wirkt als Molekularsieb, das kleine Moleküle schneller durch seine Poren wandern läßt als große. Dementsprechend werden die DNA-Moleküle nach ihrer Größe aufgetrennt.

In dieser Arbeit wurden für die Gelelektrophorese Horizontalapparaturen verwendet. Der Agaroseanteil der Gele betrug 1%. Die Agarose wurde in 1 x TAE-Puffer durch Aufkochen gelöst. Nach Abkühlen auf ca. 55°C erfolgte die Zugabe von 0,3 µg/ml Ethidiumbromid.

Diese Substanz interkaliert in doppelsträngige DNA, die durch Bestrahlung mit UV-Licht sichtbar gemacht werden kann.

Nachdem das Gel auspolymerisiert war, wurde es mit 1 x TAE-Puffer überschichtet. Die Proben wurden mit 1/5 Vol. Beschwererlösung versetzt aufgetragen. Zum Einlaufen der Proben in das Gel lag zunächst eine Spannung von 30 Volt an, die später auf 70 Volt erhöht wurde. Die DNA-Banden wurden nach dem Lauf mittels UV-Licht sichtbar gemacht und mit einer Videoanlage dokumentiert.

#### 2.4.10. DNA-Sequenzierung

Die in dieser Arbeit verwendete Methode zur DNA-Sequenzierung beruht auf dem Kettenabbruchverfahren nach Sanger et al. (Sanger et al., 1992). Dabei wurde der zu sequenzierende DNA-Abschnitt *in vitro* durch eine PCR-Reaktion, das Cycle Sequencing, vervielfältigt. Neben dem DNA-Template, der DNA-Polymerase, einem geeigneten Primer und den vier Desoxyribonukleosidtriphosphaten (dNTPs) enthält der PCR-Ansatz als zusätzliche Komponente 2',3'-Dideoxyribonukleosid-Triphosphate (ddNTPs). Diese sind durch das Fehlen der OH-Gruppe am C3-Atom nicht in der Lage, eine Phosphodiesterbindung auszubilden, so daß ihr Einbau zum Kettenabbruch führt. Da dieser Syntheseabbruch statistisch auftritt, kommt es zur Bildung von DNA-Fragmenten aller möglichen Kettenlängen mit durch den Primer definiertem 5' Ende.

Im Folgenden werden die DNA-Fragmente in einer Kapillare aufgetrennt. Die ddNTPs sind mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markiert und können mit Hilfe eines Lasers detektiert werden. Aus der Abfolge der auftretenden basenspezifischen Farbsignale ergibt sich die Basensequenz der untersuchten DNA-Probe. Die Umsetzung der Farbsignale in die Sequenz erfolgt mit Hilfe eines Computers und der entsprechenden Software.

Folgender Reaktionsansatz wurde für das Cycle Sequencing eingesetzt:

Ready Reaction Kit	0,8 µl
DNA-Template (aufgereinigtes PCR-Produkt)	10 -100 ng
Primer	10 pmol
H <sub>2</sub> O	ad 20 µl

Temperaturprofil:

96 °C	10 sec	} 25 x
60 °C	5 sec	
60 °C	4 min	

Die Aufreinigung der Proben geschah durch eine Ethanol Fällung. Zu jedem Ansatz wurden 80 µl H<sub>2</sub>O, 10 µl 3 M NaAc, pH 4,6 und 250 µl Ethanol gegeben. Darauf folgte eine erste 15-minütige Zentrifugation bei 15000 Upm. Das Pellet wurde mit 250 µl 70 % Ethanol gewaschen, erneut zentrifugiert und danach 5 min in der Vakuumzentrifuge getrocknet. Vor dem Auftragen auf die Kapillare wurden die eingetrockneten Proben in 25 µl Template Suppression reagent aufgenommen.

#### 2.4.11. Herstellung von Transposonmutanten

Die Transposonmutagenese des *A. veronii* 163a Chromosoms wurde mittels mini-Tn5Km2 (de Lorenzo and Timmis, 1994) durchgeführt, das inseriert in das pUT Plasmid (Herrero et al., 1990) vorliegt. Als Transposon-Donor diente *E. coli* S17-1λpir (Herrero et al., 1990).

Um die Auffindung von Transkonjuganten zu erleichtern, wurde zunächst mittels entsprechendem Selektionsagar eine Rifampicin resistente Mutante des Rezipienten *A. veronii* 163a isoliert.

Die Transposonmutagenese wurde wie bei de Lorenzo et al. beschrieben durchgeführt (de Lorenzo and Timmis, 1994). *A. veronii* 163a-rif<sup>r</sup> und *E. coli* S17-1λpir wurden über Nacht bei 37 °C in NI-Nährbouillon geschüttelt. 100 µl jeder Kultur wurden dann in 5 ml sterilem MgSO<sub>4</sub> gemischt und durch Vakuumfiltration auf einen Millipore HA 0,45µm Filter gebracht. Der Filter wurde auf NI-Nähragar gelegt und für 6 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die auf dem Filter gewachsenen Zellen in 10 mM MgSO<sub>4</sub> suspendiert. Transposonmutanten, bei denen die Insertion des Transposons in das Chromosom eine verringerte Empfindlichkeit gegenüber β-Laktamantibiotika zur Folge hatte, wurden dann auf einem Nähragar selektiert, der Kanamycin (30 µg/ml), Rifampicin (10µg/ml) und Cefotaxim (2 µg/ml) enthielt.

## **2.5. Isolation und Analyse von Muropeptiden**

### **2.5.1. Präparation der löslichen Muropeptide**

Zur Präparation der löslichen Muropeptide wurde eine Übernachtskultur 1:100 in 200 ml M9 Bouillon verdünnt und im Schüttelinkubator bis zu einer  $OD_{560}$  von 0,5 inkubiert. Zur Isolierung  $^3\text{H}$ -markierter Muropeptide wurde bei einer  $OD_{560}$  von 0,1  $15\ \mu\text{Ci}\ ^3\text{H}$ -markierte Diaminopimelinsäure zugegeben. Die Zellen wurden durch zehnmünütige Zentrifugation mit 5000 Upm bei  $4^\circ\text{C}$  geerntet und anschließend mit 0,01 M TrisHCl, pH 8 gewaschen. Das Pellet wurde in ca. 5 ml sterilem, eiskaltem Wasser aufgenommen. Die resuspendierten Zellen wurden dann in 20 ml kochende Wasser gegeben und für 20 Minuten gekocht. Es folgt der Niederschlag von nichtlöslichem Zellmaterial durch Zentrifugation (15 min, 12000 g, RT). Der klare Überstand wurde mit Hilfe einer Vakuumzentrifuge auf ca. 500  $\mu\text{l}$  eingengt. Im Anschluß erfolgten eine Proteinfällung durch Zugabe von 1 Volumen eiskalten Methanol und eine 15-minütige Inkubation auf Eis mit anschließender Zentrifugation (15 min, 12000 g, RT). Restliches Methanol wurde in der Vakuumzentrifuge abgedampft. Schließlich wurde die Muropeptidlösung durch Zugabe von Phosphorsäure auf etwa pH 3 eingestellt. Eine zehnmünütige Zentrifugation bei 12000xg entfernte die dabei noch ausfallenden Proteine, und der Überstand wurde bis zur HPLC-Analyse bei  $-20^\circ\text{C}$  gelagert.

### **2.5.2. Auftrennung der löslichen Muropeptide mittels HPLC**

Die Analyse der Muropeptide mittels HPLC basiert auf der von Glauner und Schwarz entwickelten Methode (Glauner and Schwarz, 1983). Verwendet wurde eine 250 x 4,6 mm Stahlsäule, gefüllt mit C18 Hypersil ODS, 3  $\mu\text{m}$  (Bischoff, Leonberg), zusammen mit einer Vorsäule des gleichen Füllmaterials.

Die Auftrennung der Muropeptide erfolgte mittels eines zweiphasigen Gradienten mit 0,05 M Na-Phosphat, pH 4,31 (Puffer A) und 0,075 M Na-Phosphat, pH 4,95; 15 % Methanol (Puffer B). Bei einer konstanten Fließgeschwindigkeit von 0,5 ml/min stieg der Anteil von Puffer B im ersten Abschnitt linear von 0 auf 32 % und im zweiten Abschnitt von 35 auf 58 %.

Aufgetragen wurden 200  $\mu\text{l}$  des Muropeptid-Zellextrakts. Der Nachweis der eluierten Substanzen erfolgt durch Bestimmung der Radioaktivität der aufgefangenen Fraktionen (1 Fraktion /30 s).

### 3. Ergebnisse

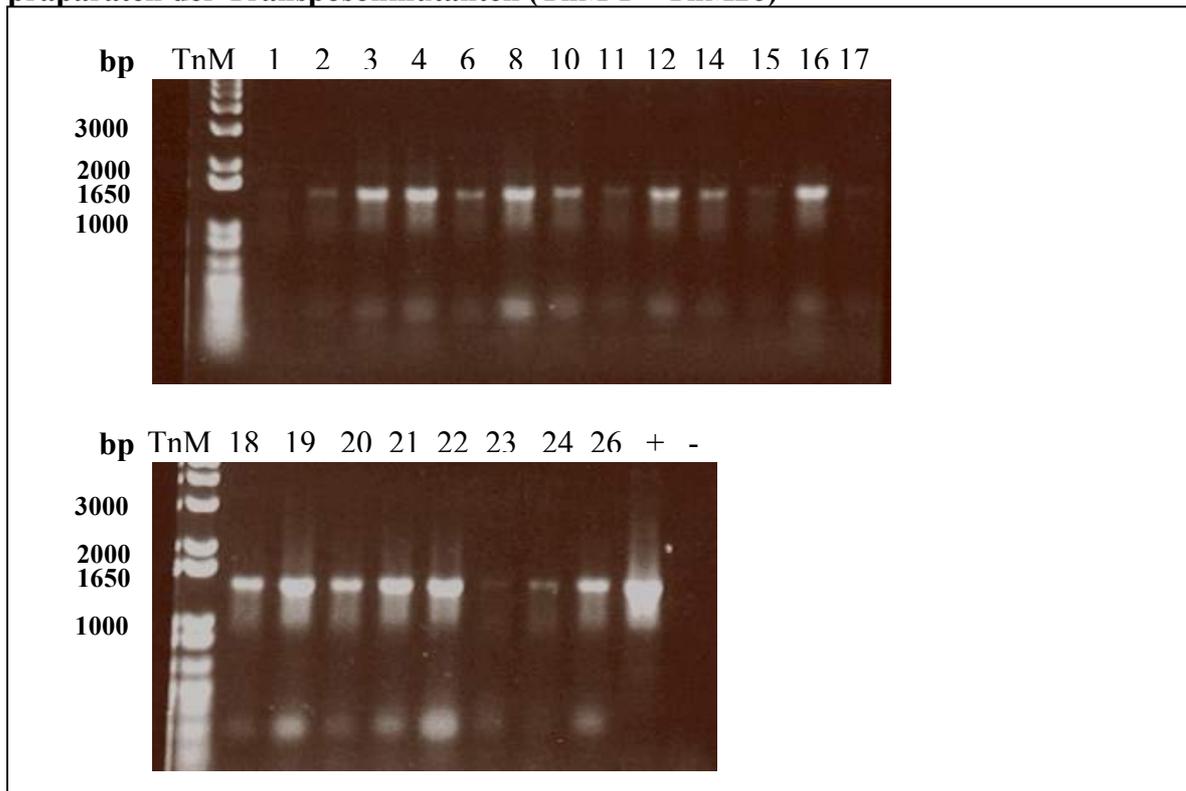
#### 3.1. Herstellung und Charakterisierung von Transposonmutanten

Ein Ansatzpunkt zur Aufklärung der  $\beta$ -Laktamase-Induktion bei *Aeromonas veronii* war es, weitere Gene zu finden, die die Regulation der  $\beta$ -Laktamase-Expression beeinflussen. Dazu wurden mittels Transposonmutagenese 19 Mutanten von *Aeromonas veronii* hergestellt, die einen dereprimierten Phänotyp aufweisen, d.h. die ihre  $\beta$ -Laktamasen in Abwesenheit eines Induktors in erhöhtem Maß produzieren. Das für die Mutagenese verwendete Transposon mini-Tn5Km2 inseriert in das Bakterienchromosom, der Insertionsort ist dabei zufällig. Bei den durch Selektion auf verringerte Empfindlichkeit gegenüber  $\beta$ -Laktamen erhaltenen Mutanten („Transposonmutanten“) ist davon auszugehen, daß ein für die Kontrolle der  $\beta$ -Laktamase-Expression bedeutsames Gen ausgeschaltet wurde. Die Transposonmutanten wurden in der kooperierenden Arbeitsgruppe von Dr. Peter Bennett am Institute for Microbiology and Pathology der University of Bristol (England) hergestellt.

##### 3.1.1. *blrD* PCR

Zur Überprüfung, ob das Transposon bei einer der Mutanten in das Gen *blrD* inseriert ist, wurde eine PCR mit den spezifischen Primern *blrD*<sup>+</sup> und *blrD*<sup>-</sup> durchgeführt, die ein 1,5 Kb großes DNA-Fragment von *blrD* amplifizieren. Im Falle einer Insertion wäre das Amplifikat um die Länge des Transposons von 1,7 Kb vergrößert. Die spezifische Amplifikation des *blrD*-Gens durch PCR und die anschließende gelelektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte ergab jedoch für alle untersuchten Transposonmutanten ein 1,5 Kb großes Fragment (Abb. 3.1).

**Abb. 3.1 Gelelektrophorese der Produkte der *blrD* PCR , durchgeführt mit Aufkochpräparaten der Transposonmutanten (TnM 1 – TnM26)**



### 3.1.2. Klonierung zur Identifizierung des ausgeschalteten Gens

Zur Identifizierung des Insertionsorts der mini-Tn5Km2-Kassette im Chromosom der überproduzierenden Transposonmutanten wurde die chromosomale DNA der Mutante TnM4 mit den Restriktionsendonucleasen *EcoRI*, *SacI*, *KpnI*, *XbaI*, *PstI* und *SalI* verdaut und in die *multiple cloning site* von pSU18 ligiert. Durch Verwendung des Kanamycin-Resistenzgens des Transposons als Resistenzmarker sollten dann nach der Transformation von DH5 $\alpha$ -Zellen Rekombinanten selektiert werden, die das chromosomale Fragment mit dem inserierten Transposon enthalten.

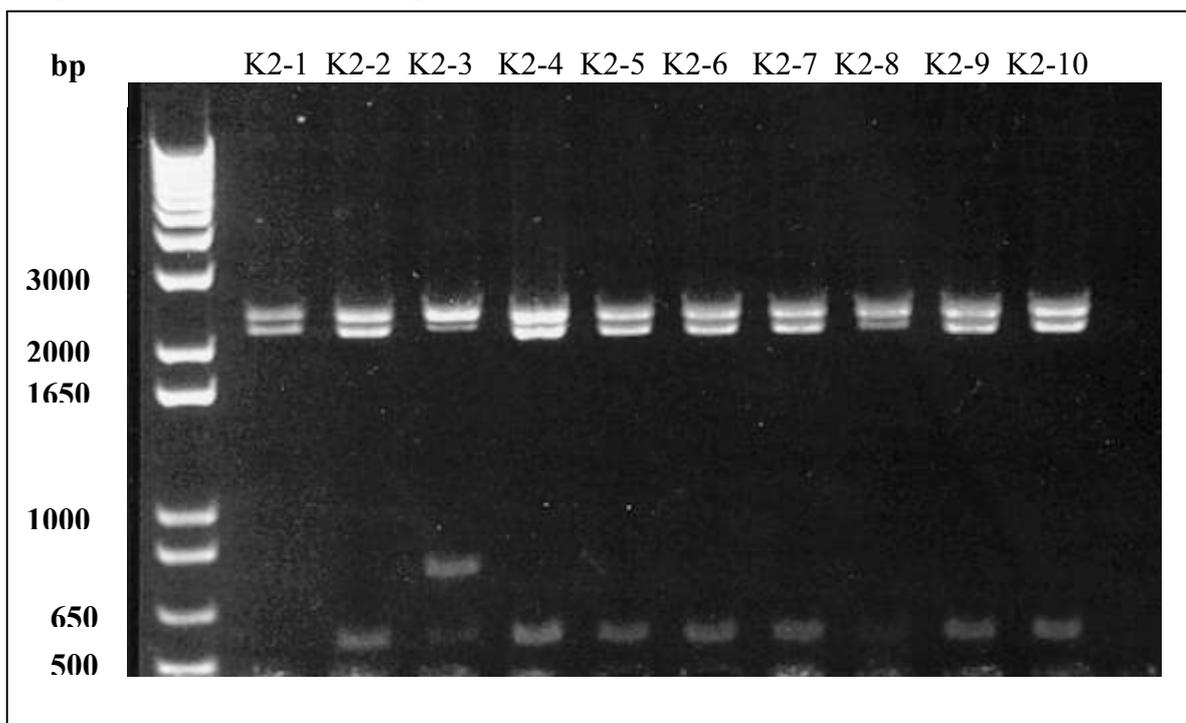
Um die Effektivität der Hydrolyse zu steigern, wurde nach der Inkubation über Nacht eine zweistündige Zusatzinkubation mit 3  $\mu$ l Enzym bei 37  $^{\circ}$ C durchgeführt. Zur Kontrolle des Klonierungserfolgs wurden im Anschluß an die Transformation 50  $\mu$ l der Bakterien-suspension auf Blau-Weiß-Selektionsplatten ausplattiert. Ansätze, aus denen nach Inkubation eine große Anzahl weißer Kolonien hervorgingen, wurden weiterbearbeitet. Die restlichen 950  $\mu$ l der transformierten DH5 $\alpha$ -Bakteriensuspension wurden 1: 10 in Nährbouillon

verdünnt und über Nacht bei 37°C geschüttelt. Von der so erhaltenen Übernachtskultur wurde eine Plasmidpräparation durchgeführt.

Nach der erneuten Transformation von DH5 $\alpha$ -Zellen mit dieser Plasmidpräparation wurden Rekombinanten mit Chloramphenicol, Kanamycin und Nalidixinsäure selektiert. Die Isolation von Rekombinanten gelang nur mit Ansätzen, bei denen die chromosomale DNA, mit dem Enzym *SacI* geschnitten worden war. Dabei erwies sich ein Verhältnis von chromosomaler DNA zu Plasmid von 3,75 : 1 als erfolgreich.

Zehn der isolierten Rekombinanten wurden ausgewählt, K2-1 bis K2-10 benannt und nach einmaliger Passage einer Miniplasmidpräparation unterzogen. Die Plasmidpräparationen wurde mit *SacI* verdaut (Abb. 3.2).

**Abb. 3.2** *SacI* Hydrolyse der Miniplasmidpräparation der gepickten Rekombinanten, aufgetrennt durch Gelelektrophorese

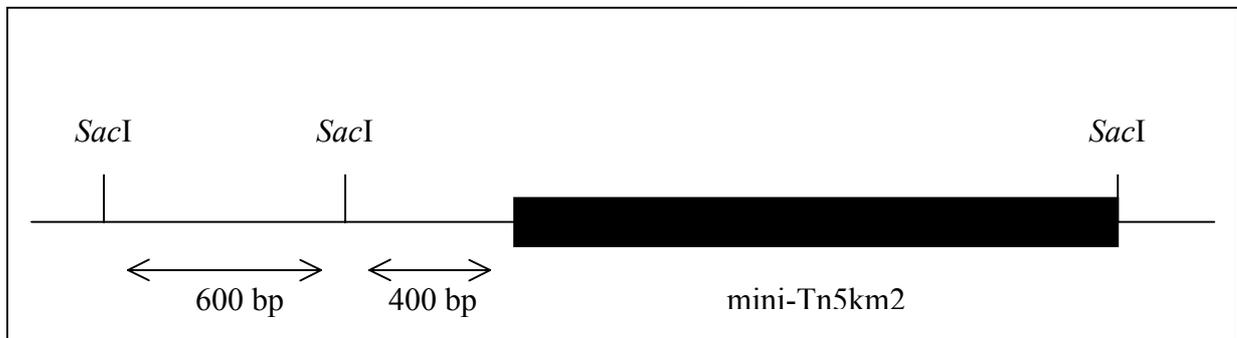


Bei den mit *SacI* verdauten Plasmiden sind mit einer Ausnahme (K2-3) jeweils drei Banden erkennbar. Demnach hat die Hydrolyse drei Fragmente freigesetzt: Das Plasmid pSU18 ist 2,3 Kb groß und wird durch eine der beiden oberen, starken Banden repräsentiert. Die beiden anderen Banden repräsentieren die in das Plasmid inserierten Fragmente. Das grö-

ßere Fragment hat in etwa die Größe von pSU18, das andere ist mit ca. 600 bp deutlich kleiner.

