

Neue Strukturen und Targets für β -Laktamase-Inhibitoren

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

Christine Schneider

aus

Landau in der Pfalz

Bonn 2004

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

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

1. Referent: Prof. Dr. B. Wiedemann

2. Referent: Prof. Dr. E. A. Galinski

Tag der Promotion: 29.11.2004

„Je weiter sich das Wissen ausbreitet, desto mehr Probleme kommen zum Vorschein.“

Johann Wolfgang von Goethe

für Anna und Walter Steinel

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
1.1.	Die β -Laktam-Antibiotika	3
1.1.1.	Penicilline (Peneme)	3
1.1.2.	Cephalosporine (Cepheme)	3
1.1.3.	Carbapeneme	4
1.1.4.	Monobaktame	4
1.1.5.	β -Laktamase-Inhibitoren	4
1.2.	Wirkungsweise von β -Laktam-Antibiotika	5
1.2.1.	Der Aufbau der bakteriellen Zellwand	5
1.2.2.	Die Angriffspunkte der β -Laktam-Antibiotika	7
1.3.	β -Laktamasen	10
1.3.1.	β -Laktamasen der Gruppe 1	11
1.3.1.1.	Chromosomale, nicht induzierbare AmpC- β -Laktamasen	13
1.3.1.2.	Chromosomale, induzierbare AmpC- β -Laktamasen	13
1.3.1.3.	Plasmid-kodierte AmpC- β -Laktamasen	13
1.3.2.	β -Laktamasen der Gruppe 2	14
1.3.3.	β -Laktamasen der Gruppen 3 und 4	16
1.4.	Regulation der β -Laktamase-Expression	17
1.4.1.	Die β -Laktamase-Expression bei <i>C. freundii</i> und <i>E. cloacae</i>	17
1.4.2.	Das AmpR-Protein	20
1.5.	Zielsetzung der Arbeit	21
2.	Material und Methoden	22
2.1.	Material	22
2.1.1.	Bakterienstämme	22
2.1.2.	Enzyme	23
2.1.3.	Plasmide	23
2.1.4.	Oligonukleotide	25
2.1.5.	DNA- und Protein-Marker	26
2.1.6.	Chemikalien	27
2.1.7.	Nährmedien und Antibiotika	27
2.1.8.	Häufig verwendete Puffer und Lösungen	28

2.1.9.	Geräte und Verbrauchsmaterialien.....	28
2.1.10.	Computer-Software	29
2.2.	Methoden.....	29
2.2.1.	Mikrobiologische Methoden	29
2.2.1.1.	Anzucht von Bakterien.....	29
2.2.1.2.	Herstellung CaCl ₂ -kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen	30
2.2.1.3.	Calciumchlorid-Transformation von <i>E. coli</i> -Zellen.....	30
2.2.2.	Molekulargenetische Arbeiten	30
2.2.2.1.	Isolation von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	30
2.2.2.1.1.	Plasmid-Schnellpräparation (GOODE UND FEINSTEIN, 1992)	30
2.2.2.2.	Agarose-Gelelektrophorese.....	31
2.2.2.3.	Rückgewinnung von DNA aus Agarosegelen.....	31
2.2.2.4.	Restriktion und Modifikation von DNA	32
2.2.2.5.	Sequenzanalyse von DNA.....	32
2.2.2.6.	Amplifikation von DNA mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	32
2.2.3.	Proteinchemische Methoden	33
2.2.3.1.	Expression des AmpR-Proteins als Fusionsprotein	33
2.2.3.2.	Expression des AmpR-Proteins ohne Fusionsanteile.....	35
2.2.3.3.	Quantitative Proteinbestimmung nach BRADFORD (1976).....	35
2.2.3.4.	Quantitative Proteinbestimmung mittels BCA-Assay.....	35
2.2.3.5.	Quantitative Proteinbestimmung mittels UV-Photometrie	35
2.2.3.6.	Analyse von Proteinen mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	36
2.2.3.7.	Transfer von Proteinen auf Membrane („Western Blotting“).....	37
2.2.3.8.	Isolierung von Inclusion Bodies.....	38
2.2.3.9.	Aufreinigung des AmpR Proteins	39
2.2.3.9.1.	DNA-Affinitätschromatographie	39
2.2.3.9.2.	Heparin-Affinitätschromatographie	39
2.2.3.9.3.	Größenausschlußchromatographie (Gelfiltration).....	40
2.2.3.10.	Aufreinigung des NusA-AmpR Fusionsproteins	40
2.2.3.10.1.	Metallchelat-Affinitätschromatographie	40
2.2.3.10.2.	Größenausschlusschromatographie (Gelfiltration)	41
2.2.3.10.3.	Thrombin-Spaltung von gereinigtem NusA/AmpR-Protein	41
2.2.3.10.4.	Separation von NusA und AmpR-Protein.....	42

2.2.3.11.	Aktivitätstest von gereinigtem AmpR-Protein mittels Bandshift-Assay (EMSA).....	42
2.2.3.12.	Silberfärbung von Polyacrylamid-Gelen nach NESTERENKO <i>et al.</i>	43
2.2.4.	Isolierung von Muropeptiden	44
2.2.4.1.	Präparation eines „Hot water Extraktes“ (verändert nach JACOBS <i>et al.</i> , 1994).....	44
2.2.4.2.	Auftrennung von löslichen Zellbestandteilen mittels HPLC	44
2.2.4.3.	Entsalzung von Muropeptiden mittels HPLC	45
2.2.4.4.	Massenspektrometrische Analyse der isolierten Muropeptide.....	45
2.2.4.5.	Analyse von ³ H-markierten Muropeptiden im Flüssigkeitsszintillations-spektrometer	45
2.2.5.	Untersuchungen zur β -Laktamase-Expression.....	45
2.2.5.1.	Expressionsstudien mittels RT-PCR	45
2.2.5.1.1.	Synthese von mRNA durch <i>In-vitro</i> Transkription.....	45
2.2.5.1.2.	Amplifikation von mRNA mittels RT-PCR.....	46
2.2.5.2.	Expressionsstudien mittels Real-Time RT-PCR	47
2.2.5.3.	Durchführung von <i>In-vivo</i> Expressionsstudien	48
2.2.6.	Kristallisation von AmpR.....	49
3.	Ergebnisse	50
3.1.	Expression und Reinigung verschiedener Varianten des AmpR-Proteins	50
3.1.1.	Expression und Reinigung des AmpR-Proteins aus <i>C. freundii</i>	51
3.1.2.	Expression und Reinigung eines NusA/AmpR-Fusionsproteins	55
3.2.	Isolation von Muropeptiden mittels HPLC	58
3.2.1.	Isolation des (1,6-anhydro)-MurNac-Tripeptids	60
3.2.2.	Isolation des (1,6-anhydro)-MurNac-Pentapeptids	61
3.3.	Expressionsanalysen der AmpC- β -Laktamase.....	63
3.3.1.	Detektion mittels RT-PCR	64
3.3.2.	Detektion mittels Real-Time RT-PCR	66
3.4.	Aufklärung der dreidimensionalen Struktur des AmpR-Proteins	70
4.	Diskussion	71
4.1.	Expressionsanalysen des <i>ampC</i> - β -Laktamase-Gens	75
4.2.	Aufklärung der Kristallstruktur des AmpR-Proteins	83
5.	Zusammenfassung	85
6.	Literaturverzeichnis.....	87

7. Anhang	99
7.1. Abbildungsverzeichnis	99
7.2. Tabellenverzeichnis.....	101
7.3. Abkürzungsverzeichnis	102

1. Einleitung

“It is time to close the book on infectious diseases.”¹

William H. Stewart, US Surgeon General, 1967

“Our window of opportunity to help those impoverished by infectious diseases is closing.”²

David L. Heymann, WHO Executive Director, 2000

Zwischen diesen Aussagen liegen ungefähr 30 Jahre, in denen die Resistenz von Bakterien gegenüber Antibiotika stark zugenommen hat. Immer noch sind akute Atemwegsinfektionen, insbesondere Pneumonien, die Haupttodesursache weltweit (HEYMANN, 2000).

Seit der Entdeckung des Penicillins durch Sir Alexander Fleming 1928 war vor allem in den 1940er Jahren eine rasante Entwicklung neuer Antibiotika zu verzeichnen (AMYES, 2000). Darunter Streptomycin (1944), Chloramphenicol (1947), Chlortetracyclin (1948) und Erythromycin (1952). Heutzutage gibt es etwa sieben große Antibiotikaklassen, die an drei verschiedenen Angriffspunkten wirken (MUTSCHLER, 1996). Dies sind

- Hemmung der Zellwandsynthese, durch die Gruppen der Penicilline und Cephalosporine
- Blockade der Proteinbiosynthese, verursacht durch Aminoglykoside, Tetracycline und Makrolide
- Unterdrückung der Nukleinsäuresynthese, bewirkt durch Sulfonamide und (Fluor)Chinolone

Zeitgleich mit der Entdeckung bzw. Weiterentwicklung von Wirkstoffen, entstanden Resistenzen gegen Antibiotika. Mutationen oder Gentransfer führten zu Bakterien, die nicht mehr mit den ursprünglich wirksamen Stoffen bekämpft werden konnten. Häufig weisen diese Erreger eine Multiresistenz gegenüber verschiedenster Antibiotika auf. Als besonders gefährlich

¹ „Es ist an der Zeit, das Kapitel Infektionskrankheiten abzuschließen“. (PATLAK, 1996)

² „Das Spektrum der Möglichkeiten, Infektionskranken zu helfen, verkleinert sich zunehmend.“ (HEYMANN, 2000)

gelten heute beispielsweise Methicillin-resistente *S. aureus* (MRSA) und Vancomycin-resistente Enterokokken (VRE). Abbildung 1 zeigt den Anstieg von MRSA in britischen Krankenhäusern in den Jahren 1987 bis 1997.

Generell hat die Häufigkeit von Resistenzen gegenüber Antibiotika bei fast allen wichtigen bakteriellen Infektionserregern weltweit zugenommen (BAQUERO, 1996). Auch in Deutschland ist ein Anstieg zu verzeichnen. So ist z.B. zwischen 1998 und 2001 eine Resistenzzunahme von *E. coli* gegenüber Ciprofloxacin (Fluorchinolon) von 7,7 auf 14,5 % ermittelt worden. Die Resistenzraten von *E. coli* gegenüber Ampicillin stiegen von 40 auf 50 % (PEG, 2001).

Eine der Hauptursachen für die Entstehung von Resistenzen ist der falsche Umgang mit Antibiotika. Darunter fallen unnötige oder falsche Verschreibungen, falsche Anwendung und unkontrollierte Erwerbsmöglichkeiten. Auch der intensive Gebrauch von Antibiotika in Krankenhäusern fördert die Resistenzentwicklung (WHO, 2000). Die Möglichkeit innerhalb kürzester an jeden beliebigen Ort der Welt zu reisen führt zu einer unaufhaltsamen Verbreitung der resistenten Erreger (HEYMANN, 2000).

Infektionen mit resistenten Bakterien erfordern meist zusätzliche Untersuchungen und Behandlungen des Patienten. Das normalerweise angewandte sog. „first-line“-Antibiotikum ist bei solchen Infektionen erfolglos. Für eine Heilung müssen teurere Wirkstoffe eingesetzt werden, stationäre Aufenthalte verlängern sich (COAST *et al.*, 1998). Die Folge sind deutlich höhere Kosten für die Gesundheitssysteme. In den USA wurden die zusätzlichen Kosten aufgrund multiresistenter Keime auf jährlich vier Milliarden Dollar geschätzt (AMERICAN SOCIETY OF MICROBIOLOGY, 1995).

Eine Eindämmung des Resistenzproblems ist kaum abzusehen. Seit 1970 wurden keine neuen Antibiotikaklassen mehr entwickelt (WHO, 2000). Erst die Zulassung von Linezolid, als erster Vertreter der Oxazolidinone, im Jahr 2001 erweckt die Hoffnung multiresistente, grampositive Erreger auch zukünftig effektiv bekämpfen zu können (HALLE *et al.*, 2002). Bei Infektionen mit gramnegativen Bakterien werden nach wie vor hauptsächlich β -Laktam-Antibiotika (Penicilline, Cephalosporine) angewandt.

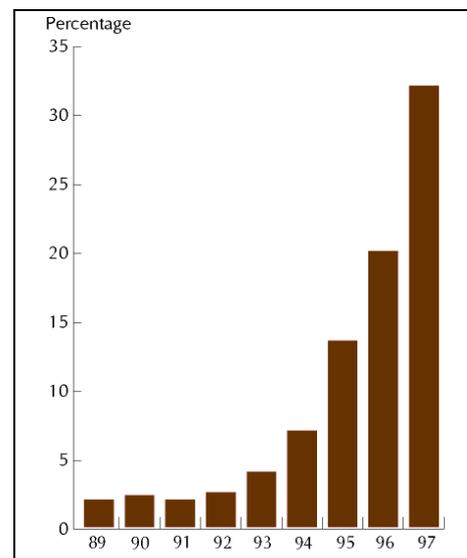


Abbildung 1: Resistenz von Staphylokokken gegen Methicillin in britischen Krankenhäusern, nach REACHER *et al.*, 2000.

1.1. Die β -Laktam-Antibiotika

Das erste β -Laktam-Antibiotikum – Penicillin – wurde zwar schon 1928 von Fleming entdeckt, konnte aber erstmals 1940 in der klinischen Therapie eingesetzt werden. In der folgenden Zeit wurden eine Vielzahl weiterer Moleküle mit ähnlicher Struktur entwickelt (LIVERMORE UND WILLIAMS, 1996). Der wichtigste und namensgebende Strukturbestandteil, der β -Laktam-Ring, ist der Grundbaustein aller Substanzen. Durch Derivatisierung des Penicillins wurden bis heute vier unterschiedliche Klassen von β -Laktam-Antibiotika hergestellt (MUTSCHLER, 1996).

1.1.1. Penicilline (Pename)

Das Grundgerüst der Penicilline bildet die 6-Aminopenicillansäure (6-APA), ein bicyclisches Dipeptid aus Cystein und Valin (siehe Abb. 2). Durch Amidierung der Aminogruppe mit verschiedenen Carbonsäuren entstanden zahlreiche Derivate (KLEIN UND FINLAND, 1963). Von den natürlichen Penicillinen hat nur das Benzylpenicillin (Penicillin G) aus *Penicillium notatum* eine klinische Bedeutung (MUTSCHLER, 1996). Die Arbeiten von SHEEHAN UND HENERY-LOGAN und BATCHELOR *et al.* ermöglichten die großtechnische Herstellung von 6-APA (BATCHELOR *et al.*, 1959; SHEEHAN UND HENERY-LOGAN, 1959). Ausgehend davon erfolgte die Synthese sog. Breitspektrum-Penicilline, die im Gegensatz zu Benzylpenicillin auch gegen gramnegative Erreger eingesetzt werden können (ROEMPP, 1995). Darunter fallen die Aminopenicilline (u.a. Ampicillin, Amoxicillin), die Acylaminopenicilline (u.a. Piperacillin) und die Carboxypenicilline (u.a. Carbenicillin, Ticarcillin).

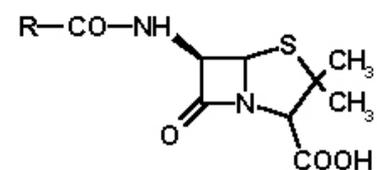


Abbildung 2: Leitstruktur der Penicilline.

1.1.2. Cephalosporine (Cepheme)

Ursprungssubstanz der Cephalosporine ist Cephalosporin C, das aus dem Pilz *Acremonium chrysogenum* gewonnen werden konnte (ROEMPP, 1995). Grundgerüst dieses Moleküls ist die 7-Aminocephalosporansäure. Der Grund für die Entwicklung der Cephalosporine waren β -Lactamase-produzierende Staphylokokken in den 1950er Jahren, die gegen die Penicilline resistent waren (LIVERMORE UND WILLIAMS, 1996). Die synthetisierten Derivate von Ce-

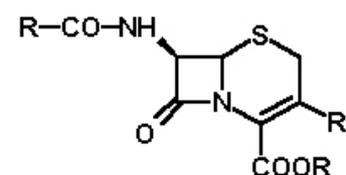


Abbildung 3: Cephalosporine.

phalosporin C sind deutlich wirksamer als ihr Vorgänger, da sie ein breiteres Spektrum abdecken und eine höhere Laktamasestabilität aufweisen (MUTSCHLER, 1996). Die Cephalosporine können nach unterschiedlichen Aspekten gruppiert werden, häufig wird eine Einteilung nach dem Entwicklungszeitraum vorgenommen. Cephazolin und Cefazedon gehören beispielsweise zu den Basiscephalosporinen. Ab 1971 wurde aufgrund von Resistenzen die zweite Generation (u.a. Cefotiam, Cefamandol, Cefuroxim) eingeführt. Die dritte Generation (ab 1980) umfasst u.a. die Substanzen Cefoxitin und Cefotetan. Cefotaxim, Ceftriaxon und Cefepim gehören zu der neusten Generation, den Breitspektrum-Cephalosporinen.

1.1.3. Carbapeneme

Die Struktur der Carbapeneme ähnelt der der Penicilline. Allerdings ist der Schwefel des Fünfrings durch ein Kohlenstoffatom ersetzt und eine Doppelbindung vorhanden (siehe Abb. 4). Das Molekül basiert auf Thienamycin, einem Naturstoff aus *Streptomyces cattleya*, der allerdings sehr instabil ist (LIVERMORE UND WILLIAMS, 1996). Bisher konnten daher auch nur wenige Carbapeneme entwickelt werden, die sich für den klinischen Einsatz eignen. Dies sind z.B. Imipenem (KROPP *et al.*, 1980) und Meropenem (EDWARDS *et al.*, 1989). Die Carbapeneme besitzen allerdings das breiteste Wirkungsspektrum aller β -Laktam-Antibiotika (MOELLERING *et al.*, 1989).

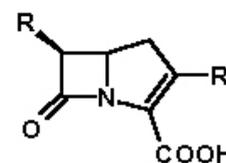


Abbildung 4: Die Struktur der Carbapeneme.

1.1.4. Monobaktame

Monobaktame sind monocyclische β -Laktam-Antibiotika (siehe Abb. 5). Die einzige klinische relevante Substanz ist das Aztreonam, das 1985 zugelassen wurde (SYKES UND BONNER, 1985). Die Wirkung von Aztreonam beschränkt sich auf gram-negative Infektionserreger und beruht insbesondere auf der Bindung an PBP3. (LIVERMORE UND WILLIAMS, 1996).

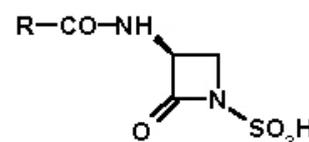


Abbildung 5: Monobaktam

1.1.5. β -Laktamase-Inhibitoren

Die Wirksamkeit von β -Laktam-Antibiotika kann durch die simultane Gabe von β -Laktamase-Inhibitoren erhöht werden. Bislange sind drei Substanzen klinisch relevant. Dies sind Sulbactam und Tazobactam (Penicillinsäure-Sulfone) und Clavulansäure (MUTSCHLER,

1996). Kommerziell vertrieben werden Kombinationen aus Clavulansäure und Amoxicillin bzw. Ticarcillin, desweiteren auch Sulbactam mit Ampicillin und Tazobactam mit Piperacillin (LIVERMORE UND WILLIAMS, 1996).

1.2. Wirkungsweise von β -Laktam-Antibiotika

Die Zielstruktur der β -Laktam-Antibiotika ist die bakterielle Zellwand. Das Fehlen einer solchen Struktur in eukaryotischen Organismen macht die β -Laktame zu einem Antibiotikum mit sehr geringen Nebenwirkungen (MUTSCHLER, 1996).

1.2.1. Der Aufbau der bakteriellen Zellwand

Bakterien werden je nach Beschaffenheit ihrer Zellwand in zwei unterschiedliche Klassen eingeteilt. Dies sind einerseits die grampositiven Bakterien, deren Zellwand sich aus der Cytoplasma-Membran und einer dicken Schicht Peptidoglykan zusammensetzt, und andererseits die gramnegativen Bakterien. Bei diesen besteht die Zellwand aus einer dünnen Lage Peptidoglykan, die sich zwischen der äußeren und der Cytoplasma-Membran befindet (siehe Abb. 6).

Das Peptidoglykan (Murein) ist ein verzweigtes Heteropolymer, das die Cytoplasma-Membran sackförmig umgibt und der Zelle Stabilität verleiht. Die äußere Membran ist über Lipoproteine mit dem Mureinsacculus kovalent verankert (BRAUN UND REHN, 1969). Aufgebaut ist das Murein aus langen Ketten der Aminosaccharide N-Acetyl-Glucosamin (GlcNac) und N-Acetyl-Muraminsäure (MurNac), die alternierend über eine β -1,4-glykosidische Bindung miteinander verknüpft sind. Diese Polysaccharidketten sind über die Carbonsäure der Muraminsäure durch kurze Peptidbrücken quervernetzt. Die Peptide variieren je nach Bakterienart. Bei gramnegativen Bakterien sind meist die Aminosäuren L-Alanin, D-Glutaminsäure, meso-Diaminopimelinsäure und D-Alanin Bestandteil der Peptidseitenketten. Die Diaminopimelinsäure ist die Voraussetzung für die Bildung der quervernetzenden Peptidbindung. Die freie Aminogruppe der Diaminopimelinsäure bindet dabei, unter Abspaltung des terminalen D-Alanins, an die freie Carboxylgruppe des D-

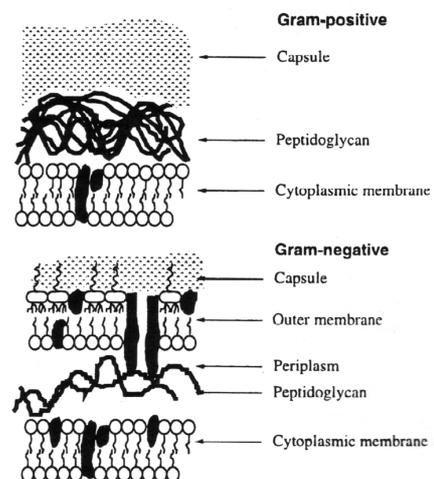


Abbildung 6: Typen der bakteriellen Zellwand (LIVERMORE UND WILLIAMS, 1996).

Alanins im benachbarten Strang (siehe Abb. 7). Seltener sind auch zwei Diaminopimelinsäure-Moleküle miteinander verknüpft (GLAUNER *et al.*, 1988). Durch Zellwachstum und -teilung unterliegt der Mureinsacculus einer ständigen Veränderung. Eine permanente Neusynthese, aber auch der Abbau von Murein trägt dem Rechnung. Pro Generation werden ca. 50 % des Peptidoglykan-Materials freigesetzt und größtenteils wiederverwertet (GOODELL, 1985). Nur ein geringer Teil (6 – 8 %) geht dabei in das Medium verloren (GOODELL UND SCHWARZ, 1985).

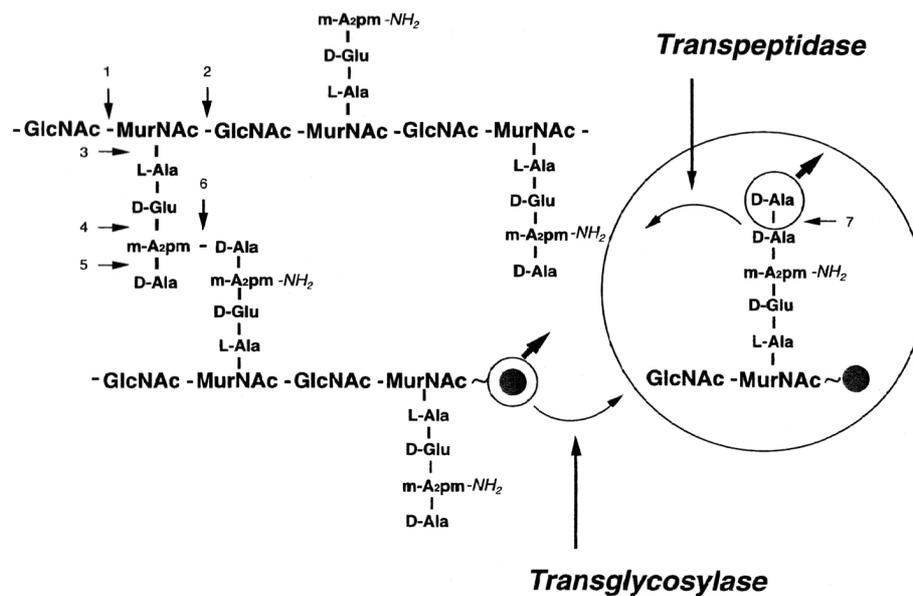


Abbildung 7: Synthese und Abbau des Peptidoglykans gramnegativer Bakterien, aus TEMPLIN UND HOLTJE, 2000. Angriffsorte Murein-abbauender Enzyme sind durch Pfeile gekennzeichnet: 1) N-Acetylglucosaminidase, 2) Muramidase, 3) Muramyl-L-Alanyl Amidase, 4) Glutamyl-Diaminopimeliny Endopeptidase, 5) L,D-Carboxypeptidase, 6) D,D-Endopeptidase, 7) D,D-Carboxypeptidase (A₂pm = Diaminopimelinsäure).

Den Ausgangspunkt für die Mureinsynthese bildet ein UDP-aktiviertes N-Acetyl-Muraminsäure-Pentapeptid. Dieses wird auf den Lipidcarrier Bactoprenol übertragen und ergibt damit das sogenannte Lipid I. An der Cytoplasma-Membran entsteht über eine 1,4-β-glykosidische Bindung mit einem UDP-GlcNAc-Molekül das Lipid II (HIGASHI *et al.*, 1967). Der entstandene Mureinbaustein wird durch die Membran transportiert und im Periplasma freigesetzt. Der genaue Ablauf dieses Vorgangs ist bislang unklar (VAN HEIJENOORT, 1998). Im Periplasma erfolgt, unter Abspaltung des Trägermoleküls, der Einbau in das bestehende Peptidoglykangerüst durch die Bildung von Peptid- und Glykosidbindungen (siehe Abb. 7).

Der Auf- und Abbau des Mureins erfordert eine Vielzahl von Enzymen, die als Zielstrukturen von β -Laktam-Antibiotika identifiziert wurden (SPRATT, 1977).

1.2.2. Die Angriffspunkte der β -Laktam-Antibiotika

Transglykosylasen katalysieren die β -1,4-glykosidische Bindung zur Verlängerung der Polysaccharid-Kette, Transpeptidasen erzeugen die quervernetzenden Peptidbrücken. Neben diesen beiden Einzeltypen existieren auch bifunktionale Enzyme, die sowohl Transpeptidase- als auch Transglykosylase-Aktivität aufweisen (ISHINO *et al.*, 1980; NAKAGAWA *et al.*, 1979; SCHIFFER UND HOLTJE, 1999). Sämtliche Mureinsynthesen, die eine Transpeptidase-Aktivität aufweisen, sind die Zielstrukturen der Penicilline. Daher werden sie auch als Penicillin-Binde-Proteine (PBP) bezeichnet. Tabelle 1 gibt die Mureinsynthesen von *E. coli* wieder. Alle Enzyme sind in der Cytoplasma-Membran lokalisiert, während das aktive Zentrum in das Periplasma ragt.

Gen	Enzym	MG (kDa)	Referenz
<i>ponA</i>	Transglykosylase/Transpeptidase (PBP1a)	94,5	(ISHINO <i>et al.</i> , 1980)
<i>ponB</i>	Transglykosylase/Transpeptidase (PBP1b)	94,3	(NAKAGAWA <i>et al.</i> , 1979)
<i>pbpC</i>	Transglykosylase/Transpeptidase (PBP1c)	85,1	(SCHIFFER UND HOLTJE, 1999)
<i>pbpA</i>	Transpeptidase (PBP2)	70,8	(ASOH <i>et al.</i> , 1986)
<i>ftsI</i>	Transpeptidase (PBP3)	63,9	(NAKAMURA <i>et al.</i> , 1983)
<i>mgt</i>	Monofunktionale Glykosyltransferase	27,3	(DI BERARDINO <i>et al.</i> , 1996)

Tabelle 1: Mureinsynthesen von *E. coli* (HOLTJE, 1998).

Die (hochmolekularen) Penicillin-Binde-Proteine (1a, 1b, 1c, 2 und 3) sind für die Zellwandsynthese von zentraler Bedeutung. Wird sowohl PBP1a als auch PBP1b deletiert, hat dies eine letale Wirkung auf die Zelle (SUZUKI *et al.*, 1978). PBP1c ist trotz Sequenzhomologien zu PBP1a und 1b nicht in der Lage, den Verlust dieser zu kompensieren. Möglicherweise fungiert PBP1c *in vivo* nur als Transglykosylase (SCHIFFER UND HOLTJE, 1999). Der Verlust von PBP2 und PBP3 ist nicht letal, hat jedoch phänotypische Auswirkungen (Sphären- bzw. Filamentbildung).

Die Bildung der Peptidbrücken ist mehrheitlich (93 %) eine D,D-Transpeptidase-Reaktion (GLAUNER *et al.*, 1988). Dabei wird zuerst die D-Ala-D-Ala-Bindung des Pentapeptids aufgebrochen und, unter Alanin-Abspaltung, ein intermediärer Enzym-Substrat-Komplex gebildet. Der β -Laktam-Ring des Penicillins weist eine Strukturanalogie zu der D-Ala-D-Ala-Bindung

auf. In Gegenwart von Penicillinen kommt es daher zur Bildung eines Penicilloyl-Enzym-Intermediats. In einem zweiten Schritt wird das gebundene Substrat auf eine Aminogruppe der Diaminopimelinsäure eines zweiten Mureinpeptids übertragen (siehe Abb. 8). Ist jedoch ein Penicillin-Rest an das Enzym gebunden, kann dieser nicht übertra-

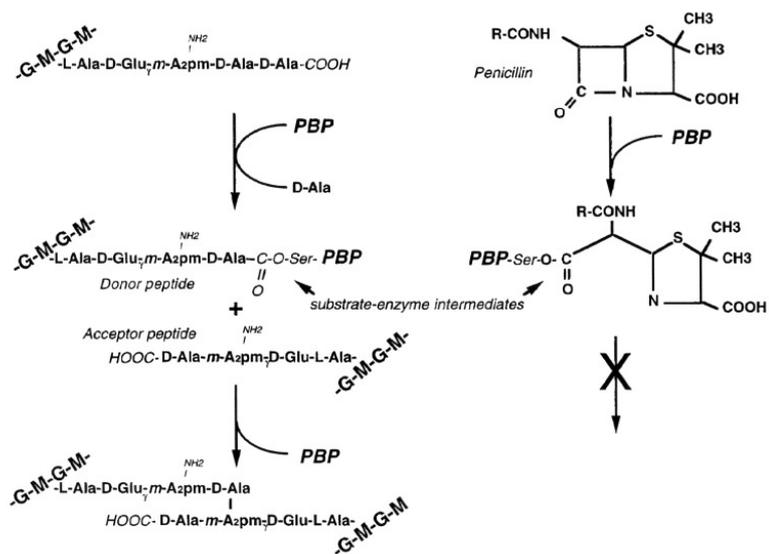


Abbildung 8: D,D-Transpeptidase-Reaktion und Einfluss von Penicillin, aus HOLTJE, 1998. G = GlcNac, M = MurNac, A₂pm = Diaminopimelinsäure, Ser kennzeichnet den Serin-Rest im aktiven Zentrum des PBPs.

gen werden und bleibt dauerhaft im aktiven Zentrum der Transpeptidase (WAXMAN UND STROMINGER, 1983). Weitere Transpeptidase-Reaktionen sind damit inhibiert.

Eine kleinere Anzahl der Peptidbrücken wird durch eine L,D-Transpeptidase-Reaktion gebildet (GLAUNER *et al.*, 1988). Diese Reaktion zwischen zwei Diaminopimelinsäure-Molekülen wird nicht durch Penicilline beeinflusst. Das katalysierende Enzym ist noch nicht bekannt. Die D-Ala-D-Ala-Bindung ist auch ein Substrat für D,D-Carboxypeptidasen, die das endständige Alanin abspalten. Diese Reaktion reguliert die Quervernetzung und wird ebenfalls durch Penicilline gehemmt (IZAKI *et al.*, 1966).

β-Laktam-Antibiotika hemmen nicht nur die Mureinsynthese, sondern auch dessen Abbau. Für Wachstum und Teilung ist allerdings ein Öffnen des Mureinsacculus unbedingt notwendig (HOLTJE UND TUOMANEN, 1991). Für jede, bei der Synthese gebildete, kovalente Bindung besitzt *E. coli* daher mindestens eine Mureinhydrolase (siehe Abb. 7). Teilweise dient diesen Enzymen das hochmolekulare Peptidoglykan als Substrat, teilweise werden aber auch nur dessen Metabolite von den Enzymen umgesetzt. Ein Teil der Mureinhydrolasen wird durch β-Laktam-Antibiotika gehemmt. Eine Übersicht über die nicht-cytoplasmatischen Mureinhydrolasen von *E. coli* gibt Tabelle 2. Im Cytoplasma befinden sich die β-N-Acetylglucosaminidase (NagZ) und AmpD, eine N-Acetylanhydromuramyl-L-Alanin Amidase (vgl. Kapitel 1.4.).

Die physiologische Rolle der niedermolekularen Penicillin-Binde-Proteine (PBP4, 5, 6, 7 und 8) ist nicht eindeutig geklärt. Obwohl sie die Reifung und Öffnung des Mureins katalysieren,

Hydrolase	Gen	Enzym	MG (kDa)	Referenz
D,D-Endopeptidasen				
	<i>dacB</i>	PBP4	48	(KORAT <i>et al.</i> , 1991)
	<i>pbpG</i>	PBP7 , PBP8 (Abbauprodukt von 7)	31	(HENDERSON <i>et al.</i> , 1995; ROMEIS UND HOLTJE, 1994)
	<i>mepA</i>	MepA	28	(KECK <i>et al.</i> , 1990)
D,D-Carboxypeptidasen				
	<i>dacA</i>	D,D-Carboxypeptidase (PBP5)	40	(BROOME-SMITH <i>et al.</i> , 1988)
	<i>dacC</i>	D,D-Carboxypeptidase (PBP6)	40	
	<i>dacB</i>	D,D-Carboxypeptidase (PBP6b)	43,5	(BAQUERO <i>et al.</i> , 1996)
Lytische Transglykosylasen				
	<i>sltY</i>	SlT70	70	(ENGEL <i>et al.</i> , 1991)
	<i>mltA</i>	MltA	38	(LOMMATZSCH <i>et al.</i> , 1997)
	<i>mltB</i>	MltB, SlT35 (Abbauprodukt von MltB)	39 35	(EHLERT UND HOLTJE, 1996); (DIJKSTRA <i>et al.</i> , 1995)
	<i>mltC</i>	MltC	40	(DIJKSTRA UND KECK, 1996)
	<i>emtA</i>	EmtA	22	(KRAFT <i>et al.</i> , 1998)
Amidasen				
	<i>amiA</i>	Muramyl-L-Alanin Amidase A	28	(TOMIOKA <i>et al.</i> , 1983)
	<i>amiB</i>	Muramyl-L-Alanin Amidase B	48	(TSUI <i>et al.</i> , 1994)
	<i>amiC</i>	Muramyl-L-Alanin Amidase C	43	(TEMPLIN <i>et al.</i> , 1998)

Tabelle 2: Mureinhydrolasen von *E. coli*, nach HOLTJE, 1998. SlT = Soluble lytic transglycosylase, Mlt = Membrane-bound lytic transglycosylase, Emt = Endospecific membrane-bound lytic transglycosylase.

sind sie für die Bakterienzelle nicht essentiell (HENDERSON *et al.*, 1997). Daher ist der lytische Effekt, den β -Laktam-Antibiotika auf die Zellen ausüben, mit der Bindung an die hochmolekularen Penicillin-Binde-Proteine (1a-c, 2 und 3) in Beziehung zu setzen. Eine Hemmung dieser Proteine stoppt allerdings nur die Neusynthese des Peptidoglykans. Für die anschließende Lyse der Zellen sind insbesondere die lytischen Transglykosylasen verantwortlich (TOMASZ, 1974).

Diese Lysozym-ähnlichen Proteine spalten die β -1,4-glykosidische Bindung zwischen Muraminsäure und N-Acetyl-Glucosamin. Anders als bei Lysozym wird der Glykosylrest aber nicht auf Wasser, sondern auf die C6-Hydroxyl-Gruppe der Muraminsäure übertragen (THUNNISSEN *et al.*, 1995). Dadurch entsteht eine 1,6-Anhydro-Bindung an der Muraminsäu-

re. Da diese Mureinmetabolite (sog. Muropeptide) wieder in ins Cytoplasma aufgenommen und verwertet werden, ermöglicht dies eventuell die Unterscheidung zwischen Mureinabbauprodukten und –vorläufermolekülen. Die meisten Mureinhydrolasen sind potentielle Autolysine und müssen daher sehr wirksam kontrolliert werden. Interaktionsstudien ergaben eine direkte Wechselwirkung zwischen den Mureinsynthasen und –hydrolasen (VOLLMER *et al.*, 1999). Man geht daher davon aus, dass der Mureinumsatz, ähnlich wie die DNA-Replikation, in einem Multienzymkomplex (Holoenzym) stattfindet (HOLTJE, 1996). Tatsächlich konnte ein Komplex aus einer Transglykosylase/Transpeptidase und einer lytischen Transglykosylase in Gegenwart eines spezifischen Strukturproteins *in-vitro* rekonstituiert werden (TEMPLIN UND HOLTJE, 2000).

