

**Regulation der  $\beta$ -Laktamase-Expression durch ein  
Zwei-Komponenten-System in *Aeromonas* spp.**

**Dissertation**

zur

Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

Andrea Maria Schiefer

aus

Asunción / Paraguay

Bonn 2006

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

1. Referent: Prof. Dr. B. Wiedemann

2. Referent: Prof. Dr. H.-G. Sahl

Tag der Promotion: 21.06.2006

Diese Dissertation ist auf dem Hochschulschriftenserver der ULB Bonn [http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss\\_online](http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss_online) elektronisch publiziert.

Erscheinungsjahr: 2006

für meine Eltern

## **Inhaltsverzeichnis**

<b>1. Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1. Die Gattung <i>Aeromonas</i>	1
1.2. Aufbau der bakteriellen Zellwand	3
1.3. Die Zellwandbiosynthese	4
1.4. $\beta$ -Laktam-Antibiotika	10
1.5. Resistenz gegenüber $\beta$ -Laktam-Antibiotika	12
1.6. Vorkommen von $\beta$ -Laktamasen bei der Gattung <i>Aeromonas</i>	14
1.7. Regulation der $\beta$ -Laktamase-Expression durch ein Zwei-Komponenten-System	15
1.8. Zielsetzung der Arbeit	19
<b>2. Material und Methoden</b>	<b>20</b>
2.1. Material	20
2.1.1. Bakterienstämme	20
2.1.2. Plasmide	21
2.1.3. Oligonukleotide	21
2.1.4. Antibiotika	23
2.1.5. Enzyme	24
2.1.6. Nährmedien	24
2.1.7. Puffer und Lösungen	25
2.1.8. Chemikalien und sonstige Materialien	27
2.1.9. Geräte	28
2.2. Mikrobiologische Methoden	29
2.2.1. Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration	29
2.2.2. Bestimmung der Lebendkeimzahl	29
2.2.3. Bulgecin Agar Diffusionstest	30
2.3. Methoden der Proteinbiochemie	30
2.3.1. Induktion der $\beta$ -Laktamasen	30
2.3.2. Spektralphotometrischer $\beta$ -Laktamase-Test	31
2.3.3. Proteinbestimmung nach LOWRY <i>et al.</i>	32
2.3.4. Präparation von löslichen Muropeptiden	32
2.3.5. Überproduktion von BlrD	33
2.4. Molekularbiologische Methoden	33
2.4.1. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	33
2.4.2. Herstellung der Template-DNA durch Aufkochpräparate	36

2.4.3. Isolierung von DNA und RNA	36
2.4.3.1. Präparation von Plasmid-DNA	36
2.4.3.2. Präparation von genomischer DNA	37
2.4.3.3. Präparation von RNA	37
2.4.4. Reinigung von PCR-Produkten	38
2.4.5. Agarose-Gelelektrophorese	38
2.4.6. DNA Extraktion aus dem Agarose-Gel	39
2.4.7. Sequenzierung von DNA	39
2.4.8. Enzymatische Modifikation von DNA	40
2.4.8.1. Restriktionsverdauung	40
2.4.8.2. Dephosphorylierung	41
2.4.8.3. Ligation	41
2.4.9. Entsalzung der Ligationsprobe	42
2.4.10. Herstellung elektrokompetenter Zellen	42
2.4.11. Übertragung von genetischem Material durch Transformation	42
2.4.12. Amplifikation von unbekanntem Zielsequenzen	43
2.4.13. Expressionsstudien mittel Real-Time RT-PCR	45
<b>3. Ergebnisse</b>	<b>47</b>
3.1. Charakterisierung der Transposonmutanten von <i>Aeromonas veronii</i> bv. <i>sobria</i>	47
3.1.1. Klonierung zur Identifizierung des ausgeschalteten Gens	47
3.1.2. Identifizierung des ausgeschalteten Gens der zweiten Mutanten-Art	53
3.1.3. Charakterisierung der beiden durch das Transposon unterbrochenen Genprodukte	56
3.2. Induktion mit Muropeptiden	58
3.2.1. Auswirkung von Polymyxin-B-Nonapeptid auf die Membrangängigkeit von <i>Aeromonas veronii</i> bv. <i>sobria</i>	59
3.2.2. Einfluss von Muropeptiden auf die $\beta$ -Laktamase-Aktivität	60
3.2.3. Einfluss von Muropeptiden auf die $\beta$ -Laktamase-Expression	61
3.3. Einfluss von Bulgecin auf die Induzierbarkeit der $\beta$ -Laktamasen	62
3.3.1. Auswirkungen von Bulgecin auf die $\beta$ -Laktamase-Expression	63
3.3.2. Effekt von Bulgecin auf die Induktion der $\beta$ -Laktamase	64
3.3.3. Bulgecin Agar-Diffusionstest	66
3.4. Untersuchungen zur Funktion von BlrD	67
3.4.1. Genetische Überprüfung der Klone	68

3.4.2. Lebendzellzahlbestimmung in Abhängigkeit von verschiedenen Arabinose-Konzentrationen	69
3.4.3. Nachweis der <i>blrD</i> -Überexpression mittels Real-Time RT-PCR	70
3.4.4. Auswirkungen der <i>blrD</i> -Überexpression auf die spezifische $\beta$ -Laktamase-Aktivität	71
3.4.5. Auswirkungen der <i>blrD</i> -Überexpression auf die Expression der $\beta$ -Laktamase	72
<b>4. Diskussion</b>	<b>74</b>
<b>5. Zusammenfassung</b>	<b>88</b>
<b>6. Literaturverzeichnis</b>	<b>89</b>
<b>7. Anhang</b>	<b>98</b>
7.1. Vektorkarte	98
7.2. Abkürzungsverzeichnis	99

## 1. Einleitung

Anfang des letzten Jahrhunderts waren Infektionskrankheiten die Haupttodesursache der Weltbevölkerung. Durch verbesserte Hygienemaßnahmen, Impfungen und insbesondere dem Einsatz von Antibiotika konnte die hohe Todesrate stark reduziert werden. Trotzdem stirbt noch heute weltweit jeder siebte Mensch an einer bakteriellen Infektion [WHO Report 2004]. Neben schlechten Hygieneverhältnissen und einer eingeschränkten Verfügbarkeit von Antibiotika in der dritten Welt, ist dafür das Auftreten von resistenten Erregern verantwortlich. Diese werden, vor allem in den Industrienationen, zu einem immer größeren Problem, da sie mit den meisten herkömmlichen Antibiotika nicht mehr bekämpft werden können.

Um sich auch für die Behandlung von Infektionen, die durch resistente Erreger hervorgerufen werden, Therapieoptionen offen zu halten, ist es wichtig neue Antibiotika-Klassen zu entwickeln. Ein weiterer Ansatzpunkt ist die Aufklärung der zu Grunde liegenden Resistenz-Mechanismen. Gelingt es, diese gezielt auszuschalten, kann die Wirksamkeit des jeweiligen Antibiotikums wiederhergestellt und gleichzeitig die Ausbreitung verhindert werden.

Der wichtigste Resistenzmechanismus, der zur Resistenz gegenüber  $\beta$ -Laktam-Antibiotika führt, ist die Produktion von  $\beta$ -Laktamasen. Diese Enzyme inaktivieren das Antibiotikum durch Spaltung des  $\beta$ -Laktamrings. Unter den gramnegativen Bakterien sind chromosomal kodierte  $\beta$ -Laktamasen weit verbreitet, deren Expression in der Regel durch  $\beta$ -Laktame induzierbar ist. Von großem Interesse ist die Regulation der  $\beta$ -Laktamase-Expression in der Gattung *Aeromonas*, da sie sich grundlegend von der Regulation anderer gramnegativer Bakterien unterscheidet.

### 1.1. Die Gattung *Aeromonas*

Aeromonaden sind gramnegative, fakultativ anaerobe Bakterien, die zu den Nonfermentern gehören. Phylogenetisch wird diese Gattung den  $\gamma$ -Proteobakterien zugeordnet. Insgesamt gibt es 14 verschiedene *Aeromonas* Arten, die entweder unbeweglich oder durch eine einzelne polare Geißel beweglich sind. Natürlicherweise kommen Stämme der Gattung *Aeromonas* in aquatischen Ökosystemen und im Boden vor. Einige *Aeromonas*-Arten, wie z.B. *A. hydrophila* und *A. salmonicida* sind tierpathogen und können vor allem bei Fischen,

Amphibien und diversen Meerestieren unterschiedliche Krankheiten hervorrufen [The Prokaryotes, 1992].

Innerhalb der Gattung sind eine Reihe humanpathogener Arten wie z.B. *A. hydrophila*, *A. caviae* und *A. veronii* bv. *sobria* zu finden, die verschiedene Infektionskrankheiten auslösen können. Wundinfektionen häufen sich z.B. bei Personen mit schweren Verletzungen oder Verbrennungen, die in Kontakt mit kontaminiertem Boden oder Wasser gekommen sind [Janda und Abbott, 1998]. Als Nosokomiale Infektionen können eine Vielzahl an extraintestinalen und systemischen Infektionen vorkommen, wie z.B. Blutvergiftung, Lungenentzündung, Hirnhautentzündung oder Bauchfellentzündung [Janda und Abbott, 1998]. *Aeromonas* spp. gewinnen zunehmend an klinischer Bedeutung, vor allem bei Patienten mit schweren Grunderkrankungen und immunsuprimierten Patienten, die überwiegend von den schwerwiegenden Nosokomialen Infektionen betroffen sind. Da *Aeromonas* spp. in verschiedenen Meeresfrüchten vorkommen, kann man sich auch über den Verzehr von Muscheln, Shrimps oder Krabben infizieren, was in der Regel eine gastrointestinale Erkrankung zur Folge hat [Janda *et al.*, 1999].

Oftmals treten Infektionen durch *Aeromonas* Arten bei Patienten auf, die sich einer Blutegeltherapie unterziehen. *Aeromonas* spp. kommen in der Darmflora des Egels als Symbionten vor. Dem Parasit fehlen proteolytische Enzyme in seinem Verdauungstrakt. Diese Enzyme können von *Aeromonas* spp. produziert werden und sind notwendig, um die Blutmahlzeit zu verdauen [Valauri, 1991]. Heutzutage wird der medizinische Blutegel wieder vermehrt eingesetzt und kann z.B. in der plastischen Chirurgie oder in der Transplantationschirurgie zur Linderung von Blutstau in den Venen verwendet werden [Snower *et al.*, 1989, Sartor *et al.*, 2002].

Durch den Einsatz von Antibiotika kann man die meisten bakteriellen Infektionen effektiv bekämpfen. Es gibt dabei verschiedene Angriffspunkte, gegen die die Antibiotika gerichtet sind. Zu den Zielstrukturen der Antibiotika gehören Enzyme, die an der Zellwandsynthese beteiligt sind, sowie verschiedene Prozesse der Proteinbiosynthese und der Nukleinsäuresynthese. Infektionen, die durch *Aeromonas* spp. hervorgerufen sind, werden in der Regel mit Trimethoprim-Sulfamethoxazol, Chinolonen, Tetracyclinen oder Aminoglykosiden behandelt, da die Gattung gegenüber  $\beta$ -Laktam-Antibiotika natürlich resistent ist [Janda *et al.*, 1999].  $\beta$ -Laktam-Antibiotika greifen spezifisch Enzyme der bakteriellen Zellwand an.

## 1.2. Aufbau der bakteriellen Zellwand

Bakterien verfügen über eine elastische Zellwand, die die Cytoplasmamembran sackförmig umgibt. Die Zellwand verleiht der Bakterienzelle ihre charakteristische Form und dient als Schutz und als Stütze gegen den inneren osmotischen Druck. Das Stützgerüst der Zellwand ist das Peptidoglykan, welches auch als Murein bezeichnet wird.

Das Murein ist ein Heteropolymer, das aus geraden, unverzweigten Ketten aufgebaut ist, in denen N-Acetylglukosamin (GlcNAc) und N-Acetylmuraminsäure (MurNAc) alternierend  $\beta$ -1,4-glykosidisch miteinander verknüpft sind. Über die Laktylgruppe ist die N-Acetylmuraminsäure mit Peptiden verbunden. Durch Amidbindung benachbarter Peptidketten können zwei heteropolymere Ketten miteinander verknüpft werden, wodurch der netzartige Murein-Sacculus entsteht.

Das Peptidoglykan von gramnegativen Bakterien ist zu 75-80% einlagig, während die übrigen 20-25% aus drei Lagen bestehen [Labischinski *et al.*, 1991]. Über dieser dünnen Schicht Peptidoglykan befindet sich eine äußere Membran, die aus Proteinen, Phospholipiden und Lipopolysacchariden aufgebaut ist. Diese Membran ist durch Lipoproteine mit dem Peptidoglykan verbunden [Beveridge, 1999]. Das Murein der gramnegativen Bakterien ist in seiner chemischen Zusammensetzung recht homogen [Quintela *et al.*, 1995]. Wenn Variationen in der Murein Komposition auftreten, entstehen diese durch O-Acetylierung von Zuckerresten und Amidierung der D-Glutaminsäure [Schleifer und Kandler, 1972]. Weitere Veränderungen können in den Murein gebundenen Lipoproteinen auftreten, die sich in ihren Sequenzen Spezies spezifisch unterscheiden können [Quintela *et al.*, 1995].

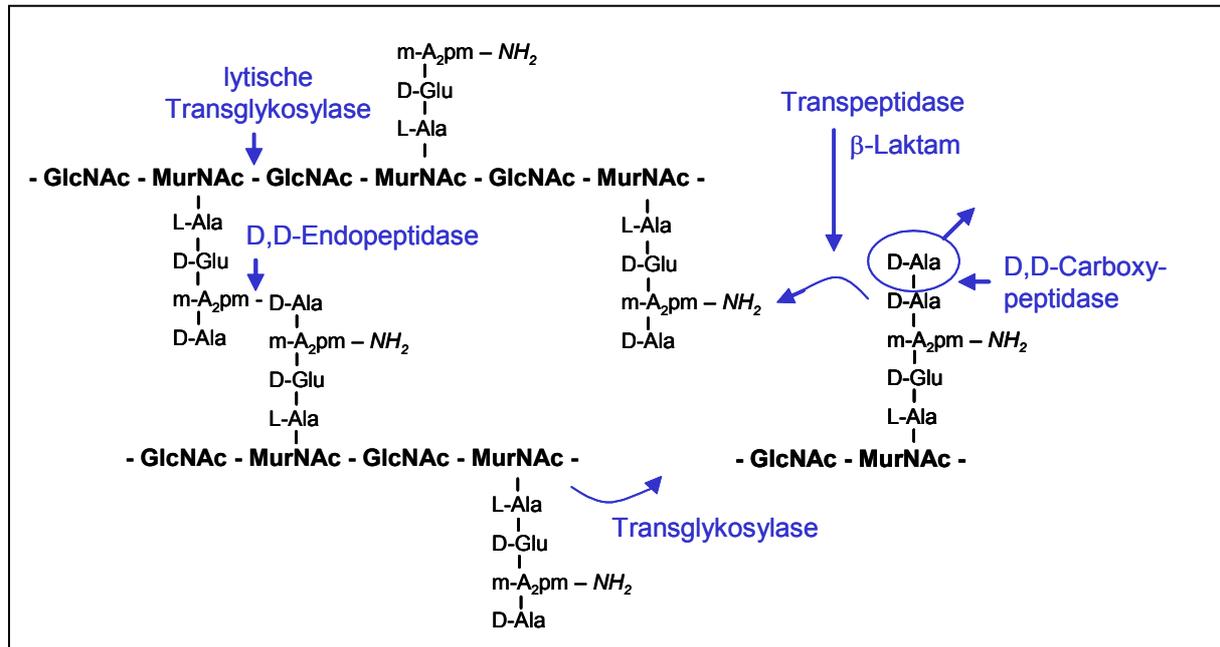
Die Zusammensetzung der quervernetzenden Peptidketten im Murein kann je nach Spezies variieren. Bei gramnegativen Bakterien sind häufig die Aminosäuren in der Reihenfolge L-Alanin, D-Glutaminsäure, m-Diaminopimelinsäure, D-Alanin und einem weiteren D-Alanin zu finden [Schleifer und Kandler, 1972]. Ungefähr 32,9% der Peptidseitenketten sind bei *Escherichia coli* quervernetzt und bestehen hauptsächlich aus D-Alanin-m-Diaminopimelinsäure Peptidbrücken in der DD-Konfiguration [Glauner *et al.*, 1988]. Nur ein geringer Teil (5,4%) der Peptidbrücken wird zwischen zwei m-Diaminopimelinsäure-Resten gebildet. Im Gegensatz dazu ist bei *Aeromonas* spp. der Anteil an Quervernetzungen durch Peptidbrücken zwischen zwei m-Diaminopimelinsäure-Resten in der LD-Konfiguration wesentlich höher (15,6%). Der Grad der Quervernetzung ist bei *Aeromonas* spp. mit 34,3% vergleichbar zu dem in *E. coli* [Quintela *et al.*, 1995].

### 1.3. Die Zellwandbiosynthese

Die Biosynthese des Peptidoglykans ist ein komplex ablaufender Prozess, der in drei Abschnitte gegliedert werden kann. Dabei werden zunächst im Cytoplasma die Vorläufermoleküle UDP-N-Acetylglukosamin und UDP-N-Acetylmuraminsäure-Pentapeptid synthetisiert. An der Cytoplasmamembran wird das UDP-N-Acetylmuraminsäure-Pentapeptid mit dem lipophilen Trägermolekül Pyrophosphoryl-Undecaprenol (Bactoprenol) verbunden, wodurch das so genannte Lipid I entsteht. Durch Verknüpfung des Lipid I mit UDP-N-Acetylglukosamin wird ein Disaccharid-Pentapeptid, das Lipid II gebildet. Nach Transport über die Cytoplasmamembran, vermutlich katalysiert durch eine spezifische Translokase oder Flippase, kann das Disaccharid-Pentapeptid durch Transglykosylase- und Transpeptidase-Reaktionen in die wachsende Peptidoglykankette eingebaut werden [zur Übersicht Scheffers und Pinho, 2005]. Durch die Transglykosylase-Reaktion wird dabei der Muramylrest mit einem freien N-Acetylglukosaminrest des bereits bestehenden Mureins verknüpft. Das Bactoprenol wird während der Transglykosylierungs-Reaktion freigesetzt und steht nach einer Dephosphorylierung als Lipid-Carrier erneut zur Verfügung.

Das endständige D-Alanin der Pentapeptidketten kann sowohl durch eine D,D-Carboxypeptidase als auch durch eine Transpeptidase abgespalten werden. Die Transpeptidase katalysiert zusätzlich zu der Abspaltung die Bildung der Querbrücken zwischen den Peptidseitenketten, wodurch zwei Peptidoglykanstränge miteinander verbunden werden. Für diese Reaktion wird zunächst die D-Alanyl-D-Alanin Bindung des GlcNAc-MurNAc-Pentapeptids gespalten und ein Enzym-Substrat Komplex gebildet. In einem zweiten Schritt wird dann das endständige D-Alanin mit der Aminogruppe der Diaminopimelinsäure verknüpft. Neben diesen dimeren Peptidbrücken können auch trimere Verknüpfungen auftreten, bei denen drei Peptidseitenketten miteinander verbunden sind. Diese Verbindungen machen jedoch nur 4,1% der Peptidbindungen aus. In sehr geringem Umfang (0,13%) können diese Bindungen auch als Tetramere vorliegen [Glauner *et al.*, 1988].

**Abb. 1.1.** Abbau und Synthese des Peptidoglykans gramnegativer Bakterien [Vollmer und Höltje, 2000]



Die Synthese des Peptidoglykans wird von den so genannten Penicillin-Binde-Proteinen (PBPs) gesteuert, welche die Transpeptidase-, Transglykosylase- und D,D-Carboxypeptidase-Reaktionen katalysieren. Insgesamt sind zwölf verschiedene PBPs von *E. coli* bekannt, die entsprechend der Konvention absteigend nach dem Molekulargewicht nummeriert werden (Tab.1.1.).

**Tab. 1.1.** Penicillin-Binde-Proteine von *E. coli*

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

**Fortsetzung Tab. 1.1.** Penicillin-Binde-Proteine von *E. coli*

5	<i>dacA</i>	46,9	31,9%	D,D-Carboxypeptidase	Abnormalität der Zellpole	Broome-Smith <i>et al.</i> , 1988, Meberg <i>et al.</i> , 2004
6a	<i>dacC</i>	44,5	8,9%	D,D-Carboxypeptidase	kein	Broome-Smith, 1985
6b	<i>dacD</i>	43,3	n.b.	D,D-Carboxypeptidase	kein	Baquero <i>et al.</i> , 1996
7	<i>pbpG</i>	31,2	15,6%	D,D-Endopeptidase	kein	Romeis <i>et al.</i> , 1994
8		29,5	14,6%	Abbauprodukt von PBP7	kein	Henderson <i>et al.</i> , 1994
AmpH	<i>ampH</i>	40,1	n.b.	unbekannt	kein	Henderson <i>et al.</i> , 1997

Penicillin-Binde-Proteine gehören zu der Familie der Acyl-Serin-Transferasen, die hochmolekulare PBPs, niedermolekulare PBPs und  $\beta$ -Laktamasen umfasst [Ghuysen, 1991]. Zu den hochmolekularen PBPs zählen die bifunktionellen Transglykosylasen-Transpeptidasen PBP1a und PBP1b [Goffin und Ghuysen, 1998]. Während die aminoternale Domäne dieser Enzyme Transglykosylase-Aktivität aufweist, besitzt die carboxyterminale Domäne Transpeptidase-Funktion. Der Hypothese von Bertsche *et al.* [2005] zufolge können PBP1a bzw. PBP1b *in vivo* Dimere ausbilden und quervernetzte Murein-Fragmente produzieren, die dann durch die Aktivität von monofunktionellen Transpeptidasen in das bestehende Murein eingebaut werden. Der Verlust eines der Enzyme kann durch die Aktivität des anderen kompensiert werden. Die Deletion oder selektive Inaktivierung beider Enzyme ist für die Zelle jedoch letal [Suzuki *et al.*, 1978].

Zu den monofunktionellen Transpeptidasen zählen die PBPs 1c, 2 und 3, die den hochmolekularen PBPs zugeordnet werden [Goffin und Ghuysen, 1998, Schiffer und Höltje, 1999]. Obwohl PBP1c hohe Homologien zu den PBPs 1a und 1b aufweist, kann selbst eine 10-20-fache Überproduktion von PBP1c die Deletion in PBP1a/PBP1b-Doppelmutanten nicht komplementieren. Daher wird vermutet, dass PBP1c eine andere spezifische Funktion als die PBPs 1a und 1b aufweist und *in vivo* nur als Transglykosylase fungiert [Schiffer und Höltje, 1999]. Die PBPs 2 und 3 spielen in Verbindung mit anderen Membranproteinen eine wichtige Rolle bei der Zellmorphologie. PBP2 ist zusammen mit dem integralen Membranprotein RodA am Zellwachstum und der Formgebung beteiligt [Matsuzawa *et al.*, 1989]. PBP3 liegt mit den Membranproteinen FtsW, FtsA, FtsL, FtsN und FtsQ in einem Multi-Enzym-Komplex vor und ist bei der Septumbildung und Zellteilung involviert [Satta *et al.*, 1994, Karimova *et al.*, 2005]. Sowohl die Inaktivierung von PBP2 als auch von PBP3 ist für die

Bakterienzelle nicht letal, führt jedoch zu einem veränderten Phänotyp. Bei Deletion von *pbpA* (PBP2) ist eine Sphäroplastenbildung, bei Deletion von *ftsI* (PBP3) die Bildung von Filamenten zu beobachten.

Zu den niedermolekularen Penicillin-Binde-Proteine gehören PBP4 bis PBP8, die D,D-Carboxypeptidase oder D,D,-Endopeptidase Funktion aufweisen. Da die Inaktivierung eines dieser Enzyme keine Veränderung der Zellmorphologie nach sich zieht, werden sie auch als nicht-essentielle PBPs bezeichnet [Henderson *et al.*, 1997]. Nach den Ergebnissen von Meberg *et al.* [2004] hat jedoch zumindest die Deletion von *dacA* (PBP5) eine Änderung des Phänotyps zur Folge. Bei Bakterien mit inaktivem PBP5 wurden Abnormalitäten der Zellpole beobachtet.

Durch Spaltung zwischen Peptidbrücken der Peptidseitenketten können neue Zellwandbausteine in das Peptidoglykan eingebaut werden. Diese Reaktionen werden von den Endopeptidasen PBP4, PBP7 und dessen Abbauprodukt PBP8 katalysiert. Die D,D-Carboxypeptidasen PBP4, PBP5, PBP6a und PBP6b spalten das terminale D-Alanin von den Pentapeptidketten ab. Durch diese Aktivität wird der Grad der Quervernetzung bestimmt, und man vermutet, dass durch die unterschiedlichen Peptidlängen im Murein Elongation bzw. Zellteilung gefördert werden [Höltje, 1998].

Die Zellteilung und die Insertion neuer Zellwandbausteine in das bestehende Peptidoglykan sind Vorgänge, die von der Aktivität der Autolysine abhängig sind. *E. coli* verfügt über insgesamt 13 Autolysine, die drei verschiedenen Klassen zugeordnet werden können. Neben den bereits beschriebenen Endopeptidasen gehören noch die Amidasen und die lytischen Transglykosylasen dazu. Die drei Amidasen (AmiA, AmiB und AmiC) spalten die Amidbindung zwischen MurNAc und L-Alanin, während die lytischen Transglykosylasen die Spaltung zwischen MurNAc und GlcNAc-Resten katalysieren [Korsak *et al.*, 2005]. *E. coli* besitzt insgesamt sieben verschiedene lytische Transglykosylasen, die in Tabelle 1.2. aufgelistet sind.

**Tab. 1.2.** Lytische Transglykosylasen von *E. coli*

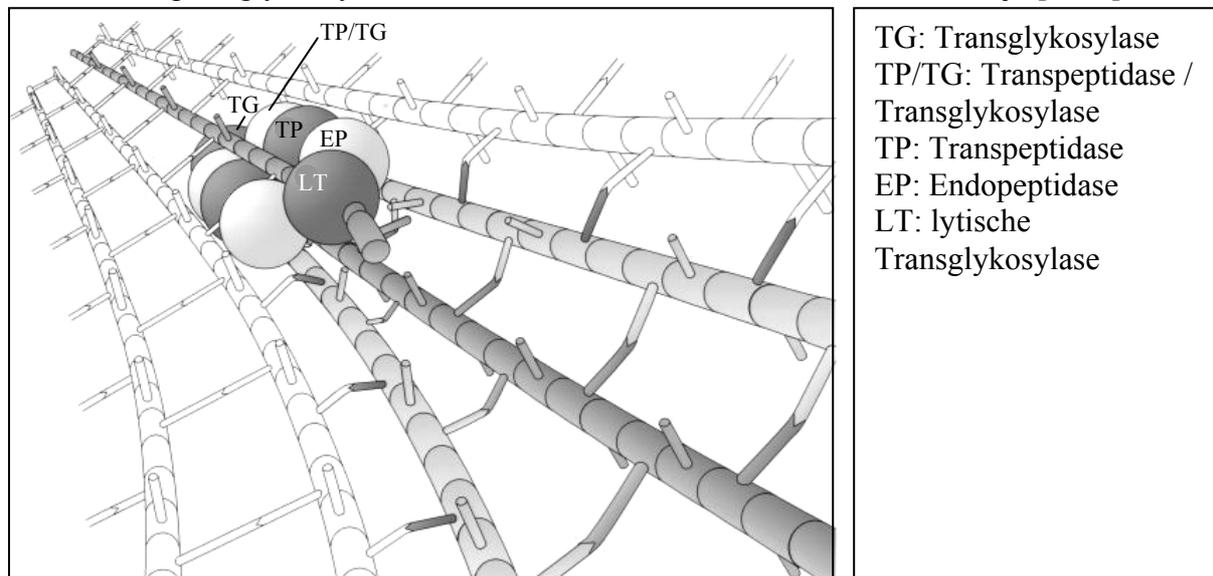
Enzym	Gen	MG [kDA]	Lokalisation	Spaltung	PBP-Wechselwirkung	Referenz
MltA	<i>mltA</i>	38	äußere Membran	exoglykolytisch	1b, 1c, 2, 3	Lommatzsch <i>et al.</i> , 1997; Vollmer <i>et al.</i> , 1999
MltB	<i>mltB</i>	39	äußere Membran	exoglykolytisch	1a, 1b, 3	Ehlert <i>et al.</i> , 1995
MltC	<i>mltC</i>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

Bei Spaltung der  $\beta$ -1,4-glykosidischen Bindung zwischen GlcNAc und MurNAc wird der Glykosid-Anteil nicht auf ein Wassermolekül, sondern bei einer intramolekularen Glykosyl-Transfer-Reaktion auf die C-6 Hydroxylgruppe der Muraminsäure übertragen [Höltje *et al.*, 1975]. Die dabei entstehenden Anhydromuramylpeptide akkumulieren im Periplasma und werden zum Murein-Recycling in das Cytoplasma aufgenommen. Bei *E. coli* beträgt die Turnover-Rate zwischen 40%-50% pro Generation und wird hauptsächlich durch die Aktivitäten der Enzyme MltA, MltB und Slt70 verursacht [Kraft *et al.*, 1999]. Der überwiegende Anteil der lytischen Transglykosylasen spaltet das Disaccharid exoglykolytisch ab, d.h. vom Ende des Glykanstrangs her. Während die Proteine MltA, MltB, MltC, MltD und EmtA in der äußeren Membran verankert sind, liegen die Slt70 und Slt35 in löslicher Form im Periplasma vor. Bei Slt35 handelt es sich um das proteolytische Abbauprodukt von MltB, das volle katalytische Aktivität aufweist. Für ihre Aktivität benötigen sowohl die Slt70 als auch die Slt35 Peptidseitenketten im Peptidoglykan [Beachey *et al.*, 1981, Romeis *et al.*, 1993]. Während die Slt70 als ringförmiges Multi-Domänen-Protein vorliegt [Thunnissen *et al.*, 1994], bei dem das aktive Zentrum auf der Innenseite der Ringstruktur liegt [Thunnissen *et al.*, 1995], ist die Slt35 aus drei Domänen zusammengesetzt mit dem katalytischen Zentrum in einer zentralen Domäne [van Asselt *et al.*, 1999]. Der Kristallstrukturanalyse zufolge besitzt die Slt35 vier Zuckerbindestellen, jeweils zwei für GlcNAc bzw. MurNAc und zwei Peptidbinderegionen, die in der Nähe der MurNAc-Bindestelle lokalisiert sind [van Asselt *et al.*, 2000].

Um bei der Peptidoglykansynthese die Autolyse der Zelle zu verhindern, müssen die Aktivitäten der Mureinsynthesen und der Mureinhydrolasen koordiniert ablaufen und einer strengen Kontrolle unterliegen. Durch Affinitätschromatographie konnte gezeigt werden, dass Mureinsynthesen und Mureinhydrolasen miteinander interagieren (Tabelle 1.2).

Wie die Zelle die Aktivitäten der Autolysine während der Mureinsynthese reguliert, ist bislang noch nicht vollständig aufgeklärt. Dem „make-before-break“-Modell zufolge werden neue Zellwandbestandteile in die Zellwand eingebaut, bevor die alten Bestandteile entfernt werden [Koch, 1990]. Höltje erweiterte diese Theorie mit dem „drei-für-eins“-Modell (Abbildung 1.2.) [Höltje, 1998].

**Abb. 1.2.** Peptidoglykansynthese nach dem „drei-für-eins“-Modell nach Höltje [1998]



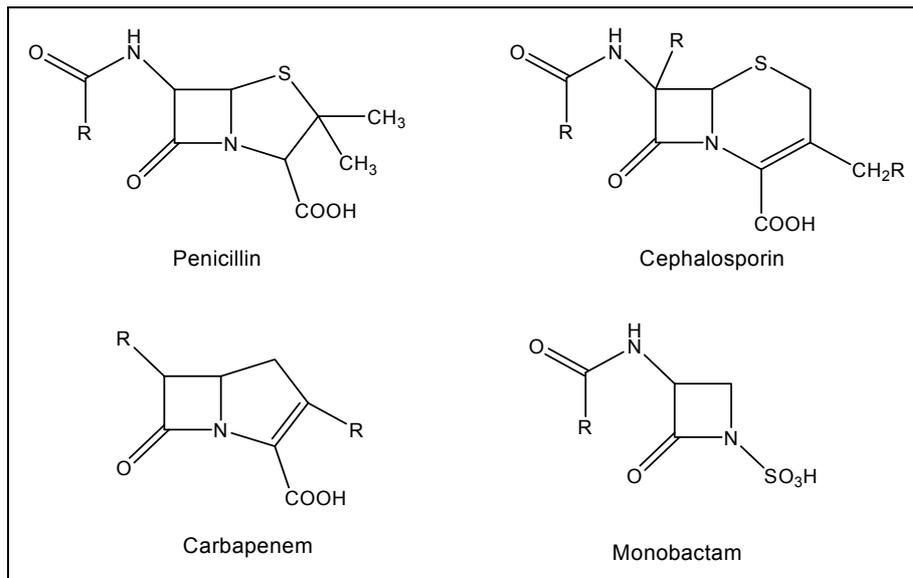
Dieser Hypothese nach liegt der Multi-Enzym-Komplex an einem Andockstrang und synthetisiert drei miteinander verknüpfte Mureinketten. Diese werden dann mit Glykanketten verbunden, die neben dem Andockstrang liegen. Anschließend kann der Andockstrang von den lytischen Transglykosylasen abgebaut werden. Durch die Bildung eines Multi-Enzym-Komplexes ist gewährleistet, dass Synthese und Hydrolyse des Mureins koordiniert ablaufen können. Kommt es zu einem Ungleichgewicht zwischen den einzelnen Enzymen, wird diese Koordination empfindlich gestört.

$\beta$ -Laktam-Antibiotika hemmen die Mureinsynthetisierenden Enzyme, während die lytischen Transglykosylasen weiter aktiv sind. Dem Modell zufolge setzt der Multi-Enzym-Komplex seinen Weg an dem Andockstrang fort, wobei kein neues Murein synthetisiert wird, sondern lediglich der Andockstrang abgebaut wird. Dies hat eine Reißverschlussartige Öffnung der Zellwand zufolge, wodurch die Lyse der Zelle verursacht wird.

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

$\beta$ -Laktam-Antibiotika gehören zu den wichtigsten Antibiotikaklassen in der Medizin. Zu den  $\beta$ -Laktamen zählen insgesamt vier verschiedene Gruppen; die Penicilline, die Cephalosporine, die Carbapeneme und die Monobactame, die alle durch den viergliedrigen Laktamring gekennzeichnet sind (Abbildung 1.3.).

**Abb. 1.3.** Struktur der  $\beta$ -Laktam-Antibiotika



Das Grundgerüst der Penicilline bildet die 6-Aminopenicillansäure (6-APA), die aus einem Thiazolidinring mit einem  $\beta$ -Laktamring besteht. Von den natürlich produzierten Penicillinen hat nur das Benzylpenicillin (Penicillin G) eine klinische Bedeutung erlangt. Seine Wirkungsweise ist auf grampositive Bakterien beschränkt, da es die äußere Membran der gramnegativen Bakterien nicht durchdringen kann. Durch Variation der Seitenkette am sechsten Kohlenstoffatom können zahlreiche semisynthetische Derivate hergestellt werden, mit Hilfe derer auch gramnegative Bakterien effektiv bekämpft werden können.

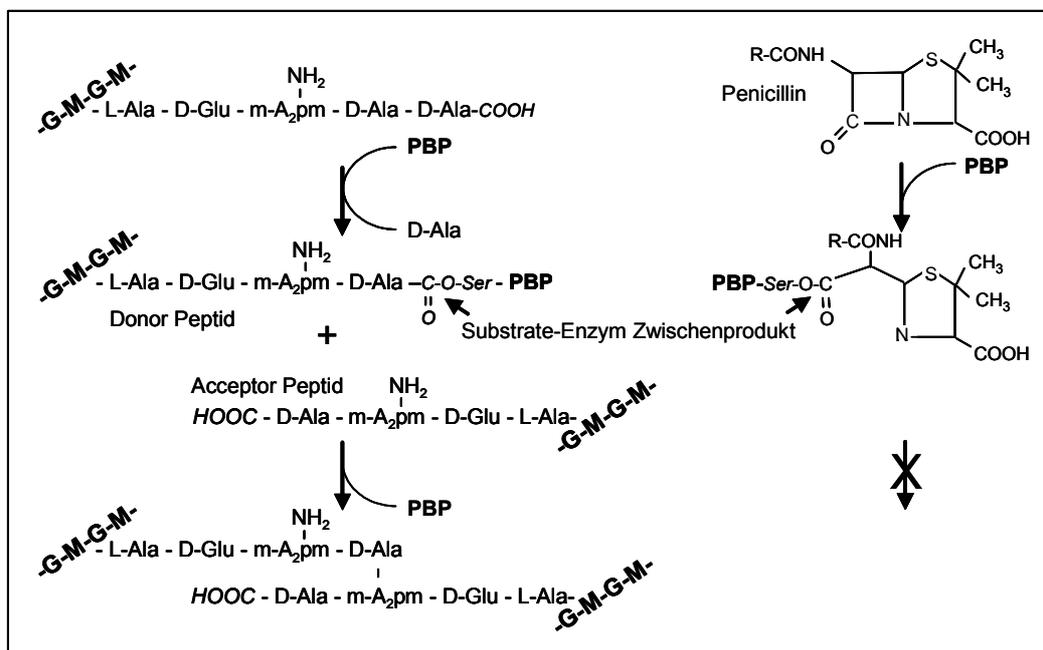
Cephalosporine unterscheiden sich strukturell von den Penicillinen, da sie anstelle des fünfgliedrigen Thiazolidinringes einen sechsgliedrigen Dihydrothiazinring besitzen. Die klinisch bedeutsamen Cephalosporine sind semisynthetische Derivate, die ein breiteres antibiotisches Wirkungsspektrum als die Penicilline besitzen und häufig resistenter gegen die Aktivität von  $\beta$ -Laktamasen sind [Madigan *et al.*, 2001].