Die Plasmidpräparation des Klons K2-2 wurde für die Sequenzierung des inserierten Fragments eingesetzt. Diese Sequenzierung bestätigte die durch die Hydrolyse mit *SacI* gefundene, zusätzliche *SacI*-Schnittstelle innerhalb des Fragments. Offensichtlich wurden zwei Einzelfragmente in die *multiple cloning site* des pSU18-Vektors ligiert (Abb. 3.3). Nur eines davon liegt in unmittelbarer Nachbarschaft zu dem O-Ende der Kanamycin-kassette und repräsentiert daher das durch die Kassette ausgeschaltete Gen.

**Abb. 3.3 Schematische Darstellung der ermittelten Sequenz**



Die Sequenz dieses Fragments (Abb. 3.4) wurde analysiert und mittels des EMBOSS-Transeq Programms des European Bioinformatics Institute (<http://www.ebi.ac.uk/emboss/transeq/index.html>) in die möglichen Aminosäuresequenzen umgeschrieben. Diese Sequenzen wurden dann mit Hilfe des BLAST Programms mit denen anderer Proteine in der EMBL Datenbank verglichen. Der Vergleich ergab eine Homologie zu dem Penicillinbindeprotein 4 (PBP4) verschiedener gramnegativer Spezies.

**Abb. 3.4 Sequenz des klonierten *SacI*-Fragments**

Abschnitte die eine Homologie zu einem Gen in der Datenbank aufweisen sind in die entsprechenden Aminosäuresequenzen übersetzt. In dem unmittelbar an das O-Ende des Transposons grenzenden, PBP-ähnlichen Gen sind die konservierten Aminosäuremotive des aktiven Zentrums grau unterlegt

```

                                SacI
                                gagctcgagaccatgaccc
                                E L E T M T
agcgcatcgtgacccaccttggcgggcccgtgcaccatcagcggctgccgatgcctgcc
Q R I V T H L G G P L H H Q R L P D A C
tgccggccggcagccaggtggcgcccctggtggcctgcgccatgctggccggggcccgcg
L P A G S Q V A P L V A C A M L A G A R
agcaggtcggtcaggtggacttcgccctgcacaatgccggcggagtgcgctgctccctcg
E Q V G Q V D F A L H N A G G V R C S L
agcccgggcccgtcagcgaagcggacatcgccggccgcctgctgccgttcgccatcccgc
E P G P L S E A D I A G R L L P F A I P
tcaacctctatcgggtgcacggccatgaactggccgaagcgtggagggggccatcgaca
L N L Y R V H G H E L A E A L E G A I D
acgccaccaacaacggcgtgacgggcaatggcagcggcagcttcccctataaccgccggcg
N A T N N G V T G N G S G S F P Y T A G
tgcgcttctgttatcaggcagaccagcccaagggggcgcggatcaccggctggagtggg

agcgcgcccccgccagtgccagccggtcgaggccgacgccatctatcgggggggtttcca

gcgcctacaaccgcctccgggaaggagggtacaccgcgctggcccgcaccctgaccag
                                SacI
cacaaccaggagctcaaaggctgcatcaccccgaacaaggagccacagggactgcgcttc
H N Q E L K G C I T P N K E P Q G L R F
gccatccacgacgtggaggcctggggctgggacaacatccgctgggccatggaccgtgcc
A I H D V E A W G W D N I R W A M D R A
ggcatcaagcatgacggcctgctgcgggtgacccacaaatcgccggacaatgccgagacg
G I K H D G L L R V T H K S P D N A E T
ctggggcaaccactactcgggtctcattgccgggtgatgctggccaagatgctgaaaaaatcg
L G N H Y S V S L P V M L A K M L K K S
gacaacctctatgccgatactttcctgaagaccgtcggtcgccactactacaacaagccg
D N L Y A D T F L K T V G R H Y Y N K P
ggcagctatcgcagcggcaccatggcgggtgcgcgccattctgaccaagaacggcatcgat
G S Y R S G T M A V R A I L T K N G I D
ctggggcaacgccaccctggccgacggctcgggcctctctgctgactcctatacacaagt
L G N A T L A D G S G L S A - L L Y T S
gcggccgcggcctagggcggcgaagcttgcattgcctgcaggtcgactctagaggatccgg
A A A A - A A E A C M P A G R L - O-Ende
ctgtaatccgggcagcgaacggaacattcatcaagtgtaaaaatggaatcaataaagcc

```

Tabelle 3.1 gibt die Identitäten für einige ausgewählte Spezies an. Auch das nicht unmittelbar an das Transposon grenzende Fragment wurde auf diese Weise analysiert. Der Vergleich mit der Datenbank ergab hier eine Homologie zu dem Gen für eine putative Nucleotidase von *Vibrio cholerae*.

**Tab. 3.1 Identität zwischen der ermittelten Aminosäuresequenz und dem homologen PBP4 verschiedener Spezies**

Spezies	Identität (%)
<i>Haemophilus influenzae</i>	35
<i>Shewanella oneidensis</i>	40
<i>Pasteurella multocida</i>	36
<i>Yersinia pestis</i>	38
<i>Escherichia coli</i>	35

In der kooperierenden Arbeitsgruppe von Dr. Peter Bennett am Institute for Microbiology and Pathology der University of Bristol (England) wurde in einer anderen überproduzierenden Transposonmutante des Stamms *A. veronii* 163a durch *SalI* Hydrolyse die Teilsequenz (Abb. 3.5) eines weiteren, durch das Transposon ausgeschalteten Gens bestimmt (Niumsup, 1998).

**Abb. 3.5 Sequenz des am Institute for Microbiology and Pathology der University of Bristol klonierten *SalI*-Fragments**

```
accaggagcaactgctggggttggatgaaggtcacctcatcctgggtggggcaaggcccg
T Q E Q L L G L D E G H L I L V G Q G P
caccggctgacggccgccaccgcggccgccttcaacgacatgcaggtggccgcccac
H R L T A A T A A A F N D M Q V A A A H
gccggtttcaacctgcagcccgcctccagctc
A G F N L Q P A S S
```

Zu dieser Sequenz ließ sich zunächst kein homologes Gen mit bekannter Funktion finden. Erneute Recherchen mit dem BLAST Programm ergaben jedoch, daß das Genprodukt dieses Fragments eine hohe Ähnlichkeit (38 % Identität) mit einem D,D-Carboxypeptidaseverwandten Protein bei *Vibrio cholerae* aufweist.

Die beiden als ausgeschaltet identifizierten Gene wurden für die weitere Bearbeitung zunächst *pbpa* bzw. *pbpb* benannt.

### 3.1.3. PCR zur Identifizierung des ausgeschalteten Gens in restlichen Transposonmutanten

Um festzustellen, in welchen Mutanten das Transposon ebenfalls in *pbpa* oder *pbpb* inseriert ist, wurden mit allen Stämmen zwei PCR-Reaktionen durchgeführt. Dabei war jeweils der eine Primer zum inserierten mini-Tn5Km2 komplementär und der andere zum jeweili-

gen zu untersuchenden Gen. Für die Analyse des Gens *pbpa* fanden die Primer KNR3- und K2-2+ Verwendung. Die PCR-Reaktion mit diesen Primern lieferte bei sieben der 19 untersuchten Transposonmutanten ein Fragment mit einer Größe von ca. 350 bp. Bei den übrigen 12 Transposonmutanten ergab die Reaktion mit diesem Primerpaar kein Amplifikat. Die Untersuchung mit den Primern DapE+ und KNR2+, die für das *pbpb*-Gen verwendet wurden, ergab dann bei elf dieser 12 Stämme ein Fragment von ca. 1000 bp. Nur bei einem Stamm konnte mit keinem der beiden Primerpaare ein Fragment amplifiziert werden. Tabelle 3.2 fasst die Ergebnisse der beiden PCR-Reaktionen zusammen.

**Tab. 3.2 Ergebnisse der PCR-Reaktionen**

		<i>pbpa</i> PCR	<i>pbpb</i> PCR
	Primer	KNR3-, K2-2+	DapE+, KNR2+
<b>1</b>	TnM1	+	-
<b>2</b>	TnM2	-	+
<b>3</b>	TnM3	-	+
<b>4</b>	TnM4	+	-
<b>5</b>	TnM6	-	+
<b>6</b>	TnM8	+	-
<b>7</b>	TnM11	-	+
<b>8</b>	TnM12	+	-
<b>9</b>	TnM14	-	+
<b>10</b>	TnM15	-	+
<b>11</b>	TnM16	-	+
<b>12</b>	TnM19	-	-
<b>13</b>	TnM20	-	+
<b>14</b>	TnM21	-	+
<b>15</b>	TnM22	-	+
<b>16</b>	TnM23	+	-
<b>17</b>	TnM24	-	+
<b>18</b>	TnM27	+	-
<b>19</b>	TnM28	+	-

Die Sequenzierung der PCR-Produkte von TnM1 und TnM8 ergab, daß das Transposon jeweils nicht an exakt dem gleichen Ort im Gen inseriert ist. Der Insertionsort ist jeweils verschoben, bei dem Stamm TnM1 liegt er weitere 107 bp stromaufwärts, bei dem Stamm TnM8 um 18 bp stromabwärts.

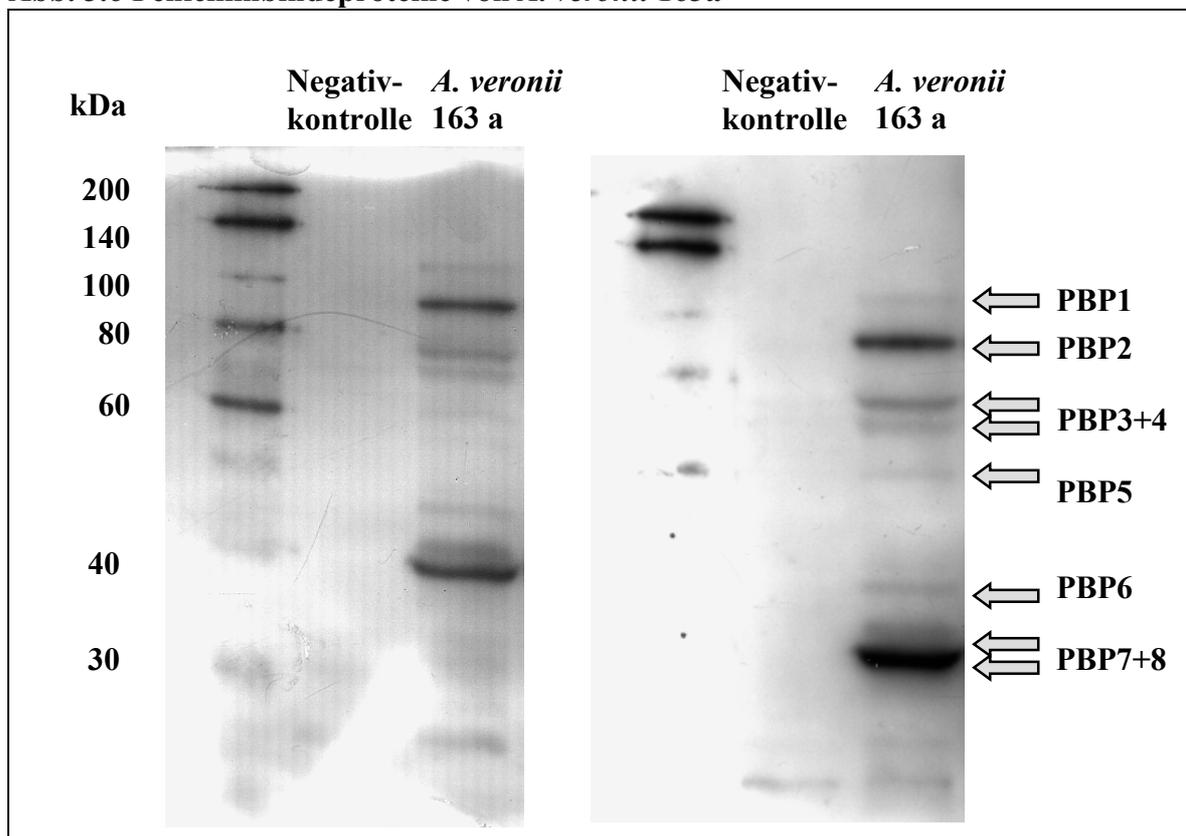
### 3.1.4. Nachweis der Penicillinbindeproteine auf Proteinebene

Um den Verlust eines PBPs bei den Transposonmutanten auch auf Proteinebene nachzuweisen, wurden die PBPs des Wildtyps und der verschiedenen Mutanten mit biotinyliertem Ampicillin markiert und mittels eines Streptavidin-Peroxidase-Konjugats über ECL-Detektion auf einem Röntgenfilm sichtbar gemacht.

Für das Gelingen des Nachweises war es wichtig, stets „frische“ Membranpräparationen einzusetzen, d. h. Präparationen, die nicht länger als 14 Tage bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert und nicht schon mehrfach aufgetaut und wieder eingefroren worden waren. Ein günstiges Mengenverhältnis für die Markierung der Membranproteine war  $100\text{ }\mu\text{g}$  Protein und  $5\text{ }\mu\text{g}$  biotinyliertes Ampicillin. Um den Hintergrund gering zu halten wurde die Einwirkungszeit der Blockierlösung von einer auf zwei Stunden erhöht und wurde der Waschschrift im Anschluß an die Einwirkung des Streptavidins intensiviert: Statt stets bei Raumtemperatur 1x kurz, 1x5, 1x15 und noch 1x5 Minuten zu waschen, wurde 1 x kurz bei Raumtemperatur, dann 2x15 Minuten und nochmals 1x 5 Minuten bei jeweils  $40^{\circ}\text{C}$  und anschließend erneut 2x 5 Minuten bei Raumtemperatur gewaschen.

Abbildung 3.6 zeigt zwei Röntgenfilme des PBP-Nachweises beim Stamm *Aeromonas veronii* 163a.

**Abb. 3.6 Penicillinbindeproteine von *A. veronii* 163a**



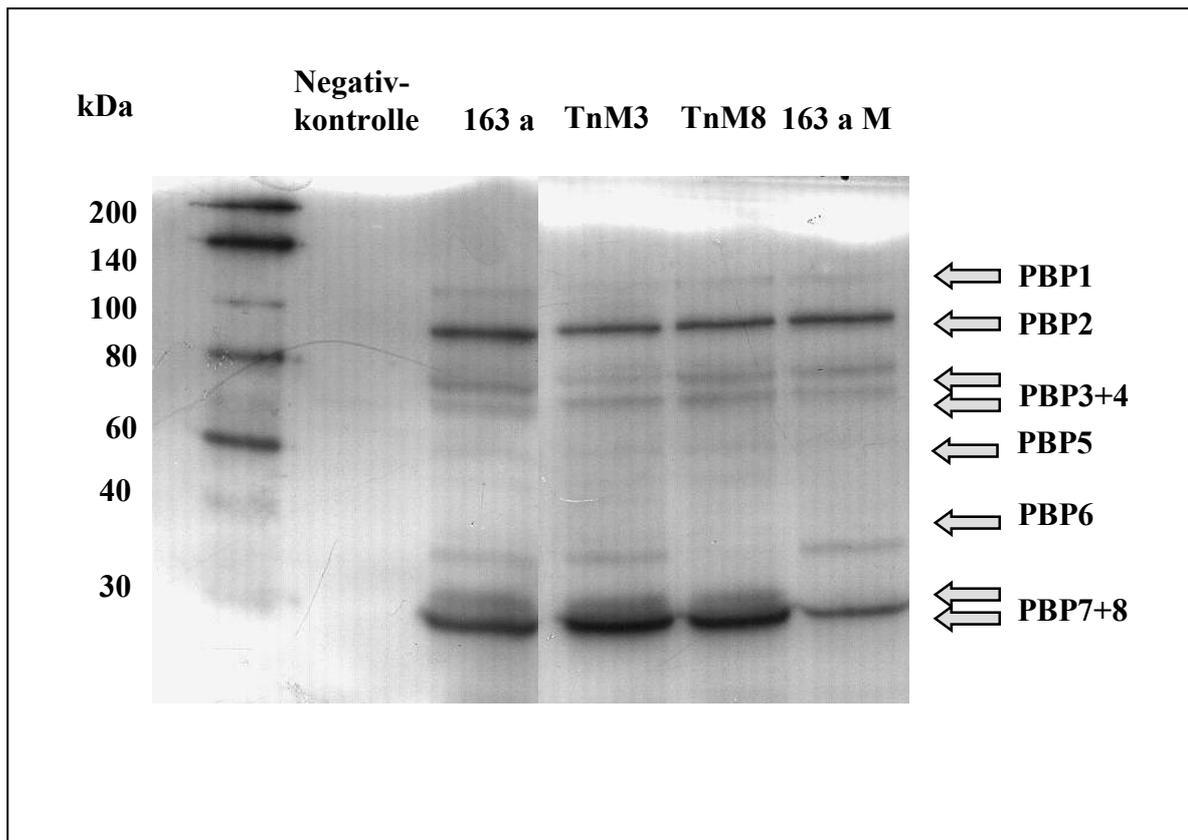
Als Negativkontrolle wurde die Membranpräparation des Stammes 163aP anstelle von biotinyliertem Ampicillin mit Natriumphosphatpuffer (pH 7,2) versetzt und dann im Folgenden wie die anderen Proben behandelt. Es sind zehn Banden erkennbar, die möglicherweise PBPs repräsentieren. Die beiden am weitesten gelaufenen Banden finden sich jedoch auch bei der Negativkontrolle wieder, die nicht mit biotinyliertem Ampicillin versetzt wurde. Die Markierung kann daher nicht aufgrund einer spezifischen Bindung des Streptavidins an biotinyliertes Ampicillin zustande gekommen sein. Es verbleibt daher bei nur acht Banden, die als PBPs interpretiert werden können.

Zur Abschätzung ihrer Molekulargewichte wurde aus den Laufstrecken der Markerproteine das Verhältnis von Laufstrecke zu Molekulargewicht bestimmt. So konnte anhand der Laufstrecken der einzelnen Proteine deren Molekulargewicht ermittelt werden. In Tabelle 3.3 sind die Größen der einzelnen PBPs aufgeführt.

**Tab. 3.3** Abgeschätzte Molekulargewichte der PBPs von *Aeromonas veronii* 163a

PBP	Molekulargewicht (kDa)
PBP1	106
PBP2	90
PBP3	77
PBP4	72
PBP5	64
PBP6	47
PBP7	42
PBP8	40

Abbildung 3.7 zeigt die Penicillinbindeproteine der Stämme 163a, TnM1, TnM8 und 163aM.