1.3. β -Laktamasen

Wie anfangs bereits beschrieben, stellt die Resistenz gegen β -Laktam-Antibiotika ein großes Problem dar. Insbesondere in Krankenhäusern verlieren mehr und mehr Erreger die Empfindlichkeit gegenüber diesen Wirkstoffen, was eine verlangsamte Genesung oder sogar den Tod zur Folge haben kann.

Prinzipiell existieren drei unterschiedliche Mechanismen, die eine Resistenz gegen β -Laktame verursachen (NEU, 1992). Dies sind:

- Veränderungen in der Membran, die verhindern, dass das Antibiotikum die Penicillin-Binde-Proteine erreicht (JAFFE *et al.*, 1982; LI *et al.*, 1994).
- Veränderungen an den Penicillin-Binde-Proteinen selbst, die diese unempfindlich gegen β -Laktame machen (SPRATT, 1994).
- Produktion von β -Laktam-spaltenden Enzymen, den β -Laktamasen (SEEBERG *et al.*, 1983).

Die ersten beiden Mechanismen spielen klinisch nur eine untergeordnete Rolle. Relevanz erlangen sie allenfalls sofern sie in Verbindung mit der Produktion von β -Laktamasen auftreten (PIDDOCK UND GRIGGS, 1991).

Die β -Laktamasen sind die wichtigste und häufigste Ursache von Resistenzerscheinungen (LIVERMORE, 1995). Durch die Spaltung des β -Laktam-Rings inaktivieren sie die Antibiotika bevor diese stabile Serinester mit den PBP ausbilden.

Seit der Einführung des Penicillins 1940 und nahezu gleichzeitigem Auftreten der ersten Resistenzen (*Staphylococcus aureus*; KIRBY, 1944), wurden eine Vielzahl von β -Laktamasen entdeckt und erforscht. 2001 waren mindestens 340 verschiedene β -Laktamasen bekannt, die aus klinischen Isolaten stammten (BUSH, 2001). Da die Techniken zur Identifizierung solcher Proteine immer einfacher und schneller wird, ist davon auszugehen, dass diese Zahl noch um einiges steigen wird.

Ambler schlug deshalb 1980 eine Klassifizierung der Enzyme nach ihrer Aminosäuresequenz vor. Daraus entwickelten sich die sog. Ambler-Klassen A – D (AMBLER, 1980). Aufgrund der klinischen Relevanz der β -Laktamasen ist es aber von großer Wichtigkeit, deren Substratprofil zu kennen, um ein geeignetes Antibiotikum auszuwählen. Heutzutage wird daher mehr auf die Klassifizierung von Bush, Jacoby und Medeiros zurückgegriffen (BUSH *et al.*, 1995). Diese teilt die Enzyme nach ihrem Substratprofil und ihrer Empfindlichkeit gegenüber β -Laktamase-Inhibitoren ein (siehe Tabelle 3). Allerdings ergeben sich teilweise große Ähnlichkeiten zwischen Amblers molekularen Klassen und den Hauptgruppen von Bush.

In nahezu allen Gruppen stieg die Anzahl der beschriebenen β -Laktamasen zwischen 1995 und 2000. Dennoch sind - zumindest noch - nicht alle Enzyme auch klinisch relevant. Im folgenden soll ein kurzer Überblick über die einzelnen Gruppen gegeben werden.

1.3.1. β -Laktamasen der Gruppe 1

Die Laktamasen der Gruppe 1 entsprechen als einzige der Ambler-Klasse C. Hauptvertreter dieser Gruppe sind die AmpC- β -Laktamasen. Sie hydrolysieren sämtliche β -Laktam-Antibiotika außer den Cephalosporinen Cefepim und Cefpirom und den Carbapenemen. Allerdings müssen sie dazu in ausreichender Menge produziert werden (LIVERMORE, 1998). β -Laktamase-Inhibitoren zeigen bei dieser Gruppe keine Wirkung. Durch ihre weite Verbreitung in gramnegativen Erregern besitzen diese Enzyme eine hohe klinische Relevanz. In Verbindung mit akquirierten Carbapenemasen oder einer Verminderung der Membranpermeabilität, führen die AmpC-Enzyme zu breiten Resistenzspektren und wenig Therapieoptionen (BORNET *et al.*, 2000; PIDDOCK UND GRIGGS, 1991).

Die AmpC- β -Laktamasen können entweder chromosomal oder auf einem Plasmid kodiert sein. Bei den chromosomalen Enzymen wird weiter in induzierbare und nicht-induzierbare unterschieden.

Funktionelle Gruppe	Untergruppe	Ambler Klasse	Substratspezifität / Hemmbarkeit	Beispiele	Anzahl	
					1995	2000
1		C	Chromosomale o. Plasmid-kodierte Enzyme gramnegativer Bakterien, Hydrolyse aller β -Laktame außer Carbapenemen, keine Hemmung durch Clavulansäure	AmpC	32	51
2		A, D	in der Regel durch Clavulansäure hemmbar		136	256
	2a	A	Hydrolyse von Penicillinen	BlaZ	20	23
	2b	A	Breitspektrum β -Laktamasen, Hydrolyse von Penicillinen und Breitspektrum-Cephalosporinen	TEM-1, SHV-1	16	16
	2be	A	β -Laktamasen mit erweitertem Spektrum (ESBL), Hydrolyse von Oxyimino-Cephalosporinen und Monobaktamen	TEM-3 bis 20, SHV-2	36	119
	2br	A	Inhibitor-resistente Breitspektrum β -Laktamasen	TEM-30 bis 40 SHV-10	9	24
	2c	A	Carbenicillin-hydrolysierende Enzyme	CARB-1 BRO-1	15	19
	2d	D	Cloxacillin/Oxacillin-hydrolysierende Enzyme, hemmbar durch Clavulansäure	OXA-1 bis 10	18	31
	2e	A	Cephalosporinasen, hemmbar durch Clavulansäure	CepA	19	20
	2f	A	Serin-Carbapenemasen, hemmbar durch Clavulansäure	SME-1, NMC-A	3	4
3		B	Metallo- β -Laktamasen, Hydrolyse von allen β -Laktamen außer Monobaktamen, keine Hemmung durch Clavulansäure	IMP-1, VIM-1	13	24
4		unbekannt	Unsequenzierte Enzyme, die in keine der anderen Gruppen passen		7	9

Tabelle 3: Einteilung der β -Laktamasen nach Bush, erweitert nach Wiegand (BUSH *et al.*, 1995; BUSH, 2001; WIEGAND, 2003). Anzahl = geschätzte Anzahl von β -Laktamasen aus klinischen Isolaten.

1.3.1.1. Chromosomale, nicht induzierbare AmpC-β-Laktamasen

Die gramnegativen Bakterien *E. coli* und *Shigella spp.* besitzen eine chromosomale, jedoch nicht-induzierbare AmpC-β-Laktamase. Das Gen wird konstitutiv, aber so schwach exprimiert, dass keine klinischen Resistenz-Werte erreicht werden. Die Ursache der niedrigen Expressionsraten ist der schwache Promoter des *ampC*-Gens (JAURIN *et al.*, 1981; OLSSON *et al.*, 1983). Mutationen im Promoterbereich oder der Attenuatorsequenz des Gens, können zu einer vielfach stärkeren Laktamase-Expression führen. Um klinische Resistenz zu vermitteln müssen jedoch mehrere Basen gleichzeitig verändert sein (WIEGAND, 2003).

1.3.1.2. Chromosomale, induzierbare AmpC-β-Laktamasen

Bei einer Vielzahl von gramnegativen Bakterien (u.a. *E. cloacae*, *C. freundii*, *S. marcescens*, *M. morgani* und *Y. enterocolitica*) wird die Expression der AmpC-Laktamase erst durch ein Induktionssignal aktiviert. Die Transkription unterliegt einem komplexen Regulationsmechanismus, in den eine Reihe weiterer Enzyme involviert sind. Bei einigen Spezies ist dieser Mechanismus annähernd vollständig aufgeklärt, bei anderen sind noch wesentliche Elemente unklar (JACOBS *et al.*, 1997; POIREL *et al.*, 1999; WESTPHAL, 2003). Auf die Regulation der β-Laktamase-Expression bei *C. freundii* und *E. cloacae* wird später noch genauer eingegangen (siehe Kap. 1.4.). Auch bei diesen β-Laktamasen können Mutationen zu einer stabilen Überproduktion führen. Die Mutationsfrequenz liegt mit 10^{-4} bis 10^{-7} allerdings deutlich höher als bei nicht-induzierbaren Enzymen (KORFMANN UND WIEDEMANN, 1988). Die Ursache liegt häufig in einer Mutation der N-Acetylanhydromuramyl-L-Alanin Amidase (AmpD). Dabei gibt es zahlreiche Möglichkeiten, die zum Funktionsverlust des Proteins und einer daraus resultierenden Laktamase-Überexpression führen können (PETROSINO *et al.*, 2002).

1.3.1.3. Plasmid-kodierte AmpC-β-Laktamasen

Seit 1989 die erste Plasmid-kodierte AmpC-β-Laktamase beschrieben wurde, sind eine Vielzahl weiterer Isolate mit entsprechenden Plasmiden gefunden worden (PHILIPPON *et al.*, 2002). Die Benennung erfolgte dabei nach Kriterien wie Substrat, Name des Patienten oder Name des Krankenhauses (WIEGAND, 2003). Das *ampC*-Gen, das phylogenetisch von dem chromosomalen Gen abstammt, ist nun auf übertragbaren Plasmiden lokalisiert. Diese Plasmide finden sich zunehmend in Organismen wie *Klebsiella spp.* und *Salmonella spp.* wieder, die ursprünglich keine AmpC-β-Laktamase besitzen (HANSON, 2003). Häufig werden diese

Laktamasen in großer Menge exprimiert und führen zu signifikanten Veränderungen in der Empfindlichkeit des Wirtsstammes (PHILIPPON *et al.*, 2002). Die Ursache für die hohen Expressionsraten sind möglicherweise Promoter-Mutationen während der Rekombination (HANSON, 2003). Bisher ist der Anteil klinischer Isolate mit Plasmid-kodierter AmpC- β -Laktamase noch sehr gering (COUDRON *et al.*, 2000; DUNNE *et al.*, 2000). Die schwierige Identifikation bzw. die hohe Verwechslungsgefahr mit ESBL-produzierenden Erregern, führt bereits heute zu einer klinischen Relevanz dieser Laktamase-Gruppe.

1.3.2. β -Laktamasen der Gruppe 2

Die Gruppe 2 der Bush-Einteilung ist weitgefächert und enthält eine Vielzahl unterschiedlicher Enzyme, die in Untergruppen aufgeteilt sind. Die meisten dieser Gruppen sind oder werden zunehmend klinisch relevant. Lediglich die Untergruppen 2c, 2e, 2f sind bisher noch von geringer Bedeutung (WIEGAND, 2003).

In die Gruppe 2a fallen β -Laktamasen, die Penicilline hydrolysieren und nicht durch Clavulansäure hemmbar sind. Bedeutung erlangt diese Gruppe vor allem wegen der BlaZ-Laktamasen von *S. aureus*, die das erstmalige Resistenzauftreten gegenüber Benzylpenicillin vermittelten. Damals waren bereits ca. 5 % der *S. aureus*-Isolate resistent (KIRBY, 1945). Da dieses Enzym Plasmid-kodiert ist, wurde es durch Konjugation weiterverteilt. Dies und die Selektion resistenter Stämme führten schon 1984 zu einer Resistenzrate von 80 – 90 % (LACEY, 1984).

Gruppe 2b beinhaltet die sog. Breitspektrum- β -Laktamasen. Diese besitzen die Fähigkeit die meisten Penicilline und Cephalosporine der ersten und zweiten Generation zu hydrolysieren. Diese Laktamasen werden durch β -Laktamase-Inhibitoren gehemmt. Aufgrund ihrer weiten Verbreitung spielen vor allem TEM-1 und SHV-1-Enzyme eine klinische Rolle. So besitzen mittlerweile weltweit ungefähr 50 % der *E. coli*-Isolate eine TEM-1 Laktamase (LIVERMORE, 1995). Da es sich um ein Plasmid-kodiertes Enzym handelt, wurde es mittlerweile auf verschiedene andere gramnegative Spezies übertragen. Beispiele sind *Neisseria gonorrhoeae*, *Haemophilus influenzae* und *Vibrio cholerae* (LIVERMORE, 1998). Auch die SHV-1 Laktamase, die ursprünglich nur chromosomal in *Klebsiella spp.* vorkam, ist mittlerweile auf Plasmiden kodiert und vielfach übertragen worden (CHAVES *et al.*, 2001; HAEGGMAN *et al.*, 1997). Durch Mutationen der Laktamasen in Gruppe 2b entstanden Enzyme mit neuen, zusätzlichen

Fähigkeiten. Diese sind in den Gruppen 2be (erweitertes Hydrolyse-Spektrum, ESBL) und 2br (Inhibitor-resistent, IRBL) zusammengefasst.

Die ESBLs (Extended Spectrum Beta Lactamase) sind aufgrund von Aminosäureaustauschen befähigt auch Oxyiminocephalosporine zu hydrolysieren. Wichtige Vertreter dieser Gruppe sind die aus TEM-1 und SHV-1 entstandenen Enzyme (TEM-3 bis TEM-20, SHV-2), aber auch die CTX-M-Laktamasen. Diese haben ihren Ursprung in der chromosomalen AmpC- β -Laktamase von Enterobakterien (u.a. *Kluyvera spp.*), sind mittlerweile aber Plasmid-kodiert (BAUERNFEIND *et al.*, 1996; OLIVER *et al.*, 2001). Eine klinische Relevanz ergibt sich aufgrund der weltweiten Verbreitung der TEM-, SHV- und CTX-M-Enzyme. In Deutschland liegt der Anteil der ESBL-positiver *E. coli* und *K. pneumoniae* bei fast 10% (PEG, 2001).

Die Inhibitor-resistenten β -Laktamasen sind ebenfalls durch Aminosäureaustausche aus Enzymen der Gruppe 2b entstanden (BERMUDES *et al.*, 1999). Sie können nicht durch Clavulansäure gehemmt werden. Diese Enzyme sind bisher vorrangig in Frankreich, sonst aber noch recht gering verbreitet (GIRLICH *et al.*, 2000).

Die Gruppe 2c beinhaltet die sog. Carbenicillinasen. Diese spalten Carbenicillin gut, Cloxacillin und Oxacillin jedoch schlecht. Clavulansäure ist in der Lage, diese Enzyme zu hemmen. Die Ursprünge der Carbenicillinasen sind höchst unterschiedlich, zuerst wurde eine solche Laktamase (PSE-4) in *Pseudomonas aeruginosa* beschrieben (HAEGGMAN *et al.*, 1997). Aufgrund ihres nur vereinzelt Auftretens sind die Carbenicillinasen bisher noch nicht klinisch relevant (WIEGAND, 2003).

Penicillinasen, die Carbenicillin, aber auch Cloxa- und Oxacillin sehr gut hydrolysieren können, sind in die Gruppe 2d eingeordnet. Sie werden durch Clavulansäure schwach inhibiert und gehören als einzige Enzyme der Gruppe 2 in die Ambler Klasse D. Diese OXA-Enzyme liegen meist auf konjugativen Plasmiden und treten sehr häufig bei *P. aeruginosa* auf (BONFIGLIO *et al.*, 1998; CHEN *et al.*, 1995). Bei *Acinetobacter baumannii* treten zunehmend OXA-Enzyme auf, die auch geringe Mengen Imipenem hydrolysieren können (AFZAL-SHAH *et al.*, 2001; BOU *et al.*, 2000; RICCIO *et al.*, 2000). Multiresistente, Carbapenemase-produzierende *Acinetobacter* stellen ein ernsthaftes Problem in der Therapie dar (DALLA-COSTA *et al.*, 2003).

Die Gruppen 2e und 2f umfassen Laktamasen, die bisher eher selten auftreten. Für die Gruppe 2e sind dies Cephalosporinasen, für die Gruppe 2f Serin-Carbapenemasen. Die Enzyme bei-

der Gruppen sind durch Clavulansäure hemmbar. Bekannte Vertreter der Gruppe 2e sind die induzierbaren Cephalosporinasen von *Proteus vulgaris* und *Proteus penneri* und die Klasse-A- β -Laktamasen von *Bacteroides spp.* (WIEGAND, 2003). Laktamasen der Gruppe f wurden bisher vor allem in *S. marcescens*, *E. cloacae* und *K. pneumoniae* gefunden (POTTUMARTHY *et al.*, 2003; QUEENAN *et al.*, 2000; YIGIT *et al.*, 2001). Ein Grund für das bisher geringe Auftreten könnte sein, dass Carbapenemasen in Enterobakterien häufig nur eine verminderte Empfindlichkeit, aber keine Resistenz, verursachen und deshalb unentdeckt bleiben (NORDMANN UND POIREL, 2002).

1.3.3. β -Laktamasen der Gruppen 3 und 4

Die β -Laktamasen der Gruppe 3 sind Metallo-Enzyme, d.h. die Katalyse erfolgt über ein oder zwei Zink-Ionen im aktiven Zentrum. Metallo-Laktamasen sind in der Lage alle β -Laktame außer den Monobaktamen zu spalten. Gegenüber den herkömmlichen β -Laktamase-Inhibitoren (Clavulansäure, Tazo-, Sulbactam) sind sie unempfindlich, lassen sich aber durch die Komplexbildner EDTA und 1,10-o-Phenanthrolin hemmen. *Flaviobacterium odoratum*, *Aeromonas hydrophilia*, *Bacillus cereus* und *Legionella gormanii* besitzen typischerweise chromosomale β -Laktamasen (LIVERMORE UND WILLIAMS, 1996). Diese Erreger sind jedoch eher selten und besitzen daher keine klinische Relevanz (LIVERMORE UND WOODFORD, 2000). Anders ist dies bei der Spezies *Stenotrophomonas maltophilia*, die ein Metallo-Enzym (L1) und eine Cephalosporinase (L2) besitzt, und zunehmend im klinischen Kontext auftritt (QUINN, 1998).

Plasmid-kodierte Metallo- β -Laktamasen wurden vor allem in *P. aeruginosa*, *S. marcescens* und *A. baumannii* gefunden (HIRAKATA *et al.*, 1998; SENDA *et al.*, 1996; WATANABE *et al.*, 1991). Dabei handelt es sich um IMP-1-Laktamasen, die auf konjugativen Plasmiden mit weitem Wirtsspektrum kodiert sind (KUROKAWA *et al.*, 1999). Eine zweite Gruppe transferierbarer Metallo-Laktamasen sind die VIM-Enzyme. Diese sind erstmalig 1999 in *P. aeruginosa* aufgetreten. Mittlerweile wurden im europäischen Raum bereits sieben Varianten nachgewiesen, die für mehrere klinische Ausbrüche positiver *P. aeruginosa*-Stämme sorgten (WIEGAND, 2003).

In die Gruppe 4 werden bislang β -Laktamasen eingeordnet, die nicht in die anderen Gruppen passen. Die Anzahl ist noch gering. Bei einem weiteren Anstieg muss jedoch über eine Klassifizierung nachgedacht werden.

1.4. Regulation der β -Laktamase-Expression

Grundlage der vorliegenden Arbeit sind die chromosomalen AmpC- β -Laktamasen aus *E. cloacae* und *C. freundii* bzw. deren Regulationsmechanismus. Dieser ist ein komplexes Zusammenspiel von mehreren Molekülen und Proteinen. Im folgenden wird zunächst der Ablauf der Induktion und Expression dieser Laktamasen erläutert. Anschließend erfolgt eine ausführliche Beschreibung des β -Laktamase-Transkriptionsfaktors AmpR.

1.4.1. Die β -Laktamase-Expression bei *C. freundii* und *E. cloacae*

Bei den Enterobakterien *C. freundii* und *E. cloacae* erfolgt die β -Laktamase-Expression erst bei Anwesenheit von β -Laktam-Antibiotika. Wie bereits erläutert (siehe Kap. 1.2.) inhibieren β -Laktame Enzyme, die wichtige Funktionen bei der Mureinsynthese bzw. der -hydrolyse innehaben. Verschiedene Antibiotika besitzen dabei unterschiedliche Induktorkapazitäten. Die Stärke der Induktion hängt von der Affinität des β -Laktams zu den einzelnen Penicillin-Binde-Proteinen ab. Wirkstoffe wie Imipenem und Cefoxitin, die sowohl PBP1a/1b/2 als auch PBP4/5/6 hemmen können, führen zu einer relativ starken Induktion (PFEIFLE *et al.*, 2000).

Durch die Inhibition der Penicillin-Binde-Proteine kommt der Mureinmetabolismus in Ungleichgewicht. Der normalerweise vorhandene Recyclingkreislauf wird empfindlich gestört. Die freigesetzten Moleküle informieren die Zelle über den Zustand des Mureins, da die relativen Anteile von Mureinabbauprodukten und -vorläufermolekülen den Status der Zellwand widerspiegeln (JACOBS *et al.*, 1994; PARK, 1996). Ein Modell für die Induktion der Laktamase-Expression wurde erstmals 1990 von NORMARK vorgeschlagen und später durch JACOBS und PFEIFLE erweitert (JACOBS *et al.*, 1994; NORMARK *et al.*, 1990; PFEIFLE *et al.*, 1999). Eine schematische Darstellung ist in Abbildung 9 zu sehen.

Lytische Transglykosylasen, Endopeptidasen und eine L,D-Carboxypeptidase setzen beim Abbau des Peptidoglykans Anhydromuramylpeptide (Muropeptide) frei (HOLTJE *et al.*, 1975; HOLTJE UND TUOMANEN, 1991; URSINUS *et al.*, 1992). An das Dissaccharid ist dabei ein Peptidrest aus drei, vier oder fünf Aminosäuren gekoppelt. Inhibierung der lytischen Transglykosylasen durch Bulgecin führt zur einer stark verminderten Freisetzung von Anhydromuramylpeptiden (PFEIFLE, 1999). Ebenso führt es zum Verlust der Induzierbarkeit und zu einer Reduktion der Laktamase-Menge in konstitutiv überexprimierenden *E. cloacae*-Stämmen (PFEIFLE, 1999).

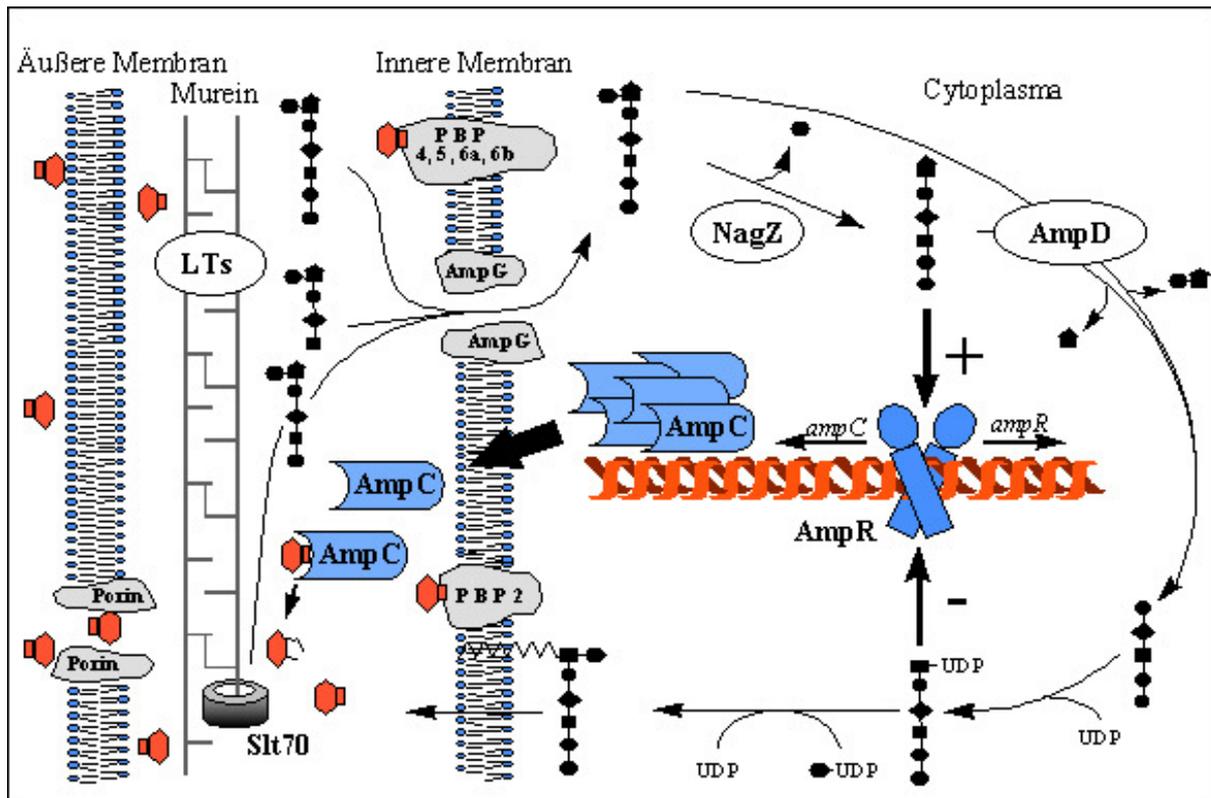


Abbildung 9: Modell für die Induktion der β -Laktamase.

Die Permease AmpG ist ein integrales Membranprotein der inneren Membran und transportiert die Muropeptide in das Cytoplasma (JACOBS *et al.*, 1994; LINDQUIST *et al.*, 1993). Bei *E. cloacae*-Mutanten, die kein AmpG mehr exprimieren, wurden keine Anhydromuramylpeptide im Cytoplasma gefunden (DIETZ *et al.*, 1997). Außerdem ist bei den Deletions-Mutanten keine Induktion der β -Laktamase-Expression mehr möglich (KORFMANN UND SANDERS, 1989).

Die cytoplasmatische β -N-Acetylglucosaminidase NagZ spaltet an den Muropeptiden N-Acetyl-Glucosamin ab (PARK, 1996). Dabei entstehen (1,6-anhydro)-MurNac-Peptide (aM-Peptide), die für die Induktion der β -Laktamase verantwortlich sind (VOTSCH UND TEMPLIN, 2000). Eine NagZ-Deletionsmutante verliert die Fähigkeit zur Induktion fast vollständig (VOTSCH UND TEMPLIN, 2000). Obwohl NagZ die einzige β -N-Acetylglucosaminidase ist, ist sie für die Zelle nicht essentiell (CHENG *et al.*, 2000).

Der Peptidrest der Muropeptide wird durch die N-Acetyl-anhydromuramyl-L-Alanin Amidase AmpD abgespalten (HOLTJE *et al.*, 1994; JACOBS *et al.*, 1995). Die Anzahl der Zuckermoleküle ist dabei unerheblich (JACOBS *et al.*, 1995). Wahrscheinlich werden aM-Peptide aber schneller hydrolysiert als aD-Peptide (GENEREUX *et al.*, 2004). AmpD spaltet spezifisch nur (1,6-anhydro)-Muramylpeptide und vermeidet so den Abbau cytoplasmatischer Mureinvor-

läufermoleküle (HOLTJE *et al.*, 1994). Da die aM-Peptide Signalmoleküle für die β -Laktamase-Expression sind, wirkt AmpD als negativer Regulator der Laktamase-Expression (HOLTJE *et al.*, 1994; LINDBERG *et al.*, 1987). Mutationen in der Aminosäuresequenz können zur Hyperinduzierbarkeit oder konstitutiver Laktamase-Expression führen (KOPP *et al.*, 1993; LINDBERG *et al.*, 1987; NORMARK *et al.*, 1990). Die Mutationsfrequenz liegt für AmpD mit 10^{-4} bis 10^{-7} relativ hoch (KORFMANN UND WIEDEMANN, 1988).

Ist nun unter Einfluss von β -Laktam-Antibiotika der Mureinabbau schneller als die Synthese, liegt in der Zelle ein deutlich erhöhter Spiegel an Muropeptiden vor. Da AmpD nicht in der Lage ist, die Muropeptide schnell genug zu hydrolysieren um die Konzentration auf Normalniveau zu senken, kommt es zur Expression der AmpC- β -Laktamase. JACOBS (1997) postulierte dafür folgende Vorgänge:

Das AmpR-Protein, der Transkriptionsfaktor der β -Laktamase, bindet an die intercistronische Region zwischen *ampC*- und *ampR*-Gen. Da die beiden Gene gegenläufig transkribiert werden, ist AmpR in der Lage, sowohl seine eigene als auch die *ampC*-Transkription zu regulieren. Die Interaktion eines niedermolekularen Liganden mit AmpR determiniert, welchen Einfluss AmpR auf die *ampC*-Transkription hat. Im Normalzustand ist das Mureinvorläufermolekül UDP-N-Acetyl-Muraminsäure-Pentapeptid an AmpR gebunden. Die Expression der Laktamase wird reprimiert. Kommt es zu einer Anhäufung von Mureinabbauprodukten, wird das UDP-MurNac-Pentapeptid vermutlich verdrängt und es kommt zur Bindung des Signalmoleküls an AmpR. Dies führt wahrscheinlich zu einer Konformationsänderung von AmpR, die die *ampC*-Transkription ermöglicht.

Obwohl VOTSCH UND TEMPLIN (2000) zeigten, dass es sich bei dem Signalmolekül um ein (1,6-anhydro)-MurNac-Peptid, also ein Monosaccharid, handelt, konnte bisher nicht aufgeklärt werden, welche Länge der Peptidrest aufweist. Aus den Ergebnissen eines Transkriptionsassays zogen JACOBS *et al.* (1997) die Schlussfolgerung, dass es sich um das aM-Tripeptid handelt. Dem widerspricht DIETZ *et al.* (1997), da nur der Anstieg der cytoplasmatischen aM-Pentapeptide mit der Laktamase-Expression korreliert. Dies wird unterstützt durch die Tatsache, dass β -Laktame wie Cefsulodin, Mecillinam und Aztreonam, die nur an die hochmolekularen PBPs binden, nicht in der Lage sind die β -Laktamase-Expression zu induzieren (PFEIFLE *et al.*, 2000). Die Hemmung der Penicillin-Binde-Proteine mit D,D-Carboxypeptidase-Aktivität ist für die Induktion erforderlich. Dies ist allerdings ursächlich für einen Anstieg von Pentapeptidseitenketten im Murein (BAQUERO *et al.*, 1996).

1.4.2. Das AmpR-Protein

Für die Induzierbarkeit der β -Laktamase-Expression ist das AmpR-Protein unbedingt erforderlich (LINDBERG *et al.*, 1985). In Spezies wie *E. coli*, deren Laktamase nicht induzierbar ist, wurde das *ampR*-Gen vermutlich deletiert (HONORE *et al.*, 1986).

AmpR ist 32 kDa groß und gehört zur Familie der LysR-Transkriptionsfaktoren (LINDQUIST *et al.*, 1989). Diese Proteinfamilie wurde nach dem Transkriptionsfaktor der *lysA*-Gens (Lysin-Synthetase) aus *E. coli* benannt (STRAGIER *et al.*, 1983). Mittlerweile sind über 50 Proteine bekannt, die in diese Gruppe gehören (HENIKOFF *et al.*, 1988; SCHELL, 1993). Alle LysR-Transkriptionsfaktoren besitzen am N-terminalen Ende ein Helix-Turn-Helix-Motiv, das sie befähigt an DNA zu binden. Die Transkriptionsfaktoren werden selbst durch niedermolekulare Liganden reguliert (SCHELL, 1993).

Die Regulation der β -Laktamase-Expression durch AmpR ist in den Enterobakterien weit verbreitet. So wurde außer bei *C. freundii* und *E. cloacae* das *ampR*-Gen auch bei *M. morgani* und *Y. enterocolitica* gefunden (POIREL *et al.*, 1999; SEOANE *et al.*, 1992). Auch außerhalb der *Enterobacteriaceae* wurde ein ähnliches Protein entdeckt. Bei *P. aeruginosa* ist die chromosomale AmpC- β -Laktamase ebenfalls durch AmpR reguliert (LODGE *et al.*, 1993).

Ebenso wie bei AmpD liegt die Mutationsfrequenz, die zu einer konstitutiven Laktamase-Expression führt, für AmpR mit ungefähr 10^{-6} relativ hoch (KUGA *et al.*, 2000). Ein Beispiel dafür ist der Aminosäureaustausch G102E, der sowohl *in-vivo* als auch *in-vitro* zu einer nicht-reprimierbaren AmpC-Expression führt (BARTOWSKY UND NORMARK, 1991; JACOBS *et al.*, 1997).

Die Bindung von AmpR an die intercistronische Region von *ampC* und *ampR* wurde bereits 1989 bewiesen (LINDQUIST *et al.*, 1989). Die Bindestelle umfasst 38 Basenpaare und schließt den Promoter des *ampR*-Gens mit ein. Außerdem liegt sie direkt stromaufwärts (2bp) des *ampC*-Promoterbereiches (LINDQUIST *et al.*, 1989). Dadurch ist AmpR in der Lage, die Transkription beider Gene zu steuern.

Durch die Bindung des UDP-MurNac-Pentapeptids an AmpR wird die Transkription der Laktamase verhindert. Dies wurde auch *in-vitro* bestätigt (JACOBS *et al.*, 1997). In Zellen ohne AmpR ist die AmpC-Expression doppelt so hoch wie in Zellen, die AmpR besitzen (BARTOWSKY UND NORMARK, 1991). Die Laktamase-Transkription erfolgt in geringen Mengen also auch ohne AmpR. JACOBS *et al.* (1997) erhielten hingegen *in-vitro* bei Abwesenheit von AmpR keine Transkription von *ampC*.

Der reprimierende Effekt des UDP-MurNac-Pentapeptids kann *in-vitro* durch Zugabe von aM-Tripeptid egalisiert werden (JACOBS *et al.*, 1997). Die Laktamase-Transkription erreicht dann

die gleiche Stärke wie ohne Liganden. *In-vivo* ist die Expression der Laktamase bei Induktion jedoch fast um den Faktor acht erhöht (BARTOWSKY UND NORMARK, 1991). Dieser Widerspruch beruht möglicherweise auf der Tatsache, dass das aM-Tripeptid nicht oder nicht allein der Induktor für Laktamase-Expression ist. Das von DIETZ *et al.* (1997) postulierte Signalmolekül, das aM-Pentapeptid, wurde *in-vitro* bisher noch nicht getestet.

1.5. Zielsetzung der Arbeit

Angesichts der ständig steigenden Resistenz von Erregern gegenüber vorhandenen β -Laktam-Antibiotika ist es wünschenswert neuartige Wirkstoffe zu entwickeln. Durch die Aufklärung des Induktionsmechanismus von *C. freundii* und *E. cloacae* in den letzten fünfzehn Jahren wurden mehrere Angriffspunkte für den Einsatz von Antibiotika aufgedeckt. Eine Möglichkeit wäre die Expression der β -Laktamase zu verhindern, indem ein reprimierender Ligand permanent an das AmpR-Protein bindet. Dazu sind genaue Kenntnisse über die Struktur der induzierenden und reprimierenden Liganden nötig. Bisher wurden bereits aM-Tripeptid und aM-Pentapeptid als Induktor postuliert. Es konnte aber noch nicht aufgeklärt werden, welches der beiden Moleküle die Transkription der β -Laktamase *in-vivo* auslöst.

Ziel dieser Arbeit ist es, durch vergleichende Untersuchungen mit aM-Tripeptid und aM-Pentapeptid eindeutig zu klären, welche Effekte die beiden Moleküle auslösen. Zu diesem Zweck soll das AmpR-Protein aus *Enterobacter cloacae* exprimiert und gereinigt werden. Die Liganden sollen aus *E. coli* isoliert werden und zusammen mit dem rekombinanten Protein in Transkriptionsassays eingesetzt werden.

Um Rückschlüsse auf die Bindestellen der Liganden an AmpR zu ziehen, soll die dreidimensionale Struktur des AmpR-Proteins ermittelt werden. Dazu soll das Protein kristallisiert werden und mittels Röntgenkristallographie analysiert werden. Die dafür notwendige Menge an reinem AmpR soll ebenfalls im Rahmen dieser Arbeit bereitgestellt werden.

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Bakterienstämme

E. coli XL 1-Blue

Genotyp: *recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 (rk⁻ mk⁺) supE44 relA1 λ⁻ lac⁻*
[F['] *proAB lacI^q ZΔM15 Tn10(Tet^r)*]

Bezugsquelle: Stratagene (Heidelberg)

Dieser Stamm diente als Wirtstamm für Plasmide bei Klonierungen.

E. coli BL21 (DE3) pLysS

Genotyp: F⁻ *ompT hsdS_B (r_B⁻ m_B⁻) gal dcm* (DE3) pLysS(Cm^R)

Bezugsquelle: Stratagene (Heidelberg)

Dieser Stamm wurde zur Überexpression rekombinanter Proteine benutzt.

E. coli C41 (DE3)

Genotyp: F⁻ *ompT hsdS_B (r_B⁻ m_B⁻) gal dcm* (DE3)

Herkunft: MIROUX UND WALKER, 1996

Dieser Stamm wurde zur Überexpression rekombinanter Proteine benutzt.

E. coli DC2

Herkunft: RICHMOND UND WOTTON, 1976

Dieser Stamm besitzt einen Defekt in der äußeren Membran und wurde für Induktionsversuche verwendet.

E. coli JRG582

Genotyp: (*nadC-ampD-ampE-aroP*)

Herkunft: LANGLEY UND GUEST, 1977

Aus diesem Stamm wurden die Anhydromuramylpeptide aM-Tripeptid und aM-Pentapeptid isoliert.