Carbapeneme ähneln strukturell den Penicillinen, wobei das Schwefel-Atom durch ein Kohlenstoff-Atom ersetzt und eine zusätzliche Doppelbindung im fünfgliedrigen Ring zu finden ist. Aufgrund der hohen Ringspannung besitzen Carbapeneme eine geringe chemische Stabilität. Von allen  $\beta$ -Laktamen besitzen die Carbapeneme das breiteste Wirkungsspektrum, das nahezu alle pathogenen Spezies umfasst.

Monobaktame sind durch den monocyclischen  $\beta$ -Laktamring gekennzeichnet. Das einzige zugelassene Monobaktam ist das Aztreonam, dessen Wirkung auf gramnegative Infektionserreger beschränkt ist, da die Affinität zu den Penicillin-Binde-Proteinen der grampositiven Keime fehlt [Hellinger und Brewer, 1999].

$\beta$ -Laktame wirken auf die wachsende Zelle bakterizid, indem sie als Inhibitoren in die Synthese der Zellwand eingreifen. Die Transpeptidase-Reaktion ist dabei der hauptsächliche Angriffspunkt dieser Antibiotika (Abbildung 1.4.).

**Abb. 1.4.** Transpeptidase-Reaktion und Einfluß von  $\beta$ -Laktamen [Höltje, 1998]



Als Struktur analogon kann anstelle des D-Ala-D-Ala der  $\beta$ -Laktamring mit dem Enzym reagieren, wobei die Transpeptidase unter Öffnung des  $\beta$ -Laktamrings acyliert wird. Durch Bindung des  $\beta$ -Laktams an einen Serin-Rest im aktiven Zentrum entsteht ein stabiler Penicilloyl-Enzym-Komplex [Ghuysen, 1991]. Im Gegensatz zum Peptid-Enzym-Komplex ist der Penicilloyl-Enzym-Komplex stabil und inaktiviert so das Enzym [Höltje, 1998]. Auf diese

Weise kann neben der Transpeptidase auch die D,D-Carboxypeptidase gehemmt werden. Für die bakterizide Wirkung ist diese Reaktion jedoch bedeutungslos.

### **1.5. Resistenz gegenüber $\beta$ -Laktam-Antibiotika**

Da es auf Grund von Resistenzen gegenüber den  $\beta$ -Laktam-Antibiotika zu einem Therapieversagen kommen kann, sind Erkenntnisse über die Ursachen der Resistenz von großer Bedeutung.

Als klinisch resistent bezeichnet man Bakterien, die sich bei therapeutisch eingesetzten Antibiotika-Konzentrationen weiterhin vermehren können. Während die natürliche Resistenz eines Erregers genetisch kodiert vorliegt und Spezies spezifisch ist, wird bei der erworbenen Resistenz die genetische Erbinformation eines zuvor empfindlichen Keims verändert.

Man unterscheidet zwischen drei verschiedenen Mechanismen, durch die Bakterien eine Resistenz gegenüber  $\beta$ -Laktam-Antibiotika erlangen können.

#### Zugangsbehinderung des Antibiotikums zur Zielstruktur

Da die äußere Membran gramnegativer Bakterien für  $\beta$ -Laktam-Antibiotika weitgehend undurchlässig ist, können diese Substanzen den periplasmatischen Raum nur durch eingelagerte Porine erreichen. Bei Verlust oder Veränderung der Porine können die Antibiotika nicht mehr zu den Zielstrukturen gelangen, was eine verringerte Empfindlichkeit der Bakterien nach sich zieht [Jaffe *et al.*, 1982].

#### Veränderungen der Zielstruktur

Durch eine niedrigere  $\beta$ -Laktam Bindungsaffinität der Zielstruktur kann die Empfindlichkeit der Erreger herabgesetzt werden. Dabei verringern Mutationen in dem Gen für die Transpeptidase die Affinität für  $\beta$ -Laktame, weshalb diese schlechter gebunden werden. Dieser Resistenzmechanismus ist jedoch nur bei einer geringen Anzahl an Spezies zu finden und spielt bei gramnegativen Keimen eine untergeordnete Rolle [Spratt, 1994].

#### Enzymatische Inaktivierung des Antibiotikums

Der wichtigste Resistenzmechanismus gramnegativer Bakterien gegenüber  $\beta$ -Laktam-Antibiotika ist die Bildung von  $\beta$ -Laktamasen [Wiedemann *et al.*, 1989]. Dies sind Enzyme, die durch Hydrolyse die  $\beta$ -Laktame inaktivieren können. Dabei wird durch die freie Hydroxylgruppe an der Seitenkette eines Serinrestes im aktiven Zentrum der  $\beta$ -Laktamase der

$\beta$ -Laktamring angegriffen, wodurch ein kovalenter Acylester entsteht. Die Hydrolyse des Esters setzt anschließend ein aktives Enzym und ein inaktiviertes  $\beta$ -Laktam frei. Außer den Serin- $\beta$ -Laktamasen treten auch Metalloenzyme auf, die Zink-Ionen im aktiven Zentrum besitzen [Waley, 1992].

Neben diesem Merkmal können  $\beta$ -Laktamasen anhand ihrer Substratprofile und der Empfindlichkeit gegenüber verschiedenen Inhibitor-Molekülen differenziert werden. Weiterhin besteht ein Unterschied zwischen Plasmid- und chromosomal kodierten Enzymen [Livermore, 1995]. Das Klassifizierungssystem von Bush, Jacoby und Madeiros (BJM) [1995] weist die  $\beta$ -Laktamasen entsprechend ihrem Substratprofil und der Empfindlichkeit gegenüber  $\beta$ -Laktamase-Inhibitoren vier verschiedenen Gruppen zu (Abb.1.5.). Diese Gruppierung ähnelt der Klassifizierung von Ambler [1980], der die Enzyme aufgrund von Aminosäuresequenzen im aktiven Zentrum einteilte.

**Abb. 1.5.** Klassifizierung der  $\beta$ -Laktamasen in BJM-Gruppen [Bush, 2001]

BJM Gruppe	Untergruppe	Molekulare Klasse*	Eigenschaften (Substrate/ Hemmung)	Beispiel
1		C	Chromosomal Enzyme in Gram-negativen, auch auf Plasmiden alle $\beta$ -Laktame außer Carbapeneme keine Hemmung durch Clavulansäure	AmpC
2		A, D	meist durch Clavulansäure hemmbar	
	2a	A	Penicilline	Staphylokokken Penicillinase
	2b	A	Breit-Spektrum $\beta$ -Laktamasen [OSBL] Penicilline, Breit-Spektrum-Cephalosporine	TEM-1, SHV-1
	2be	A	$\beta$ -Laktamasen mit erweitertem Spektrum [ESBL] Oximino-Cephalosporine and Monobactame	TEM-3 bis TEM-20, SHV-2
	2br	A	Breit-Spektrum $\beta$ -Laktamasen [IRBL] nicht durch Inhibitoren hemmbar	TEM-30 bis TEM-40
	2c	A	Carbenicillinasen	PSE-1, PSE-3
	2d	D	Cloxacillin (Oxacillin) hydrolysierende Enzyme	OXA-1 bis OXA-10, PSE-2
	2e	A	Cephalosporinasen durch Clavulansäure hemmbar	FPM-1
	2f	A	Serin-Carbapenemasen durch Clavulansäure hemmbar	MNC-A, Sme-1
3	3a 3b 3c	B	Metallo-Enzyme alle $\beta$ -Laktame außer Monobactame; nicht durch Clavulansäure hemmbar	IMP-1, L1 CphA
4		unbekannt	Unsequenzierte Enzyme, die nicht in die anderen Gruppen passen	

\* ältere Klassifikation nach Ambler (nach Ähnlichkeiten des aktiven Zentrums auf Aminosäure-Ebene)

Viele *Enterobacteriaceae* produzieren Klasse-A- oder Klasse-C- $\beta$ -Laktamasen, die abhängig von der Spezies und dem Stamm entweder induzierbar oder konstitutiv gebildet werden. Die

chromosomale AmpC- $\beta$ -Laktamase, eine Cephalosporinase der molekularen Klasse C, gilt als das „typische“ Enzym der *Enterobacteriaceae*, welches auch in vielen Nonfermentern zu finden ist. Die AmpC- $\beta$ -Laktamase ist in der Regel ein induzierbares Enzym, das nach Behandlung mit  $\beta$ -Laktamen produziert wird. *E. coli* besitzt eine nicht induzierbare AmpC- $\beta$ -Laktamase, die nur in geringen Mengen gebildet wird, weshalb die Art natürlich sensibel gegenüber Ampicillin und Cephalosporinen mit engem Spektrum ist.

### 1.6. Vorkommen von $\beta$ -Laktamasen bei der Gattung *Aeromonas*

Die Produktion von  $\beta$ -Laktamasen ist ein gemeinsames Merkmal der Gattung *Aeromonas*. Dabei werden, je nach Spezies, zwischen zwei bis drei verschiedene  $\beta$ -Laktamasen gebildet, eine Klasse-C-Cephalosporinase, eine Klasse-D-Penicillinase und eine Klasse-B-Metallo- $\beta$ -Laktamase [Walsh *et al.*, 1995]. Am besten untersucht sind bislang die Enzyme AmpH, CepH und ImiH der Spezies *A. hydrophila* und AmpS, CepS und ImiS von *A. veronii* bv. *sobria* [Walsh *et al.*, 1995, Walsh *et al.*, 1998, Niumsup *et al.*, 2003]. Signifikante Unterschiede der Aminosäure-Sequenz und auf funktionellem Level zwischen den Klasse-C-Enzymen zweier *A. veronii* bv. *sobria* und *A. jandaei* Stämme lassen auf einen Polymorphismus der Enzyme schließen [Walsh *et al.*, 1995, Rasmussen *et al.*, 1994]. Alle drei  $\beta$ -Laktamasen weisen ein relativ enges Wirkungsspektrum auf. Die Cephalosporinase zeigt hydrolytische Aktivität gegenüber Cephalosporinen der ersten und zweiten Generation, während Penicilline und Carbapeneme nicht gespalten werden. Die Penicillinase hingegen ist hydrolytisch aktiv gegenüber Penicillinen und ist auch in der Lage, Cephalosporine in geringem Umfang zu inaktivieren [Walsh *et al.*, 1995, Rasmussen *et al.*, 1994]. Carbapeneme werden äußerst effektiv durch die Metallo- $\beta$ -Laktamase gespalten, die ebenfalls eine schwache Aktivität gegenüber Penicillinen und Cephalosporinen aufweist [Walsh *et al.*, 1996]. Im Gegensatz zu anderen Metallo- $\beta$ -Laktamasen besitzt das Enzym der Gattung *Aeromonas* nur ein Zink-Ion im aktiven Zentrum, wodurch das vergleichsweise enge Wirkungsspektrum verursacht wird [Walsh *et al.*, 1998]. Die Zugabe weiterer Zink-Ionen führt zu einer nichtkompetitiven Hemmung des Enzyms [Valladares *et al.*, 1997, Crawford *et al.*, 2004].

Nicht alle *Aeromonas* Spezies verfügen über eine Carbapenemase. Während die klinisch relevanten Spezies *A. hydrophila*, *A. veronii* bv. *sobria* und *A. jandaei* diese  $\beta$ -Laktamase produzieren können, fehlt das kodierende Gen in *A. caviae* und *A. trota* Stämmen. Das Auftreten einzelner *A. caviae* Stämme, die eine Metallo- $\beta$ -Laktamase bilden können, lässt

vermuten, dass ein horizontaler Transfer dieser Gene in einigen Fällen möglich ist [Rossolini *et al.*, 1996].

Das Vorhandensein von Plasmid kodierten  $\beta$ -Laktamasen in *Aeromonas* spp. wurde bislang nur selten beobachtet. In zwei Fällen konnte ein Plasmid mit der Extended-Spektrum  $\beta$ -Laktamase TEM-24 in *A. hydrophila* und *A. caviae* nachgewiesen werden [Marchandin *et al.*, 2003, Fosse *et al.*, 2004]. In einem weiteren Bericht wird das Auftreten eines Plasmids mit einer TEM-ähnlichen  $\beta$ -Laktamase in *A. caviae* beschrieben, die jedoch in diesem Stamm nicht exprimiert wird. Anscheinend können *Aeromonas* Arten ein stilles Reservoir für Plasmid kodierte TEM-ähnliche  $\beta$ -Laktamasen bilden [Sayeed *et al.*, 1996].

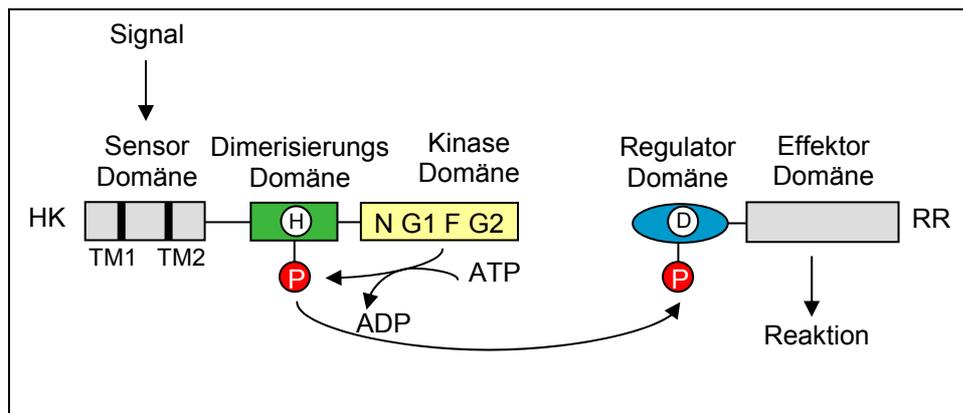
Da die Produktion der chromosomalen  $\beta$ -Laktamasen einem gemeinsamen Regulationsmechanismus unterliegt, können  $\beta$ -Laktame die Bildung der Enzyme koordiniert induzieren [Iaconis und Sanders, 1990]. Zusätzlich dazu entstehen mit einer Frequenz von  $10^{-7}$  -  $10^{-9}$  dereprimierte Mutanten die alle drei  $\beta$ -Laktamasen überproduzieren, was der Häufigkeit für eine einzelne Punktmutation entspricht [Walsh *et al.*, 1995, Walsh *et al.*, 1997]. Die Expressions-Regulation der  $\beta$ -Laktamasen erfolgt bei *Aeromonas* spp. durch ein so genanntes Zwei-Komponenten-System.

### **1.7. Regulation der $\beta$ -Laktamase-Expression durch ein Zwei-Komponenten-System**

Zwei-Komponenten-Systeme detektieren und transduzieren externe Signale, die durch Veränderungen in der Umwelt auftreten, und veranlassen die bakterielle Zelle zur Anpassung an die neuen Bedingungen. Das *E. coli* Genom kodiert beispielsweise für 62 verschiedene Zwei-Komponenten-Systeme, die an der Regulation von verschiedenen Prozessen wie Chemotaxis, Osmoregulation, Metabolismus und Transport beteiligt sind [Mizuno, 1997]. Außerdem können Zwei-Komponenten-Systeme an der Virulenzausprägung pathogener Erreger und an der Bildung verschiedener Resistenzmechanismen beteiligt sein [Stephenson und Hoch, 2002].

Ein Zwei-Komponenten-System besteht aus zwei hoch konservierten Proteinen, einer Histidin Proteinkinase (Sensor kinase) und einem Response Regulator (Abbildung 1.6.).

**Abb. 1.6.** Phosphotransfer eines Zwei-Komponenten-Systems [West und Stock, 2001]



Die Mehrheit der Histidin-Kinasen sind membrangebundene, homodimere Proteine mit einer N-terminalen periplasmatischen Sensor-Domäne, die mit einer C-terminalen cytoplasmatischen Kinase-Domäne verbunden ist [West und Stock, 2001]. Während die Sequenz der Sensor-Domäne variabel ist, besteht die Kinase-Domäne aus hoch konservierten Bereichen [Stock *et al.*, 1989]. Bindet ein spezifisches Signal an die Sensor-Domäne, erfolgt die Autophosphorylierung eines Histidin-Restes der Kinase-Domäne. Dabei katalysiert die eine Untereinheit des Dimers die ATP-abhängige Autophosphorylierung eines Histidin-Restes der zweiten Dimeruntereinheit. Dieser Phosphatrest kann dann anschließend auf den Response Regulator übertragen werden.

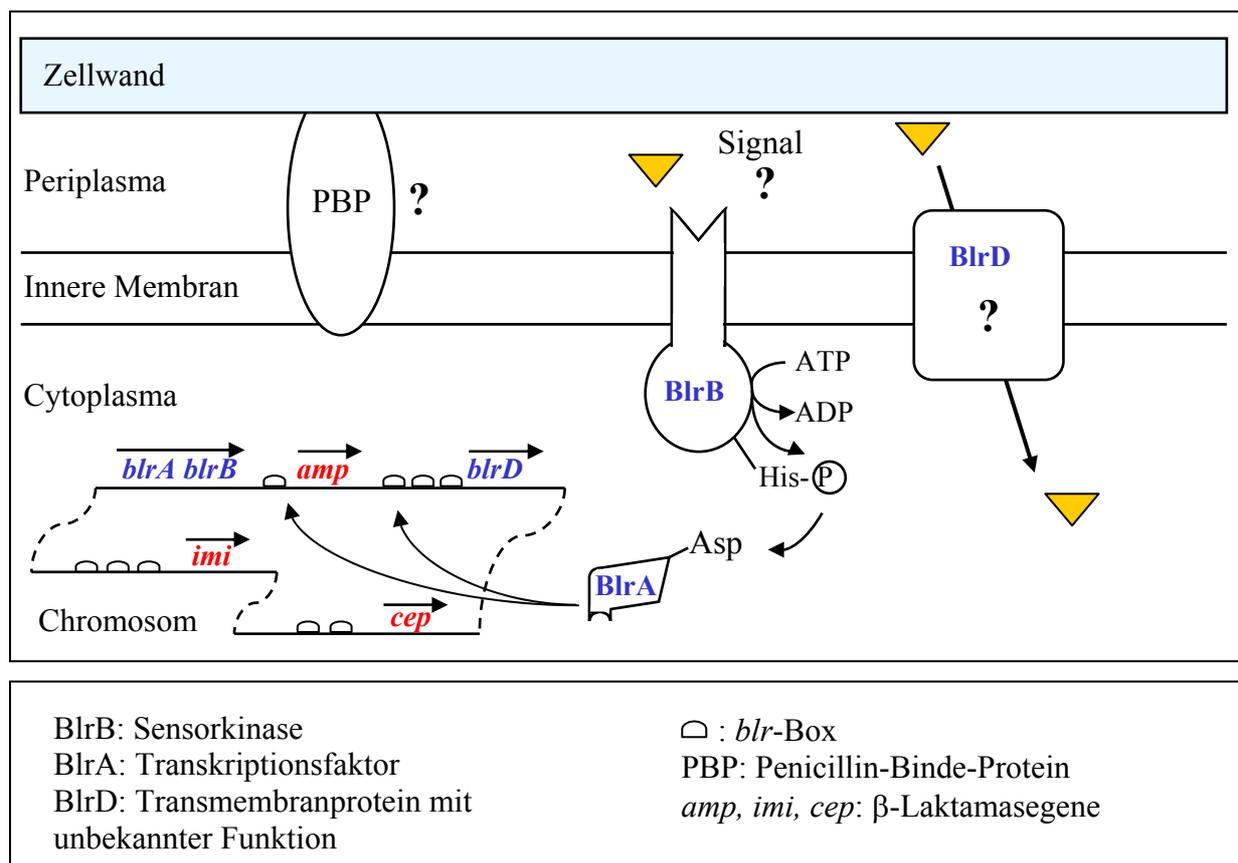
Response Regulator Proteine besitzen eine N-terminale Regulator-Domäne und eine variable C-terminale Effektor-Domäne. Die Regulator-Domäne hat drei verschiedene Funktionen. Zum einen interagiert sie mit der phosphorylierten Histidin-Kinase und katalysiert den Transfer des Phosphatrestes auf einen eigenen Aspartatrest. Zum anderen reguliert sie die Aktivitäten der mit ihr assoziierten Effektor-Domäne und kann durch ihre Autophosphatase-Aktivität ihren eigenen Aktivierungszustand limitieren [West und Stock, 2001]. Die Effektor-Domäne verfügt über ein helix-turn-helix-DNA-Bindemotiv, womit die Domäne an die DNA binden kann und die Transkription eines oder mehrerer Gene aktiviert.

Durch den hier beschriebenen Mechanismus kann eine Bakterienzelle ihre Gen-Expression variieren und so auf Veränderungen in der Umwelt reagieren.

Die gleichzeitige Expression aller drei  $\beta$ -Laktamase-Gene durch das Zwei-Komponenten-System in *Aeromonas* spp. ermöglicht der Zelle einen maximalen Schutz gegenüber  $\beta$ -Laktam-Antibiotika. Der Regulationsmechanismus besteht aus der Sensorkinase BlrB und dem Response Regulator BlrA (Abbildung 1.7.). Beide Proteine zeigen hohe Homologien zu dem CreBC-Zwei-Komponenten-System von *E. coli*. Dieses System besteht aus der

Sensorkinase CreC und dem Respons Regulator CreB. Die genaue Funktion dieses Zwei-Komponenten-Systems ist bislang unbekannt, es wird jedoch vermutet, dass es an der Regulation wichtiger Stoffwechselwege in *E. coli* beteiligt ist [Avison *et al.*, 2001]. Insgesamt sind 63% der Aminosäuren von BlrA identisch mit denen des Transkriptionsfaktors CreB [Alksne und Rasmussen, 1997] und 65% der BlrB-Sequenzen identisch zu denen der Sensorkinase CreC [Niumsup *et al.*, 2003]. Eine  $\beta$ -Laktamase-überproduzierende *blrB*-Mutante, mit einer Punktmutation in der Kinase-Domäne, belegt die Funktion von BlrB als Sensorkinase. Die Klonierung und Expression dieses mutierten *blrBs* in dem Wildtyp resultierte in einem dereprimierten Phänotyp [Avison *et al.*, 2001].

**Abb. 1.7.** Zwei-Komponenten-System zur  $\beta$ -Laktamase-Expression in *Aeromonas* spp.



Zwischen den Genen *blrA* und *blrB* ist kein Transkriptionsterminator zu erkennen. Anscheinend bilden beide Gene ein Operon [Niumsup, 1998], wie es häufig bei den Proteinen eines Zwei-Komponenten-Systems zu finden ist [Albright *et al.*, 1989]. Untersuchungen der genetischen Umgebung der drei  $\beta$ -Laktamase-Gene ergab, dass 75 Nukleotide stromabwärts von *blrB* das Gen für die Penicillinase *ampH* in derselben Orientierung zu finden ist. Die Gene für die Cephalosporinase *cepH* und die Carbapenemase *imiH* liegen im Chromosom

verstreut und weisen keine räumliche Nähe zu einem Transkriptions Regulator Protein auf [Niumsup *et al.*, 2003].

Neben dem *blrA-blrB*-Operon und *ampH* ist noch *blrD* in dem Gencluster zu finden. Dieses Gen liegt 118 Nukleotide stromabwärts von *ampH* und kodiert für ein integrales Membranprotein. BlrD besteht aus insgesamt sechs Transmembran-Domänen, eine ist N-terminal und fünf sind C-terminal lokalisiert. Dazwischen befindet sich eine große periplasmatische Schleife [Avison *et al.*, 2004]. Die Funktion von BlrD ist bislang unbekannt. Niumsup *et al.* [1998] postulierten, dass dieses Protein als Permease fungiert und die Aufnahme des Signals ins Cytoplasma ermöglicht. Dadurch würde BlrD direkt mit der Sensor kinase BlrB um das Signal konkurrieren. Die Aminosäuresequenz von BlrD zeigt 35% Homologien zu dem CreD-Protein von *E. coli*, einem Protein, welches zum CreBC-System gehört und dessen Funktion ebenfalls noch nicht aufgeklärt werden konnte [Amemura *et al.*, 1986, Drury und Buxton, 1988].

In *E. coli* wird die Expression von *creD* über das CreBC-System reguliert [Avison *et al.*, 2001]. Real-Time Versuche zur Expression der  $\beta$ -Laktamasen in *A. hydrophila* verdeutlichen, dass neben den drei  $\beta$ -Laktamase-Genen auch *blrD* über das Zwei-Komponenten-System reguliert wird. Ein RT-PCR Versuch mit einem passenden Primer in *ampH* und einem in *blrD* erzielte kein PCR-Produkt, was darauf schließen lässt, dass die Expression von *blrD* nicht über ein Durchlesen des *ampH*-Transkripts erreicht wird [Avison *et al.*, 2004].

Die koordinierte Expression von vier Genen, die nicht in einem Operon kodiert vorliegen, lässt auf das Vorhandensein einer gemeinsamen regulatorischen Sequenz schließen. Bei allen vier Genen ist eine kurze Nukleotid-Sequenz (*blr*-Box) innerhalb von 70 bp vor dem jeweiligen Transkriptstart zu finden. Möglicherweise sind dies die Bindestellen für den Transkriptionsfaktor BlrA. Die Anzahl der *blr*-Boxen vor den verschiedenen Genen ist variabel. Während sich vor *imiH* und *blrD* drei *blr*-Boxen befinden, sind vor *cepH* zwei *blr*-Boxen und vor *ampH* nur eine *blr*-Box vorhanden [Niumsup, 2003, Avison *et al.*, 2004]. Die Expression des jeweiligen Gens korreliert mit der Anzahl der davor befindlichen *blr*-Boxen. Je mehr Boxen vor dem Gen sind, desto höher ist die Expression nach Induktion [Niumsup, 2003, Avison *et al.*, 2001, Avison *et al.*, 2004].

Das Signalmolekül, welches im Periplasma an BlrB bindet und die Signal-Kaskade auslöst, ist bislang unbekannt. Da BlrB keine  $\beta$ -Laktam-Bindestelle besitzt, kann man die direkte Bindung eines  $\beta$ -Laktam-Antibiotikums an BlrB ausschließen [Niumsup *et al.*, 2003]. Die Induktion der  $\beta$ -Laktamasen erfolgt unter Einwirkung von  $\beta$ -Laktamen. Diese stören durch

Inhibierung der PBPs den Zellwandstoffwechsel einer Zelle. Anhand von  $\beta$ -Laktamasen-überproduzierenden Transposonmutanten, bei denen der Verlust eines PBPs nachgewiesen wurde, konnten PBPs als Komponenten des Regulationssystems für die  $\beta$ -Laktamasen-Expression identifiziert werden [Westphal, 2003]. Dies unterstützt die Hypothese, dass es sich möglicherweise bei dem Induktionssignal um ein Abbauprodukt des Peptidoglykans handelt, welches durch den veränderten Murein-Stoffwechsel vermehrt entsteht.

### **1.8. Zielsetzung der Arbeit**

In dieser Arbeit sollte das Bild der Zwei-Komponenten-Regulation der  $\beta$ -Laktamase-Expression bei *Aeromonas* spp. weiter vervollständigt werden. Vorgänge, die in Gegenwart von  $\beta$ -Laktamen zur Induktion der Sensor kinase BlrB führen, sollten näher untersucht werden. Die Hypothese, dass ein durch  $\beta$ -Laktame gestörter Zellwandstoffwechsel eine Rolle bei der  $\beta$ -Laktamase Induktion spielt, indem Abbauprodukte der Zellwand das eigentliche Signal für das Zwei-Komponenten-System darstellen, sollte überprüft werden. Penicillin-Binde-Proteine sind am Zellwandstoffwechsel beteiligt und scheinen auch in die Induktion der  $\beta$ -Laktamase-Gene involviert zu sein. Die genaue Rolle der PBPs bei der  $\beta$ -Laktamase-Expression sollte näher charakterisiert werden. Des Weiteren soll die Beteiligung der noch unbekannt Komponente BlrD am BlrA/BlrB-System nachgewiesen werden.

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Material

#### 2.1.1. Bakterienstämme

Die in dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme sind in den Tabellen 2.1. bis 2.3. aufgelistet.

**Tab. 2.1.** *Aeromonas veronii* bv. *sobria* Stämme

Stamm	Beschreibung	Referenz
163 aP	klinisches Isolat	Walsh <i>et al.</i> , 1995
TnM3	$\beta$ -Laktamasen überproduzierende Transposonmutante	Westphal, 2003
TnM4	$\beta$ -Laktamasen überproduzierende Transposonmutante	Westphal, 2003
TnM15	$\beta$ -Laktamasen überproduzierende Transposonmutante	Westphal, 2003
TnM19	$\beta$ -Laktamasen überproduzierende Transposonmutante	Westphal, 2003
TnM21	$\beta$ -Laktamasen überproduzierende Transposonmutante	Westphal, 2003
TnM23	$\beta$ -Laktamasen überproduzierende Transposonmutante	Westphal, 2003
TnM27	$\beta$ -Laktamasen überproduzierende Transposonmutante	Westphal, 2003

**Tab. 2.2.** *Aeromonas hydrophila* Stämme

Stamm	Beschreibung	Referenz
T429125	klinisches Isolat	Niumsup <i>et al.</i> , 2003
Tn1		Westphal, 2003

**Tab. 2.3.** *E. coli* K-12 Laborstämme

Stamm	Genotyp	Beschreibung	Referenz
DH5a	<i>supE44, hsdR17, recA1, gyrA96, thi.1, F-, endA1, deoR, lambda-</i>	Wirtsstamm für die Klonierung	Invitrogen, Karlsruhe
SN03	<i>F<sup>-</sup> ampC8 ampA1 pyrB rpsL recA</i>	enthält <i>ampR/ampC</i> aus <i>E. cloacae</i>	Normark und Burman, 1977
JRG582	<i>nadC-ampD-ampE-aroP</i>	Isolation von Anhydromuramylpeptiden	Langley und Guest, 1977
JRG58201	<i>ampG::km</i>	Isolation von Anhydromuramylpeptiden	Lindquist <i>et al.</i> , 1993

### 2.1.2. Plasmide

In Tabelle 2.4. sind die Plasmide angegeben, die im Rahmen dieser Arbeit verwendet bzw. erzeugt wurden. Letztere kamen bei der Transformation in elektrokompente *E. coli* DH5 $\alpha$ - oder *Aeromonas* T429125-Zellen zum Einsatz.

**Tab. 2.4.** Genotypische Darstellung der Vektoren und rekombinanten Plasmide

rekombinantes Plasmid	Vektor	Größe	Marker	Insert	Herkunft
	pSU18	2300 bp	Cm <sup>R</sup>		Martinez <i>et al.</i> , 1988
pBPAS1	pSU18	~9800 bp	Cm <sup>R</sup> , Km <sup>R</sup>	Genomische DNA aus TnM19	diese Arbeit
pBPAS1-a	pSU18	~8000 bp	Cm <sup>R</sup>	Genomische DNA aus TnM19	diese Arbeit
pBPAS3	pSU18	5841 bp	Cm <sup>R</sup> , Km <sup>R</sup>	Genomische DNA aus TnM4	diese Arbeit
	pUTkm2	7055 bp	Amp <sup>R</sup> , Km <sup>R</sup>		de Lorenzo <i>et al.</i> , 1990
	pBAD/ <i>Myc</i> -His A	4100 bp	Amp <sup>R</sup>		Invitrogen, Karlsruhe
pBAD-Km	pBAD/ <i>Myc</i> -His A	5040 bp	Amp <sup>R</sup> ::Km <sup>R</sup>	Km <sup>R</sup> aus pUTkm2	diese Arbeit
pBAD- <i>blrD</i> -Km	pBAD/ <i>Myc</i> -His A	6420 bp	Amp <sup>R</sup> ::Km <sup>R</sup>	<i>blrD</i> aus <i>A. hydrophila</i> Tn1, Km <sup>R</sup> aus pUTkm2	diese Arbeit

### 2.1.3. Oligonukleotide

In dieser Arbeit wurden verschiedene Primer (Tabelle 2.5.) zum Nachweis von Genen per PCR, zum Sequenzieren, in der Real-Time RT-PCR oder zu Klonierungen eingesetzt. Die Synthese der Oligonukleotide erfolgte durch die Firma Operon, Köln. Der Primer DapE+VE stammte aus der Dissertationsarbeit von Frau Westphal [2003], die Primer RealTime-EcAmpC5 und RealTimeEcAmpC3 aus der Dissertationsarbeit von Frau Schneider [2004].

**Tab. 2.5.** Oligonukleotide

Primer	Bindung in	Funktion	Sequenz 5' → 3'
Peco1	pSU18	PCR, Sequenzierung	GAGCGGATAACAATTCACAC
Psall	pSU18	PCR, Sequenzierung	TCCCAGTCACGACGTTGTA

**Fortsetzung Tab. 2.5. Oligonukleotide**

Aph(3')I-F	<i>km<sup>R</sup></i>	PCR, Sequenzierung	TTATGCCTCTTCCGACCATC
Aph(3')I-R	<i>km<sup>R</sup></i>	PCR, Sequenzierung	GAGAAACTCACCGAGGCAG
aphI-FW-2	<i>km<sup>R</sup></i>	PCR, Sequenzierung	TGCCTCGGTGAGTTTTCTC
AphI-F-2	<i>km<sup>R</sup></i>	PCR, Sequenzierung	ATGGTCGGAAGAGGCATAA
Km-Fw	<i>km<sup>R</sup></i>	Klonierung	ACGTTGTGTCTCAAAATCTC
Km-Rev	<i>km<sup>R</sup></i>	Klonierung	AACCAATTAACCAATTCTGA
P19E1	pBPAS1	Sequenzierung	TGCGGTGCGTCAAGCCAGC
PAS1-aA	pBPAS1-a	Sequenzierung	CGCAGTTCTTGTCGATGATCAC CGAC
PAS1-aB	pBPAS1-a	Sequenzierung	AGCCTGAATGTCGGTGGCAA
P41	pBPAS3	Sequenzierung	GTTGGCGAAAAAGGCGTG
P41B	pBPAS3	Sequenzierung	ATGTGGTCTGCGCGCCATGC
P41C	pBPAS3	Sequenzierung	AACCAGCTGCTCGGCGATC
P41D	pBPAS3	Sequenzierung	GCACCTTGTTCTTTCATC
P41E	pBPAS3	Sequenzierung	AACATCACGAAGGCCTTG
P41F	pBPAS3	Sequenzierung	TGTCGATGAAGCCCACCA
PBP4-F	<i>pbp4</i>	PCR, Sequenzierung	CGGGTGAAACAAGGTTGAAT
PBP4-R	<i>pbp4</i>	PCR, Sequenzierung	AGTGGAATTGTGATACGGC
PBP4-M	<i>pbp4</i>	PCR, Sequenzierung	AAGGAGCCACAGGGACTGC
PBP9-Fw	<i>ddcA</i>	PCR, Sequenzierung	GGACGATCTGGATCTGCT
PBP9-Rev	<i>ddcA</i>	PCR, Sequenzierung	GTCGCTTCATGTCCTTGA
DapE+VE	<i>dapE</i>	PCR	GAGATGTGGTGAAGAACG
PBP-TSP1	<i>ddcA</i>	PCR	CGCCTTCAACGACATGCA
PBP-TSP2	<i>ddcA</i>	PCR	ACGCCGGTTTCAACCTGCA
PBP-TSP3	<i>ddcA</i>	PCR, Sequenzierung	TTTCAACCTGCAGCCCGCCT
DW-ACP 1	unbekannt	PCR	unbekannt, SpeedUp-Kit
DW-ACP 2	unbekannt	PCR	unbekannt, SpeedUp-Kit
DW-ACP 3	unbekannt	PCR	unbekannt, SpeedUp-Kit
DW-ACP 4	unbekannt	PCR	unbekannt, SpeedUp-Kit
DW-ACPN	unbekannt	PCR	unbekannt, SpeedUp-Kit
Universal	unbekannt	PCR	unbekannt, SpeedUp-Kit
BlrD-NcoI-L	<i>blrD</i>	Klonierung	GACGTGCCATGGTCAAACAGA NcoI
BlrD-HindIII-R	<i>blrD</i>	Klonierung	GCTCTCCAAGCTTGCCGTCGTG HindIII
BlrD-F	<i>blrD</i>	Nachweis	TGATCTTCGTCCATACCGTG
BlrD-R	<i>blrD</i>	Nachweis	TAGCAAACCCGAGTAGAGCA

**Fortsetzung Tab. 2.5.** Oligonukleotide

pBAD-Fw	pBAD/ <i>Myc</i> -His A	Sequenzierung	CTACTGTTTCTCCATACCCG
pBAD-Rev	pBAD/ <i>Myc</i> -His A	Sequenzierung	GACGGCGCTATTCAGATCCTC
ImiSL	<i>imi A.veronii</i>	Real-Time RT-PCR	TTGTTTACTTCCCCGACCAG
ImiSR	<i>imi A.veronii</i>	Real-Time RT-PCR	GTCTGCGGATAAGCCTTCAC
GyrL	<i>gyr</i>	Real-Time RT-PCR	TTTCAGCGATACCCTGTTCC
GyrR	<i>gyr</i>	Real-Time RT-PCR	ATGGAGACACCGGAGTTGAG
BlrDrealL	<i>blrD</i>	Real-Time RT-PCR	GCCGAACCTGAACGGTAAGAC
BlrDrealR	<i>blrD</i>	Real-Time RT-PCR	GGACAGCACCAGGTTTCAGAT
CepH-realT-Fw	<i>cep A.hydrophila</i>	Real-Time RT-PCR	TGACCCTGATAGGCTTGTTCC
CepH-realT-Rev	<i>cep A.hydrophila</i>	Real-Time RT-PCR	CTCGGCTTGCATCACACTTA
AmpH-realT-Fw	<i>amp A.hydrophila</i>	Real-Time RT-PCR	AGTACACCGCCAACATCCTC
AmpH-realT-Rev	<i>amp A.hydrophila</i>	Real-Time RT-PCR	CATCCAGCTTCTTCGGGTAG
ImiH-realT-Fw	<i>imi A.hydrophila</i>	Real-Time RT-PCR	ACAAGCTGATCAAACGGGTC
ImiH-realT-Rev	<i>imi A.hydrophila</i>	Real-Time RT-PCR	GGACTTCCAGTAGGCGTTACC
RealTimeEc AmpC5	<i>ampC Enterobacter</i>	Real-Time RT-PCR	GATATGGCGAACTGGGTCAT
RealTimeEc AmpC3	<i>ampC Enterobacter</i>	Real-Time RT-PCR	CAGCCCAGACCCTGATACAT

#### 2.1.4. Antibiotika

In Tabelle 2.6. sind die verwendeten Antibiotika unter Angabe der Hersteller aufgelistet. Für die Substanzen, die zur Selektion von Klonen benutzt wurden, sind die Konzentrationen angegeben.