**Abb. 3.7 Penicillinbindeproteine von *A. veronii* 163a und verschiedenen Mutanten**

Bei der Transposonmutante TnM8 fehlt gegenüber dem Stamm 163a die 47-kDa-Bande. Zwischen dem klinischen Isolat und der Transposonmutanten TnM3 ist kein Unterschied im Bandenmuster erkennbar. Für die Mutante 163aM sind jedoch Unterschiede zum Wildtyp erkennbar: Die 40-kDa-Bande erscheint schwächer und die 42-kDa-Bande fehlt vollständig.

### 3.1.5. Phänotypische Charakterisierung der Transposonmutanten

Um zu überprüfen, ob die Insertion der Tn5-Kassette in den beiden Genen der Transposonmutanten unterschiedliche Auswirkungen hat, wurden die Minimalen Hemmkonzentrationen verschiedener  $\beta$ -Laktame und die spezifische  $\beta$ -Laktamase-Aktivität gegenüber Nitrocefin bestimmt.

### 3.1.5.1. Charakterisierung der Transposonmutanten durch MHK-Bestimmung

Die Minimalen Hemmkonzentrationen von 22 verschiedenen  $\beta$ -Laktam-Antibiotika gegenüber den Transposonmutanten wurden durch Mikrodilution bestimmt. Tabelle 4 zeigt die ermittelten MHK-Häufigkeitsverteilungen dieser Stämme.

**Tab. 3.4 MHK-Häufigkeitsverteilungen Transposonmutanten**

	< Cmin	0,125	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	128	256	512	1024	2048	>Cmax
Amoxicillin															4	10	4
Amoxicillin / Clavulansäure											7	6	2	2			1
Ampicillin / Tazobactam													1	5	10		2
Ampicillin / Sulbactam														6	9		3
Piperacillin													8				10
Piperacillin/Tazobactam											3						15
Piperacillin / Sulbactam																	18
Ticarcillin																	18
Cefazolin																	18
Cefotaxim								2	12	4							
Cefotaxim / Clavulansäure								6	10	2							
Ceftazidim								5	11	1	1						
Ceftazidim / Clavulansäure								12	4	1							1
Ceftriaxon									7	9							2
Cefpodoxim																	18
Cefuroxim									1	15							2
Cefepim					1	3	10	3	1								
Aztreonam	18																
Imipenem	17								1								
Meropenem	4	8	2	3	1												
Cefoxitin										2	14						2
Cefotetan											14	2					2

Die hellgraue Unterlegung kennzeichnet den für die jeweilige Substanz getesteten Konzentrationsbereich. Die dunkelgrau unterlegten bzw. doppelt umrandeten Kästchen markieren die MHK-Werte des jeweiligen  $\beta$ -Laktams gegenüber dem Wildtyp-Stamm 163a und der überproduzierenden Mutante 163aM. Die Minimalen Hemmkonzentrationen gegenüber diesen Stämmen sind in Tabelle 3.5 noch einmal angegeben:

**Tab. 3.5 Minimale Hemmkonzentrationen (mg/L) verschiedener  $\beta$ -Laktame gegenüber dem Wildtyp 163a und der überproduzierenden Mutante 163aM**

Antibiotikum	163aP	163aM	Antibiotikum	163aP	163aM
Amoxicillin	2048	>2048	Ceftazidim	0,25	8
Amoxicillin / Clavulansäure	32	64	Ceftazidim / Clavulansäure	0,25	8
Ampicillin / Tazobactam	1024	512	Ceftriaxon	2	16
Ampicillin / Sulbactam	1024	1024	Cefpodoxim	8	>64

**Fortsetzung Tab. 3.5 Minimale Hemmkonzentrationen (mg/L) verschiedener  $\beta$ -Laktame gegenüber dem Wildtyp 163a und der überproduzierenden Mutante 163aM**

Antibiotikum	163aP	163aM	Antibiotikum	163aP	163aM
Piperacillin	<2	>256	Cefuroxim	<4	16
Piperacillin/ Tazobactam	<4	>64	Cefepim	<0,5	4
Piperacillin / Sulbactam	16	>32	Aztreonam	<4	<4
Ticarcillin	128	>128	Imipenem	<2	4
Cefazolin	>64	>64	Meropenem	1	2
Cefotaxim	0,25	8	Cefoxitin	8	8
Cefotaxim / Clavulansäure	0,25	8	Cefotetan	8	8

Die Minimalen Hemmkonzentrationen der verschiedenen getesteten Substanzen sind bei den Transposonmutanten im Vergleich zum Wildtyp-Stamm überwiegend erhöht und fallen in etwa mit denen der überproduzierenden Mutante 163aM zusammen. Besonders ausgeprägt ist die gegenüber dem Wildtyp verringerte Empfindlichkeit beim Piperacillin mit und ohne Inhibitor und bei den Cephalosporinen. Die Empfindlichkeit der Transposonmutanten gegenüber Ampicillin mit und ohne Inhibitor ist dagegen mit der des Wildtyps vergleichbar. Die MHK-Werte des Carbapenems Imipenem liegen im Wildtyp-Bereich, während die Transposonmutanten gegenüber dem Carbapenem Meropenem sogar empfindlicher reagieren als der Wildtyp.

Die MHK-Häufigkeitsverteilungen der Transposonmutanten sind sehr homogen. Sie weisen keine bimodale Verteilung auf. Die Transposonmutanten, bei denen unterschiedliche Gene ausgeschaltet sind, lassen sich anhand ihrer MHK-Werte nicht unterscheiden.

### 3.1.5.2. Charakterisierung der Transposonmutanten durch Bestimmung der spezifischen $\beta$ -Laktamase-Aktivität

Die spezifische  $\beta$ -Laktamase-Aktivität gegenüber Nitrocefin wurde photometrisch bestimmt. Die ermittelten Werte lagen jeweils zwischen dem des Wildtyps und dem der überproduzierenden Mutante 163aM (Tabelle 3.6, Abbildung 3.8).

**Tab. 3.6 Spezifische  $\beta$ -Laktamase-Aktivitäten der Stämme 163a P und 163a M sowie der Transposonmutanten**

Stamm	Spezifische $\beta$ -Laktamase-Aktivität [U/mg]	Stamm	Spezifische $\beta$ -Laktamase-Aktivität [U/mg]
163aP	0,05	163aM	12,66
TnM1	2,19	TnM15	6,38
TnM2	5,54	TnM16	1,72
TnM3	0,48	TnM19	0,84
TnM4	1,74	TnM20	1,10
TnM6	1,22	TnM21	0,13
TnM8	1,92	TnM22	1,32
TnM11	0,57	TnM23	0,69
TnM12	0,84	TnM24	6,24
TnM14	0,14	TnM27	3,42

**Abb. 3.8 Spezifische  $\beta$ -Laktamase-Aktivitäten der Stämme 163a P und 163a M sowie der Transposonmutanten**

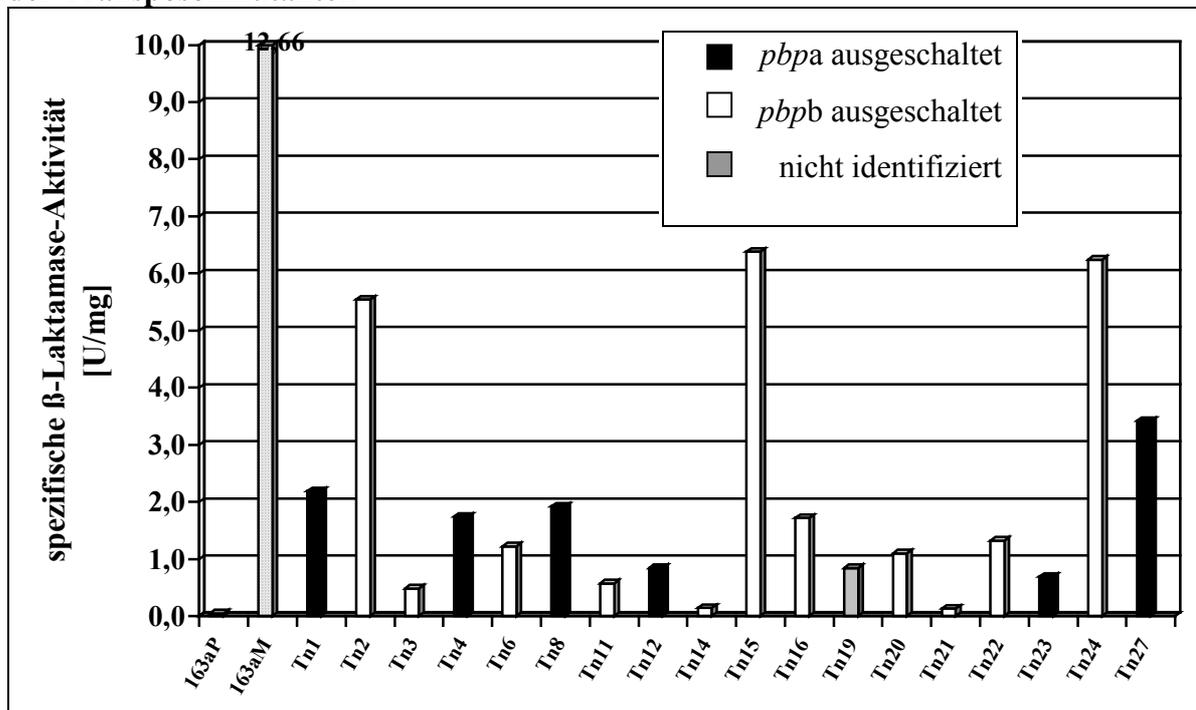


Abbildung 3.8 weist die spezifische  $\beta$ -Laktamase-Aktivität der verschiedenen Stämme aus und gibt an, welches der beiden identifizierten pbp-Gene bei dem jeweiligen Stamm ausgeschaltet ist. Die spezifischen Aktivitäten schwanken unabhängig von dem jeweils ausgeschalteten Gen. Hieraus wird ersichtlich, daß sich die beiden Deletionen auch in der  $\beta$ -Laktamase-Aktivität nicht unterschiedlich auswirken. Auffällig sind die relativ hohen Werte der Stämme TnM2, TnM15 und TnM24. Möglicherweise liegt bei ihnen eine zusätzliche Mutation vor, die die  $\beta$ -Laktamase-Produktion noch verstärkt.

### 3.2. Untersuchung des Zellwandstoffwechsels durch HPLC

Nachdem die vorangegangenen Untersuchungen zu den PBPs Hinweise auf eine Verknüpfung von Zellwandstoffwechsel und Regulation der  $\beta$ -Laktamase-Expression bei *Aeromonas veronii* ergeben hatten, sollte geprüft werden, inwieweit die Veränderungen im Zellwandstoffwechsel bei erhöhter  $\beta$ -Laktamase-Expression mittels HPLC verfolgt werden können. Durch chromatographische Auftrennung der löslichen Muropeptide sollte dabei ermittelt werden, welche Muropeptide bei erhöhter Expression der  $\beta$ -Laktamase-Gene verstärkt freigesetzt werden.

Zu diesem Zweck waren die Chromatogramme der überproduzierenden Mutanten und des induzierten Wildtyps einerseits mit dem Chromatogramm des nicht induzierten Wildtyps andererseits zu vergleichen.

#### 3.2.1. Vorversuche für die HPLC: Induktion mit verschiedenen Antibiotika

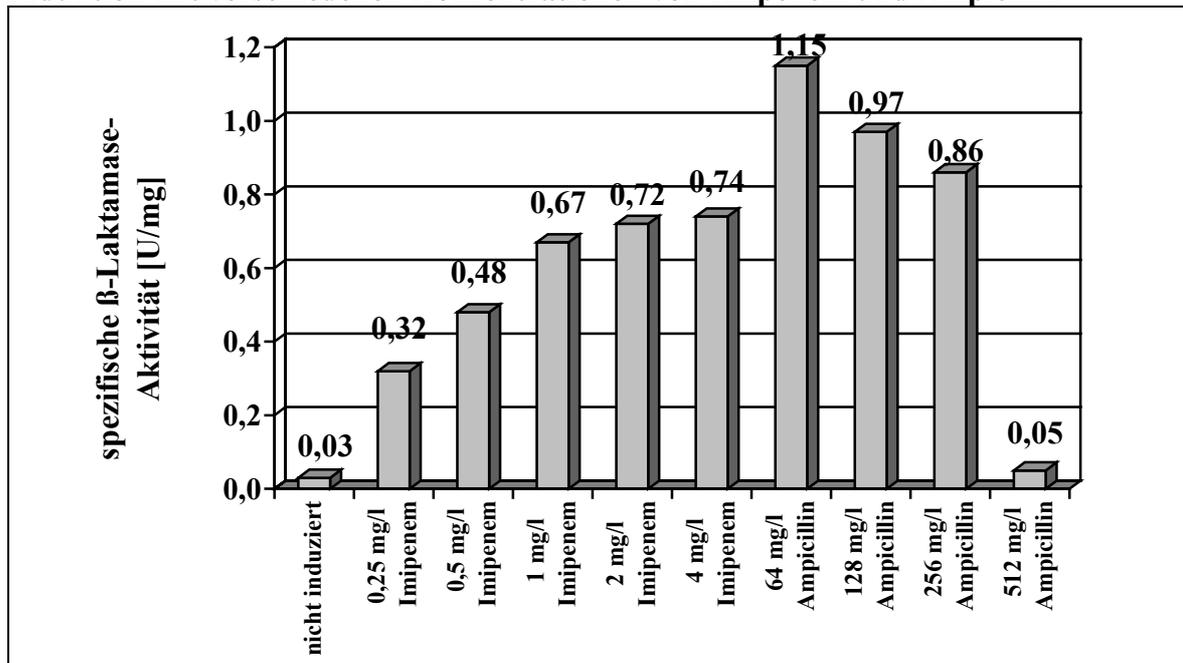
Durch verschiedene Vorversuche mussten die Eignung dieser Methode für die Spezies *Aeromonas veronii* überprüft und günstige Rahmenbedingungen entwickelt werden.

So konnte zunächst gezeigt werden, daß *Aeromonas veronii* in M9-Bouillon wächst und daß die  $\beta$ -Laktamase-Produktion auch in diesem Minimalmedium induzierbar ist. Für die weitere Untersuchung der Vorgänge bei der Signaldetektion des Zwei-Komponenten-Systems war zu ermitteln, welche Substanz in welcher Konzentration zu einer starken Induktion führt, um gezielt ein deutliches Signal für die  $\beta$ -Laktamase-Expression auslösen zu können. Für diese Zwecke wurden verschiedene Induktionsversuche durchgeführt.

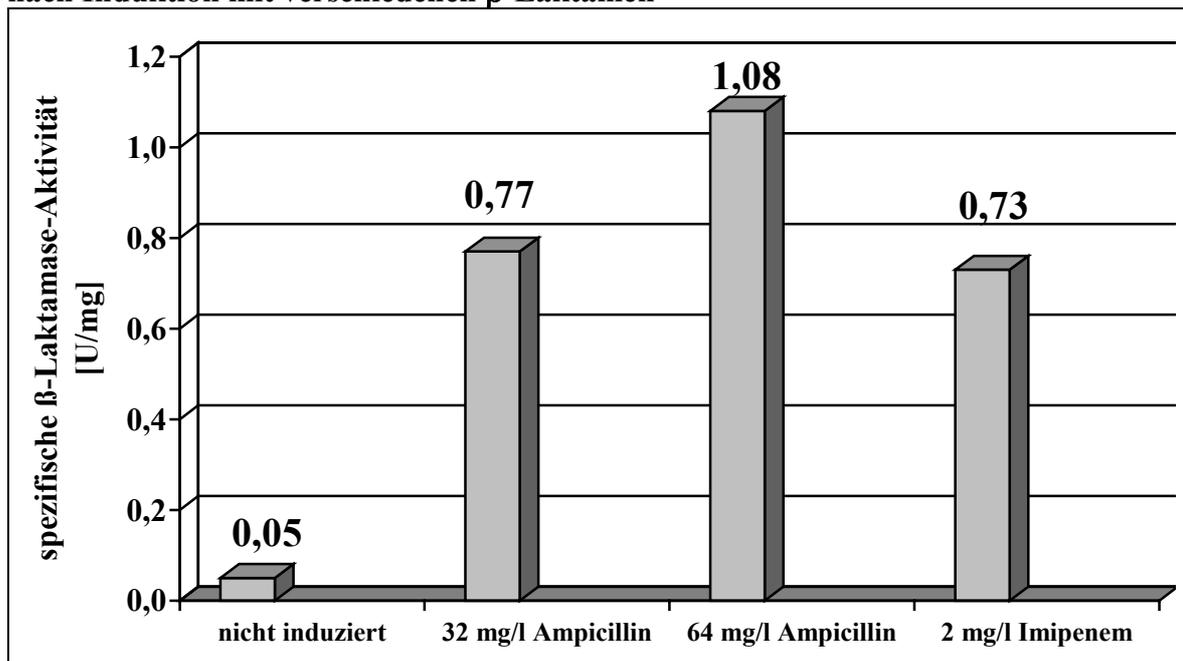
Bakken et al. (Bakken et al., 1988) fanden, daß die Expression der *Aeromonas*  $\beta$ -Laktamasen durch verschiedene  $\beta$ -Laktame unterschiedlich stark induziert wird. Für die Spezies *Aeromonas veronii* zeigten sie anhand eines Stammes, daß Ampicillin und Imipe-

nem stark induzierend wirken. Daher wurde für den Stamm *A. veronii* 163aP die spezifische  $\beta$ -Laktamase-Aktivität nach Induktion mit verschiedenen Konzentrationen dieser Antibiotika bestimmt (Abbildung 3.9 und 3.10). Dabei erwies sich Ampicillin in der Konzentration 64 g/ml als am stärksten induzierend.

**Abb. 3.9 Spezifische  $\beta$ -Laktamase-Aktivität des Stamms *Aeromonas veronii* 163a nach Induktion mit verschiedenen Konzentrationen von Imipenem und Ampicillin**

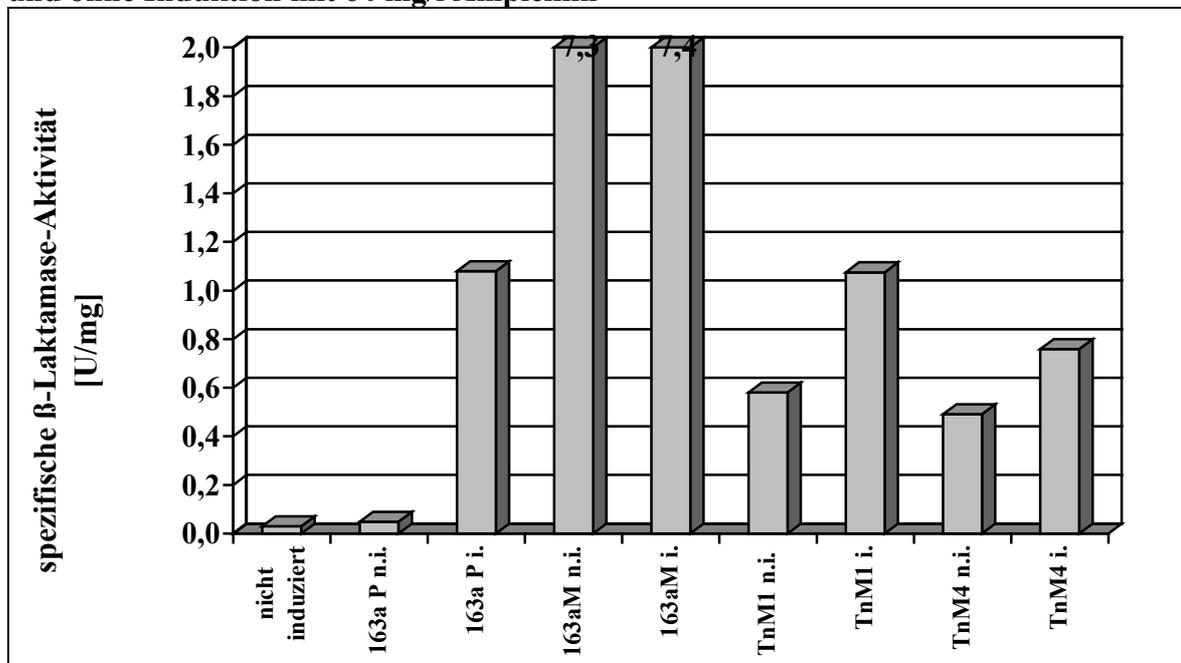


**Abb. 3.10 Spezifische  $\beta$ -Laktamase-Aktivität des Stamms *Aeromonas veronii* 163a nach Induktion mit verschiedenen  $\beta$ -Laktamen**



Mit dem auf diese Weise ermittelten starken Induktor wurden in der Folge weitere Induktionsversuche mit zwei Transposonmutanten und der Mutante 163aM durchgeführt, um den Level der Derepression bei diesen Stämmen zu ermitteln (Abb. 3.11).