E. coli UGM599

Genotyp: ($\Delta dacA:Km$)

Herkunft: BAQUERO *et al.*, 1996

Dieser Stamm wurde bei Induktionsversuchen eingesetzt.

2.1.2. Enzyme

Restriktionsenzyme und DNA-modifizierende Enzyme wurden, soweit nicht anders angegeben, von Gibco/BRL (Eggenstein) und New England Biolabs (Schwalbach/Taunus) bezogen.

2.1.3. Plasmide

Kommerziell erwerbbar oder bereits hergestellte Plasmide:

pBluescript SK-

Bezugsquelle: Stratagene (Heidelberg)

Verwendet zur Klonierung und Sequenzierung von DNA-Fragmenten.

pBP131

Bezugsquelle: (KORFMANN, 1988)

Das Plasmid enthält einen Teil der genomischen DNA von *E. cloacae*, der unter anderem für die β -Laktamase und das AmpR-Protein kodiert.

pBP19-6

Bezugsquelle: (DIETZ, 1997)

Dieses Plasmid enthält die DNA-Sequenz für AmpD und AmpE aus *E. cloacae*.

pBR322

Bezugsquelle: (SOBERON *et al.*, 1980)

Verwendet zur Klonierung und Sequenzierung von DNA-Fragmenten.

pET19b, *pET22b*, *pET43a*

Bezugsquelle: Novagen (Heidelberg)

Verwendet zur Überexpression des AmpR Proteins aus *E. cloacae* und *C. freundii*.

pJFCfAmpR

Bezugsquelle: BISHOP UND WEINER, 1993

Verwendet zur Überexpression des AmpR Proteins aus *C. freundii*

pNU305

Bezugsquelle: Prof. Dr. Herbert Schmidt, TU Dresden

Das Plasmid enthält einen Teil der genomischen DNA von *C. freundii* OS60, der unter anderem für die β -Laktamase und das AmpR-Protein kodiert (LINDBERG *et al.*, 1985). Das Ursprungsplasmid ist pBR322.

Selbst hergestellte Plasmide:

Bezeichnung	Entstehung	Verwendungszweck
pBPCS1 (Amp ^R)	pET19b und <i>ampR</i> aus <i>C. freundii</i> , kloniert über <i>Bam</i> HI und <i>Eco</i> RI	Expression von AmpR aus <i>C. freundii</i>
pBPCS2 (Amp ^R)	pET22b und <i>ampR</i> aus <i>C. freundii</i> , kloniert über <i>Nde</i> I und <i>Xho</i> I	Expression von AmpR mit C-terminalem His-Tag
pBPCS3 (Amp ^R)	pET22b und <i>ampR</i> aus <i>E. cloacae</i> , kloniert über <i>Nde</i> I und <i>Bam</i> HI	Expression von AmpR aus <i>E. cloacae</i>
pBPCS5 (Tic ^R)	pET43a und <i>ampR</i> aus <i>C. freundii</i> , kloniert über <i>Sma</i> I und <i>Eco</i> RI	Expression des Fusionsproteins NusA/AmpR
pBPCS6 (Tic ^R)	pET43a und <i>ampR</i> aus <i>E. cloacae</i> , kloniert über <i>Sma</i> I und <i>Bam</i> HI	Expression des Fusionsproteins NusA/AmpR
pBPCS10 (Amp ^R)	p <i>Bluescript</i> SK- und 175 bp der <i>ampR-ampC</i> Intergenregion aus <i>C. freundii</i> , kloniert über <i>Eco</i> RI	
pBPCS11 (Amp ^R , Tet ^R)	pBR322 und <i>ampR-ampC</i> aus <i>C. freundii</i> , kloniert über <i>Eco</i> RI	DNA-Matrize für <i>In-vitro</i> Transkriptionsversuche

2.1.4. Oligonukleotide

Die zur DNA-Amplifikation benutzten Oligonukleotide wurden von der Firma Operon (Köln) und Sigma-Ark (Darmstadt) synthetisiert und auf eine Konzentration von 100 µmol pro Liter eingestellt.

Folgende Oligonukleotide wurden eingesetzt:

Name	Sequenz	Verwendungszweck
ATP-1 (WIEGAND, 2001)	GCT TCG CGT CAT GGT C	Synthese von EMSA-DNA
ATP-2 (WIEGAND, 2001)	GGA TTT GAC TGT GCC TG	Synthese von EMSA-DNA
ATP-3	GCA GGG CGC AGC AAA GGG	Synthese von EMSA-DNA
CfAmpR-NdeI-5	TAA CCG GTT CAT ATG ACG CGT AGC TAT ATC	Herstellung von pBPCS2
CfAmpR-BamHI-3	ATA TAG GGA TCC GCC TTT TTT ATT TGT GCA G	Herstellung von pBPCS1
CfAmpRSmaI	TAT CCC GGG GTG GAA TGA CGC GTA GCT ATA TC	Herstellung von pBPCS5
CfAmpRXhoI	ATA TAG CTC GAG TTT GTG CAG CAC CCC GGT TC	Herstellung von pBPCS2
(Ec)AmpR-BamHI (WIEGAND, 2001)	AAC ACT GGA TCC GAT TGC CGT GGT CAC CAT C	Herstellung von pBPCS3 und pBPCS6
(Ec)AmpR-NdeI (WIEGAND, 2001)	TGT ATTCGC TGC CAT ATG ACG CGA AGC TAT CTA	Herstellung von pBPCS3
EcAmpRSmaI	TAT CCC GGG GTG GAA TGA CGC GAA GCT ATC TA	Herstellung von pBPCS6
IVT-AmpC-5	CAC ACC ACT GAT GCA GGA GCA GGC	RT-PCR Versuche
IVT-AmpC-3a	AAC GGC GGG AAG CGC TG	RT-PCR Versuche
IVT-AmpR-5	GAC ATC TCA GCT TTA CCC GCG CTG CG	RT-PCR Versuche
IVT-AmpR-3a	CCC CGG TCA ACC AAC GG	RT-PCR Versuche
IVT-Tet-5	CTG CCG GGC CTC TTG CGG GAT ATC	RT-PCR Versuche
IVT-Tet-3a	GGT AAG AGC CGC GAG CGA TCC	RT-PCR Versuche
pNU305AmpC- Ende_EcoR	CGA ATT CTT ATT GCA GTT TTT CAA GAA TGC G	Herstellung von pBPCS11

pNU305AmpR- Ende_EcoR	CGA ATT CTT ATT TGT GCA GCA CCC C	Herstellung von pBPCS1, pBPCS5 und pBPCS11
RealTimeAmpC5	CAC CCA GTC ACG CAG CAA AC	Real Time RT-PCR
RealTimeAmpC3	GTG ACC GGA TCG CTG AGC TT	Real Time RT-PCR
RealTimeAmpR5	ATC GTA TGG CGG GGA TGT TG	Real Time RT-PCR
RealTimeAmpR3	ATC GCT CAA CAG CGG GAA AA	Real Time RT-PCR
RealTimeEcAmpC5	GAT ATG GCG AAC TGG GTC AT	Real Time RT-PCR
RealTimeEcAmpC3	CAG CCC AGA CCC TGA TAC AT	Real Time RT-PCR
RealTimeGap5	TGG TCT GTT CTT GAC TGA CG	Real Time RT-PCR
RealTimeGap3	TTG TCG AAG TTA GCG CCT TT	Real Time RT-PCR
RealTimeLuc5	TTG TTT CCA AAA AGG GGT TG	Real Time RT-PCR
RealTimeLuc3	CAT CGA CTG AAA TCC CTG GT	Real Time RT-PCR
Saeulenp_AmpC_EcoRI	CGA ATT CGC GCG CAG CAT ATC G	Herstellung von pBPCS10
Saeulenp_AmpR_EcoRI	CGA ATT CAA GCC CGC AGC GAG TTA AG	Herstellung von pBPCS10

2.1.5. DNA- und Protein-Marker

Ready-Load 100 bp DNA Ladder	(Invitrogen, Karlsruhe)
Smart Ladder SF	(Eurogentec, Köln)
Smart Ladder	(Eurogentec, Köln)
Low Range Standard	(Biorad, München)
6xHis Protein Ladder	(Qiagen, Hilden)

2.1.6. Chemikalien

Soweit nicht anders angegeben, wurden Chemikalien der Firmen Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe) und Sigma-Aldrich (Deisenhofen) verwendet.

2.1.7. Nährmedien und Antibiotika

Die Nährmedien wurden zur Sterilisation 20 min bei 120 °C autoklaviert. Agarhaltige Medien wurden, falls nötig, mit den entsprechenden Antibiotika versetzt und in Petrischalen gefüllt.

Die benötigten Antibiotika wurden als Vorratslösung angesetzt, sterilfiltriert und bei Anlegen einer Kultur in das Flüssigmedium gegeben. Die Vorratslösungen wurden bei -20 °C gelagert.

LB-Medium	10 g NaCl, 10 g Pepton (Gibco/BRL), 5 g Hefeextrakt (Gibco/BRL) ad 1 l A. dest.
2x YT-Medium	10 g NaCl, 16 g Pepton (Gibco/BRL), 10 g Hefeextrakt (Gibco/BRL) ad 1 l A. dest.
M9-Salze (5x)	10,5 g K ₂ HPO ₄ , 4,5 g KH ₂ PO ₄ , 1 g (NH ₄) ₂ SO ₄ , 2,5 g Na-Citrat x 2 H ₂ O ad 1 l A. dest.
M9-Medium	1x M9-Salze, 0,2% (w/v) Glucose, 0,1% (w/v) Casaminosäuren, 50 mg/l Uracil, 1 mg/l Thiamin, 5 mg/l Nicotinamid, 1 mM MgSO ₄ , 1 µM CaCl ₂
LB-Agar	10 g NaCl, 10 g Pepton (Gibco/BRL), 5 g Hefeextrakt (Gibco/BRL), 15 g Agar (Gibco/BRL) ad 1 l A. dest.
Ampicillin	Vorrat: 25 mg Ampicillin / ml A. dest. Endkonzentration: 100 µg / ml Bezugsquelle: Bayer, Leverkusen
Chloramphenicol	Vorrat: 35 mg Chloramphenicol / ml Ethanol p.A. Endkonzentration: 35 µg / ml Bezugsquelle: Boehringer, Mannheim
Sulfomethoxazol	Vorrat: 500 mg Tetracyclin / ml /A. dest + NaOH Endkonzentration: 500 µg / ml Bezugsquelle: Hoffmann-La Roche, Basel
Tetracyclin	Vorrat: 12,5 mg Tetracyclin / ml Ethanol/A. dest (1:1) Endkonzentration: 12,5 µg / ml

	Bezugsquelle:	Hoechst, Frankfurt
Ticarcillin	Vorrat:	25 mg Ticarcillin / ml A. dest.
	Endkonzentration:	100 µg / ml
	Bezugsquelle:	GlaxoSmithKline, München

2.1.8. Häufig verwendete Puffer und Lösungen

3x DNA-Probenpuffer	25 % (w/v) Saccharose, 0,05 % (w/v) Bromphenolblau in 3x TBE
5x SDS-Probenpuffer	10 % (w/v) Glycerin, 5 % (v/v) β-Mercaptoethanol, 3 % (w/v) SDS, 0,5 % (w/v) Bromphenolblau, 62,5 mM Tris/HCl pH 6,8
AmpR-Puffer	300 mM Kaliumglutamat (ABCR, Karlsruhe), 10 mM Tris/HCl pH 8,5, 30 % Glycerin
Phenol/Chloroform	Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol 50:49:1 (v/v/v), pH 8,0
TBE-Puffer	90 mM Tris/HCl, 2,5 mM EDTA, 90 mM Borsäure, pH 8,3

2.1.9. Geräte und Verbrauchsmaterialien

Elektrophoresegeräte	Mini-Protean [®] III Cell (Biorad) Flachbett-Geräte Typ 30015 und 300414 (Renner)
Inkubationsschüttler	Serie 25 (New Brunswick Scientific) Rollschüttler (Schütt)
PCR-Thermocycler	UNO-Thermoblock (Biometra) Icycler (Biorad)
Photometer	LKB/Pharmacia Biotech Novaspec II (AP Biotech) Spektralphotometer 150-200 (Hitachi)
pH-Meter	Analog pH-Meter CG711 (Schott)
Ultraschallgerät	UP 50H (Dr. Hielscher)
Videodokumentation	UV-Link (Biometra) Dokumentation (Intas)
Western-Blot-Apparatur	Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell (Biorad)
Zentrifugen	Biofuge 28S (Heraeus) mit Rotoren 3042, 3746, 3731 J2-21 (Beckmann) mit JA10 Rotor

	Minispin (Eppendorf)
	Vakuumentrifuge Speedvac SC 100 (Savant)
Protein-Blot-Membran	Hybond P (AP Biotech)
Röntgenfilm	Hyperfilm ECL (AP Biotech)
	Entwickler und Fixierer: Tetenal

2.1.10. Computer-Software

Zur Analyse von DNA-Sequenzen und zum Verfassen der Arbeit wurden folgende Programme eingesetzt:

- Programmpaket DNASTar (DNASTar, Inc.)
- Office 2000 (Microsoft)

Die in dieser Arbeit wiedergegebenen Bilder wurden elektronisch in das Dokument eingebunden. Die Originalgele und –membrane wurden entweder mittels einer Videodokumentationsanlage oder durch Einscannen digitalisiert. Während der Datenerfassung und –verarbeitung kam es zu keiner inhaltlichen Veränderung der Abbildungen.

2.2. Methoden

2.2.1. Mikrobiologische Methoden

2.2.1.1. Anzucht von Bakterien

E. coli-Zellen wurden aus einer Glycerin-Stammkultur auf LB-Agarplatten mit entsprechenden Antibiotika ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C bebrütet. Bakterienflüssigkulturen wurden in 2 – 20 ml LB- oder 2x YT-Medium aus einer Einzelkolonie angeimpft und über Nacht bei 37 °C auf einem Inkubationsschüttler bebrütet. Sofern Resistenzplasmide vorhanden waren, wurden die Bakterien durch Zugabe von Antibiotika unter Selektionsdruck gehalten. Die Bestimmung der Zelldichte erfolgte mittels einer Messung der optischen Dichte im Spektralphotometer bei einer Wellenlänge von 600 nm.

2.2.1.2. Herstellung CaCl₂-kompetenter *E. coli*-Zellen

20 ml LB-Medium (supplementiert mit den erforderlichen Antibiotika) wurden mit 0,5 ml einer frischen *E. coli*-Übernachtskultur angeimpft und bei 37 °C auf einem Inkubationsschüttler bebrütet. Nach Erreichen einer Zelldichte von OD₆₀₀ = 0,4 wurden die Bakterien 10 Minuten auf Eis inkubiert und anschließend durch Zentrifugation (1000 g, RT, 5 min) geerntet. Das Zellpellet wurde in 8 ml eiskaltem 0,1 M CaCl₂ resuspendiert und 20 min auf Eis inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation wurden die Bakterien in 4 ml eiskaltem 0,1 M CaCl₂ / 15 % Glycerin aufgenommen und für eine weitere Stunde auf Eis belassen. Die so hergestellten Zellen konnten in 200 µl-Aliquots bei –80 °C aufbewahrt werden.

2.2.1.3. Calciumchlorid-Transformation von *E. coli*-Zellen

200 µl kompetente *E. coli*-Zellen wurden mit der zu übertragenden DNA gemischt und für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Die Bakterien wurden dann durch eine zweiminütige Inkubation bei 42 °C einer Hitzeschockbehandlung unterzogen. Zu der Zellsuspension wurde sofort anschließend 1 ml 2x YT-Medium gegeben. Die Bakterien wurden 30 Minuten bei 37 °C zur phänischen Expression auf einem Rollschüttler inkubiert und danach in Aliquots von 50 – 200 µl auf antibiotikahaltigen Platten ausgespatelt. Die Agarplatten wurden über Nacht bei 37 °C bebrütet.

2.2.2. Molekulargenetische Arbeiten

2.2.2.1. Isolation von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Plasmid-DNA wurde auf unterschiedliche Weise aus *E. coli*-Zellen isoliert. Für Restriktionsanalysen nach der Methoden von GOODE UND FEINSTEIN (1992, siehe 2.2.2.1.1) und für Transformationen über Silica-Säulen der Firma Qiagen (Hilden). Die Aufreinigung erfolgte dabei gemäß den Vorschriften des Herstellers.

2.2.2.1.1. Plasmid-Schnellpräparation (GOODE UND FEINSTEIN, 1992)

2 – 4 ml einer frischen *E. coli*-Übernachtskultur wurden in einem Eppendorfgefäß zentrifugiert (12.000 g, RT, 1 min) und das Zellpellet in 100 µl Lösung A (s.u.) resuspendiert. Die Fällung der zellulären Proteine erfolgte durch die Zugabe von 100 µl Phenol/Chloroform, wobei da-

rauf geachtet wurde, dass die Phasen gut durchmischt wurden. Nach Zentrifugation (12.000g, RT, 2 min) konnte die wäßrige obere Phase abgenommen und in ein neues Eppendorfgefäß überführt werden. Dazu wurden 200 µl eiskaltes 100 %-iges Ethanol gegeben und anschließend wurde erneut zentrifugiert (12.000 g, RT, 5 min). Die präzipitierte DNA wurde mit 1 ml eiskaltem 70 %-igen (v/v) Ethanol gewaschen, weitere 5 Minuten wie oben zentrifugiert und anschließend in einer Vakuumzentrifuge getrocknet. Die erhaltene Plasmid-DNA wurde in 20 µl 10 mM Tris/HCl pH 8,5 / 0,25 µg/µl RNase A aufgenommen.

Lösung A: 50 mM Tris/HCl pH 8,0, 4 % (w/v) Triton X-100, 2,5 M LiCl, 62,5 mM EDTA

2.2.2.2. Agarose-Gelelektrophorese

Zur Analyse von DNA-Restriktionsfragmenten, der Mengen- und Größenabschätzung von linearisierter DNA sowie der präparativen Isolierung von DNA erfolgte eine gelelektrophoretische Auftrennung der Moleküle. Dazu wurden Flachbettgelkammern benutzt, in denen die Elektrophorese bei konstanter Spannung (100 V) in TBE-Laufpuffer durchgeführt wurde. Die Agarose wurde in Konzentrationen von 1 – 2 % eingesetzt und in TBE-Laufpuffer gelöst. Zur Größenabschätzung wurde auf die Gele ein Molekulargewichtsmarker aufgetragen; je nach Fragestellung Smartladder SF oder Smartladder. Vor dem Gießen der Gele wurde der Agarose Ethidiumbromidlösung zugesetzt (Endkonzentration 0,5 µg/ml), da die interkalierenden Ethidiumbromid-Moleküle aufgrund ihrer fluoreszierenden Eigenschaften die DNA-Helix im UV-Licht ($\lambda = 254 \text{ nm}$) sichtbar machen. Das Ergebnis wurde mittels einer Videodokumentationsanlage auf einer Fotografie oder auf Diskette festgehalten.

2.2.2.3. Rückgewinnung von DNA aus Agarosegelen

Gelelektrophoretisch aufgetrennte DNA-Fragmente konnten für weitere Experimente aus Agarosegelen zurückgewonnen werden. Dazu wurden die gesuchten DNA-Fragmente unter UV-Licht lokalisiert und mit einem Skalpell ausgeschnitten. Die DNA wurde mit Hilfe eines Gelextraktions-Kits (QIAquick Gel Extraction Kit, Qiagen, Hilden) gemäß des Herstellerprotokoll aus der Agarose herausgelöst und konnte sofort weiterverarbeitet werden.

2.2.2.4. Restriktion und Modifikation von DNA

DNA, die mittels Restriktion an definierten Erkennungssequenzen analysiert werden sollte, wurde gemäß den Angaben des Herstellers mit den entsprechenden Restriktionsenzymen und zugehörigen Reaktionspuffern gemischt und 1 – 3 Stunden bei 37 °C inkubiert. Für die Restriktion von 1 µg DNA wurde circa eine Unit Restriktionsenzym eingesetzt. Die Analyse erfolgte anschließend per Agarose-Gelelektrophorese (siehe Kap. 2.2.2.2).

Ligationen mit T4-DNA-Ligase und Dephosphorylierungen mit Alkalischer Phosphatase (SAP) von DNA erfolgten gemäß den Angaben des Herstellers.

2.2.2.5. Sequenzanalyse von DNA

Gereinigte DNA wurde mittels der Didesoxymethode (SANGER *et al.*, 1977) sequenziert. Die dazu notwendigen Arbeiten wurden an einem A.L.F.-Sequenzierautomaten (Automated Laser Fluorescent Sequencer) von Frau Kim Sherwood durchgeführt.

2.2.2.6. Amplifikation von DNA mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (MULLIS *et al.*, 1986; SAIKI *et al.*, 1985) erlaubt die Amplifikation von DNA zwischen zwei flankierenden Regionen mit bekannter DNA-Sequenz. Für die Reaktion werden eine DNA-Matrize (Template), zwei Primer (Oligonukleotide), Didesoxynukleotide (dNTP's) und eine hitzestabile DNA-Polymerase benötigt. Standardmäßig besteht eine Polymerase-Kettenreaktion aus fünf Schritten:

- (1) initialer Denaturierungsschritt, 94 °C, Dauer 2 – 3 Minuten. Die DNA-Matrize wird dabei vollständig denaturiert und liegt dann als einzelsträngige DNA vor.
- (2) Denaturierung 94 °C, Dauer 30 – 60 Sekunden. Doppelsträngige Matrizen-Moleküle sowie Matrizen-Primer-Hybride werden gespalten.
- (3) Annealing (Primeranlagerung), Dauer 30 – 60 Sekunden. Die Temperatur errechnet sich aus der Schmelztemperatur der verwendeten Primer. Die verwendete Annealing-Temperatur liegt in der Regel zwischen 0 °C und 5 °C unter der errechneten Temperatur. In dieser Phase hybridisieren Primer und DNA-Matrize.
- (4) Elongation (Synthesephase). Die Dauer errechnet sich aus der Länge der zu amplifizierenden DNA, unter der Annahme, dass 1 kbp pro Minute synthetisiert wird. Die Temperatur ist abhängig von der verwendeten DNA-Polymerase. In der vorliegenden Arbeit

wurden Temperaturen von 72 und 75 °C verwendet. Während des Elongations-Schrittes wird die Matrizen-DNA - ausgehend von den Primern - amplifiziert.

(5) finale Elongation, Dauer 5 – 10 Minuten, Temperatur wie in (4). Bereits begonnene unvollständige Amplifikationen werden in dieser Phase fertiggestellt.

Die Schritte (2) – (5) werden je nach Fragestellung 25 – 35x wiederholt.

In dieser Arbeit wurde die Polymerase-Kettenreaktion für unterschiedliche Fragestellungen benutzt. Die Sequenzen der dabei verwendeten Primer sind in Kapitel 2.1.5. aufgeführt.

Sollte die DNA weiterverarbeitet werden wurde sie mit Hilfe von DNA-Aufreinigungskits (QIAQuick PCR Purification Kit / MinElute PCR Purification Kit, Qiagen, Hilden) gereinigt.

2.2.3. Proteinchemische Methoden

2.2.3.1. Expression des AmpR-Proteins als Fusionsprotein

Die Expression von AmpR mit unterschiedlichen Fusionen erfolgte mit Hilfe des pET-Expressionssystems in *E. coli* BL21(DE3)pLysS. Das pET-Expressionssystem ist aufgrund der hohen Selektivität der T7-RNA-Polymerase für ihre Promotorsequenz und ihrer starken Aktivität ein strikt kontrolliertes aber hocheffizientes Expressionssystem (STUDIER *et al.*, 1990; STUDIER UND MOFFATT, 1986). Durch den Einsatz des pLysS-Plasmids wird die Stringenz zusätzlich erhöht, da das durch dieses Plasmid kodierte T7-Lysozym die T7-RNA-Polymerase inaktiviert und damit die Basalexpression des Zielgens in nicht-induzierten Zellen unterdrückt (siehe Abb. 10).

Die kodierende Sequenz des Zielgens wird stromabwärts des T7-Promotors und des Gen 10 Translations-Initiations-Signals inkloniert. Das T7-Gen 1 ist in das Chromosom von *E. coli* BL21 (DE3) integriert und wird durch Induktion mit IPTG zur Expression gebracht, da es unter der Kontrolle des *lacUV5*-Promotors steht. Die exprimierte T7-RNA-Polymerase transkribiert dann das Zielgen.

Die Gensequenz des AmpR-Proteins aus *C. freundii* OS 60 wurde über *Nde*I- und *Bam*HI-Restriktionsschnittstellen in den Expressionsvektor pET19b kloniert. Mit dem erhaltenen Konstrukt pBPCS1 wurden *E. coli* BL21(DE3)pLysS-Zellen transformiert.

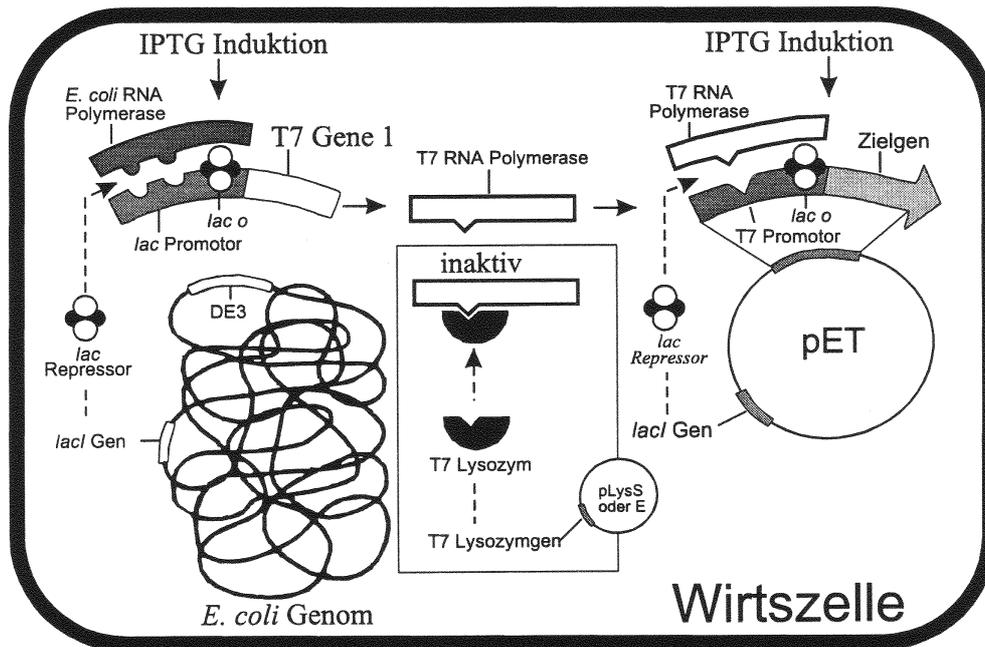


Abbildung 10: Das pET-Expressionssystem und seine Kontrollelemente.

Zur Expression wurden einzelne, frisch transformierte Kolonien in 20 ml LB-Medium (supplementiert mit Chloramphenicol und Ampicillin) überführt und bei 37 °C auf einem Rollschüttler über Nacht vermehrt. Mit dieser Kultur wurden 20 ml oder 2 l 2x YT-Medium (Antibiotika-supplementiert) 2,5 %-ig angeimpft und bei 37 °C auf einem Inkubationsschüttler bebrütet. Die Zelldichte wurde dabei mit einem Spektralphotometer verfolgt. Bei einer OD_{600} von ca. 0,5 wurde die Expression des Zielgens durch Zugabe von 1 mM IPTG induziert. Gleichzeitig wurde nochmals Ampicillin (50 µg/ml) zugegeben. Die Expression des His-AmpR-Proteins erfolgte über 3 – 4 Stunden. Vor und nach der Induktion wurden jeweils 1 ml Kultur zur Analyse auf einem SDS-Polyacrylamid-Gel entnommen.

Zur Reinigung des exprimierten Proteins wurde die Kultur 20 Minuten bei 4000 g zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 10 ml Lysepuffer (s.u.) pro Liter Kultur aufgenommen. Zur Zellyse wurde die Suspension versetzt und für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Der vollständige Zellaufschluß erfolgte durch Ultraschall-Behandlung (3x 1 Minute auf Eis).

Lysepuffer: 50 mM NaH_2PO_4 , 300 mM NaCl, 10 mM Imidazol, pH 8,0

Außerdem wurden mit folgenden AmpR-kodierenden Plasmiden (siehe Kap. 2.1.3.) Expressionsversuche in *E. coli* BL21(DE3)pLysS oder *E. coli* C41(DE3) durchgeführt:

- pBPCS2
- pBPCS5
- pBPCS6

2.2.3.2. Expression des AmpR-Proteins ohne Fusionsanteile

Zur Expression von AmpR ohne zusätzliche Aminosäuren wurden die Plasmide pJFCfAmpr und pBPCS3 in *E. coli* BL21(DE3)pLysS eingebracht und analog zu Kapitel 2.2.3.1. verwendet.

2.2.3.3. Quantitative Proteinbestimmung nach BRADFORD (1976)

Die Konzentration von Proteinen in Lösung läßt sich spektralphotometrisch bestimmen. Dazu macht man sich die Eigenschaft von Coomassie Brilliant Blue zunutze, unspezifisch an fast alle Proteine zu binden. Um die Proteinkonzentration einer Probe zu bestimmen, wurden 5 µl der Probe mit 2 ml Bradford-Reagenz und 195 µl A. dest. gemischt. Anschließend erfolgte die Messung der OD₅₉₅ im Spektralphotometer. Als Referenz dienten 2 ml Bradford-Reagenz mit 200 µl A. dest.. Die Proteinkonzentration wurde mittels einer Eichgeraden bestimmt, die mit BSA-Proteinstandard-Lösungen ermittelt wurde.

Bradford-Reagenz: 0,01 % (w/v) Coomassie Blue G 250, 4,75 % (v/v) Ethanol, 8,5 % (v/v) Phosphorsäure

2.2.3.4. Quantitative Proteinbestimmung mittels BCA-Assay

Zur Messung der Proteinkonzentration wurde außerdem ein kommerziell erhältlicher Bichinonsäure-Test eingesetzt (BCA-200 Protein Assay Kit, Pierce, Bonn). Die Proteinbestimmung erfolgte dabei nach den Angaben des Herstellers.

2.2.3.5. Quantitative Proteinbestimmung mittels UV-Photometrie

Diese Bestimmung der Protein-Konzentration beruht auf dem Lambert-Beerschen Gesetz, nachdem die Konzentration proportional zur Extinktion ist. Der Proportionalitätsfaktor ist der

Extinktionskoeffizient, der für Moleküle und Wellenlänge spezifisch ist. Der Extinktionskoeffizient der vermessenen Proteine wurde mit dem im Internet frei zugänglichen „Prot Param Tool“ (<http://au.expasy.org/tools/protparam.html>) bestimmt. Das Programm beruht auf einer von GILL und VON HIPPEL und errechnet die Extinktionskoeffizienten für verschiedene Wellenlängen (GILL UND VON HIPPEL, 1989).

Die Proteinlösungen wurden bei einer Wellenlänge von 280 nm vermessen und die Konzentration anhand des entsprechenden Extinktionskoeffizienten errechnet.

2.2.3.6. Analyse von Proteinen mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die gelelektrophoretische Auftrennung von Proteinen erfolgte mittels diskontinuierlicher SDS-PAGE (LAEMMLI, 1970). In Gegenwart von 0,1 % (w/v) SDS werden die Proteine bei der eindimensionalen Gelelektrophorese unter denaturierenden Bedingungen aufgrund ihres Molekulargewichtes während ihrer Wanderung durch die Gelmatrix in Richtung Anode aufgetrennt. Die Polypeptide werden in SDS-Probenpuffer hitzedenaturiert; außerdem werden durch den Zusatz des anionischen Detergenz SDS die Eigenladungen der Proteine so effektiv überdeckt, dass anionische Mizellen mit konstanter Nettoladung pro Masseneinheit entstehen. Gesamtzellextrakte oder Protein-Lösungen wurden dazu mit 2x SDS-Probenpuffer gemischt und 5 Minuten auf 95 °C erhitzt. Die Elektrophorese erfolgte in einer Mini-Protean® III Kammer (Biorad, München) für 45 – 55 Minuten bei einer Spannung von 200 V. Dabei wurden 10 – 13 %-ige Polyacrylamid-Trenngele und 4 %-ige Sammelgele eingesetzt. Die Gele wurden anschließend in BioSafe-Färbelösung (Biorad, München) entsprechend den Herstellerangaben gefärbt.

Gelzusammensetzung:

		10 %	13 %
Trenngel:	Acrylamidstammlösung	3,3 ml	4,3 ml
	4x Lower Tris	5 ml	5 ml
	A. dest.	1,7 ml	0,7 ml
	10 % (w/v) SDS	100 µl	100 µl
	10 % (w/v) APS	50 µl	50 µl
	TEMED	25 µl	25 µl

Sammelgel:	1,3 ml Acrylamidstammlösung, 2,5 ml 4x Upper Tris, 6,1 ml A. dest., 50 µl 10 % (w/v) SDS, 50 µl 10 % (w/v) APS, 25 µl TEMED
Acrylamidstammlösung:	30 % (w/v) Acrylamid, 0,8 % (w/v) Bisacrylamid (Roth, Karlsruhe)
4x Upper Tris:	0,5 M Tris/HCl, pH 6,8
4x Lower Tris:	1,5 M Tris/HCl, pH 8,8
Elektrophoresepuffer:	25 mM Tris, 250 mM Glycin, 0,1 % (w/v) SDS

2.2.3.7. Transfer von Proteinen auf Membrane („Western Blotting“)

Zum Nachweis von His-Tag[®]-Fusionsproteinen wurden Proteine aus Polyacrylamid-Gelen auf PVDF-Membrane transferiert. Dazu wurden die zu analysierenden Proteine mittels SDS-PAGE (siehe Kap. 2.2.3.6.) aufgetrennt und anschließend mit Hilfe einer Blotting-Apparatur (Biorad, München) auf eine PVDF-Membran übertragen. Die Membran wurde zuvor 5 Sekunden in Methanol äquilibriert und 10 Minuten in Transfer-Puffer geschüttelt. Das Proteingel wurde ebenfalls für 15 Minuten in Transfer-Puffer äquilibriert. Der Transfer erfolgte bei 15 V für 60 Minuten.

Um unspezifische Signale zu verhindern, wurde die Membran 1 Stunde unter Schütteln in Blocking-Puffer inkubiert. Einer einstündigen Inkubation in primärer Antikörper-Lösung folgte ein 15minütiger und zwei 5minütige Waschschrte in Waschlösung I. Danach wurde die Membran 1 Stunde in sekundärer Antikörperlösung geschüttelt. Zur Entfernung ungebundenen Antikörpers wurde die Membran zweimal 5 Minuten mit Waschlösung II und zweimal 5 Minuten mit Waschlösung II gewaschen. Die Entwicklung erfolgte durch Auftragen von 1 ml ECL Reagent (Amersham Biosciences, Freiburg) und Aufnahme der Signale auf Röntgenfilm. Die Membran konnte zur Darstellung der gesamten Proteine auch mit Coomassie-Blau-Färbelösung angefärbt werden.

Transfer-Puffer:	50 mM Tris, 50 mM Borsäure, 10 % (v/v) Methanol, pH 8,3
Blocking-Puffer:	5% (w/v) Milchpulver, 0,1% (v/v) Tween 20 in PBS-Puffer
PBS-Puffer (10x):	0,58 M Na ₂ HPO ₄ , 0,17 M NaH ₂ PO ₄ , 0,68 M NaCl
prim. AK-Lösung:	1:500 His-Probe (H-3) (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA) in Waschlösung I

sek. AK-Lösung:	1:2000 anti-Maus IgG-HRP (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA) in Waschlösung I
Waschlösung I:	1% (w/v) Milchpulver in PBS-Puffer
Waschlösung II:	1% (w/v) Milchpulver, 0,3% (v/v) Tween 20 in PBS-Puffer

2.2.3.8. Isolierung von Inclusion Bodies

Exprimiertes Protein, das sich nicht in der löslichen Fraktion befindet, liegt meist aggregiert in sog. Inclusion Bodies vor. Durch mehrere Zentrifugationsschritte können die Proteine von den anderen unlöslichen Zellbestandteilen getrennt werden.

Aufgeschlossene Bakterien-Zellen wurden bei 4000 g und 4 °C 20 Minuten zentrifugiert. Der Überstand enthält die löslichen Zellbestandteile und wurde verworfen. Das Pellet mit den unlöslichen Bestandteilen und den Inclusion Bodies wurde in 10 ml (pro Liter Ausgangskultur) Inclusion Body Waschpuffer (s.u.) resuspendiert und für 30 Minuten auf Eis belassen. Durch die nachfolgende Zentrifugation (10.000g, 4 °C, 20 min) wurden die Inclusion Bodies pelletiert, während andere unlösliche Moleküle, wie zum Beispiel Lipide oder Lipopolysaccharide im Überstand verblieben. Das Pellet wurde in 10 ml Solubilisierungspuffer (s.u.) resuspendiert und erneut 30 Minuten auf Eis inkubiert, um die Inclusion Bodies aufzulösen. Nach einer weiteren Zentrifugation (15.000 g, 4 °C, 20 min) erhielt man die exprimierten Proteine im Überstand gelöst. Der Überstand wurde mit Solubilisierungspuffer auf eine Proteinkonzentration von ca. 2 – 3 mg/ml eingestellt und über Nacht gegen 1 l Harnstoff-Lyse-Puffer (s.u.) und weitere 4 Stunden gegen Bindepuffer (s.u.) dialysiert. Alle Schritte erfolgten bei 4 °C. Aliquots der Überstände wurden auf einem 13 %-igen SDS-Polyacrylamid-Gel analysiert.