**Tab. 2.6.** Antibiotika

Antibiotikum	Konzentration [ $\mu\text{g/ml}$ ]	Hersteller
Ampicillin	50	Sigma, Deisenhofen
Chloramphenicol	30	Boehringer, Mannheim
Kanamycin	30	Sigma, Deisenhofen
Imipenem	--	MSD, München

### 2.1.5. Enzyme

Die in dieser Arbeit verwendeten Enzyme sind in Tabelle 2.7. angegeben.

**Tab. 2.7.** Enzyme

Enzym	Bezugsquelle
alkalische Phosphatase (Shrimp)	Roche, Mannheim
Lysozym	Sigma, Deisenhofen
Proteinase K	Sigma, Deisenhofen
Proteinase K	Qiagen, Hilden
REDAccuTaq™	Sigma, Steinheim
RedTaq™	Sigma, Steinheim
Restriktionsenzyme <i>EcoRI</i> <i>SalI</i> <i>NcoI</i> <i>HindIII</i> <i>ScaI</i>	New England Biolabs, Schwalbach New England Biolabs, Schwalbach New England Biolabs, Schwalbach Gibco, BLR, Eggenstein New England Biolabs, Schwalbach
RNase A	Qiagen, Hilden
RQ1 DNase	Promega, Madison, USA
Triple Master Taq	Eppendorf, Hamburg
T4-DNA-Ligase	Roche, Mannheim
T4-DNA-Ligase	Invitrogen, Karlsruhe

### 2.1.6. Nährmedien

Die Angaben in Tabelle 2.8. beziehen sich auf ein Volumen von einem Liter. Die Nährböden und Nährmedien wurden unmittelbar nach dem Einwiegen gelöst und autoklaviert.

**Tab. 2.8.** Nährmedien

Medium	Bezugsquelle bzw. Herstellungsvorschrift
Agar-Agar	Merck, Darmstadt
LB-Medium	10 g Trypton, 10 g NaCl, 5 g Hefeextrakt; pH 7,5
M9-Salze (5x)	42,5 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> *2H <sub>2</sub> O, 15 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 2,5 g NaCl, 5 g NH <sub>4</sub> Cl
M9-Medium	1x M9-Salze, 0,2% Glukose, 0,1% Casamino-säuren, 50 µg/ml Uracil, 1 µg/ml Thiamin, 1 mM MgSO <sub>4</sub> , 5 µg/ml Nicotinamid, 0,001 mM CaCl <sub>2</sub>

**Fortsetzung Tab. 2.8.** Nährmedien

Müller-Hinton-Medium, Kationen optimiert	Becton Dickinson, Le Pont de Claix, Frankreich
Standard NI-Bouillon	Merck, Darmstadt
SOC-Medium	2% Trypton, 0,5% Hefeextrakt, 10 mM MgSO <sub>4</sub> , 10 mM MgCl <sub>2</sub> , 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 20 mM Glucose

**2.1.7. Puffer und Lösungen**

In Tabelle 2.9. sind die eingesetzten Puffer und Lösungen angegeben.

**Tab. 2.9.** Puffer und Lösungen

<b>Lösung bzw. Puffer</b>	<b>Zusammensetzung/Hersteller</b>
alkalisches Kupferreagenz	2% Lsg. C, 2% Lsg. B, 96% Lsg. A 2% CuSO <sub>4</sub> (Lsg. B) 4% K-Na-Tartrat (Lsg. C) 3% Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> in 0,1 M NaOH (Lsg. A)
AccuTaq Puffer (10x)	Sigma, Steinheim
Beschwererlösung (6x)	0,25% Bromphenolblau, 0,25% Xylencyanol, 20% Ficoll
Dephosphorylierungspuffer (10x)	Roche, Mannheim
<u>DNeasy Tissue Kit</u> Puffer ATL (Lysispuffer) Puffer AL (Lysispuffer) Puffer AW1 (Waschpuffer) Puffer AW2 (Waschpuffer) Puffer AE (Elutionspuffer) Proteinase K	Qiagen, Hilden ohne Angaben ohne Angaben ohne Angaben ohne Angaben ohne Angaben
High Fidelity Puffer (10x)	Eppendorf, Hamburg
<u>HiSpeed Plasmid Midi Kit</u> Puffer P1 (Resuspensionspuffer) Puffer P2 (Lysis-Puffer) Puffer P3 (Neutralisationspuffer) Puffer QBT (Equilibrierungspuffer) Puffer QC (Waschpuffer) Puffer QF (Elutionspuffer) Puffer TE (Elutionspuffer)	Qiagen, Hilden 50 mM TrisHCl; pH 8, 10 mM EDTA, 100 µg/ml RNase A 200 mM NaOH, 1% SDS 3 M Kaliumacetat; pH 5,5 750 mM NaCl, 50mM MOPS pH 7, 0,15% Triton X-100, 15% Isopropanol 1 M NaCl, 50mM MOPS pH 7, 15% Isopropanol 1,25 M NaCl, 50mM TrisHCl, 15% Isopropanol 10 mM TrisHCl pH 8, 1 mM EDTA
Master Mix II (2x)	Seegene, Rockville, USA
MgCl <sub>2</sub> -freier Polymerase-Puffer	Sigma, Steinheim
<u>MinElute PCR Purification Kit</u> Puffer PB (Bindungspuffer) Puffer PE (Waschpuffer) Puffer EB (Elutionspuffer)	Qiagen, Hilden ohne Angabe ohne Angabe 10 mM Tris; pH 8,5

**Fortsetzung Tab. 2.9. Puffer und Lösungen**

NEBuffer <i>Eco</i> RI (10x)	New England Biolabs, Schwalbach
NEBuffer <i>Sal</i> I (10x)	New England Biolabs, Schwalbach
NEBuffer4 (10x)	New England Biolabs, Schwalbach
Nitrocefin-Lösung (1 mM)	5 mg Nitrocefin in 0,5 ml DMSO ad 10 ml mit 0,05 M Phosphatpuffer
<u>NucleoSpin RNA II</u>	Macherey-Nagel, Düren
Puffer RA1 (Lysispuffer)	ohne Angaben
Puffer RA2 (Waschpuffer)	ohne Angaben
Puffer RA3 (Waschpuffer)	ohne Angaben
Phosphatpuffer, 0,05 M; pH 7 (Sörensen)	0,2 M Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 0,2 M NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; pH 7
<u>QIAprep Miniprep Kit</u>	Qiagen, Hilden
Puffer P1 (Resuspensionspuffer)	50 mM TrisHCl; pH 8, 10 mM EDTA, 100 µg/ml RNase A
Puffer P2 (Lysis-Puffer)	200 mM NaOH, 1% SDS
Puffer N3 (Neutralisationspuffer)	ohne Angaben
Puffer PB (Waschpuffer)	ohne Angaben
Puffer PE (Waschpuffer)	ohne Angaben
Puffer EB (Elutionspuffer)	10mM Tris pH 8,5
<u>QIAquick Gel Extraction Kit</u>	Qiagen, Hilden
Puffer QG (Bindungspuffer)	ohne Angaben
Puffer PE (Waschpuffer)	ohne Angaben
Puffer EB (Elutionspuffer)	10 mM Tris pH 8,5
<u>QuantiTect SYBR Green RT-PCR Kit</u>	Qiagen, Hilden
RT-PCR Master Mix (2x)	HotStarTaq DNA Polymerase QuantiTect SYBR Green RT-PCR Puffer dNTP Mix SYBR Green I ROX 5 mM MgCl <sub>2</sub>
RT Mix	Omniscript Reverse Transkriptase Sensiscript Reverse Transkriptase
TAE-Puffer	40 mM Tris-Acetat, 1 mM EDTA; pH 8
Tuning Puffer (10x)	Eppendorf, Hamburg
T4-DNA-Ligationspuffer (10x)	Roche, Mannheim
T4-DNA-Ligasepuffer (5x)	Invitrogen, Karlsruhe

### 2.1.8. Chemikalien und sonstige Materialien

**Tab. 2.10.** Chemikalien und sonstige Materialien

<b>Chemikalien</b>	<b>Hersteller</b>
Agarose	Roth, Karlsruhe
L(+)-Arabinose	Fluka Chemie GmbH, Buchs
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
BSA (Rinderserumalbumin)	Serva, Heidelberg
Bulgecin	Takeda Chemical Industries, Japan
Calciumchlorid	Merck, Darmstadt
DEPC-Wasser	AppliChem, Darmstadt
D(+)-Glukose-Monohydrat	Merck, Darmstadt
DMSO	Fluka, Seelze
DNA Molecular weight Marker V	Boehringer, Mannheim
dNTPs	Metabion, Martinsried
Ethanol p.A.	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Biomol, Hamburg
Fluorescein	Biorad, München
Filterpapier	BioRad Lab., München
Folin-Ciocalteus-Phenolreagenz	Merck, Darmstadt
Gene Pulser Cuvette	BioRad. Lab., München
Glycerin, ultra pure	ICN Biomedicals, Eschwege
Magnesiumchlorid	Eppendorf, Hamburg
Magnesiumchlorid	Sigma, Steinheim
2-Mercaptoethanol	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
MetaPhor® Agarose	Cambrex Bio Science, Rockland, USA
Methanol	Merck, Darmstadt
Mitsubishi Thermo Papier K61 B	Mitsubishi, Japan
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Nitrocefin	Oxoid, Basingstoke, England
NucleoBond Folded Filter XL	Macherey-Nagel, Düren
PCR softtubes, RNase-frei	Biozym, Hess. Oldendorf
Phosphorsäure 85%	Merck, Darmstadt

**Fortsetzung Tab. 2.10.** Chemikalien und sonstige Materialien

RNase Inhibitor	Amersham Biosciences, Freiburg
RNase Zap®	Sigma-Aldrich, Steinheim
Safeseal Tips Premium	Biozym, Hess. Oldendorf
Smart Ladder	Eurogentec, Seraing, Belgien
Sterilfilter	Pall, Dreieich
Tris-HCl	Sigma, Steinheim
Wasser, HPLC	Merck, Darmstadt
Zentrifugenflaschen, 500 ml	Nalgene, Rochester, USA

### 2.1.9. Geräte

In Tabelle 2.11. sind die in dieser Arbeit benutzten Geräte unter Angabe der Hersteller aufgelistet.

**Tab. 2.11.**Geräte

Geräte	Hersteller
Analog pH-Meter CG711	Schott, Hofheim
Biofuge 28S	Heraeus, Osterode
Brutschrank	Heraeus, Osterode
Electrophoresis Power Supply	GibcoBRL, Eggenstein
Electrophoresis Power Supply EPS 500/400	Pharmacia
Eppendorf MiniSpin	Eppendorf, Hamburg
Gelelektrophorese-Apparatur Typ 30015 und 300414	Renner, Darmstadt
iCycler iQ	BioRad, München
iCycler	BioRad, München
J2-21 Zentrifuge	Beckmann
Micro Pulser	BioRad Lab., München
PCR UNO-Thermoblock	Biometra, Göttingen
Reinstwasseranlage Easy Pure LF®	Barnstead
Rollinkubator	Schütt, Göttingen
Scanner Agfa e40	Aga-Gevaert, Leverkusen
Schüttelinkubator Certomat	Braun Biotech

**Fortsetzung Tab. 2.11. Geräte**

Schüttelinkubator	New Brunswick Scientific Co, New Jersey, USA
Spectralphotometer Hitachi 150-20	Colora, Lorch
Spectrophotometer Novaspec® II	Pharmacia Biotech, Freiburg
Speedvac SC 100	Savant, USA
Ultraschallprozessor UP 50H	Dr. Hielscher GmbH, Teltow
UV-Link	Biometra, Göttingen
Videodokumentationsanlage	INTAS, Göttingen

**2.2. Mikrobiologische Methoden**

**2.2.1. Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration**

Um die Antibiotika-Empfindlichkeit eines Bakterienstammes zu untersuchen, wurde die minimale Hemmkonzentration (MHK) durch Mikrodilution ermittelt. Die MHK ist definiert als die geringste Konzentration eines Antibiotikums, bei der unter standardisierten Bedingungen ein sichtbares Bakterienwachstum verhindert wird. Bei dem Mikrodilutionsverfahren werden Mikrotitrationsplatten der Firma Merlin-Diagnostika GmbH (Bornheim), die Antibiotika in dehydratisierter Form enthalten, mit Bakteriensuspension beimpft.

Zur Herstellung der Bakteriensuspension wurden Kolonien einer 18-24 h alten Müller-Hinton-Agar-Platte in 0,9 %-iger Kochsalzlösung suspendiert und eine  $OD_{560}$  von  $0,12 \pm 0,02$  (McFarland Standard 0,5) eingestellt. Die Suspension wurde 1:1000 in Müller-Hinton-Bouillon verdünnt und gut durchmischt. Anschließend wurden je 100  $\mu$ l in die Vertiefungen der Mikrotitrationsplatten pipettiert und die Platten bei 37°C bebrütet. Die Auswertung erfolgte nach 18-22 h visuell.

**2.2.2. Bestimmung der Lebendkeimzahl**

Die Anzahl der Lebendkeime wurde durch 1:10 Verdünnung der Probe in physiologischer Kochsalzlösung bestimmt. Es wurde eine Verdünnungsreihe bis  $10^{-7}$  hergestellt und je 50  $\mu$ l der Verdünnungen  $10^{-4}$  bis  $10^{-7}$  auf LB-Agarplatten ausgestrichen. Nach Inkubation über

Nacht bei 37°C wurden die koloniebildenden Einheiten (KBE) gezählt und die KBE pro ml berechnet.

### **2.2.3. Bulgecin Agar Diffusionstest**

Um den Einfluss von Peptidoglykan-Abbauprodukten auf die  $\beta$ -Laktamase-Expression zu untersuchen, sollte die lytische Transglykosylase Slt70 durch den spezifischen Inhibitor Bulgecin gehemmt werden. Dafür wurde ein Bulgecin Agar Diffusionstest in Anlehnung an Kraft *et al.* [1999] durchgeführt. Dabei wurden 20 ml LB-Agarplatten mit 10 - 40  $\mu$ l Übernachtskultur (ÜNK) überschichtet. Anschließend wurden sterile Filterpapiere (5 mm) mit Cefoxitin (500  $\mu$ g/ml), Ampicillin (40  $\mu$ g/ml) oder Bulgecin (verschiedene Konzentrationen) getränkt. Jeweils ein Streifen mit dem Antibiotikum und ein Streifen mit Bulgecin wurden in einem 90° Winkel zueinander angeordnet auf die Platte gelegt. Die Agarplatten wurden über Nacht bebrütet und am nächsten Tag visuell ausgewertet.

## **2.3. Methoden der Proteinbiochemie**

### **2.3.1. Induktion der $\beta$ -Laktamasen**

Die  $\beta$ -Laktamase-Induktion der *Aeromonas*-Stämme bzw. der verschiedenen Klone wurde nach einem modifizierten Verfahren von Pham und Bell [1993] durchgeführt.

Dazu wurde eine ÜNK 1:100 in LB- bzw. N1-Bouillon verdünnt und im Trockenschüttler bei 37°C bis zu einer OD<sub>546</sub> von  $0,5 \pm 0,05$  inkubiert. Zur Induktion der  $\beta$ -Laktamasen wurde einem Ansatz Ampicillin in einer Endkonzentration von 64  $\mu$ g/ml zugegeben, und die Kultur für eine weitere Stunde bebrütet. Zur Herstellung des  $\beta$ -Laktamase-Rohextrates wurden jeweils 10 ml der Proben für 20 min bei 5300 Upm und 4°C abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Zellpellet in 1 ml Sörensenpuffer resuspendiert. Um den Zellaufschluß zu erleichtern, wurden die Proben über Nacht eingefroren. Im Eisbad wurden die Proben 3x10 s mit Ultraschall behandelt und die Zelltrümmer durch 10 min Zentrifugation bei 4°C und 15000 Upm abzentrifugiert. Der klare Überstand wurde in neue Caps aliquotiert und zur Messung der spezifischen  $\beta$ -Laktamase-Aktivität eingesetzt.

Sollte die Induktion der  $\beta$ -Laktamasen mittels Real-Time RT-PCR untersucht werden, so betrug die Induktionszeit mit Ampicillin lediglich 10 min. Anschließend erfolgte dann die Präparation der RNA.

### 2.3.2. Spektralphotometrischer $\beta$ -Laktamase-Test

Die Messung der  $\beta$ -Laktamase-Aktivität wurde nach einem Verfahren von O'Callaghan *et al.* [1968] durchgeführt. Nitrocefin ist ein chromophores Substrat-Analogon zu Cephalosporinen und kann von  $\beta$ -Laktamasen hydrolytisch gespalten werden, wodurch ein Farbumschlag von gelb nach rot erfolgt. Durch die Extinktionszunahme bei 485 nm kann die  $\beta$ -Laktamase-Aktivität gemessen werden.

Folgende Versuchsansätze wurden verwendet:

0,05 M Sörensenpuffer	900 $\mu$ l
1 mM Nitrocefin	50 $\mu$ l
Enzymrohextrakt in geeigneter Verdünnung	50 $\mu$ l

Mit Hilfe des Lambert-Beerschen Gesetzes kann die Enzymaktivität bestimmt werden:

$$E = \varepsilon \cdot c \cdot d$$

E: Extinktion

$\varepsilon$ : molarer Extinktionskoeffizient von Nitrocefin [ $\text{l}\cdot\text{mmol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ ]

c: Konzentration des Nitrocefins [ $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ ]

d: Schichtdicke der Küvette [cm]

Die Umsatzgeschwindigkeit  $v$  eines Enzyms ist definiert als die Änderung der Substratkonzentration pro Zeiteinheit ( $v = \Delta c / \Delta t$  [ $\mu\text{mol}\cdot\text{ml}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ ]).

Durch Kombination der beiden Formeln ergibt sich die Gleichung: 
$$v = \frac{\Delta E}{\varepsilon \cdot d \cdot \Delta t} [\text{U/ml}]$$

Die spezifische  $\beta$ -Laktamase-Aktivität [ $\mu\text{mol}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ ] wird in Bezug auf den Proteingehalt der Probe berechnet.

### 2.3.3. Proteinbestimmung nach LOWRY *et al.*

Zur Messung des Proteingehalts wurde die Methode nach LOWRY *et al.* [1951] eingesetzt, bei der die Aminosäuren mit dem Stickstoffatom ihrer Aminogruppe komplex an  $\text{Cu}^{2+}$ -Ionen binden, wodurch ein farbiger Chelatkomplex gebildet wird. Zusätzlich dazu wird das Folin-Ciocalteus-Phenolreagenz durch bestimmte Aminosäuren (Tyrosin, Tryptophan, Cystein, Histidin) reduziert, wodurch die Lösung blau gefärbt wird.

Zuerst wurde eine Eichreihe mit BSA-Proben bekannten Proteingehaltes (0-240  $\mu\text{g/ml}$ ) erstellt, mit der die Proteinkonzentration der Proben bestimmt werden konnte. Zu 100  $\mu\text{l}$  jeder BSA-Verdünnungsstufe wurde 1 ml alkalisches Kupferreagenz gegeben, die Lösung gut durchmischt und für 10 min bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Anschließend wurden 100  $\mu\text{l}$  frisch verdünntes Folin-Ciocalteus-Phenolreagenz (1:3 in aq. dest.) hinzugefügt, gemischt und bei Raumtemperatur (RT) für 20 min inkubiert. Die Extinktion wurde bei 578 nm gegen den Leerwert gemessen. Die Enzymrohextrakte wurden 1:20 in Sörensenspuffer verdünnt und ebenfalls mit alkalischem Kupferreagenz und Folin-Ciocalteus-Phenolreagenz behandelt.

### 2.3.4. Präparation von löslichen Muropeptiden

Die Präparation der löslichen Muropeptide erfolgte in Anlehnung an die Methode nach Jacobs *et al.*, 1994. Hierfür wurde eine ÜNK 1:100 in 2 l M9-Bouillon verdünnt und im Trockenschüttler bis zu einer  $\text{OD}_{560}$  von  $0,5 \pm 0,05$  bebrütet. Anschließend wurden die Zellen durch Zentrifugation bei 5000 Upm für 10 min bei  $4^\circ\text{C}$  geerntet, und in 1x-fachen Volumen eiskalten  $\text{TrisHCl}$  (0,01 M, pH8) resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation (5000 Upm,  $4^\circ\text{C}$ , 10 min) wurde das Pellet in ca. 20 ml eiskaltem, sterilem Wasser aufgenommen. Der Ansatz wurde nach und nach in ca. 20 ml kochendes Wasser gegeben und für 20 min gekocht, wobei ständig neues Wasser nachgefüllt wurde. Auf diese Art und Weise wurde die Probe bis zu einem Volumen von 1 ml eingengt. Der Niederschlag von nichtlöslichem Zellmaterial erfolgte durch Zentrifugieren bei 13400 Upm für 15 min bei RT. Durch die Zugabe von 1x-fachen Volumen eiskalten Methanol und einer fünfzehnminütigen Inkubation auf Eis wurden Proteine gefällt und bei 10000 Upm für 15 min bei RT abzentrifugiert. Der pH-Wert der Probe wurde durch Zugabe von Phosphorsäure auf pH 3 eingestellt. Die dabei ausfallenden Proteine wurden durch Zentrifugieren für 10 min bei 10000 Upm entfernt und die Muropeptidlösung bis zur weiteren Verwendung bei  $-20^\circ\text{C}$  eingefroren.

### 2.3.5. Überproduktion von BlrD

Um die Funktion des Membranproteins BlrD genauer zu untersuchen, sollte das Protein in verstärktem Maße gebildet werden. Dafür wurde ein Überexpressionssystem, der pBAD-Expressions-Vektor verwendet. Prinzipiell werden bei Überexpressionssystemen die natürlichen Promotoren und Ribosomen-Bindestellen durch äußerst effiziente Systeme ersetzt. Beim pBAD-System unterliegt die Expression des Zielproteins der Kontrolle des *araBAD*-Promotors [Guzman *et al.*, 1995]. Dieser Promotor wird sowohl positiv als auch negativ durch AraC reguliert. AraC ist ein Transkriptionsregulator, der mit L-Arabinose einen Komplex bildet. Im Normalzustand bildet AraC ein Dimer, das an zwei verschiedenen Stellen an die DNA bindet und so die Bildung einer DNA-Schleife verursacht, wodurch die Transkription des Zielgens verhindert wird. Durch Zugabe von L-Arabinose wird ein AraC-Arabinose-Komplex gebildet, wodurch sich AraC von der einen Bindestelle löst, die DNA-Schleife zerfällt und die Transkription des Zielgens beginnt.

Eine ÜNK des Expressionstamms T429125 mit pBAD-*blrD-Km* wurde 1:100 in LB-Medium verdünnt, mit Kanamycin versetzt und bei 37°C bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,4 ± 0,04 geschüttelt. Der Hälfte der Kultur wurde L-Arabinose hinzugefügt, und beide Kulturansätze für 1 h bei 37°C inkubiert. Um einen Gen-Dosis Effekt zu untersuchen, wurden unterschiedliche Konzentrationen an Arabinose (Endkonzentration 0,0002%-0,2%) ausgetestet. Beide Kulturen wurden auf zwei verschiedenen Kolben aufgeteilt, und je einer der Ansätze wurde mit Ampicillin (Endkonzentration 64 µg/ml) versetzt. Wenn der β-Laktamase-Rohextrakt untersucht werden sollte, wurden die Kulturen für 1 weitere h inkubiert, für Versuche mittels Real-Time RT-PCR wurden die Ansätzen nur für weitere 10 min bebrütet (siehe 2.3.1.).

## 2.4. Molekularbiologische Methoden

### 2.4.1. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die PCR ist eine Methode zur in-vitro-Amplifikation von DNA-Abschnitten. Dabei wird die Zielsequenz, flankiert von zwei Oligonukleotiden (Primern), in den anschließenden Zyklen exponentiell vervielfältigt. In den flankierenden Sequenzbereichen binden die Primer gegenläufig an die komplementären Bereiche und ermöglichen die Amplifikation des zwischen ihnen liegenden Abschnitts durch eine hitzestabile DNA-Polymerase.

Ein PCR-Zyklus besteht prinzipiell aus drei Schritten:

1. Denaturierung: Durch Erhitzen wird die DNA in Einzelstränge getrennt.
2. Anlagerung (Annealing): Die Primer binden an komplementäre Sequenzbereiche.
3. DNA-Synthese (Extension): Verlängerung der Primer durch die Taq-Polymerase.

Nach 30 Zyklen sind von der DNA-Zielsequenz im Idealfall ca.  $10^7$  Kopien vorhanden.

Als Template wurde bei den unterschiedlichen PCR-Reaktionen entweder Plasmid-DNA, genomische DNA oder DNA aus Aufkochpräparaten (z.B. zur Überprüfung von Klonen) benutzt. Im Laufe dieser Arbeit wurden verschiedene DNA-Polymerasen verwendet. Bei einer herkömmlichen PCR wurde die RedTaq (Sigma, Steinheim), mit einer zusätzlichen proofreading-Funktion ein Gemisch (1:1) aus RedTaq und REDAccuTaq (Sigma, Steinheim) und, wenn außerdem die Sequenz besonders GC-reich war, die Triple Master Taq (Eppendorf, Hamburg) eingesetzt. In den Tabellen 2.12. bis 2.17. sind die Reaktionsansätze für die verschiedenen Polymerasen mit den dazugehörigen Amplifikationsbedingungen aufgelistet.

**Tab. 2.12.** Reaktionsansatz für die RedTaq

Polymerase-Puffer 10x	10 µl
MgCl <sub>2</sub> 25 mM	6 µl
dNTPs 2 mM	2,5 µl
Primer A 10 µM	2 µl
Primer B 10 µM	2 µl
RedTaq	5 µl
Template	x µl
Wasser	ad 100µl

**Tab. 2.13.** Amplifikationsbedingungen

<u>Temperatur</u>	<u>Zeit</u>	<u>Zyklen</u>
95°C	5 min	1
X°C	1 min	30
72°C	1 min	30
95°C	1 min	30
X°C	1 min	1
72°C	10 min	1
4°C	Pause	

**Tab. 2.14.** Reaktionsansatz AccuTaq/RedTaq

AccuTaq Puffer 10x	2,5µl
dNTPs 2 mM	1,25 µl
Primer C 25 µM	1 µl
Primer D 25 µM	1 µl
RedTaq	0,75 µl
AccuTaq	0,75 µl
Template	x µl
Wasser	ad 25 µl

**Tab. 2.15.** Amplifikationsbedingungen

<u>Temperatur</u>	<u>Zeit</u>	<u>Zyklen</u>
95°C	3 min	1
95°C	1 min	10
Z°C	1 min	10
68°C	2 min	10
95°C	1 min	25
Z°C	1 min	25
68°C	2 min+5 s	25
68 °C	10 min	1
4°C	Pause	

**Tab. 2.16.** Reaktionsansatz Triple Master Taq

<u>Mix 1</u>		<u>Mix 2</u>	
Puffer 10x	1,5 µl	Puffer 10x	1 µl
Primer E 25 µM	0,4 µl	dNTPs 10 mM	0,5 µl
Primer F 25µM	0,4 µl	Taq	0,3 µl
Template	x µl	MgCl <sub>2</sub>	x µl
Wasser	ad 15 µl	Wasser	ad 10 µl

Für die Triple-Master Taq wurden zwei verschiedene Master-Mixe angesetzt und auf Eis aufbewahrt. Master-Mix 1 wurde zunächst für 30 s auf 98 °C erhitzt und erneut auf Eis gestellt, wo dann die Vermengung mit Master-Mix 2 erfolgte. Anschließend wurde der PCR-Ansatz ab dem 97°C-Schritt weiter inkubiert.

**Tab. 2.17.** Reaktionsbedingungen für die Triple Master Taq

<u>Temperatur</u>	<u>Zeit</u>	<u>Zyklen</u>
98°C	30 s	1
97°C	5 min	1
97°C	30 s	35
Y°C	30 s	35
72°C	1 min	35
4°C	Pause	

Für vier verschiedene Gene sind die verwendeten Polymerasen und die spezifischen Annealing Temperaturen in Tabelle 2.18. angegeben. Eine Abweichung der Elongations Zeit von den ursprünglichen Bedingungen ist ebenso aufgelistet wie der verwendete Puffer und die MgCl<sub>2</sub>-Konzentration pro 25 µl Ansatz.

**Tab.2.18.** spezifische PCR-Bedingungen

<b>Gen</b>	<b>Taq</b>	<b>Puffer / MgCl<sub>2</sub></b>	<b>Annealing Temperatur</b>	<b>Elongations Zeit</b>
<i>pbp4</i>	RedTaq/AccuTaq	--	58°C	--
<i>ddcA</i>	Triple Master	Tuning Puffer 0,75 µl MgCl <sub>2</sub>	55°C	50 s
<i>blrD</i>	Triple Master	High Fidelity Puffer	64°C	1,5 min
<i>km</i>	Triple Master	Tuning Puffer 0,75 µl MgCl <sub>2</sub>	39°C	--

Zur Überprüfung der PCR-Produkte wurden je 10 µl der Probe mit 2 µl Beschwererlösung vermischt und auf ein 1% Agarosegel aufgetragen.

### **2.4.2. Herstellung der Template-DNA durch Aufkochpräparate**

Zur Aufbereitung der Template-DNA wurden drei bis fünf Kolonien einer 16-20 h alten Bakterienkultur (LB-Agar) in 100 µl PCR-Wasser resuspendiert. Der Ansatz wurde für 10 min bei 99°C erhitzt, und die Zelltrümmer bei 13400 Upm für 10 min abzentrifugiert. Anschließend wurden pro 100 µl Ansatz 5 µl der Suspension als Template eingesetzt.

### **2.4.3. Isolierung von DNA und RNA**

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

Die Isolation von Plasmid-DNA aus einer 5 ml ÜNK (in LB-Bouillon) erfolgte mit Hilfe des QIAprep Miniprep Kits von Qiagen, Hilden. Dazu wurde zunächst die ÜNK für 2 min bei 13400 Upm zentrifugiert und durch Zugabe des Puffers P1 resuspendiert. Nach Behandlung mit den Puffer P2 und N3 wurde die Probe bei 13000 Upm abzentrifugiert und der Überstand auf eine QIAprep Spin-Säule aufgetragen. Den verschiedenen Wasch- und Zentrifugationsschritten folgte anschließend die Elution der Plasmid-DNA in 50 µl EB-Puffer. Für höhere Plasmidkonzentrationen in einem geringeren Volumen wurde der EB-Puffer 1:2 bzw. 1:5 mit Merck-Wasser verdünnt und das Eluat in der Speedvac einrotiert.

Zur Isolierung von Plasmiden aus 150 – 400 ml Bakterienkultur (ÜNK in LB-Bouillon) wurde das HiSpeed Plasmid Midi Kit von Qiagen, Hilden verwendet. Die Zellernte erfolgte durch Zentrifugation bei 5300 Upm für 15 min bei 4°C, wonach die Probe in P1-Puffer resuspendiert wurde. Die alkalische Zell-Lyse erfolgte durch Zugabe von Puffer P2. Nach Neutralisierung der Probe durch Zusatz von Puffer P3 wurden die ausgefallenen Proteine, Zelltrümmer und genomische DNA durch Filtration durch einen NucleoBond Filter von den im Überstand enthaltenen Plasmiden getrennt. Der Überstand wurde dann auf eine äquilibrierte Säule gegeben und nach einem Waschschrift mit QC-Puffer in QF-Puffer eluiert. Das Eluat wurde durch Isopropanol gefällt und mit einer Spritze durch einen QIA-

Precipitator-Filter gepresst. Der Filter wurde mit durchgepresster Luft getrocknet und die Plasmide in TE-Puffer eluiert.

### **2.4.3.2. Präparation von genomischer DNA**

Die Präparation genomischer DNA wurde mit dem DNeasy Tissue Kit der Firma Qiagen GmbH, Hilden ausgeführt. Dafür wurde 1 ml einer ÜNK in LB-Bouillon bei 13400 Upm für 2 min abzentrifugiert und der Überstand entfernt. Zur Isolierung der DNA wurden exakt die Anweisungen des Herstellers befolgt. Die gesäuberte DNA wurde zweifach in verschiedene Eppendorf-Gefäße eluiert. Für das erste Eluat wurde 150 µl, für das zweite Eluat 100 µl AE-Puffer auf die Membran der Säule aufgetragen. Der Ansatz wurde für 1 min bei RT stehen gelassen und danach für 1 min bei 8000 Upm zentrifugiert. Um den Erfolg der Präparation zu überprüfen, wurden 10 µl der Probe auf ein 0,8%-iges Agarosegel aufgetragen.

### **2.4.3.3. Präparation von RNA**

Um Kontaminationen mit RNAsen zu vermeiden, wurden alle verwendeten Glasbehälter und Pinzetten bei 220°C für 8 Stunden sterilisiert. Vor Arbeitsbeginn wurde die Arbeitsfläche mit RNase Zap (Sigma-Aldrich, Steinheim) behandelt, um vorhandene RNAsen zu inaktivieren. Anschließend wurde die Arbeitsfläche mit 70%-igem Ethanol und DEPC-Wasser abgewischt. Bei der Arbeit mit RNA wurden stets Einmalhandschuhe getragen, die in regelmäßigen Abständen gewechselt wurden. Außerdem wurden RNase-freie Eppendorf-Gefäße und RNase-freie Filterspitzen benutzt.

Die Isolation der RNA erfolgte mit Hilfe des NucleoSpin RNA II Kit von Macherey-Nagel, Düren. Von der zu untersuchenden Probe wurde 0,5 ml bei 13400 Upm für 1 min abzentrifugiert und das Pellet in 100 µl TE-Puffer mit 2 mg/ml Lysozym resuspendiert. Der Ansatz wurde bei 37°C für 10 min inkubiert. Anschließend wurden die Zellen durch Zugabe von 350 µl RA1-Puffer und 3,5 µl Mercaptoethanol lysiert. Das Lysat wurde auf eine NucleoSpin Filter-Säule aufgetragen und für 1 min bei 13400 Upm zentrifugiert. Zum Überstand wurden 350 µl 70%iger Ethanol hinzugefügt und die Probe auf eine NucleoSpin RNA-Säule überführt. Nach Zentrifugation bei 10000 Upm für 30 s wurde die Säule in ein neues Auffanggefäß übertragen. Anschließend erfolgten drei verschiedene Waschschrte mit jeweiliger Zentrifugation bei 10000 Upm für 30 s. Um die Säulenmembran zu trocknen,

wurde nach dem letzten Waschschrift für 2 min bei 13400 Upm zentrifugiert. Zum Abschluss wurde die RNA in 60 µl Wasser durch Zentrifugation (13400 Upm, 1 min) eluiert.

Um die in der Probe vorhandene DNA abzubauen, wurde der Probe 4 µl eines Gemischs aus DNase RQ1 und RNase-Inhibitor (4 µl DNase RQ1 + 0,5 µl RNase-Inhibitor) hinzugefügt. Da diese Enzyme äußerst empfindlich sind, wurde der Ansatz nur durch ein vorsichtiges Umrühren mit der Pipettenspitze vermischt. Anschließend erfolgte die Inkubation für 2 h bei 37°C im Wasserbad. Um die DNAsen zu inaktivieren, wurde die Probe für 10 min auf 70°C erhitzt und für die folgenden Arbeitsschritte auf Eis aufbewahrt. Wenn die RNA für einen längeren Zeitraum verwahrt werden sollte, erfolgte dies bei -70°C.

Die Konzentration der RNA wurde durch Messen der Absorption bei 260 nm in einem Spektralphotometer bestimmt. Dabei wurde die Formel

$$A_{260} \cdot l = 40 \mu\text{g/ml RNA}$$

verwendet, die den Extinktionskoeffizienten von RNA in Wasser angibt. Je 30µl RNA wurden in 570 µl Merck-Wasser verdünnt und in einer Quarzglas-Küvette vermessen.

### **2.4.4. Reinigung von PCR-Produkten**

Die Aufreinigung von PCR-Fragmenten wurde mit Hilfe des MinElute PCR Purification Kits der Firma Qiagen GmbH, Hilden durchgeführt. Dafür wurde das PCR-Produkt mit dem fünffachen Volumen PB-Puffer vermischt und auf eine MinElute-Säule aufgetragen. Nach Zentrifugation für 1 min bei 13000 Upm wurde die Säule mit PE-Puffer gewaschen und zweimal für 1 min bei 13000 Upm zentrifugiert. Die Elution des PCR-Produktes erfolgte in 10 µl EB-Puffer. Um höhere DNA-Konzentrationen zu erzielen, wurde der Puffer zuvor auf 50°C erhitzt oder 1:2 mit Merck-Wasser verdünnt und die Probe anschließend in der Speedvac einrotiert.