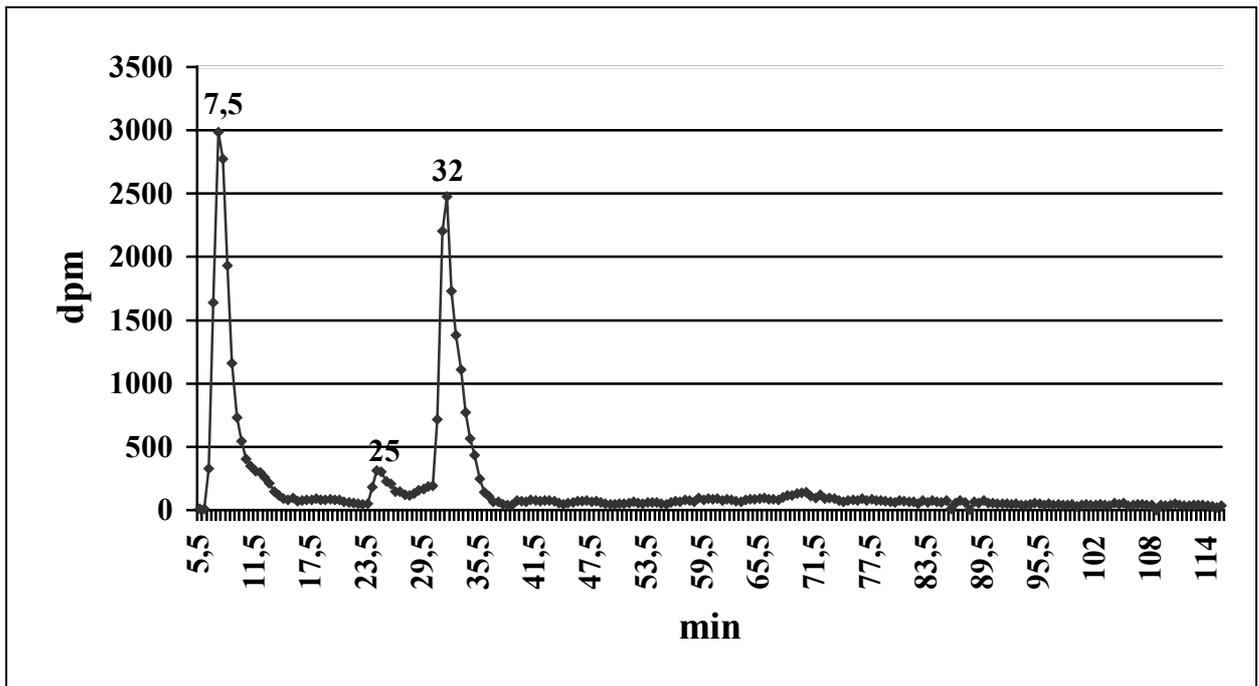
**Abb. 3.11 Spezifische  $\beta$ -Laktamase-Aktivität des Stamms *Aeromonas veronii* 163a mit und ohne Induktion mit 64 mg/l Ampicillin**



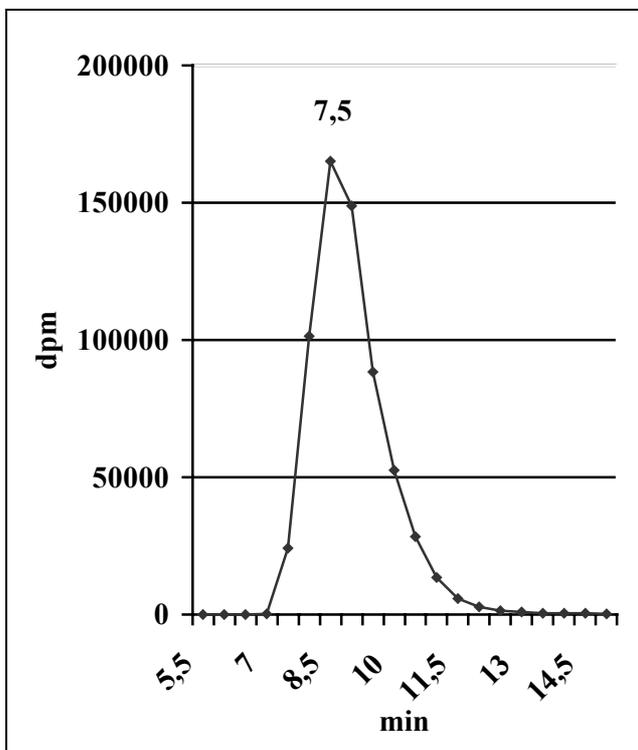
Diese Versuche ergaben, daß sich die  $\beta$ -Laktamase-Aktivität der Transposonmutanten durch Induktion noch leicht steigern ließ. Das Niveau des Stammes 163aM wurde jedoch nicht erreicht. Dieser Stamm scheint maximal dereprimiert zu sein, eine weitere Erhöhung seiner  $\beta$ -Laktamase-Aktivität war durch Induktion mit Ampicillin 64 mg/l nicht möglich.

### 3.2.2. HPLC-Analyse der löslichen Muropeptide

Abbildung 3.12 zeigt das HPLC-Chromatogramm der löslichen Muropeptide des Wildtyp-Stamms 163a ohne Induktion. Drei Substanzen wurden detektiert, die Retentionszeiten betragen 8, 25 und 32 Minuten.

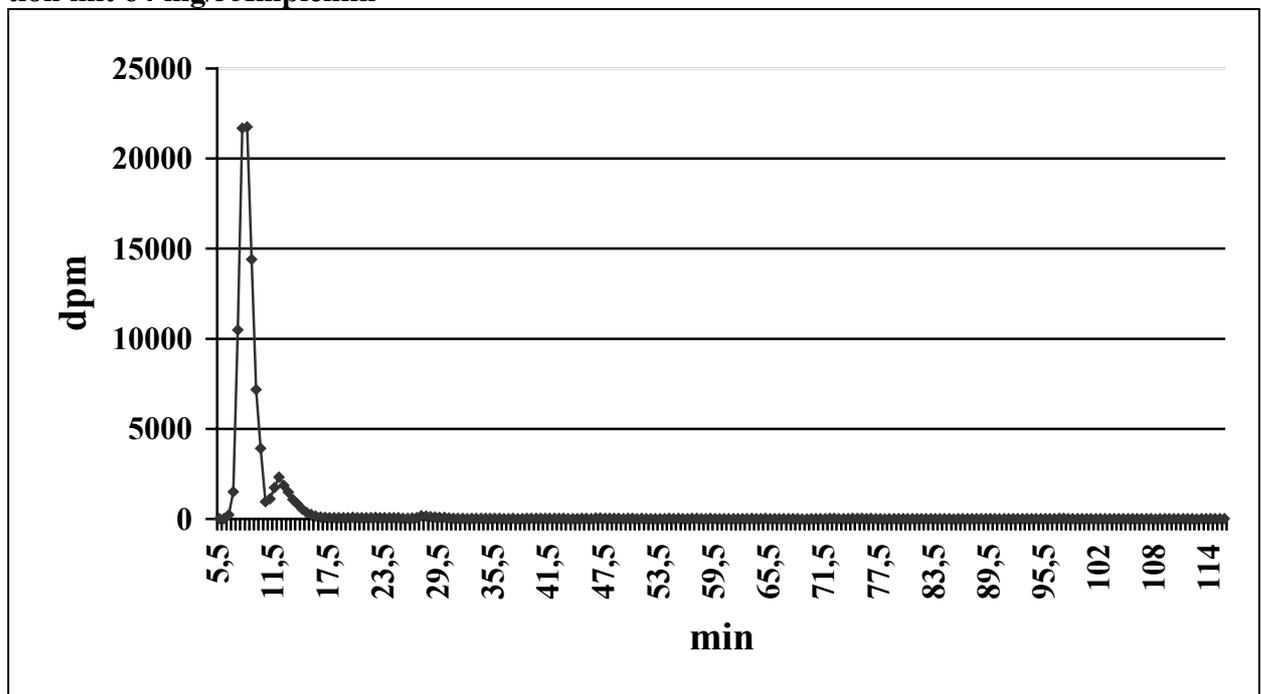
**Abb. 3.12 Lösliche Muropeptide des Wildtyp-Stamms 163a ohne Induktion**

Ein Test mit reiner Diaminopimelinsäure zeigte, daß diese Substanz nach 8 Minuten von der Säule eluiert (Abb. 3.13).

**Abb. 3.13 HPLC-Chromatogramm reiner Diaminopimelinsäure**

Bei dem ersten Peak im Chromatogramm des Wildtyp-Stamms ohne Induktion handelt es sich daher wahrscheinlich um freie Diaminopimelinsäure. Die Identität der anderen beiden Substanzen ist unklar. In HPLC-Chromatogrammen der Muropeptide von *E. coli* (Glauner, 1988) handelt es sich bei Substanzen mit so kurzen Retentionszeiten um Peptide ohne Zuckeranteil, während die Muropeptide mit einem Mono- oder Disaccharidanteil später von der Säule eluiert werden. Letztere wurden offensichtlich von der verwendeten Methode nicht erfasst. Es bestand die Möglichkeit, daß diese Muropeptide aufgrund eines sofortigen Ausscheidens in das Medium nicht in den Zellen nachweisbar sind. Daher wurde die Nährbouillon, in der die zur Präparation der löslichen Muropeptide angezogenen Bakterien gewachsen waren, ebenfalls analysiert: 10 ml des Zellüberstandes einer mit 64 mg/l Ampicillin induzierten Kultur von *Aeromonas veronii* 163a wurden mit Hilfe der Vakuumzentrifuge auf 100 µl eingengt und auf die HPLC aufgetragen. Abbildung 14 zeigt das zugehörige Chromatogramm.

**Abb. 3.14 Lösliche Muropeptide im Medium des Wildtyp-Stamms 163a nach Induktion mit 64 mg/l Ampicillin**

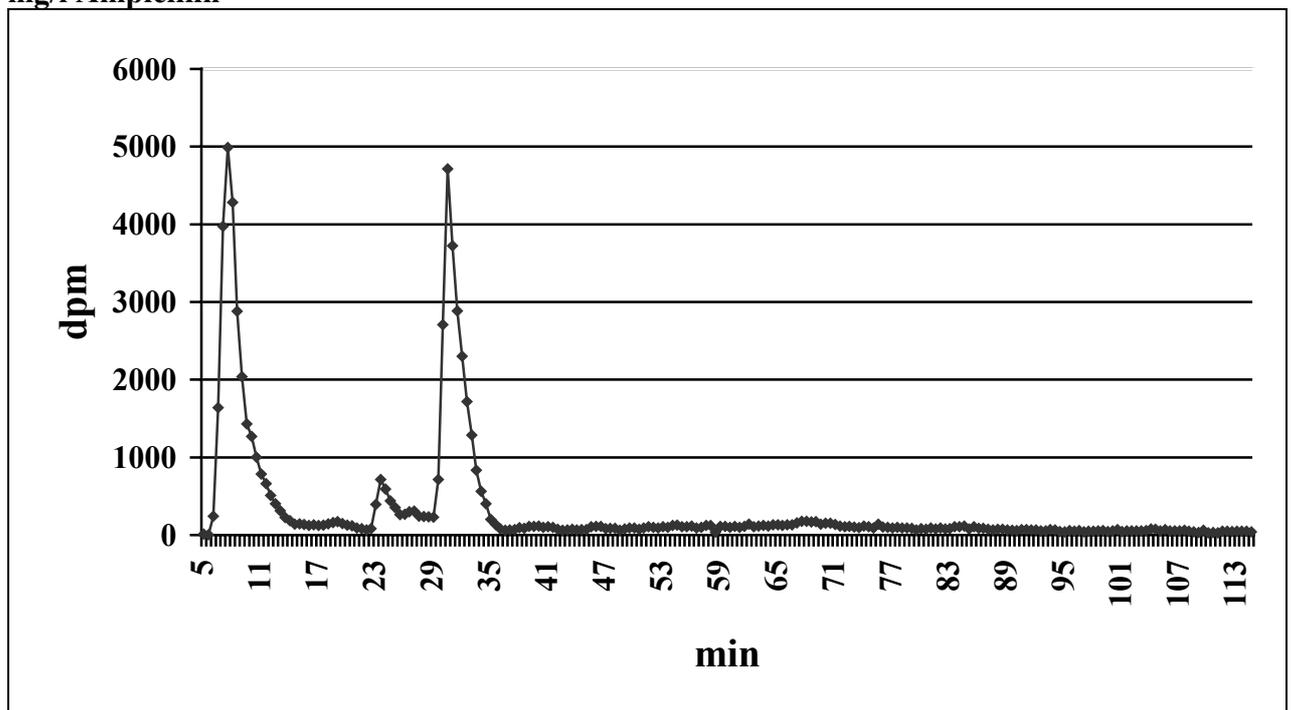


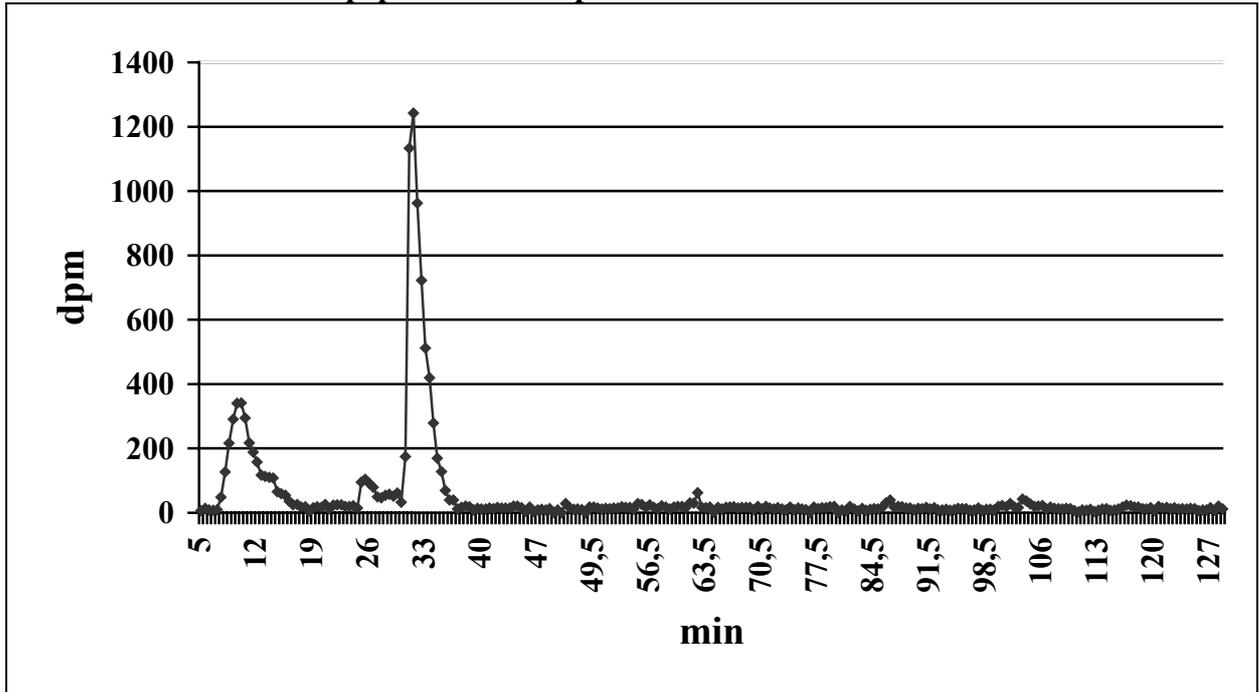
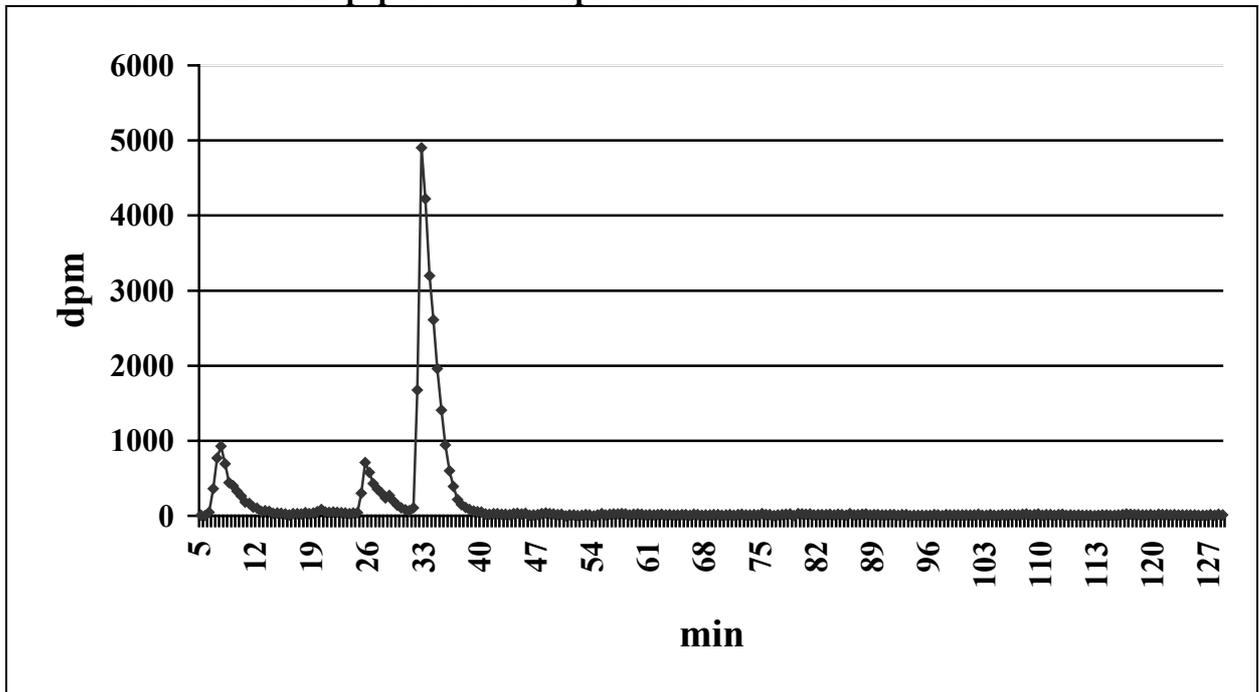
Auch hier konnten keine Substanzen mit Retentionszeiten, die größer als 30 Minuten waren, nachgewiesen werden (Abb. 3.14).

Im Anschluß wurde überprüft, ob bei den einzelnen Stämmen mit unterschiedlich starker  $\beta$ -Laktamase-Expression Unterschiede in der Zusammensetzung der löslichen Muropeptide erkennbar sind.

Die folgenden Abbildungen zeigen die löslichen Muropeptide des Wildtyp-Stamms 163a nach Induktion mit 64 mg/l Ampicillin (Abb. 3.15) und die löslichen Muropeptide der überproduzierenden Mutanten 163aM (Abb. 3.16) und TnM2 (Abb. 3.17).