Inclusion Body Waschpuffer:	50 mM Tris/HCl pH 7,5, 2 mM EDTA pH 8,0, 0,1 M NaCl, 1 M Harnstoff, 0,05 % (w/v) Deoxycholsäure, 1 mM PMSF (nach HLODAN <i>et al.</i> , 1991)
Solubilisierungspuffer:	1,67 M Guanidinium-HCl, 10 mM Tris-HCl pH 8,0, 10 % (v/v) Glycerin, 1mM DTT, 1 mM PMSF
Harnstoff-Lyse-Puffer:	2 M Harnstoff, 50 mM NaH ₂ PO ₄ , 300 mM NaCl, 10 % (v/v) Glycerin, pH 8,0

Bindepuffer: 50 bzw. 150 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA,
5 % (v/v) Glycerin, pH 6,5

2.2.3.9. Aufreinigung des AmpR Proteins

2.2.3.9.1. DNA-Affinitätschromatographie

Zur Reinigung von renaturiertem AmpR wurde die Fähigkeit des Proteins, an DNA zu binden genutzt. Ein doppelsträngiges 80 bp-Fragment (s.u.) der *ampR/ampC*-Intergenregion aus *C. freundii* gekoppelt an Agarose diente als Säulenmatrix. Ein Oligonukleotid wurde bei der Synthese biotinyliert (Roth, Karlsruhe).

Je 20 nmol der komplementären Oligonukleotide wurden in 100 µl 10 mM Tris/HCl pH 8,5 resuspendiert, gemischt und auf 95 °C erhitzt. Zur Hybridisierung erfolgte eine Abkühlung auf 20 °C über einen Zeitraum von 17 Stunden. Die erhaltene doppelsträngige DNA wurde zu einem Milliliter (350 nmol) Streptavidin Agarose (Strep-Tactin Superflow, IBA, Göttingen) gegeben, eine Stunde auf Eis inkubiert und anschließend in eine Säule eingefüllt. Ungebundene DNA wurde durch mehrmaliges Waschen mit Bindepuffer (s.u.) entfernt

Nach Aufgabe der AmpR-Proteinlösung und mehrmaligem Waschen mit Bindepuffer erfolgte die Elution mit mehreren Säulenvolumina Elutionspuffer. AmpR-haltige Fraktionen wurden über Nacht gegen AmpR-Puffer dialysiert.

Bindepuffer: 50 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 5 % (v/v) Glycerin,
pH 8,5

Elutionspuffer: 300 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 5 % (v/v) Glycerin,
pH 8,5

2.2.3.9.2. Heparin-Affinitätschromatographie

Renaturiertes AmpR konnte außerdem über Heparin-Agarose-Säulen aufgereinigt werden. Das Polyanion Heparin ähnelt dem DNA-Rückgrat und ermöglicht so eine Affinitätschromatographie vieler DNA-Bindeproteine. Die Elution erfolgt dabei analog zur DNA-Affinitätschromatographie durch Erhöhen der Salzkonzentration. Die Säulen wurden bereits fertig gepackt erworben (HiTrap Heparin HP, 1 ml, Amersham Biosciences, Freiburg) und

mit einer Peristaltikpumpe betrieben. Ein angeschlossener UV-Detektor ermöglichte die Analyse des Eluats im Hinblick auf proteinhaltige Fraktionen.

Bei einer Flussrate von ca. 1 ml/min wurde die Säule zunächst mit Bindepuffer (s.u.) equilibriert, anschließend wurde die Proteinlösung auf die Säule aufgetragen. Nach Waschen mit mehreren Säulenvolumina Waschpuffer erfolgte die Elution von AmpR mit 10 ml Elutionspuffer. Eluat, welches AmpR enthielt wurde über Nacht gegen AmpR-Puffer dialysiert.

Bindepuffer: 150 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 5 % (v/v) Glycerin, pH 6,5

Waschpuffer: 200 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 6,5

Elutionspuffer: 1 M NaCl, 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 10 % (v/v) Glycerin, pH 6,5

2.2.3.9.3. Größenausschlußchromatographie (Gelfiltration)

Um besonders reines Protein zu erhalten, wurde während der Renaturierung eine Größenausschlußchromatographie durchgeführt. Dazu wurde AmpR nach der Dialyse in Harnstoff-Lyse-Puffer (s.u.) auf eine Gelfiltrationssäule (Superdex 200 prep grade, 143 ml Säulenvolumen, Amersham Biosciences, Freiburg) aufgetragen, die mit gleichem Puffer äquilibriert worden war. Die Elution erfolgte mit einer Flussrate von 0,2 ml/min ohne Pufferwechsel. Proteinhaltige Fraktionen wurden durch UV-Detektion ersichtlich. Fraktionen, die AmpR enthielten wurden vereinigt und nach dem standardmäßigen Renaturierungsprotokoll (siehe Kap. 2.2.3.8.) weiterbehandelt.

Harnstoff-Lyse-Puffer: 2 M Harnstoff, 50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 10 % (v/v) Glycerin, pH 8,0

2.2.3.10. Aufreinigung des NusA-AmpR Fusionsproteins

2.2.3.10.1. Metallchelate-Affinitätschromatographie

AmpR wurde nach Fusion an den Transkriptionsfaktor NusA als lösliches Protein exprimiert. Das resultierende Fusionsprotein besitzt zusätzlich sechs aufeinanderfolgende interne Histidin-Reste. Derartige Fusionsproteine können mit Hilfe einer Ni-NTA-Säule (Nickel-Nitriloacetic-Acid, Qiagen, Hilden) nach dem Prinzip der immobilisierten Metallchelate-

Chromatographie aufgereinigt werden (PORATH *et al.*, 1975). NTA ist eine vierzählig chelatierende Substanz, die mit vier der sechs Liganden-Bindestellen des Nickel-Ions interagiert. Die beiden verbleibenden Liganden-Bindestellen können mit dem 6xHis-Tag interagieren, und das Protein so an die Säule binden. Durch hohe Imidazol-Konzentrationen kann das Protein von der Säule eluiert werden, da es kompetitiv von den Bindestellen der Nickel-Ionen entfernt wird.

Die Chromatographie-Säule wurde mit 5 ml Ni-NTA-Agarose (Qiagen, Hilden) nach den Vorschriften des Herstellers gepackt und mit ca. 10 Säulenvolumina Lysepuffer (s.u.) äquilibriert. Zur Aufreinigung des Proteinen wurde nach Zellyse und Zentrifugation der Überstand filtriert und auf die Säule gegeben. Um unspezifisch gebundene Proteine zu entfernen, wurde die Säule viermal mit einem Säulenvolumen Waschpuffer20 (s.u.) gewaschen. Die Elution erfolgte mit jeweils viermal einem Säulenvolumen Elutionspuffer mit Imidazol-Konzentrationen von 30, 50 und 100 mM (s.u.). Eluate, die NusA/AmpR enthielten, wurden vereinigt.

Lysepuffer:	50 mM NaH ₂ PO ₄ , 300 mM NaCl, 10 mM Imidazol, pH 8,0
Waschpuffer20:	50 mM NaH ₂ PO ₄ , 300 mM NaCl, 20 mM Imidazol, pH 8,0
Elutionspuffer:	wie Lysepuffer, jedoch mit Imidazol-Konzentrationen von 30, 50 und 100 mM

2.2.3.10.2. Größenausschlusschromatographie (Gelfiltration)

NusA/AmpR, das bereits per Metallchelate-Affinitätschromatographie gereinigt worden war, wurde zur Erhöhung der Reinheit auf eine Gelfiltrationssäule (Superdex 200 prep grade, 143 ml Säulenvolumen, Amersham Biosciences, Freiburg) aufgetragen, die mit Lysepuffer äquilibriert worden war. Die Elution erfolgte mit einer Flussrate von 0,3 ml/min ohne Pufferwechsel. Proteinhaltige Fraktionen wurden durch UV-Detektion ersichtlich. Fraktionen, die NusA/AmpR enthielten wurden vereinigt. Je nach weiterer Verwendung wurde das Protein entweder gegen AmpR-Puffer dialysiert oder einer Thrombin-Spaltung unterzogen.

2.2.3.10.3. Thrombin-Spaltung von gereinigtem NusA/AmpR-Protein

Zur Abspaltung des AmpR-Proteins von dem NusA-Fusionsanteil wurde eine proteolytische Spaltung mit Thrombin Protease (Amersham Biosciences, Freiburg) durchgeführt. Direkt N-

terminal zur AmpR-Sequenz befindet sich die Consensus-Sequenz für eine Thrombin-Schnittstelle, um die Gewinnung von nativem AmpR zu ermöglichen.

Zur Spaltung wurde das bei der Gelfiltration erhaltene Fusionsprotein mit 25 U Thrombin Protease über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Während der Inkubation konnte das Protein gegen AmpR-Puffer oder Lysepuffer dialysiert werden.

Lysepuffer: 50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 10 mM Imidazol, pH 8,0, (20% Glycerin)

2.2.3.10.4. Separation von NusA und AmpR-Protein

Die Gewinnung von reinem AmpR aus der Thrombin-Spaltung erfolgte mittels Ni-NTA-Agarose (Qiagen, Hilden). Da die Polyhistidin-Sequenz nach der Spaltung an dem NusA-Anteil verbleibt, kann dieses Fragment an die Matrix binden, AmpR hingegen nicht. Die Separation wurde im Batch-Verfahren durchgeführt.

1 ml Ni-NTA-Agarose wurden mit Lysepuffer äquilibriert. Anschließend wurde ein Milliliter des Spaltungsansatzes (gegen Lysepuffer dialysiert) zur Agarose gegeben, gemischt und 5 Minuten inkubiert. Nach Zentrifugation (1000g, 1 min) konnte der AmpR-haltige Überstand abgenommen werden. Die Ni-NTA-Matrix konnte durch Waschen mit Elutionspuffer regeneriert werden. Isoliertes AmpR-Protein wurde über Nacht gegen AmpR-Puffer dialysiert.

Lysepuffer: 50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 10 mM Imidazol, pH 8,0

Elutionspuffer: 50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 300 mM Imidazol, pH 8,0

2.2.3.11. Aktivitätstest von gereinigtem AmpR-Protein mittels Bandshift-Assay (EMSA)

Aktives AmpR-Protein benötigt die Fähigkeit an DNA zu binden, damit es als Transkriptionsfaktor wirken kann. Isoliertes und gereinigtes Protein wurde daher in EMSA (Electrophoretic Mobility Shift Assay; KERR, 1995) Experimenten eingesetzt, um die DNA-Bindeaktivität zu überprüfen. Dies beruht auf dem unterschiedlichen Laufverhalten von freier DNA und DNA-Protein-Komplexen in der Gelelektrophorese. Das *ampC/ampR*-Operatorfragment sollte demnach durch die Bindung von aktivem AmpR retardiert werden.

Das eingesetzte DNA-Fragment wurde mit Hilfe der Primer ATP1 und ATP2 bzw. ATP1 und ATP3 bzw. Saeulenp_AmpC_EcoRI und Saeulenp_AmpR_EcoRI mittels PCR gewonnen. Als Template dienten dabei die Plasmide pBP131 bzw. pBPCS11.

100 – 200 ng DNA-Fragment wurden mit 0,1 – 1 µg AmpR Protein in Gelshift-Puffer (s.u.) gemischt und 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe von DNA-Probenpuffer wurden die Proben auf einem TBE-Polyacrylamid-Gel (10%) bei einer Spannung von 100 V aufgetrennt. Die Detektion erfolgte durch Silberfärbung des Gels (siehe Kap. 2.2.3.12.).

Gelshift-Puffer:	5 mM MgCl ₂ , 75 mM NaCl, 10 mM Tris/HCl pH 8,0
TBE-Polyacrylamid-Gel:	3,3 ml Acrylamid-Stammlösung, 2 ml 5x TBE, 4,7 ml A. dest., 50 µl 10 % Ammoniumpersulfat, 25 µl TEMED
Acrylamidstammlösung:	30 % (w/v) Acrylamid, 0,8 % (w/v) Bisacrylamid (Roth, Karlsruhe)

2.2.3.12. Silberfärbung von Polyacrylamid-Gelen nach NESTERENKO *et al.*, 1994

Zur Anfärbung von Proteinen und DNA in Polyacrylamid-Gelen wurden diese einer Silberfärbung unterzogen. Nach der Elektrophorese wurden die Gele 5 Minuten in Fixierlösung (s.u.) unter Schütteln inkubiert, anschließend dreimal mit A. dest. gewaschen (5 sec). Darauf folgte ein fünfminütiger Waschschrift in A. dest. und drei weitere Waschriffe (5 sec) mit A. dest.. Im Anschluss an eine fünfminütige Inkubation in 50 % (v/v) Aceton wurden die Gele für eine Minute in Na₂S₂O₃-Lösung (0,02 % (w/v)) überführt. Vor der Färbung erfolgten drei weitere Waschriffe (5 sec) in A. dest., dann wurden die Gele acht Minuten in Färbelösung inkubiert. Nach erneutem zweimaligen Spülen (5 sec) mit A. dest. folgte die Entwicklung in Entwicklerlösung. Sobald die Banden in der gewünschten Stärke sichtbar waren, wurde die Entwicklung mit 1 % (v/v) Essigsäure gestoppt.

Fixierlösung:	50 % (v/v) Aceton, 1,25 % (w/v) TCA, 0,0154 % (v/v) Formaldehyd
Färbelösung:	0,27 % (w/v) AgNO ₃ , 3,7 % (v/v) Formaldehyd
Entwicklerlösung:	0,004 % (w/v) Na ₂ S ₂ O ₃ , 1,6 % (w/v) Na ₂ CO ₃ , 0,0154 % (v/v) Formaldehyd

2.2.4. Isolierung von Muropeptiden

2.2.4.1. Präparation eines „Hot water Extraktes“ (verändert nach JACOBS *et al.*, 1994)

Muropeptide wurden aus *E. coli* JRG582 isoliert. Diese Amp^D-Mutante reichert Anhydromuramylpeptide an, da keine Amidaseaktivität mehr vorhanden ist.

0,2 – 2 l M9-Medium wurden mit einer *E. coli* JRG582 Übernachtskultur 1:100 angeimpft und bis zu einer OD₅₄₆ von 0,5- 0,6 im Inkubationsschüttler bei 37 °C bebrütet. Zur Isolation von ³H-markierten Murein-Metaboliten wurde das Medium mit 15 µCi ³H-Diaminopimelinsäure supplementiert.

Die Bakterien wurden durch Zentrifugation (4000g, 4 °C, 15 min) geerntet und mit 1 Volumen 0,01 M Tris-HCl pH 8,0 gewaschen. Das Zellpellet wurde in 5 – 20 ml eiskaltem A. dest. resuspendiert und sofort in 20 ml kochendes Wasser pipettiert. Nach 20minütigem Kochen wurde das unlösliche Zellmaterial abzentrifugiert (12.000g, RT, 15 min). Zur Fällung von Proteinen wurde zum Überstand ein gleiches Volumen Methanol gegeben und die Probe 10 Minuten auf Eis inkubiert. Proteinpräzipitate wurden abzentrifugiert (12.000g, RT, 15 min) und der Überstand auf 0,52 – 5,2 ml eingengt. Durch Zugabe von Phosphorsäure wurde der pH-Wert der Probe auf etwa pH 3 eingestellt. Weitere Präzipitate wurden erneut durch Zentrifugation entfernt (12.000g, RT, 15 min). Die Probe konnte bis zur weiteren Aufarbeitung bei –20 °C gelagert werden.

2.2.4.2. Auftrennung von löslichen Zellbestandteilen mittels HPLC

Die mit dem „Hot Water Extrakt“ isolierten löslichen Zellbestandteile wurden chromatographisch aufgetrennt. Die Trennung erfolgte dabei auf der von GLAUNER entwickelten Methode (GLAUNER *et al.*, 1988). Zum Einsatz kam ein HPLC-System mit einer C18 Hypersil ODS Säule (3µm, Bischoff, Leonberg) und einem zweiphasigen Natriumphosphatpuffer-Gradienten. Bei einer Fließgeschwindigkeit von 0,5 ml/min wurde der Anteil von Puffer B in 45 Minuten von 0 auf 32 %, und in weiteren 35 Minuten von 35 auf 58 % gesteigert. Für die Isolierung des Anhydromuramyl-Tripeptids wurde die Säule auf 38,5 °C temperiert, für das Anhydromuramyl-Pentapeptid auf 32,5 °C. Die Muropeptid-Fractionen wurden aufgefangen und lyophilisiert. Sollte das Eluat im Flüssigkeitsszintillationsspektrometer vermessen werden (siehe Kap. 2.2.4.5.) wurden Fractionen à 30 Sekunden aufgefangen.

Puffer A: 0,05 M Na-Phosphat, pH 4,31

Puffer B: 0,075 M Na-Phosphat, pH 4,95, 15 % Methanol

2.2.4.3. Entsalzung von Muropeptiden mittels HPLC

Bevor die lyophilisierten Muropeptide in weitere Untersuchungen eingesetzt wurden, fand eine Entsalzung mittels HPLC statt. Dazu wurde ein Wasser/Acetonitril-Gradient benutzt, der in 60 Minuten von 0 auf 20 % Acetonitril anstieg. Beiden Laufmitteln war 0,05 % TFA zugesetzt. Die Muropeptide wurden in H₂O/TFA aufgenommen und auf die Säule aufgetragen. Die Muropeptid-Fractionen wurden aufgefangen, lyophilisiert und bei -20 °C gelagert.

2.2.4.4. Massenspektrometrische Analyse der isolierten Muropeptide

Isolierte Muropeptide wurden zusätzlich einer massenspektrometrischen Analyse unterzogen, um sicherzustellen, dass es sich um die gewünschten Moleküle handelt. Die Messung des aM-Tripeptids wurde in der chemischen Analytik der Universität Bonn (Dr. Eckert) durchgeführt. Das aM-Pentapeptid wurde im Institut für Hygiene und öffentlichen Gesundheit (Dirk Skutlarek, Abt. Wasserhygiene) überprüft. Die Konzentrationen der isolierten Muropeptide konnten aufgrund fehlender Standards nicht genau ermittelt werden. Anhand der Substanz β -Alanyl-Alanin konnten sie aber durch Vergleich der HPLC-Peakflächen abgeschätzt werden.

2.2.4.5. Analyse von ³H-markierten Muropeptiden im Flüssigkeitsszintillationsspektrometer

Zur Bestimmung der Radioaktivität der HPLC-Fractionen wurden 50 – 100 μ l der jeweiligen Fractionen mit 9 Volumina Szintillationscocktail (Optiphase HiSafe 3, Perkin Elmer, Rodgau-Jügesheim) versetzt und in einem Flüssigkeitsszintillationsspektrometer (Wallac, Turku, Finnland) vermessen.

2.2.5. Untersuchungen zur β -Laktamase-Expression

2.2.5.1. Expressionsstudien mittels RT-PCR

2.2.5.1.1. Synthese von mRNA durch *In-vitro* Transkription

Mit Hilfe des gereinigten AmpR-Proteins sollte die Wirkung unterschiedlicher Liganden auf die Expression der β -Laktamase *in-vitro* untersucht werden. Möglich wurde dies durch eine

In-vitro Transkription in der alle notwendigen Komponenten zur mRNA-Synthese vorhanden sind. Mit Ausnahme des AmpR-Proteins, der Muropeptid-Liganden und der DNA-Matrize konnten diese Komponenten käuflich erworben werden. Ein Standard-*In-vitro*-Transkriptionsansatz setzte sich aus folgenden Bestandteilen zusammen:

Transkriptionspuffer (s.u.) in einfacher Endkonzentration, 3 nM DNA-Matrize (lineares Fragment, das für *ampC*, *ampR* sowie die intercistronische Region kodiert und aus pNU305 amplifiziert wurde oder pNU305 selbst), unterschiedliche Konzentrationen von AmpR und Mureinmetaboliten, 1 U *E. coli* RNA Polymerase (Amersham Biosciences, Freiburg), 0,35 mM NTP-Mix, 0,25 U RNase Inhibitor (RNAguard Porcine, Amersham Biosciences, Freiburg) und A. dest. bis zu einem Reaktionsvolumen von 15 µl.

Die Transkription erfolgte bei 37 °C für 10 Minuten. Anschließend wurde die RNA mittels eines RNA-Isolations-Kits (NucleoSpin RNA II, Macherey-Nagel, Düren) gereinigt.

Nach Zugabe von 0,25 U RNase Inhibitor und 40 U DNase I (Amersham Biosciences, Freiburg) wurden die RNA zum Abbau der DNA-Matrize für zwei Stunden bei 37 °C inkubiert. Nach erneuter Reinigung mit Hilfe des Isolations-Kits war die RNA für weitere Versuche bereit. Zur Lagerung wurde die erhaltene RNA bei -70 °C eingefroren.

Sollte die RNA mittels Real-Time RT-PCR quantifiziert werden, wurden der DNA-Matrize vor der *In-vitro* Transkription pro Reaktionsansatz 5 pg Luciferase-RNA (Luciferase Control RNA, Promega, Mannheim) beigemischt. Die Luciferase-RNA konnte dann als externe Referenz bei der Real-Time RT-PCR verwendet werden (RODRIGUEZ-ANTONA *et al.*, 2000).

5x Transkriptionspuffer: 200 mM Tris/HCl pH 8,0, 0,75 M KCl, 5 mM DTT, 40 mM MgCl₂

2.2.5.1.2. Amplifikation von mRNA mittels RT-PCR

Zur Amplifikation und qualitativen Quantifizierung von synthetisierter RNA wurde eine Kombination aus Reverser Transkription und Polymerase-Kettenreaktion in einem Ein-Schritt-Verfahren angewandt. Die Reaktion basiert auf dem „One-Step RT-PCR Kit“ der Firma Qiagen (Hilden). Anfangs wird durch eine Reverse Transkriptase die mRNA in cDNA transkribiert. Die ebenfalls im Reaktionsansatz enthaltene DNA-Polymerase ist inaktiv, da ihr aktives Zentrum durch einen Antikörper blockiert ist, der erst durch Erhitzen denaturiert werden muss. An die Reverse Transkription schließt sich daher ein längerer Schritt bei hoher Temperatur (95 °C) an, in dem sowohl die DNA-Polymerase aktiviert als auch die Reverse

Transkriptase zerstört wird. Anschließend folgt eine herkömmliche PCR in der die erhaltene cDNA amplifiziert wird.

Zusätzlich zu den Komponenten des Kits werden die mRNA und spezifische Primer benötigt. In einem 50 µl-Ansatz wurden 14 µl der RNA aus *In-vitro* Transkriptionsreaktionen (siehe Kapitel 2.2.2.7.) eingesetzt. Die für die jeweiligen Gene spezifischen Primer wurden in einer Endkonzentration von 0,6 µM zugegeben. Für das *ampC*-Gen waren dies die Primer IVT-AmpC-5 und IVT-AmpC-3a, für das *ampR*-Gen die Primer IVT-AmpR-5 und IVT-AmpR-3a und für das *tet*-Gen IVT-Tet-5 und IVT-Tet-3a. Die Reverse Transkription wurde 40 Minuten bei 50 °C durchgeführt, ansonsten erfolgte die Amplifikation gemäß den Angaben des Herstellers. Aliquots der einzelnen Reaktionsansätze wurden anschließend mittels Agarose-Gelelektrophorese begutachtet und dokumentiert.

2.2.5.2. Expressionsstudien mittels Real-Time RT-PCR

Die Real-Time PCR ist eine Weiterentwicklung der herkömmlichen Polymerase-Kettenreaktion, die im Wesentlichen auf Higuchi zurückzuführen ist (HIGUCHI *et al.*, 1992; HIGUCHI *et al.*, 1993). Durch Zugabe eines Fluoreszenz-Farbstoffes, der in doppelsträngige DNA interkaliert, wird während der PCR die Amplifikation verfolgt. Meist kommt dabei als Fluorophor SYBR-Green I (Molecular Probes, Portland, Oregon, USA) zum Einsatz, das je nach System mit Halogen-, LED-, oder Laserlicht angeregt wird.

Die Quantifizierung der Produkte basiert auf der Berechnung eines Fluoreszenz-Schwellenwertes c_T (Threshold Cycle). In diesem Zyklus übersteigt die gemessene Fluoreszenz erstmals signifikant die Hintergrundfluoreszenz. Der c_T -Wert muß im exponentiellen Bereich der PCR liegen, da die Quantifizierung auf der Kinetik der Reaktion beruht.

Je nach Versuchsaufbau lässt sich eine absolute oder eine relative Aussage über die Template-Menge treffen. Durch PCR-Läufe mit bekannten Ausgangs-DNA-Mengen lässt sich mit Hilfe der resultierenden c_T -Werte eine Standardkurve erstellen, anhand derer eine unbekannte Template-Menge durch ihren c_T -Wert absolut quantifiziert werden kann. Für eine relative Aussage werden die erhaltenen c_T -Werte über $n=2^{-c_T}$ in relative Template-Mengen umgerechnet, auf das Referenzgen normalisiert und zueinander in Bezug gesetzt.

Die Synthese der mRNA erfolgte wie in Kapitel 2.2.5.1.1. beschrieben. Die Reverse Transkription und die Polymerase-Kettenreaktion wurden analog zu Kapitel 2.2.5.1.2. in einem Einschnitt-Verfahren durchgeführt. Basierend auf dem „Quantitect SYBR Green RT-PCR

Kit“ (Qiagen, Hilden) wurden 20 μ l Reaktionen angesetzt, denen 4 μ l RNA und die genspezifischen Primer (Endkonzentration 0,5 μ M) beigelegt wurde. Zum Einsatz kamen dabei die Primer RealTimeAmpC5 und RealTimeAmpC3 bzw. RealTimeAmpR5 und RealTimeAmpR3 bzw. RealTimeLuc5 und RealTimeLuc3.

Die Messungen wurden auf einem iCycler iQ Real-Time System (Biorad, München) durchgeführt. Zur Kalibrierung des Systems wurden jedem RT-PCR-Ansatz 1 nM Fluorescein (Biorad, München) zugegeben.

Die Reverse Transkription erfolgte für 30 Minuten bei 50 °C, im Anschluss daran wurden die Proben für 15 Minuten auf 95 °C erhitzt. Zur Amplifikation der cDNA wurde eine 40 Zyklen lange Polymerase-Kettenreaktion durchgeführt (Denaturierung: 94 °C, 30 sec, Annealing: 55 °C, 30 sec, Elongation: 72 °C, 30 sec). Am Ende einer jeden Elongationsphase erfolgte die Fluoreszenzmessung. Nach Abkühlung auf 4 °C wurde eine Schmelzkurvenmessung durchgeführt, um die Spezifität der Amplifikate sicherzustellen. Dafür wurde die Temperatur (ausgehend von 50 °C bis zu 90 °C) schrittweise alle 10 Sekunden um 0,5 °C erhöht und die Fluoreszenz gemessen.

Die Auswertung wurde mit der iCycler iQ Software (Biorad, München) vorgenommen, die für jeden Reaktionsansatz den zugehörigen c_T -Wert lieferte.

2.2.5.3. Durchführung von *In-vivo* Expressionsstudien

Zur Messung der β -Laktamase-Expression in lebenden Zellen wurde eine *E. coli*-Übernachtskultur 1:75 in M9-Medium verdünnt. Die benutzten *E. coli*-Stämme wurden vorher mit dem Plasmid pNU305 bzw. pBP131 transformiert, um ein induzierbares *ampC/ampR*-Operon zu erhalten. Die Induktion mit Imipenem bzw. den gereinigten Liganden erfolgte bei einer OD_{595} von ca. 0,5 für drei Minuten. Die Zellen wurden durch einminütiges Zentrifugieren (12.000g, RT) geerntet und die RNA mit Hilfe des RNAII-Kits (Macherey&Nagel, Düren) isoliert. Durch Zugabe von 0,25 U RNase Inhibitor und 40 U DNase I (Amersham Biosciences, Freiburg) und Inkubation für zwei Stunden (37 °C) wurde eventuell verbleibende genomische DNA abgebaut. Die RNA wurde anschließend für 10 Minuten auf 70 °C erhitzt um die DNase zu inaktivieren.

Die Konzentration der erhaltenen RNA wurde spektrophotometrisch bei einer Wellenlänge von $\lambda = 260$ nm bestimmt. Die mRNA-Menge, die für die β -Laktamase kodiert, wurde mittels Real-Time RT-PCR bestimmt. Die Anwendung erfolgte dabei analog zu Kapitel 2.2.5.2., wobei 2 – 4 ng RNA und genspezifische Primer (RealTimeAmpC5, RealTimeAmpC3, RealTi-

meEcAmpC5, RealTimeEcAmpC3) eingesetzt wurden. Zur Normalisierung wurde außerdem die mRNA-Menge des *E. coli* Enzyms Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase bestimmt (FITZMAURICE *et al.*, 2004). Dazu wurden die spezifischen Primer RealTimeGap5 und RealTimeGap3 eingesetzt.

2.2.6. Kristallisation von AmpR

Kristallisationsversuche des AmpR-Proteins wurden in Zusammenarbeit mit Dr. Paulette Charlier, Laboratoire de Cristallographie des Protéines, Universität Liège (Belgien) durchgeführt. Die Versuche mit dem gereinigten AmpR- bzw. NusA/AmpR-Protein wurden nach der Hanging-Drop-Methode durchgeführt. Es wurden verschiedene Kristallisationsbedingungen getestet, wobei folgende kommerzielle Kits zum Einsatz kamen: Grid Screen Ammonium Sulphate, Grid Screen PEG 6000, Grid Screen PEG 6000 / LiCl, Grid Screen Sodium Malonate, Crystal Screen I und II (alle von Hampton Research, Aliso Viejo, USA) und Wizard I und II (Emerald Biostructure, Reykjavik, Island).

Für jede Bedingung wurde 1 µl Proteinlösung (1 mg/ml für AmpR, 8,8 mg/ml für NusA/AmpR) mit dem vorgegebenen Reagenz gemischt und bei 20 °C inkubiert. Die Proben wurden vor der Inkubation, während der ersten Woche täglich und anschließend einmal pro Woche auf Kristallbildung hin mikroskopiert.

3. Ergebnisse

Für einen Transkriptionsassay und für Kristallisationsexperimente waren große Mengen reines AmpR-Protein nötig. In früheren Arbeiten wurde bereits versucht, AmpR aus *Enterobacter cloacae* als Fusionsprotein mit N-terminalem His-Tag zu exprimieren und zu reinigen (WIEGAND, 2001). Es konnte allerdings kein aktives Protein gewonnen werden. Auch eine N-terminale Fusion des Maltose-Binde-Proteins mit dem His-AmpR-Konstrukt brachte nicht den gewünschten Erfolg (WIEGAND, 2001).

Bereits 1993 versuchten BISHOP UND WEINER aktives AmpR-Protein aus *C. freundii* und *E. cloacae* durch Expression in *E. coli* zu gewinnen. Dies gelang allerdings nur mit dem Protein aus *C. freundii* (BISHOP UND WEINER, 1993).

3.1. Expression und Reinigung verschiedener Varianten des AmpR-Proteins

In der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene Strategien ausgewählt um aktives AmpR-Protein zu erhalten. Einerseits waren dies zwei weitere Konstrukte des Proteins aus *E. cloacae*, andererseits wurde, aufgrund der Ergebnisse von BISHOP UND WEINER (1993), auch die Möglichkeit *C. freundii*-AmpR zu exprimieren, aufgegriffen.

Da der N-Terminus des AmpR-Proteins durch das Helix-Turn-Helix-Motiv für die DNA-Bindung verantwortlich ist, wurde bzgl. *E. cloacae* ein Konstrukt aus *ampR* und einem C-terminalen His-Tag kloniert und exprimiert. Außerdem wurde versucht, das AmpR-Protein aus *E. cloacae* ohne Fusionsanteile zu exprimieren und zu reinigen. Dies geschah unter, im Vergleich mit BISHOP UND WEINER (1993), veränderten Bedingungen. Beide Varianten wurden als unlösliche Inclusion Bodies exprimiert. Eine Solubilisierung mit anschließender Renaturierung war nicht möglich.

Eine Expression und Reinigung des Proteins aus *Citrobacter freundii* (CfAmpR) wurde sowohl mit N-terminaler als auch mit C-terminaler His-Tag-Fusion versucht. Die His-Tag-Anteile sollten die Reinigung des Proteins erleichtern. Auch hier wurden beide Varianten als unlösliche Inclusion Bodies exprimiert. AmpR mit N-terminaler Fusion ließ sich nach der Solubilisierung nicht renaturieren. Wurde das His-Tag C-terminal fusioniert, konnte das Protein nach Solubilisierung in nicht-denaturierende Pufferlösungen dialysiert werden. In Gel-Shift-Experimenten zeigte CfAmpR/His allerdings keine DNA-Binde-Aktivität.

3.1.1. Expression und Reinigung des AmpR-Proteins aus *C. freundii*

In den letzten Jahren arbeiteten bereits mehrere Arbeitsgruppen erfolgreich mit dem AmpR-Protein aus *Citrobacter freundii* (BISHOP UND WEINER, 1993; JACOBS *et al.*, 1997; ROH *et al.*, 1996). Daher wurde auch in dieser Arbeit versucht, das Protein ohne Fusionsanteile zu verwenden.

Der heterologe Wirt *E. coli* BL21(DE3)pLysS wurde dazu mit dem Plasmid pJFCfAmpR transformiert. Die Expression wurde mit IPTG ausgelöst und ergab im induzierten Zellextrakt eine deutlich sichtbare Bande bei etwa 32 kDa, was auch mit dem für AmpR errechneten Molekulargewicht von 32,6 kDa gut übereinstimmt (siehe Abb. 11). Nach dem Zellaufschluß wurde die lösliche Fraktion ebenfalls auf einem Polyacrylamid-Gel analysiert, enthielt jedoch keine signifikante Bande in derselben Höhe (siehe Abb. 11).

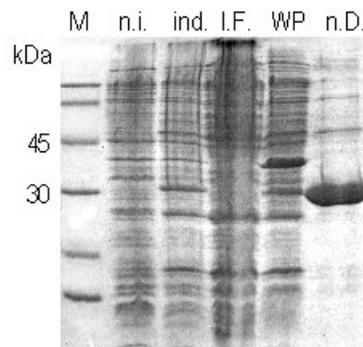


Abbildung 11: Expression von CfAmpR (SDS-PAGE). M: Marker, n.i.: Zellextrakt nicht induziert, ind.: Zellextrakt induziert, I.F.: lösliche Fraktion, WP: Inclusion-Body-Waschpuffer, n.D.: nach Dialyse in Harnstoff-Lyse-Puffer.

Die unlöslichen Zellbestandteile befanden sich nach dem Zellaufschluß und Zentrifugation in einem Pellet und wurden mit Inclusion-Body-Waschpuffer gewaschen. Der Überstand dieses Schrittes ist ebenfalls in Abb. 11 zu sehen. Er enthält auch eine gut sichtbare Bande bei etwa 32 kDa. Das Pellet wurde nach dem Waschschrift in Solubilisierungspuffer aufgenommen. Da dieser Puffer Guanidinium-Hydrochlorid enthält, konnte die Proteinlösung nicht auf ein Polyacrylamid-Gel aufgetragen werden. Es wurde aber davon ausgegangen, dass sich das überexprimierte Protein darin befindet. Aufgrund der starken Aufkonzentrierung hätte sonst in dem Wasch-Überstand eine deutlich stärkere Bande sein müssen.

Die Proteinlösung wurde dann gegen Harnstoff-Lyse-Puffer dialysiert. Man geht davon aus, dass sich in diesem Puffer bereits stabile Sekundärstrukturen ausbilden können. Während der

Dialyse wurde die Lösung leicht milchig, es entstanden aber keine größeren Präzipitate. Nach Zentrifugation wurde der Überstand mittels SDS-PAGE analysiert und zeigt deutlich eine dicke Bande in der gesuchten Größe (siehe Abb. 11).

Zur Reinigung des Proteins mittels Affinitätschromatographie wurde eine AmpR-spezifische DNA-Säule entwickelt (siehe Kap. 2.2.3.9.1.). Um an die Säule binden zu können, musste das Protein vollständig renaturiert werden. Außerdem durfte der Salzgehalt der Pufferlösung nur bei etwa 50 mM liegen, da höhere Konzentrationen die DNA-Bindung beeinträchtigten. Die Proteinlösung wurde daher gegen Bindepuffer mit 50 mM NaCl dialysiert. Schon kurz nach Beginn der Dialyse bildeten sich Präzipitate. Bei langen Dialysezeiten (10 – 12h) war das gesuchte Protein vollständig im Präzipitat zu finden. Es stellte sich heraus, dass nach einer Dialysezeit von 3 – 4 Stunden ein Großteil des AmpR-Proteins bereits renaturiert, aber auch noch in Lösung war. Der Überstand des zentrifugierten Dialysats wurde auf die DNA-Säule aufgetragen. Nach mehreren Waschschrritten wurde das gebundene Protein durch Erhöhen der NaCl-Konzentration eluiert. Aliquots sämtlicher Schritte wurden auf einem Polyacrylamid-Gel hinsichtlich ihres Proteingehalts analysiert (siehe Abb. 12).