### **2.4.5. Agarose-Gelelektrophorese**

Als Elektrophorese bezeichnet man die Wanderung geladener Teilchen im elektrischen Feld [Stryer, 1996]. Bei der Agarose-Gelelektrophorese wandern DNA-Fragmente aufgrund ihrer negativ geladenen Phosphatreste zur Anode, wobei die Fragmente der Größe nach aufgetrennt werden.

Für die Gelelektrophorese wurden verschiedene Horizontalapparaturen verwendet. Je nach Größe der aufzutrennenden DNA wurden 0,8%-, 1%- oder 4%-ige Agarosegele benutzt. Durch Aufkochen in Laufpuffer (1xTAE) wurde die Agarose gelöst. Nach Abkühlen auf ca. 55°C wurde pro 100 ml Laufpuffer 3 µl Ethidiumbromid zugegeben. Die Proben wurden mit 1/6 Volumen Beschwererlösung vermischt und zusammen mit einem Molekulargewichtsmarker auf das Gel aufgetragen. Zum Einlaufen der Proben wurde eine Spannung von 50 V angelegt, die anschließend auf 100 V erhöht wurde.

Ethidiumbromid interkaliert in doppelsträngige DNA, wodurch diese unter UV-Bestrahlung sichtbar wird. Nach der Elektrophorese wurden die DNA-Banden durch UV-Licht sichtbar gemacht und mit Hilfe einer Videokamera dokumentiert.

### **2.4.6. DNA Extraktion aus dem Agarose-Gel**

Unter der UV-Lampe wurde die entsprechende DNA-Bande mit einem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten und in einem Eppendorf-Gefäß gewogen. Je nach Größe des ausgeschnittenen Fragmentes und je nach gewünschtem Elutionsvolumen wurde entweder das QIAquick-Kit oder das MinElute-Kit von Qiagen verwendet. Die Aufreinigung der extrahierten Bande erfolgte dabei jeweils nach Anleitung des Herstellers. Wenn höhere DNA-Konzentrationen in eventuell geringerem Volumen erforderlich waren, wurde der Elutions-Puffer zuvor auf 50°C erhitzt oder 1:2 mit Merck-Wasser verdünnt und die Probe anschließend in der Speedvac einrotiert.

### **2.4.7. Sequenzierung von DNA**

Alle Sequenzierungen wurden von der Firma SeqLab, Göttingen durchgeführt. Je nach zu sequenzierendem DNA-Abschnitt wurde dazu entweder ein PCR-Produkt oder Plasmid-DNA zu SeqLab geschickt.

Für die Sequenzierungen wurde folgender Reaktionsansatz verwendet (Tab 2.19.):

**Tab. 2.19.** Sequenzierungsansatz

PCR-Produkt pro bp	0,2 ng
Plasmid	0,6 µg
Primer 25 µmol	0,8 µl
Merck-Wasser	ad. 7 µl

## 2.4.8. Enzymatische Modifikation von DNA

### 2.4.8.1. Restriktionsverdauung

Bakterien besitzen ein Restriktions- und Modifikationssystem, das dazu dient eindringende fremde DNA zu zerstören während die eigene DNA durch Modifikation geschützt ist. Restriktionsenzyme schneiden doppelsträngige DNA an einer spezifischen Erkennungssequenz. In der Gentechnologie werden häufig Restriktionsendonukleasen der Klasse 2 eingesetzt, die innerhalb der Erkennungsregion spalten.

Der vollständige Verdau der DNA ist von der DNA-Konzentration und der Anzahl der Schnittstellen in der DNA abhängig. Die dafür benötigte Enzymmenge berechnet sich nach folgender Formel:

$$\text{Enzym (U)} = \frac{\mu\text{g DNA} \cdot 5 \cdot 10^4 \cdot S_v}{\text{bp DNA} \cdot S_\lambda \cdot h}$$

$S_v$  = Schnittstellen in der DNA

$S_\lambda$  = Schnittstellen im  $\lambda$  Genom

$h$  = Inkubationszeit

Die Restriktion der DNA wurde nach folgendem Ansatz (Tabelle 2.20.) durchgeführt:

**Tab. 2.20.** Restriktionsansatz

Komponente	Volumen
DNA	x µg
10 x Puffer	1/10 Vol.
BSA 100 x	1/100 Vol.
Restriktionsenzym	y U
Aqua dest.	z µl

Das Volumen des in Glycerin gelösten Enzyms darf höchstens 1/10 des Gesamtvolumens betragen, da ansonsten der Glycerinanteil zu groß ist und die Restriktion beeinträchtigt werden könnte.

Der Plasmid-Verdau wurde für 2-4 h, der Verdau genomischer DNA über Nacht inkubiert. Die Inkubationstemperatur wurde dabei entsprechend nach der optimalen Reaktionstemperatur des Enzyms gewählt. Bei einer Doppelverdauung mit zwei Enzymen wurde der Puffer und die Temperatur verwendet, bei der beide Enzyme ihre volle Aktivität entfalten können. Um die Restriktionsendonukleasen zu inaktivieren, wurde die Probe je nach Herstellerangaben für 20 min auf 65°C bzw. 80°C erhitzt. Wenn das Enzym nicht durch Hitze inaktivierbar war, erfolgte eine Aufreinigung der DNA-Fragmente entweder durch das MinElute-Kit oder das Miniprep-Kit von Qiagen (siehe 2.4.3.1. und 2.4.4.).

### **2.4.8.2. Dephosphorylierung**

Um eine Religation des geschnittenen Vektors bei der Ligation zu verhindern, wird die 5'-Phosphatgruppe durch die alkalische Phosphatase abgespalten.

Nach der Restriktionsverdauung wurden zu 7 µl geschnittenem Plasmid 1 µl Phosphatase und 0,9 µl Dephosphorylierungspuffer gegeben und über Nacht bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Phosphatase für 20 min bei 65°C inaktiviert.

### **2.4.8.3. Ligation**

Die DNA-Ligase ist ein Enzym, das die Bildung einer Phosphodiesterbindung zwischen zwei DNA-Strängen katalysiert. Es wird dabei die Hydroxylgruppe am 3'-Ende des einen Stranges mit der Phosphatgruppe am 5'-Ende des anderen Stranges verknüpft. *In vitro* können kohäsive, komplementär geschnittene Enden von DNA-Fragmenten verbunden werden.

Für die Ligation wurde das geschnittene Insert mit dem geschnittenen, dephosphorylierten Vektor vermischt. Zu 50 ng Vektor und 150 ng Insert wurden 5 U Ligase und 10 µl Ligationpuffer 2x pipettiert. Wenn die DNA-Fragmente „sticky Ends“ aufwiesen, wurde das Gemisch über Nacht bei 24°C inkubiert, bei „blunt Ends“ erfolgte die Inkubation bei 14°C. Da die Transformation mittels Elektroporation durchgeführt wurde, musste der Ligationsansatz vor der weiteren Verwendung zunächst entsalzt werden.

#### **2.4.9. Entsalzung der Ligationsprobe**

Zur Entsalzung des Ligationsansatzes wurde das Miniprep Kit von Qiagen verwendet. Dafür wurde das fünffache Volumen PB-Puffer zum 1x-fachen Volumen der DNA-Probe gegeben und die Lösung auf eine QIAprep Säule aufgetragen. Anschließend wurde die Säule mit PE-Puffer gewaschen und die entsalzte DNA in EB-Puffer oder in Wasser eluiert.

#### **2.4.10. Herstellung elektrokompetenter Zellen**

Zur Herstellung elektrokompetenter Zellen wurde eine ÜNK 1:50 in 2 l LB-Medium verdünnt und bis zu einer  $OD_{546}$  von  $0,5 \pm 0,05$  bebrütet. *E. coli* DH5 $\alpha$  Zellen wurden bei 37°C, *Aeromonas* Zellen bei 30°C inkubiert. Die Zellernte erfolgte durch Zentrifugieren bei 8000 Upm für 30 min bei 4°C. Anschließend wurden die Zellen 2x mit dem gleichen Volumen eiskalten Wassers gewaschen und abzentrifugiert. Das Pellet wurde in insgesamt 20 ml Glycerin (25%) aufgenommen und erneut zentrifugiert. Abschließend wurde die Zellsuspension in ca. 2-3 ml Glycerin (25%) resuspendiert und in 50  $\mu$ l Portionen aliquotiert. Bis zur Verwendung wurden die Zellen bei -70 °C gelagert.

#### **2.4.11. Übertragung von genetischem Material durch Transformation**

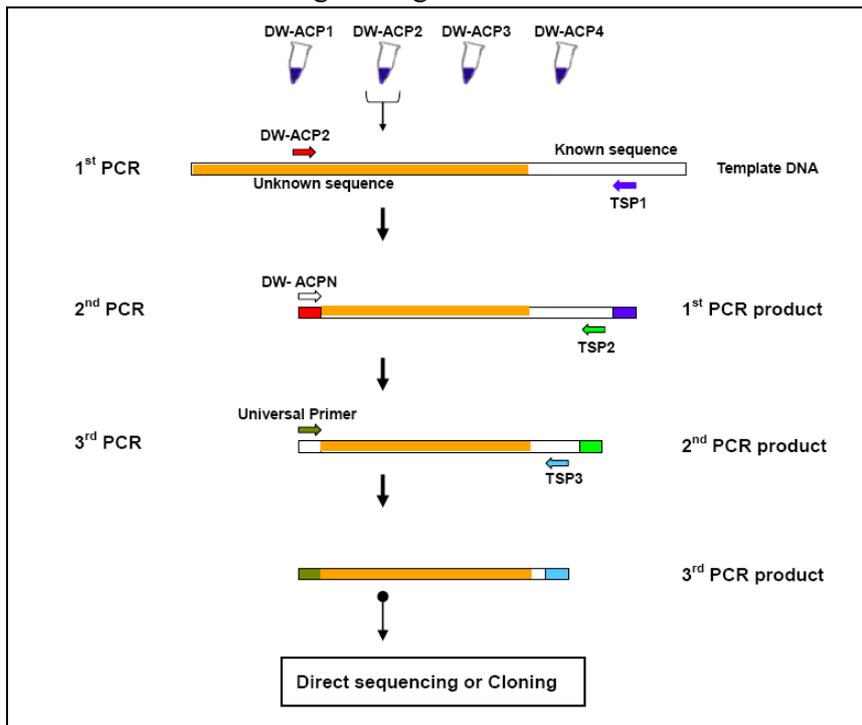
Die Aufnahme von freier DNA aus der Umgebung in die Bakterienzelle wird Transformation genannt. Die natürliche Aufnahmebereitschaft (Kompetenz) der Bakterien kann unter bestimmten Bedingungen erhöht werden. In dieser Arbeit wurde die Elektroporation eingesetzt, bei der durch Anlegen eines elektrischen Feldes die Membranen durchlässig gemacht werden.

Für die Transformation wurden 50  $\mu$ l kompetente Zellen vorsichtig auf Eis aufgetaut und mit dem Ligationsansatz (~ 200 ng DNA) vermischt. Das Gemisch wurde in eine vorgekühlte Küvette gefüllt und 15 min auf Eis inkubiert. Die Küvette wurde in den Micro Pulser gespannt und die Transformation mit einem Puls von 2,5 eV, 25  $\mu$ F, 200  $\Omega$  bei 5 ms durchgeführt. Unmittelbar danach wurde der Ansatz in vorgewärmtes SOC-Medium gegeben und für 1,5 bis 2 h im Rollinkubator bei 37°C bebrütet. Anschließend wurden je 100-200  $\mu$ l Zellen auf entsprechenden Selektionsagar ausplattiert und bei 37°C bebrütet. Als Negativkontrolle wurden nicht-transformierte kompetente Zellen auf Selektionsagar ausgestrichen.

### 2.4.12. Amplifikation von unbekannt Zielsequenzen

Um das Gen für die vermutliche Carboxypeptidase aus *A. veronii* bv. *sobria* vollständig sequenzieren zu können, wurde das DNA Walking *SpeedUp*<sup>TM</sup> Premix Kit der Firma Seegene, Rockville USA verwendet. Mit Hilfe dieses Kits können unbekannte Zielsequenzen, ausgehend von einer bekannten Sequenz, durch DNA-Walking amplifiziert werden. Das Prinzip der DNA-Walking Strategie ist in Abbildung 2.1. dargestellt.

**Abb. 2.1.** DNA-Walking Strategie



Zunächst wurden drei verschiedene Primer hergestellt (TSP1-TSP3), die alle in der bekannten Sequenz binden und in Richtung der unbekanntem Sequenz lesen. In drei aufeinander folgenden PCR-Reaktionen wurde die Zielsequenz amplifiziert und konnte nach der dritten PCR-Reaktion zum Sequenzieren verschickt werden. Als Template wurde in der ersten PCR-Reaktion genomische DNA eingesetzt. Die Tabellen 2.21. bis 2.26. geben die PCR-Reaktionsansätze und PCR-Bedingungen an.

**Tab. 2.21.** Erste PCR-Reaktion

DNA-Template	8 µl
DW-ACP-Primer (1-4) 2,5 µM	4 µl
TSP1-Primer 10 µM	1 µl
Master-Mix 2x	25 µl
Wasser	12 µl

**Tab. 2.22.** Amplifikationsbedingungen

<u>Temperatur</u>	<u>Zeit</u>	<u>Zyklen</u>
94°C	5 min	1
42°C	1 min	1
72°C	2 min	1
94°C	30 s	30
55°C	30 s	30
72°C	100s	30
72°C	7 min	1

Das PCR-Produkt aus der ersten PCR-Reaktion wurde mit Hilfe des MinElute Kits aufgereinigt und als Template in die Zweite PCR-Reaktion eingesetzt.

**Tab. 2.23.** Zweite PCR-Reaktion

Gereinigtes PCR-Produkt	2 µl
DW-ACPN-Primer 10 µM	1 µl
TSP2-Primer 10 µM	1 µl
Master-Mix 2x	10 µl
Wasser	6 µl

**Tab. 2.24.** Amplifikationsbedingungen

<u>Temperatur</u>	<u>Zeit</u>	<u>Zyklen</u>
94°C	3 min	1
94°C	30 s	35
56°C	30 s	35
72°C	100 s	35
72°C	7 min	1

Das Zweite PCR-Produkt konnte ohne vorherige Reinigung als Template in die dritte PCR-Reaktion eingesetzt werden.

**Tab. 2.25.** Dritte PCR-Reaktion

PCR-Produkt	2 µl
Universal Primer 10 µM	1 µl
TSP3-Primer 10 µM	1 µl
Master Mix 2x	10 µl
Wasser	6 µl

**Tab. 2.26.** Amplifikationsbedingungen

<u>Temperatur</u>	<u>Zeit</u>	<u>Zyklen</u>
94°C	3 min	1
94°C	30 s	35
61°C	30 s	35
72°C	100 s	35
72°C	7 min	1

Um die PCR-Reaktionen zu überprüfen, wurden je 9 µl aller PCR-Produkte auf ein Agarosegel aufgetragen. Die Banden mit der gewünschten Fragmentgröße wurden aus dem Gel ausgeschnitten und aufgereinigt. Anschließend erfolgte dann die Sequenzierung durch SeqLab, Göttingen.

### 2.4.13. Expressionsstudien mittel Real-Time RT-PCR

Die Auswirkung verschiedener Ausgangssubstanzen auf die Expression der  $\beta$ -Laktamasen wurde mit Hilfe der Real-Time RT-PCR untersucht. Dabei wurde ein Ein-Schritt-Verfahren angewendet, bei dem durch Kombination aus reverser Transkription und PCR die Amplifikation und Quantifizierung der mRNA erfolgt. Durch eine Reverse Transkriptase wird als erstes die mRNA in cDNA transkribiert. Währenddessen ist die DNA-Polymerase, die ebenfalls im Reaktionsansatz vorhanden ist, inaktiv, da ihr katalytisches Zentrum durch einen Antikörper blockiert ist, der erst durch Erhitzen denaturiert und entfernt werden kann. Daher erfolgt nach der reversen Transkription ein längerer Schritt bei hoher Temperatur (95°C), bei dem die DNA-Polymerase aktiviert und die Reverse Transkriptase inaktiviert wird. Die DNA-Polymerase amplifiziert dann anschließend in einer herkömmlichen PCR die cDNA.

Eine Weiterentwicklung der PCR ist die Real-Time PCR, die hauptsächlich auf Higuchi zurückzuführen ist [Higuchi *et al.*, 1992, Higuchi *et al.*, 1993]. Dabei kann durch die Zugabe eines Fluoreszenzfarbstoffes, der in doppelsträngige DNA interkaliert, die Amplifikation während der PCR sichtbar gemacht werden. Bei dem hier verwendeten „Quantitect SYBR Green RT-PCR Kit“ (Qiagen, Hilden) kommt das Fluorophor SYBR-Green zum Einsatz, das durch Halogen-, LED- oder Laserlicht angeregt werden kann.

Durch Berechnung eines Fluoreszenz-Schwellenwertes  $C_T$  (Threshold-Cycle) können die Produkte quantifiziert werden. Der  $C_T$ -Wert gibt dabei den Zyklus in der PCR an, bei dem die Fluoreszenz der Probe die Hintergrundfluoreszenz erstmals signifikant übersteigt. Man unterscheidet zwischen der absoluten und der relativen Quantifizierung. Bei der absoluten Quantifizierung werden bekannte DNA / RNA-Konzentrationen in der PCR eingesetzt und mit den daraus resultierenden  $C_T$ -Werten eine Standardkurve erstellt. Die Template-Konzentration der unbekannt Probe lässt sich dann anhand ihres  $C_T$ -Wertes absolut quantifizieren. Bei der relativen Quantifizierung wird der  $C_T$ -Wert des Target-Gens zu dem  $C_T$ -Wert eines Referenz-Gens in Bezug gesetzt. Der Genexpressionslevel des Target-Gens kann dann durch die Formel  $n = 2^{-\Delta\Delta C_T}$  berechnet werden.

Folgende Reagenzien und Amplifikationsbedingungen wurden für die Real-Time RT-PCR eingesetzt (Tab. 2.27. und Tab. 2.28.):

**Tab. 2.27.** Real-Time RT-PCR Ansatz

Fluorescein	0,2 µl
RT-PCR Master Mix 2x	10 µl
Primer Mix 25 µM	0,4 µl
RT-Mix	0,2 µl
Wasser	5,2 µl
RNA 1ng/µl	4 µl

**Tab.2.28.** Amplifikationsbedingungen

<u>Temperatur</u>	<u>Zeit</u>	<u>Zyklen</u>
50°C	30 min	1
95°C	15 min	1
94°C	30 s	35
57°C	30 s	35
72°C	30 s	35

Nach jeder Elongationsphase wurde die Fluoreszenz in dem iCycler iQ Real-Time System (Biorad, München) gemessen. Um die Spezifität der PCR-Produkte sicherzustellen, wurden nach der PCR die Produkte auf ein 4% Metaphor-Agarosegel aufgetragen und eine Schmelzkurvenmessung durchgeführt. Dabei wurde schrittweise alle 10 Sekunden die Temperatur um 0,5°C erhöht und die Fluoreszenz gemessen. Entsprechend ihrem Schmelzpunkt liegen die verschiedenen Produkte nur noch als Einzelstrang vor. Die damit verbundene Fluoreszenzabnahme erlaubt nun eine Differenzierung zwischen den kurzen, bei niedrigeren Temperaturen schmelzenden Primer-Dimeren von den längeren, bei höheren Temperaturen schmelzenden PCR-Produkten. Die Auswertung der Real-Time RT-PCR wurde mit der iCycler iQ Software (Biorad, München) durchgeführt, die zu jedem Reaktionsansatz den entsprechenden C<sub>T</sub>-Wert lieferte.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1. Charakterisierung der Transposonmutanten von *Aeromonas veronii* bv. *sobria*

Um die  $\beta$ -Laktamase-Induktion bei *Aeromonas veronii* bv. *sobria* weiter aufzuklären, war nach Genen gesucht worden, die an der Regulation der  $\beta$ -Laktamase-Expression beteiligt sind. Dafür waren durch Transposonmutagenese Mutanten hergestellt worden, die ihre  $\beta$ -Laktamasen in Abwesenheit eines Induktors überproduzieren.

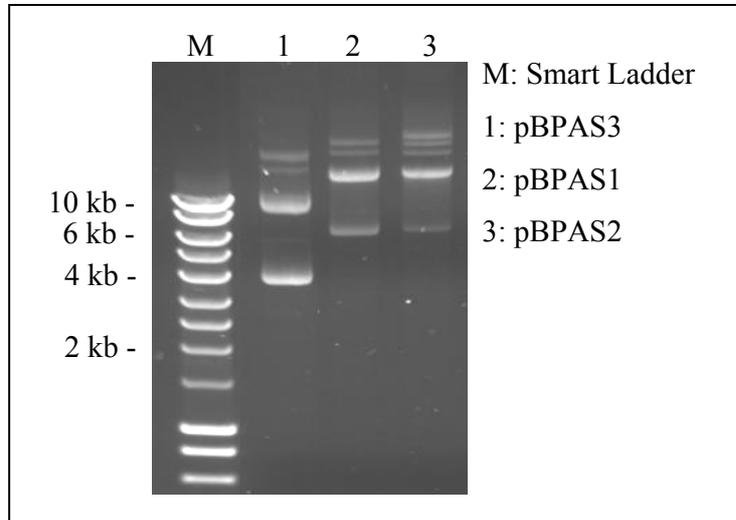
In diesem Projekt standen das klinische Isolat *A. veronii* bv. *sobria* 163a und davon abgeleitete Tn5-Mutanten zur Verfügung. Durch die Transposonmutagenese mit Tn5Km2 waren 19 verschiedene Klone erzeugt worden, die in zwei Mutanten-Typen differenziert wurden. Insgesamt konnten sieben Klone dem ersten Mutanten-Typ und elf Klone dem zweiten Mutanten-Typ zugeordnet werden. Ein Klon (TnM19) konnte anhand der PCR-Reaktion keinem dieser zwei Mutanten-Typen zugeteilt werden [Westphal, 2003]. Die Teil-Sequenzierung des durch das Transposon ausgeschalteten Gens ergab für den einen Mutanten-Typ einen Genabschnitt, dessen Genprodukt eine Homologie (35%-40%) zu einer D,D-Carboxypeptidase von verschiedenen Spezies aufweist. Das aus dem Chromosom des anderen Mutanten-Typs gewonnene Fragment hat eine Sequenz, dessen Genprodukt eine hohe Ähnlichkeit mit einem D,D-Carboxypeptidase verwandtem Protein bei *Vibrio cholerae* zeigt [Westphal, 2003, Niumsup, 1998].

##### 3.1.1. Klonierung zur Identifizierung des ausgeschalteten Gens

Zur Identifizierung des kompletten durch die Insertion ausgeschalteten Gens wurden die Mutanten TnM4 und TnM19 ausgewählt. Während TnM4 dem ersten Mutanten-Typ zugeordnet wurde, war der Insertionsort des Transposons in der TnM19-Mutante unbekannt. Das Chromosom dieser zwei Mutanten wurde jeweils mit einer Restriktionsendonuklease (TnM19 mit *EcoRI*, TnM4 mit *SaII*) verdaut. Nach Ligation der jeweiligen Fragmente mit dem entsprechend linearisierten Vektor pSU18 und Transformation in DH5 $\alpha$ -Zellen wurden die Zellen auf Chloramphenicol-Kanamycin-Agar ausgestrichen. Dies diente der Selektion von Klonen mit dem Vektor pSU18, die ein chromosomales Fragment mit dem inserierten Transposon enthielten. Auf diese Art und Weise konnten insgesamt zwei verschiedene Klone selektiert werden, die im Vektor genomische DNA aus der Mutante TnM19 (Plasmide pBPAS1 und pBPAS2) enthielten. Das Plasmid pBPAS3 aus einem weiteren Klon wies genomische DNA aus der Transposonmutante TnM4 auf. Zur genetischen Überprüfung

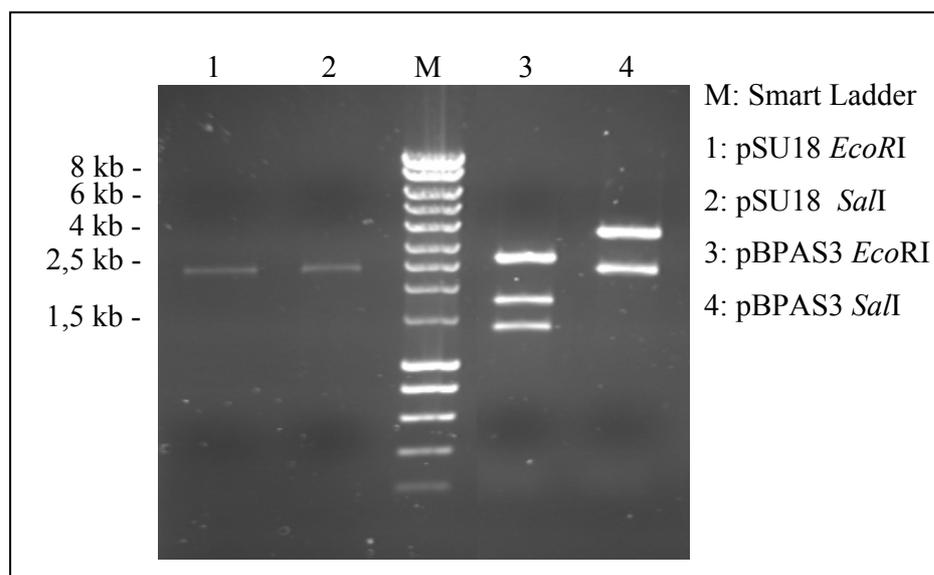
wurden die Plasmide aus den drei Klonen isoliert und ihre Größe anhand eines Agarosegels ermittelt (Abbildung 3.1.).

**Abb. 3.1.** Plasmidpräparation der drei verschiedenen Klone



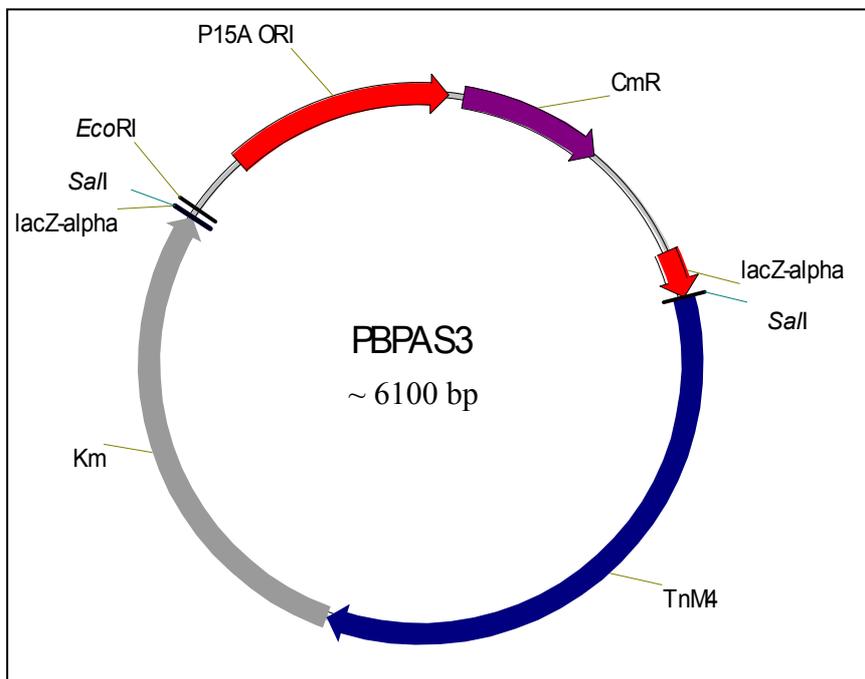
Die aufgetrennten Plasmide wiesen je vier oder fünf verschiedene Coil-Formen auf, deren Größe zwischen 4 kb und >10 kb variierte. Das Ursprungs-Plasmid pSU18 ist 2,3 kb groß, weshalb davon ausgegangen wurde, dass alle Plasmide ein großes Insert tragen. Da das Plasmid pBPAS2 etwas größer als das Plasmid pBPAS1 erschien, wurden alle weiteren Versuche mit pBPAS1 durchgeführt. Zur Überprüfung und Größenbestimmung des Inserts wurden die Plasmide pBPAS1 und pBPAS3 jeweils mit *EcoRI* und *SalI* geschnitten (Abbildungen 3.2. und 3.4.).

**Abb. 3.2.** Restriktionsverdauung des Plasmids pBPAS3



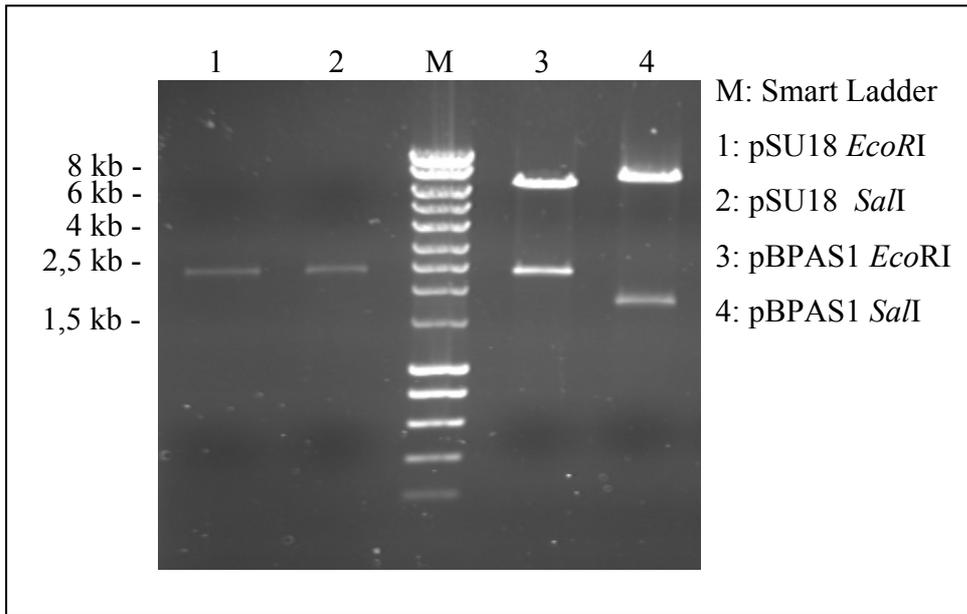
Die Restriktionsverdauung von pBPAS3 mit *Sall* ergab zwei Fragmente. Neben dem 2,3 kb großen Vektor war noch eine ca. 3,8 kb große Bande vorhanden, die außer der Kanamycin-Kassette ca. 2 kb genomische DNA aus TnM4 enthielt. Bei dem mit *EcoRI* geschnittenen pBPAS3 waren drei unterschiedliche Banden sichtbar. Die 2,9 kb Bande repräsentiert den 2,3 kb großen Vektor, der mit ca. 600 bp genomischer DNA verbunden ist, während die 1,4 kb Bande ausschließlich genomische DNA enthält. Anhand der Restriktionsmuster konnte sowohl die Orientierung des Inserts als auch eine ungefähre Vektorkarte erstellt werden (Abbildung 3.3.).

**Abb. 3.3.** Schematische Darstellung von pBPAS3 mit genomischer DNA aus TnM4



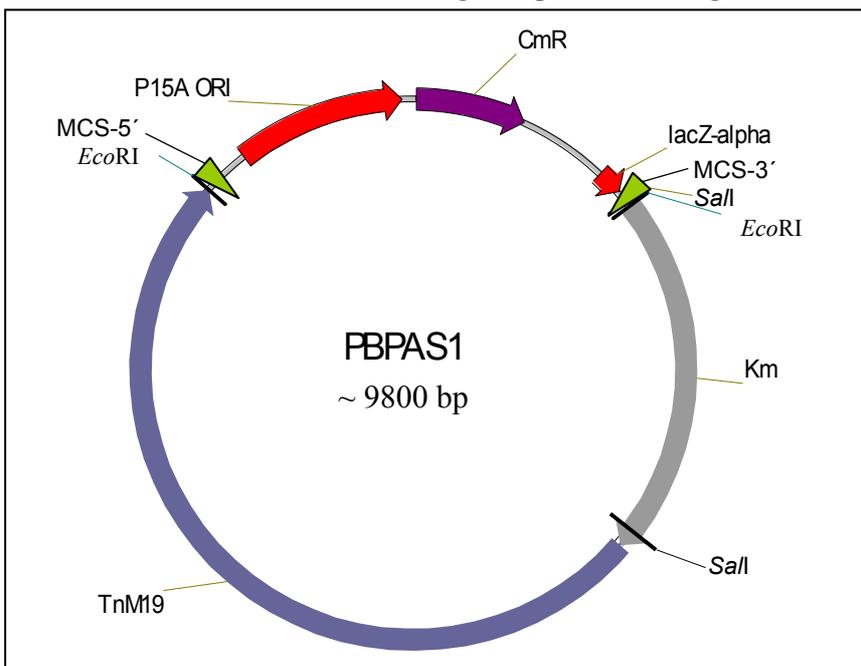
Die in pBPAS3 enthaltene genomische DNA aus TnM4 konnte, ausgehend von der Multiple-Cloning-Site, mittels Primerwalking vollständig sequenziert werden.

**Abb. 3.4.** Restriktionsverdauung des Plasmids pBPAS1



Durch die Verdauung mit *EcoRI* konnte das Insert aus pBPAS1 wieder herausgeschnitten werden. Neben der Kanamycin-Kassette (1,8 kb) enthielt das ca. 7,5 kb große Fragment noch ca. 5,7 kb genomische DNA aus der Mutante TnM19. Die Restriktionsverdauung mit *SalI* ermöglichte die Orientierungsbestimmung des Inserts und die Erstellung einer ungefähren Vektorkarte (Abbildung 3.5.).

**Abb. 3.5.** Schematische Darstellung von pBPAS1 mit genomischer DNA aus TnM19



Die Sequenzierung der genomischen DNA aus pBPAS1 gestaltete sich schwierig. Insgesamt sind in diesem Plasmid 5,7 kb genomische DNA aus TnM19 vorhanden. Neben dem deletierten Genfragment enthält diese DNA weitere Abschnitte des *Aeromonas* Genoms. Da das unterbrochene Gen mit der Kanamycin-Kassette verbunden ist, wäre eine Sequenzierung von der Kanamycin-Kassette aus oder von der entgegen gesetzten Multiple-Cloning-Site (MCS-5') möglich (Abbildung 3.5.).

Die jeweils letzten 400 bp der Kanamycin-Kassette bestehen aus „inverted repeats“, weshalb eine Primerbindung für die Sequenzierung in diesem Bereich schlecht ist. Bei einem Primerwalking vom 5'-Ende der Multiple-Cloning-Site aus müssten die gesamten 5,7 kb DNA sequenziert werden, um das gewünschte Genfragment zu erhalten, was ebenfalls sehr langwierig ist. Aus diesem Grund wurde eine Subklonierung durchgeführt. Bei der Restriktionsverdauung mit *SalI* wurde erkannt, dass keine *SalI*-Schnittstelle in dem genomischen Fragment von TnM19 vorhanden ist (Abbildung 3.4. und 3.5.). Um direkt von pSU18 in das deletierte Gen sequenzieren zu können, wurde die Kanamycin-Kassette mit *SalI* gezielt aus PBPAS1 herausgeschnitten und die durch die Verdauung entstandenen Fragmente auf einem Agarosegel aufgetrennt. Die 8 kb große Bande mit dem Vektor pSU18 und der genomischen DNA wurde aus dem Gel ausgeschnitten, aufgereinigt, ligiert und erneut in DH5 $\alpha$ -Zellen transformiert. Von dem daraus resultierenden Plasmid pBPAS1-a konnte dann, unmittelbar vom 3'-Ende der Multiple-Cloning-Site aus, in das ausgeschaltete Gen gelesen werden.

Bei der Sequenzierung wurde festgestellt, dass in den Transposonmutanten TnM4 und TnM19 das gleiche Gen unterbrochen wurde, das Transposon jedoch um einige Basen verschoben ist. Durch Zusammensetzung der beiden Sequenzen konnte das vollständige Gen identifiziert werden. Das sequenzierte Fragment (GenBank accession number AY940440) kodiert für ein open reading frame von 478 Aminosäuren mit einem errechneten Molekulargewicht (MW) von 52 kDa. Das abgeleitete Protein weist zwischen 31% - 37% identische und 57%-62% ähnliche Sequenz-Homologien zu Penicillin-Binde-Proteinen von verschiedenen Spezies auf (Tabelle 3.1.).

**Tab. 3.1.** Aminosäure-Sequenz-Homologie und errechnetes Molekulargewicht der PBPs verschiedener Spezies im Vergleich zum PBP4 von *E. coli* und dem *A. veronii* bv. sobria PBP

	Identische Sequenz	Ähnliche Sequenz	MW
<i>A. veronii</i> bv. sobria			52 kDa
<i>E. coli</i>	37 %	62 %	52 kDa
<i>Vibrio</i> spp.	31-32 %	57-59 %	53-54 kDa
<i>Shewanella oneidensis</i>	32 %	57 %	56 kDa

Das PBP4 von *E. coli* ist ein Enzym mit D,D-Carboxypeptidase- und D,D-Endopeptidase-funktion, das im Peptidoglykan die Spaltung der quervernetzenden Peptidbrücken und die Abspaltung des terminalen D-Alanin-Rests von den Pentapeptidseitenketten katalysiert. Um zu untersuchen, ob das PBP4-ähnliche Enzyme von *A. veronii* bv. sobria die typischen PBP-Funktionen besitzt, wurde ein Aminosäure-Sequenz-Alignment des PBP4 von *E. coli* mit dem PBP von *A. veronii* bv. sobria durchgeführt (Abbildung 3.6.). Dieses Alignment zeigt, dass alle PBP charakteristischen Sequenz-Motive in dem ermittelten Enzym vorhanden sind.