**Abb. 3.15 Lösliche Muropeptide des Wildtyp-Stamms 163a nach Induktion mit 64 mg/l Ampicillin**



**Abb. 3.16 Lösliche Muropeptide der überproduzierenden Mutante 163aM****Abb. 3.17 Lösliche Muropeptide der überproduzierenden Mutante TnM2**

In keinem dieser Chromatogramme werden neue Substanzen nachgewiesen, die beim nicht induzierten Wildtyp nicht auftreten. Die beiden Substanzen mit den Retentionszeiten 25 und 32 Minuten werden in allen Fällen detektiert, ihr Größenverhältnis schwankt zwischen 1:5 und 1:10. Einzige Variation zwischen den Chromatogrammen der verschiedenen

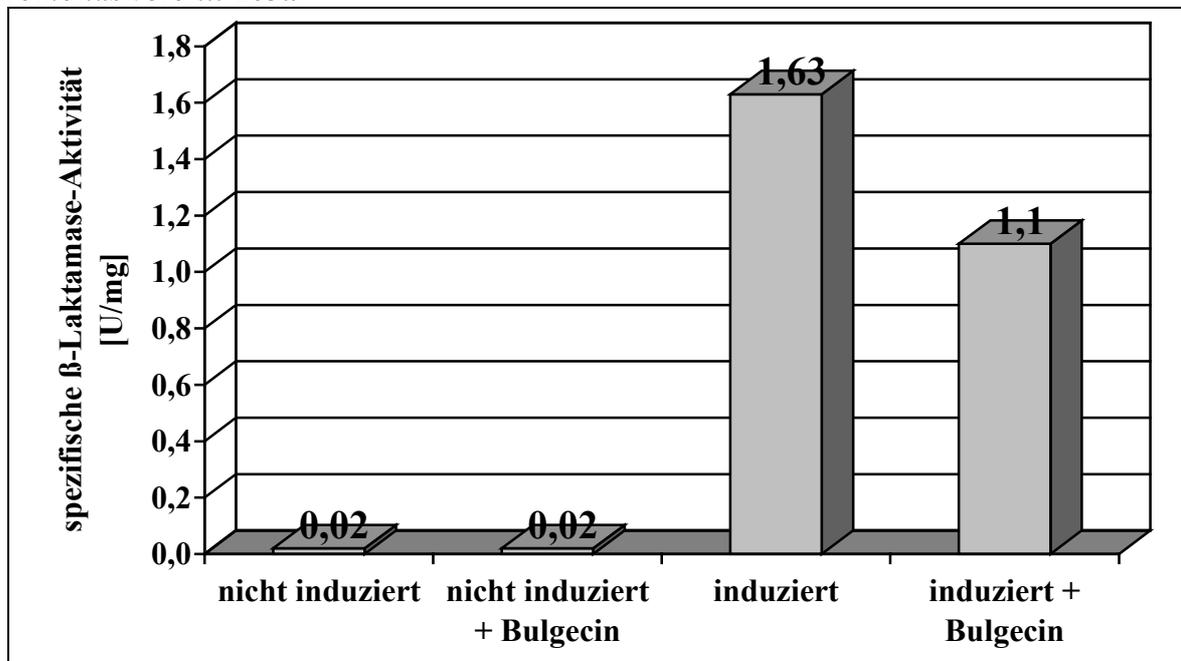
Stämme ist die Höhe des 8-Minuten-Peaks, die bei den überproduzierenden Mutanten deutlich geringer ist als beim induzierten und nicht induzierten Wildtyp.

### 3.3. Einfluß von Bulgecin auf die Induzierbarkeit und Überproduktion der $\beta$ -Laktamase

Bulgecin ist ein spezifischer Hemmstoff des Zellwandabbaus. Bei *Enterobacter cloacae* inhibiert es spezifisch die Transglykosylase Slt70, die durch die Spaltung von Bindungen in den Polysaccharidketten der Zellwand Muropeptide freisetzt. Ihre Hemmung führt bei *Enterobacter* zu einer verringerten Induzierbarkeit und bei dereprimierten Mutanten zu einer verringerten Überproduktion (Pfeifle et al., 1999).

Um die Auswirkungen von Bulgecin auf die  $\beta$ -Laktamase-Induktion und -Überproduktion von *Aeromonas veronii* zu untersuchen, wurde die spezifische  $\beta$ -Laktamase-Aktivität des induzierten Wildtyps und der überproduzierenden Mutanten, die jeweils mit Bulgecin im Medium herangewachsen waren, mit der  $\beta$ -Laktamase-Aktivität der gleichen Stämme, verglichen, die jedoch ohne Bulgecin herangewachsen waren (Abb. 3.18).

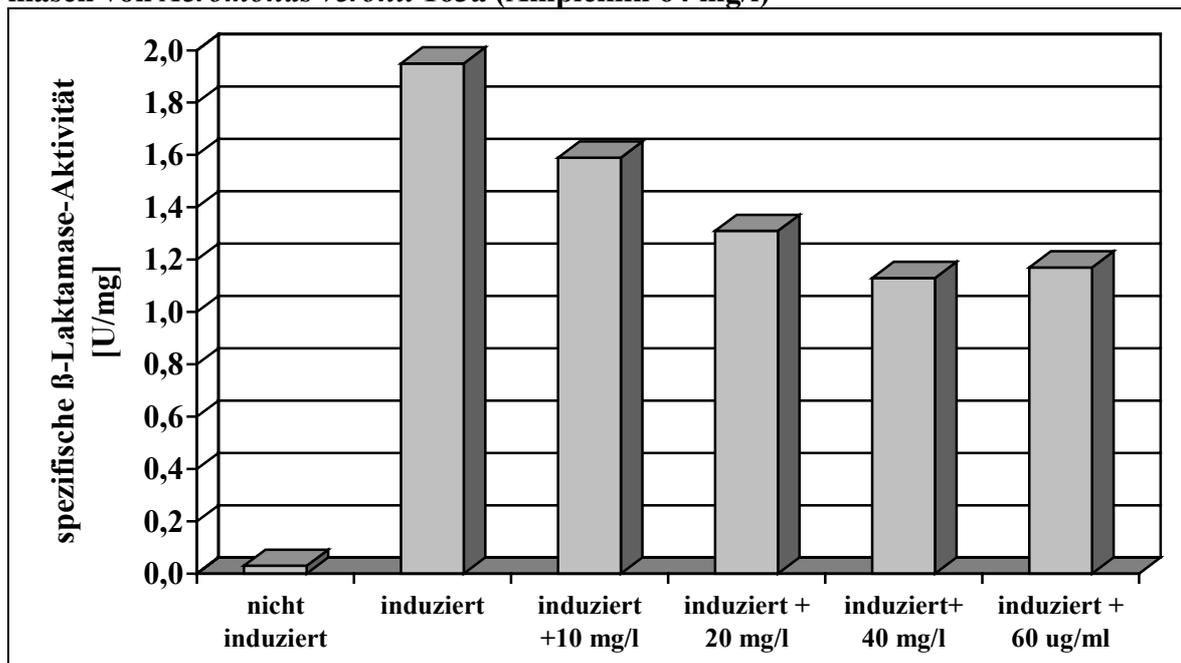
**Abb. 3.18** Effekt von 20 mg/l Bulgecin auf die Induktion (Ampicillin 64 mg/l) von *Aeromonas veronii* 163a



Durch die Zugabe von 20 mg/l Bulgecin in die Nährbouillon wurde die die spezifische  $\beta$ -Laktamase-Aktivität um 33 % von 1,63 auf 1,1 U/mg reduziert.

Durch steigende Bulgecinkonzentrationen wurde dieser Effekt noch verstärkt (Abb.3.19, Tab. 3.7): Mit zunehmender Konzentration ergab sich eine abnehmende Induzierbarkeit der Zellen, mit einer maximalen Reduktion der spezifischen  $\beta$ -Laktamase-Aktivität um 40 %. Diese maximale Reduktion erfolgte bei der Konzentration 40  $\mu\text{g/ml}$ , eine weitere Steigerung der Konzentration auf 60  $\mu\text{g/ml}$  brachte keine weitere Reduktion.

**Abb. 3.19** Effekt steigender Bulgecinkonzentrationen auf die Induktion der  $\beta$ -Laktamasen von *Aeromonas veronii* 163a (Ampicillin 64 mg/l)

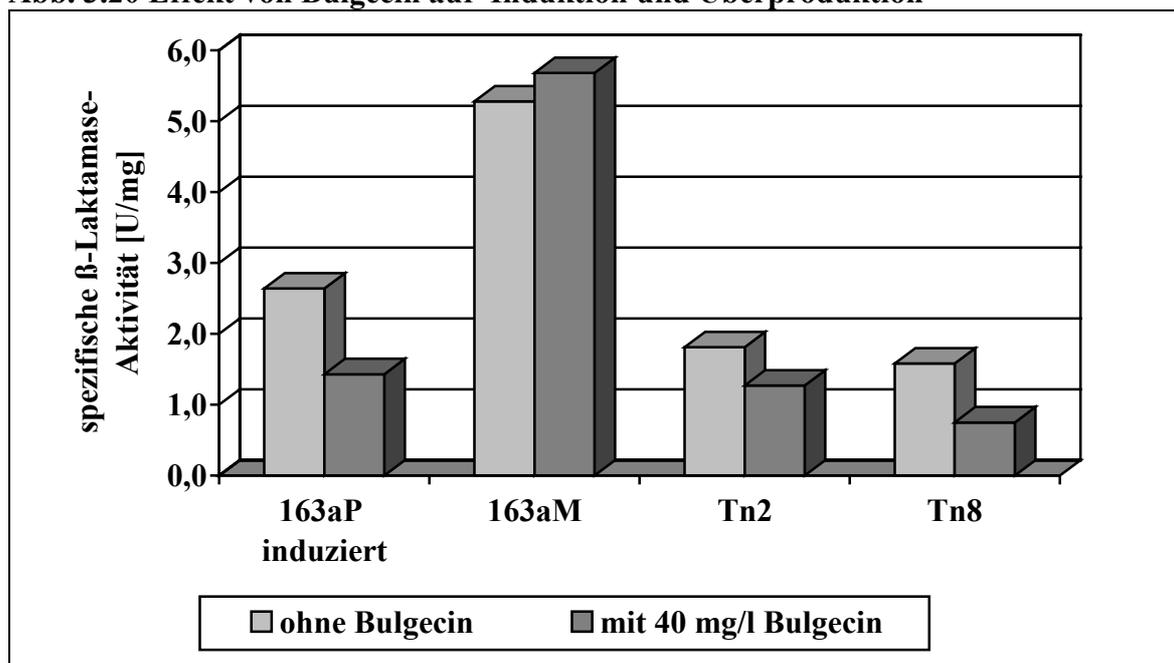


**Tab. 3.7** Spezifische  $\beta$ -Laktamase-Aktivität von *Aeromonas veronii* 163a bei unterschiedlichen Bulgecinkonzentrationen

Induktion mit Ampicillin (64 mg/l)	-	+	+	+	+	+
Bulgecinkonzentration [ $\mu\text{g/ml}$ ]	-	-	10	20	40	60
Spezifische $\beta$ -Laktamase-Aktivität [U/mg]	0,03	1,95	1,59	1,31	1,13	1,17
Abnahme der spezifischen $\beta$ -Laktamase-Aktivität [%]	-	-	19	33	42	40

Der induzierte Wildtyp sowie die überproduzierenden Mutanten 163aM, TnM2 und TnM8 wurden dann in Gegenwart von 40 µg/ml Bulgecin herangezogen. Hier zeigte sich sowohl bei dem Wildtyp als auch bei den Transposonmutanten die schon beobachtete Reduktion der Induktion (Abb. 3.20, Tab. 3.8), während eine solche bei der Mutante 163aM nicht festgestellt werden konnte.

**Abb. 3.20 Effekt von Bulgecin auf Induktion und Überproduktion**



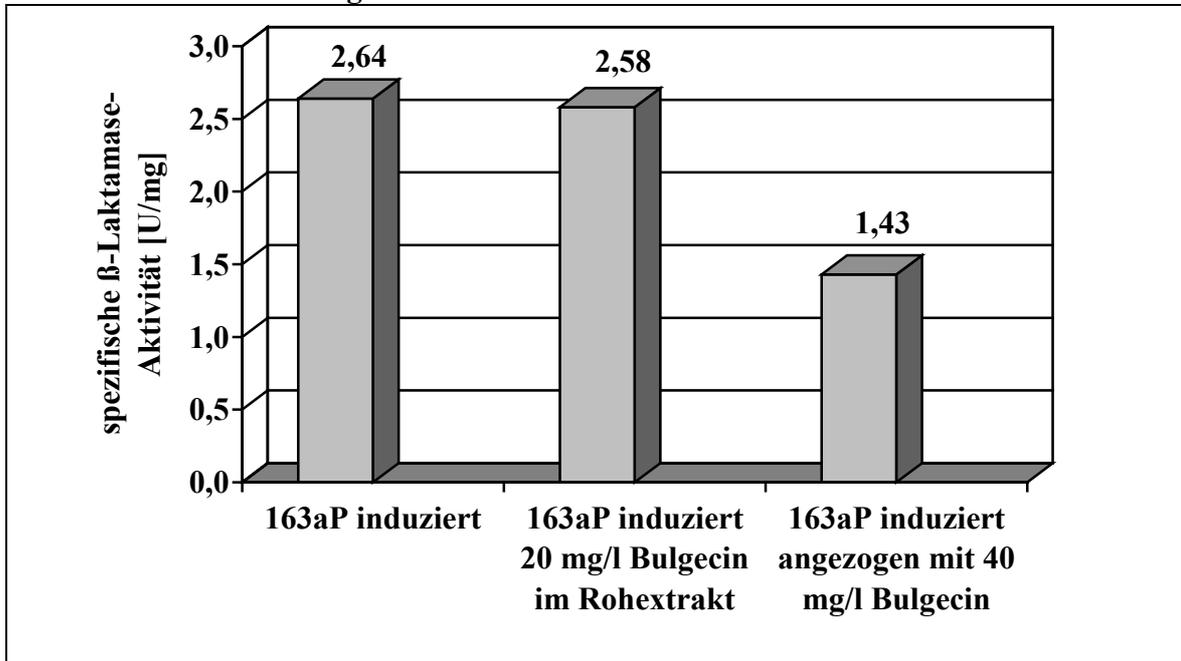
**Tab. 3.8 Spezifische  $\beta$ -Laktamase-Aktivität verschiedener *Aeromonas veronii* Stämme mit und ohne Zugabe von 40 mg/l Bulgecin**

Stamm	163a induziert	163aM	TnM2	TnM8
Spezifische $\beta$ -LaktamaseAktivität [U/mg] ohne Bulgecin	2,64	5,28	1,81	1,58
Spezifische $\beta$ -LaktamaseAktivität [U/mg] mit Bulgecin	1,43	5,68	1,27	0,75
Änderung [%]	54	107	70	47

Um sicher zu gehen, daß der beobachtete Effekt tatsächlich auf der Beeinflussung der Regulation und nicht auf einer direkten Hemmung des Enzyms durch das Bulgecin beruht, wurde der Enzymextrakt des induzierten Wildtyps, der ohne Bulgecin herangewachsen

war, mit 20 µg/ml Bulgecin versetzt. Hier ergab sich keine Reduktion der  $\beta$ -Laktamase-Aktivität (Abb. 3.21).

**Abb. 3.21 Effekt von Bulgecin in Rohextrakt und Nährbouillon**



#### 4. Diskussion

Die vorliegende Arbeit soll die Kenntnisse über die Zwei-Komponenten-Regulation der Expression der chromosomalen  $\beta$ -Laktamasen von *Aeromonas veronii* ergänzen. Ein Ziel war insbesondere die Identifizierung weiterer Komponenten des  $\beta$ -Laktamase-Regulationssystems von *Aeromonas veronii*.

Zu diesem Zweck wurden im Anschluß an eine Transposonmutagenese Rekombinanten selektiert, die ihre  $\beta$ -Laktamasen überproduzieren. Führt die Ausschaltung eines Gens durch die Insertion des Transposons zur  $\beta$ -Laktamase-Überproduktion, so ist davon auszugehen, daß dieses Gen einen Einfluß auf die Regulation hat. Zur Identifizierung des ausgeschalteten Gens wurde das Transposon zusammen mit einem Stück flankierender DNA aus dem Chromosom geschnitten, kloniert und anschließend sequenziert. Die Sequenzierung der flankierenden DNA ergab eine starke Ähnlichkeit zu Genen verschiedener Spezies, die für das Penicillinbindeprotein 4 (PBP4) kodieren.

Penicillinbindeproteine sind periplasmatische Enzyme, die im Rahmen des Zellwandstoffwechsels Transglycosylase-, Transpeptidase- und Carboxypeptidasereaktionen katalysieren (siehe 1.1.2.2. Biosynthese der Zellwand). Das PBP4 ist ein bifunktionales Enzym, das sich sowohl durch D,D-Carboxypeptidase- und D,D-Endopeptidase-Reaktionen am Zellwandstoffwechsel beteiligt. In der Sequenz des *E. coli* PBP4 konnten zunächst keine Transmembranabschnitte, amphiphile Helices oder Ansatzstellen für einen Lipidanker gefunden werden (Mottl et al., 1991). Später wurden dem PBP4 jedoch amphiphile  $\alpha$ -Helices zugeschrieben, die mit Oberflächenregionen der Membran interagieren (Harris et al., 2002). Es wird daher als Membrankomponente isoliert, und nur bei überproduzierenden Stämmen wird ein großer Anteil des PBPs in löslicher Form freigesetzt (Korat et al., 1991). Wie alle mit Penicillin interagierenden Proteine besitzt es die vier typischen Aminosäuregruppierungen SXXK, SXN, D/E und KTG, die das aktive Zentrum bilden (Ghuysen, 1991). Eine Besonderheit des PBP4 ist eine zusätzliche Sequenz von ca. 190 Aminosäuren, die zwischen den Motiven SXXK und SXN eingeschoben, deren Funktion aber unklar ist (Mottl et al., 1991). So ist auch sein im Vergleich zu den anderen niedermolekularen PBPs großes Molekulargewicht von 51,7 kDa (Korat et al., 1991), bzw. 49 kDa nach Abspaltung des Signalpeptids (Mottl et al., 1991) zu erklären.

Auch der in dieser Arbeit untersuchte DNA-Abschnitt aus *Aeromonas veronii*, in den das Transposon inseriert ist, enthält in der Aminosäure-Übersetzung das Motiv SXN. Wie beim

*E. coli* PBP4 handelt es sich bei der mittleren Aminosäure um eine Asparaginsäure (D). Zum Aminoterminus hin umfaßt das Fragment bis zur Schnittstelle der Endonuclease *SacI*, mit der es kloniert wurde, nur noch 55 Aminosäurereste; daher ist das SXXK-Motiv im Fragment nicht enthalten. Da der Anfang der Sequenz abgeschnitten ist, kann auch keine Numerierung vorgenommen werden. Ausgehend von der SDN-Gruppierung liegen wie beim *E. coli* PBP4 zum carboxyterminalen Ende hin zwei durch acht nicht konservierte Aminosäuren getrennte Asparaginsäuren (D). Der Abstand zwischen dem SDN-Motiv und der ersten der beiden Asparaginsäuren beträgt bei *E. coli* 38, bei dem *Aeromonas*-Fragment 37 Aminosäuren. Legt man die Aminosäuresequenz des Enzyms nach Abspaltung des Signalpeptids zugrunde, so wird die SDN-Triade beim *E. coli* PBP4 von den Aminosäuren 286-288 der aus 457 Aminosäuren bestehenden Sequenz gebildet. Die beiden Asparaginsäuren sind daher die Aminosäuren 327 und 335 (Mottl et al., 1991). In der untersuchten Sequenz von *Aeromonas* folgen nach der zweiten konservierten Asparaginsäure des D/D-Motivs noch sechs weitere Aminosäuren. Dann beginnt das O-Ende des inserierten Transposons. Das PBP-Gen von *Aeromonas veronii* ist also zwischen dem D/D- und dem KTG-Motiv unterbrochen. Da diese zusammen mit der SXXK-Tetrade und der SXN-Triade das aktive Zentrum bilden, ist gut nachzuvollziehen, daß die hier gefundene Insertion zu einem Funktionsverlust des Enzyms führt.