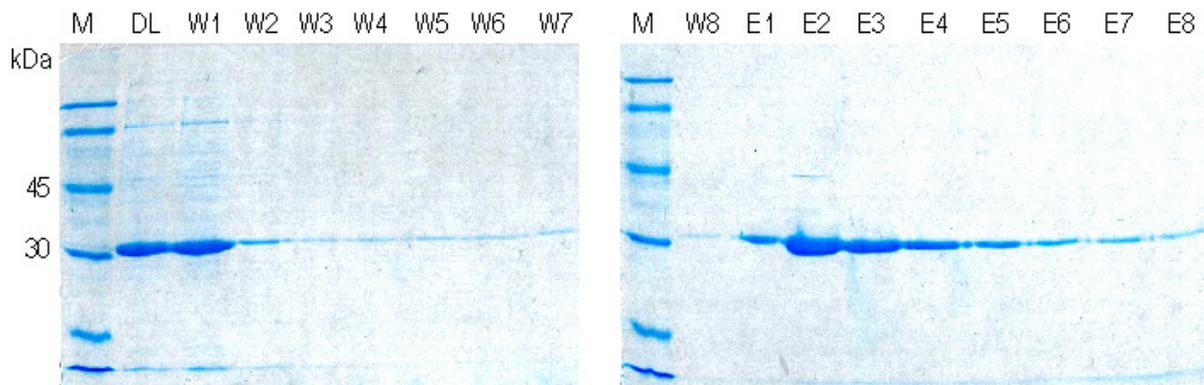


Abbildung 12: Reinigung von CfAmpR mittels DNA-Affinitätschromatographie (SDS-PAGE). M: Marker, DL: Durchlauf, W1-W8: Waschrinne 1-8; E1-E8: Elutionsschritte 1-8.

In allen Eluat-Fractionen ist bei ca. 32 kDa eine AmpR-Bande zu sehen. Die Fraktion, die am meisten AmpR enthält, ist durch ein zusätzliches Protein von ungefähr 44 kDa verunreinigt. Aufgrund einer zu geringen Säulenkapazität befindet sich auch im Durchlauf und in der ersten Waschfraktion verhältnismäßig viel AmpR-Protein. Da die Kosten der DNA-Synthese für die Säule sehr hoch sind, konnte die Kapazität nicht erhöht werden. Durch verbesserte Reini-

gungsmethoden wurde versucht, das Problem der Verunreinigungen und der geringen Protein-Menge zu lösen.

Eine größere Proteinmenge konnte mittels Heparin-Affinitätschromatographie gereinigt werden. Die fertig gelieferten Heparin-Agarose-Säulen besaßen ein Vielfaches der Kapazität der DNA-Säule. Außerdem gelang es durch Absenken des pH-Wertes die Bindung des Proteins an das Säulenmaterial zu verbessern. Obwohl AmpR dadurch in Bindepuffer mit 150 mM NaCl dialysiert werden konnte, durfte die Dialysezeit von 3 – 4 Stunden nicht überschritten werden. Die Reinigung von AmpR mit Hilfe einer Heparin-Säule ist in Abbildung 13 dargestellt.

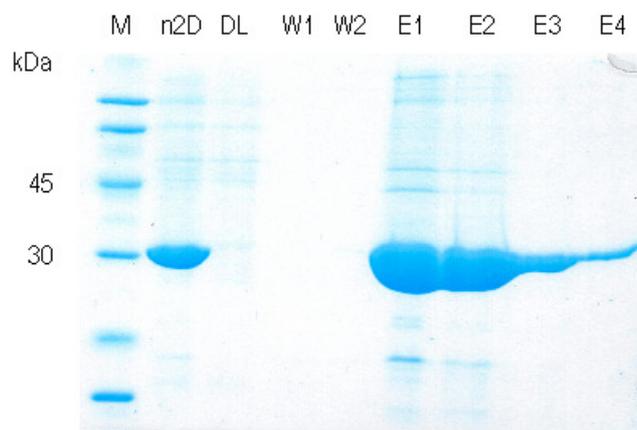


Abbildung 13: Reinigung von CfAmpR mittels Heparin-Affinitätschromatographie (SDS-PAGE). M: Marker, n2D: Protein nach Dialyse in Bindepuffer, DL: Durchlauf, W1/W2: Waschschritte 1+2, E1-E4: Elutionsschritte 1-4.

Im Durchlauf und den Waschschritten ist kein AmpR sichtbar. Das Protein konnte also vollständig an die Säule binden. Das Eluat enthielt große Mengen an AmpR-Protein, aber auch noch mindestens fünf weitere gut sichtbare Proteinbanden.

Um das Protein weiter aufzureinigen wurde zusätzlich eine Gelfiltration durchgeführt. Aufgrund der Instabilität von AmpR konnte diese aber nur im denaturierten Zustand des Proteins angewandt werden. Die Proteinlösung wurde deshalb nach Dialyse in Harnstoff-Lyse-Puffer auf die Gelfiltrationssäule aufgetragen. Anschließend wurden die AmpR-haltigen Fraktionen vereinigt und gegen Bindepuffer dialysiert. Danach erfolgte eine Heparin-

Affinitätschromatographie. Abbildung 14 zeigt das Protein in den einzelnen Schritten der Reinigungsprozedur.

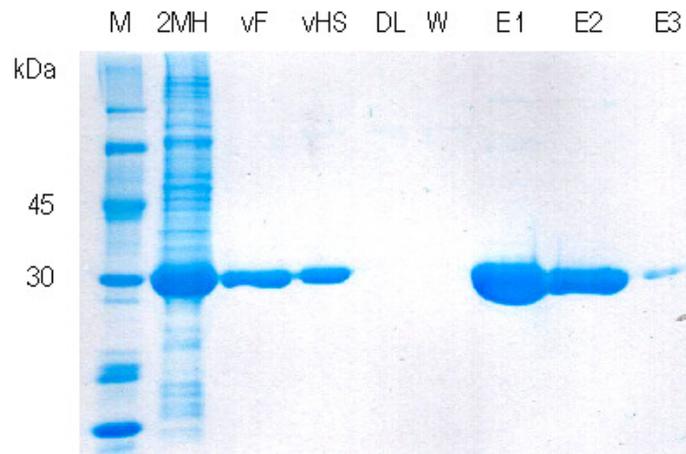


Abbildung 14: Reinigung von CfAmpR mittels Gelfiltration/Heparinsäule (SDS-PAGE). M: Marker, 2MH: Protein nach Dialyse in Harnstoff-Lyse-Puffer, vF: vereinigte Fraktion nach der Gelfiltration, vHS: Protein nach Dialyse in Bindepuffer, DL: Durchlauf, W: Waschschrift, E1-E3: Elutionsschritte 1-3.

Durch die Kombination beider Reinigungsmethoden konnten große Mengen an reinem Protein isoliert werden (siehe Abb. 14, Spur E1-E3). Die Reinheit des AmpR-Proteins wurde mittels MALDI-MS überprüft (siehe Abb. 15). Dieser Versuch wurde von der stiftung caesar, Bonn, durchgeführt.

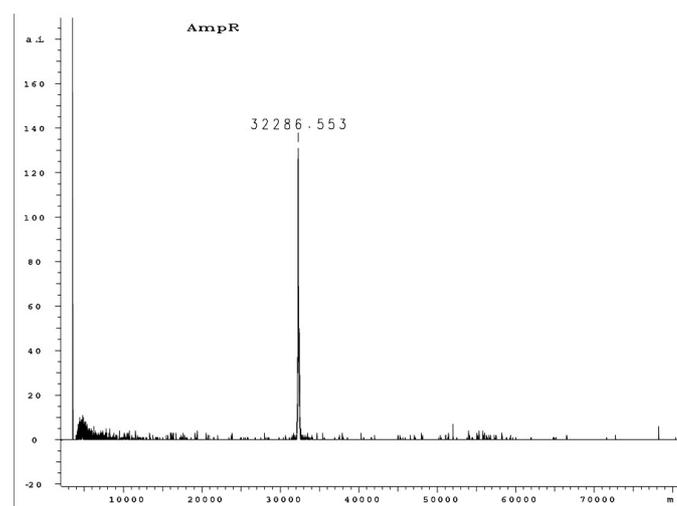


Abbildung 15: MALDI-MS von CfAmpR.

Das Massenspektrogramm zeigt einen Hauptpeak bei 32287 Dalton. Dies entspricht auch etwa der Masse von AmpR. Sonst wurden keine signifikanten Peaks detektiert. Daher konnte

davon ausgegangen werden, dass die Reinheit des Proteins ausreichend für die geplanten Anwendungen (Transkriptionsassay, Kristallisation) war.

Um die Aktivität des gereinigten AmpR-Proteins zu überprüfen wurden Gelshift-Versuche durchgeführt. Dazu wurden unterschiedliche Mengen an AmpR mit einem 80bp-DNA-Fragment der AmpR-Binderegion inkubiert und auf TBE-Acrylamid-Gel aufgetragen (siehe Abb. 16).

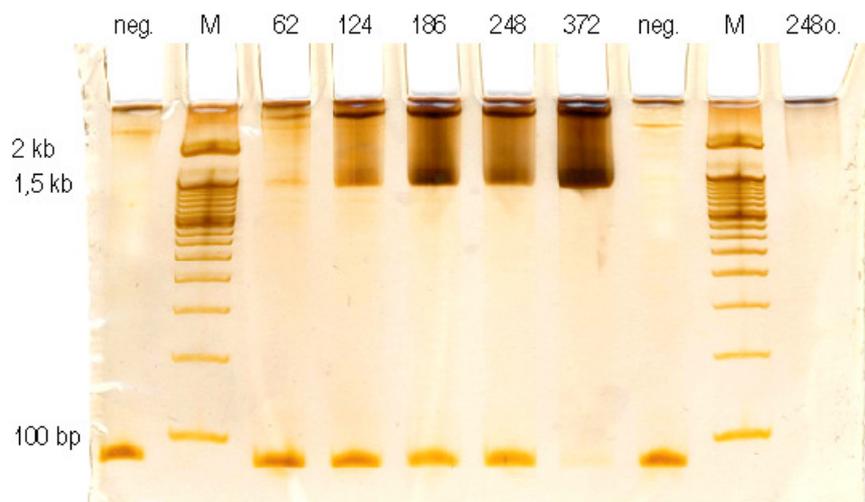


Abbildung 16: Gelshift mit CfAmpR. neg.: ~ 150 ng DNA, M: Marker, 62-372: ~ 150 ng DNA + AmpR (Menge in ng), 248o.: 248 ng AmpR ohne DNA.

Spuren, die DNA und Protein enthalten, zeigen zwei deutlich sichtbare Banden, die in den DNA-Spuren (Abb. 16, Spuren 'neg.') fehlen. Die DNA-Spuren weisen nur das 80 bp-Fragment und eine weitere Bande (>2kb) auf. Diese Bande wird durch das Plasmid, das als Template in der PCR (Amplifikation des 80 bp-Fragments) diente, verursacht. In den Spuren mit DNA und Protein wird die Bande bei ca. 1,5 kb durch einen Shift des 80 bp-Fragments bewirkt. Die zweite zusätzliche Bande, die deutlich größer als 2 kb ist, entstand durch den Shift des Template-Plasmids. Das exprimierte und gereinigte AmpR-Protein war also in der Lage an die DNA zu binden.

3.1.2. Expression und Reinigung eines NusA/AmpR-Fusionsproteins

Das NusA-Protein ist ein Transkriptionsfaktor aus *E. coli*. Berechnungen zufolge besitzt es bei einer Überexpression ein sehr hohes Löslichkeitspotential (DAVIS *et al.*, 1999). Dies kann sich auch auf andere Proteine auswirken, die C-terminal an NusA fusioniert sind. Da bisher

nur unlöslich exprimiertes AmpR gereinigt werden konnte, wurde ein NusA/AmpR-Fusionsprotein kloniert. Dies sollte eine native Reinigung ermöglichen und gegebenenfalls in Kristallisationsexperimente eingesetzt werden, da die dreidimensionale Struktur von NusA bereits bekannt ist.

Um die Reinigung des Fusionsproteins zu erleichtern wurde ein His-Tag eingefügt. Eine Thrombin-Protease-Schnittstelle sollte die Abspaltung des AmpR-Proteins ermöglichen. Eine schematische Darstellung des Proteins zeigt Abbildung 17.



Abbildung 17: Schematische Darstellung des NusA/AmpR-Fusionsproteins.

Das Fusionsprotein wurde in *E. coli* C41(DE3) exprimiert. Zellextrakte vor und nach Induktion wurden auf einem Polyacrylamid-Gel analysiert (siehe Abb. 18). Der induzierte Zellextrakt zeigt eine deutlich sichtbare zusätzliche Bande, die der erwarteten Größe von 94,3 kDa in etwa entspricht.

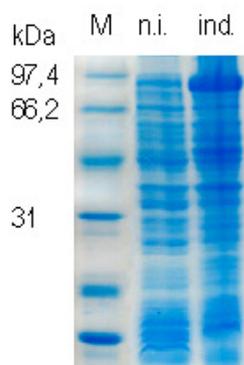


Abbildung 18: Überexpression von NusA/AmpR (SDS-PAGE). M: Marker, n.i.: Zellextrakt nicht induziert, ind.: Zellextrakt induziert.

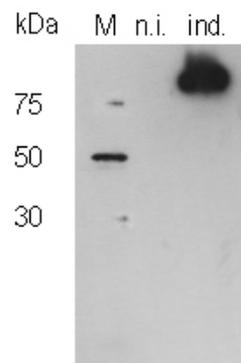


Abbildung 19: His-Tag-Nachweis von NusA-AmpR (Western Blot). M: Marker, n.i.: Zellextrakt nicht induziert, ind.: Zellextrakt induziert.

Zum Nachweis des His-Tags wurde ein Western-Blot angefertigt. Nach Detektion ist auf dem Röntgenfilm ungefähr in gleicher Höhe eine entsprechende Bande zu sehen (siehe Abb. 19). Die Expression des gesamten Konstrukts war also erfolgreich.

Nach einer Löslichkeitsbestimmung sollte das Fusionsprotein mittels Metallchelataffinitätschromatographie gereinigt werden. Aliquots sämtlicher Schritte wurden auf einem Polyacrylamid-Gel analysiert (siehe Abb. 20).

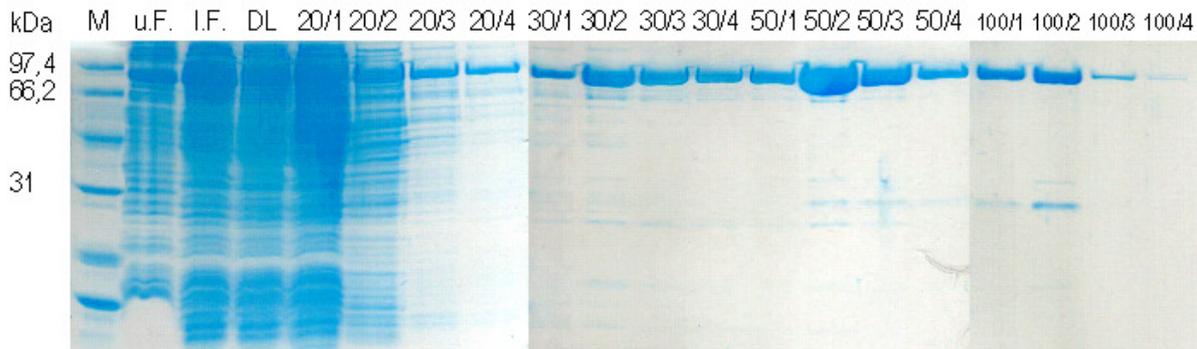


Abbildung 20: Löslichkeitsbestimmung und Reinigung von NusA/AmpR (SDS-PAGE). M: Marker, u.F.: unlösliche Fraktion, I.F.: lösliche Fraktion, 20/1-20/4: Waschschrte 1-4 (20 mM Imidazol), 30/1-30/4: Waschschrte 1-4 (30 mM Imidazol), 50/1-100/4: Elutionsschrte (50 und 100 mM Imidazol).

Sowohl die lösliche Fraktion als auch die unlösliche Fraktion enthielten das exprimierte Fusionsprotein. Die lösliche Fraktion wurde auf eine Ni-NTA-Säule aufgetragen und durch eine Erhöhung der Imidazol-Konzentration eluiert. Sämtliche Fraktionen der Reinigung weisen das NusA/AmpR-Protein auf. Zur Verbesserung der Reinheit des Proteins wurde im Anschluß an die Affinitätschromatographie eine Gelfiltration durchgeführt (siehe Abb. 21).

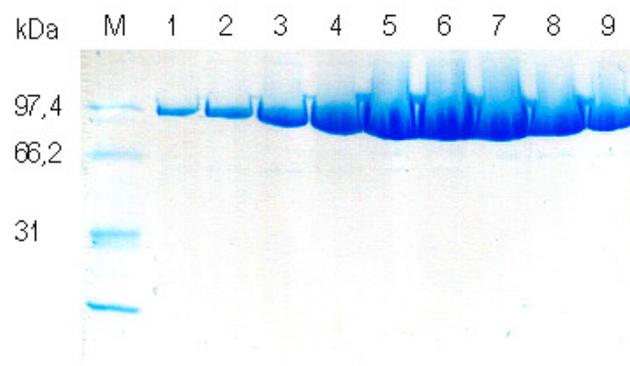


Abbildung 21: Gelfiltration von NusA/AmpR (SDS-PAGE). M: Marker, 1-9: Fraktionen aus der Gelfiltration.

Die Reinheit konnte durch die Größenausschlusschromatographie deutlich verbessert werden. Zur Abspaltung des AmpR-Proteins wurde das gereinigte Protein mit Thrombin-Protease be-

handelt. Der Spaltungsansatz wurde auf einem Polyacrylamid-Gel überprüft und zeigt zwei Banden mit Molekulargewichten von ungefähr 32 und 60 kDa (siehe Abb. 22). Dies korrespondiert mit der theoretischen Masse von AmpR (32,6 kDa) und NusA/His (61,7 kDa).

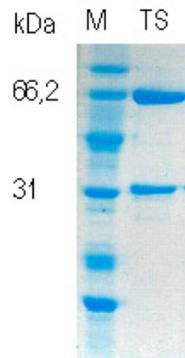


Abbildung 22: Thrombinspaltung des Fusionsproteins NusA/AmpR (SDS-PAGE). M: Marker, TS: Spaltansatz.

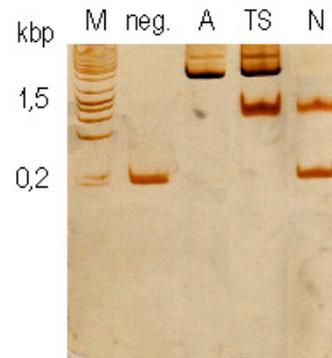


Abbildung 23: Gelshift (TBE-Acrylamid-Gel). M: Marker, neg.: ~ 100 ng DNA, A: DNA + AmpR, TS: DNA + Spaltansatz, N: DNA + NusA/His.

Die DNA-Bindeaktivität des gespaltenen Fusionsproteins wurde mittels Bandshift-Assay überprüft. Nach Inkubation des Spaltansatzes mit spezifischer DNA, sind auf dem TBE-Gel zwei unterschiedlich hohe Banden zu sehen (siehe Abb. 23). Die obere Bande entspricht dabei dem Shift, der von AmpR allein verursacht wird. Die untere Bande entsteht durch die Retardierung des DNA-Fragments durch NusA/His. Dies wurde überprüft indem NusA/His isoliert und allein mit DNA inkubiert wurde (siehe Abb. 23). Von NusA abgespaltenes AmpR besitzt also die gleiche Bindeaktivität wie renaturiertes AmpR-Protein.

3.2. Isolation von Muropeptiden mittels HPLC

Zur Durchführung von Bindungsstudien mußten die potentiell aktivierenden Liganden (aM-Tripeptid und aM-Pentapeptid) aus *E. coli* isoliert und gereinigt werden. Beide Moleküle konnten bereits früher gewonnen werden (PFEIFLE, 1999). Aufgrund der Tritium-Markierung war das allerdings nur in geringen Mengen möglich. Für die Durchführung des Transkriptionssassays sollten die Liganden daher in nicht-radioaktiver Form isoliert werden.

Die Isolation konnte nur mit *E. coli* AmpD⁻-Mutanten durchgeführt werden, da nur diese über signifikante Mengen der Liganden verfügen. Durch Auftragen auf die HPLC wurden die löslichen Zellbestandteile von *E. coli* aufgetrennt. Die Identifikation der Peaks erfolgte durch Abgleich des UV-Chromatogramms der Mutante mit dem der Mutante mit AmpD-kodierendem

Plasmid (siehe Abb. 24). Außerdem wurde die Mutante in Medium mit ^3H -Diaminopimelin-säure angezüchtet, die löslichen Zellbestandteile per HPLC aufgetrennt und das Eluat in einem Flüssigkeitsszintillationsspektrometer analysiert (siehe Abb. 25).

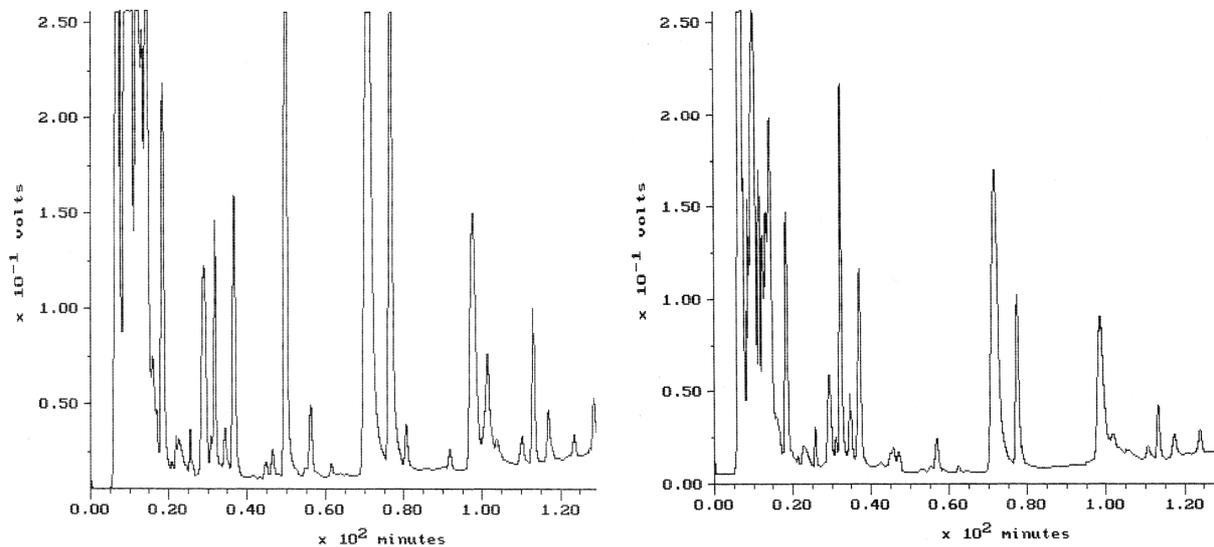


Abbildung 24: HPLC-UV-Chromatogramme der "Hot water-Extrakte" von *E. coli* JRG582 (AmpD-Mutante, links) und *E. coli* JRG582 mit AmpD-kodierendem Plasmid (rechts).

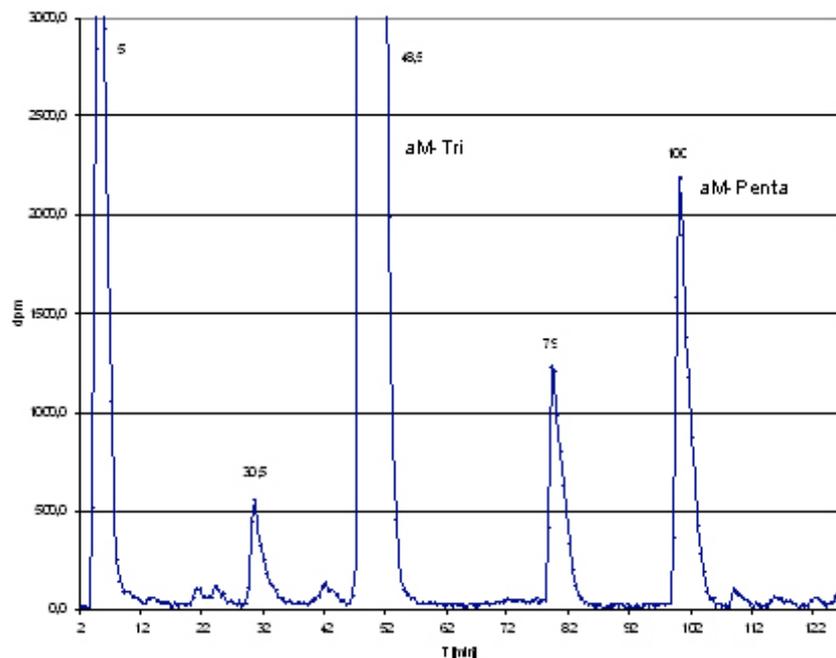


Abbildung 25: Auswertung des HPLC-Eluats (*E. coli* JRG582) im Szintillationszähler.

Die radioaktiven Peaks der gesuchten Substanzen wurden anhand DIETZ identifiziert und eluieren bei einer Retentionszeit von ungefähr 49 bzw. 100 Minuten (DIETZ, 1997). Die UV-Chromatogramme weisen bei diesen Zeiten auch deutliche Unterschiede auf (siehe Abb. 24).

3.2.1. Isolation des (1,6-anhydro)-MurNac-Tripeptids

Das aM-Tripeptid eluiert bei etwa 49 Minuten. Das UV-Chromatogramm des Stammes JRG582 zeigt bei dieser Retentionszeit einen deutlichen Peak, der in dem Chromatogramm der Mutante mit Plasmid fehlt (siehe Abb. 26).

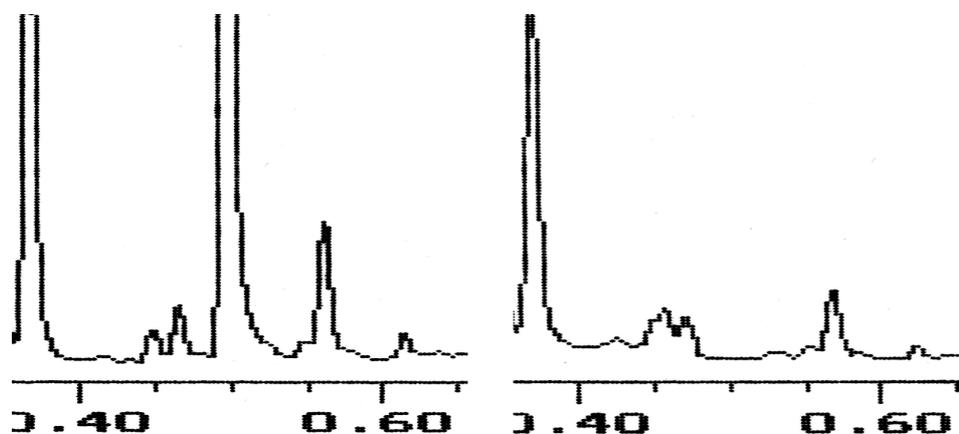


Abbildung 26: Ausschnitte der UV-Chromatogramme von *E. coli* JRG582 (links) und JRG582/pBP19-6 (rechts).

Dieser Peak wurde aus mehreren HPLC-Läufen gesammelt und zur Entsalzung nochmals mit einem Wasser-Acetonitril-Gradienten per HPLC aufgetrennt (siehe Abb. 27). Zum Vergleich wurde auch radioaktives aM-Tripeptid mit diesem Gradienten analysiert (siehe Abb. 28).

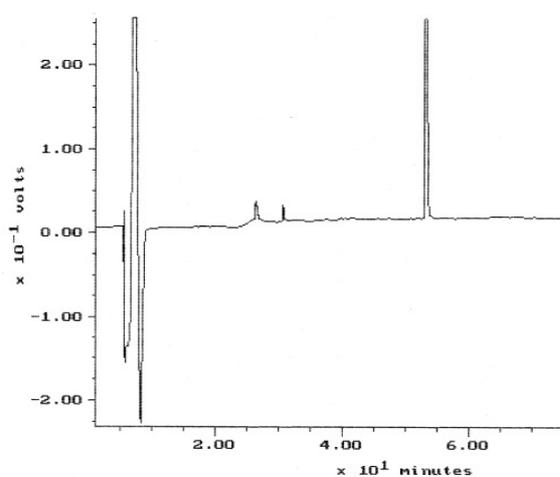


Abbildung 27: UV-Chromatogramm des isolierten aM-Tripeptids (Wasser-Acetonitril-Gradient).

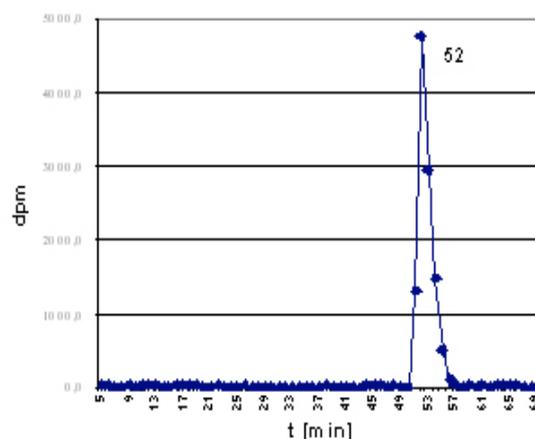


Abbildung 28: ³H-markiertes aM-Tripeptid nach Elution von der HPLC (Wasser-Acetonitril-Gradient).

Die entsalzte Substanz wurde mittels ESI-Massenspektrometer hinsichtlich ihres Molekulargewichts überprüft (siehe Abb. 29).

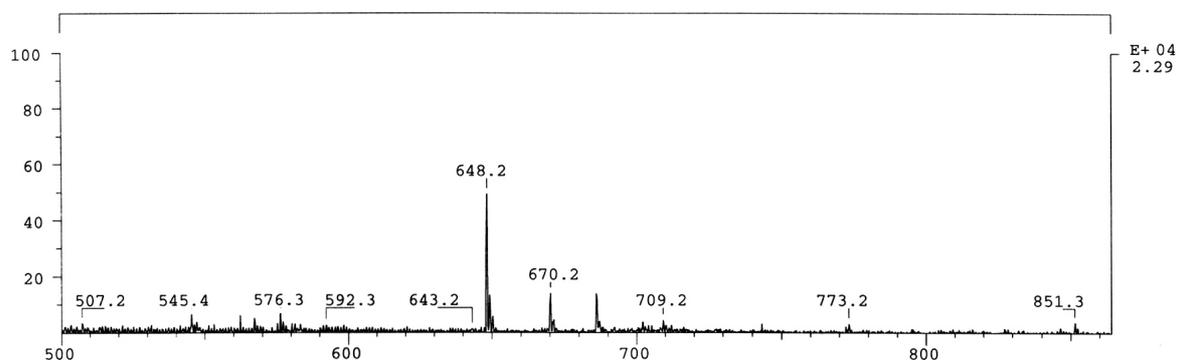


Abbildung 27: Massenspektrum des isolierten aM-Tripeptids.

Die theoretisch errechnete Masse beträgt unter Berücksichtigung des Massendefekts 647,26 au. Der höchste Peak im Massenspektrum entspricht daher der Masse des aM-Tripeptids und H^+ . Der Peak bei 670,2 au wird verursacht durch aM-Tripeptid und Na^+ (22,99 au). Das aM-Tripeptid wurde demnach erfolgreich isoliert.

3.2.2. Isolation des (1,6-anhydro)-MurNac-Pentapeptids

Das aM-Pentapeptid eluiert bei etwa 100 Minuten. Das UV-Chromatogramm des Stammes JRG582 zeigt im Vergleich mit dem Chromatogramm der Mutante mit Plasmid auch Unterschiede (siehe Abb. 30). Es stellte sich aber heraus, dass bei dieser Säulentemperatur mehrere Peaks übereinander liegen und das aM-Pentapeptid daher nicht sauber aufgetrennt wird. Durch Optimierung der HPLC-Methode (hauptsächlich durch Temperatur-Absenkung) konnte eine bessere Trennung der übereinanderliegenden Peaks erreicht werden. Diese teilen sich nun auf fast zwanzig Minuten auf, was eine eindeutige Identifizierung des aM-Pentapeptids möglich machte. Anhand der 3H -markierten Substanz wurde für die gesuchte Substanz eine Retentionszeit von ca. 98 Minuten ermittelt (siehe Abb. 30).

Der entsprechende Peak wurde aus mehreren HPLC-Läufen gesammelt und zur Entsalzung nochmals mit einem Wasser-Acetonitril-Gradienten per HPLC aufgetrennt (siehe Abb. 31). Zum Vergleich wurde auch radioaktives aM-Pentapeptid mit diesem Gradienten analysiert (siehe Abb. 32).

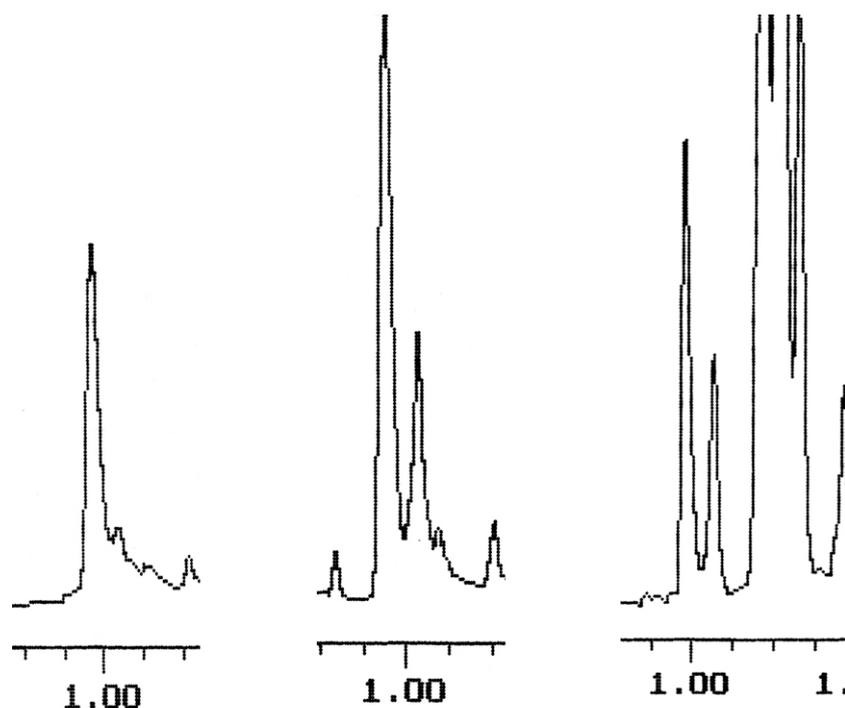


Abbildung 28: Ausschnitte der UV-Chromatogramme von *E. coli* JRG582/pBP19-6 (links) und JRG582 (mitte und rechts). Das Chromatogramm rechts wurde bei einer Säulentemperatur von 34,5°C aufgenommen. aM-Pentapeptid eluiert bei ca. 98 Minuten.

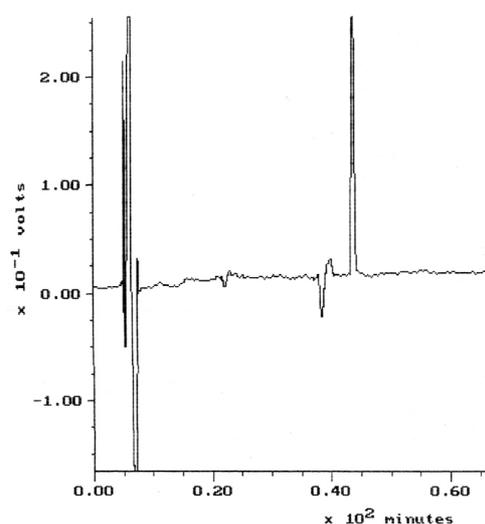


Abbildung 31: UV-Chromatogramm des isolierten aM-Pentapeptids (Wasser-Acetonitril-Gradient).

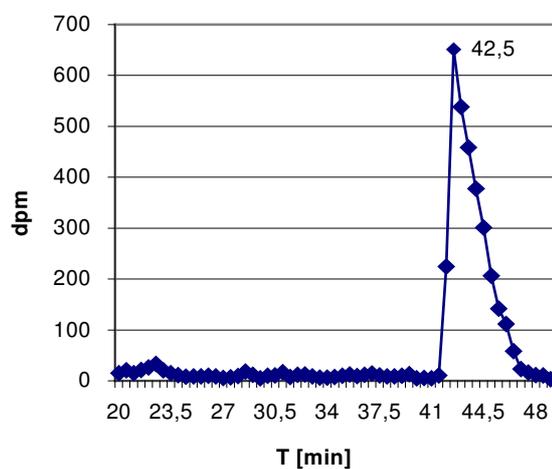


Abbildung 32: ³H-markiertes aM-Pentapeptid nach Elution von der HPLC (Wasser-Acetonitril-Gradient).

Die entsalzte Substanz wurde mittels LC-MS (ESI) hinsichtlich ihres Molekulargewichts überprüft (siehe Abb. 33).