**Abb. 3.6.** Sequenzvergleich der beiden Penicillin-Binde-Proteine von *E. coli* und *A. veronii*

Die gelb unterlegten Bereiche stellen die Aminosäuren dar, die das aktive Zentrum bilden. Grün unterlegt sind die Stellen, hinter denen bei verschiedenen Mutanten die Unterbrechung durch das Transposon erfolgte.

	..... ..... ..... ..... ..... .....
	10                  20                  30                  40                  50
<b>A. veronii</b>	--MQRLLIGF --CALFSL-A AQAAP-LTP- PGGQYAIIV Q--GNNGVEF
<b>E. coli</b>	MRFSRFTIIGL TSCIAFSVQA ANVDEYITQL PAGANLALMV QKVGASAPAI
	..... ..... ..... ..... ..... .....
	60                  70                  80                  90                  100
<b>A. veronii</b>	ARHADQMIAP <b>ASTMK</b> VLTAL AARLELGADF RFATDIQAQP GAKQGDAING
<b>E. coli</b>	DYHSQQMALP <b>ASTQK</b> VITAL AALIQLGPDF RFTTTLETK- GNVENGVLKG
	..... ..... ..... ..... ..... .....
	110                  120                  130                  140                  150
<b>A. veronii</b>	DIWINFOGDP TFSRMD---L LALFKQLGVN RIKGNVYVNT GAYNGYERGN
<b>E. coli</b>	DLVARFGADP TLKRQDIRNM VATLKKSGVN QIDGNVLIDT SIFASHDKAP
	..... ..... ..... ..... ..... .....
	160                  170                  180                  190                  200
<b>A. veronii</b>	GWSWGDQTLG FAAPVSSVII DKNC-AYGTI TATQIGKPAT GNVATGVPIG
<b>E. coli</b>	GWPWNMTQGC FSAPPAAAIV DRNCFVSLSY SAPKPGDMAF IRVASYPVPT
	..... ..... ..... ..... ..... .....
	210                  220                  230                  240                  250
<b>A. veronii</b>	IGADNVEVMS YGDMARQFCA LEVDMAGKNF YELKGCITPN KEPQGLRFAI
<b>E. coli</b>	M-FSQVRTLP RGSAEAQYCE LDVVPGLDNR FTLTGCLPQR SEPLPLAFAV
	..... ..... ..... ..... ..... .....
	260                  270                  280                  290                  300
<b>A. veronii</b>	HDVEAWGWDN IRWAMDRAGI KHDG-LLRVT HKSPDNAETL GTHYSVSLPV
<b>E. coli</b>	QDGASYAGAI LKDELKQAGI TWSGTLRQT Q-VNEPGTVV ASKQSAPLHD

**Fortsetzung Abb. 3.6.** Sequenzvergleich der beiden Penicillin-Binde-Proteine von *E. coli* und *A. veronii*

```

      .....| .....| .....| .....| .....|
      310      320      330      340      350
A. veronii MLAKMLKKSD NLYADTFLKT VGRHYYNKPG S YRSGTMAVR AILTKN-GID
E. coli    LLKIMLKKSD NMIADTVFRM IGHARFNVPG TWRAGSDAVR QILRQQAGVD

      .....| .....| .....| .....| .....|
      360      370      380      390      400
A. veronii LGNATLADGS GLSAHNIISA RQMLSVLNFI QKND AELGLI KLLPSSQVDG
E. coli    IGNTIIADGS GLSRHNLIAP ATMMQVLQYI AQHDNELNFI SMLPLAGYDG

      .....| .....| .....| .....| .....|
      410      420      430      440      450
A. veronii TLAWRRSVTA PMMKNKVHAK TGTITGTSNL VGFIDTAGGQ RKAFVMFQRG
E. coli    SLQYRAGLHQ AGVDGKVS AK TGS LQGVYNL AGFITTASGQ RMAFVQYLSG

      .....| .....| .....| .....| .....
      460      470      480      490
A. veronii LSQDPATHER YRASKAAPWP TVFEKGVLES IYQQQPIQIA DQG.
E. coli    YAVEPA--DQ -R-NRRI-PL VRFESRLYKD IYQNN----- ----

```

Das PBP4 von *E. coli* wird als Präprotein synthetisiert, wobei ein 20 Aminosäuren umfassendes Signalpeptid nach dem Transport über die Cytoplasmamembran abgespalten wird [Mottl *et al.*, 1991]. Um festzustellen, ob das PBP4-ähnliche Protein von *A. veronii* *bv. sobria* ebenfalls ein Signalpeptid enthält, wurde die Aminosäure-Sequenz in dem Protein Analyse-Tool SignalP untersucht. Dieses Programm sagt eine mögliche Signal-Spaltstelle zwischen den Aminosäuren A18 und A19 vorher. Wenn diese Berechnung stimmt, würde das Signalpeptid von *A. veronii* *bv. sobria* 18 Aminosäuren umfassen.

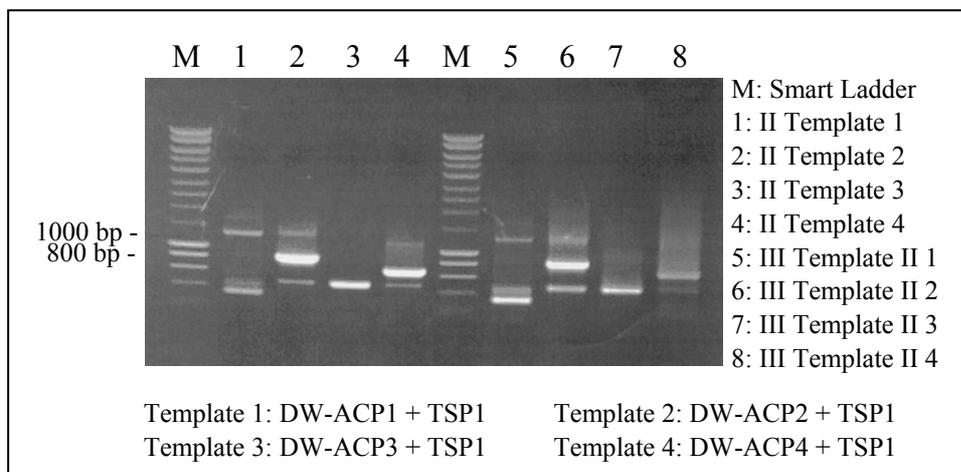
### 3.1.2. Identifizierung des ausgeschalteten Gens der zweiten Mutanten-Art

Um von dem zweiten Mutanten-Typ das ausgeschaltete Gen vollständig sequenzieren zu können, wurde genomische DNA des *A. veronii* *bv. sobria* Wildtyps als Template in das DNA Walking SpeedUp Kit von Seegene (Rockville, USA) eingesetzt. Ausgehend von einer bekannten Sequenz werden hierbei mittels PCR-Reaktionen unbekannte Ziel-Sequenzen amplifiziert, die dann anschließend sequenziert werden können.

Durch Teilsequenzierung dieses weiteren, durch das Transposon ausgeschalteten Gens waren insgesamt 152 bp identifiziert worden, deren Genprodukt hohe Ähnlichkeit mit einem D,D-Carboxypeptidase verwandtem Protein bei *Vibrio cholerae* zeigte [Niumsup, 1998]. Da 152 bp von dem zu identifizierenden Gen bekannt waren, konnten drei verschiedene Primer

(TSP1-TSP3) synthetisiert werden, die in diesem Bereich binden. Durch Kombination der Primer DW-ACP1, -2, -3 und -4 mit dem Primer TSP1 wurden in der ersten PCR-Reaktion unterschiedlich große PCR-Produkte amplifiziert. Diese wurden nach Aufreinigung als Template in der zweiten PCR-Reaktion eingesetzt. Die dabei entstehenden PCR-Produkte wurden wiederum in der dritten PCR-Reaktion als Template verwendet. In Abbildung 3.7. sind die PCR-Produkte der zweiten und dritten PCR-Reaktion unter Angabe der Primer-Kombinationen der ersten PCR-Reaktion dargestellt.

**Abb. 3.7.** PCR-Produkte der zweiten (II) und dritten (III) PCR-Reaktion unter Angabe des eingesetzten Templates

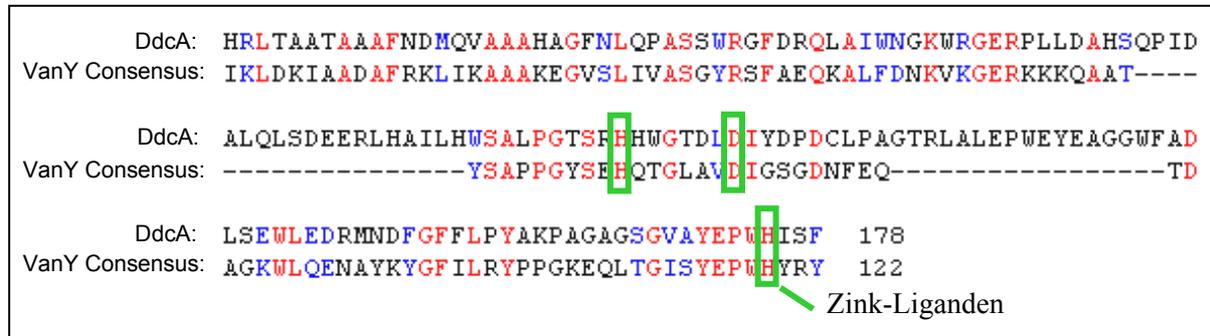


Die PCR-Reaktionen mit der Primer-Kombination DW-ACP2-TSP1 ergaben das stärkste PCR-Produkt. Von den Proben 2 und 6 wurde die dicke Bande bei 800 bp aus dem Gel ausgeschnitten, aufgereinigt und anschließend zur Sequenzierung verschickt.

Das zweite sequenzierte Fragment kodiert für ein open reading frame von 229 Aminosäuren mit einem errechneten Molekulargewicht von 25 kDa. Zur Klärung der biologischen Funktion dieses Proteins wurde mit Hilfe einer Protein Datenbank (NCBI conserved domain search) nach konservierten Bereichen gesucht. Dabei wurden Homologien zu VanY, einem Enzym der grampositiven Enterokokken entdeckt. VanY ist eine D,D-Carboxypeptidase, die bei der Vermittlung der Vancomycin-Resistenz in *Enterococcus* spp. eine Rolle spielt. Bei dieser D,D-Carboxypeptidase handelt es sich um eine Metalloprotease, die charakteristische Zink-Bindestellen im aktiven Zentrum aufweist. Aufgrund der hohen Homologien in den konservierten Bereichen (Abbildung 3.8.) ist davon auszugehen, dass es sich bei dem sequenzierten Genprodukt aus *A. veronii* bv. *sobria* ebenfalls um ein Enzym mit einer D,D-

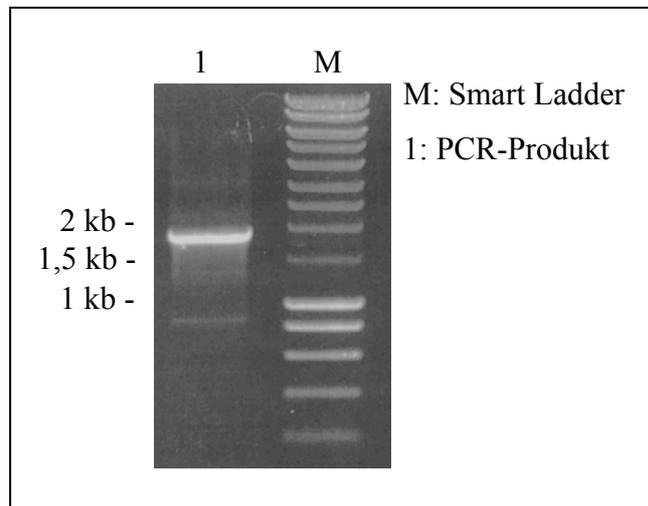
Carboxypeptidase-Funktion handelt. Aus diesem Grund wurde das Protein vorläufig als Enzym mit DdcA = D,D-Carboxypeptidase Aktivität bezeichnet.

**Abb. 3.8.** Aminosäure-Sequenz-Alignment der Consensus Sequenz von VanY und der DdcA



Um zu bestätigen, dass es sich bei der identifizierten Sequenz um das durch das Transposon unterbrochene Gen handelt, wurde eine PCR-Reaktion durchgeführt, bei der genomische DNA der Transposonmutante TnM3 als Template verwendet wurde. Dabei kamen zwei Primer zum Einsatz, die zum einen in der ermittelten Sequenz, zum anderen in dem Transposon binden. Da beide Bindungsstellen bekannt waren, wurde mit einem PCR-Produkt von 1,8 kb gerechnet (Abbildung 3.9.).

**Abb. 3.9.** PCR zur Überprüfung des Insertionsortes des Transposon



Der Nachweis des 1,8 kb großen PCR-Produktes zeigt, dass in der Transposonmutante TnM3 das DdcA durch das Transposon unterbrochen ist.

Neben der DdcA konnte auch der genetische Kontext des Enzyms untersucht werden. Stromaufwärts von *ddcA* liegt ein Gen, welches 68% Sequenzhomologie zu *dapE* von *E. coli*

aufweist. DapE ist ein Enzym, das die Synthese von LL-Diaminopimelinsäure katalysiert. Diese kann dann zu meso-Diaminopimelinsäure isomerisiert werden, die für die Peptidoglykan-Biosynthese oder zur Herstellung von L-Lysin benötigt wird. Stromabwärts von *ddcA* befindet sich ein kleiner Leserahmen (*orf*), der vermutlich für ein Membranprotein kodiert. Das Stop-Codon von *dapE* überlappt mit dem Start-Codon von *ddcA*, während das Stop-Codon der *ddcA* sich mit dem Start-Codon des Membranproteins überschneidet.

Um die DdcA auf das Vorhandensein einer Signalsequenz zu untersuchen, wurde die Aminosäure-Sequenz in dem Programm SignalP analysiert. Mittels dieses Programms konnte keine Signal-Spaltstelle gefunden werden. Bei der DdcA handelt es sich demnach um ein cytoplasmatisches Enzym.

VanY von *Enterococcus* spp. besitzt eine N-terminale Transmembrandomäne, mit der das Enzym in der Membran verankert ist [Arthur *et al.*, 1992]. Mit Hilfe des Protein Analyse-Tools TMHMM können Vorhersagen zu Transmembrandomänen in Proteinen getroffen werden. Die DdcA weist laut dieser Software keine Protein-Strukturen auf, die mit Membranen interagieren könnten. Demnach liegt das Enzym löslich im Cytoplasma vor.

### 3.1.3. Charakterisierung der beiden durch das Transposon unterbrochenen Genprodukte

Bei Gegenüberstellung der DdcA mit der zuvor sequenzierten PBP4-ähnlichen D,D-Carboxypeptidase sind einige Unterschiede festzustellen (Tabelle 3.2.).

**Tab. 3.2.** Vergleich der beiden Genprodukte, deren Ausschaltung zur  $\beta$ -Laktamase-Überexpression führt.

	<b>PBP 4-ähnlich</b>	<b>DdcA</b>
<b>Größe</b>	478 Aminosäuren	229 Aminosäuren
<b>Gewicht</b>	52 kDA	25 kDA
<b>Postulierte Enzymfunktion</b>	D,D-Carboxypeptidase, D,D-Endopeptidase	D,D-Carboxypeptidase
<b>Enzymfamilie</b>	Serinprotease	Metalloprotease
<b>PBP-Zugehörigkeit</b>	PBP	Kein PBP
<b>Lokalisation</b>	Periplasma	Cytoplasma

Zunächst fällt auf, dass die DdcA mit 25 kDa ein wesentlich geringeres Molekulargewicht als die PBP4-ähnliche Carboxypeptidase hat. Im Gegensatz zum *Aeromonas* PBP4-ähnlichen Enzym fehlen der DdcA-Aminosäure-Sequenz außerdem die typischen PBP-Sequenzmotive. Das gebildete Protein zählt demnach nicht zu den Penicillin-Binde-Proteinen. Im Vergleich zum PBP4-ähnlichen Enzym, welches zu den Serinproteasen gehört, weist die DdcA Aminosäure-Sequenz charakteristische Zink-Bindestellen auf und lässt sich den Metalloproteasen zuordnen. Ein weiterer deutlicher Unterschied ist der Lokalisationsort der Enzyme. Während die PBP4-ähnliche Carboxypeptidase vermutlich als Präprotein synthetisiert wird und mittels des Signalpeptids über die Cytoplasmamembran transportiert wird, weist die DdcA keinerlei typische Signalsequenz auf. Das Enzym kann daher nicht über die Membran transportiert werden und verbleibt im Cytoplasma.

Die Folgen der Genunterbrechung durch das Transposon auf die  $\beta$ -Laktamase-Expression sollte mittels Real-Time RT-PCR untersucht werden. Dafür wurden von jedem Mutanten-Typ zwei Stämme ausgewählt, die entweder eine sehr hohe, bzw. eine etwas niedrigere  $\beta$ -Laktamase-Aktivität als der Wildtyp aufwiesen. In den Real-Time RT-PCR Versuchen wurde dann die Expression der Carbapenemase (*imi*) untersucht (Tabelle 3.3.).

**Tab. 3.3.** Auswirkung der Gendeletion auf die  $\beta$ -Laktamase-Expression und auf die  $\beta$ -Laktamase-Aktivität

	spez. Laktamase-Aktivität (U/mg)*	<i>imi</i> $\Delta$ CT-Wert nicht induziert	<i>imi</i> $\Delta$ CT-Wert induziert	Expressionslevel in % zwischen nicht induzierter TnM und induziertem WT	deletiertes Gen
WT	0,05	8	-1,3	~~	~~
TnM15	6,4	6,5	-0,6	30 %	<i>ddcA</i>
TnM21	0,13	5,9	0,03	37 %	<i>ddcA</i>
TnM23	0,7	5,2	2,9	44 %	<i>pbp4</i>
TnM27	3,4	0,1	-0,7	98 %	<i>pbp4</i>

\* [Westphal, 2003]

Der CT-Wert einer Probe gibt den Zyklus in der Real-Time RT-PCR an, bei dem die zunehmende Fluoreszenz einen bestimmten Schwellenwert erreicht. Je niedriger der CT-Wert ist, desto höher ist der RNA-Gehalt in der Probe. Der  $\Delta$ CT-Wert beschreibt die Differenz zwischen dem CT-Wert des Ziel-Gens (*imi*) und dem CT-Wert des Referenzgens.

Die Real-Time Ergebnisse bestätigen die von Westphal [2003] beobachtete Überproduktion der  $\beta$ -Laktamasen. Im nicht induzierten Zustand waren die  $\Delta$ CT-Werte der Carbapenemase-Gene im Vergleich zum Wildtyp erniedrigt. Der höchste mRNA-Level war bei den Laktamasen der Mutanten TnM23 und TnM27 zu beobachten, beides Mutanten, bei denen das *pbp4* unterbrochen ist. Auch ohne Induktion erreichten diese Mutanten 44% bzw. 98% des induzierten Genexpressionslevels des Wildtyps. Die hohe spezifische  $\beta$ -Laktamase-Aktivität der Mutante TnM15, die von Westphal gemessen worden war, konnte auf der Ebene der Genexpression nicht bestätigt werden. Die Überproduktion der  $\beta$ -Laktamasen beschränkt sich auf den nicht induzierten Zustand. Nach Induktion wurde bei den Mutanten ein gleicher bzw. höherer  $\Delta$ CT-Wert als beim Wildtyp beobachtet. Dies zeigte, dass die Mutanten die  $\beta$ -Laktamasen im Grundzustand überexprimieren, dass nach Induktion die Überproduktion noch weiter gesteigert werden kann, jedoch nicht den  $\beta$ -Laktamase-Level des Wildtyps erreicht.

Anhand der  $\beta$ -Laktamase überproduzierenden Transposonmutanten, bei denen ein Verlust eines PBPs auf DNA- und Proteinebene nachgewiesen wurde, konnte ein PBP als Komponente im Regulationssystem für die  $\beta$ -Laktamase-Expression identifiziert werden [Westphal, 2003]. Die Tatsache, dass es sich bei dem einen ausgeschalteten PBP um eine D,D-Carboxypeptidase und D,D-Endopeptidase handelt und das zweite ausgeschaltete Gen ebenfalls eine D,D-Carboxypeptidase ist, unterstützt die Hypothese, dass es sich bei dem Induktionssignal für BlrB um ein Muropeptid handelt, welches durch die gestörte Zellwandsynthese vermehrt entsteht.

### **3.2. Induktion mit Muropeptiden**

Falls das Signal für BlrB ein Muropeptid ist, sollte die Expression der  $\beta$ -Laktamase-Gene auch direkt durch Muropeptide induzierbar sein. Da *Aeromonas* spp. seine Zellwandabbauprodukte voraussichtlich wie andere gramnegative Bakterien zum Recycling ins Cytoplasma aufnimmt, wurde von einer beschränkten Isolation von Muropeptiden aus dieser Spezies ausgegangen. Deshalb wurden Muropeptide aus einer *ampD*-Mutante von *E. coli* (JRG582), welche die Zellwandabbauprodukte aufgrund der funktionsuntüchtigen Amidase AmpD im Cytoplasma anhäuft, isoliert und zur Induktion verwendet. Dies ist möglich, da das Peptidoglykan von *E. coli* und *Aeromonas* spp. überwiegend aus den gleichen Untereinheiten zusammengesetzt ist [Quintela *et al.*, 1995].

Da möglicherweise die Muropeptide die äußere Membran der Bakterien nicht durchdringen können, wodurch das Signal nicht mit der Sensorkinase BlrB interagieren könnte, wurde die äußere Membran mit dem Polymyxin-B-Nonapeptid (PMBN) permeabilisiert. Als kationisches Detergenz kann Polymyxin-B mit den Carboxylgruppen der äußeren Lipopolysaccharidschicht interagieren und stabilisierende  $\text{Ca}^{2+}$ - und  $\text{Mg}^{2+}$ -Ionen verdrängen. Dies hat eine Veränderung der Membranstabilität und ein Leckwerden der Membran zur Folge, wodurch die Penetrationsfähigkeit von Antibiotika durch die äußere Membran gramnegativer Bakterien erhöht wird.

### 3.2.1. Auswirkung von Polymyxin-B-Nonapeptid auf die Membrangängigkeit von *Aeromonas veronii* bv. *sobria*

Die äußere Membran der gramnegativen Bakterien stellt eine natürliche Barriere für verschieden Antibiotika dar, die aufgrund ihrer Größe, Ladung oder Hydrophobizität nicht oder nur in geringem Umfang in die Bakterienzelle gelangen. Zu diesen Antibiotika gehören die Makrolide, weshalb sie besonders gut geeignet sind, um die Penetrationsfähigkeit der äußeren Membran zu testen. Um die optimale Konzentration des einzusetzenden PMBNs zu bestimmen, wurde die minimale Hemmkonzentration (MHK) des *A. veronii* bv. *sobria* Wildtyps mit verschiedenen Konzentrationen an PMBN und vier unterschiedlichen Makrolidantibiotika bestimmt (Tabelle 3.4.).

**Tab. 3.4.** MHK-Werte ( $\mu\text{g/ml}$ ) des *A. veronii* bv. *sobria* Wildtyps

PMBN	ohne	10 $\mu\text{g/ml}$	50 $\mu\text{g/ml}$	100 $\mu\text{g/ml}$	150 $\mu\text{g/ml}$
<b>Erythromycin</b>	16	8	8	8	-
<b>Clarithromycin</b>	64	8	4	4	-
<b>Clindamycin</b>	>32	>32	>32	>32	32
<b>Lividomycin</b>	4	2	2	2	-

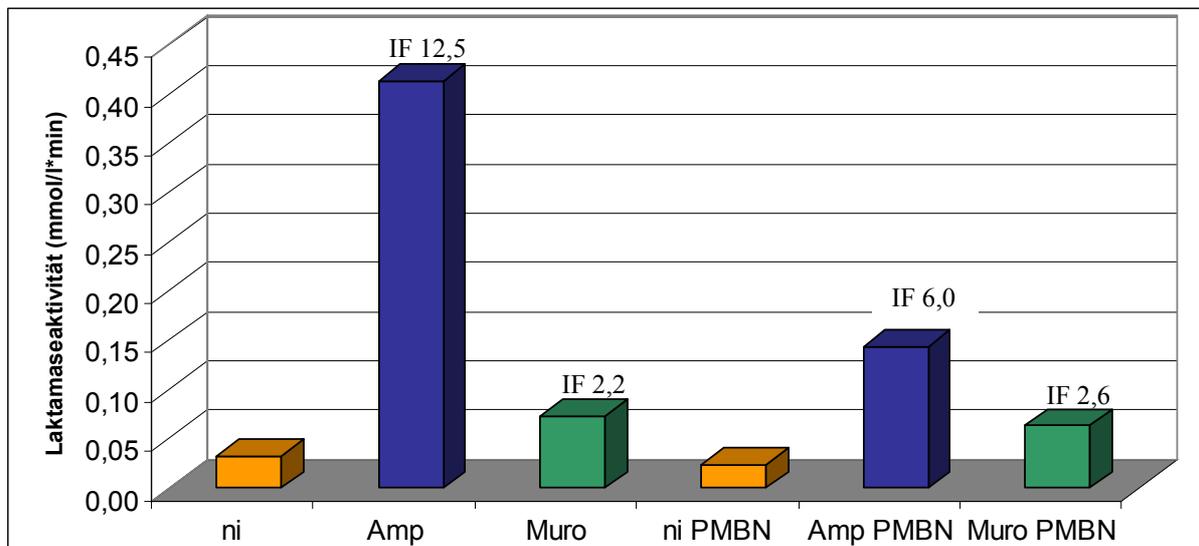
Die verschiedenen PMBN-Konzentrationen verursachen eine Abnahme der MHK gegenüber Makrolidantibiotika. Die stärkste Erniedrigung der MHK ist beim Clarithromycin zu beobachten, hier sank die MHK schon unter dem Einfluss von 10  $\mu\text{g/ml}$  PMBN um drei MHK Stufen ab. Das PMBN permeabilisiert also die Membran von *Aeromonas* und ermöglicht auch größeren Molekülen den Zutritt ins Periplasma. Das Antibiotikum Clarithromycin ist ca. 747 Dalton groß. Die Anhydromuramylpeptide aM-Tripeptid und aM-

Pentapeptid haben eine Größe von 646 und 789 Dalton. Da das Clarithromycin nach PMBN-Behandlung ins Periplasma gelangen kann, sollte dies auch den Muropeptiden möglich sein.

### 3.2.2. Einfluss von Muropeptiden auf die $\beta$ -Laktamase-Aktivität

Die Induktion der  $\beta$ -Laktamasen wurde nach einem modifizierten Verfahren von Pham und Bell durchgeführt [1993]. Hierfür wurden TnM21-Zellen in M9-Medium kultiviert. Ab einer  $OD_{546}$  von 0,4 wurde dem Ansatz 50  $\mu\text{g/ml}$  PMBN zugefügt. Bei höheren Konzentrationen oder früherer Zugabe an PMBN war ein stark verlangsamtes Wachstum zu beobachten. Die Induktion der Zellen erfolgte bei  $OD_{546} = 0,5$  mit Ampicillin (64  $\mu\text{g/ml}$ ) oder Muropeptiden ( $\sim 400 \mu\text{M}$ ) für eine Stunde. Der anschließende Zellaufschluss und die Messung der  $\beta$ -Laktamase-Aktivität erfolgte wie unter 2.3.1. und 2.3.2. beschrieben.

**Abb. 3.10.**  $\beta$ -Laktamase-Aktivität bei nicht induzierten (ni), mit Ampicillin (Amp) oder Muropeptiden (Muro) induzierten Zellen, nach Behandlung mit und ohne PMBN



Bei diesen Versuchen konnte nicht die spezifische  $\beta$ -Laktamase-Aktivität bestimmt werden, da bei den mit Muropeptiden induzierten Proben der Proteingehalt durch die Muropeptid-Lösung verfälscht wurde. Trotz mehrerer Waschschrte vor dem Zellaufschluss war in diesen Ansätzen der Proteingehalt extrem hoch.

Nach Induktion mit Ampicillin war bei der unbehandelten Kultur eine um das 12-fache erhöhte  $\beta$ -Laktamase-Aktivität im Vergleich zum nicht induzierten Zustand messbar, während

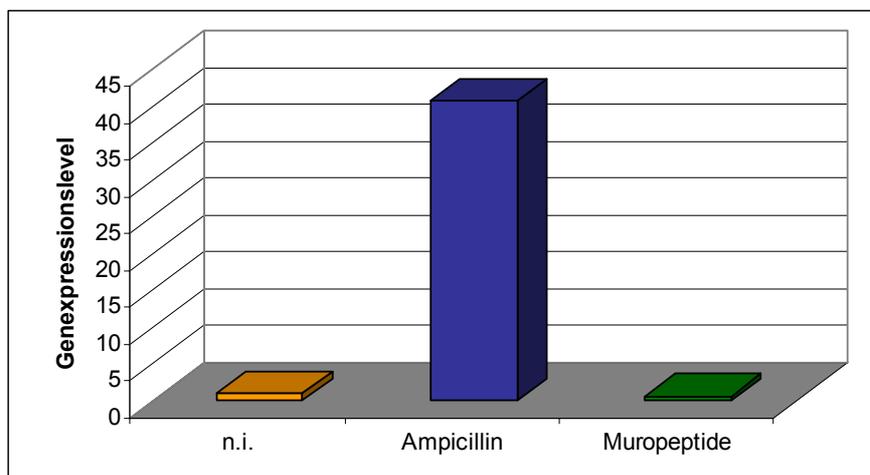
die  $\beta$ -Laktamase-Aktivität bei den mit PMBN behandelten Zellen nur um das Sechsfache anstieg (Abbildung 3.10.). Die Enzymaktivität der mit Muropeptiden induzierten Zellen nahm unabhängig von der Behandlung mit PMBN um das Doppelte zu (Induktionsfaktoren 2,2 bzw. 2,6).

Da die hier verwendete Messmethode durch verschiedene Faktoren sehr starken Schwankungen unterliegt, war trotz Variation der Kulturbedingungen keine Reproduzierbarkeit der Messwerte möglich. Die mit Ampicillin induzierten Zellen wiesen stets eine höhere  $\beta$ -Laktamase-Aktivität auf als Zellen im Grundzustand. Bei den mit Muropeptiden induzierten Zellen war jedoch entweder keine oder nur eine sehr gering erhöhte Laktamase-Aktivität messbar.

### 3.2.3. Einfluss von Muropeptiden auf die $\beta$ -Laktamase-Expression

Um eine exaktere Messmethode zu verwenden und genauere Aussagen über die Stärke der Induktion zu erhalten, wurde im Folgenden die erhöhte Genexpression mittels Real-Time RT-PCR nachgewiesen. Dabei wurden Primer gewählt, die in dem Gen für die Gyrase als Referenzgen bzw. in dem Gen für die Carbapenemase (*imi*) binden. Zur Induktion wurden ausschließlich Zellen verwendet, die zuvor mit PMBN behandelt wurden. Die verschiedenen Ansätze wurden entweder mit Ampicillin oder mit Muropeptiden für 10 min induziert. Daran anschließend wurde die RNA aus 0,5 ml Kultur isoliert und eine Real-Time RT-PCR durchgeführt.

**Abb. 3.11.** Mittels Real-Time RT-PCR bestimmter Genexpressionslevel der Carbapenemase



Nach der Induktion mit Ampicillin konnte eine um das 40-fache erhöhte *imi*-mRNA-Konzentration im Vergleich zum nicht induzierten Zustand gemessen werden (Abbildung 3.11.). Die Induktion mit Muropeptiden ergab reproduzierbar keine erhöhte *imi*-mRNA-Konzentration, das *imi*-Gen wurde vielmehr genauso stark exprimiert wie im Grundzustand.

Um zu überprüfen, ob GlcNAc- $\beta$ -1,4-(1,6-anhydro)-MurNAC-Peptide (aD-Peptide) an der Regulation der  $\beta$ -Laktamase-Expression beteiligt sind, wurden die löslichen Muropeptide aus einer AmpG Mutante von *E. coli* (JRG58201) isoliert. In einer intakten *E. coli* Zelle werden aD-Peptide durch die Permease AmpG ins Cytoplasma transportiert. Da dieser Transport in der AmpG Mutante unterbleibt, akkumulieren dort aD-Peptide im Periplasma. Zur Induktion mit aD-Peptiden wurden Zellen eingesetzt, die zuvor mit PMBN behandelt wurden. Sowohl die Messung der  $\beta$ -Laktamase-Aktivität als auch die Versuche mittels Real-Time RT-PCR zeigten keine Veränderung der  $\beta$ -Laktamase-Expression nach der Behandlung mit aD-Peptiden.

Weder durch Messung der  $\beta$ -Laktamase-Aktivität noch durch Bestimmung des Genexpressionslevels der Carbapenemase konnte eine Induktion der  $\beta$ -Laktamasen durch Muropeptide nachgewiesen werden.

### **3.3. Einfluss von Bulgecin auf die Induzierbarkeit der $\beta$ -Laktamasen**

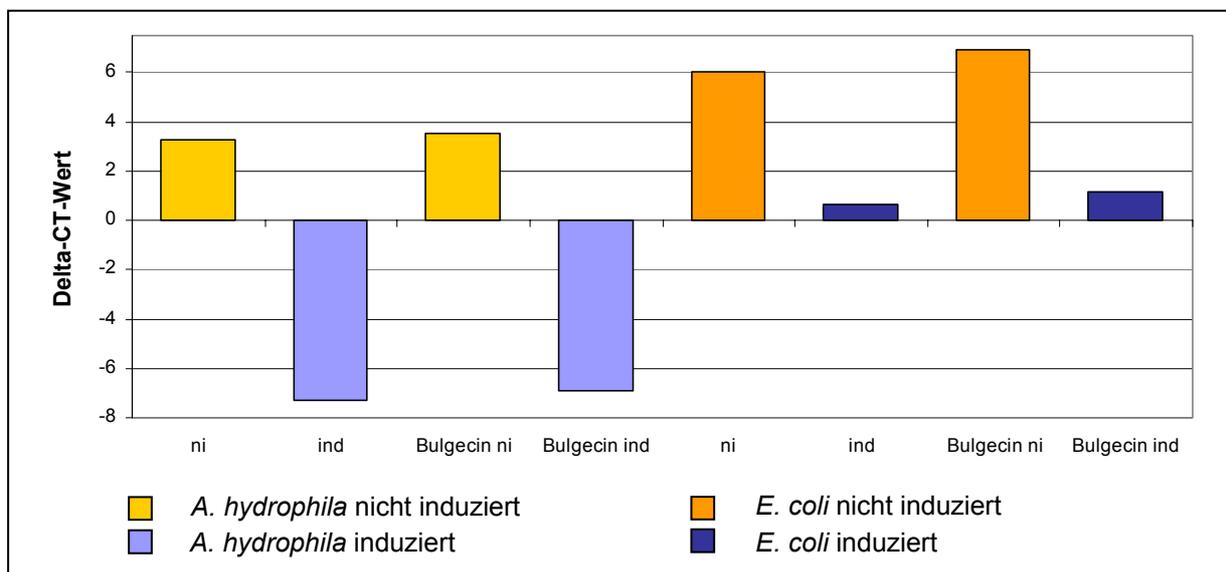
Anhydromuramylpeptide werden im Peptidoglykan durch die Aktivitäten der lytischen Transglykosylasen freigesetzt. Dabei ist die Aktivität der Enzyme MltA, MltB und Slt70 von zentraler Bedeutung [Kraft *et al.*, 1999]. Bulgecin ist ein sulfoniertes Glucosamin-Derivat, das spezifisch die lytische Transglykosylase Slt70 auf nichtkompetitive Weise hemmt [Templin *et al.*, 1992]. Bei *Enterobacter cloacae* führt die Inhibierung der Slt70 zu einer verringerten Induzierbarkeit und bei dereprimierten Mutanten zu einer reduzierten Überproduktion [Pfeifle, 1999]. Auch bei *Aeromonas veronii* bv. *sobria* konnte eine Reduktion der spezifischen  $\beta$ -Laktamase-Aktivität nach Behandlung mit Bulgecin beobachtet werden [Westphal, 2003]. Da die Messung der spezifischen  $\beta$ -Laktamase-Aktivität sehr starken Schwankungen unterliegt, sollte die erniedrigte Genexpression mittels Real-Time RT-PCR nachgewiesen werden.

Für einen Vorversuch wurden vier verschiedene Primerpaare eingesetzt, die in dem Gen für die Gyrase als Referenzgen und in den drei  $\beta$ -Laktamase-Genen (*cep*, *imi* und *amp*) binden. Mit Hilfe dieses Vorversuches konnten die Ergebnisse von Avison *et al.* [2004] bestätigt werden. Dabei wurde untersucht, welches der drei Gene nach Induktion mit Ampicillin am stärksten abgelesen wird. Genau wie bei Avison *et al.* postuliert, werden in ansteigender Konzentration die Penicillinase, die Cephalosporinase und die Carbapenemase exprimiert. Bei den Real-Time RT-PCR Versuchen wurde die Genexpression des *imi*-Gens untersucht, da dessen Expression mit den drei *blr*-boxen vor dem Transkriptions-Start am stärksten von den drei  $\beta$ -Laktamase-Genen induziert wird.