Untersuchungen an Deletionsmutanten von *E. coli* haben jedoch gezeigt, daß die Ausschaltung eines niedermolekularen PBPs allein keine phänotypischen Auswirkungen hat (Denome et al., 1999; Pfeifle et al., 1999a). Pfeifle et al. untersuchten die basale spezifische  $\beta$ -Laktamase-Aktivität von *E. coli* Mutanten mit Deletionen in ein bis vier D,D-Carboxypeptidase-Genen nach Transformation mit der *ampC/ampR* Region aus *E. cloacae* (Pfeifle et al., 1999a). Der Verlust von ein oder zwei D,D-Carboxypeptidasen zeigte dabei keinen Einfluß auf die  $\beta$ -Laktamase-Grundaktivität. Erst bei Deletion von drei ( $\Delta$  PBP 4, 5, 6a oder  $\Delta$  PBP 5, 6a, 6b) oder vier ( $\Delta$  PBP 4, 5, 6a, 6b) Carboxypeptidase-Genen war die basale spezifische  $\beta$ -Laktamase-Aktivität gegenüber dem Wildtyp deutlich erhöht (4 bzw. 12-fach). Eine zusätzliche Hemmung von PBP1 und/oder PBP2 durch spezifisch bindende  $\beta$ -Laktame konnte diesen Effekt noch erheblich steigern.

Eine Erklärungsmöglichkeit für die Wirkungslosigkeit von Deletionen einzelner PBPs bei *E. coli* ergibt sich aus der gleichen oder ähnlichen enzymatischen Aktivität verschiedener PBPs, in dem nämlich der Verlust eines einzigen PBPs durch die Funktion der anderen überdeckt werden könnte.

Im Gegensatz zu den beschriebenen Verhältnissen bei *E. coli* zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit hinsichtlich der Transposonmutanten von *Aeromonas veronii*, daß die Ausschaltung nur eines einzigen D,D-Carboxypeptidase-Gens schon zur Überproduktion der  $\beta$ -Laktamasen führt. Ursächlich könnte dafür sein, daß bei dieser Spezies im Gegensatz zu *E. coli* nicht mehrere Enzyme mit der gleichen oder ähnlichen Aktivität zur Verfügung stehen, so daß sich der Verlust nur einer einzigen Carboxypeptidase bereits auswirkt. Dagegen spricht jedoch, daß auf Proteinebene acht verschiedene PBPs nachgewiesen werden konnten (s. u.), und es erscheint unwahrscheinlich, daß darunter nicht noch mindestens eine weitere Carboxypeptidase zu finden ist; so wies auch die bei der Untersuchung einer weiteren Transposonmutante in der Arbeitsgruppe Bennett (Institute for Microbiology and Pathology, University of Bristol, UK) ermittelte Sequenz eine hohe Ähnlichkeit zu einem D,D-Carboxypeptidase-verwandtem Protein von *Vibrio cholerae* auf. Aber auch bei dieser Mutante hatte offensichtlich die Ausschaltung dieses einen PBPs bereits eine Überproduktion der chromosomalen  $\beta$ -Laktamasen zur Folge.

Obwohl *Aeromonas veronii* also über mindestens zwei D,D-Carboxypeptidasen verfügt, scheinen sich diese Enzyme in ihrer Funktion nicht gegenseitig ersetzen zu können.

Es gibt jedoch selbst bei *E. coli* ein Beispiel dafür, daß sich die Carboxypeptidasen nicht vollständig gegenseitig ersetzen können. So besitzt das PBP5 unter den niedermolekularen PBPs eine Sonderrolle, da dessen Deletion bei Mutanten von *E. coli*, denen mehrere PBPs fehlen, zu einem veränderten Durchmesser und dem Verlust der einheitlichen äußeren Kontur führt (Nelson and Young, 2000). Es konnte gezeigt werden, daß der Mechanismus der Membran-Verankerung und Besonderheiten der enzymatisch aktiven Domäne bei der Funktion von PBP 5 von erheblicher Bedeutung sind (Ghosh and Young, 2003; Harris et al., 2002; Nelson et al., 2002).

Eine weitere denkbare Ursache dafür, daß Enzyme trotz grundsätzlich gleicher Funktion nicht austauschbar sind, ist auch die Menge des jeweiligen Enzyms: Ein Enzym, daß in deutlich geringerer Menge gebildet wird als ein anderes mit einer ähnlichen Funktion, wird mangels Kapazität dieses Enzym nicht vollständig ersetzen können.

Die Untersuchung von 18 weiteren Transposonmutanten, bei denen durch PCR festgestellt wurde, daß jeweils eines der beiden erwähnten Carboxypeptidase-Gene ausgeschaltet ist, ergab keine grundsätzlichen phänotypischen Unterschiede zwischen den Mutanten mit un-

terschiedlichen Deletionen. Offensichtlich wirkt sich die Ausschaltung der beiden Enzyme jeweils ähnlich auf den Phänotyp aus.

Durch den Nachweis der Penicillinbindeproteine mittels biotinyliertem Ampicillin konnte die auf DNA-Ebene gefundene Ausschaltung der PBP4-ähnlichen Carboxypeptidase auf Proteinebene bestätigt werden:

Bei dem klinischen Isolat *Aeromonas veronii* 163a mit Wildtyp  $\beta$ -Laktamase-Expression wurden acht PBPs nachgewiesen. Ihre Molekulargewichte wurden im Rahmen der SDS-Gelelektrophorese anhand eines Molekulargewichtsmarkers abgeschätzt und lagen zwischen 40 und 106 kDa. Nach absteigender Größe wurden die Proteine PBP1 bis PBP9 benannt. Bei der Transposonmutante TnM8, bei der nach den vorangegangenen Untersuchungen das *pbp4*-ähnliche Gen ausgeschaltet war, konnten nur sieben PBPs nachgewiesen werden. PBP6 mit einem Molekulargewicht von 47 kDa fehlte. Damit liegt die Größe des ausgeschalteten Proteins im Bereich der Größe von PBP4 von *E. coli*, die 49,6 kDa beträgt (Korat et al., 1991). Im Gegensatz dazu konnte die Ausschaltung des Gens, das Ähnlichkeit mit dem Carboxypeptidase-ähnlichen Gen bei *V. cholerae* aufwies, nicht durch eine gegenüber dem Wildtyp fehlende Bande nachgewiesen werden. Eine mögliche Erklärung ist, daß das ausgeschaltete Protein nicht durch die zum PBP-Nachweis verwendete Methode erfaßt wird. Dies wäre z.B. für ein rein lösliches PBP der Fall, das nicht mit der Membran assoziiert ist; denn der Nachweis erfolgt an Membranpräparationen. Außerdem besteht die Möglichkeit, daß das Protein trotz der Insertion des Transposons noch gebildet wird und der Funktionsverlust nur durch eine leichte Verkürzung zustande kommt. In diesem Fall könnte allerdings nicht das aktive Zentrum betroffen sein, da der durchgeführte Nachweis nur solche Proteine detektiert, die in der Lage sind, das biotinylierte Ampicillin zu binden. Demnach könnte der Funktionsverlust auch auf das Fehlen eines Abschnitts zurückzuführen sein, der die korrekte Lokalisierung und Ausrichtung des PBPs gewährleistet.

Durch PCR konnte gezeigt werden, daß in 18 weiteren untersuchten Transposonmutanten, die ihre  $\beta$ -Laktamasen überproduzieren, jeweils eines der beiden gefundenen PBP-Gene ausgeschaltet ist. Vor dem Hintergrund der Feststellung, daß *Aeromonas veronii* über zahlreiche PBPs verfügt, stellt sich die Frage, warum bei diesen Mutanten keine weiteren ausgeschalteten PBPs gefunden wurden. Lediglich bei einer weiteren untersuchten Mutante konnte das Transposon in keinem der beiden PBP-Gene nachgewiesen werden. Da die

PCR-Reaktion auch bei strenger Einhaltung von Standardbedingungen sehr unzuverlässig war, läßt sich nicht mit Sicherheit ausschließen, daß die Insertion des Transposons nicht auch in diesem Stamm in einem der beiden Gene erfolgte. Möglicherweise handelt es sich jedoch um ein drittes Gen, dessen Ausschaltung ebenfalls zur Derepression der  $\beta$ -Laktamasen führt. Diese Frage sollte durch eine genauere Untersuchung des betreffenden Stamms zur Identifizierung des ausgeschalteten Gens geklärt werden. Dazu kann das hier inserierte Transposon wiederum zusammen mit einem Stück flankierender DNA aus dem Chromosom ausgeschnitten, kloniert und anschließend sequenziert werden. Eine Alternative dazu wäre der Nachweis des Verlusts eines PBP's auf Proteinebene.

Der Umstand, daß nur die Hemmung zweier PBP's zur Überproduktion führt, wäre erklärlich, wenn die Ausschaltung anderer PBP's eine letale Mutation darstellte. Dies ist durchaus denkbar, da auch bei *E. coli* der Verlust von PBP1a und b zur Zell-Lyse führt (Spratt, 1975). Daneben ist es wahrscheinlich, daß einige der auf Proteinebene nachgewiesenen PBP's sich eben doch gegenseitig ersetzen können, so daß ihre jeweils einzelne Ausschaltung nicht zu dem überproduzierenden Phänotyp führt, auf den die Transposonmutanten selektiert wurden.

Die gefundene Ausschaltung eines PBP's als Ursache für die Derepression der  $\beta$ -Laktamaseproduktion weist die PBP's als Bestandteile des  $\beta$ -Laktamase-Regulationssystems aus. Es unterstützt die These, daß die Inaktivierung von PBP's durch Bindung des  $\beta$ -Laktams wie bei *Enterobacter cloacae* zur verstärkten Signalbildung und somit zur  $\beta$ -Laktamase-Induktion führt. Dies kann als starker Hinweis auf eine Verknüpfung von Zellwandstoffwechsel und Regulation der  $\beta$ -Laktamase-Expression gewertet werden und legt nahe, daß das Signal auch bei *Aeromonas veronii* ein Abbauprodukt des Peptidoglykanstoffwechsels ist.

Vor dem Hintergrund der gefundenen Ergebnisse, die eine Beteiligung der PBP's und damit des Zellwandstoffwechsels an der Regulation der  $\beta$ -Laktamase-Expression belegen, sollte die Rolle des Zellwandstoffwechsels nun genauer untersucht werden:

Der Zusammenhang zwischen Zellwandstoffwechsel und  $\beta$ -Laktamase-Induktion konnte bei *Enterobacter cloacae* durch HPLC-Analyse der löslichen Muropeptide bei unterschiedlich starker  $\beta$ -Laktamase-Induktion aufgeklärt werden. Die zugrundeliegende Über-

legung war, daß das spezifische Signal für die  $\beta$ -Laktamase-Induktion bei Stämmen mit hoher  $\beta$ -Laktamase-Expression aufgrund von Induktion oder einer entsprechenden Mutation verstärkt gebildet wird. Handelt es sich dabei um ein bestimmtes Muropeptid, dann müßte es durch HPLC-Analyse der löslichen Muropeptide identifizierbar sein. Für *Enterobacter* stellte Dietz mit dieser Methode fest, daß die Stärke der  $\beta$ -Laktamase-Produktion nur mit der Menge eines bestimmten Muropeptids, dem Anhydromuramyl-Pentapeptid korreliert. Sie schloß daraus, daß das Pentapeptid das spezifische Signal für die Induktion darstellt (Dietz et al., 1997). Pfeifle führte dieses Ergebnis mit den Ergebnissen seiner Untersuchung der Deletionsmutanten folgendermaßen zusammen: Die Inhibierung der Carboxypeptidasen führt zu einem erhöhten Anteil von Pentapeptiden im Peptidoglycan, da die enzymatische Spaltung des terminalen D-Ala-D-Ala-Restes nach Einbau des Disaccharid-Peptid-Monomers in das wachsende Peptidoglykan nur noch in einem geringeren Umfang stattfindet. Die Arbeit der Mureinhydrolasen führt daher zu einer verstärkten Freisetzung von Pentapeptiden, die nach einigen Modifikationen, als Signale für die  $\beta$ -Laktamase-Expression wirken. Eine noch stärkere Aktivierung der  $\beta$ -Laktamase-Expression resultiert aus einer zusätzlichen Hemmung von PBP1a/1b und/oder PBP2, da die daraus folgende verringerte Quervernetzung zu noch mehr freien Pentapeptid-Seitenketten führt (Pfeifle et al., 1999).

Auch für *Aeromonas veronii* sollte geprüft werden, ob die erhöhte  $\beta$ -Laktamase-Produktion mit einschlägigen Veränderungen in der Zusammensetzung der löslichen Muropeptide einhergeht. Die Zellwand von *Aeromonas* spp. entspricht in ihrer chemischen Komposition im wesentlichen der von *E. coli* (Quintela et al., 1995). Ein Unterschied ist allein der hohe Anteil von LD-Peptidbrücken zwischen m-Dpm-Resten bei *Aeromonas* spp. im Gegensatz zu den DD-Bindungen zwischen D-Ala und m-Dpm, die bei *E. coli* und vielen anderen gramnegativen Bakterien vorherrschen. Aufgrund der Ähnlichkeit der Zellwandzusammensetzung wurde erwartet, daß die für *Enterobacter* verwendete Methode der HPLC-Analyse löslicher Muropeptide auch bei der Aufklärung der Rolle des Zellwandstoffwechsels bei der  $\beta$ -Laktamase-Induktion von *Aeromonas* spp. hilfreich ist.

Die Analyse der löslichen Muropeptide von *Aeromonas* ergab jedoch keine Unterschiede in der Muropeptidzusammensetzung bei verschieden starker  $\beta$ -Laktamase-Expression. Drei Substanzen wurden nachgewiesen, mit Retentionszeiten zwischen sieben und 35 Minuten.

Die Substanz mit der kürzesten Retentionszeit wurde durch Vergleich mit dem Chromatogramm freier Diaminopimelinsäure als diese Aminosäure identifiziert. Bei den beiden anderen Substanzen handelt es sich wahrscheinlich um Peptide ohne Zuckeranteil, da Peptide mit Mono- oder Disaccharidanteil später von der Säule eluiert werden (Glauner, 1988). Solche Muropeptide mit Mono- oder Disaccharidanteil konnten jedoch mit der verwendeten HPLC-Methode überhaupt nicht nachgewiesen werden.

Die Präparation der löslichen Muropeptide erfolgte bei der in dieser Arbeit verwendeten Methode aus den Bakterienzellen, Muropeptide, die in das Medium abgegeben werden, werden nicht erfaßt. Dies hätte das Fehlen der Muropeptide mit Mono- oder Disaccharidanteil möglicherweise erklären können. Die Untersuchung des aufkonzentrierten Mediums ergab jedoch, daß eine Abgabe im großen Umfang in das Medium nicht stattgefunden hat. Vor dem Hintergrund der oben dargelegten Übereinstimmung der Zellwandkomposition von *E. coli* und *Aeromonas* ist die wahrscheinlichste Erklärung für das Fehlen dieser Komponenten im Chromatogramm von *Aeromonas veronii*, daß diese nach Abspaltung von der Zellwand zu schnell in das Cytoplasma aufgenommen und dem Recycling zugeführt werden, als daß sie mit der verwendeten Methode nachgewiesen werden könnten. Für die Untersuchung der  $\beta$ -Laktamase-Induktion von *Enterobacter* standen Mutanten zur Verfügung, deren Zellwandrecycling eingeschränkt war. Eine Mutante war durch eine Mutation in AmpG nicht in der Lage, Zellwandabbauprodukte in das Cytoplasma zu transportieren (Lindquist et al., 1993). Die Abbauprodukte häuften sich daher im Periplasma an, es resultierte ein nicht induzierbarer Phänotyp. Neben dieser Mutante gab es eine AmpD Mutante mit überproduzierendem Phänotyp, bei der sich die Abbauprodukte der Zellwand im Cytoplasma anreichern und daher im Überfluß für die Induktion über AmpR vorhanden sind (Langley and Guest, 1977). In beiden Fällen kommt es zu einer Anreicherung der Muropeptide, die offensichtlich den Nachweis mittels HPLC erleichtert. Eine entsprechende Mutante von *Aeromonas veronii* stand für die Untersuchungen dieser Arbeit nicht zur Verfügung. Eine solche gezielt herzustellen erscheint äußerst problematisch. Es ist nämlich nicht klar, welche Auswirkungen der Verlust des Transporters für Zellwandabbauprodukte auf den Phänotyp hätte. Da die Sensorkinase BlrB das Signal für die Induktion wahrscheinlich im Periplasma bindet, führt die Unfähigkeit, Abbauprodukte ins Cytoplasma aufzunehmen, jedenfalls nicht wie bei *E. coli* zu einem nicht induzierbaren Phänotyp.

Da also mittels HPLC keine Unterschiede in der Zusammensetzung der löslichen Muropeptide bei unterschiedlich starker  $\beta$ -Laktamase-Expression nachweisbar waren, wurde der Zusammenhang zwischen Zellwandstoffwechsel und  $\beta$ -Laktamase-Induktion auf andere Weise untersucht:

Es wurden die Auswirkungen von Bulgecin, einem spezifischen Hemmstoff des Zellwandabbaus, auf die  $\beta$ -Laktamase-Induktion überprüft. Bulgecin ist ein Glucosamin-Derivat, das aus dem Kulturmedium von *Pseudomonas acidophila* isoliert wird. Es besitzt strukturelle Ähnlichkeit mit Muropeptiden und hemmt die lytische Transglycosylase Slt 70 nicht-kompetitiv (Templin et al., 1992). Die Slt70 ist ein ringförmiges Multi-Domänen Protein (Thunnissen et al., 1994), dessen aktives Zentrum auf der Innenseite des Ringes lokalisiert ist (Thunnissen et al., 1995). Die Produkte seiner katalytischen Aktivität sind die Anhydromuramylpeptide, die durch die Bindung an den Transkriptionsfaktor AmpR die Expression der  $\beta$ -Laktamase von *Enterobacter* aktivieren.

Wird Bulgecin dem Kulturmedium von *Enterobacter*-Stämmen zugegeben, die ihre AmpC- $\beta$ -Laktamase überproduzieren, so sinkt daher deren  $\beta$ -Laktamase-Aktivität stark ab (Pfeifle et al., 1999b). Ebenso verringert Bulgecin die durch Induktion klinischer Isolate erreichbare  $\beta$ -Laktamase-Aktivität. In beiden Fällen erfolgt jedoch kein vollständiger Rückgang der  $\beta$ -Laktamase-Aktivität auf die Grundaktivität des Wildtyps.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, daß Bulgecin auch die  $\beta$ -Laktamase-Aktivität überproduzierender oder induzierter Stämme von *Aeromonas veronii* verringert. Während Pfeifle (1999b) eine maximale Reduktion der  $\beta$ -Laktamase-Aktivität bei einer Bulgecin-Konzentration von 20  $\mu\text{g/ml}$  im Kulturmedium feststellte, konnte bei *Aeromonas veronii* Stämmen erst ab einer Konzentration von 40  $\mu\text{g/ml}$  keine Steigerung des Effekts mehr erreicht werden. Die spezifische  $\beta$ -Laktamase-Aktivität des induzierten klinischen Isolats *Aeromonas veronii* 163 a wurde bei dieser Bulgecin-Konzentration um 46 % verringert, die der Transposonmutanten TnM2 und TnM8 um 30 bzw. 53 %. Dagegen hatte die Zugabe von Bulgecin zum Kulturmedium des Stammes 163a M keine Auswirkungen auf dessen  $\beta$ -Laktamase-Aktivität.