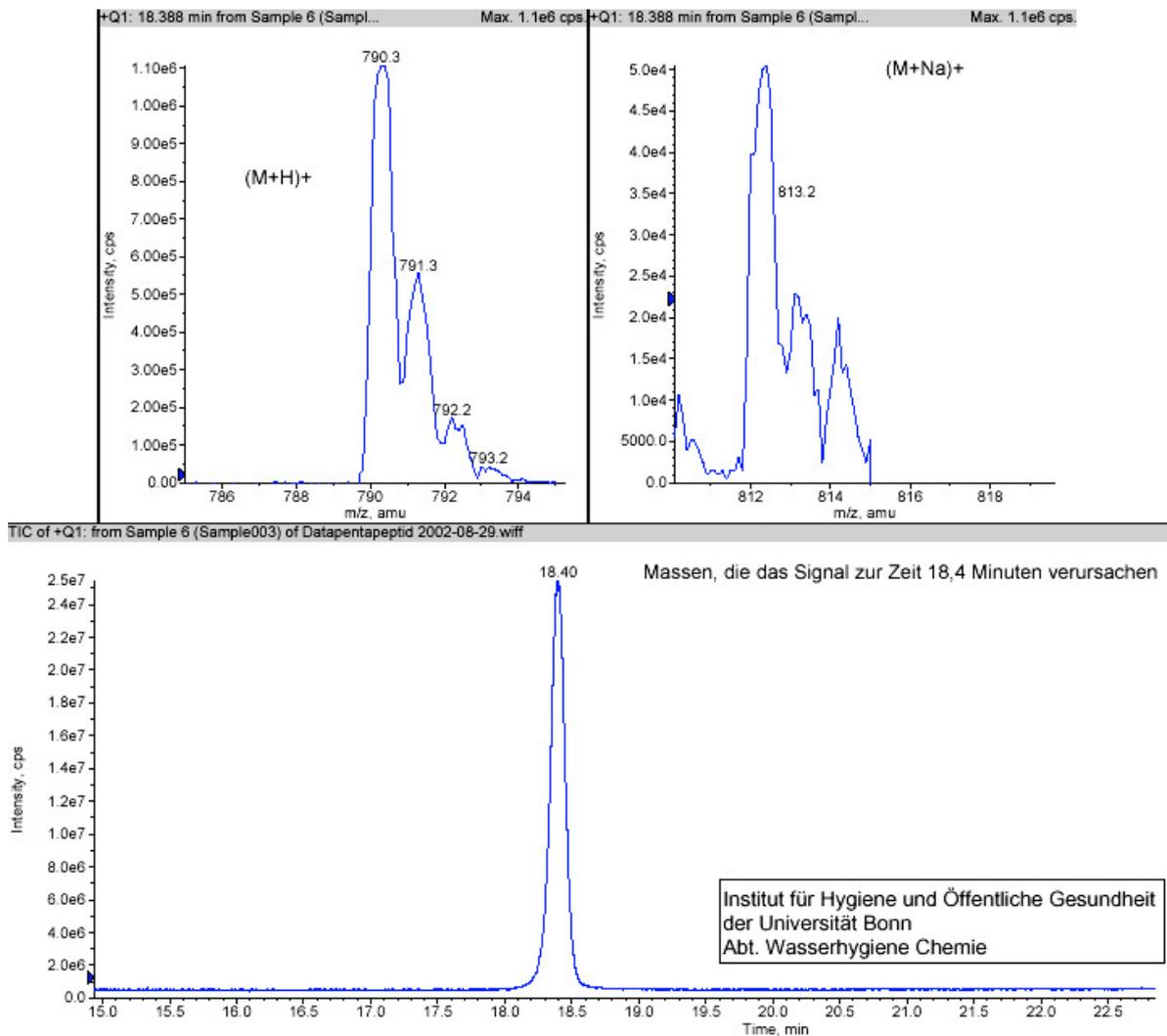


Abbildung 29: Massenspektrum des isolierten aM-Pentapeptids.

Die theoretisch errechnete Masse beträgt unter Berücksichtigung des Massendefekts 789,33 au. Die Massen, die bei der HPLC einen Peak bei 18,4 Minuten verursachen, besitzen die Massen 790,3 au bzw. 813,2 au. Sie können daher dem Molekül und H^+ bzw. dem Molekül und Na^+ zugeordnet werden. Das aM-Pentapeptid wurde demnach erfolgreich isoliert.

3.3. Expressionsanalysen der AmpC- β -Laktamase

Die Wirkung der Liganden aM-Tripeptid und aM-Pentapeptid auf die Transkription der AmpC- β -Laktamase sollte mit Hilfe eines Transkriptionsassays untersucht werden. Dazu wurde zuerst eine *In-vitro* Transkription durchgeführt, in der das gereinigte Protein, Template-DNA aus *C. freundii* (pNU305) und gegebenenfalls Liganden eingesetzt wurden. Die daraus entstandene RNA wurde gereinigt und mit DNase behandelt, um eventuelle Reste der

Template-DNA abzubauen. In ersten Versuchen diente diese RNA als Matrize für eine RT-PCR, in der das *ampC*- und das *ampR*-Gen nachgewiesen wurden. Da die Template-DNA aus *C. freundii* in das Plasmid pBR322 kloniert war, konnte außerdem das darauf kodierte Gen für die Tetracyclin-Resistenz als Kontrolle in der RT-PCR amplifiziert werden.

In späteren Versuchen wurde die RNA aus der *In-vitro* Transkription auch in der Real-Time RT-PCR eingesetzt. Auch hier wurden *ampC*- und *ampR*-Gen nachgewiesen. Als Kontrolle diente zugesetzte Luciferase-RNA. Bei beiden Versuchen wurden Kontrollen ohne Reverse Transkriptase durchgeführt, um nicht abgebaute Template-DNA nachzuweisen.

3.3.1. Detektion mittels RT-PCR

Aliquots der einzelnen RT-PCR-Reaktionen bzw. Kontroll-Reaktionen wurden zur Begutachtung auf ein Agarose-Gel aufgetragen. Beispielhaft ist dies in den Abbildungen 34 und 35 dargestellt.

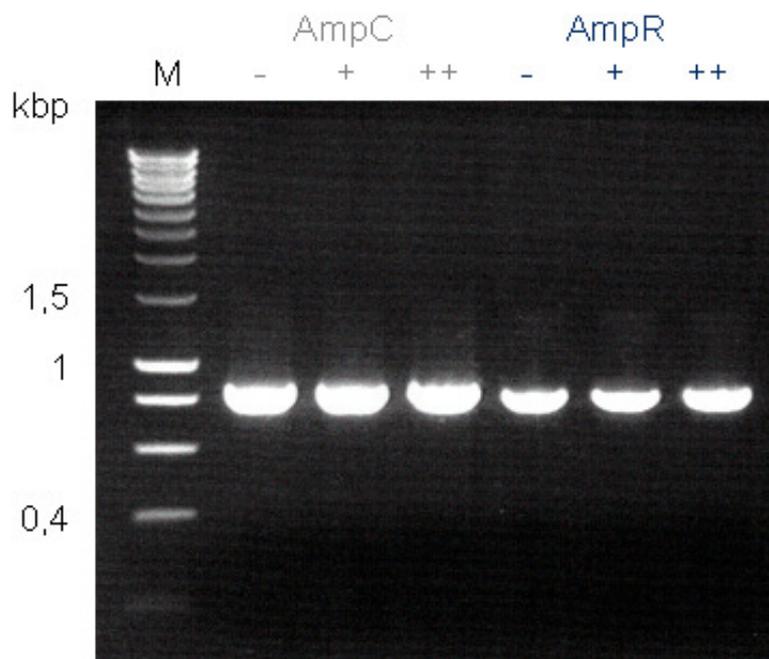


Abbildung 30: RT-PCR zum Nachweis der AmpC- und AmpR-Expression (Agarose-Gel). M: Marker, -: *In-vitro*-Transkription ohne AmpR, +: *In-vitro*-Transkription mit geringer Menge AmpR, ++: *In-vitro*-Transkription mit hoher Menge AmpR.

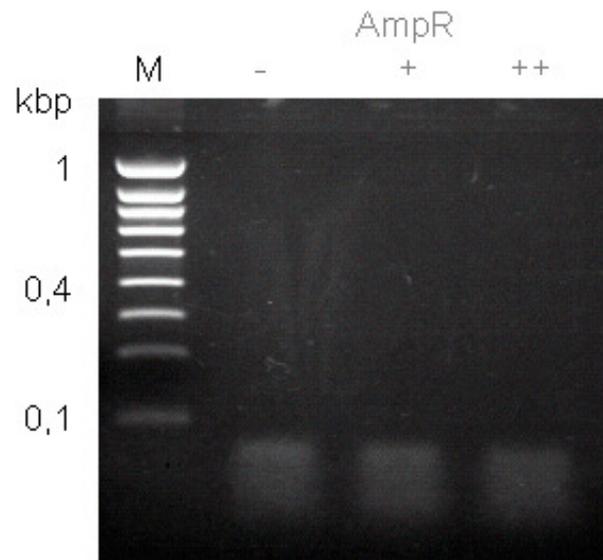


Abbildung 31: Kontrollreaktion ohne Reverse Transkriptase, Nachweis des *ampR*-Gens (Agarose-Gel). M: Marker, -: *In-vitro*-Transkription ohne AmpR, +: *In-vitro*-Transkription mit geringer Menge AmpR, ++: *In-vitro*-Transkription mit hoher Menge AmpR.

Das Agarose-Gel der RT-PCR zeigt bei allen Proben deutliche Banden in der erwarteten Höhe. Bei der Kontrollreaktion sind hingegen nur Primer-Dimere, jedoch keine Genamplifikate zu erkennen. Daher kann davon ausgegangen werden, dass die Produkte der RT-PCR durch Amplifikation von mRNA entstanden sind. Eine Transkription der beiden Gene hat stattgefunden. Die Banden sind allerdings etwa gleich stark, es sind also keine Unterschiede in der Transkriptionsstärke zu sehen. Eine ansteigende Konzentration von AmpR in der *In-vitro* Transkription sollte aber zu einem Anstieg der AmpC- und zur Verminderung der AmpR-Expression führen (JACOBS *et al.*, 1997). In den durchgeführten Versuchen konnten aber in der Regel keine Unterschiede nachgewiesen werden.

Zur Optimierung der Versuche und Verbesserung der Ergebnisse wurden zahlreiche Parameter verändert. Die wichtigsten Änderungen sind nachfolgend aufgeführt:

- Die Konzentration der Template-DNA wurde zwischen 1 und 6,7 nM variiert.
- Als Template-DNA wurde entweder das Plasmid pNU305 oder ein daraus amplifiziertes lineares DNA-Fragment eingesetzt. Das lineare Fragment kodierte für das *ampC*-, *ampR*-Gen und die Intergenregion.
- Die Konzentration des eingesetzten AmpR-Proteins variierte zwischen 5 nM und 2,5 μ M. Dabei wurde Protein aus unterschiedlichen Chargen verwendet. Die Verdünnung erfolgte in Wasser oder AmpR-Puffer.

- Anstelle des renaturierten AmpR-Proteins wurde das gespaltene NusA/AmpR-Fusionsprotein eingesetzt.
- Die Komponenten der *In-vitro* Transkription wurden entweder komplett vorher gemischt oder sequentiell nach Inkubationsschritten zugegeben.
- Die Länge der *In-vitro* Transkription betrug 10, 15, 20 oder 30 Minuten.
- Die Reverse Transkription wurde für 30, 40 oder 60 Minuten durchgeführt.
- Die PCR enthielt zwischen 30 und 40 Zyklen. Sie wurde mit und ohne finale Elongationsphase durchgeführt.

Sämtliche Änderungen führten nicht zu reproduzierbaren Transkriptionsunterschieden. Auch die Zugabe von UDP-MurNac-Pentapeptid (Endkonzentration 0,8 mM, bei einer AmpR-Konzentration von 20 nM) ergab keine erkennbaren Unterschiede in der Bandenstärke.

Um eine höhere Empfindlichkeit bei der Detektion der Transkript-Menge zu erreichen, wurde in nachfolgenden Versuchen die Real-Time RT-PCR eingeführt. Diese sollte an die Stelle der RT-PCR nach der mRNA-Isolierung treten.

3.3.2. Detektion mittels Real-Time RT-PCR

Nach Durchführung der Real-Time RT-PCR wurden die erhaltenen c_T -Werte auf die Luciferase normiert (vgl. Kap. 2.2.5.2.). Allerdings ergaben sich auch mit dieser Detektionsmethode keine signifikanten Unterschiede in der Transkriptionsstärke. Daher wurden weitere Parameter der *In-vitro* Transkription variiert:

- Die Konzentration der RNA-Polymerase wurde verdoppelt.
- Die DNA-Matrize wurde sowohl linear als auch zirkulär in Konzentrationen von 0,83 – 3 nM eingesetzt.
- Die NTP-Konzentration wurde verdoppelt.
- Die *In-vitro* Transkription erfolgte ohne Zugabe von RNase-Inhibitor.
- Die AmpR-Konzentration variierte zwischen 80 nM und 2,5 μ M. Dabei wurde auch Protein eingesetzt, das in starker Anlehnung an JACOBS *et. al* (1997) gereinigt worden war.
- Anstelle von renaturiertem AmpR wurde auch das intakte Fusionsprotein NusA/AmpR eingesetzt.

- Zugabe von aM-Tripeptid (~ 1 mM) bzw. aM-Pentapeptid (~ 0,9 mM).

Auch hier führten die genannten Veränderungen nicht zu eindeutigen Unterschieden in der Transkription. Teilweise war die mRNA-Menge in Ansätzen mit AmpR im Vergleich zu Ansätzen ohne AmpR leicht erhöht. Dies ist vermutlich auf ionische Wechselwirkungen zurückzuführen, die sich positiv auf die Aktivität der RNA-Polymerase auswirken. Eine Regulation durch das AmpR-Protein konnte daraus nicht abgeleitet werden.

Die Real-Time PCR ist normalerweise in der Lage, sehr geringe Unterschiede in den Template-Mengen nachzuweisen. Dennoch wurde überprüft, ob die Veränderungen des mRNA-Levels bei Induktion der β -Laktamase überhaupt detektiert werden können.

Dazu wurde das Plasmid pNU305 in den *E. coli*-Stamm DC2 transformiert um *in-vivo* Induktionsversuche durchzuführen. Dieser *E. coli*-Stamm besitzt einen Defekt in der Zellmembran, die dadurch auch für größere Moleküle durchlässig ist. So ist der Stamm sensibel gegen das Antibiotikum Erythromycin, welches aufgrund seiner Größe (ca. 733 Dalton) normalerweise nicht in die Zelle gelangen kann (PFEIFLE, 1999). Auch die potentiell aktivierenden Liganden aM-Tripeptid und aM-Pentapeptid sind mit 646 bzw. 789 Dalton relativ groß. Eine intakte Zellmembran ist für diese Moleküle vermutlich nicht permeabel. Durch die Verwendung von *E. coli* DC2 sollte gewährleistet werden, dass die Liganden in das Cytoplasma gelangen können.

Zur Etablierung der RNA-Isolation und Real-Time RT-PCR wurden zunächst Induktionsversuche mit Imipenem als starkem Induktor der β -Laktamase durchgeführt. Bei Zugabe von Imipenem in das Kulturmedium kann eine signifikant höhere Laktamaseaktivität gemessen werden als im nicht induzierten Zustand (PFEIFLE, 1999).

Bei *E. coli* DC2 / pNU305 konnten bei der Induktion mit 2 bzw. 4 μ g/ml Imipenem folgende mRNA-Werte gemessen werden:

2 μ g/ml Imipenem:

Zustand	c_t <i>ampC</i>	c_t <i>gap</i>	Relative Menge an <i>ampC</i> -mRNA normalisiert
nicht induziert	19,7	19,6	1
induziert	17,4	17,1	0,87

4 µg/ml Imipenem:

Zustand	c_t <i>ampC</i>	c_t <i>gap</i>	Relative Menge an <i>ampC</i> -mRNA normalisiert
nicht induziert	20,15	16,85	1
induziert	18,7	16,65	2,37

Bei einer Induktion mit 2 bzw. 4 µg/ml bleibt demnach die Menge an mRNA, die für die β -Laktamase kodiert, gleich bzw. verdoppelt sich in etwa. Da dieser Anstieg zu gering erschien, wurden vergleichsweise Versuche mit *E. coli* UGM599 / pBP131 und DC2 / pBP131 durchgeführt. Das Plasmid pBP131 enthält die Sequenz des *ampC/ampR*-Operons aus *Enterobacter cloacae*. Dabei wurden bei Induktion mit Imipenem folgende Werte gemessen:

UGM599 / pBP131, Induktion mit 2 µg/ml Imipenem:

Zustand	c_t <i>ampC</i>	c_t <i>gap</i>	Relative Menge an <i>ampC</i> -mRNA normalisiert
nicht induziert	22,6	15,5	1
induziert	16,2	15,3	75

DC2 / pBP131, Induktion mit 4 µg/ml Imipenem:

Zustand	c_t <i>ampC</i>	c_t <i>gap</i>	Relative Menge an <i>ampC</i> -mRNA normalisiert
nicht induziert	23,8	16,45	1
induziert	18,7	16,6	38

Der RNA-Level stieg bei diesen Versuchen um das 38 bzw. 75fache an. Dies macht deutlich, dass die Expression der β -Laktamase nach Induktion mit Imipenem, sofern sie durch das Plasmid pNU305 vermittelt wird, sehr schwach ist.

Daher wurden im Anschluss weitere *In-vivo* Induktionsversuche nur mit Zellen, die das Plasmid pBP131 beinhalten, durchgeführt.

Nach dem erfolgreichen Nachweis der β -Laktamase-Induktion mit Imipenem, sollte nun versucht werden, eine Induktion mittels AmpR-Liganden zu erreichen. Dazu wurde *E. coli* DC2 / pBP131 in Minimalmedium angezogen. In der logarithmischen Wachstumsphase wurden der Kultur aM-Tripeptid bzw. aM-Pentapeptid zugegeben. Als Kontrolle wurde eine weitere

Kultur mit Imipenem versetzt. Nach einer anschließenden RNA-Isolation wurde die *ampC*-Transkription mittels Real-Time RT-PCR analysiert. Folgende Werte wurden ermittelt:

E. coli DC2 / pBP131:

Zustand	c_t <i>ampC</i>	c_t <i>gap</i>	Relative Menge an <i>ampC</i> -mRNA normalisiert
nicht induziert	24,1	16,9	1
Tripeptid ~ 230 μ M	23,8	16,8	1,15
Pentapeptid ~ 210 μ M	23,5	16,4	1,07
Imipenem 5 μ g/ml	17	16,5	104

Eine signifikante Erhöhung der mRNA konnte demnach bei Induktion mit aM-Tri- oder aM-Pentapeptid nicht festgestellt werden. Da die Induktion mit Imipenem erfolgreich war, wurde angenommen, dass die Liganden trotz des Membrandefekts nicht in die Zellen eindringen konnten.

Als nächstes wurde deshalb versucht, durch Zugabe von Polymyxin B Nonapeptid die Membran für die Liganden permeabel zu machen. Polymyxin B Nonapeptid (PMBN) ist eine membrandesorientierende Substanz aus *Bacillus polymyxa*, die die äußere und innere Membran gramnegativer Bakterien destabilisiert. Als Polykation interferiert es mit den Carboxylgruppen der äußeren Lipopolysaccharidschicht und verdrängt stabilisierende Ca^{2+} - und Mg^{2+} -Ionen. Dies führt zu einer erhöhten Sensibilität gegen verschiedene Antibiotika, wie Vancomycin (~1,44 kDa) oder Teicoplanin (~1,9 kDa) (PFEIFLE, 1999).

E. coli UGM599 / pBP131 wurde in M9-Medium angezogen. Bei einer OD_{595} von 0,4 wurde der Kultur 100 μ g/ml PMBN zugegeben. Die Induktion erfolgte bei einer OD_{595} von 0,5 mit den Liganden bzw. Imipenem zur Kontrolle. Anschließend wurde die RNA isoliert und mittels Real-Time RT-PCR analysiert. Folgende mRNA-Werte wurden gemessen:

E. coli UGM599 / pBP131 mit PMBN:

Zustand	c_t <i>ampC</i>	c_t <i>gap</i>	Relative Menge an <i>ampC</i> -mRNA normalisiert
nicht induziert	24,2	17,1	1
Tripeptid ~ 0,53 mM	24,2	17,1	1,00
Pentapeptid ~ 0,5 mM	24,3	17,1	0,93

Imipenem 4 µg/ml	20,7	17,2	12,1
------------------	------	------	------

Auch mit diesem Experiment konnte kein Anstieg der β -Laktamase-Transkription bei Zugabe von Liganden nachgewiesen werden.

3.4. Aufklärung der dreidimensionalen Struktur des AmpR-Proteins

Zur Aufklärung der dreidimensionalen Struktur werden Proteinkristalle benötigt, die vermessen werden können. Die Kristallisationsversuche mit dem AmpR-Protein wurden in Kooperation mit Dr. Paulette Charlier an der Universität Liège in Belgien durchgeführt. Sowohl für das AmpR- als auch das NusA/AmpR-Protein wurden etwa 300 verschiedene Bedingungen getestet. In der Mehrzahl der Versuche wurde ein unbrauchbares Präzipitat erhalten. Manche Bedingungen führten gar nicht zur Präzipitation.

Bislang führte nur eine einzige Bedingung zu kristallinem Material (Hampton Research, Grid Screen Sodium Malonate, condition A2). Dabei wird die Proteinlösung mit 1,5 M Na-Malonat pH 4,0 gemischt. Dieses Ergebnis konnte mit 1,5 M Na-Malonat pH 4,5 reproduziert werden. Allerdings sind die Kristalle bisher zu klein, um sie einer genaueren Analyse zu unterziehen.

4. Diskussion

Die Bildung von β -Laktamasen ist der wichtigste Mechanismus der Resistenz gegenüber β -Laktamantibiotika vermittelt (LIVERMORE, 1998). Die β -Laktame werden durch diese Enzyme an ihrem Wirkort, dem Periplasma, hydrolysiert. Bei zahlreichen Spezies (u. a. *Citrobacter freundii*, *Enterobacter spp.*, *Serratia spp.*, Indol-positiven *Proteus spp.* und *Pseudomonas aeruginosa* wird die Produktion der β -Laktamase durch die Gegenwart von β -Laktamantibiotika induziert.

An diesem Regulationsmechanismus sind periplasmatische, membranständige und cytoplasmatische Proteine beteiligt (HANSON UND SANDERS, 1999). Dadurch bieten sich mehrere Angriffspunkte, um die Produktion der β -Laktamase zu verhindern. Ein Beispiel dafür ist die Inhibierung der lytischen Transglykosylasen durch den Naturstoff Bulgecin (KRAFT *et al.*, 1999). Gramnegative Bakterien, die in Gegenwart dieses Glucosaminderivats kultiviert werden, sind phänotypisch normal (NAKAO *et al.*, 1986). Die Fähigkeit zur Induktion der β -Laktamase durch Cefoxitin ist jedoch stark reduziert (PFEIFLE, 1999).

Gegenstand der vorliegenden Arbeit ist das Protein AmpR, der Transkriptionsfaktor der β -Laktamase. Auch hier bieten sich Möglichkeiten zur Inhibierung der β -Laktamase-Expression. Die Tatsache, dass AmpR durch niedermolekulare Liganden reguliert wird, könnte es ermöglichen, Inhibitoren der β -Laktamase-Transkription zu entwickeln. Dazu müsste AmpR durch ein geeignetes Molekül dauerhaft im reprimierenden Status gehalten werden. Die Struktur eines solchen Moleküls kann nur mit genauen Kenntnissen über aktivierende und reprimierende Liganden sowie deren Bindung an AmpR konzipiert werden. Bisher ist lediglich bekannt, dass es sich bei dem reprimierenden Liganden um UDP-MurNac-Pentapeptid handelt. Für die aktivierenden Liganden wurden bisher aM-Tripeptid und aM-Pentapeptid vorgeschlagen, eine abschließende Klärung steht allerdings noch aus (HANSON UND SANDERS, 1999).

Ziel dieser Arbeit war die Etablierung eines Transkriptionsassays, mit dem beide potentiell aktivierenden Liganden getestet werden können. Dieser Assay könnte dann auch bei neuentwickelten Transkriptions-Inhibitoren zur Untersuchung ihrer Wirksamkeit eingesetzt werden.

Für einen solchen *In-vitro* Transkriptionsansatz werden verschiedene Komponenten benötigt: eine Template-DNA, die das *ampClampR*-Operon kodiert, reines und aktives AmpR-Protein, RNA-Polymerase und Nukleotide. Außerdem müssen das reprimierende UDP-MurNac-Pentapeptid und die zu testenden Liganden zur Verfügung stehen.

Primäres Teilziel dieser Arbeit war daher die Isolierung und Reinigung von aktivem AmpR-Protein. Dies wurde auf unterschiedlichen Wegen versucht. Wie auch in vorangegangenen Arbeiten führte dabei die Expression von AmpR aus *Enterobacter cloacae* nicht zum Erfolg (BISHOP UND WEINER, 1993; WIEGAND, 2001). Dabei war es unerheblich, ob die exprimierte Sequenz zusätzliche Elemente wie ein His-Tag besaß, oder nur das Protein selbst kodiert war. Sämtliche Konstrukte führten in der Vergangenheit zur Bildung unlöslicher Inclusion Bodies. Die Expression rekombinanter Gene führt in *E. coli* zur Aktivierung von Hitzeschock- und SOS-Antwort-Aktivitäten und zur Expression weiterer Stress-Gene. Zudem wird der gesamte Zellmetabolismus durch die Biosynthese und Prozessierung der rekombinanten Proteine blockiert (VILLAVERDE UND CARRIO, 2003). Dies resultiert in einer Anhäufung des exprimierten Proteins in unlöslichen Aggregaten. Ein anderer Transkriptionsfaktor der LysR-Familie, NodD, benötigt zur korrekten Faltung das Chaperon GroEL (OGAWA UND LONG, 1995). Möglicherweise wird auch die Faltung von AmpR von anderen Proteinen unterstützt, die im Falle einer Überexpression nicht in ausreichendem Maße zur Verfügung stehen.

Neuere Studien vermuten, dass die Inclusion Body-Bildung von Zellen unter Stress sogar beabsichtigt ist, um sie erst später entweder durch Proteolyse- oder Faltungsprozesse weiter zu verarbeiten (VILLAVERDE UND CARRIO, 2003). Diese Vermutung wird unterstützt durch die Tatsache, dass die Zugabe von Zellextrakt zur Auflösung von Inclusion Bodies und Faltung der Proteine führen kann (CARRIO UND VILLAVERDE, 2001).

Die Bildung dieser unlöslichen Protein-Aggregate kann allerdings durchaus von Vorteil sein, da so bereits nach der Isolierung Reinheitsgrade von bis zu 90 % erreicht werden können (LANGLEY *et al.*, 1987). Durch *in-vitro* Renaturierung ist es daher bei einigen Proteinen möglich, mit wenigen Reinigungsschritten natives Protein zu erhalten. Generell enthalten Reinigungsstrategien bei der Bildung von Inclusion Bodies drei Schritte: 1) Isolation und Waschen der aggregierten Proteine, 2) Solubilisierung der Aggregate und 3) Rückfaltung / Renaturierung der Proteine. Im Allgemeinen ist dabei Schritt drei der schwierigste.

Bei der Reinigung von AmpR aus *Enterobacter cloacae* schlägt jedoch schon der zweite Schritt, die Solubilisierung der Proteinaggregate fehl. Solubilisierungsprozesse basieren entweder auf denaturierenden Agenzien wie Harnstoff oder Guanidinium-Hydrochlorid oder auf

Detergenzien wie SDS oder N-Lauroylsulfat. 8 M Harnstoff bzw. 6 M Guanidinium-Hydrochlorid führt bei *E. cloacae* AmpR nicht zur Solubilisierung. Auch eine Ultraschallbehandlung oder der Zusatz von N-Lauroylsulfat war nicht erfolgreich. Dies könnte daran liegen, dass selbst bei sehr hohen Konzentrationen der denaturierenden Stoffe inter- und intramolekulare Interaktionen auftreten können (TSUMOTO *et al.*, 2003). Diese Interaktionen sind vermutlich die Ursache von erneuter Aggregation oder Fehlfaltungen bei Entfernung des denaturierenden Agens.

Die Expression von AmpR aus *Citrobacter freundii* führte ebenfalls zur Bildung von Inclusion Bodies. Diese konnten allerdings durch Guanidinium-Hydrochlorid und Ultraschall-Behandlung solubilisiert werden. Auch die Renaturierung war unter bestimmten Bedingungen erfolgreich. So konnte sehr reines Protein gewonnen werden, welches in der Lage ist an die Promoter-Region des *ampC/ampR*-Operons zu binden. Diese Bindefähigkeit wurde in Gelshift-Experimenten nachgewiesen. AmpR aus *C. freundii*, das C-terminal mit einem His-Tag fusioniert wurde, zeigte hingegen keine DNA-Bindeaktivität. Dies war nicht unbedingt zu erwarten, da die DNA-Bindedomäne von LysR-Transkriptionsfaktoren, zu denen auch AmpR gehört, N-terminal kodiert ist (HARRISON UND AGGARWAL, 1990). Möglicherweise verhindert der His-Tag eine korrekte Faltung der DNA-Binderegion. Da die dreidimensionale Struktur von AmpR unbekannt ist, lässt sich auch nicht sagen, wo sich der C-Terminus des Proteins befindet. Der His-Tag könnte damit auch durch seine räumliche Anordnung eine DNA-Bindung verhindern.

Durch die Fusion des NusA-Proteins an den N-Terminus von *C. freundii* AmpR wurde es möglich, lösliches Protein zu exprimieren. Der *E. coli* Transkriptionsfaktor NusA (N Utilization Substance) besitzt nach Berechnungen von DAVIS ein sehr hohes Löslichkeitspotential (DAVIS *et al.*, 1999). Dieses entfaltet allerdings nur dann seine Wirkung, wenn es N-terminal positioniert wird. Die Größe des Fusionsproteins (495 Aminosäuren) erfordert eine Möglichkeit zur Abspaltung, daher wurde eine Thrombin-Protease-Schnittstelle zwischen die beiden Proteine gesetzt. Ein internes His-Tag C-terminal zu NusA erleichterte die Aufreinigung. Der zusätzliche Proteinteil besitzt dadurch ein Molekulargewicht von 61,7 kDa. Vermutlich würde dies die Bindung von AmpR an DNA behindern. Bei einem Gelshift-Experiment zeigt sich dennoch eine Retardierung der DNA. Dies ist vermutlich auf eine unspezifische Bindung des Transkriptionsfaktors NusA an die DNA zurückzuführen.

Wird das Fusionsprotein einer Proteinspaltung unterzogen und der Spaltansatz in Gelshift-Experimenten eingesetzt, erhält man zwei unterschiedliche Banden retardierter DNA. Dies bestätigt die Vermutung, dass auch NusA an die *ampC/ampR*-Operatorregion binden kann. Eine der Banden entspricht dabei der Retardierung, die auch durch das renaturierte *C. freundii* AmpR verursacht wird. Dies deutet darauf hin, dass die DNA-Bindeaktivität nicht durch die Solubilisierungs- und Renaturierungsprozesse beeinträchtigt wird.

Aufgrund der Reinheit und der vorhandenen DNA-Bindeaktivität wurde davon ausgegangen, dass das isolierte und renaturierte *C. freundii* AmpR in *In-vitro* Transkriptionsexperimenten eingesetzt werden kann. Ein weiteres Teilziel dieser Arbeit war daher die Isolierung der potentiell aktivierenden Liganden (1,6-anhydro)-MurNac-Tripeptid und (1,6-anhydro)-MurNac-Pentapeptid.

Beide Moleküle wurden bereits in der Vergangenheit isoliert (JACOBS *et al.*, 1994; PFEIFLE, 1999). Das aM-Pentapeptid lag dabei allerdings nur radioaktiv markiert vor. Für die *In-vitro* Transkriptionsexperimente sollten aus ökologischen Gründen nicht-radioaktive Moleküle eingesetzt werden. Die Isolation des aM-Tripeptids verlief problemlos, da es in hoher Konzentration in *E. coli* JRG582-Zellen vorliegt. Dieser Stamm besitzt kein funktionales AmpD-Protein und akkumuliert daher die Muropeptide im Cytoplasma. Aus einem Liter Kultur können ca. 400 nmol aM-Tripeptid gewonnen werden (JACOBS *et al.*, 1994).

Der für die HPLC aufbereitete „Hot-water Extrakt“ aus *E. coli* JRG582 enthält allerdings nur 1/20 der aM-Tripeptid-Menge an aM-Pentapeptid. Dies spiegelt vermutlich auch das Verhältnis *in-vivo* wider. Die Isolation nicht-radioaktiven aM-Pentapeptids gestaltete sich daher schwieriger. Durch eine Optimierung der HPLC-Bedingungen konnte die Substanz gesammelt werden.

Beide Moleküle wurden durch einen zweiten HPLC-Lauf weiter gereinigt und entsalzt. Massenspektrometrische Analysen bestätigten die Identität der Substanzen. Aufgrund fehlender Standards konnte keine exakte Stoffmenge bestimmt werden. Anhand eines Vergleichs der HPLC-Peakflächen mit der Fläche bestimmter Mengen an β -Alanyl-Alanin wurde aber eine Abschätzung vorgenommen. Die potentiell aktivierenden Liganden standen somit für die *In-vitro* Transkription zur Verfügung.

Der reprimierende Ligand UDP-MurNac-Pentapeptid wurde freundlicherweise von J. van Heijenoort (Universität Paris-Sud, Frankreich) zur Verfügung gestellt und brauchte daher

nicht isoliert zu werden. Die benötigte Template-DNA wurde von H. Schmidt (Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene, TU Dresden) zur Verfügung gestellt. Dabei handelte es sich um das Plasmid pNU305, welches von LINDBERG *et al.* kloniert wurde (LINDBERG *et al.*, 1985). Dieses Plasmid enthält das *ampC/ampR*-Operon aus *C. freundii* OS60 und wurde auch in den Versuchen von JACOBS *et al.* eingesetzt (JACOBS *et al.*, 1997). Alle benötigten Komponenten für die *In-vitro* Transkription waren damit verfügbar.

4.1. Expressionsanalysen des *ampC*- β -Laktamase-Gens

Bislang wurden zwei Substanzen als Signalmoleküle für die Induktion der β -Laktamase postuliert. Einerseits das aM-Tripeptid und andererseits das aM-Pentapeptid (DIETZ *et al.*, 1997; JACOBS, 1997). Beide Ansätze lassen allerdings keinen eindeutigen Schluß zu.

Aufgrund einer Anhäufung von aM-Tripeptid im Cytoplasma des *ampD*-negativen und konstitutiv Laktamase-exprimierenden Stammes *E. coli* JRG582, vermuteten JACOBS *et al.* dieses Molekül als Induktor (JACOBS *et al.*, 1994). Im Cytoplasma des Wildtyps konnten sie aber auch nach Induktion der Laktamase-Expression mit Cefoxitin kein aM-Tripeptid nachweisen. In *In-vitro* Transkriptionsexperimenten war aM-Tripeptid in der Lage, die reprimierende Wirkung des UDP-MurNac-Pentapeptids aufzuheben (JACOBS, 1997). Dies ist ein starker Hinweis auf die Induktionsfähigkeit dieses Moleküls. Die *ampC*-Transkription konnte allerdings nur auf dasselbe Level wie bei völliger Abwesenheit von Liganden zurückgeführt werden.

In den *In-vitro* Transkriptionsexperimenten ist außerdem keine Expression der β -Laktamase ohne Zugabe von AmpR bzw. bei Zugabe des UDP-Pentapeptids und AmpR nachgewiesen worden. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit können dies nicht bestätigen. Auch BARTOWSKY und NORMARK konnten eine Basalexpression von AmpC in Abwesenheit von AmpR ermitteln (BARTOWSKY UND NORMARK, 1991). Möglicherweise liegt diese aber auch unter der Nachweisgrenze, der von JACOBS *et al.* verwendeten Methode.

DIETZ *et al.* untersuchten die Freisetzung von aD-Muropeptiden aus dem Peptidoglykan unter dem Einfluß verschiedener Antibiotika. Dabei ergab sich, dass nur die Konzentration des aD-Pentapeptids mit der Expression der β -Laktamase korreliert (DIETZ *et al.*, 1997). Daher wurde angenommen, dass das aM-Pentapeptid das Signalmolekül für die Induktion der β -Laktamase sein muß. HANSON und SANDERS kritisieren, dass es sich bei der Betrachtung um die Disaccharid-Moleküle im Periplasma handelt, was nicht unbedingt der cytoplasmatischen Situation

entsprechen muss (HANSON UND SANDERS, 1999). Bei einer Induktion der AmpD-Mutante JRG582 mit Imipenem konnte DIETZ allerdings auch einen 3 – 4fachen Anstieg von aM-Pentapeptid im Cytoplasma bzw. Gesamtzellextrakt nachweisen. Die Konzentration von aM-Tripeptid blieb hingegen unverändert (DIETZ, 1997). Auch bei Anwesenheit von AmpD konnte nach Imipenem-Induktion ein Anstieg der aM-Pentapeptid-Menge um ein Vielfaches gemessen werden. Die Veränderungen von aM-Tripeptid waren nicht signifikant (DIETZ, 1997).

Möglicherweise sind auch beide Moleküle in der Lage die Transkription der β -Laktamase zu aktivieren. Da bisher noch nicht aufgeklärt ist, wie die Liganden an AmpR binden, kann keine Aussage über Wechselwirkungen zwischen dem Protein und den Liganden getroffen werden. Das AmpR-Protein besitzt jedoch keine besondere Erkennungsstelle für das endständige D-Alanyl-D-Alanin des Pentapeptids, wie sie die Penicillin-Binde-Proteine aufweisen (LINDQUIST *et al.*, 1989). Von daher ist eine höhere Affinität von AmpR für das aM-Pentapeptid nicht unbedingt zu erwarten.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde zunächst versucht, die von JACOBS *et al.* veröffentlichten Ergebnisse zu reproduzieren. Wurde in *In-vitro* Transkriptionsexperimenten kein AmpR-Protein eingesetzt, konnte keine *ampC*-Transkription nachgewiesen werden. Bei Zugabe steigender Mengen an AmpR, stieg auch die Transkription der β -Laktamase an (JACOBS *et al.*, 1997). Bei hohen AmpR-Konzentrationen wurde dagegen die Transkription von *ampR* unterdrückt.