### 3.3.1. Auswirkungen von Bulgecin auf die $\beta$ -Laktamase-Expression

Als Positiv-Kontrolle diente der *E. coli* Stamm SN03, der das Plasmid pBP131 mit den Genen *ampC/ampR* aus *Enterobacter cloacae* WT14 trägt. Dadurch besitzt dieser Stamm eine induzierbare  $\beta$ -Laktamase. Für die Induktionsversuche wurde eine ÜNK von *A. hydrophila* T429125 und *E. coli* SN03/pBP131 1:100 in LB-Medium verdünnt und je einem Ansatz 40  $\mu\text{g/ml}$  Bulgecin zugefügt. Die Induktion der  $\beta$ -Laktamasen erfolgte bei  $\text{OD}_{600} = 0,4$  bei *Aeromonas*-Zellen mit Ampicillin (64  $\mu\text{g/ml}$ ) bei *E. coli* SN03-Zellen mit Imipenem (4  $\mu\text{g/ml}$ ). Bei der anschließenden Real-Time RT-PCR wurde der Genexpressionslevel der Carbapenemase aus *A. hydrophila* und die, auf dem Plasmid kodiert vorliegende, AmpC- $\beta$ -Laktamase aus *E.coli* untersucht (Abbildung 3.12.).

**Abb. 3.12.** Effekt von Bulgecin auf die  $\beta$ -Laktamase-Expression



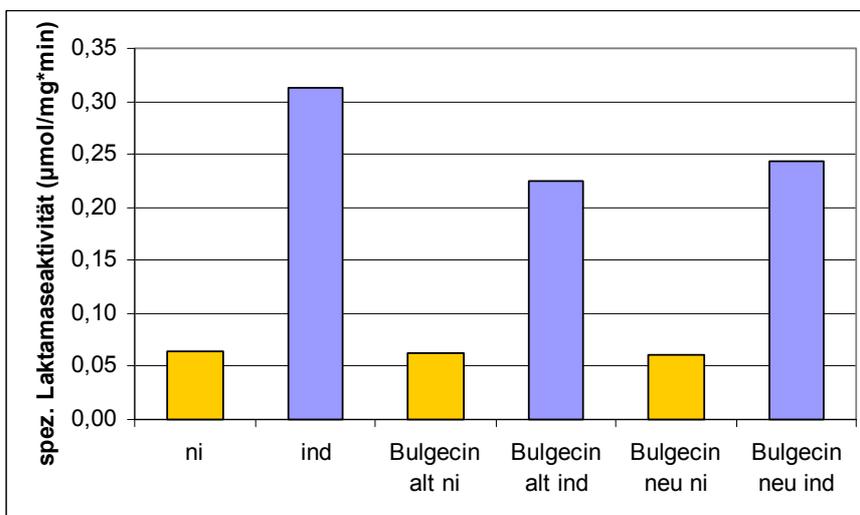
Nach Induktion mit Ampicillin war bei *A. hydrophila* ein um ca. zehn Zyklen erniedrigter  $\Delta$ CT-Wert messbar, die  $\beta$ -Laktamase wird verstärkt exprimiert. Durch den Zusatz von Bulgecin war keine Veränderung des Genexpressionslevels der  $\beta$ -Laktamase messbar. Sowohl im nicht induzierten Zustand als auch nach Induktion waren die  $\Delta$ CT-Werte mit denen der Kulturen ohne Bulgecin Behandlung vergleichbar.

Die verstärkte  $\beta$ -Laktamase-Expression bei *E. coli* war nach Induktion mit Imipenem durch den um ca. fünf Zyklen erniedrigten  $\Delta$ CT-Wert zu beobachten. Auch bei der *E. coli* Kultur war nach Behandlung mit Bulgecin keine Abnahme der Induzierbarkeit messbar. Aus diesem Grund wurde vermutet, dass die Substanz Bulgecin keine Aktivität aufwies. Um zu überprüfen, ob es sich lediglich um ein Chargen-Problem handelt, wurde die spezifische  $\beta$ -Laktamase-Aktivität der beiden Stämme nach Behandlung mit einer alten und der neuen Charge Bulgecin im Vergleich zu unbehandelten Zellen untersucht.

### 3.3.2. Effekt von Bulgecin auf die Induktion der $\beta$ -Laktamase

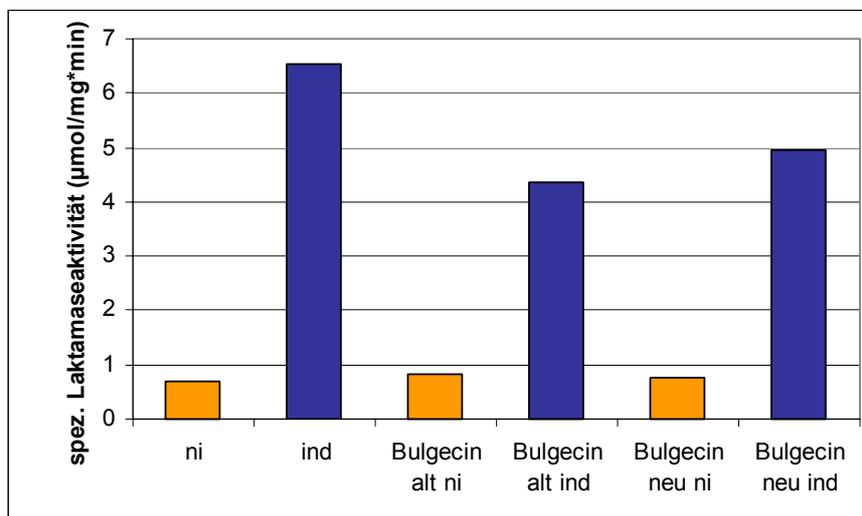
Die Anzucht der Zellen erfolgte wie zur Untersuchung der  $\beta$ -Laktamase-Expression, lediglich die Induktionszeit wurde auf eine Stunde erhöht. Für die Zellernte wurden insgesamt 5 ml Kultur abzentrifugiert und anschließend, wie unter 2.3.1. - 2.3.3. beschrieben, zur Messung der  $\beta$ -Laktamase-Aktivität vorbereitet.

**Abb. 3.13.**  $\beta$ -Laktamase-Aktivität bei nicht induzierten (ni) oder induzierten (ind) *Aeromonas* Zellen nach Behandlung mit Bulgecin aus der alten bzw. der neuen Charge



Im nicht induzierten Zustand war bei der *Aeromonas*-Kultur eine spezifische  $\beta$ -Laktamase-Aktivität von  $0,065 \mu\text{mol}/\text{mg}\cdot\text{min}$  zu messen (Abbildung 3.13.). Nach Induktion mit Ampicillin nahm die spezifische  $\beta$ -Laktamase-Aktivität um das Fünffache zu. Die Behandlung mit Bulgecin zeigte, unabhängig ob die Substanz aus der alten oder der neuen Charge verwendet wurde, keine Auswirkungen auf die Aktivität der  $\beta$ -Laktamase. Im nicht induzierten Zustand war vielmehr eine gleich bleibende  $\beta$ -Laktamase-Aktivität messbar. Nach Induktion schien die spezifische  $\beta$ -Laktamase-Aktivität in Abhängigkeit vom Bulgecin abzunehmen. Diese Reduktion ist jedoch nicht signifikant, sondern lässt sich vielmehr auf die Schwankungsbreite der Messmethode zurückführen.

**Abb. 3.14.** Einfluss von Bulgecin aus der alten bzw. der neuen Charge auf die  $\beta$ -Laktamase-Aktivität bei nicht induzierten (ni) oder induzierten (ind) *E. coli*-Zellen



Auch die Messung der spezifischen  $\beta$ -Laktamase-Aktivität von *E. coli* SN03/pBP131 als Positiv-Kontrolle zeigte keinen deutlichen Effekt des Bulgecins (Abbildung 3.14.). Im Grundzustand variierten die Aktivitäts-Werte zwischen  $0,69 - 0,83 \mu\text{mol}/\text{mg}\cdot\text{min}$  und waren damit nahezu gleich. Der leichte Rückgang der  $\beta$ -Laktamase Induktion nach Behandlung mit Bulgecin ließ sich nicht eindeutig auf den Einfluss des Bulgecins zurückführen. Die Reduktion der  $\beta$ -Laktamase-Induktion war bei vorherigen Studien weitaus signifikanter [Pfeifle, 1999, Westphal, 2003], so dass davon ausgegangen wurde, dass der überwiegende Anteil des eingesetzten Bulgecins inaktiv war.

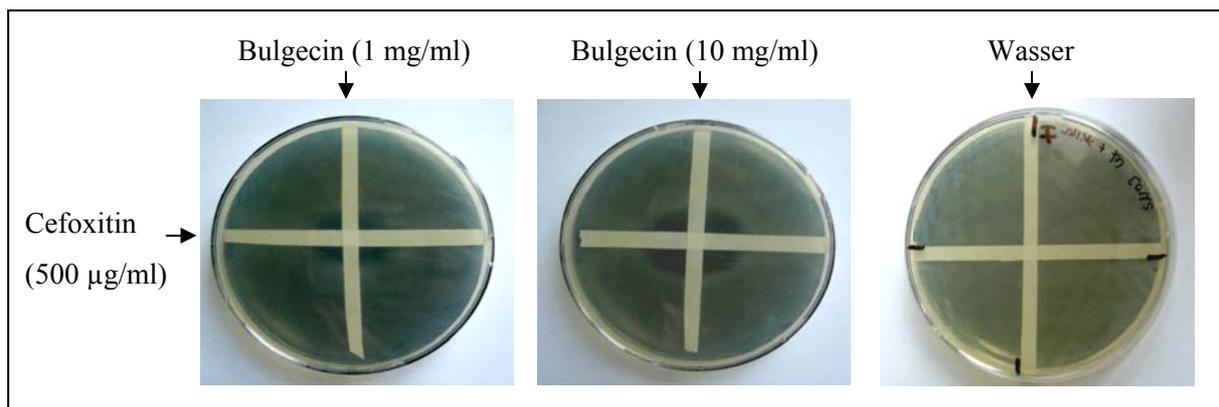
Um dennoch einen Anhaltspunkt zu bekommen, dass Bulgecin durch Inhibierung der lytischen Transglykosylase ein Einfluss auf die Produktion der  $\beta$ -Laktamase ausübt, wurde

ein Agar-Diffusionstest nach Kraft *et al.* [1999] durchgeführt. Dabei wurde das Bulgecin der neuen Charge in sehr hohen Konzentrationen (1-10 mg/ml) eingesetzt.

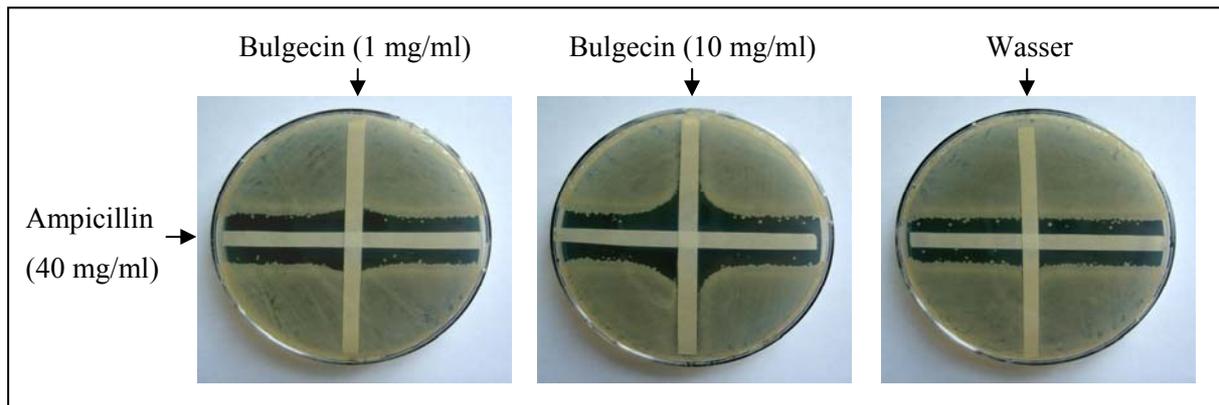
### 3.3.3. Bulgecin Agar-Diffusionstest

Für den Agar-Diffusionstest wurden Filterpapierstreifen, die entweder mit einem  $\beta$ -Laktam oder mit Bulgecin getränkt wurden, im 90° Winkel zueinander auf eine Agarplatte gelegt. Diese wurde zuvor mit der jeweiligen Bakterienspezies beimpft. Die  $\beta$ -Laktame induzieren die Expression der  $\beta$ -Laktamasen, so dass ein Wachstum der Bakterien möglich ist. An der Stelle, wo Bulgecin und  $\beta$ -Laktam gleichzeitig wirken, liegt kein Induktionssignal vor, die Bildung der  $\beta$ -Laktamasen unterbleibt und die Bakterien sind sensibel gegenüber dem Antibiotikum, erkennbar an einem Hemmhof.

**Abb. 3.15.** Einfluss von Bulgecin auf die  $\beta$ -Laktamase-Produktion bei *E. coli* SN03/pBP131



Auf den mit *E. coli* SN03/pBP131 angeimpften Agarplatten war ein Bakterienrasen zu beobachten, der an der Schnittstelle der beiden Filterpapiere einen deutlichen Hemmhof bildete (Abbildung 3.15.). Der Durchmesser des Hemmhofes nahm in Abhängigkeit von der Bulgecin Konzentration zu. Als Negativ-Kontrolle wurde ein mit Wasser getränkter Filterpapierstreifen verwendet. Bei dieser Agarplatte war kein Hemmhof zu sehen.

**Abb. 3.16.** Einfluss von Bulgecin auf die  $\beta$ -Laktamase-Produktion bei *A. hydrophila*

Auch auf den Agarplatten mit *A. hydrophila* war die Bildung eines Hemmhofes zu beobachten (Abbildung 3.16.). Die Ampicillin Konzentration wurde etwas zu hoch eingesetzt, weswegen die Zellen nicht bis an den  $\beta$ -Laktam-Filterstreifen wachsen konnten. Die Größe des Hemmhofes nahm bei der hohen Bulgecin Konzentration im Vergleich zu der niedrigen Konzentration deutlich zu. Bei dem mit Wasser getränkten Filterstreifen war kein Hemmhof zu beobachten. Deshalb wurde davon ausgegangen, dass die Ausbildung des Hemmhofes nicht auf ein bloßes Diffundieren des Ampicillins über den feuchten Bulgecin-Streifen zurückzuführen war.

Die Substanz Bulgecin scheint also tatsächlich die Regulation der  $\beta$ -Laktamase-Expression zu beeinflussen. Eine Inhibierung auf dem Level der Genexpression bzw. die Reduktion der  $\beta$ -Laktamase-Aktivität konnte jedoch nicht gemessen werden. Dies lag hauptsächlich daran, dass in der vorliegenden Charge Bulgecin die Menge an aktiver Substanz äußerst gering war. Da diese Substanz momentan nicht hergestellt wird, konnten keine Versuche mit einer weiteren Charge durchgeführt werden.

### 3.4. Untersuchungen zur Funktion von BlrD

Weiterhin sollte die Funktion von BlrD genauer untersucht werden. Bislang gibt es noch keine Beweise, dass BlrD an der Regulation der  $\beta$ -Laktamase-Expression direkt beteiligt ist. Wegen der engen genetischen Verknüpfung liegt die Annahme jedoch nahe, dass BlrD in die Regulation eingreift. BlrD ist ein überwiegend hydrophobes Protein mit sechs Transmembrandomänen und einer großen periplasmatischen Schleife. Die Funktion dieses

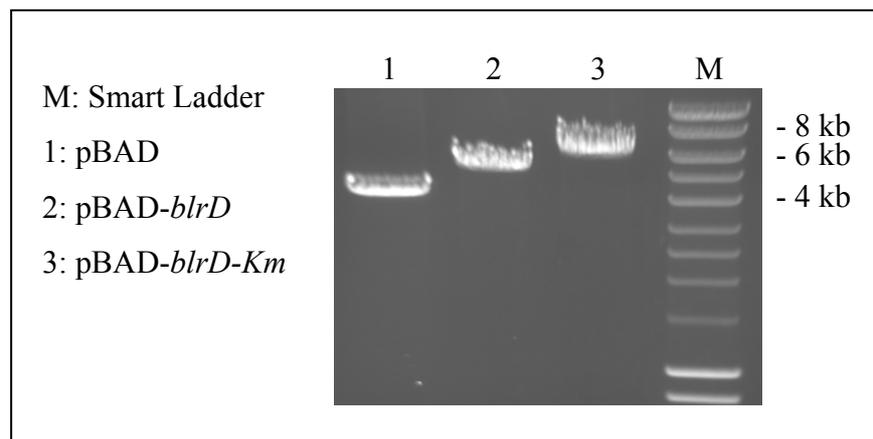
Proteins ist nicht bekannt. Möglicherweise fördert es als Permease die Aufnahme des spezifischen Signals in das Cytoplasma, erniedrigt damit die Konzentration im Periplasma und tritt so in Konkurrenz zu dem Signalsensor BlrB [Niumsup, 1998].

Um Anhaltspunkte auf eine Beteiligung zu erhalten, wurde das *blrD* Gen in einen durch Arabinose regulierbaren Expressionsvektor kloniert. Dafür wurde zunächst das chromosomale Gen mit genomischer DNA aus *A. hydrophila* als Template amplifiziert und in den pBAD-*myc*-HisA-Vektor (Invitrogen) ligiert. Das Plasmid pBAD-*blrD* wurde anschließend in elektrokompente *E. coli* DH5 $\alpha$  Zellen transformiert. Da der Vektor pBAD-*myc*-HisA eine  $\beta$ -Laktamase als Resistenzmarker enthält, die für Selektionszwecke in *Aeromonas* nicht verwendet werden kann, wurde das  $\beta$ -Laktamase-Gen mit einer Kanamycin-Kassette unterbrochen. Der dabei entstehende Vektor pBAD-*blrD*-*Km* wurde zunächst in elektrokompente *E. coli* DH5 $\alpha$  Zellen und anschließend in *A. hydrophila* T429125 transformiert.

### 3.4.1. Genetische Überprüfung der Klone

Die Plasmide wurden durch Restriktionsverdauung mit *Nco*I und *Hind*III auf das Vorhandensein der beiden Inserts untersucht (Abbildung 3.17. und 3.18.).

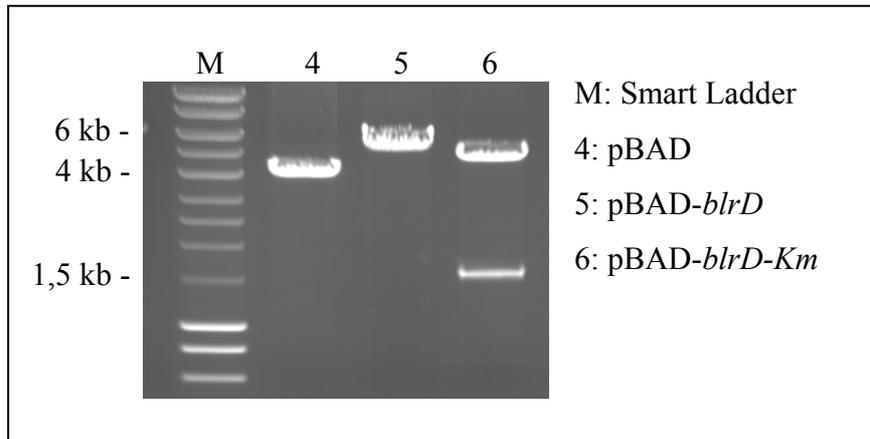
**Abb. 3.17.** Charakterisierung der Plasmide durch *Nco*I-Verdauung



Das *blrD*-Gen wurde über eine *Nco*I-Schnittstelle und eine *Hind*III-Schnittstelle in den pBAD-Vektor ligiert. In der Kanamycin-Kassette befindet sich keine *Nco*I-Schnittstelle, so dass durch die Verdauung mit *Nco*I die Plasmide jeweils linearisiert wurden. Der linearisierte

Ursprungsvektor pBAD (4100 bp), das Plasmid pBAD-*blrD* (5432 bp) und das Plasmid pBAD-*blrD-Km* (6372 bp) waren bei der gelelektrophoretischen Auftrennung eindeutig zu identifizieren und entsprachen in ihren Größen jeweils den berechneten Werten.

**Abb. 3.18.** Charakterisierung der Plasmide durch *Hind*III-Verdauung



Neben einer *Hind*III-Schnittstelle in der Multiple-Cloning-Site des Vektors befindet sich ebenfalls eine in dem Kanamycin-Resistenzgen. Durch die Restriktionsverdauung mit *Hind*III wurden nochmals die Größen der verschiedenen Plasmide bestätigt. Zusätzlich dazu konnte die korrekte Orientierung des inserierten Kanamycin-Resistenzgens festgestellt werden. Die Identifizierung von *blrD* in pBAD-*blrD-Km* erfolgt durch Sequenzierung.

### 3.4.2. Lebendzellzahlbestimmung in Abhängigkeit von verschiedenen Arabinose-Konzentrationen

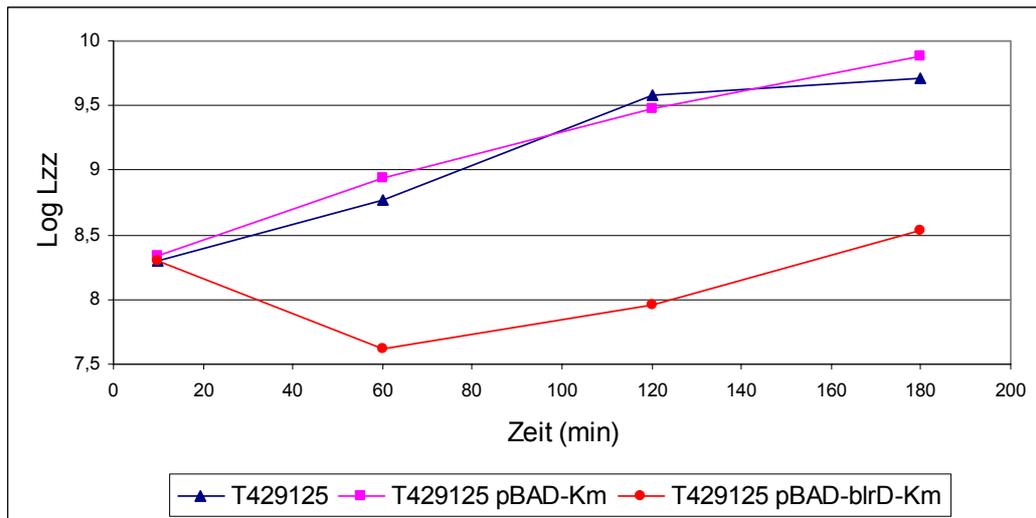
Bei dem Expressions-Vektor pBAD-*myc-HisA* ist die Regulation der Gen-Expression durch Zugabe von L-Arabinose steuerbar, wodurch eine Dosis-Effekt-Untersuchung möglich ist.

Um den Phänotyp der Zellen nach der vermehrten BldD-Produktion zu untersuchen, wurde die Lebendzellzahl von drei verschiedenen Kulturen bestimmt. Dafür wurde zu den *A. hydrophila* Kulturen (1x ohne Plasmid, 1x mit pBAD-*Km* und 1x mit pBAD-*blrD-Km*) bei einer  $OD_{600} = 0,4$  unterschiedliche Konzentrationen an Arabinose hinzugefügt. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurde jeweils eine Probe entnommen und eine Zellzahlbestimmung durchgeführt.

Das Wachstumsverhalten des *A. hydrophila* Wildtyps und des Stamms mit dem pBAD-*Km*-Plasmid waren, unabhängig von der Arabinose-Konzentration, nahezu gleich. Bei den

niedrigen Arabinose-Konzentrationen war auch kein Unterschied zu der Kultur mit dem Plasmid pBAD-*blrD*-Km zu erkennen. Die hohen Konzentrationen an Arabinose hatten auf diese Kultur jedoch einen Einfluss, was in dem verringerten Wachstum zu beobachten war. Exemplarisch ist die logarithmierte Lebendzellzahl der drei Kulturen nach Zusatz der höchsten Konzentration von Arabinose (0,2%) in Abbildung 3.19. dargestellt.

**Abb. 3.19.** Logarithmierte Lebendzellzahlbestimmung nach Zusatz von 0,2% Arabinose

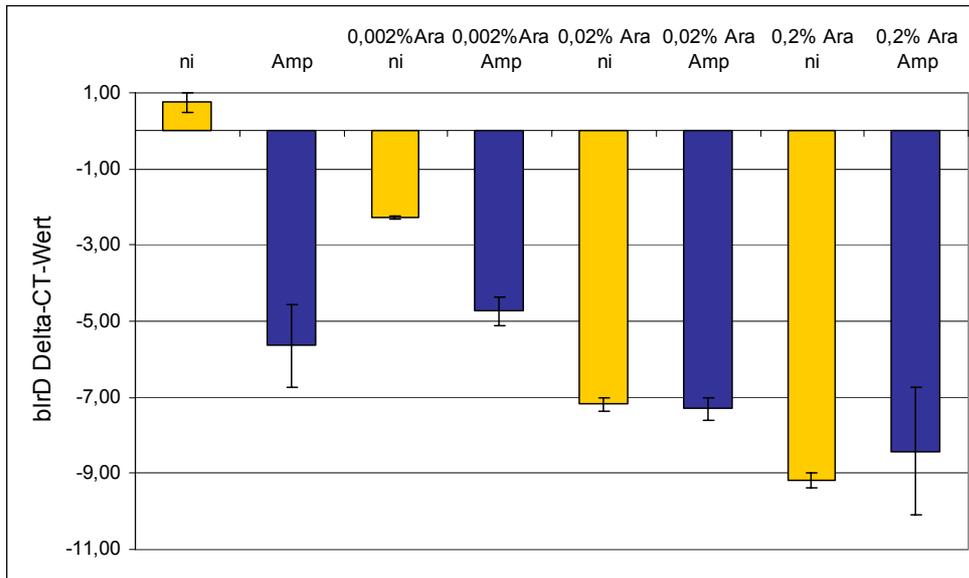


Die höchste Konzentration an Arabinose hatte einen deutlichen Effekt auf das Wachstum der Bakterien. Durch die vermehrte Produktion von BlrD und Einlagerung in die Membran wurde die Zelle dermaßen geschwächt, dass das Wachstum nach einer Stunde um eine Zehnerpotenz abnahm. Nach dieser Zeit wurde wieder ein Anstieg der Lebendzellzahl beobachtet, der im Vergleich zu den anderen beiden Kulturen stets um eine Zehnerpotenz verschoben blieb. Den Bakterien war es anscheinend möglich, die vermehrte Einlagerung des Membranproteins zu kompensieren.

### 3.4.3. Nachweis der *blrD*-Überexpression mittels Real-Time RT-PCR

Für die Induktion von *blrD* von pBAD-*blrD*-Km aus wurde Arabinose in drei verschiedenen Konzentrationen (0,002%-0,2%) verwendet. Nach einer 60-minütigen Induktionszeit wurden je eine Hälfte des jeweiligen Kulturansatzes für weitere 10 min mit Ampicillin induziert.

**Abb. 3.20.** *blrD*- $\Delta$ CT-Werte bei nicht induzierten (ni) oder mit Ampicillin (Amp) induzierten Zellen, nach Behandlung mit und ohne Arabinose (Ara)



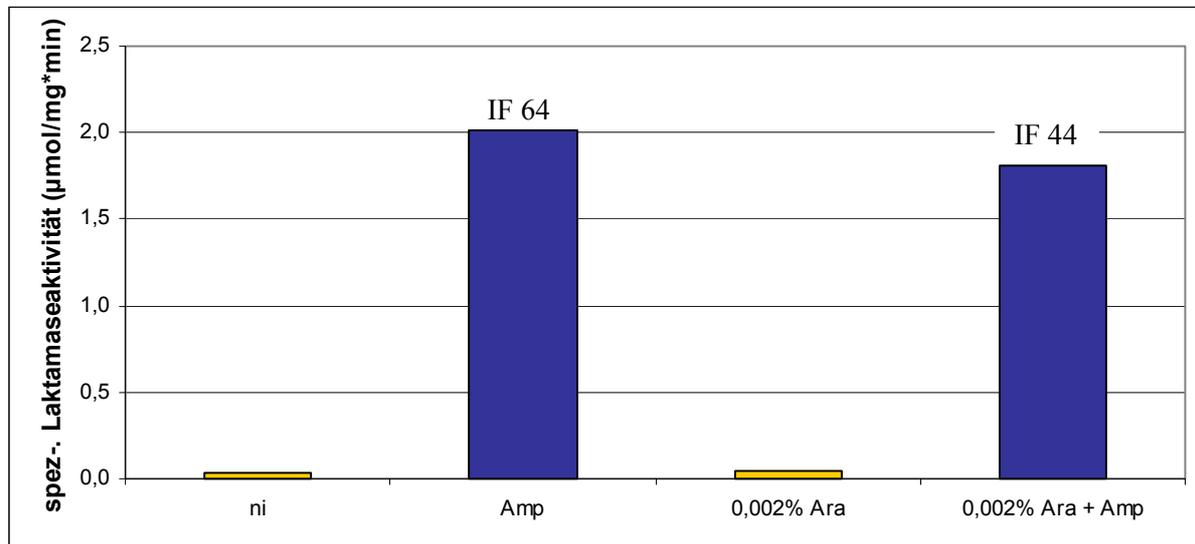
In Abbildung 3.20. wird deutlich, dass nach der Induktion mit Ampicillin ein um ca. sieben Zyklen niedriger  $\Delta$ CT-Wert als im nicht induzierten Zustand messbar ist, d.h. *blrD* wird vermehrt exprimiert. Durch die Zugabe der verschiedenen Arabinose-Konzentrationen wird auch ohne den Zusatz von Ampicillin *blrD* gebildet, die  $\Delta$ CT-Werte nehmen in Abhängigkeit der Arabinose-Konzentrationen ab. Durch Zugabe von Ampicillin kann bei 0,002% Arabinose die Expression von *blrD* noch gesteigert werden, bei den anderen beiden Konzentrationen an Arabinose erfolgt durch Induktion mit Ampicillin keine weitere Expressionssteigerung im Vergleich zum nicht induzierten Zustand. Bei den Ansätzen mit 0,2% Arabinose war im Vergleich zu den anderen Proben der Gesamt-RNA-Gehalt extrem niedrig. Durch die hohe Produktion von BlrD und dessen Einlagerung in die Membran ist die Bakterienzelle geschwächt und betreibt nicht den kompletten Biosynthesestoffwechsel. Infolgedessen nimmt der Gesamt-RNA-Gehalt der Zelle ab.

#### 3.4.4. Auswirkungen der *blrD*-Überexpression auf die spezifische $\beta$ -Laktamase-Aktivität

Um erste Hinweise darauf zu erhalten, dass sich die gesteigerte BlrD-Produktion auf die Regulation der  $\beta$ -Laktamasen auswirkt, wurde die spezifische  $\beta$ -Laktamase-Aktivität nach Behandlung mit 0,002% Arabinose untersucht. Nach einer Induktionszeit von 60 min mit

Arabinose wurden die Kulturvolumina geteilt und je eine Hälfte des Kulturansatzes mit Ampicillin für weitere 10 min induziert.

**Abb. 3.21.** Spezifische  $\beta$ -Laktamaseaktivität bei nicht induzierten (ni), mit Arabinose (Ara) und mit Ampicillin (Amp) induzierten Zellen



Nach Induktion mit Ampicillin war bei der unbehandelten Kultur eine um das 64-fache erhöhte spezifische  $\beta$ -Laktamase-Aktivität im Vergleich zum nicht induzierten Zustand messbar, während die  $\beta$ -Laktamase-Aktivität bei den zuvor mit Arabinose induzierten Zellen um das 44-fache zunahm (Abbildung 3.21.). Da die hier verwendete Messmethode durch verschiedene Faktoren sehr starken Schwankungen unterliegt, ist nicht gesichert, dass die Abnahme des Induktionsfaktors von 64 auf 44 einen tatsächlichen Effekt von BlrD auf die  $\beta$ -Laktamase-Expression darstellt oder durch Schwankungen der Methode verursacht wurde.

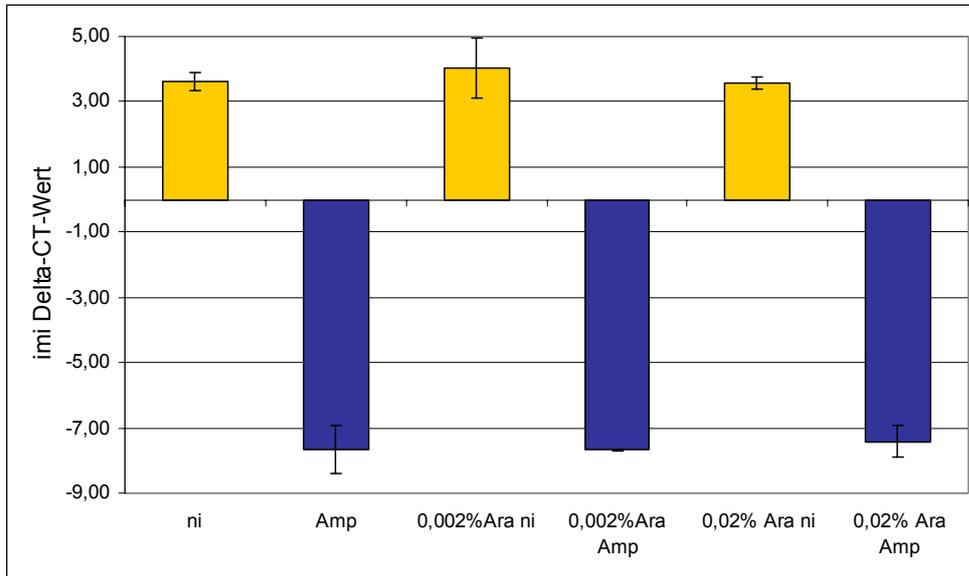
Um eine genauere Messmethode zu verwenden, wurde im Folgenden der veränderte Genexpressionslevel mit Hilfe der Real-Time RT-PCR bestimmt. Mit Hilfe dieser Methode kann man die Menge an BlrD mit der Expression der  $\beta$ -Laktamase-Gene genau korrelieren.

### 3.4.5. Auswirkungen der *blrD*-Überexpression auf die Expression der $\beta$ -Laktamase

Um die Auswirkungen des verstärkt gebildeten BlrD auf die  $\beta$ -Laktamase-Expression in der Real-Time RT-PCR zu untersuchen, wurde der Genexpressionslevel des *imi*-Gen gemessen.

Die Induktionsversuche wurden mit 0,002% und 0,02% Arabinose durchgeführt, da bei diesen Konzentrationen das Zellwachstum weitgehend normal verläuft.

**Abb. 3.22.** *imi*- $\Delta$ CT-Werte bei nicht induzierten (ni) oder mit Ampicillin (Amp) induzierten Zellen, nach Behandlung mit und ohne Arabinose (Ara)



Ohne Ampicillin Zugabe sind die  $\Delta$ CT-Werte unabhängig von der Arabinose-Konzentration weitgehend gleich, das *imi*-Gen wird also auch bei steigender BlrD-Konzentration konstant schwach exprimiert (Abbildung 3.22.). Nach der Induktion mit Ampicillin war der  $\Delta$ CT-Wert um zehn Zyklen niedriger als im nicht induzierten Zustand, die Imi- $\beta$ -Laktamase wird verstärkt produziert. Auch nach Zunahme der *blrD*-Expression durch die Arabinose-Induktion blieben die  $\Delta$ CT-Werte des *imi*-Gens nach Zugabe von Ampicillin gleich. Es war keine Abnahme der  $\beta$ -Laktamase-Induktion messbar.

Der bei der Messung der  $\beta$ -Laktamase-Aktivität beobachtete Effekt, dass sich die vermehrte Bildung von BlrD negativ auf die Expression der Laktamasen auswirkt, konnte durch Versuche mittels Real-Time RT-PCR nicht bestätigt werden. Die Hypothese, dass BlrD als Permease das eigentliche Signal für BlrB ins Cytoplasma abtransportiert und dadurch mit BlrB um das Signal konkurriert, konnte mit diesen Versuchen nicht belegt werden.

#### 4. Diskussion

Diese Arbeit sollte die Kenntnisse über die Zwei-Komponenten-Regulation der  $\beta$ -Laktamase-Expression bei *Aeromonas* spp. vertiefen. Dafür wurden zu Beginn  $\beta$ -Laktamasen-überproduzierende Transposonmutanten untersucht. Wenn das Ausschalten eines Gens durch Insertion des Transposons zu einer Überproduktion der  $\beta$ -Laktamasen führt, so ist davon auszugehen, dass dieses Gen an der Regulation der  $\beta$ -Laktamase-Expression beteiligt ist. Durch die Transposonmutagenese waren zwei Mutanten-Typen erzeugt worden, bei denen jeweils ein anderes Gen unterbrochen ist.

Durch Klonierung und anschließende Sequenzierung konnte eines der beiden Gene vollständig sequenziert und anschließend identifiziert werden. Dieses Gen kodiert für ein Penicillin-Binde-Protein, welches Homologien zu PBP4 von *E. coli* aufweist.

Penicillin-Binde-Proteine sind periplasmatische Enzyme, die am Zellwand-Stoffwechsel beteiligt sind und Transglykosylase-, Transpeptidase-, D,D-Carboxypeptidase- oder D,D-Endopeptidase-Reaktionen katalysieren. Das PBP4 von *E. coli* ist ein bifunktionelles Enzym, welches sowohl D,D-Carboxypeptidase- als auch D,D-Endopeptidase-Funktion aufweist.