Bulgecin hemmt als Muropeptid-Analogon voraussichtlich auch bei *Aeromonas* die Bildung von Anhydromuramylpeptiden. Die Reduktion der Induktion durch den spezifischen Hemmstoff eines zellwandabbauenden Enzyms ist ein klarer Hinweis darauf, daß freige-

setzte Muropeptide für die Induktion erforderlich sind und daß es sich bei dem Signal für die Sensorkinase tatsächlich um ein solches Muropeptid handelt. Die Reduktion der Überproduktion bei den Transposonmutanten ist damit konsistent, da bei Ihnen die Ausschaltung eines PBPs vermutlich verstärkten Zellwandabbau bedingt, der in Gegenwart von Bulgecin gehemmt wird.

Die Ergebnisse zu der Mutante 163a M, die durch Selektion mit Cefotaxim generiert wurde, sind widersprüchlich:

Die Wirkungslosigkeit von Bulgecin auf die  $\beta$ -Laktamase-Aktivität dieses Stamms deutet auf eine Überproduktion hin, die nicht auf eine verstärkte Signalbildung zurückzuführen ist. Diese durch Bulgecin nicht beeinflussbare Überproduktion ließe sich am besten durch eine Mutation in dem Signalsensor *blrB* oder in dem Transkriptionsfaktor *blrA* des Zwei-Komponenten-Systems erklären, die unabhängig von der Gegenwart des Signals die Expression der  $\beta$ -Laktamasen aktiviert. Die PBP-Profile zeigen jedoch, daß das PBP7 mit einem Molekulargewicht von 42 kDa gegenüber dem Wildtyp fehlt. Demnach wäre auch bei diesem Stamm eine vermehrte Signalbildung als Ursache für die Überproduktion zu vermuten. Möglicherweise ist das Fehlen des PBP7 aber doch auf eine Mutation in einem regulatorischen Gen zurückzuführen, die dessen Expression verhindert. Dies könnte auch erklären, warum zusätzlich das mit 40 kDa kleinste PBP, das PBP8, in geringerem Ausmaß gebildet wird. Hier wäre eine zumindest teilweise, gemeinsame Regulation zu vermuten.

Auch bei *E.coli* gibt es ein Beispiel dafür, daß einzelne PBPs gemeinsam reguliert werden. Die Gene *dacA* und *dacC*, die für PBP5 und PBP6 kodieren, werden zusammen mit dem *ampC* Gen über *bolA* reguliert (Santos et al., 2002).

Eine weitere Untersuchung der Ursache der Überproduktion bei dem Stamm 163a M könnte für Aufklärung des gesamten Regulationsmechanismus aufschlußreich sein. Zunächst sollten daher die Gene *blrA* und *blrB* sequenziert werden, um auszuschließen, daß hier eine Mutation stattgefunden hat.

Zusammenfassend ist festzuhalten, daß anhand der  $\beta$ -Laktamase überproduzierenden Transposonmutanten, bei denen der Verlust eines penicillinbindenden Proteins auf DNA- und Proteinebene nachgewiesen wurde, Penicillinbindeproteine als Komponenten des Regulationssystems für die  $\beta$ -Laktamase-Expression von *Aeromonas veronii* identifiziert werden konnten.

Da PBPs wichtige Stoffwechselreaktionen in der Zellwand katalysieren, zeigt dieses Ergebnis, dass auch die Zwei-Komponenten-Regulation von *Aeromonas veronii* eng mit dem Zellwandstoffwechsel verknüpft ist.

Die Reduktion der spezifischen  $\beta$ -Laktamase-Aktivität induzierter oder überproduzierender Stämme durch Bulgecin bestätigt dieses Ergebnis und macht deutlich, daß Zellwandabbau-produkte für die Induktion erforderlich sind. Anhydromuramylpeptide sind daher (wahrscheinlich) auch bei *Aeromonas* spp. die Mediatoren für die Induktion der chromosomalen  $\beta$ -Laktamase. Die Bindung von  $\beta$ -Laktam-Antibiotika an Penicillinbindepoteine führt demnach auch bei *Aeromonas* spp. zu einer Störung des Zellwandstoffwechsels, die mit einer vermehrten Bildung von Zellwandabbauprodukten einhergeht. Die gebildeten Peptidoglykanfragmente werden möglicherweise noch im Periplasma modifiziert, bewirken dann durch Bindung an die Sensorkinase BlrB noch im Periplasma deren Autophosphorylierung und induzieren so die Expression der chromosomalen  $\beta$ -Laktamasen.

Welche Abbauprodukte der Zellwand nun tatsächlich das spezifische Signal für die Aktivierung von BlrB sind, konnte in dieser Arbeit aufgrund der beschriebenen Problematik bei der HPLC-Analyse der löslichen Muropeptide nicht näher geklärt werden. Immerhin spricht das gefundene Ergebnis, daß auch bei *Aeromonas veronii* die Hemmung von Carboxypeptidasen zur  $\beta$ -Laktamase-Produktion führt, für die Annahme daß auch hier die Pentapeptide eine bedeutende Rolle spielen.

Der Frage nach dem eigentlichen Signal für die Auslösung der  $\beta$ -Laktamase-Expression könnte durch Bindungsstudien mit isoliertem BlrB und verschiedenen Muropeptiden, die aus einer nicht wiederverwertenden *E. coli* Mutante aufgereinigt werden, auf den Grund gegangen werden. Alternativ könnten Induktionsversuche mit isolierten Muropeptiden zum Ziel führen. Dazu wäre es wahrscheinlich notwendig, die äußere Zellmembran für Muropeptide durchlässig zu machen, damit die Muropeptide in den periplasmatischen Raum gelangen können. Eine mögliche Methode dafür ist die Behandlung der Zellen mit einem membrandestabilisierenden Agens, wie dem Polymyxin-B-Nonapeptid (Vaara and Vaara, 1983).

Um die Vorgänge bei der Regulation weiter aufzuklären, müßte auch die Rolle des Proteins BlrD aufgeklärt werden. Dazu könnte das entsprechende Gen in einen Vektor kloniert und dann in den Wildtyp sowie die verschiedenen Mutanten eingebracht werden. Stimmt die Hypothese, daß es sich bei BlrD um einen Transporter für Peptidoglykanfragmente handelt,

---

der mit BlrB in Konkurrenz tritt, so müßte seine konstitutive Expression ähnliche phänotypische Auswirkung haben wie die Einwirkung von Bulgecin, nämlich eine Verringerung der Grundaktivität bei den Transposonmutanten wie auch der Induzierbarkeit beim Wildtyp.

Schließlich ergibt sich als Ausblick eine bedeutsame Rolle des ungewöhnlich hohen Anteils von D,D-m-Dpm-Quervernetzungen (Quintela et al., 1995) in der *Aeromonas*-Zellwand. Letzterer könnte ursächlich dafür sein, daß bei *Aeromonas veronii* schon die Ausschaltung einer D,D-Carboxypeptidase genügt, um die  $\beta$ -Laktamase-Produktion zu aktivieren. Der Anteil quervernetzter Peptidseitenketten wird für *E. coli* und *Aeromonas* spp. mit ca. 30 % angegeben, während jedoch bei *E. coli* nur 5 % der Quervernetzungen durch D,D-m-Dpm-Brücken zustande kommen, sind es bei *Aeromonas* 15 %, also ungefähr die Hälfte aller Quervernetzungen. Über die Enzyme, die diese Quervernetzungen katalysieren ist noch nicht sehr viel bekannt. Denkbar wäre jedoch beispielsweise, daß diese auf Tetrapeptidseitenketten als Substrate angewiesen sind, also auf die Produkte der katalytischen Aktivität der D,D-Carboxypeptidasen. Damit erklärte sich hinlänglich, daß der Ausfall nur einer Carboxypeptidase bei *Aeromonas veronii* stärkere Auswirkungen hat als dies bei *E. coli* der Fall war, bei dem nämlich die Transpeptidasen Pentapeptide verwerten können.

## 5. Zusammenfassung

Die chromosomalen  $\beta$ -Laktamasen gramnegativer Bakterien stellen eine Bedrohung für die Therapie von Infektionen mit  $\beta$ -Laktam-Antibiotika dar. Diese hydrolytischen Enzyme sind in der Regel induzierbar, erhalten jedoch eine besondere klinische Bedeutung, wenn sie durch eine Mutation in den regulatorischen Genen konstitutiv exprimiert werden. Um therapeutische Antworten auf dieses Problem entwickeln zu können, muß der Regulationsmechanismus für die Expression der  $\beta$ -Laktamasen aufgeklärt werden.

Für viele gramnegative Bakterienspezies ist dies weitgehend geschehen:

So bewirken etwa bei *Enterobacter* spp.  $\beta$ -Laktam-Antibiotika durch Inaktivierung der PBPs primär eine Störung des Zellwandstoffwechsels, die eine vermehrte Bildung von Zellwandabbauprodukten zur Folge hat. Der LysR-ähnliche Transkriptionsfaktor AmpR wird dann unmittelbar durch ein Abbauprodukt der Zellwand aktiviert, dessen Konzentration infolge der PBP-Inaktivierung stark ansteigt und das über die Permease AmpG in das Cytoplasma aufgenommen wird.

Ein ganz anderer Mechanismus liegt bei der Gattung *Aeromonas* vor. Bei dieser Spezies wurden drei verschiedene chromosomale  $\beta$ -Laktamasen nachgewiesen, die über ein Zwei-Komponenten-System gemeinsam reguliert werden.

In der vorliegenden Arbeit sollten die Vorgänge untersucht werden, die zur Autophosphorylierung der Sensor kinase des Zwei-Komponenten-Systems führen. Insbesondere sollte der Frage nachgegangen werden, ob auch bei *Aeromonas* Anhydromuramylpeptide als Signalmolekül für die Induktion der  $\beta$ -Laktamasen wirken.

Über die Herstellung und Untersuchung von  $\beta$ -Laktamase-überproduzierenden Transposonmutanten, bei denen der Verlust eines penicillinbindenden Proteins auf DNA- und Proteinebene nachgewiesen wurde, konnten Penicillinbindepoteine als Komponenten des Regulationssystems für die  $\beta$ -Laktamase-Expression von *Aeromonas veronii* identifiziert werden. Da PBPs wichtige Stoffwechselreaktionen in der Zellwand katalysieren, zeigt dieses Ergebnis, dass auch die Zwei-Komponenten-Regulation von *Aeromonas veronii* eng mit dem Zellwandstoffwechsel verknüpft ist.

Die gefundene Reduktion der spezifischen  $\beta$ -Laktamase-Aktivität induzierter oder überproduzierender Stämme durch Bulgecin bestätigt dieses Ergebnis und macht deutlich, daß Zellwandabbauprodukte für die Induktion erforderlich sind. Dementsprechend sind diese mit hoher Wahrscheinlichkeit auch bei *Aeromonas* spp. die Mediatoren für die Induktion der chromosomalen  $\beta$ -Laktamase.

---

## 6. Literaturverzeichnis

- Albright, L.M., E. Huala and F.M. Ausubel.** 1989. Prokaryotic signal transduction mediated by sensor and regulator protein pairs. *Annu.Rev.Genet.* 23:311-336.
- Alksne, L.E. and B.A.Rasmussen.** 1997. Expression of the AsbA1, OXA-12, and AsbM1 beta-lactamases in *Aeromonas jandaei* AER 14 is coordinated by a two-component regulon. *J.Bacteriol.* 179:2006-2013.
- Ambler, R.P.** 1980. The structure of beta-lactamases. *Philos.Trans.R.Soc.Lond B Biol.Sci.* 289:321-331.
- Avison, M.B., P. Niumsup, T.R. Walsh and P.M. Bennett.** 2000a. *Aeromonas hydrophila* AmpH and CepH beta-lactamases: derepressed expression in mutants of *Escherichia coli* lacking creB. *J.Antimicrob.Chemother.* 46:695-702.
- Avison, M.B., K. Nurmohamed, P. Niumsup, T.R. Walsh, A.P. MacGowan, P.M. Bennett.** 1999. Global Gene Regulation and Antibiotic Resistance in *Aeromonas* spp. 39th Interscience Conference on Antimicrob.Agents Chemother. 88.(Abstract)
- Avison, M.B., A.M. Simm, P. Niumsup, A.P. MacGowan, T.R.Walsh, P.M.Bennett.** 2001. *Aeromonas hydrophila* beta-lactamases are part of a wider regulon under the control of the BlrAB two-component system. 41th Interscience Conference on Antimicrob.Agents Chemother. 88. (Abstract)
- Avison, M.B., T.R.Walsh, A.P. MacGowan, P.M. Bennett.** 2000b. Crosstalk between the Blr and Cre regulons of *Aeromonas* spp and *Escherichia coli*. 100th ASM general meeting , 12. (Abstract)
- Bakken, J.S., C.C. Sanders, R.B. Clark and M. Hori.** 1988. Beta-lactam resistance in *Aeromonas* spp. caused by inducible beta- lactamases active against penicillins, cephalosporins, and carbapenems. *Antimicrob.Agents Chemother.* 32:1314-1319.

- 
- Baquero, M.R., M. Bouzon, J.C. Quintela, J.A. Ayala and F. Moreno.** 1996. *dacD*, an *Escherichia coli* gene encoding a novel penicillin-binding protein (PBP6b) with DD-carboxypeptidase activity. *J.Bacteriol.* 178:7106-7111.
- Bartowsky, E. and S. Normark.** 1991. Purification and mutant analysis of *Citrobacter freundii* AmpR, the regulator for chromosomal AmpC beta-lactamase. *Mol.Microbiol.* 5:1715-1725.
- Bennett, P.M.** 2002. (Persönliche Mitteilung)
- Birnboim, H.C. and J.Doly.** 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* 7:1513-1523.
- Bott, M., M. Meyer and P. Dimroth.** 1995. Regulation of anaerobic citrate metabolism in *Klebsiella pneumoniae*. *Mol.Microbiol.* 18:533-546.
- Botta, G.A. and J.T. Park.** 1981. Evidence for involvement of penicillin-binding protein 3 in murein synthesis during septation but not during cell elongation. *J.Bacteriol.* 145:333-340.
- Broome-Smith, J.K.** 1985. Construction of a mutant of *Escherichia coli* that has deletions of both the penicillin-binding protein 5 and 6 genes. *J.Gen.Microbiol.* 131 ( Pt 8):2115-2118.
- Broome-Smith, J.K., I. Ioannidis, A.Edelman and B.G. Spratt.** 1988. Nucleotide sequences of the penicillin-binding protein 5 and 6 genes of *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res.* 16:1617.
- Brown, T.A.** 1991. Bacteria and bacteriophages, 1-22. *In: Molecular biology Lab Fax.* Blackwell Scientific Publisher.
- Bryan, L.E. and A.J. Godfrey.** 1991.  $\beta$ -Lactam Antibiotics: Mode of Action and Bacterial Resistance., *In: V Lorian (ed), Antibiotics in Laboratory Medicine.* Williams and Wilkins, Baltimore.

- Bush, K., G.A. Jacoby and A.A. Medeiros.** 1995. A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob. Agents Chemother.* 39:1211-1233.
- Datz, M., B. Joris, E.A. Azab, M. Galleni, J. Van Beeumen, J.M. Frere and H.H. Martin.** 1994. A common system controls the induction of very different genes. The class-A beta-lactamase of *Proteus vulgaris* and the enterobacterial class-C beta-lactamase. *Eur. J. Biochem.* 226:149-157.
- de Lorenzo, V., M. Herrero, U. Jakubzik and K.N. Timmis.** 1990. Mini-Tn5 transposon derivatives for insertion mutagenesis, promoter probing, and chromosomal insertion of cloned DNA in gram-negative eubacteria. *J. Bacteriol.* 172:6568-6572.
- de Lorenzo, V. and K.N. Timmis.** 1994. Analysis and construction of stable phenotypes in gram-negative bacteria with Tn5- and Tn10-derived minitransposons. *Methods Enzymol.* 235:386-405.
- Denome, S.A., P.K. Elf, T.A. Henderson, D.E. Nelson and K.D. Young.** 1999. *Escherichia coli* Mutants Lacking All Possible Combinations of Eight Penicillin Binding Proteins: Viability, Characteristics, and Implications for Peptidoglycan Synthesis. *J. Bacteriol.* 181:3981-3993.
- Dietz, H., D. Pfeifle and B. Wiedemann.** 1997. The signal molecule for beta-lactamase induction in *Enterobacter cloacae* is the anhydromuramyl-pentapeptide. *Antimicrob. Agents Chemother.* 41:2113-2120.
- Dijkstra, A.J.** 1997. The Lytic Transglycosylase Family of *Escherichia coli*. Rijksuniversiteit Groningen. (Dissertation)
- Dijkstra, A.J., F. Hermann and W. Keck.** 1995. Cloning and controlled overexpression of the gene encoding the 35 kDa soluble lytic transglycosylase from *Escherichia coli*. *FEBS Lett.* 366:115-118.
- Dijkstra, A.J. and W. Keck.** 1996. Identification of new members of the lytic transglycosylase family in *Haemophilus influenzae* and *Escherichia coli*. *Microb. Drug Resist.* 2:141-145.

- Ehlert, K., J.V. Höltje and M.F. Templin.** 1995. Cloning and expression of a murein hydrolase lipoprotein from *Escherichia coli*. *Mol.Microbiol.* 16:761-768.
- Engel, H., B. Kazemier and W. Keck.** 1991. Murein-metabolizing enzymes from *Escherichia coli*: sequence analysis and controlled overexpression of the *slt* gene, which encodes the soluble lytic transglycosylase. *J.Bacteriol.* 173:6773-6782.
- Engel, H., A.J. Smink, L. van Wijngaarden and W. Keck.** 1992. Murein-metabolizing enzymes from *Escherichia coli*: existence of a second lytic transglycosylase. *J.Bacteriol.* 174:6394-6403.
- Ghosh, A.S. and K.D. Young.** 2003. Sequences near the Active Site in Chimeric Penicillin Binding Proteins 5 and 6 Affect Uniform Morphology of *Escherichia coli*. *The Journal of Bacteriology* 185:2178-2186.
- Ghuysen, J.M.** 1991. Serine  $\beta$ -lactamases and penicillin-binding proteins. *Annu.Rev.Microbiol.* 45:37-67.
- Glauner, B.** 1988. Separation and quantification of mucopeptides with high-performance liquid chromatography. *Anal.Biochem.* 172:451-464.
- Glauner, B. and U.Schwarz.** 1983. The analysis of murein composition with high-pressure-liquid chromatography, 29-34. *In: The target of penicillin.* Walter de Gruyter & Co, Berlin, New York.
- Harris, F., K. Brandenburg, U. Seydel and D. Phoenix.** 2002. Investigations into the mechanisms used by the C-terminal anchors of *Escherichia coli* penicillin-binding proteins 4, 5, 6 and 6b for membrane interaction. *European Journal of Biochemistry* 269:5821-5829.
- Harz, H., K. Burgdorf and J.V.Höltje.** 1990. Isolation and separation of the glycan strands from murein of *Escherichia coli* by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Anal.Biochem.* 190:120-128.
- Hayes, M.V., C.J. Thomson and S.G. Amyes.** 1994. Three beta-lactamases isolated from *Aeromonas salmonicida*, including a carbapenemase not detectable by conventional methods. *Eur.J.Clin.Microbiol.Infect.Dis.* 13:805-811.