Diese Befunde konnten nicht reproduziert werden. Sowohl im Ansatz ohne AmpR als auch in Ansätzen mit AmpR, wurden stets ungefähr gleiche Transkriptionsraten für *ampC* und *ampR* detektiert. Da der Versuchsaufbau im Wesentlichen dem von JACOBS *et al.* entsprach, wurde nicht das Experiment als Ganzes in Frage gestellt, sondern einzelne Parameter geändert. Insbesondere, da auch jeweils mRNA gebildet wurde, was eindeutig durch Kontrollexperimente nachweisbar war.

So wurde beispielsweise vermutet, dass die Länge der RT-Phase zu kurz ist, um von allen vorhandenen mRNA-Molekülen eine cDNA zu synthetisieren. Eine Verlängerung brachte aber keine Unterschiede. Auch die Länge der Transkriptionsphase selbst wurde in Frage gestellt. Eine Variation zwischen 10 und 30 Minuten änderte das Ergebnis aber nicht.

Auch die Annahme, dass ein Teil der isolierten AmpR-Proteins inaktiv ist, und daher die effektive Konzentration deutlich niedriger ist, wurde in Betracht gezogen. Die eingesetzten

AmpR-Mengen wurden deshalb um ein Vielfaches erhöht, um gegebenenfalls eine bestimmte Teilmenge an aktivem Protein zu erhalten. Da das AmpR-Protein in Gelshift-Experimenten erfolgreich auf seine DNA-Bindeaktivität getestet wurde, wurde angenommen, dass zumindest eine Teilmenge die Fähigkeit zur Regulation haben müßte. Da das Protein anfangs in Wasser verdünnt war, bestand die Möglichkeit der Präzipitation schon vor der *In-vitro*-Transkription. Aber auch in Experimenten, bei denen AmpR vorher mit AmpR-Puffer verdünnt wurde, zeigten sich keine Unterschiede.

Die Template-DNA wurde anfangs linearisiert eingesetzt, um eventuelle Transkripte über das gesamte Plasmid zu vermeiden. Da JACOBS *et al.* die DNA zirkulär einsetzten, wurde vermutet, dass lineare DNA möglicherweise nicht in gleicher Weise als Template dienen kann. Beispielsweise aufgrund einer eventuell schlechteren Rehybridisierung der Stränge oder unnatürlichen Verwindungen. Auch mit zirkulärer DNA konnten die Ergebnisse nicht reproduziert werden.

Da in Betracht gezogen wurde, die Ergebnisse von JACOBS *et al.* könnten fälschlicherweise entstanden sein, wurde die Zugabe von UDP-Pentapeptid getestet. Auch damit konnten aber keine Unterschiede in der *ampC*-Transkription erreicht werden, was ebenfalls im Gegensatz zu den Ergebnissen von JACOBS *et al.* steht.

Ein grundsätzlicher Unterschied im Versuchsaufbau war die Detektion der gebildeten mRNA. JACOBS *et al.* wiesen die mRNA mittels radioaktiv markierter Primer nach, die während der Reversen Transkription in die cDNA eingebaut wurden. Die cDNA wurde gelelektrophoretisch aufgetrennt und die Intensität der radioaktiven Banden bestimmt. In dieser Arbeit wurde die gebildete cDNA mittels anschließender PCR amplifiziert, gelelektrophoretisch aufgetrennt und durch Ethidiumbromid-Färbung nachgewiesen. Da die Polymerase-Kettenreaktion irgendwann eine Plateau-Phase erreicht, wurde vermutet, dass kleine Mengenunterschiede im Ausgangstemplate während des PCR-Laufs egalisiert werden. Daher wurde auch die Zyklanzahl der PCR variiert. Allerdings waren dann entweder gar keine Banden nachweisbar (weniger Zyklen) oder gleiche Bandenintensitäten sichtbar. Dies führte zu der Schlussfolgerung, dass die gewählte Detektionsmethode möglicherweise nicht empfindlich genug ist, um die Unterschiede in der β -Laktamase-Expression nachzuweisen.

Die Anwendung der Real-Time RT-PCR als hochempfindliche Methode brachte zunächst auch keine Änderung der erhaltenen Ergebnisse. Auch damit konnten keine Unterschiede in der *ampC*- und *ampR*-Transkription festgestellt werden.

Daher wurden weitere Parameter der *In-vitro* Transkription verändert. So wurde beispielsweise die eingesetzte Menge an RNA-Polymerase und Nukleotiden erhöht, um sicherzustellen, dass beide Komponenten durchgängig weit im Überschuss vorliegen. Weiterhin wurde in Betracht gezogen, dass das isolierte AmpR-Protein zwar eine DNA-Bindeaktivität aufweist, aber dennoch nicht in der Lage ist, die Transkription zu regulieren.

Obwohl die Reinigungsstrategie von AmpR zumindest teilweise der von JACOBS *et al.* stark ähnelte, wurde deshalb neues Protein gereinigt, wobei die Renaturierungs- und Reinigungsschritte mit denen von JACOBS *et al.* vergleichbar waren. Außerdem wurde das intakte Fusionsprotein NusA/AmpR eingesetzt. Mit beiden Proteinvarianten wurden ebenfalls keine unterschiedliche Transkriptionsraten erhalten. Die Vermutung, dass das isolierte AmpR-Protein nicht in der Lage ist, die Transkription zu regulieren, konnte damit nicht sicher bestätigt werden.

Um festzustellen, ob aM-Pentapeptid möglicherweise eine transkriptionssteigernde Wirkung unabhängig von der Basaltranskription aufweist, wurde auch aM-Tripeptid bzw. aM-Pentapeptid eingesetzt. Beide Liganden verursachten allerdings keine Unterschiede in der Transkript-Menge.

Die Eignung der Real-Time RT-PCR zur Detektion von Unterschieden in der β -Laktamase-Expression wurde als sicher angenommen, sollte aber dennoch durch Experimente bestätigt werden. Dazu wurde RNA aus *E. coli*-Zellen isoliert, die das Plasmid pNU305 enthielten, welches auch in der *In-vitro* Transkription eingesetzt wurde. Da *E. coli* dadurch im Besitz einer induzierbaren β -Laktamase ist, sollte die *ampC*-mRNA-Menge bei Induktion mit Imipenem deutlich ansteigen. Dies wurde bereits für die gebildete Menge an β -Laktamase nachgewiesen (PFEIFLE, 1999). Vermutlich ist der Unterschied der mRNA-Menge im induzierten und nicht-induzierten Zustand jedoch kleiner als *in-vitro*. Dies ist dadurch begründet, dass in lebenden Zellen die gebildete mRNA nach kurzer Zeit wieder abgebaut wird (MAHLEN *et al.*, 2003). Gelingt es also, Unterschiede in *in-vivo* Transkription zu detektieren, sollten auf jeden Fall auch Unterschiede *in-vitro* nachweisbar sein.

Nach Induktion von *E. coli* DC2 / pNU305 mit zwei unterschiedlichen Konzentrationen von Imipenem konnten keine signifikanten Änderungen in der *ampC*-Transkription nachgewiesen werden. Bei 2 $\mu\text{g/ml}$ Imipenem ergab sich kein Anstieg, bei 4 $\mu\text{g/ml}$ nur ein sehr schwacher Anstieg (\sim Verdoppelung) der Transkript-Menge. Dies war nicht zu erwarten, da PFEIFLE in

dem gleichen *E. coli*-Stamm bei Induktion mit 4 µg/ml Imipenem eine Erhöhung der β-Laktamase-Menge um das 15fache messen konnte (PFEIFLE, 1999). Bei dieser Messung enthielten die DC2-Zellen allerdings nicht das Plasmid pNU305 sondern das Plasmid pBP131. Dieses enthält das *ampC/ampR*-Operon aus *Enterobacter cloacae*.

Zum Vergleich wurde auch isolierte RNA aus *E. coli* UGM599 / pBP131 und DC2 / pBP131 in der Real-Time RT-PCR eingesetzt. Damit zeigten sich bei Imipenem-Induktion deutliche Unterschiede. Die Menge an *ampC*-mRNA war jeweils um ein Vielfaches erhöht.

Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass das Plasmid pNU305 nicht mehr geeignet ist, um Induktionsstudien durchzuführen. Auch die Tatsache, dass im nicht-induzierten Zustand bei pNU305 bereits mehr *ampC*-RNA vorliegt als bei pBP131 bestätigt diesen Eindruck. Das zur Verfügung gestellte Plasmid pNU305 wurde letztmals vor ca. 10 Jahren in Experimenten eingesetzt und anschließend in einem *E. coli*-Stamm in Dauerkultur aufbewahrt. Möglicherweise fand während dieser Zeit eine Veränderung des Plasmids statt.

Dennoch war dies nicht zu erwarten, da die relevanten Bereiche (die Intergenregion, sowie Teile von *ampC* und *ampR*) bei der Ankunft des Plasmids sequenziert wurden. Dabei wurden keine Veränderungen in der DNA-Sequenz festgestellt. Welche Veränderungen zum Verlust der Induzierbarkeit geführt haben könnten, bleibt daher unklar.

Diese Ergebnisse belegen die Eignung der Real-Time RT-PCR zur Detektion von Unterschieden in der β-Laktamase-Expression. Daher muß davon ausgegangen werden, dass die Ursache der nicht reproduzierbaren *In-vitro* Transkriptionsergebnisse in der *In-vitro* Transkription selbst liegt. Die Ergebnisse deuten weiterhin darauf hin, dass die verursachende Komponente das Plasmid pNU305 ist, da dieses als DNA-Matrize diente. Wurde linearisierte DNA eingesetzt, stammte diese ebenfalls aus pNU305.

Da die Sequenz des isolierten AmpR-Proteins aus *Citrobacter freundii* OS60 stammt, sollte in der *In-vitro* Transkription auch die DNA-Matrize aus dieser Spezies eingesetzt werden. Aufgrund der vorliegenden Ergebnisse der Real-Time RT-PCR war es allerdings nicht mehr sinnvoll, mit dieser DNA weiter zu arbeiten. Da das *ampC/ampR*-Operon in pBP131 aus *Enterobacter cloacae* stammt, wurde für weitere Versuche eine andere Strategie gewählt.

Mit Hilfe des Plasmids pBP131 sollten *in-vivo* Induktionsversuche durchgeführt werden. Durch Zugabe der potentiell aktivierenden Liganden zum Kulturmedium sollte, ähnlich wie

bislang mit Imipenem, die Wirkung auf die *ampC*-Transkription getestet werden. Versuche dieser Art wurden bereits zuvor von DIETZ und von PFEIFLE durchgeführt (DIETZ, 1997; PFEIFLE, 1999).

Problematisch ist bei diesen Experimenten die selektive Permeabilität der äußeren Membran. Die Verknüpfung der Lipid-Doppelschicht mit Polysacchariden führt zu einer verhältnismäßig undurchlässigen Membran. Diese Undurchlässigkeit des sogenannten Lipopolysaccharids (LPS) ist allerdings auch eine Voraussetzung für das Recycling von Mureinmetaboliten (KRAFT *et al.*, 1999).

Zucker und Peptide können das LPS nicht durchdringen. Da dies aber unabdingbar für die Nährstoffzufuhr ist, besitzen gramnegative Bakterien transmembranäre Proteine, die relativ unspezifisch eine Reihe von Substanzen passiv transportieren. Diese Proteine werden Porine genannt und sind für viele hydrophile Kationen und Anionen durchlässig. Bei *E. coli* sind insbesondere die Porine OmpC, OmpF und PhoE für diesen unspezifischen Transport zuständig (NIKAIDO, 2003). Es können jedoch nur Moleküle bis zu einer Größe von ca. 600 Dalton durch diese Porine aufgenommen werden.

Der Größenbereich der Porin-Permeabilität kann auch an der Resistenz von *E. coli* gegenüber verschiedener Antibiotika verdeutlicht werden. So ist im Regelfall eine Sensibilität gegenüber Aminoglykosid-Antibiotika (z. B. Streptomycin, Kanamycin, Gentamycin, Amikacin, Netilmycin) festzustellen. Das Molekulargewicht dieser Aminoglykoside bewegt sich im Bereich von 400 – 600 Dalton. Gegenüber dem Makrolidantibiotikum Erythromycin (733 Dalton) oder den Glykopeptid-Antibiotika Vancomycin (1449 Dalton) und Teicoplanin (~ 1880 Dalton) sind die Zellen in der Regel unsensibel. Aufgrund ihrer Größe können diese Moleküle nicht an ihren Wirkort gelangen.

Auch die potentiellen AmpR-Liganden sind vermutlich nicht in der Lage, die äußere Membran zu durchdringen, da bereits das kleinere Molekül, aM-Tripeptid, ein Molekulargewicht von 646 Dalton aufweist. DIETZ versuchte in ihren Experimenten dieses Problem durch Etherpermeabilisierung der Zellen bzw. durch den Einsatz von Sphaeroplasten zu umgehen (DIETZ, 1997). Mit beiden Methoden konnte keine Induktion der β -Laktamase erreicht werden. Dabei ist allerdings kritisch anzumerken, dass die Ether-permeabilisierten Zellen für die Induktionsversuche auf ein Dreissigstel des Kulturvolumens eingeengt wurden und die Etherpermeabilisierung generell schwierig war. Der Induktionsversuch erfolgte außerdem mit isoliertem und abgebautem Murein und nicht mit einzelnen Muropeptiden.

Die Sphaeroblasten sollten mit 350 nM aD-Tripeptid bzw. aD-Tetrapeptid induziert werden. Selbst wenn man davon ausgeht, dass alle Moleküle durch NagZ zu Monosaccharid-Peptiden gespalten werden, sind diese Mengen möglicherweise nicht ausreichend für eine Induktion. JACOBS *et al.* geben die Konzentration von aM-Tripeptid in einer konstitutiv Laktamase-exprimierenden AmpD-Mutante von *E. coli* mit 400 µM an (JACOBS *et al.*, 1997). Diese Konzentration wäre vermutlich zu hoch, da die N-Acetylglucosaminidase NagZ *in-vitro* bei einer Substratkonzentration von 100 µM inhibiert wird (VOTSCH UND TEMPLIN, 2000). Nach VOTSCH UND TEMPLIN liegt die Muropeptid-Konzentration in Zellen mit induzierter β-Laktamase allerdings durchaus in diesem Konzentrationsbereich.

PFEIFLE versuchte die Membranpermeabilität durch Verwendung des membrandefekten *E. coli*-Stammes DC2 bzw. durch den Einsatz der membrandesorientierenden Substanz Polymyxin B Nonapeptid (PMBN) zu erhöhen (PFEIFLE, 1999). Allerdings kamen auch in diesen Versuchen Liganden bis zu einer maximalen Konzentration von ca. 100 nM zum Einsatz. Dies dürfte für eine Induktion der β-Laktamase ebenfalls zu niedrig sein.

In dieser Arbeit wurde daher auch die Strategie der Verwendung des membrandefekten *E. coli* bzw. der Einsatz von PMBN gewählt. Bei Zugabe von ca. 200 µM aM-Tripeptid bzw. aM-Pentapeptid zum Kulturmedium von *E. coli* DC2 / pBP131 konnte allerdings keine Induktion der β-Laktamase mittels Real-Time RT-PCR nachgewiesen werden. Auch PMBN-Behandlung von *E. coli* UGM599 / pBP131 und Zugabe von je ca. 500 µM Ligand in das Kulturmedium führte nicht zu einem Anstieg der *ampC*-mRNA-Menge. Die Kontrollinduktion mit Imipenem war bei beiden Versuchen erfolgreich.

Dabei sollten die eingesetzten Konzentrationen an potentiell aktivierenden Liganden mehr als ausreichend sein. Die gleichbleibende Transkriptionsrate kann daher nur zwei Ursachen haben. Entweder die Liganden können nicht in das Cytoplasma aufgenommen werden oder sie besitzen keine induzierende Wirkung. Zumindest für das aM-Tripeptid muß aber eine positive Wirkung auf die *ampC*-Transkription angenommen werden, da diese auch *in-vitro* festgestellt wurde (JACOBS *et al.*, 1997).

Die Verwendung des membrandefekten Stammes bzw. PMBN sollte zudem die Durchlässigkeit der äußeren Membran für die Liganden sichergestellt haben. Zumindest lassen dies MHK-Studien von PFEIFLE vermuten (PFEIFLE, 1999). Um an ihren Wirkort im Cytoplasma zu gelangen, müssen die Liganden auch die innere Membran durchdringen. Bei einer β-Laktamase-Induktion durch Antibiotika werden die Zellwandabbauprodukte durch die Permease AmpG in das Cytoplasma transportiert und können dort an AmpR binden (KORFMANN

UND SANDERS, 1989). Die Zellwandmetabolite weisen allerdings in der Regel einen GlcNac-(1,6-anhydro)-MurNac-Anteil auf. Man muß daher die Frage stellen, ob AmpG überhaupt in der Lage ist, aM-Peptide zu transportieren. Weitere Transportproteine der inneren Membran von *E. coli* sind Dpp (Dipeptide Permease), Tpp (Tripeptide Permease) und Opp (Oligopeptide Permease) (GOODELL UND HIGGINS, 1987). Diese Proteine sind allerdings nicht in der Lage, Peptide mit Zuckeranteil zu transportieren und kommen daher nicht für den aM-Peptid-Transport in Frage.

Nach einer Studie von CHENG UND PARK besitzt die Permease AmpG tatsächlich eine Substratspezifität für Disaccharide (CHENG UND PARK, 2002). Demnach werden von Opp-negativen *E. coli*-Zellen weder das Tripeptid noch das aM-Tripeptid aufgenommen (siehe Abb. 36).

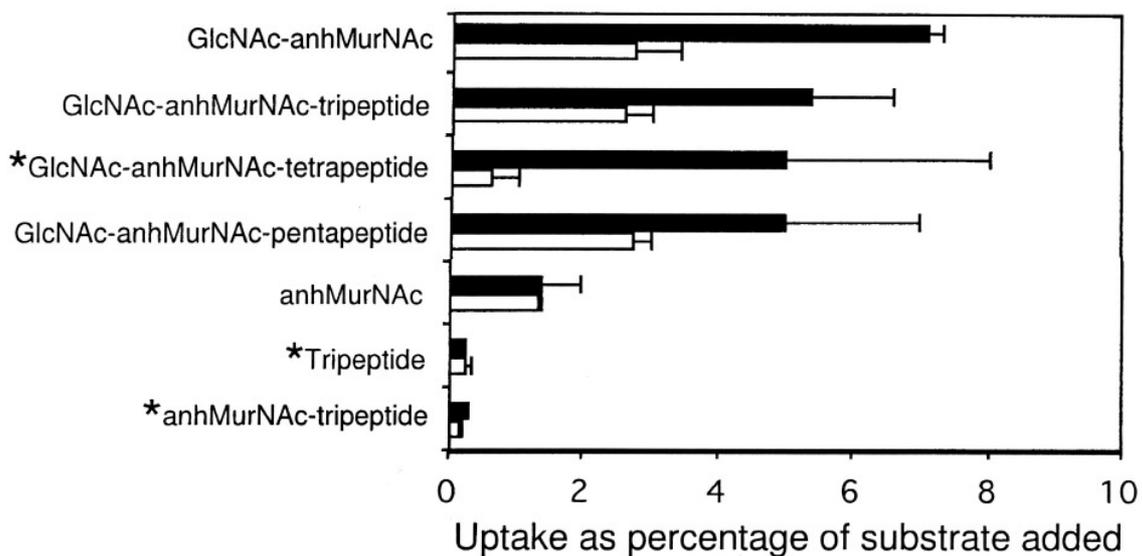


Abbildung 32: Nachweis der Substratspezifität von AmpG für Anhydrodisaccharide (verändert aus CHENG UND PARK, 2002). Schwarze Balken symbolisieren AmpG-positive, weiße Balken AmpG-negative *E. coli*-Zellen. Sternchen an den Molekülnamen bedeuten, dass die Substanz mit ^3H -Diaminopimelinsäure markiert wurde. Alle andere Moleküle wurden mit D-[6- ^3H (N)]Glucosamin markiert.

Diese Ergebnisse weisen eindeutig darauf hin, dass die Liganden aus dem Kulturmedium wahrscheinlich in das Periplasma aufgenommen wurden, jedoch nicht in das Cytoplasma gelangen konnten. Zudem konnten maximal nur etwa 5 – 7 % der zugegebenen Substratmenge von CHENG UND PARK im Cytoplasma nachgewiesen werden. Bei Induktionsversuchen sollte daher eine Konzentration von mindestens 500 μM Ligand eingesetzt werden. Es erscheint

sinnvoll, die durchgeführten Versuche mit den jeweiligen Disacchariden der potentiell aktivierenden Liganden (aD-Tripeptid und aD-Pentapeptid) zu wiederholen.

4.2. Aufklärung der Kristallstruktur des AmpR-Proteins

Für die Entwicklung neuartiger Inhibitoren der β -Laktamase-Expression ist es von großem Interesse die dreidimensionale Struktur des Transkriptionsfaktors AmpR zu kennen. Einerseits könnten dadurch neue Erkenntnisse über die Bindemechanismen der natürlichen Liganden gewonnen werden. Andererseits ließe sich eventuell die Wirksamkeit neuentwickelter Liganden, die AmpR permanent im reprimierenden Status halten sollen, abschätzen.

Bei der Aufklärung der dreidimensionalen Struktur ist das bedeutendste Verfahren die Röntgenstrukturanalyse von Einkristallen (OLLIS UND WHITE, 1990). In letzter Zeit gewinnt allerdings auch die NMR-Spektroskopie an Bedeutung (WUTHRICH, 1990). Da das NMR-Verfahren bisher hauptsächlich bei Proteinen mit Molekulargewichten kleiner 30 kDa zum Einsatz kam, wurde in dieser Arbeit die Röntgenstrukturanalyse gewählt.

Eine Voraussetzung für die Anwendbarkeit dieser Methode ist die Kristallisation des Proteins. In den bislang durchgeführten Versuchen wurden noch keine AmpR-Kristalle ausreichender Größe erhalten. Die chemischen und physischen Bedingungen für die Kristallisation eines Proteins müssen jeweils empirisch ermittelt werden (MCPHERSON, 1990). Dabei ist auch die Reinheit und Homogenität der Probe von großer Bedeutung (OLLIS UND WHITE, 1990). Bezüglich der Reinheit sollten jedoch keine Probleme auftreten, da die massenspektrometrische Analyse des gereinigten AmpR-Proteins keine Kontaminanten aufzeigte. Die Homogenität der Proteinlösung könnte allerdings durchaus problematisch sein, da eine Teildenaturierung des Proteins nicht ausgeschlossen werden kann. Während der Etablierung von Reinigungsstrategien kam es häufig zu einer Präzipitation von AmpR. Das Protein ist in Lösung also verhältnismäßig instabil. Inhomogenitäten durch Präzipitate verhindern allerdings die Bildung von Kristallen.

Durch die Expression und Reinigung von löslichem NusA/AmpR sollte die intrinsische Instabilität umgangen werden. Kristallisationsversuche mit NusA/AmpR waren allerdings bisher auch nicht erfolgreich. Zukünftig müssen daher noch weitere Bedingungen und eventuell andere Fusionspartner überprüft werden.

Generell scheint die Kristallisation von Transkriptionsfaktoren aus der LysR-Familie schwierig. Erst vor kurzem konnte erstmals ein solches Protein in voller Sequenzlänge kristallisiert werden. Dabei handelt sich das Protein CbnR, ein Regulator des Chlorocatechol-Metabolismus

aus *Ralstonia eutropha* (MURAOKA *et al.*, 2003b). Auch die Kristallisierung dieses Proteins erforderte mit einem NaCl-Gehalt des Puffers von 4,3 mol/l außergewöhnliche Bedingungen (MURAOKA *et al.*, 2003a).

Eine andere Möglichkeit Informationen über die dreidimensionale Struktur eines Proteins zu erhalten, sind Homologievergleiche in Proteindatenbanken. Zwischenzeitlich existieren im Internet circa fünf unterschiedliche Programme um ein solches Homologie-Modelling durchzuführen (<http://www.expasy.org>). Dabei wird anhand bekannter Kristallstrukturen von Proteinen mit ähnlicher Aminosäuresequenz ein theoretisches 3D-Modell des unbekanntes Proteins erstellt. Die CPHmodels-Software von LUND *et al.* liefert für ein AmpR ein theoretisches Modell (LUND *et al.*, 1997). Die Struktur basiert dabei auf der oben erwähnten Kristallstruktur von CbnR. Grundsätzlich sind die theoretischen Modelle um so besser, je mehr bekannte Kristallstrukturen zugrunde gelegt werden. Zudem beträgt die Homologie der Aminosäuresequenz von AmpR und CbnR lediglich 20%. Aus diesen Gründen wird auf die Darstellung des theoretischen Modells verzichtet.

Die Resistenz von Bakterien ist ein zunehmendes Problem für die Gesundheit der Menschen. Obwohl große Anstrengungen unternommen werden neue Wirkstoffe zu entwickeln, nimmt die Anzahl wirksamer Substanzen kontinuierlich ab (SCHMIDT, 2004). Auch in der vorliegenden Arbeit konnten aufgrund immer noch unvollständiger Kenntnisse über die Induktion der β -Laktamase-Expression keine neuen Wirkstoff-Moleküle identifiziert werden. Eine Inhibierung der β -Laktamase auf der Ebene der Transkription bleibt damit weiterhin verwehrt. Generell wurden bislang kaum Antibiotika über ein targetbasiertes Screening entwickelt (PROJAN, 2002). Trotz weitreichenden Kenntnissen über das Genom und Proteom von Bakterien, bleibt es unmöglich innerhalb kurzer Zeit wirksame Substanzen zu identifizieren.

5. Zusammenfassung

Bei der Therapie von Infektionen mit gramnegativen Krankheitserregern kommen häufig β -Laktam-Antibiotika zum Einsatz. Die Wirksamkeit dieser Substanzen wird durch die Bildung von β -Laktamasen stark beeinträchtigt. Eine Vielzahl dieser Enzyme ist chromosomal kodiert und wird erst nach Induktion durch β -Laktame exprimiert. Sie gelangen dann in das Periplasma und hydrolysieren dort das Antibiotikum. Eine besondere klinische Bedeutung erhalten diese induzierbaren β -Laktamasen, wenn sie durch eine Mutation in den regulatorischen Genen konstitutiv exprimiert werden.

Bei einer weltweit ansteigenden Resistenz von Bakterien gegenüber vorhandenen Antibiotika, ist es dringend nötig neue Wirkstoffe bzw. Wirkstoffklassen zu entwickeln. Dazu sind genaue Kenntnisse über den Regulationsmechanismus der β -Laktamase nötig. Bei vielen gramnegativen Spezies, insbesondere den Enterobakterien *Citrobacter spp.* und *Enterbacter spp.* ist dies weitgehend der Fall. Die β -Laktam-Antibiotika bewirken eine vermehrte Bildung von Zellwandmetaboliten. Diese Moleküle werden in das Cytoplasma transportiert und binden dort an den Transkriptionsfaktor der β -Laktamase, AmpR. Dabei verdrängen sie UDP-MurNac-Pentapeptid, eine Mureinvorstufe, die im Normalzustand an AmpR gebunden ist und das Protein in einer reprimierenden Konformation hält. Durch die Bindung der Mureinmetabolite ändert sich vermutlich die dreidimensionale Struktur von AmpR und ermöglicht die Transkription des β -Laktamasegens.

Welche Zellwandabbauprodukte an AmpR binden ist noch nicht vollständig aufgeklärt. In Frage kommen das (1,6-anhydro)-MurNac-Tripeptid und das (1,6-anhydro)-MurNac-Pentapeptid. Ziel dieser Arbeit war die Durchführung eines Transkriptions-Assays, der die Wirkung beider Moleküle auf die Laktamase-Transkription vergleichend zeigen sollte. Dazu wurden einzelne Komponenten benötigt, die im Rahmen dieser Arbeit isoliert und gereinigt werden sollten.

Durch Überexpression in *E. coli* konnte der Transkriptionsfaktor AmpR aus *C. freundii* in großen Mengen rein gewonnen werden. Das Protein fiel bei der Expression in unlöslichen Inclusion Bodies aus und konnte durch Solubilisierungs- und Renaturierungsprozesse vermutlich in seine native Struktur gebracht werden. Durch Fusion des NusA-Proteins an die

AmpR-Sequenz ergab sich auch die Möglichkeit das Protein in löslicher Form zu reinigen. Beide isolierten AmpR-Proteine zeigten in DNA-Bindungstests die gleiche DNA-Bindeaktivität.

Weiterhin wurden im Rahmen dieser Arbeit die potentiell aktivierenden Liganden (1,6-anhydro)-MurNac-Tripeptid und (1,6-anhydro)-MurNac-Pentapeptid aus *E. coli*-Zellen isoliert und mittels HPLC gereinigt.

Durchgeführte Transkriptions-Assays konnten keine Unterschiede in der β -Laktamase-Transkription nachweisen. Dabei war es unerheblich, ob die entstandene mRNA mittels herkömmlicher RT-PCR oder mittels Real-Time RT-PCR detektiert wurde. In *in-vivo* Induktionsversuchen stellte sich heraus, dass die verwendete DNA möglicherweise nicht in der Lage ist als funktionales Template für die *In-vitro* Transkription zu dienen.

Zusätzlich wurden deshalb *In-vivo* Studien durchgeführt, bei denen die potentiell aktivierenden Liganden in das Kulturmedium gegeben wurden. Auch in diesen Experimenten konnten keine Unterschiede in der β -Laktamase-Transkription gemessen werden. Induktionsversuche mit dem starken Induktor Imipenem waren dagegen erfolgreich. Die Ursache für die nicht vorhandene Wirkung von (1,6-anhydro)-MurNac-Tripeptid und (1,6-anhydro)-MurNac-Pentapeptid, liegt vermutlich in der Substratspezifität von AmpG, denn diese Permease, die Zellwandmetabolite in das Cytoplasma transportiert, ist spezifisch für Moleküle mit Disaccharidanteil. Erst im Cytoplasma kommt es zur Abspaltung eines Zuckers und zur Freisetzung der induzierenden Liganden.

Im Rahmen einer Kooperation sollte außerdem die dreidimensionale Struktur des AmpR-Proteins aufgeklärt werden. Dazu wurde gereinigtes AmpR- und NusA/AmpR-Protein unter verschiedenen Bedingungen in Kristallisationsversuchen nach der sogenannten „hanging-drop“-Methode eingesetzt. Bislang sind die entstandenen Kristalle allerdings noch zu klein, um sie einer Röntgenstrukturanalyse zu unterziehen.

6. Literaturverzeichnis

- Afzal-Shah, M., Woodford, N., Livermore, D.M. (2001): Characterization of OXA-25, OXA-26, and OXA-27, molecular class D beta-lactamases associated with carbapenem resistance in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45: 583-588
- Ambler, R.P. (1980): The structure of beta-lactamases. *Philos. Trans. R. Soc. Lond B Biol. Sci.* 289: 321-331
- American Society of Microbiology (1995): Report of the ASM task force on antibiotic resistance. *Antimicrob. Agents Chemother. Suppl.* 1-23
- Amyes, S.G. (2000): The rise in bacterial resistance is partly because there have been no new classes of antibiotics since the 1960s. *BMJ* 320: 199-200
- Asoh, S., Matsuzawa, H., Ishino, F., Strominger, J.L., Matsushashi, M., Ohta, T. (1986): Nucleotide sequence of the *pbpA* gene and characteristics of the deduced amino acid sequence of penicillin-binding protein 2 of *Escherichia coli* K12. *Eur. J. Biochem.* 160: 231-238
- Baquero, F. (1996): Trends in antibiotic resistance of respiratory pathogens: an analysis and commentary on a collaborative surveillance study. *J. Antimicrob. Chemother.* 38 Suppl A: 117-132
- Baquero, M.R., Bouzon, M., Quintela, J.C., Ayala, J.A., Moreno, F. (1996): *dacD*, an *Escherichia coli* gene encoding a novel penicillin-binding protein (PBP6b) with DD-carboxypeptidase activity. *J. Bacteriol.* 178: 7106-7111
- Bartowsky, E., Normark, S. (1991): Purification and mutant analysis of *Citrobacter freundii* AmpR, the regulator for chromosomal AmpC beta-lactamase. *Mol Microbiol.* 5: 1715-1725
- Batchelor, F.R., Doyle, F.P., Nayler, J.H., Rolinson, G.N. (1959): Synthesis of penicillin: 6-aminopenicillanic acid in penicillin fermentations. *Nature* 183: 257-258
- Bauernfeind, A., Stemplinger, I., Jungwirth, R., Ernst, S., Casellas, J.M. (1996): Sequences of beta-lactamase genes encoding CTX-M-1 (MEN-1) and CTX-M-2 and relationship of their amino acid sequences with those of other beta-lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.* 40: 509-513
- Bermudes, H., Jude, F., Chaibi, E.B., Arpin, C., Bebear, C., Labia, R., Quentin, C. (1999): Molecular characterization of TEM-59 (IRT-17), a novel inhibitor-resistant TEM-derived beta-lactamase in a clinical isolate of *Klebsiella oxytoca*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 43: 1657-1661
- Bishop, R.E., Weiner, J.H. (1993): Overproduction, solubilization, purification and DNA-binding properties of AmpR from *Citrobacter freundii*. *Eur. J. Biochem* 213: 405-412
- Bonfiglio, G., Laksai, Y., Franchino, L., Amicosante, G., Nicoletti, G. (1998): Mechanisms of beta-lactam resistance amongst *Pseudomonas aeruginosa* isolated in an Italian survey. *J. Antimicrob. Chemother.* 42: 697-702
- Bornet, C., Davin-Regli, A., Bosi, C., Pages, J.M., Bollet, C. (2000): Imipenem resistance of enterobacter aerogenes mediated by outer membrane permeability. *J. Clin. Microbiol.* 38: 1048-1052

- Bou, G., Oliver, A., Martinez-Beltran, J. (2000): OXA-24, a novel class D beta-lactamase with carbapenemase activity in an *Acinetobacter baumannii* clinical strain. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44: 1556-1561
- Braun, V., Rehn, K. (1969): Chemical characterization, spatial distribution and function of a lipoprotein (murein-lipoprotein) of the *E. coli* cell wall. The specific effect of trypsin on the membrane structure. *Eur. J. Biochem.* 10: 426-438
- Broome-Smith, J.K., Ioannidis, I., Edelman, A., Spratt, B.G. (1988): Nucleotide sequences of the penicillin-binding protein 5 and 6 genes of *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res.* 16: 1617
- Bush, K. (2001): New beta-lactamases in gram-negative bacteria: diversity and impact on the selection of antimicrobial therapy. *Clin. Infect. Dis.* 32: 1085-1089
- Bush, K., Jacoby, G.A., Medeiros, A.A. (1995): A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob. Agents Chemother.* 39: 1211-1233
- Carrio, M.M., Villaverde, A. (2001): Protein aggregation as bacterial inclusion bodies is reversible. *FEBS Lett.* 489: 29-33
- Chaves, J., Ladona, M.G., Segura, C., Coira, A., Reig, R., Ampurdanes, C. (2001): SHV-1 beta-lactamase is mainly a chromosomally encoded species-specific enzyme in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45: 2856-2861
- Chen, H.Y., Yuan, M., Livermore, D.M. (1995): Mechanisms of resistance to beta-lactam antibiotics amongst *Pseudomonas aeruginosa* isolates collected in the UK in 1993. *J. Med. Microbiol.* 43: 300-309
- Cheng, Q., Li, H., Merdek, K., Park, J.T. (2000): Molecular characterization of the beta-N-acetylglucosaminidase of *Escherichia coli* and its role in cell wall recycling. *J. Bacteriol.* 182: 4836-4840
- Cheng, Q., Park, J.T. (2002): Substrate specificity of the AmpG permease required for recycling of cell wall anhydro-muropeptides. *J. Bacteriol.* 184: 6434-6436
- Coast, J., Smith, R.D., Millar, M.R. (1998): An economic perspective on policy to reduce antimicrobial resistance. *Soc. Sci. Med.* 46: 29-38
- Coudron, P.E., Moland, E.S., Thomson, K.S. (2000): Occurrence and detection of AmpC beta-lactamases among *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Proteus mirabilis* isolates at a veterans medical center. *J. Clin. Microbiol.* 38: 1791-1796
- Dalla-Costa, L.M., Coelho, J.M., Souza, H.A., Castro, M.E., Stier, C.J., Bragagnolo, K.L., Rea-Neto, A., Pentead-Filho, S.R., Livermore, D.M., Woodford, N. (2003): Outbreak of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* producing the OXA-23 enzyme in Curitiba, Brazil. *J. Clin. Microbiol.* 41: 3403-3406
- Davis, G.D., Elisee, C., Newham, D.M., Harrison, R.G. (1999): New fusion protein systems designed to give soluble expression in *Escherichia coli*. *Biotechnol. Bioeng.* 65: 382-388
- Di Berardino, M., Dijkstra, A., Stuber, D., Keck, W., Gubler, M. (1996): The monofunctional glycosyltransferase of *Escherichia coli* is a member of a new class of peptidoglycan-synthesising enzymes. *FEBS Lett.* 392: 184-188
- Dietz, H. (1997): Zusammenhang zwischen β -Laktamaseinduktion und Peptidoglykanmetabolismus. Dissertation. Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn.