Bei *E. coli* wird das PBP4 als Präprotein synthetisiert, wobei ein 20 Aminosäure umfassendes Signalpeptid nach Transport durch die Cytoplasmamembran abgespalten wird. Das aus der Aminosäure-Sequenz berechnete Molekulargewicht unterscheidet sich daher von dem in der SDS-PAGE aufgetrennten Protein um 3 kDa [Mottl *et al.*, 1991]. Auch das PBP4-ähnliche Enzym von *A. veronii* *bv. sobria* wird vermutlich einschließlich eines Präproteins translatiert. So ließe sich die Differenz von ca. 5 kDa zwischen dem ermittelten Gewicht des Proteins [Westphal, 2003] und dem aus der Aminosäure-Sequenz berechneten Molekulargewicht erklären.

Proteine, die über den Sec-Transportweg ins Periplasma gelangen, besitzen ein N-terminales Signalpeptid, welches in der Regel 18-26 Aminosäuren lang ist. Die Aminosäure-Sequenz der Signalpeptide ist nicht konserviert, die verschiedenen Peptide sind jedoch alle nach der gleichen Struktur aufgebaut. Diese besteht aus einer positiv geladenen N-terminalen Region, einer zentralen hydrophoben Region und einer C-terminalen Region, die die Spaltstelle enthält [Stanley *et al.*, 2000]. Unmittelbar hinter der Spaltstelle befindet sich ein elektroneutraler bzw. negativ geladener Bereich.

Auch der N-Terminus des PBP4-ähnlichen Proteins von *A. veronii* *bv. sobria* ist in dieser Anordnung aufgebaut. An dritter Position befindet sich ein positiv geladener Arginin-Rest,

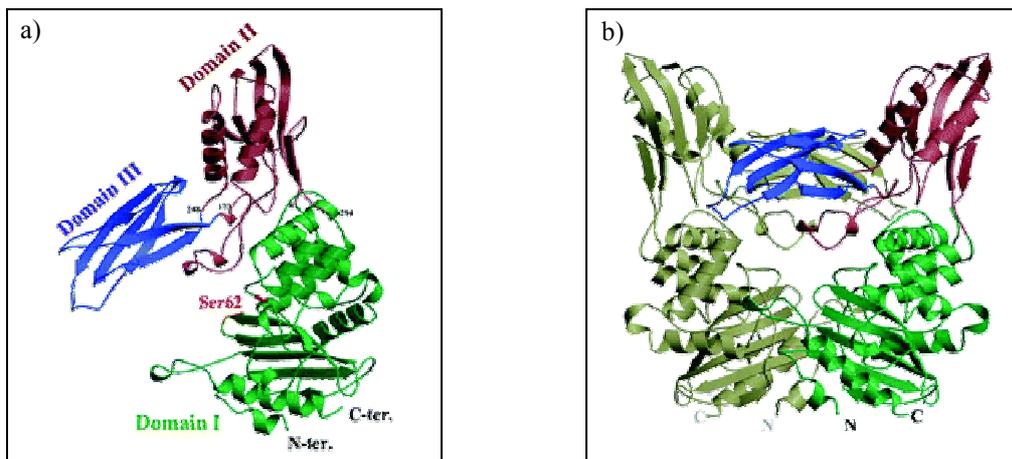
gefolgt von einem Bereich aus hydrophoben Aminosäure-Resten. Die genaue Spaltstelle des Signalpeptids ist bislang noch nicht näher untersucht, wahrscheinlich wird das Signalpeptid zwischen den Aminosäuren A18 und A19 abgespalten. Der Bereich hinter dieser Spaltstelle besteht aus zwei hydrophoben Aminosäure-Resten, auf die ein elektroneutraler Bereich folgt. Dieser Aufbau entspricht dem des Standard-Signalpeptids und bekräftigt die Vermutung, dass das PBP4-ähnliche Protein ein ca. 18 Aminosäuren umfassendes Signalpeptid besitzt.

Da dem *E. coli* PBP4 Transmembrandomänen, amphiphile Helices oder Ansatzstellen für Lipidanker fehlen, postulierten Mottl *et al.* [1991], dass es sich bei PBP4 um ein lösliches Protein handelt. Harris *et al.* beobachteten, dass die C-terminale Sequenz von PBP4 in der Gegenwart von Lipiden  $\alpha$ -Helicale bzw.  $\beta$ -Faltblatt-Strukturen annehmen kann und so mit der Membran assoziiert ist. Dabei handelt es sich vermutlich nur um eine schwache Assoziation, die hauptsächlich auf elektrostatischen Interaktionen von fünf Peptid-Kationen mit den negativ geladenen Resten der Membran beruht [Harris *et al.*, 2002]. Der C-Terminus des PBP4-ähnlichen Enzyms bei *A. veronii bv. sobria* enthält in dem entsprechenden Abschnitt lediglich zwei positiv geladene Aminosäure-Reste, die nur schwach mit der Membran interagieren werden. Da jedoch zehn hydrophobe Aminosäure-Reste in diesem Bereich zu finden sind, liegt die Vermutung nahe, dass dieses Protein ebenfalls mit der Cytoplasmamembran assoziiert ist.

Die Aminosäure-Motive SXXK, SXN und KTG, die das katalytische Zentrum des Enzyms bilden, sind charakteristisch für Proteine, die mit Penicillin interagieren. Das Serin des SXXK-Motivs ist dabei für den nukleophilen Angriff auf das  $\beta$ -Laktam bzw. die D,D-Peptidbindung verantwortlich [Ghuysen, 1991]. Diese drei Aminosäuregruppierungen sind sowohl beim PBP4 von *E. coli* als auch beim *A. veronii bv. sobria* PBP4-ähnlichen Enzym zu finden. Zwischen der SXXK- und der SXN-Sequenz ist beim *E. coli* PBP4 eine Insertionssequenz von 188 Aminosäuren zu finden, der bislang keine bestimmte Funktion zugewiesen werden konnte [Mottl *et al.*, 1991]. In Hinblick auf die autolytische D,D-Endopeptidase-Aktivität des Enzyms wird über eine eventuelle Regulator-Funktion dieser Extra-Domäne spekuliert [Mottl *et al.*, 1992]. Ohne die Insertionssequenz zeigt das PBP4 bei einem Aminosäure-Alignment hohe Homologien zu  $\beta$ -Laktamasen der Klasse A, weshalb vermutet wird, dass beide Enzyme aus einem gemeinsamen Ursprungs-Protein stammen [Mottl *et al.*, 1991].

Seit 2006 ist die Kristall-Struktur des PBP4 von *E. coli* aufgeklärt, wobei entdeckt wurde, dass dieses Enzym als Dimer vorliegt [Kishida *et al.*, 2006]. Jede Monomer-Untereinheit wird aus drei verschiedenen Domänen gebildet, von denen Domäne III in Domäne II eingebettet ist, die wiederum von Domäne I umfasst wird. Über den Aspartat-Rest 225 in Domäne III sind jeweils zwei Monomere miteinander verbunden. Sowohl Domäne I als auch Domäne II besitzen fünf antiparallele  $\beta$ -Faltblätter, die mit  $\alpha$ -Helices assoziiert sind (Abbildung 4.1).

**Abb. 4.1.** Kristall-Struktur des PBP4 von *E. coli*, dargestellt als Monomer (a) oder Dimer (b) [Kishida *et al.*, 2006]



Die Kristall-Struktur bestätigt die Insertionssequenz zwischen dem SXXK- und dem SXN-Motiv. Entgegen früherer Annahmen umfasst diese Sequenz nicht nur 188 Aminosäuren [Mottle *et al.*, 1991], sondern insgesamt 218 Aminosäure-Reste, die zusammen die Domänen II und III bilden. Sämtliche Aminosäuren, die das aktive Zentrum bilden, sind in Domäne I zu finden. Die Funktionen der Domänen II und III sind bislang unbekannt. Eine mögliche Aufgabe von Domäne III könnte die sterische Kontrolle des Substrat-Zugangs zum aktiven Zentrum sein [Kishida *et al.*, 2006].

Das Aminosäure-Alignment zwischen den beiden PBPs von *E. coli* und *A. veronii bv. sobria* zeigt deutlich, dass zwischen dem SXXK- und dem SXN-Motiv bei *A. veronii bv. sobria* ebenfalls eine lange Insertionssequenz zu finden ist. Disulfidbrücken, die im *E. coli* PBP4 zwischen den Cystein-Resten C159 – C173 und C217 – C234 gebildet werden, sind beim *A. veronii bv. sobria* Enzym an den Positionen C148 – C162 und C206 - C223 zu finden. Der Aspartat-Rest 225, der bei *E. coli* zwei Monomere verbindet, ist im PBP4-ähnlichen Protein an der Stelle A211 vorhanden.

Bei Deletionen in PBP4 von *E. coli*, die zwischen den Aminosäure Positionen 116 – 238 eingeführt wurden, weisen die Proteine weiterhin die gesamte Enzymaktivität auf. Deletionen vor oder hinter diesen Aminosäure-Resten führen zur Zerstörung des Enzyms [Mottl *et al.*, 1992]. Bei den untersuchten Transposonmutanten war das Transposon an unterschiedlichen Aminosäure-Positionen inseriert. Diese liegen genau zwischen dem SXN- und dem KTG-Motiv, was dem Aminosäure-Bereich entspricht, der im PBP4 die Domäne I bildet. Der Funktionsverlust des Enzyms lässt sich daher durch die Zerstörung des aktiven Zentrums erklären.

Die Aminosäure-Sequenz der D,D-Peptidase R39 von *Actinomadura* sp. R39 ist zu 24% homolog zu PBP4 von *E. coli* und zu 22% homolog zu dem PBP4-ähnlichen Enzym von *A. veronii* bv. *sobria*. Die Kristallstruktur dieser D,D-Peptidase ist ebenfalls aufgeklärt worden [Sauvage *et al.*, 2005]. Im Unterschied zum PBP4 liegt dieses Protein jedoch als Monomer vor. Vergleichbar ist die Verschachtelung der einzelnen Domänen, die das Monomer bilden. Wie das PBP4 besteht das R39 aus drei verschiedenen Domänen. Domäne III wird dabei von Domäne II umschlossen, die wiederum von Domäne I umgeben ist. Wie beim PBP4 sind die Penicillin-Binde-Motive in Domäne I zu finden. Während den Domänen II und III des PBP4 von *E. coli* keine bestimmte Funktion zugeordnet werden konnte [Kishida *et al.*, 2006], ist zumindest die Topologie der Domäne II von R39 mit bekannten Proteinen vergleichbar. Demnach weist diese Domäne topologische Ähnlichkeit zu der N-terminalen Domäne von MinC und der 1A Region von FtsA auf, beides Proteine, die mit FtsZ interagieren und an der Regulation der Septumbildung beteiligt sind. Außerdem bestehen Ähnlichkeiten zu einer d-Tyr-tRNA<sup>Tyr</sup>-Deacylase-Domäne von *E. coli* [Sauvage *et al.*, 2005].

Die Homologien auf Aminosäure-Ebene sind zwischen den beiden PBPs von *E. coli* und *A. veronii* bv. *sobria* mit 37% höher, als zwischen dem PBP4-ähnlichen Enzym von *A. veronii* bv. *sobria* und der D,D-Peptidase von *Actinomadura* R39. Da Cystein-Reste, zwischen denen Disulfid-Brücken gebildet werden, in der Sequenz von *A. veronii* bv. *sobria* an ähnlicher Stelle vorhanden sind wie bei der Sequenz von *E. coli*, ist es sehr wahrscheinlich, dass die Kristall-Struktur des PBP4-ähnlichen Enzyms von *A. veronii* bv. *sobria* eher mit der Struktur des PBP4 von *E. coli* übereinstimmt als mit der Proteinstruktur von *Actinomadura* R39.

Um das ausgeschaltete Gen der anderen Mutanten-Art zu identifizieren, wurde das DNA Walking SpeedUp Kit von Seegene eingesetzt, mit Hilfe dessen das zweite durch das

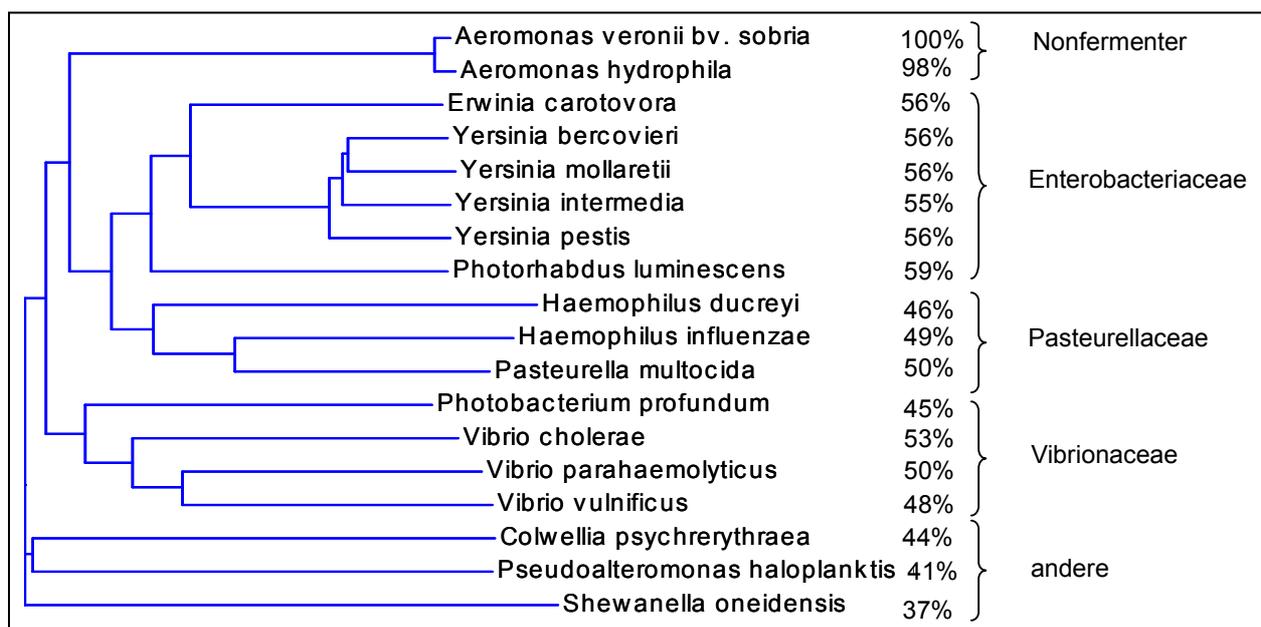
Transposon ausgeschaltete Gen amplifiziert und vollständig sequenziert werden konnte. Dieses Gen kodiert für ein Protein, dessen Aminosäure-Sequenz Homologien zu dem Enzym VanY der grampositiven Enterokokken aufweist. VanY ist eine D,D-Carboxypeptidase und D,D-Carboxyesterase, die zur Resistenzentwicklung gegenüber Vancomycin beiträgt [Wright *et al.*, 1992]. Das Glykopeptid-Antibiotikum Vancomycin bindet an den D-Ala-D-Ala-Rest des Peptidoglykan-Vorläufer-Peptids und verhindert so Transpeptidierungs- und Transglykosylierungs-Reaktionen. VanY besitzt eine N-terminale Membran-durchspannende Sequenz, mit der das Enzym auf der cytoplasmatischen Seite in der Membran verankert ist [Arthur *et al.*, 1992]. Die primäre Funktion von VanY ist die Abspaltung des terminalen D-Ala von Lipid-verbundenen Peptidoglykan-Vorläufern, wobei die Verankerung in der Membran erforderlich erscheint, um die Interaktion mit dem Substrat zu optimieren [Arthur *et al.*, 1998]. Durch die Abspaltung stehen weniger Moleküle für die Verknüpfung mit dem Vancomycin zu Verfügung, wodurch VanY zur Resistenz gegenüber diesem Glykopeptid beiträgt. Als D,D-Carboxyesterase kann VanY auch Depsipeptide wie z.B. D-Ala-D-Lactat-Verknüpfungen spalten, die ebenfalls in Peptidoglykan-Vorläufermolekülen bei Vancomycin resistenten Enterokokken zu finden sind. Durch Einbau dieser Peptide ins Murein wird die hauptsächliche Resistenz gegenüber Vancomycin vermittelt, da dieses nur in geringem Umfang an die Depsipeptide binden kann [Bugg *et al.*, 1991]. Die hydrolytische Aktivität von VanY den Depsipeptiden gegenüber ist auf eine äußerst niedrige Rate beschränkt [Arthur *et al.*, 1998]. Da in der Primär-Sequenz von VanY sämtliche Penicillin-Binde-Motive fehlen, gehört dieses Enzym nicht zu der Familie der PBPs und ist unempfindlich gegenüber  $\beta$ -Laktam-Antibiotika [Wright *et al.*, 1992].

VanY ist eine Metalloprotease mit charakteristischen Zink-Bindestellen im aktiven Zentrum. Die Zink-Liganden werden durch zwei Histidin- und einen Aspartat-Rest gebildet. Neben diesen drei Aminosäure-Resten lassen weitere Homologien in den konservierten Bereichen vermuten, dass es sich bei dem sequenzierten Genprodukt aus *A. veronii* bv. *sobria* ebenfalls um ein Enzym mit einer D,D-Carboxypeptidase-Funktion handelt. Daher wurde das Protein vorläufig als Enzym mit DdcA = D,D-Carboxypeptidase Aktivität bezeichnet. Da die Zellwand von *Aeromonas* spp. keine Ester-Bindungen aufweist [Quintela *et al.*, 1995], ist es jedoch unwahrscheinlich, dass die DdcA eine zusätzliche D,D-Carboxyesterase-Funktion besitzt.

Das Fehlen der DdcA in den entsprechenden Transposonmutanten konnte, im Gegensatz zum ausgeschalteten PBP4, auf Proteinebene nicht nachgewiesen werden [Westphal, 2003]. Zur Isolation der Proteine wurde eine Membranpräparation durchgeführt, an die der Nachweis von PBPs mittels biotinyliertem Ampicillin angeschlossen wurde. Da in der DdcA-Sequenz keine Protein-Strukturen gefunden wurden, die mit Membranen interagieren könnten, liegt dieses Enzym voraussichtlich löslich im Cytoplasma vor und kann deshalb nicht mittels einer Membranpräparation isoliert werden. Weiterhin gehört die DdcA nicht zu den Penicillin-Binde-Proteinen, weshalb das Enzym nicht durch die Bindung von markierten Ampicillin nachzuweisen ist. Sowohl die Isolations- als auch die Detektions-Methode waren demnach ungeeignet, um das Fehlen der DdcA auf Proteinebene nachzuweisen.

In unserer Arbeitsgruppe konnte eine weitere D,D-Carboxypeptidase von *A. hydrophila* sequenziert werden, die eine hohe Homologie (98%) zur DdcA aufweist [Kettern, 2006]. Um weitere Enzyme zu finden, die zur DdcA homolog sind, wurde ein Genomblast durchgeführt. Inzwischen sind eine Vielzahl von Genomen vollständig sequenziert, innerhalb derer speziell bei gramnegativen Bakterien nach weiteren Homologien zur DdcA gesucht wurde. In der Gruppe der gramnegativen Bakterien wurden nur Homologien zu Enzymen der  $\gamma$ -Proteobakterien gefunden. Diese Enzyme wurden mit den beiden *Aeromonas* D,D-Carboxypeptidase verglichen.

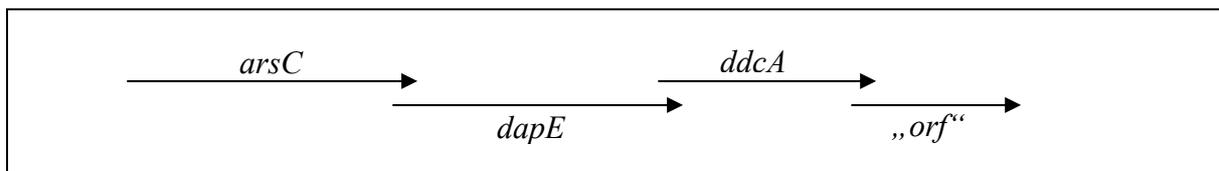
**Abb. 4.2.** Dendrogramm zur verwandtschaftlichen Beziehung der D,D-Carboxypeptidase von  $\gamma$ -Proteobakterien.



Bei den gebildeten Proteinen bestehen zwischen 37%-59% Sequenz-Homologien zu D,D-Carboxypeptidasen von verschiedenen Spezies. Das Dendrogramm (Abbildung 4.2.) gibt den verwandschaftlichen Beziehungsgrad der D,D-Carboxypeptidasen untereinander an. Die höchsten Sequenz-Homologien 55%-59% sind zu den D,D-Carboxypeptidasen der *Enterobacteriaceae* zu finden. Zu den D,D-Carboxypeptidasen der *Pasteurellaceae* und *Vibrionaceae* liegen Sequenz-Homologien zwischen 45%-53% vor. Alle genannten D,D-Carboxypeptidasen weisen die charakteristische Zink-Bindestellen auf und sind Enzyme, bei denen man eine D,D-Carboxypeptidase-Funktion aufgrund der Sequenzmotive vermutet, die bislang jedoch noch nicht näher untersucht worden sind. Interessanterweise besitzen die gut charakterisierten Spezies wie *E. coli* und *Pseudomonas aeruginosa* kein Enzym, welches Homologien zu der DdcA aufweist.

Die Untersuchung der genetischen Umgebung von *ddcA* ergab, dass dieses Gen in einem Genkluster mit zwei weiteren Genen zu finden ist. Während stromaufwärts von *ddcA* ein *dapE*-homologes-Gen liegt, befindet sich stromabwärts ein offener Leserahmen (*orf*), der bislang noch nicht näher charakterisiert wurde. DapE ist ein Enzym, das LL-Diaminopimelinsäure synthetisiert und somit zur Peptidoglykan-Biosynthese beiträgt. Die Anordnung dieses Genklusters ist bei der überwiegenden Anzahl der  $\gamma$ -Proteobakterien zu finden, die eine zur DdcA homologe Carboxypeptidase besitzen.

**Abb. 4.3.** Genetischer Kontext der D,D-Carboxypeptidase bei *Vibrio vulnificus*



Wie bei *Vibrio vulnificus* ist bei den meisten dieser Spezies noch ein weiteres Gen, *arsC*, in dem Kluster zu finden (Abbildung 4.3). Dieses liegt oberhalb von *dapE* und kodiert für eine Arsenat Reduktase, die in einigen Bakterien zur Resistenzvermittlung gegenüber Arsen verantwortlich ist. Vermutlich kann dieses Enzym außer Arsen noch weitere Verbindungen reduzieren und hat somit noch eine andere Funktion. Auch in *E. coli* ist stromaufwärts von *dapE* das *arsC*-Gen zu finden, es fehlt jedoch das Gen für die D,D-Carboxypeptidase ebenso wie für den *orf*. Ob *Aeromonas* spp. möglicherweise über das *arsC*-Gen verfügt, ist bislang unbekannt. Die Sequenzierung der DNA-Region stromaufwärts von *dapE* würde zur Aufklärung dieser Frage beitragen. Während fast alle der oben genannten Spezies über das

*dapE*-Gen verfügen, fehlt bei einigen *arsC* oder der *orf*. Da sich Start- bzw. Stop-Codon der vier Gene gegenseitig überlappen, erfolgt keine gemeinsame Genregulation. Ebenfalls auszuschließen ist die Regulation der DdcA-Expression über das BlrAB-System, da unmittelbar vor dem *ddcA*-Gen keine *blr*-Box zu finden ist. Zwar liegt 509 bp vor dem *ddcA*-Start-Codon eine *blr*-Box, dabei scheint es sich jedoch nur um eine zufällig gleiche Sequenz zu handeln, da die Distanz zum Transkriptions-Start zu groß ist. Die *blr*-Boxen der verschiedenen  $\beta$ -Laktamase-Gene sind jeweils bis zu 130 bp vor dem Start-Codon zu finden [Avison *et al.*, 2001, Avison *et al.*, 2004].

Weiterhin stellt sich die Frage, aus welchem Grund *A. veronii* *bv.* *sobria* und *A. hydrophila* über eine zusätzliche D,D-Carboxypeptidase im Cytoplasma verfügen. Über die genaue Funktion dieses Enzyms und seine Rolle im Zellwandstoffwechsel kann man bislang nur spekulieren. Möglicherweise spaltet es beim Zellwand-Recycling das terminale D-Ala von Pentapeptiden ab. Außerdem könnte es von den verschiedenen Peptidoglykan-Vorläufer-Molekülen, wie dem Lipid I und II das endständige D-Ala abspalten und so im Vorfeld Einfluss auf den Quervernetzungsgrad des Peptidoglykans nehmen. Für eine optimale Interaktion zwischen der D,D-Carboxypeptidase und den Peptidoglykan-Vorstufen scheint bei VanY die Verankerung in der Membran wichtig zu sein [Arthur *et al.*, 1998]. Da es sich bei der DdcA um ein lösliches Protein handelt, könnte sich die Hauptaufgabe dieses Enzyms von der des VanY unterscheiden. Möglicherweise spielt auch die Funktion des Proteins in *Aeromonas* spp. nur eine untergeordnete Rolle. Bei Enterokokken verursacht VanY den vermehrten Einbau von Vorläufer-Molekülen mit Tetrapeptiden ins Murein. Dadurch wird die Resistenz der Zelle gegenüber Vancomycin verstärkt. Dieser Resistenzmechanismus ist bei gramnegativen Bakterien wie den Aeromonaden irrelevant, da das Vancomycin aufgrund seiner Größe nicht ins Periplasma gelangen kann.

Untersuchungen an Deletionsmutanten von *E. coli*, die zusätzlich die  $\beta$ -Laktamase Regulator-Region aus *Enterobacter cloacae* trugen, haben gezeigt, dass erst bei Deletion von drei ( $\Delta$  PBP 4, 5, 6a oder  $\Delta$  PBP5, 6a, 6b) oder vier ( $\Delta$  PBP 4, 5, 6a, 6b) D,D-Carboxypeptidase-Genen eine Überproduktion der  $\beta$ -Laktamasen erfolgt. Die Ausschaltung von einem oder zwei D,D-Carboxypeptidasen hatte keine Auswirkungen auf die  $\beta$ -Laktamase-Aktivität [Pfeifle *et al.*, 2000]. Bei Verlust eines einzelnen PBPs kann demnach dessen Funktion von den anderen Enzymen übernommen werden.

Bei *A. veronii* bv. *sobria* führt im Gegensatz dazu schon die Ausschaltung einer einzelnen D,D-Carboxypeptidase zu einer Überexpression der  $\beta$ -Laktamasen [Westphal, 2003]. Aufgrund der verschiedenen Lokalisationsorte des PBP4 und der DdcA ist es verständlich, dass sich diese beiden Enzyme in ihrer Funktion nicht gegenseitig ergänzen können. Es ist jedoch verwunderlich, dass nicht zumindest die Funktion des PBP4 von einem der anderen PBPs übernommen werden kann. Westphal [2003] konnte insgesamt acht verschiedene PBPs auf Proteinebene nachweisen, von denen zwei PBPs ein niedrigeres Molekulargewicht als das PBP4 aufwiesen und es demnach sehr wahrscheinlich ist, dass darunter zumindest noch eine weitere D,D-Carboxypeptidase zu finden ist.

Bei *E. cloacae* erfolgt die Regulation der  $\beta$ -Laktamase-Expression durch den Transkriptionsfaktor AmpR, während an der Expression der  $\beta$ -Laktamasen in *Aeromonas* spp. ein Zwei-Komponenten-System beteiligt ist. Eventuell reichen bei *Aeromonas* spp. kleinere Mengen des Signals aus, um eine Überproduktion der  $\beta$ -Laktamasen zu erzielen. Bei *E. cloacae* hingegen muss das Induktionssignal erst den reprimierenden Ligand von AmpR verdrängen, damit AmpR seine Konformation verändern kann und vom Repressor zum Transkriptionsaktivator wird.

Beide durch die Transposonmutagenese ausgeschalteten Gene kodieren für Proteine, die am Peptidoglykan-Stoffwechsel beteiligt sind. Sowohl die Ausschaltung des PBP4-ähnlichen Enzyms als auch der DdcA resultiert in einer Überproduktion der  $\beta$ -Laktamasen. Es scheint dennoch ein phänotypischer Unterschied zwischen den beiden Mutanten-Typen zu existieren. Die Real-Time RT-PCR Ergebnisse zeigen, dass der mRNA-Level bei den zwei Transposonmutanten mit dem ausgeschalteten PBP4 höher war als bei den DdcA-Mutanten. Demnach resultiert die Ausschaltung des PBP4 in einer höheren  $\beta$ -Laktamase-Expression als die Unterbrechung der DdcA. Dies ließe sich dadurch erklären, dass nach der Ausschaltung des PBP4 eventuell eine höhere Signalkonzentration vorliegt als nach Unterbrechung der DdcA. Während das PBP4 hauptsächlich den Quervernetzungsgrad im Peptidoglykan bestimmt, nimmt die DdcA Einfluss auf Peptidoglykan-Vorläufer-Moleküle. Obwohl beide Enzyme die gleichen chemischen Reaktionen katalysieren, können die daraus resultierenden Produkte variieren. Eventuell ist das PBP4 ein aktiveres Enzym als die DdcA und kann mehr Substrat umsetzen. Durch Unterbrechung des PBP4 würde das Substrat, welches sonst zügig umgesetzt wird, im Periplasma akkumulieren. Vielleicht spielt auch die Menge des gebildeten Enzyms eine Rolle. Wenn die Menge an gebildeten PBP4 im Wildtyp höher ist als die Menge

an DdcA, hat dies bei Ausschaltung des Enzyms eine wesentlich größere Auswirkung auf den Zellwand-Stoffwechsel als die Unterbrechung der DdcA.

Bei PBP4-Überexpressionsmutanten von *E. coli* wurde eine veränderte Murein-Zusammensetzung festgestellt. So konnte in vitro eine Abnahme der quervernetzten Peptidseitenketten von 34,7% auf 3,3% und eine Reduktion der Penta-Peptidseitenketten von 16,7% auf 3,3% beobachtet werden [Korat *et al.*, 1991]. Wenn die Überproduktion des PBP4 solche Auswirkungen auf die Zusammensetzung des Peptidoglykans hat, wird auch die Ausschaltung des Enzyms eine Veränderung des Mureins nach sich ziehen. Auch bei der DdcA handelt es sich um eine D,D-Carboxypeptidase, die allerdings im Cytoplasma aktiv ist. Da auch dieses Protein am Zellwand-Stoffwechsel beteiligt zu sein scheint, resultiert die Unterbrechung des Gens in einem veränderten Mureinaufbau. Um die genaue Funktion beider Enzyme und die jeweilige Rolle im Zellwandstoffwechsel zu bestimmen, sind weitere Untersuchungen notwendig. Diese könnten dann Aufschluss darüber geben, welche Verbindungen durch die Ausschaltung der Enzyme angehäuft werden, die zur Induktion der  $\beta$ -Laktamasen führen. Eingeschränkte Untersuchungen der Zellwandbestandteile wurden bereits von Westphal [2003] durchgeführt. Mittels der HPLC-Analyse konnten keine Unterschiede in der Zusammensetzung der löslichen Muropeptide von Wildtyp bzw. Transposonmutanten nachgewiesen werden. Dies wurde darauf zurückgeführt, dass die Muropeptide nach Abspaltung aus der Zellwand für das Recycling zu schnell ins Cytoplasma aufgenommen werden und deshalb kein Unterschied zwischen Mutanten und Wildtyp messbar war.

Die Ausschaltung der Enzyme PBP4 und DdcA als Ursache für die Überproduktion der  $\beta$ -Laktamasen lässt darauf schließen, dass beide Proteine bei der Regulation der  $\beta$ -Laktamase-Expression eine Rolle spielen. Die Tatsache, dass beide Enzyme am Zellwand-Stoffwechsel beteiligt sind, unterstützt die Hypothese, dass es sich bei dem Induktionssignal für die Sensor-Kinase BlrB um ein Abbauprodukt des Peptidoglykan-Stoffwechsels handelt, welches durch die gestörte Zellwandsynthese vermehrt entsteht.

Bei *E. cloacae* konnte durch HPLC-Analyse der löslichen Muropeptide der Zusammenhang zwischen Murein-Stoffwechsel und  $\beta$ -Laktamase-Induktion weitestgehend aufgeklärt werden [Dietz *et al.*, 1997, Pfeifle, 1999]. Demnach steigt der Anteil an Pentapeptiden im Murein nach Inhibierung der D,D-Carboxypeptidasen an, da die Abspaltung des terminalen D-Ala unterbleibt. Durch die Mureinhydrolasen werden Peptidoglykan-Fragmente freigesetzt, wobei

die Konzentration der Pentapeptide im Vergleich zum Wildtyp besonders hoch ist. Diese können dann als Signal für die  $\beta$ -Laktamase-Expression wirken.

Falls Muropeptide das eigentliche Signal für die Sensor-Kinase BlrB darstellen, dann sollte die Expression der  $\beta$ -Laktamase-Gene auch direkt durch Muropeptide induzierbar sein. Da *Aeromonas* seine Zellwandabbau-Produkte voraussichtlich zum Recycling ins Cytoplasma aufnimmt, wurden Muropeptide aus einer *ampD*-Mutante von *E. coli*, die ihre Zellwandabbauprodukte im Cytoplasma anhäuft, isoliert und zur Induktion verwendet. Das Peptidoglykan von *E. coli* und *Aeromonas* spp. ist überwiegend aus den gleichen Untereinheiten zusammengesetzt [Quintela *et al.*, 1995], weshalb eine Induktion auch mit diesen Muropeptiden in *Aeromonas* möglich sein sollte. Um die äußere Membran für die Muropeptide permeabel zu machen, wurden die Zellen vor der Induktion mit Polymyxin-B-Nonapeptid (PMBN) behandelt.

Durch Messung der  $\beta$ -Laktamase-Aktivität war keine oder nur eine sehr gering erhöhte Aktivität der  $\beta$ -Laktamasen nach Induktion mit Muropeptiden messbar. Auch die Bestimmung des  $\beta$ -Laktamase-Genexpressionslevels mittels Real-Time RT-PCR ergab reproduzierbar keine erhöhte mRNA-Konzentration des *imi*-Gens, welches für die Carbapenemase kodiert. Nach Induktion mit Muropeptiden wurde dieses Gen vielmehr genauso häufig exprimiert wie im nicht induzierten Zustand. Die Hypothese, dass es sich bei dem Signal für BlrB um ein Muropeptid handelt, konnte weder durch Messung der  $\beta$ -Laktamase-Aktivität noch durch Bestimmung des  $\beta$ -Laktamase-Genexpressionslevels nachgewiesen werden.

Die Hinweise, dass es sich beim Induktionssignal für die  $\beta$ -Laktamase-Expression um ein Zellwand-Produkt handelt, sind sehr deutlich. Ein Grund, weshalb die Induktion mit Muropeptiden kein positives Ergebnis erzielte, könnte sein, dass mehr Unterschiede in der Zellwand-Zusammensetzung zwischen *Aeromonas*- und *E. coli*-Zellen existieren als bislang gedacht. So bestehen z.B. 5% der quervernetzten Peptidbrücken bei *E. coli* aus zwei *m*-Diaminopimelinsäure-Resten, während bei *Aeromonas* spp. 15% der Peptidbrücken aus diesen Verbindungen bestehen [Quintela *et al.*, 1995]. Wenn es sich bei dem Signal um ein Molekül handelt, welches im Vergleich zu *E. coli* bei *Aeromonas* spp. in größerem Maße im Murein vorkommt oder im Vergleich modifiziert vorliegt, fehlte es in der Muropeptid-Lösung, die aus den *E. coli* Zellen gewonnen wurde.

Wahrscheinlicher als dieser Aspekt ist jedoch die Vermutung, dass die Muropeptide nicht durch die äußere Membran ins Periplasma gelangen konnten. Bei der Verwendung von hohen PMBN-Konzentrationen waren die Zellen äußerst geschwächt und ließen sich kaum anzüchten. Die eingesetzten Konzentrationen wurden daher etwas niedriger gewählt, so dass die Zellen ein fast normales Wachstum zeigten, und vermutlich dennoch einige Poren in der Membran gebildet wurden. Vielleicht war die Anzahl der Poren zu gering und die Menge an einströmenden Muropeptiden zu niedrig, um die Induktion auszulösen.

Daher wurde der Zusammenhang zwischen Zellwand-Stoffwechsel und  $\beta$ -Laktamase-Induktion auf eine andere Art und Weise untersucht. Die Freisetzung von Anhydromuramylpeptide aus dem Peptidoglykan erfolgt durch die Aktivitäten der lytischen Transglykosylasen. Bulgecin ist ein Glucosamin-Derivat, das die lytische Transglykosylase Slt70 spezifisch hemmt [Templin *et al.*, 1992]. Die Inhibierung der Slt70 führt bei *E. cloacae* zu einer verringerten Induzierbarkeit und bei dereprimierten Mutanten zu einer reduzierten Überproduktion [Pfeifle, 1999]. Durch Messung der spezifischen  $\beta$ -Laktamase-Aktivität konnte auch bei *A. veronii* bv. *sobria* nach Behandlung mit Bulgecin eine Reduktion der  $\beta$ -Laktamase-Induktion beobachtet werden [Westphal, 2003]. Um wie viel Prozent der Genexpressions-Level der  $\beta$ -Laktamase nach Behandlung mit Bulgecin absinkt, sollte mittels Real-Time RT-PCR bestimmt werden.

Weder durch Bestimmung des  $\beta$ -Laktamase-Genexpressionslevels noch durch Messung der spezifischen  $\beta$ -Laktamase-Aktivität konnte eine Reduktion der  $\beta$ -Laktamase-Expression durch die Behandlung von Bulgecin nachgewiesen werden. Da jedoch auch bei der Positiv-Kontrolle keine Veränderung der  $\beta$ -Laktamase-Expression gezeigt werden konnte, wurde davon ausgegangen, dass der überwiegende Anteil des eingesetzten Bulgecins inaktiv war.