- 
- Hayes, M.V., C.J.Thomson and S.G.Amyes.** 1996. The 'hidden' carbapenemase of *Aeromonas hydrophila*. *J.Antimicrob.Chemother.* 37:33-44.
- Henderson,T.A., P.M. Dombrosky and K.D. Young.** 1994. Artfactual processing of penicillin-binding proteins 7 and 1b by the OmpT protease of *Escherichia coli*. *J.Bacteriol.* 176:256-259.
- Henderson, T.A., K.D. Young, S.A. Denome and P.K. Elf.** 1997. AmpC and AmpH, proteins related to the class C beta-lactamases, bind penicillin and contribute to the normal morphology of *Escherichia coli*. *J.Bacteriol.* 179:6112-6121.
- Henikoff, S., G.W. Haughn, J.M. Calvo and J.C. Wallace.** 1988. A large family of bacterial activator proteins. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 85:6602-6606.
- Herrero, M., V. de Lorenzo and K.N. Timmis.** 1990. Transposon vectors containing non-antibiotic resistance selection markers for cloning and stable chromosomal insertion of foreign genes in Gram-negative bacteria. *J.Bacteriol.* 172:6557-6567.
- Höltje, J.V.** 1993. "Three for one" - a simple growth mechanism that guarantees a precise copy of the thin, rod-shaped murein sacculus of *Escherichia coli*, 419-426. *In:* MA De Pedro, JV Höltje, and W Löffelhardt (eds), *Bacterial growth and lysis, metabolism and structure of the bacterial sacculus*. Plenum Press, New York.
- Höltje, J.V.** 1996. A hypothetical holoenzyme involved in the replication of the murein sacculus of *Escherichia coli*. *Microbiology* 142 ( Pt 8):1911-1918.
- Höltje, J.V., U. Kopp, A.Ursinus and B. Wiedemann.** 1994. The negative regulator of beta-lactamase induction AmpD is a N-acetyl- anhydromuramyl-L-alanine amidase. *FEMS Microbiol.Lett.* 122:159-164.
- Höltje, J.V., D. Mirelman, N. Sharon and U. Schwarz.** 1975. Novel type of murein transglycosylase in *Escherichia coli*. *J.Bacteriol.* 124:1067-1076.
- Ikeda, M., T. Sato, M. Wachi, H.K. Jung, F. Ishino, Y. Kobayashi and M. Matsuhashi.** 1989. Structural similarity among *Escherichia coli* FtsW and RodA proteins and *Bacillus subtilis* SpoVE protein, which function in cell division, cell elongation, and spore formation, respectively. *J.Bacteriol.* 171:6375-6378.

- Ish-Horowicz, D. and J.F. Burke.** 1981. Rapid and efficient cosmid cloning. *Nucleic Acids Res.* 9:2989-2998.
- Ishino, F., K. Mitsui, S. Tamaki and M. Matsubashi.** 1980. Dual enzyme activities of cell wall peptidoglycan synthesis, peptidoglycan transglycosylase and penicillin-sensitive transpeptidase, in purified preparations of *Escherichia coli* penicillin-binding protein 1A. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 97:287-293.
- Ishino, F., W. Park, S. Tomioka, S. Tamaki, I. Takase, K. Kunugita, H. Matsuzawa, S. Asoh, T. Ohta and B.G. Spratt.** 1986. Peptidoglycan synthetic activities in membranes of *Escherichia coli* caused by overproduction of penicillin-binding protein 2 and rodA protein. *J.Biol.Chem.* 261 :7024-7031.
- Iuchi, S., Z. Matsuda, T. Fujiwara and E.C. Lin.** 1990. The *arcB* gene of *Escherichia coli* encodes a sensor-regulator protein for anaerobic repression of the *arc* modulon. *Mol.Microbiol.* 4:715-727.
- Jacobs, C., J.M. Frere and S. Normark.** 1997. Cytosolic intermediates for cell wall biosynthesis and degradation control inducible beta-lactam resistance in gram-negative bacteria. *Cell* 88:823-832.
- Jacobs, C., L.J. Huang, E. Bartowsky, S. Normark and J.T. Park.** 1994. Bacterial cell wall recycling provides cytosolic muropeptides as effectors for beta-lactamase induction. *EMBO J.* 13:4684-4694.
- Jacobs, C., B. Joris, M. Jamin, K. Klarsov, J. Van Beeumen, D. Mengin-Lecreux, J. van Heijenoort, J.T. Park, S. Normark and J.M. Frere.** 1995. AmpD, essential for both beta-lactamase regulation and cell wall recycling, is a novel cytosolic N-acetylmuramyl-L-alanine amidase. *Mol.Microbiol.* 15:553-559.
- Jones, M.E. and P.M. Bennett.** 1995. Inducible expression of the chromosomal *cdiA* from *Citrobacter diversus* NF85, encoding an amblin class A beta-lactamase, is under similar genetic control to the chromosomal *ampC*, encoding an amblin class C enzyme, from *Citrobacter freundii* OS60. *Microb.Drug Resist.* 1:285-291.

- 
- Koch, A.L.** 1990. Additional arguments for the key role of "smart" autolysins in the enlargement of the wall of gram-negative bacteria. *Res.Microbiol.* 141:529-541.
- Kopp, U., B. Wiedemann, S. Lindquist and S. Normark.** 1993. Sequences of wild-type and mutant ampD genes of *Citrobacter freundii* and *Enterobacter cloacae*. *Antimicrob.Agents Chemother.* 37:224-228.
- Korat, B., H. Mottland W. Keck.** 1991. Penicillin-binding protein 4 of *Escherichia coli*: molecular cloning of the dacB gene, controlled overexpression, and alterations in murein composition. *Mol.Microbiol.* 5:675-684.
- Korfmann, G.and C.C. Sanders.** 1989. ampG is essential for high-level expression of AmpC beta-lactamase in *Enterobacter cloacae*. *Antimicrob.Agents Chemother.* 33:1946-1951.
- Korfmann, G.and B. Wiedemann.** 1988. Genetic control of beta-lactamase production in *Enterobacter cloacae*. *Rev.Infect.Dis.* 10:793-799.
- Kraft, A.R., M.F. Templin and J.V. Höltje.** 1998. Membrane-bound lytic endotransglycosylase in *Escherichia coli*. *J.Bacteriol.* 180:3441-3447.
- Kresken, M. and B. Wiedemann.** 1987. Die Epidemiologie der Resistenz bei Bakterien und ihre Bedeutung für die Wirksamkeit von Chemotherapeutika. *FAC* 6:869-1063.
- Laemmli, U.K.** 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685.
- Langaee, T.Y., M. Dargis and A. Huletsky.** 1998. An ampD gene in *Pseudomonas aeruginosa* encodes a negative regulator of AmpC beta-lactamase expression. *Antimicrob.Agents Chemother.* 42:3296-3300.
- Langley, D. and J.R. Guest.** 1977. Biochemical genetics of the alfa-keto acid dehydrogenase complexes of *Escherichia coli* K-12: isolation and biochemical properties of deletion mutants. *J.Gen.Microbiol.* 99 :263-276.

- Lindquist, S., F. Lindberg and S. Normark.** 1989. Binding of the *Citrobacter freundii* AmpR regulator to a single DNA site provides both autoregulation and activation of the inducible ampC beta-lactamase gene. *J.Bacteriol.* 171:3746-3753.
- Lindquist, S., D.G. White, H. Schwarz, J.C. Quintela, G. Korfmann, J. Erickson, C.C. Sanders, H.H. Martin and S. Normark.** 1993. AmpG, a signal transducer in chromosomal  $\beta$ -lactamase induction. *Mol.Microbiol.* 3:703-715.
- Livermore, D.M.** 1995. beta-Lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clin.Microbiol.Rev.* 8:557-584.
- Livermore, D.M. and Y.J. Yang.** 1989. Comparative activity of meropenem against *Pseudomonas aeruginosa* strains with well-characterized resistance mechanisms. *J.Antimicrob.Chemother.* 24 Suppl A:149-159.
- Lodge, J., S. Busby and L. Piddock.** 1993. Investigation of the *Pseudomonas aeruginosa* ampR gene and its role at the chromosomal ampC beta-lactamase promoter. *FEMS Microbiol.Lett.* 111:315-320.
- Lommatzsch, J., M.F. Templin, A.R. Kraft, W.Vollmer and J.V. Höltje.** 1997. Outer membrane localization of murein hydrolases: MltA, a third lipoprotein lytic transglycosylase in *Escherichia coli*. *J.Bacteriol.* 179:5465-5470.
- Martinez, E., B. Bartolome and C.F. de la.** 1988. pACYC184-derived cloning vectors containing the multiple cloning site and lacZ alpha reporter gene of pUC8/9 and pUC18/19 plasmids. *Gene* 68:159-162.
- Mottl, H., P. Terpstra and W. Keck.** 1991. Penicillin-binding protein 4 of *Escherichia coli* shows a novel type of primary structure among penicillin-interacting proteins. *FEMS Microbiol.Lett.* 78:213-220.
- Nakagawa, J., S. Tamaki and M. Matsubishi.** 1979. Purified penicillin-binding proteins 1b from *E. coli* membranes showing activities of peptidoglycan polymerase and peptidoglycan cross-linking enzyme. *Agric.Biol.Chem.* 43:1379-1380.

- 
- Nelson, D.E., A.S. Ghosh, A.L. Paulson and K.D. Young.** 2002. Contribution of membrane-binding and enzymatic domains of penicillin binding protein 5 to maintenance of uniform cellular morphology of *Escherichia coli*. *J.Bacteriol.* 184 :3630-3639.
- Nelson, D.E. and K.D. Young.** 2000. Penicillin Binding Protein 5 Affects Cell Diameter, Contour, and Morphology of *Escherichia coli*. *The Journal of Bacteriology* 182:1714-1721.
- Niumsop, P.** 1998. beta-Lactamase Expression in *Aeromonas* spp. University of Bristol. (Dissertation)
- Normark, S., T. Grundstrom and S.Bergstrom.** 1980. Susceptibility to penicillins and cephalosporins in beta-lactamase producing strains of *E. coli* and relative amount of beta-lactamase produced from these strains. *Scand.J.Infect.Dis.Suppl* suppl 25:23-29.
- O'Callaghan, C.H., E.W. Muggleton and G.W. Ross.** 1968. Effects of beta-lactamase from gram-negative organisms on cephalosporins and penicillins, 57-63. *In:* GL Hobby (ed), ASM, Bethesda.
- Oliva, B., P.M. Bennett and I. Chopra.** 1989. Penicillin-binding protein 2 is required for induction of the *Citrobacter freundii* class I chromosomal beta-lactamase in *Escherichia coli*. *Antimicrob.Agents Chemother.* 33:1115-1117.
- Park, J.T.** 1993. An overview of the assembly, turnover and recycling of the murein sacculus, 119-126. *In:* MA De Pedro and et al (eds), *Bacterial Growth and Lysis*. Plenum Press, New York.
- Pfeifle, D., E. Janas and B. Wiedemann.** 1999a. Role of penicillin-binding proteins for the initiation of the AmpC  $\beta$ -lactamase induction in *Enterobacter cloacae*. *Antimicrob.Agents Chemother.*
- Pfeifle,D., E.Janas, B.Wiedemann.** 1999b. The Lytic Transglycosylase Slt70 Is a New Target to Limit the beta-Lactamase Induction in *Enterobacter cloacae*. 39th Interscience Conference on Antimicrob.Agents Chemother. (Abstract)
- Poirel, L., M. Guibert, D. Girlich, T. Naas and P. Nordmann.** 1999. Cloning, sequence analyses, expression, and distribution of ampC-ampR from *Morganella morganii* clinical isolates. *Antimicrob.Agents Chemother.* 43:769-776.

- Quintela, J.C., M. Caparros and M.A. De Pedro.** 1995. Variability of peptidoglycan structural parameters in gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol.Lett.* 125:95-100.
- Romeis, T. and J.V. Höltje.** 1994. Penicillin-binding protein 7/8 of *Escherichia coli* is a DD- endopeptidase. *Eur.J.Biochem.* 224:597-604.
- Sanger, F., S. Nicklen and A.R. Coulson.** 1992. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. 1977. *Biotechnology* 24:104-108.
- Santos, J.M., M. Lobo, A.P.A. Matos, M.A. de Pedro and C.M. Arraiano.** 2002. The gene *bolA* *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology* 45:1729-1740.
- Schiffer, G. and J.V. Höltje.** 1999. Cloning and characterization of PBP 1C, a third member of the multimodular class A penicillin-binding proteins of *Escherichia coli*. *J.Biol.Chem.* 274:32031-32039.
- Seoane, A., M.V. Francia and J.M. Garcia Lobo.** 1992. Nucleotide sequence of the *ampC-ampR* region from the chromosome of *Yersinia enterocolitica*. *Antimicrob.Agents Chemother.* 36:1049-1052.
- Spratt, B.G.** 1975. Distinct penicillin binding proteins involved in the division, elongation, and shape of *Escherichia coli* K12. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 72:2999-3003.
- Spratt, B.G.** 1977a. Properties of the penicillin-binding proteins of *Escherichia coli* K12. *Eur.J.Biochem.* 72:341-352.
- Spratt, B.G.** 1977b. Temperature-sensitive cell division mutants of *Escherichia coli* with thermolabile penicillin-binding proteins. *J.Bacteriol.* 131:293-305.
- Stewart, V., J. Parales, Jr. and S.M. Merkel.** 1989. Structure of genes *narL* and *narX* of the *nar* (nitrate reductase) locus in *Escherichia coli* K-12. *J.Bacteriol.* 171:2229-2234.
- Suzuki, H., Y. Nishimura and Y. Hirota.** 1978. On the process of cellular division in *Escherichia coli*: a series of mutants of *E. coli* altered in the penicillin-binding proteins. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 75:664-668.

- Sykes, R.B. and M. Matthew.** 1979. Detection, assay and immunology of beta-lactamases, 17-49. *In*: MT Hamilton-Miller and JT Smith (eds), beta-lactamases. Academic Press, Ltd., London.
- Templin, M., D.H. Edwards and J.V. Höltje.** 1992. A murein hydrolase is the specific target of bulgecin in *Escherichia coli*. *J Biol Chem.* 267:20039-20043.
- Thunnissen, A.M., A.J. Dijkstra, K.H. Kalk, H.J. Rozeboom, H.Engel, W. Keck and B.W. Dijkstra.** 1994. Doughnut-shaped structure of a bacterial muramidase revealed by X-ray crystallography. *Nature* 367:750-753.
- Thunnissen, A.M., H.J. Rozeboom, K.H. Kalk and B.W. Dijkstra .** 1995. Structure of the 70-kDa soluble lytic transglycosylase complexed with bulgecin A. Implications for the enzymatic mechanism. *Biochemistry* 34:12729-12737.
- Vaara, M. and T. Vaara.** 1983. Sensitization of gram-negative bacteria to antibiotics and complement by a nontoxic oligopeptide. *Nature* 303:526-528.
- Vollmer, W., M. von Rechenberg and J.V. Höltje.** 1999. Demonstration of molecular interactions between the murein polymerase PBP1B, the lytic transglycosylase MltA, and the scaffolding protein MipA of *Escherichia coli*. *J.Biol.Chem.* 274:6726-6734.
- Walsh, T.R., D.J. Payne, A.P. MacGowan and P.M. Bennett.** 1995. A clinical isolate of *Aeromonas sobria* with three chromosomally mediated inducible beta-lactamases: a cephalosporinase, a penicillinase and a third enzyme, displaying carbapenemase activity. *J.Antimicrob.Chemother.* 35:271-279.
- Walsh, T.R., R.A. Stunt, J.A. Nabi, A.P. MacGowan and P.M. Bennett.** 1997. Distribution and expression of beta-lactamase genes among *Aeromonas* spp. *J.Antimicrob.Chemother.* 40:171-178.
- Wang, L., M.K. Khattar, W.D. Donachie and J. Lutkenhaus.** 1998. FtsI and FtsW are localized to the septum in *Escherichia coli*. *J.Bacteriol.* 180:2810-2816.
- Wanner, B.L.** 1993. Gene regulation by phosphate in enteric bacteria. *J.Cell Biochem.* 51:47-54.

---

**West, A.H. and A.M. Stock.** 2001. Histidine kinases and response regulator proteins in two-component signaling systems. *Trends Biochem.Sci.* 26:369-376.

**Wiedemann, B., C. Kliebe and M. Kresken.** 1989. The epidemiology of beta-lactamases. *J.Antimicrob.Chemother.* 24 Suppl B:1-22.

## 7. Anhang

### Abkürzungsverzeichnis

Abb. ....	Abbildung
AMX ....	Amoxicillin
Ala ....	Alanin
AS ....	Aminosäure
BSA ....	Rinderserumalbumin
bp ....	Basenpaare
DNA ....	Desoxyribonukleinsäure
dNTP ....	desoxy-Nukleotidphosphat
E ....	Extinktion
EDTA ....	Ethylendiamintetraacetat
GlcNAc ....	N-Acetylglucosamin
Glu ....	Glutaminsäure
HPLC ....	Hochdruckflüssigkeitschromatographie
kb ....	Kilobasen
kD ....	Kilodalton
m-Dpm ....	meso-Diaminopimelinsäure
MHK ....	minimale Hemmkonzentration
MurNac ....	N-Acetylmuraminsäure
OD <sub>Index</sub> ....	optische Dichte bei [Index] nm Wellenlänge
PBP ....	Penicillin-Bindeprotein
PCR ....	Polymerase-Kettenreaktion
spp. ....	Spezies
Tab. ....	Tabelle
TnM ....	Transposonmutante
TRIS ....	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Trizma Base)
Upm ....	Umdrehungen pro Minute
ÜNK ....	Übernachtskultur
V ....	Volt
Vol. ....	Volumenteile

## Danksagungen

Herrn Prof. Wiedemann danke ich für die Möglichkeit in seiner Arbeitsgruppe diese Dissertation anzufertigen, für sein Interesse am Verlauf dieser Arbeit und seine Unterstützung.

Bei Herrn Prof. Trüper möchte ich mich für die freundliche Übernahme des Koreferats bedanken.

Herrn Dr. Peter Bennett danke ich dafür, daß er mir einen Forschungsaufenthalt in seiner Arbeitsgruppe am Institute for Microbiology and Pathology der Universität Bristol in England ermöglicht hat, Herrn Dr. Matthew Avison für die wissenschaftliche Betreuung während dieses Aufenthalts.

Frau Dr. Andrea Reipert und Frau Dr. Gabi Bierbaum möchte ich für ihre Beratung und Unterstützung bei dem Nachweis von PBPs mit biotinyliertem Ampicillin sowie für die Bereitstellung des Affi-Gel 102 und der CNBr-aktivierten Sepharose danken.

Herrn Prof. Leistner danke ich für die Möglichkeit, das Isotopenlabor des Instituts für Pharmazeutische Biologie zu nutzen und seiner Arbeitsgruppe für ihre ständige Hilfsbereitschaft

Bei Herrn Dr. Dieter Pfeifle möchte ich mich für hilfreiche Diskussionen und das ein oder andere der HPLC geopferte Wochenende bedanken.

Herzlichen Dank an alle Mitarbeiter der Arbeitsgruppe für die angenehme Arbeitsatmosphäre und die stete Hilfs- und Diskussionsbereitschaft. Einen besonderen Dank an Frau Christine Schneider für wertvolle Diskussionen und mitunter aufmunternde Unterstützung.

Frau Bedia Bugdaci danke ich für die Bereitstellung von sterilen Gefäße und die Autoklavierung der Medien

Herrn Karsten Westphal danke ich für das Korrekturlesen der Arbeit.

Der DFG und Herrn Prof. Mohr danke ich für die Möglichkeit zur Teilnahme an dem Graduiertenkolleg „Struktur und molekulare Interaktion als Basis der Arzneimittelwirkung“.

Ich danke der Studienstiftung des deutschen Volkes für die finanzielle und ideelle Förderung während meines Studiums und während der Bearbeitung der Dissertation.