- Dietz, H., Pfeifle, D., Wiedemann, B. (1997): The signal molecule for beta-lactamase induction in *Enterobacter cloacae* is the anhydromuramyl-pentapeptide. *Antimicrob. Agents Chemother.* 41: 2113-2120
- Dijkstra, A.J., Hermann, F., Keck, W. (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., Keck, W. (1996): Identification of new members of the lytic transglycosylase family in *Haemophilus influenzae* and *Escherichia coli*. *Microb. Drug Resist.* 2: 141-145
- Dunne, E.F., Fey, P.D., Kludt, P., Reporter, R., Mostashari, F., Shillam, P., Wicklund, J., Miller, C., Holland, B., Stamey, K., Barrett, T.J., Rasheed, J.K., Tenover, F.C., Ribot, E.M., Angulo, F.J. (2000): Emergence of domestically acquired ceftriaxone-resistant *Salmonella* infections associated with AmpC beta-lactamase. *JAMA* 284: 3151-3156
- Edwards, J.R., Turner, P.J., Wannop, C., Withnell, E.S., Grindey, A.J., Nairn, K. (1989): In vitro antibacterial activity of SM-7338, a carbapenem antibiotic with stability to dehydropeptidase I. *Antimicrob. Agents Chemother.* 33: 215-222
- Ehlert, K., Holtje, J.V. (1996): Role of precursor translocation in coordination of murein and phospholipid synthesis in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 178: 6766-6771
- Engel, H., Kazemier, B., Keck, W. (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
- Fitzmaurice, J., Glennon, M., Duffy, G., Sheridan, J.J., Carroll, C., Maher, M. (2004): Application of real-time PCR and RT-PCR assays for the detection and quantitation of VT 1 and VT 2 toxin genes in *E. coli* O157:H7. *Mol. Cell Probes* 18: 123-132
- Genereux, C., Dehareng, D., Devreese, B., Van Beeumen, J., Frere, J.M., Joris, B. (2004): Mutational analysis of the catalytic centre of the *Citrobacter freundii* AmpD N-acetylmuramyl-L-alanine amidase. *Biochem. J.* 377: 111-120
- Gill, S.C., von Hippel, P.H. (1989): Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data. *Anal. Biochem.* 182: 319-326
- Girlich, D., Karim, A., Poirel, L., Cavin, M.H., Verny, C., Nordmann, P. (2000): Molecular epidemiology of an outbreak due to IRT-2 beta-lactamase-producing strains of *Klebsiella pneumoniae* in a geriatric department. *J. Antimicrob. Chemother.* 45: 467-473
- Glauner, B., Holtje, J.V., Schwarz, U. (1988): The composition of the murein of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 263: 10088-10095
- Goode, B.L., Feinstein, S.C. (1992): "Speedprep" purification of template for double-stranded DNA sequencing. *Biotechniques* 12: 374-375
- Goodell, E.W. (1985): Recycling of murein by *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 163: 305-310
- Goodell, E.W., Higgins, C.F. (1987): Uptake of cell wall peptides by *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 169: 3861-3865
- Goodell, E.W., Schwarz, U. (1985): Release of cell wall peptides into culture medium by exponentially growing *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 162: 391-397

- Haeggman, S., Lofdahl, S., Burman, L.G. (1997): An allelic variant of the chromosomal gene for class A beta-lactamase K2, specific for *Klebsiella pneumoniae*, is the ancestor of SHV-1. *Antimicrob. Agents Chemother.* 41: 2705-2709
- Halle, E., Majcher-Peszynska, J., Drewelow, B. (2002): Linezolid: das erste Antibiotikum aus der Klasse der Oxazolidinone. *Chemotherapie Journal* 1/2002.
- Hanson, N.D. (2003): AmpC beta-lactamases: what do we need to know for the future? *J. Antimicrob. Chemother.* 52: 2-4
- Hanson, N.D., Sanders, C.C. (1999): Regulation of inducible AmpC beta-lactamase expression among Enterobacteriaceae. *Curr. Pharm. Des* 5: 881-894
- Harrison, S.C., Aggarwal, A.K. (1990): DNA recognition by proteins with the helix-turn-helix motif. *Annu. Rev. Biochem* 59: 933-969
- Henderson, T.A., Templin, M., Young, K.D. (1995): Identification and cloning of the gene encoding penicillin-binding protein 7 of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 177: 2074-2079
- Henderson, T.A., Young, K.D., Denome, S.A., Elf, P.K. (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., Haughn, G.W., Calvo, J.M., Wallace, J.C. (1988): A large family of bacterial activator proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 85: 6602-6606
- Heymann, D.L. (2000): The Urgency of a Massive Effort Against Infectious Diseases. U.S. House of Representatives, Committee on International Relations.
- Higashi, Y., Strominger, J.L., Sweeley, C.C. (1967): Structure of a lipid intermediate in cell wall peptidoglycan synthesis: a derivative of a C55 isoprenoid alcohol. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 57: 1878-1884
- Higuchi, R., Dollinger, G., Walsh, P.S., Griffith, R. (1992): Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology (N. Y.)* 10: 413-417
- Higuchi, R., Fockler, C., Dollinger, G., Watson, R. (1993): Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology (N. Y.)* 11: 1026-1030
- Hirakata, Y., Izumikawa, K., Yamaguchi, T., Takemura, H., Tanaka, H., Yoshida, R., Matsuda, J., Nakano, M., Tomono, K., Maesaki, S., Kaku, M., Yamada, Y., Kamihira, S., Kohno, S. (1998): Rapid detection and evaluation of clinical characteristics of emerging multiple-drug-resistant gram-negative rods carrying the metallo-beta-lactamase gene blaIMP. *Antimicrob. Agents Chemother.* 42: 2006-2011
- Hlodan, R., Craig, S., Pain, R.H. (1991): Protein folding and its implications for the production of recombinant proteins. *Biotechnol. Genet. Eng. Rev.* 9: 47-88
- Holtje, J.V. (1996): A hypothetical holoenzyme involved in the replication of the murein sacculus of *Escherichia coli*. *Microbiology* 142 (Pt 8): 1911-1918
- Holtje, J.V. (1998): Growth of the stress-bearing and shape-maintaining murein sacculus of *Escherichia coli*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62: 181-203
- Holtje, J.V., Kopp, U., Ursinus, A., Wiedemann, B. (1994): The negative regulator of beta-lactamase induction AmpD is a N-acetyl- anhydromuramyl-L-alanine amidase. *FEMS Microbiol. Lett.* 122: 159-164

- Holtje, J.V., Mirelman, D., Sharon, N., Schwarz, U. (1975): Novel type of murein transglycosylase in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 124: 1067-1076
- Holtje, J.V., Tuomanen, E.I. (1991): The murein hydrolases of *Escherichia coli*: properties, functions and impact on the course of infections in vivo. *J. Gen. Microbiol.* 137 (Pt 3): 441-454
- Honore, N., Nicolas, M.H., Cole, S.T. (1986): Inducible cephalosporinase production in clinical isolates of *Enterobacter cloacae* is controlled by a regulatory gene that has been deleted from *Escherichia coli*. *EMBO J.* 5: 3709-3714
- Ishino, F., Mitsui, K., Tamaki, S., Matsuhashi, M. (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. Commun.* 97: 287-293
- Izaki, K., Matsuhashi, M., Strominger, J.L. (1966): Glycopeptide transpeptidase and D-alanine carboxypeptidase: penicillin-sensitive enzymatic reactions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 55: 656-663
- Jacobs, C. (1997): Pharmacia Biotech & Science prize. 1997 grand prize winner. Life in the balance: cell walls and antibiotic resistance. *Science* 278: 1731-1732
- Jacobs, C., Frere, J.M., Normark, S. (1997): Cytosolic intermediates for cell wall biosynthesis and degradation control inducible beta-lactam resistance in gram-negative bacteria. *Cell* 88: 823-832
- Jacobs, C., Huang, L.J., Bartowsky, E., Normark, S., Park, J.T. (1994): Bacterial cell wall recycling provides cytosolic muropeptides as effectors for beta-lactamase induction. *EMBO J.* 13: 4684-4694
- Jacobs, C., Joris, B., Jamin, M., Klarsov, K., Van Beeumen, J., Mengin-Lecreulx, D., van Heijenoort, J., Park, J.T., Normark, S., Frere, J.M. (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
- Jaffe, A., Chabbert, Y.A., Semonin, O. (1982): Role of porin proteins OmpF and OmpC in the permeation of beta-lactams. *Antimicrob. Agents Chemother.* 22: 942-948
- Jaurin, B., Grundstrom, T., Edlund, T., Normark, S. (1981): The *E. coli* beta-lactamase attenuator mediates growth rate-dependent regulation. *Nature* 290: 221-225
- Keck, W., van Leeuwen, A.M., Huber, M., Goodell, E.W. (1990): Cloning and characterization of mepA, the structural gene of the penicillin-insensitive murein endopeptidase from *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 4: 209-219
- Kerr, L.D. (1995): Electrophoretic mobility shift assay. *Methods Enzymol.* 254: 619-632
- Kirby, W.M.M. (1944): Extraction of a highly potent penicillin inactivator from penicillin resistant staphylococci. *Science* 99: 452-453
- Kirby, W.M.M. (1945): Bacteriostatic and lytic actions of penicillin on sensitive and resistant staphylococci. *J. Clin. Invest.* 24: 165-169
- Klein, J.O., Finland, M. (1963): The new penicillins. *N. Engl. J. Med.* 269: 1019-1024, 1074-1082, 1129-1134
- Kopp, U., Wiedemann, B., Lindquist, S., Normark, S. (1993): Sequences of wild-type and mutant ampD genes of *Citrobacter freundii* and *Enterobacter cloacae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 37: 224-228

- Korat, B., Mottl, H., Keck, W. (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. (1988): Molekulargenetische Untersuchungen zur Regulation der *Enterobacter cloacae* beta-Laktamase. Dissertation. Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn.
- Korfmann, G., Sanders, C.C. (1989): *ampG* is essential for high-level expression of AmpC beta-lactamase in *Enterobacter cloacae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 33: 1946-1951
- Korfmann, G., Wiedemann, B. (1988): Genetic control of beta-lactamase production in *Enterobacter cloacae*. *Rev. Infect. Dis.* 10: 793-799
- Kraft, A.R., Prabhu, J., Ursinus, A., Holtje, J.V. (1999): Interference with murein turnover has no effect on growth but reduces beta-lactamase induction in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 181: 7192-7198
- Kraft, A.R., Templin, M.F., Holtje, J.V. (1998): Membrane-bound lytic endotransglycosylase in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 180: 3441-3447
- Kropp, H., Sundelof, J.G., Kahan, J.S., Kahan, F.M., Birnbaum, J. (1980): MK0787 (N-formimidoyl thienamycin): evaluation of in vitro and in vivo activities. *Antimicrob. Agents Chemother.* 17: 993-1000
- Kuga, A., Okamoto, R., Inoue, M. (2000): *ampR* gene mutations that greatly increase class C beta-lactamase activity in *Enterobacter cloacae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44: 561-567
- Kurokawa, H., Yagi, T., Shibata, N., Shibayama, K., Arakawa, Y. (1999): Worldwide proliferation of carbapenem-resistant gram-negative bacteria. *Lancet* 354: 955
- Lacey, R.W. (1984): Antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus* and streptococci. *Br. Med. Bull.* 40: 77-83
- Laemmli, U.K. (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685
- Langley, D., Guest, J.R. (1977): Biochemical genetics of the alpha-keto acid dehydrogenase complexes of *Escherichia coli* K12: isolation and biochemical properties of deletion mutants. *J. Gen. Microbiol.* 99: 263-276
- Langley, K.E., Berg, T.F., Strickland, T.W., Fenton, D.M., Boone, T.C., Wypych, J. (1987): Recombinant-DNA-derived bovine growth hormone from *Escherichia coli*. 1. Demonstration that the hormone is expressed in reduced form, and isolation of the hormone in oxidized, native form. *Eur. J. Biochem.* 163: 313-321
- Li, X.Z., Ma, D., Livermore, D.M., Nikaido, H. (1994): Role of efflux pump(s) in intrinsic resistance of *Pseudomonas aeruginosa*: active efflux as a contributing factor to beta-lactam resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* 38: 1742-1752
- Lindberg, F., Lindquist, S., Normark, S. (1987): Inactivation of the *ampD* gene causes semiconstitutive overproduction of the inducible *Citrobacter freundii* beta-lactamase. *J. Bacteriol.* 169: 1923-1928
- Lindberg, F., Westman, L., Normark, S. (1985): Regulatory components in *Citrobacter freundii ampC* beta-lactamase induction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 82: 4620-4624

- Lindquist, S., Lindberg, F., Normark, S. (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., Weston-Hafer, K., Schmidt, H., Pul, C., Korfmann, G., Erickson, J., Sanders, C., Martin, H.H., Normark, S. (1993): AmpG, a signal transducer in chromosomal beta-lactamase induction. *Mol Microbiol.* 9: 703-715
- Livermore, D.M. (1995): beta-Lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clin. Microbiol. Rev.* 8: 557-584
- Livermore, D.M. (1998): Beta-lactamase-mediated resistance and opportunities for its control. *J. Antimicrob. Chemother.* 41 Suppl D: 25-41
- Livermore, D.M., Williams, D. (1996): beta-Lactams. mode of action and mechanisms of bacterial resistance. In: Lorian, V. (Ed.), *Antibiotics in laboratory medicine*. Williams & Wilkins,
- Livermore, D.M., Woodford, N. (2000): Carbapenemases: a problem in waiting? *Curr. Opin. Microbiol.* 3: 489-495
- Lodge, J., Busby, S., Piddock, L. (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., Templin, M.F., Kraft, A.R., Vollmer, W., Holtje, J.V. (1997): Outer membrane localization of murein hydrolases: MltA, a third lipoprotein lytic transglycosylase in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 179: 5465-5470
- Lund, O., Frimand, K., Gorodkin, J., Bohr, H., Bohr, J., Hansen, J., Brunak, S. (1997): Protein distance constraints predicted by neural networks and probability density functions. *Protein Eng* 10: 1241-1248
- Mahlen, S.D., Morrow, S.S., Abdalhamid, B., Hanson, N.D. (2003): Analyses of ampC gene expression in *Serratia marcescens* reveal new regulatory properties. *J. Antimicrob. Chemother.* 51: 791-802
- McPherson, A. (1990): Current approaches to macromolecular crystallization. *Eur. J. Biochem.* 189: 1-23
- Miroux, B., Walker, J.E. (1996): Over-production of proteins in *Escherichia coli*: mutant hosts that allow synthesis of some membrane proteins and globular proteins at high levels. *J. Mol Biol.* 260: 289-298
- Moellering, R.C., Eliopoulos, G.M., Sentochnik, D.E. (1989): The carbapenems: new broad spectrum beta-lactam antibiotics. *J. Antimicrob. Chemother.* 24 Suppl A: 1-7
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., Erlich, H. (1986): Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 51 Pt 1: 263-273
- Muraoka, S., Okumura, R., Ogawa, N., Nonaka, T., Miyashita, K., Senda, T. (2003a): Crystal structure of a full-length LysR-type transcriptional regulator, CbnR: unusual combination of two subunit forms and molecular bases for causing and changing DNA bend. *J. Mol. Biol.* 328: 555-566
- Muraoka, S., Okumura, R., Urugami, Y., Nonaka, T., Ogawa, N., Miyashita, K., Senda, T. (2003b): Purification and crystallization of a LysR-type transcriptional regulator CBNR from *Ralstonia eutropha* NH9. *Protein Pept. Lett.* 10: 325-329

- Mutschler, E. (1996): Arzneimittelwirkungen, 7. Auflage, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart
- Nakagawa, J., Tamaki, S., Matsuhashi, M. (1979): Purified penicillin binding proteins 1Bs from *Escherichia coli* membrane showing activities of both peptidoglycan polymerase and peptidoglycan crosslinking enzyme. *Agric. Biol. Chem.* 43: 1379-1380
- Nakamura, M., Maruyama, I.N., Soma, M., Kato, J., Suzuki, H., Horota, Y. (1983): On the process of cellular division in *Escherichia coli*: nucleotide sequence of the gene for penicillin-binding protein 3. *Mol. Gen. Genet.* 191: 1-9
- Nakao, M., Yukishige, K., Kondo, M., Imada, A. (1986): Novel morphological changes in gram-negative bacteria caused by combination of bulgecin and cefmenoxime. *Antimicrob. Agents Chemother.* 30: 414-417
- Neu, H.C. (1992): The crisis in antibiotic resistance. *Science* 257: 1064-1073
- Nikaido, H. (2003): Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 67: 593-656
- Nordmann, P., Poirel, L. (2002): Emerging carbapenemases in Gram-negative aerobes. *Clin. Microbiol. Infect.* 8: 321-331
- Normark, S., Bartowsky, E., Lindquist, S., Galleni, M., Tuomanen, E., Martin, H.H., Schmidt, H. (1990): Mechanism of chromosomal β -lactamase induction in enterobacteria. In: Neu, H.C. (Ed.), *New antibacterial strategies*. Churchill Livingstone, Edinburgh, 161-173
- Ogawa, J., Long, S.R. (1995): The *Rhizobium meliloti* groELc locus is required for regulation of early nod genes by the transcription activator NodD. *Genes Dev.* 9: 714-729
- Oliver, A., Perez-Diaz, J.C., Coque, T.M., Baquero, F., Canton, R. (2001): Nucleotide sequence and characterization of a novel cefotaxime-hydrolyzing beta-lactamase (CTX-M-10) isolated in Spain. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45: 616-620
- Ollis, D., White, S. (1990): Protein crystallization. *Methods Enzymol.* 182: 646-659
- Olsson, O., Bergstrom, S., Lindberg, F.P., Normark, S. (1983): ampC beta-lactamase hyperproduction in *Escherichia coli*: natural ampicillin resistance generated by horizontal chromosomal DNA transfer from *Shigella*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 80: 7556-7560
- Park, J.T. (1996): The convergence of murein recycling research with beta-lactamase research. *Microb. Drug Resist.* 2: 105-112
- Patlak, M. (1996): Book Reopened on Infectious Diseases. *FDA Consumer Magazine* April 1996.
- PEG. (2001): PEG Resistenzstudie. Bonn, Paul-Ehrlich-Gesellschaft für Chemotherapie e.V., Arbeitsgemeinschaft Empfindlichkeitsprüfungen & Resistenz.
- Petrosino, J.F., Pendleton, A.R., Weiner, J.H., Rosenberg, S.M. (2002): Chromosomal system for studying AmpC-mediated beta-lactam resistance mutation in *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 46: 1535-1539
- Pfeifle, D. (1999): Die Initiierung der AmpC- β -Laktamase-Produktion in *Enterobacter cloacae*. Dissertation. Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn.

- Pfeifle, D., Janas, E., Wiedemann, B. (2000): Role of penicillin-binding proteins in the initiation of the AmpC beta-lactamase expression in *Enterobacter cloacae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44: 169-172
- Pfeifle, D., Janas, E., Wiegand, I., Wiedemann, B. (1999): Die Initiierung der AmpC-Lactamase-Induktion in *Enterobacter cloacae*. *Chemotherapie Journal* 2/1999: 82-84
- Philippon, A., Arlet, G., Jacoby, G.A. (2002): Plasmid-determined AmpC-type beta-lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.* 46: 1-11
- Piddock, L.J., Griggs, D.J. (1991): Selection and characterization of cefepime-resistant gram-negative bacteria. *J. Antimicrob. Chemother.* 28: 669-676
- Poirel, L., Guibert, M., Girlich, D., Naas, T., Nordmann, P. (1999): Cloning, sequence analyses, expression, and distribution of ampC-ampR from *Morganella morganii* clinical isolates. *Antimicrob. Agents Chemother.* 43: 769-776
- Porath, J., Carlsson, J., Olsson, I., Belfrage, G. (1975): Metal chelate affinity chromatography, a new approach to protein fractionation. *Nature* 258: 598-599
- Pottumarthy, S., Moland, E.S., Juretschko, S., Swanzy, S.R., Thomson, K.S., Fritsche, T.R. (2003): NmcA carbapenem-hydrolyzing enzyme in *Enterobacter cloacae* in North America. *Emerg. Infect. Dis.* 9: 999-1002
- Projan, S.J. (2002): New (and not so new) antibacterial targets - from where and when will the novel drugs come? *Curr. Opin. Pharmacol.* 2: 513-522
- Queenan, A.M., Torres-Viera, C., Gold, H.S., Carmeli, Y., Eliopoulos, G.M., Moellering, R.C., Jr., Quinn, J.P., Hindler, J., Medeiros, A.A., Bush, K. (2000): SME-type carbapenem-hydrolyzing class A beta-lactamases from geographically diverse *Serratia marcescens* strains. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44: 3035-3039
- Quinn, J.P. (1998): Clinical problems posed by multiresistant nonfermenting gram-negative pathogens. *Clin. Infect. Dis.* 27 Suppl 1: S117-S124
- Reacher, M.H., Shah, A., Livermore, D.M., Wale, M.C., Graham, C., Johnson, A.P., Heine, H., Monnickendam, M.A., Barker, K.F., James, D., George, R.C. (2000): Bacteraemia and antibiotic resistance of its pathogens reported in England and Wales between 1990 and 1998: trend analysis. *BMJ* 320: 213-216
- Riccio, M.L., Franceschini, N., Boschi, L., Caravelli, B., Cornaglia, G., Fontana, R., Amicosante, G., Rossolini, G.M. (2000): Characterization of the metallo-beta-lactamase determinant of *Acinetobacter baumannii* AC-54/97 reveals the existence of bla(IMP) allelic variants carried by gene cassettes of different phylogeny. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44: 1229-1235
- Richmond, M.H., Wotton, S. (1976): Comparative study of seven cephalosporins: susceptibility to beta-lactamases and ability to penetrate the surface layers of *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 10: 219-222
- Rodriguez-Antona, C., Jover, R., Gomez-Lechon, M.J., Castell, J.V. (2000): Quantitative RT-PCR measurement of human cytochrome P-450s: application to drug induction studies. *Arch. Biochem. Biophys.* 376: 109-116
- Roempp (1995): *Chemie Lexikon*, 9. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart

- Roh, I.K., Kim, I.J., Chung, J.H., Byun, S.M. (1996): Affinity purification and binding characteristics of *Citrobacter freundii* AmpR, the transcriptional regulator of the ampC beta-lactamase gene. *Biotechnol. Appl. Biochem* 23 (Pt 2): 149-154
- Romeis, T., Holtje, J.V. (1994): Penicillin-binding protein 7/8 of *Escherichia coli* is a DD-endopeptidase. *Eur. J. Biochem.* 224: 597-604
- Saiki, R.K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K.B., Horn, G.T., Erlich, H.A., Arnheim, N. (1985): Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230: 1350-1354
- Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A.R. (1977): DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 74: 5463-5467
- Schell, M.A. (1993): Molecular biology of the LysR family of transcriptional regulators. *Annu. Rev. Microbiol.* 47: 597-626
- Schiffer, G., Holtje, J.V. (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
- Schmidt, F.R. (2004): The challenge of multidrug resistance: actual strategies in the development of novel antibacterials. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 63: 335-343
- Seeberg, A.H., Tolxdorff-Neutzling, R.M., Wiedemann, B. (1983): Chromosomal beta-lactamases of *Enterobacter cloacae* are responsible for resistance to third-generation cephalosporins. *Antimicrob. Agents Chemother.* 23: 918-925
- Senda, K., Arakawa, Y., Ichiyama, S., Nakashima, K., Ito, H., Ohsuka, S., Shimokata, K., Kato, N., Ohta, M. (1996): PCR detection of metallo-beta-lactamase gene (blaIMP) in gram-negative rods resistant to broad-spectrum beta-lactams. *J. Clin. Microbiol.* 34: 2909-2913
- Seoane, A., Francia, M.V., Garcia Lobo, J.M. (1992): Nucleotide sequence of the ampC-ampR region from the chromosome of *Yersinia enterocolitica*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 36: 1049-1052
- Sheehan, J.C., Henery-Logan, K.R. (1959): Total synthesis of penicillin V. *J. Am. Chem. Soc.* 81: 3089-3094
- Soberon, X., Covarrubias, L., Bolivar, F. (1980): Construction and characterization of new cloning vehicles. IV. Deletion derivatives of pBR322 and pBR325. *Gene* 9: 287-305
- Spratt, B.G. (1977): Temperature-sensitive cell division mutants of *Escherichia coli* with thermolabile penicillin-binding proteins. *J. Bacteriol.* 131: 293-305
- Spratt, B.G. (1994): Resistance to antibiotics mediated by target alterations. *Science* 264: 388-393
- Stragier, P., Richaud, F., Borne, F., Patte, J.C. (1983): Regulation of diaminopimelate decarboxylase synthesis in *Escherichia coli*. I. Identification of a lysR gene encoding an activator of the lysA gene. *J. Mol. Biol.* 168: 307-320
- Studier, F.W., Moffatt, B.A. (1986): Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J. Mol. Biol.* 189: 113-130
- Studier, F.W., Rosenberg, A.H., Dunn, J.J., Dubendorff, J.W. (1990): Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes. *Methods Enzymol.* 185: 60-89

- Suzuki, H., Nishimura, Y., Hirota, Y. (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., Bonner, D.P. (1985): Discovery and development of the monobactams. *Rev. Infect. Dis.* 7 Suppl 4: S579-S593
- Templin, M., Holtje, J.V. (2000): Auf- und Abbau des Mureins begleiten das Wachstum der Bakterienzellwand. *Biospektrum* 2: 103-108
- Templin, M.F., Ursinus, A., Holtje, J.V. (1998): Unpublished data.
- Thunnissen, A.M., Rozeboom, H.J., Kalk, K.H., Dijkstra, B.W. (1995): Structure of the 70-kDa soluble lytic transglycosylase complexed with bulgecin A. Implications for the enzymatic mechanism. *Biochemistry* 34: 12729-12737
- Tomasz, A. (1974): The role of autolysins in cell death. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 235: 439-447
- Tomioka, S., Nikaido, T., Miyakawa, T., Matsushashi, M. (1983): Mutation of the N-acetylmuramyl-L-alanine amidase gene of *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* 156: 463-465
- Tsui, H.C., Zhao, G., Feng, G., Leung, H.C., Winkler, M.E. (1994): The *mutL* repair gene of *Escherichia coli* K-12 forms a superoperon with a gene encoding a new cell-wall amidase. *Mol. Microbiol.* 11: 189-202
- Tsumoto, K., Ejima, D., Kumagai, I., Arakawa, T. (2003): Practical considerations in refolding proteins from inclusion bodies. *Protein Expr. Purif.* 28: 1-8
- Ursinus, A., Steinhaus, H., Holtje, J.V. (1992): Purification of a nocardicin A-sensitive LD-carboxypeptidase from *Escherichia coli* by affinity chromatography. *J. Bacteriol.* 174: 441-446
- van Heijenoort, J. (1998): Assembly of the monomer unit of bacterial peptidoglycan. *Cell Mol. Life Sci.* 54: 300-304
- Villaverde, A., Carrio, M.M. (2003): Protein aggregation in recombinant bacteria: biological role of inclusion bodies. *Biotechnol. Lett.* 25: 1385-1395
- Vollmer, W., von Rechenberg, M., Holtje, J.V. (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
- Votsch, W., Templin, M.F. (2000): Characterization of a beta -N-acetylglucosaminidase of *Escherichia coli* and elucidation of its role in muropeptide recycling and beta - lactamase induction. *J. Biol. Chem.* 275: 39032-39038
- Watanabe, M., Iyobe, S., Inoue, M., Mitsuhashi, S. (1991): Transferable imipenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 35: 147-151
- Waxman, D.J., Strominger, J.L. (1983): Penicillin-binding proteins and the mechanism of action of beta-lactam antibiotics. *Annu. Rev. Biochem.* 52: 825-869
- Westphal, K. (2003): Sind Anhydromuramylpeptide auch bei *Aeromonas* spp. die Mediatoren für die Induktion der chromosomalen β -Laktamase? Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn.
- WHO. (2000): Overcoming Antimicrobial Resistance - World Health Organization Report on Infectious Diseases. WHO.

Wiegand, I. (2001): Zielstrukturen für die Hemmung der Induktion chromosomal kodierter AmpC β -Laktamasen. Dissertation. Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn.

Wiegand, I. (2003): Molekulare und biochemische Grundlagen der beta-Laktamresistenz durch beta-Laktamasen. *Chemotherapie Journal* 6/2003: 151-167

Wuthrich, K. (1990): Protein structure determination in solution by NMR spectroscopy. *J. Biol. Chem.* 265: 22059-22062

Yigit, H., Queenan, A.M., Anderson, G.J., Domenech-Sanchez, A., Biddle, J.W., Steward, C.D., Alberti, S., Bush, K., Tenover, F.C. (2001): Novel carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase, KPC-1, from a carbapenem-resistant strain of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45: 1151-1161

7. Anhang

7.1. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Resistenz von Staphylokokken gegen Methicillin in britischen Krankenhäusern, nach REACHER <i>et al.</i> , 2000.	2
Abbildung 2: Leitstruktur der Penicilline.....	3
Abbildung 3: Cephalosporine.....	3
Abbildung 4: Die Struktur der Carbapeneme.....	4
Abbildung 5: Monobaktam	4
Abbildung 6: Typen der bakteriellen Zellwand (LIVERMORE UND WILLIAMS, 1996).....	5
Abbildung 7: Synthese und Abbau des Peptidoglykans gramnegativer Bakterien, aus TEMPLIN UND HOLTJE, 2000.	6
Abbildung 8: D,D-Transpeptidase-Reaktion und Einfluss von Penicillin aus HOLTJE, 1998....	8
Abbildung 9: Modell für die Induktion der β -Laktamase.	18
Abbildung 10: Das pET-Expressionssystem und seine Kontrollelemente.....	34
Abbildung 11: Expression von CfAmpR.	51
Abbildung 12: Reinigung von CfAmpR mittels DNA-Affinitätschromatographie.	52
Abbildung 13: Reinigung von CfAmpR mittels Heparin-Affinitätschromatographie.....	53
Abbildung 14: Reinigung von CfAmpR mittels Gelfiltration/Heparinsäule.	54
Abbildung 15: MALDI-MS von CfAmpR.....	54
Abbildung 16: Gelshift mit CfAmpR.....	55
Abbildung 17: Schematische Darstellung des NusA/AmpR-Fusionsproteins.	56
Abbildung 18: Überexpression von NusA/AmpR.	56
Abbildung 19: His-Tag-Nachweis von NusA-AmpR.	56
Abbildung 20: Löslichkeitsbestimmung und Reinigung von NusA/AmpR.....	57
Abbildung 21: Gelfiltration von NusA/AmpR (SDS-PAGE).....	57
Abbildung 22: Thrombinspaltung des Fusionsproteins NusA/AmpR.	58
Abbildung 23: Gelshift.....	58
Abbildung 24: HPLC-UV-Chromatogramme der "Hot water-Extrakte“ von <i>E. coli</i> JRG582 und <i>E. coli</i> JRG582 mit AmpD-kodierendem Plasmid.	59
Abbildung 25: Auswertung des HPLC-Eluats (<i>E. coli</i> JRG582) im Szintillationszähler.....	59
Abbildung 26: Ausschnitte der UV-Chromatogramme von <i>E. coli</i> JRG582 und JRG582/pBP19-6.....	60

Abbildung 27: UV-Chromatogramm des isolierten aM-Tripeptids (Wasser-Acetonitril-Gradient).....	60
Abbildung 28: ³ H-markiertes aM-Tripeptid nach Elution von der HPLC (Wasser-Acetonitril-Gradient).....	60
Abbildung 29: Massenspektrum des isolierten aM-Tripeptids.	61
Abbildung 30: Ausschnitte der UV-Chromatogramme von E. coli JRG582/pBP19-6 und JRG582.....	62
Abbildung 31: UV-Chromatogramm des isolierten aM-Pentapeptids (Wasser-Acetonitril-Gradient).....	62
Abbildung 32: ³ H-markiertes aM-Pentapeptid nach Elution von der HPLC (Wasser-Acetonitril-Gradient).	62
Abbildung 33: Massenspektrum des isolierten aM-Pentapeptids.	63
Abbildung 34: RT-PCR zum Nachweis der AmpC- und AmpR-Expression.	64
Abbildung 35: Kontrollreaktion ohne Reverse Transkriptase, Nachweis des <i>ampR</i> -Gens.....	65
Abbildung 36: Nachweis der Substratspezifität von AmpG für Anhydrodisaccharide (verändert aus CHENG UND PARK, 2002).	82

7.2. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Mureinsynthesen von <i>E. coli</i> (HOLTJE, 1998).....	7
Tabelle 2: Mureinhydrolasen von <i>E. coli</i> , nach HOLTJE, 1998.	9
Tabelle 3: Einteilung der β -Laktamasen nach Bush, erweitert nach Wiegand (BUSH <i>et al.</i> , 1995; BUSH, 2001; WIEGAND, 2003).....	12

7.3. Abkürzungsverzeichnis

A. dest.	Aqua destillata (destilliertes Wasser)
Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
APS	Ammoniumpersulfat
au	Atomare Masseneinheit
bp	Basenpaare
BSA	bovines Serumalbumin
°C	Grad Celsius
C-terminal	Carboxy-terminal
cDNA	copy-DNA
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
dUTP	Desoxyuridintriphosphat
EDTA	Ethylendiaminotetraessigsäure
g	Erdbeschleunigung, Gramm
h	Stunde
HCl	Salzsäure
kbp	Kilobasenpaare (1000 Basenpaare)
kDa	Kilodalton
M	Molar
mA	Milliampere
mg	Milligramm
µg	Mikrogramm
MHK	Minimale Hemm-Konzentration
min	Minute
ml	Milliliter
µl	Mikroliter
mM	Millimolar
N	Normal
N-terminal	Amino-terminal
NaAc	Natriumacetat
ng	Nanogramm
OD	Optische Dichte
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PMBN	Polymyxin B Nonapeptid
pmol	Pikomol

RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute („rounds per minute“)
RT	Reverse Transkription
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
TBE	Tris-Borat-EDTA
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Unit
UV	Ultraviolett
V	Volt
(v/v)	Volumen/Volumen
(w/v)	Gewicht/Volumen

Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Bernd Wiedemann für die Möglichkeit meine Dissertation in seiner Arbeitsgruppe anzufertigen. Ebenso danke ich ihm für motivierende Gespräche und für seine Unterstützung, die mir u.a. auch die Teilnahme an Auslands-Kongressen ermöglichte.

Bei Herrn Prof. Erwin A. Galinski möchte ich mich für die freundliche Übernahme des Koreferats bedanken.

Herrn Prof. Klaus Mohr und dem gesamten Graduiertenkolleg 677 danke ich für die freundliche Aufnahme, Einblicke in unterschiedlichste pharmazeutische Fragestellungen und die gute Gemeinschaft. Außerdem danke ich der Deutschen Forschungsgemeinschaft für die finanzielle Unterstützung dieser Arbeit im Rahmen des Graduiertenkollegs.

Bei Herrn Prof. Dr. Eckhard Leistner und Frau Dr. Christel Drewke bedanke ich mich für die Möglichkeit das Isotopenlabor zu nutzen und für die Einweisung in dasselbige.

Frau Dr. Irith Wiegand möchte ich für die ausführliche Einarbeitung in das Thema danken, Herrn Dr. Dieter Pfeifle (Stiftung caesar, Bonn), Dr. Paulette Charlier und Dr. Bernard Joris (Universität Liège, Belgien) für die gute Zusammenarbeit und die ein oder andere wertvolle Anregung.

Andrea Schulte, Yvonne Lübbe, Katrin Gramann danke ich für geduldige Einführungen in die Gel Filtration bzw. in die Real-Time PCR. Frau Dr. Christiane Dahl und Herrn Dr. Hans-Jörg Kunte für die Möglichkeit diese Geräte nutzen zu dürfen. Dr. Matthias Kurz für seine Hilfe nach dem Umzug des I-Cyclers und Marlene Stein für Tips und Hilfe bezüglich HPLC und Netzwerktechnik.

Dirk Skutlarek danke ich für seinen Einsatz bei der MS-Analyse des aM-Pentapeptids.

Bei Frau Bedia Bugdaci und Frau Inge Luhmer-Becker bedanke ich mich für die Versorgung mit sterilen Glasgeräten und Laborverbrauchsmaterialien.

Frau Sylvia Mendel danke ich für ihren unermüdlichen Einsatz bei der Organisation von Bestellungen und den damit verbundenen Problemen.

Meinen Praktikanten Christina Henseler, Florian Toyka und Christian Körner gilt mein Dank für ihre Hilfe während dieser Arbeit.

Ich bedanke mich bei der Arbeitsgruppe Pharmazeutische Mikrobiologie für die gute Gemeinschaft und das angenehme Arbeitsklima. Ein besonderer Dank gebührt Frau Dr. Katrin Westphal für viele wissenschaftliche (und private) Diskussionen.

Mario Berger, Dr. Reinhard Depping und Dr. Nicole Sommer danke ich für zahlreiche Ratschläge zur Proteinreinigung und Real-Time PCR sowie für ihre Freundschaft.

Bei Oliver Thewes, Dr. Carsten Junker und Carsten Müller bedanke ich mich für private und/oder technische Unterstützung.

Meinen Eltern Doris und Richard und meiner Schwester Alexandra danke ich für die geduldige und fortwährende Unterstützung während des Studiums und der Promotion. Ebenso danke ich Gerrit Michelfelder, der mir immer mit Rat und Tat zur Seite stand.