Um dennoch die Ergebnisse von Westphal [2003] bestätigen zu können, wurde ein Agar-Diffusionstest mit äußerst hohen Bulgecin-Konzentrationen durchgeführt. Dabei konnte sowohl bei *A. hydrophila* als auch bei *E. coli* ein deutlicher Hemmhof an der Schnittstelle zwischen den Filterpapieren mit Bulgecin bzw. Ampicillin oder Cefoxitin beobachtet werden. An dieser Stelle unterbleibt die Bildung der  $\beta$ -Laktamasen, da durch Hemmung der lytischen Transglykosylase Slt70 kein Induktionssignal freigesetzt werden kann. Bulgecin beeinflusst also tatsächlich die Regulation der  $\beta$ -Laktamase-Expression in *A. hydrophila*, da die Freisetzung der Anhydromuropeptide durch Inhibierung der lytischen Transglykosylase verhindert wird. Dies verstärkt die Hypothese, dass für die Induktion der  $\beta$ -Laktamase-

Expression Muropeptide erforderlich sind und dass es sich bei dem Signal für die Sensor-Kinase BlrB um ein Muropeptid handelt.

Im Laufe dieser Arbeit sollte des Weiteren die Beteiligung der noch unbekannt Komponente BlrD am BlrA/BlrB-System nachgewiesen werden. Die Expression von *blrD* wird gemeinsam mit den drei  $\beta$ -Laktamase-Genen über das Zwei-Komponenten-System reguliert [Avison *et al.*, 2004]. Daher liegt die Annahme sehr nahe, dass BlrD an der Regulation der  $\beta$ -Laktamase-Expression direkt beteiligt ist. BlrD ist ein Membranprotein, das aus sechs Transmembrandomänen und einer periplasmatischen Schleife aufgebaut ist. Bislang ist die Funktion von BlrD unbekannt. Niumsup postulierte, dass dieses Protein eventuell als Permease die Aufnahme des spezifischen Signals in das Cytoplasma ermöglicht, wodurch die Signal-Konzentration im Periplasma erniedrigt würde. Dadurch würde BlrD direkt mit der Sensorkinase BlrB um das Signal konkurrieren [Niumsup, 1998]. Um Anhaltspunkte auf die Beteiligung von BlrD am Zwei-Komponenten-System zu erhalten, wurden die Auswirkungen der *blrD*-Überexpression auf die  $\beta$ -Laktamase-Produktion untersucht.

Anhand der Real-Time RT-PCR konnte die erfolgreiche Überexpression von *blrD* gezeigt werden. Die steigenden BlrD-Konzentrationen zeigten keinerlei Effekt auf den  $\beta$ -Laktamase-Genexpressionslevels oder die spezifische  $\beta$ -Laktamase-Aktivität. Es konnte jedoch beobachtet werden, dass durch die vermehrte Bildung von BlrD und dessen Einlagerung in die Membran eine deutliche Schwächung der Bakterienzelle erfolgte. Dies war bei hohen Arabinose-Konzentrationen sowohl auf Protein- und RNA-Ebene messbar als auch bei Bestimmung der Lebendzellzahl zu sehen.

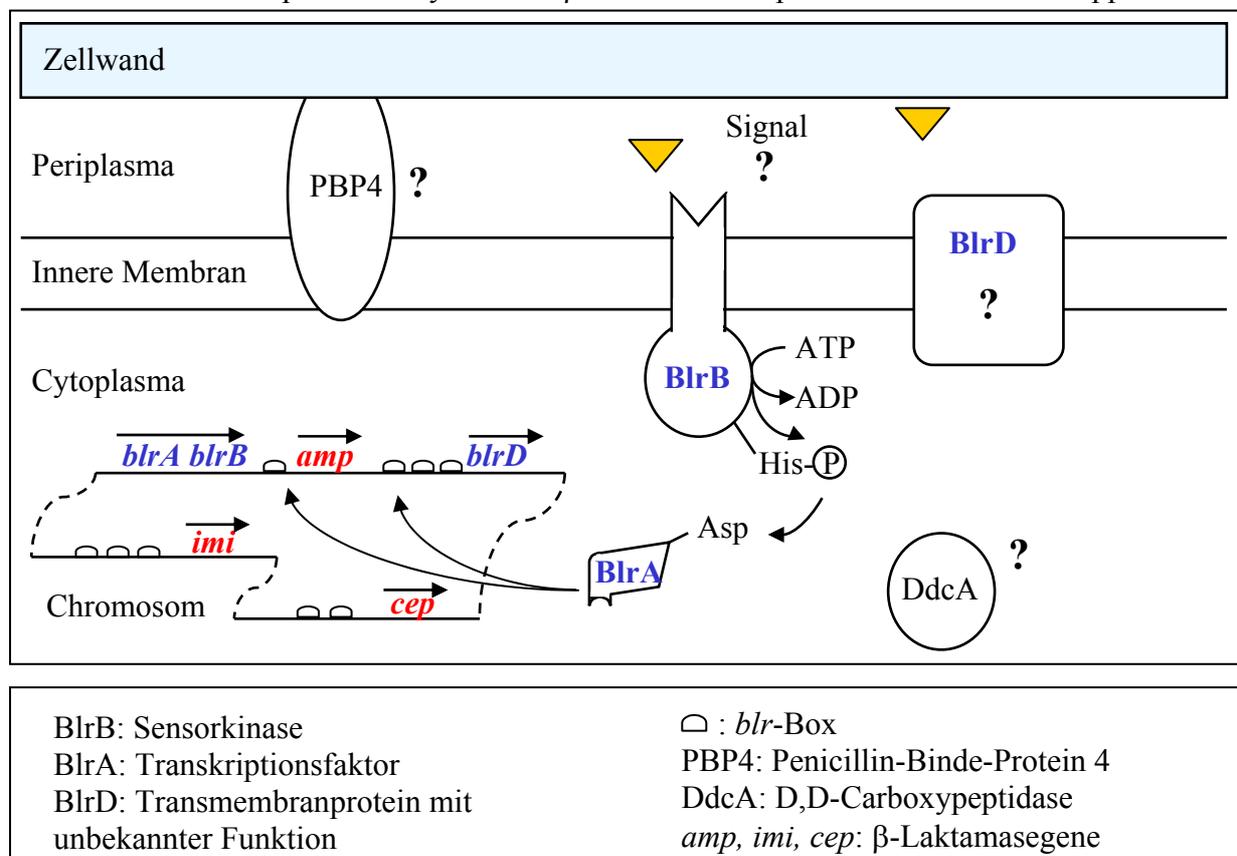
Die von Niumsup [1998] aufgestellte Hypothese, dass BlrD als Permease das eigentliche Induktions-Signal ins Cytoplasma abtransportiert und dadurch mit BlrB um das Signal konkurriert, konnte mit diesen Versuchen nicht bestätigt werden. Der gleichbleibende Genexpressionslevel der  $\beta$ -Laktamase, trotz vermehrter Produktion von BlrD ohne Induktion über das Zwei-Komponenten-System, schließt vielmehr einen negativen Regulationseffekt aus. Die direkte Beteiligung von BlrD an der Regulation der  $\beta$ -Laktamase-Expression konnte durch Überproduktion von BlrD nicht nachgewiesen werden.

Um die Funktion von BlrD weiter zu untersuchen, wäre es eventuell aufschlussreich, den Expressionsvektor mit dem *blrD* in jeweils eine der Transposonmutanten zu transformieren. Da in beiden Mutanten-Typen ein anderes Enzym ausgeschaltet ist, erfolgt die verstärkte Signal-Bildung in verschiedenen Kompartimenten der Zelle. Möglicherweise zeigt die

Überexpression von *blrD* in einer der Mutanten einen Effekt, der Rückschlüsse auf die eigentliche Funktion von BlrD erlaubt. Ein weiterer Ansatzpunkt ist die gezielte Ausschaltung von *blrD*. Die Auswirkungen dieser *blrD*<sup>-</sup>-Mutation auf die Expression der  $\beta$ -Laktamase-Gene könnte zur Aufklärung über die Beteiligung von BlrD am Zwei-Komponenten-System beitragen.

Mit den Ergebnissen dieser Dissertation lässt sich das Modell der  $\beta$ -Laktamase-Expression über ein Zwei-Komponenten-System bei *Aeromonas* spp. weiter ergänzen (Abbildung 4.4.).

**Abb. 4.4.** Zwei-Komponenten-System zur  $\beta$ -Laktamase-Expression in *Aeromonas* spp.



Die Enzyme PBP4 und DdcA konnten als Komponenten identifiziert werden, die an der Regulation der  $\beta$ -Laktamase-Expression beteiligt sind. Wie die beiden D,D-Carboxypeptidasen in den Regulationsmechanismus eingreifen, konnte jedoch nicht geklärt werden. Ob es sich bei dem Signal, welches im Periplasma an die Sensor-Kinase BlrB bindet, um ein Muropeptid oder um ein anderes Produkt des Zellwandstoffwechsels handelt, konnte bislang nicht aufgeklärt werden. Weiterhin unklar ist die Rolle des Membranproteins *blrD* bei der  $\beta$ -Laktamase-Expression. Durch Überproduktion dieses Proteins konnte keine Beteiligung am Zwei-Komponenten-System nachgewiesen werden.

## 5. Zusammenfassung

Der wichtigste Resistenzmechanismus gramnegativer Bakterien gegenüber  $\beta$ -Laktam-Antibiotika ist die Bildung von  $\beta$ -Laktamasen. Solche hydrolytischen Enzyme werden bei fast allen gramnegativen Bakterien natürlicherweise chromosomal kodiert und sind dann in der Regel durch  $\beta$ -Laktame induzierbar. Die Aufklärung des zu Grunde liegenden Regulationsmechanismus ist von großem Interesse, um gezielt in die Produktion der Enzyme eingreifen zu können.

Bei *Aeromonas* spp. erfolgt die Regulation der Expression von drei verschiedenen  $\beta$ -Laktamasen über ein Zwei-Komponenten-System. Nach Induktion mit  $\beta$ -Laktamen wird die Expression der  $\beta$ -Laktamasen zusammen mit der Expression der unbekannt Komponente BlrD gesteuert. In der vorliegenden Arbeit sollte das Bild der Zwei-Komponenten-Regulation weiter aufgeklärt werden.

Anhand von  $\beta$ -Laktamasen überproduzierenden Transposonmutanten konnte die Beteiligung von zwei D,D-Carboxypeptidasen am Zwei-Komponenten-System nachgewiesen werden. Da beide Enzyme Reaktionen des Peptidoglykan-Stoffwechsels katalysieren, scheint die Regulation der  $\beta$ -Laktamase-Expression mit dem Zellwand-Stoffwechsel eng verbunden zu sein. Einen weiteren Hinweis darauf lieferte die Hemmung der lytischen Transglykosylase Slt70 durch die Substanz Bulgecin. Anscheinend sind für die Induktion der  $\beta$ -Laktamasen Zellwand-Abbauprodukte notwendig, wahrscheinlich Anhydromuramylpeptide, die als Induktions-Signal mit der Sensor-Kinase BlrB interagieren. Die direkte Interaktion dieser Peptide mit der Sensor-Kinase BlrB konnte durch die Induktion mit Muropeptiden nicht nachgewiesen werden. Vermutlich konnten die Peptide nicht durch die äußere Membran ins Periplasma gelangen, weshalb eine Interaktion mit der Sensor-Kinase BlrB nicht stattfinden konnte.

Welche Rolle das Membranproteins BlrD bei der  $\beta$ -Laktamase-Expression spielt, ist weiterhin unklar. Die direkte Beteiligung von BlrD am Zwei-Komponenten-System konnte nicht eindeutig bewiesen werden. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass dieses Protein nicht mit BlrB um das Signal konkurriert.

## 6. Literaturverzeichnis

**Albright, L. M., Huala, E., and Ausubel, F. M.** Prokaryotic signal transduction mediated by sensor and regulator protein pairs. *Annu.Rev.Genet.* 23, 311-336. 1989.

**Alksne, L. E. and Rasmussen, B. A.** Expression of the AsbA1, OXA-12, and AsbM1 beta-lactamases in *Aeromonas jandaei* AER 14 is coordinated by a two-component regulon. *J.Bacteriol.* 179[6], 2006-2013. 1997.

**Ambler, R. P.** The structure of beta-lactamases. *Philos.Trans.R.Soc.Lond B Biol.Sci.* 289[1036], 321-331. 1980.

**Amemura, M., Makino, K., Shinagawa, H., and Nakata, A.** Nucleotide sequence of the phoM region of *Escherichia coli*: four open reading frames may constitute an operon. *J.Bacteriol.* 168[1], 294-302. 1986.

**Arthur, M., Molinas, C., and Courvalin, P.** Sequence of the vanY gene required for production of a vancomycin-inducible D,D-carboxypeptidase in *Enterococcus faecium* BM4147. *Gene* 120[1], 111-114. 1992.

**Arthur, M., Depardieu, F., Cabanié L., Reynolds P., and Courvalin, P.** Requirement of the VanY and VanX D,D-peptidases for glycopeptides resistance in enterococci. *Mol. Microbiol.* 30 (4): 819-30. 1998.

**Avison, M. B., Horton, R. E., Walsh, T. R., and Bennett, P. M.** *Escherichia coli* CreBC is a global regulator of gene expression that responds to growth in minimal media. *J.Biol.Chem.* 276[29], 26955-26961. 2001.

**Avison, M.B., Simm, A.M., Niumsup, P., MaGowan, A.P., Walsh T.R., and Bennett P.M.** *Aeromonas hydrophila* beta-lactamases are part of a wider regulon under the control of the BlrAB two-component system. 41<sup>th</sup> Interscience Conference on Antimicrob. Agents Chemother. 88 (Abstract) 2001.

**Avison, M. B., Niumsup, P., Nurmahomed, K., Walsh, T. R., and Bennett, P. M.** Role of the 'cre/blr-tag' DNA sequence in regulation of gene expression by the *Aeromonas hydrophila* beta-lactamase regulator, BlrA. *J.Antimicrob.Chemother.* 53[2], 197-202. 2004.

**Balows, A., Trüper, H.G., Dworkin, M., Harder, W., and Schleifer, K.H.** *The Prokaryotes*, second edition. Springer-Verlag, Heidelberg. 1992.

**Baquero, M. R., Bouzon, M., Quintela, J. C., Ayala, J. A., and Moreno, F.** dacD, an *Escherichia coli* gene encoding a novel penicillin-binding protein (PBP6b) with DD-carboxypeptidase activity. *J.Bacteriol.* 178[24], 7106-7111. 1996.

**Beachey, E. H., Keck, W., de Pedro, M. A., and Schwarz, U.** Exoenzymatic activity of transglycosylase isolated from *Escherichia coli*. *Eur.J.Biochem.* 116[2], 355-358. 1981.

**Bertsche, U., Breukink, E., Kast, T., and Vollmer, W.** In vitro murein peptidoglycan synthesis by dimers of the bifunctional transglycosylase-transpeptidase PBP1B from *Escherichia coli*. *J.Biol.Chem.* 280[45], 38096-38101. 2005.

- Beveridge, T. J.** Structures of gram-negative cell walls and their derived membrane vesicles. *J.Bacteriol.* 181[16], 4725-4733. 1999.
- Botta, G. A. and Park, J. T.** Evidence for involvement of penicillin-binding protein 3 in murein synthesis during septation but not during cell elongation. *J.Bacteriol.* 145[1], 333-340. 1981.
- Broome-Smith, J. K.** Construction of a mutant of *Escherichia coli* that has deletions of both the penicillin-binding protein 5 and 6 genes. *J.Gen.Microbiol.* 131[8], 2115-2118. 1985.
- Broome-Smith, J. K., Ioannidis, I., Edelman, A., and Spratt, B. G.** Nucleotide sequences of the penicillin-binding protein 5 and 6 genes of *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res.* 16[4], 1617. 1988.
- Bugg, T. D., Wright, G. D., Dutka-Malen, S., Arthur, M., Courvalin, P., and Walsh, C. T.** Molecular basis for vancomycin resistance in *Enterococcus faecium* BM4147: biosynthesis of a depsipeptide peptidoglycan precursor by vancomycin resistance proteins VanH and VanA. *Biochemistry* 30[43], 10408-10415. 1991.
- Bush, K., Jacoby, G. A., and Medeiros, A. A.** A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob.Agents Chemother.* 39[6], 1211-1233. 1995.
- Bush, K.** New beta-lactamases in gram-negative bacteria: diversity and impact on the selection of antimicrobial therapy. *Clin.Infect.Dis.* 32[7], 1085-1089. 2001.
- Crawford, P. A., Sharma, N., Chandrasekar, S., Sigdel, T., Walsh, T. R., Spencer, J., and Crowder, M. W.** Over-expression, purification, and characterization of metallo-beta-lactamase ImiS from *Aeromonas veronii* bv. sobria. *Protein Expr.Purif.* 36[2], 272-279. 2004.
- De Lorenzo, V, Herrero, M., Jakubzik, U., and Timmis, K. N.** Mini-Tn5 transposon derivatives for insertion mutagenesis, promoter probing, and chromosomal insertion of cloned DNA in gram-negative eubacteria. *J.Bacteriol.* 172[11], 6568-6572. 1990.
- Desvaux, M., Dumas, E., Chafsey, I., and Hebraud, M.** Protein cell surface display in Gram-positive bacteria: from single protein to macromolecular protein structure. *FEMS Microbiol.Lett.* 256[1], 1-15. 2006.
- Dietz, H., Pfeifle, D., and Wiedemann, B.** The signal molecule for beta-lactamase induction in *Enterobacter cloacae* is the anhydromuramyl-pentapeptide. *Antimicrob.Agents Chemother.* 41[10], 2113-2120. 1997.
- Dijkstra, A. J., Hermann, F., and Keck, W.** Cloning and controlled overexpression of the gene encoding the 35 kDa soluble lytic transglycosylase from *Escherichia coli*. *FEBS Lett.* 366[2-3], 115-118. 1995.
- Dijkstra, A. J. and Keck, W.** Identification of new members of the lytic transglycosylase family in *Haemophilus influenzae* and *Escherichia coli*. *Microb.Drug Resist.* 2[1], 141-145. 1996.
- Dijkstra, A.J.** The Lytic Transglycosylase Family of *Escherichia coli*. Rijksuniversiteit Groningen. Dissertation. 1997.
- Drury, L. S. and Buxton, R. S.** Identification and sequencing of the *Escherichia coli* cet gene which codes for an inner membrane protein, mutation of which causes tolerance to colicin E2. *Mol.Microbiol.* 2[1], 109-119. 1988.

- Ehlert, K., Höltje, J. V., and Templin, M. F.** Cloning and expression of a murein hydrolase lipoprotein from *Escherichia coli*. *Mol.Microbiol.* 16[4], 761-768. 1995.
- Engel, H., Kazemier, B., and Keck, W.** Murein-metabolizing enzymes from *Escherichia coli*: sequence analysis and controlled overexpression of the *slt* gene, which encodes the soluble lytic transglycosylase. *J.Bacteriol.* 173[21], 6773-6782. 1991.
- Engel, H., Smink, A. J., van Wijngaarden, L., and Keck, W.** Murein-metabolizing enzymes from *Escherichia coli*: existence of a second lytic transglycosylase. *J.Bacteriol.* 174[20], 6394-6403. 1992.
- Fosse, T., Giraud-Morin, C., Madinier, I., Mantoux, F., Lacour, J. P., and Ortonne, J. P.** *Aeromonas hydrophila* with plasmid-borne class A extended-spectrum beta-lactamase TEM-24 and three chromosomal class B, C, and D beta-lactamases, isolated from a patient with necrotizing fasciitis. *Antimicrob.Agents Chemother.* 48[6], 2342-2343. 2004.
- Ghuysen, J. M.** Serine beta-lactamases and penicillin-binding proteins. *Annu.Rev.Microbiol.* 45, 37-67. 1991.
- Glauner, B., Höltje, J. V., and Schwarz, U.** The composition of the murein of *Escherichia coli*. *J.Biol.Chem.* 263[21], 10088-10095. 1988.
- Goffin, C. and Ghuysen, J. M.** Multimodular penicillin-binding proteins: an enigmatic family of orthologs and paralogs. *Microbiol.Mol.Biol.Rev.* 62[4], 1079-1093. 1998.
- Guzman, L. M., Belin, D., Carson, M. J., and Beckwith, J.** Tight regulation, modulation, and high-level expression by vectors containing the arabinose PBAD promoter. *J.Bacteriol.* 177[14], 4121-4130. 1995.
- Harris, F., Brandenburg, K., Seydel, U., and Phoenix, D.** Investigations into the mechanisms used by the C-terminal anchors of *Escherichia coli* penicillin-binding proteins 4, 5, 6 and 6b for membrane interaction. *Eur.J.Biochem.* 269[23], 5821-5829. 2002.
- Hellinger, W. C. and Brewer, N. S.** Carbapenems and monobactams: imipenem, meropenem, and aztreonam. *Mayo Clin.Proc.* 74[4], 420-434. 1999.
- Henderson, T. A., Dombrosky, P. M., and Young, K. D.** Artfactual processing of penicillin-binding proteins 7 and 1b by the OmpT protease of *Escherichia coli*. *J.Bacteriol.* 176[1], 256-259. 1994.
- Henderson, T. A., Young, K. D., Denome, S. A., and Elf, P. K.** 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[19], 6112-6121. 1997.
- Hernandez, Valladares M., Felici, A., Weber, G., Adolph, H. W., Zeppezauer, M., Rossolini, G. M., Amicosante, G., Frere, J. M., and Galleni, M.** Zn(II) dependence of the *Aeromonas hydrophila* AE036 metallo-beta-lactamase activity and stability. *Biochemistry* 36[38], 11534-11541. 1997.
- Higuchi, R., Dollinger, G., Walsh, P. S., and Griffith, R.** Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology (N.Y.)* 10[4], 413-417. 1992.
- Higuchi, R., Fockler, C., Dollinger, G., and Watson, R.** Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology (N.Y.)* 11[9], 1026-1030. 1993.

- Höltje, J. V., Mirelman, D., Sharon, N., and Schwarz, U.** Novel type of murein transglycosylase in *Escherichia coli*. J.Bacteriol. 124[3], 1067-1076. 1975.
- Höltje, J. V.** Growth of the stress-bearing and shape-maintaining murein sacculus of *Escherichia coli*. Microbiol.Mol.Biol.Rev. 62[1], 181-203. 1998.
- Iaconis, J. P. and Sanders, C. C.** Purification and characterization of inducible beta-lactamases in *Aeromonas* spp. Antimicrob.Agents Chemother. 34[1], 44-51. 1990.
- Ishino, F., Mitsui, K., Tamaki, S., and Matsushashi, M.** Dual enzyme activities of cell wall peptidoglycan synthesis, peptidoglycan transglycosylase and penicillin-sensitive transpeptidase, in purified preparations of *Escherichia coli* penicillin-binding protein 1A. Biochem.Biophys.Res.Comm. 97[1], 287-293. 1980.
- Ishino, F., Park, W., Tomioka, S., Tamaki, S., Takase, I., Kunugita, K., Matsuzawa, H., Asoh, S., Ohta, T., and Spratt, B. G.** Peptidoglycan synthetic activities in membranes of *Escherichia coli* caused by overproduction of penicillin-binding protein 2 and rodA protein. J.Biol.Chem. 261[15], 7024-7031. 1986.
- Jacobs, C., Huang, L. J., Bartowsky, E., Normark, S., and Park, J. T.** Bacterial cell wall recycling provides cytosolic muropeptides as effectors for beta-lactamase induction. EMBO J. 13[19], 4684-4694. 1994.
- Jaffe, A., Chabbert, Y. A., and Semonin, O.** Role of porin proteins OmpF and OmpC in the permeation of beta-lactams. Antimicrob.Agents Chemother. 22[6], 942-948. 1982.
- Janda, J. M. and Abbott, S. L.** Evolving concepts regarding the genus *Aeromonas*: an expanding Panorama of species, disease presentations, and unanswered questions. Clin.Infect.Dis. 27[2], 332-344. 1998.
- Janda, J. M. and Abbott, S. L.** Unusual food-borne pathogens. *Listeria monocytogenes*, *Aeromonas*, *Plesiomonas*, and *Edwardsiella* species. Clin.Lab Med. 19[3], 553-582. 1999.
- Karimova, G., Dautin, N., and Ladant, D.** Interaction network among *Escherichia coli* membrane proteins involved in cell division as revealed by bacterial two-hybrid analysis. J.Bacteriol. 187[7], 2233-2243. 2005.
- Kettern, N.** Diplomarbeit in der Abteilung Pharmazeutische Mikrobiologie, Universität Bonn. 2006.
- Kishida, H., Unzai, S., Roper, D. I., Lloyd, A., Park, S. Y., and Tame, J. R.** Crystal structure of penicillin binding protein 4 (dacB) from *Escherichia coli*, both in the native form and covalently linked to various antibiotics. Biochemistry 45[3], 783-792. 2006.
- Koch, A. L.** Additional arguments for the key role of "smart" autolysins in the enlargement of the wall of gram-negative bacteria. Res.Microbiol. 141[5], 529-541. 1990.
- Korat, B., Mottl, H., and Keck, W.** Penicillin-binding protein 4 of *Escherichia coli*: molecular cloning of the dacB gene, controlled overexpression, and alterations in murein composition. Mol.Microbiol. 5[3], 675-684. 1991.
- Korsak, D., Liebscher, S., and Vollmer, W.** Susceptibility to antibiotics and beta-lactamase induction in murein hydrolase mutants of *Escherichia coli*. Antimicrob.Agents Chemother. 49[4], 1404-1409. 2005.

- Kraft, A. R., Templin, M. F., and Höltje, J. V.** Membrane-bound lytic endotransglycosylase in *Escherichia coli*. J.Bacteriol. 180[13], 3441-3447. 1998.
- Kraft, A. R., Prabhu, J., Ursinus, A., and Holtje, J. V.** Interference with murein turnover has no effect on growth but reduces beta-lactamase induction in *Escherichia coli*. J.Bacteriol. 181[23], 7192-7198. 1999.
- Labischinski, H., Goodell, E. W., Goodell, A., and Hochberg, M. L.** Direct proof of a "more-than-single-layered" peptidoglycan architecture of *Escherichia coli* W7: a neutron small-angle scattering study. J.Bacteriol. 173[2], 751-756. 1991.
- Langley, D. and Guest, J. R.** Biochemical genetics of the alpha-keto acid dehydrogenase complexes of *Escherichia coli* K12: isolation and biochemical properties of deletion mutants. J.Gen.Microbiol. 99[2], 263-276. 1977.
- Lindquist, S., Weston-Hafer, K., Schmidt, H., Pul, C., Korfmann, G., Erickson, J., Sanders, C., Martin, H. H., and Normark, S.** AmpG, a signal transducer in chromosomal beta-lactamase induction. Mol.Microbiol. 9[4], 703-715. 1993.
- Livermore, D. M.** beta-Lactamases in laboratory and clinical resistance. Clin.Microbiol.Rev. 8[4], 557-584. 1995.
- Lommatzsch, J., Templin, M. F., Kraft, A. R., Vollmer, W., and Holtje, J. V.** Outer membrane localization of murein hydrolases: MltA, a third lipoprotein lytic transglycosylase in *Escherichia coli*. J.Bacteriol. 179[17], 5465-5470. 1997.
- Lowry O.H., Rosenbrough, N.J., Farr, A., and Randall, K.** Protein measurement with the Folin phenol reagent. J.Biol.Chem. 193: 265-75. 1951.
- Madigan, M.T., Martinko, J.M., and Parker, J.** Brock Mikrobiologie. Spektrum Akademischer Verlag GmbH Heidelberg. 2001.
- Marchandin, H., Godreuil, S., Darbas, H., Jean-Pierre, H., Jumas-Bilak, E., Chanal, C., and Bonnet, R.** Extended-spectrum beta-lactamase TEM-24 in an *Aeromonas* clinical strain: acquisition from the prevalent *Enterobacter aerogenes* clone in France. Antimicrob.Agents Chemother. 47[12], 3994-3995. 2003.
- Martinez, E., Bartolome, B., and de la, Cruz F.** pACYC184-derived cloning vectors containing the multiple cloning site and lacZ alpha reporter gene of pUC8/9 and pUC18/19 plasmids. Gene 68[1], 159-162. 1988.
- Matsuzawa, H., Asoh, S., Kunai, K., Muraiso, K., Takasuga, A., and Ohta, T.** Nucleotide sequence of the rodA gene, responsible for the rod shape of *Escherichia coli*: rodA and the pbpA gene, encoding penicillin-binding protein 2, constitute the rodA operon. J.Bacteriol. 171[1], 558-560. 1989.
- Meberg, B. M., Paulson, A. L., Priyadarshini, R., and Young, K. D.** Endopeptidase penicillin-binding proteins 4 and 7 play auxiliary roles in determining uniform morphology of *Escherichia coli*. J.Bacteriol. 186[24], 8326-8336. 2004.
- Mizuno, T.** Compilation of all genes encoding two-component phosphotransfer signal transducers in the genome of *Escherichia coli*. DNA Res. 4[2], 161-168. 1997.

- 
- Mottl, H., Terpstra, P., and Keck, W.** Penicillin-binding protein 4 of *Escherichia coli* shows a novel type of primary structure among penicillin-interacting proteins. FEMS Microbiol.Lett. 62[2-3], 213-220. 1991.
- Mottl, H., Nieland, P., de Kort, G., Wierenga, J. J., and Keck, W.** Deletion of an additional domain located between SXXK and SXN active-site fingerprints in penicillin-binding protein 4 from *Escherichia coli*. J.Bacteriol. 174[10], 3261-3269. 1992.
- Nakagawa, J., Tamaki, S., and Matsuhasi, M.** Purified penicillin-binding proteins 1b from *E. coli* membranes showing activities of peptidoglycan polymerase and peptidoglycan cross-linking enzyme. Agric. Biol. Chem. 43:1379-1380. 1979.
- Niumsup, P.** Beta-lactamase expression in *Aeromonas* spp. University of Bristol. Dissertation. 1998.
- Niumsup, P., Simm, A. M., Nurmahomed, K., Walsh, T. R., Bennett, P. M., and Avison, M. B.** Genetic linkage of the penicillinase gene, amp, and blrAB, encoding the regulator of beta-lactamase expression in *Aeromonas* spp. J.Antimicrob.Chemother. 51[6], 1351-1358. 2003.
- Normark, S. and Burman, L. G.** Resistance of *Escherichia coli* to penicillins: fine-structure mapping and dominance of chromosomal beta-lactamase mutations. J.Bacteriol. 132[1], 1-7. 1977.
- O'Callaghan, C.H., Morris, A., Kirby, S.M., and Ahingler, A.H.** Novel method for detection of  $\beta$ -lactamases by using a chromogenic cephalosporin substrate. Antimicrob.Agents.Chemother 1: 283-8. 1968.
- Pfeifle, D.** Die Initiierung der AmpC  $\beta$ -Laktamase-Produktion in *Enterobacter cloacae*. Dissertation. 1999.
- Pfeifle, D., Janas, E., and Wiedemann, B.** Role of penicillin-binding proteins in the initiation of the AmpC beta-lactamase expression in *Enterobacter cloacae*. Antimicrob.Agents Chemother. 44[1], 169-172. 2000.
- Pham, JN., and Bell, SM.** The prevalence of inducible  $\beta$ -lactamase in clinical isolates of *Yersinia enterocolitica*. Pathol 25: 385-387. 1993.
- Quintela, J. C., Caparros, M., and de Pedro, M. A.** Variability of peptidoglycan structural parameters in gram-negative bacteria. FEMS Microbiol.Lett. 125[1], 95-100. 1995.
- Rasmussen, B. A., Keeney, D., Yang, Y., and Bush, K.** Cloning and expression of a cloxacillin-hydrolyzing enzyme and a cephalosporinase from *Aeromonas sobria* AER 14M in *Escherichia coli*: requirement for an *E. coli* chromosomal mutation for efficient expression of the class D enzyme. Antimicrob.Agents Chemother. 38[9], 2078-2085. 1994.
- Romeis, T., Vollmer, W., and Höltje, J. V.** Characterization of three different lytic transglycosylases in *Escherichia coli*. FEMS Microbiol.Lett. 111[2-3], 141-146. 1993.
- Romeis, T. and Höltje, J. V.** Penicillin-binding protein 7/8 of *Escherichia coli* is a DD-endopeptidase. Eur.J.Biochem. 224[2], 597-604. 1994.
- Rossolini, G. M., Walsh, T., and Amicosante, G.** The *Aeromonas* metallo-beta-lactamases: genetics, enzymology, and contribution to drug resistance. Microb.Drug Resist. 2[2], 245-252. 1996.

- Sartor, C., Limouzin-Perotti, F., Legre, R., Casanova, D., Bongrand, M. C., Sambuc, R., and Drancourt, M.** Nosocomial Infections with *Aeromonas hydrophila* from Leeches. Clin.Infect.Dis. 1.;35.(1.):E1.-5. 35[1], E1-E5. 2002.
- Satta, G., Fontana, R., and Canepari, P.** The two-competing site (TCS) model for cell shape regulation in bacteria: the envelope as an integration point for the regulatory circuits of essential physiological events. Adv.Microb.Physiol 36, 181-245. 1994.
- Sauvage, E., Herman, R., Petrella, S., Duez, C., Bouillenne, F., Frere, J. M., and Charlier, P.** Crystal structure of the Actinomadura R39 DD-peptidase reveals new domains in penicillin-binding proteins. J.Biol.Chem. 280[35], 31249-31256. 2005.
- Sayed, S., Saunders, J. R., Edwards, C., Corkill, J. E., and Hart, C. A.** Expression of *Aeromonas caviae* bla genes in *Escherichia coli*. J.Antimicrob.Chemother. 38[3], 435-441. 1996.
- Scheffers, D. J. and Pinho, M. G.** Bacterial cell wall synthesis: new insights from localization studies. Microbiol.Mol.Biol.Rev. 69[4], 585-607. 2005.
- Schiffer, G. and Höltje, J. V.** Cloning and characterization of PBP 1C, a third member of the multimodular class A penicillin-binding proteins of *Escherichia coli*. J.Biol.Chem. 274[45], 32031-32039. 1999.
- Schleifer, K. H. and Kandler, O.** Peptidoglycan types of bacterial cell walls and their taxonomic implications. Bacteriol.Rev. 36[4], 407-477. 1972.
- Schneider, C.** Neue Strukturen und Targets für  $\beta$ -Laktamase-Inhibitoren. Dissertation. 2004.
- Snower, D. P., Ruef, C., Kuritza, A. P., and Edberg, S. C.** *Aeromonas hydrophila* infection associated with the use of medicinal leeches. J.Clin.Microbiol. 27[6], 1421-1422. 1989.
- Spratt, B. G.** Resistance to antibiotics mediated by target alterations. Science 264[5157], 388-393. 1994.
- Stanley, N. R., Palmer, T., and Berks, B. C.** The twin arginine consensus motif of Tat signal peptides is involved in Sec-independent protein targeting in *Escherichia coli*. J.Biol.Chem. 275[16], 11591-11596. 2000.
- Stephenson, K. and Hoch, J. A.** Histidine kinase-mediated signal transduction systems of pathogenic microorganisms as targets for therapeutic intervention. Curr.Drug Targets.Infect.Disord. 2[3], 235-246. 2002.
- Stock, J. B., Ninfa, A. J., and Stock, A. M.** Protein phosphorylation and regulation of adaptive responses in bacteria. Microbiol.Rev. 53[4], 450-490. 1989.
- Stryer, L.** Biochemie. Spektrum Akademischer Verlag GmbH Heidelberg. 1996.
- Suzuki, H., Nishimura, Y., and Hirota, Y.** 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[2], 664-668. 1978.
- Templin, M. F., Edwards, D. H., and Höltje, J. V.** A murein hydrolase is the specific target of bulgecin in *Escherichia coli*. J.Biol.Chem. 267[28], 20039-20043. 1992.

- 
- Thunnissen, A. M., Dijkstra, A. J., Kalk, K. H., Rozeboom, H. J., Engel, H., Keck, W., and Dijkstra, B. W.** Doughnut-shaped structure of a bacterial muramidase revealed by X-ray crystallography. *Nature* 367[6465], 750-753. 1994.
- Thunnissen, A. M., Rozeboom, H. J., Kalk, K. H., and Dijkstra, B. W.** Structure of the 70-kDa soluble lytic transglycosylase complexed with bulgecin A. Implications for the enzymatic mechanism. *Biochemistry* 34[39], 12729-12737. 1995.
- Valauri, F. A.** The use of medicinal leeches in microsurgery. *Blood Coagul.Fibrinolysis* 2[1], 185-187. 1991.
- Van Asselt, E. J., Thunnissen, A. M., and Dijkstra, B. W.** High resolution crystal structures of the *Escherichia coli* lytic transglycosylase Slf70 and its complex with a peptidoglycan fragment. *J.Mol.Biol.* 291[4], 877-898. 1999.
- Van Asselt, E. J., Kalk, K. H., and Dijkstra, B. W.** Crystallographic studies of the interactions of *Escherichia coli* lytic transglycosylase Slf35 with peptidoglycan. *Biochemistry* 39[8], 1924-1934. 2000.
- Van Heijenoort, J.** Formation of the glycan chains in the synthesis of bacterial peptidoglycan. *Glycobiology* 11[3], 25R-36R. 2001.
- Vollmer, W., von Rechenberg, M., and Höltje, J. V.** 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[10], 6726-6734. 1999.
- Vollmer, W. and Höltje, J. V.** A simple screen for murein transglycosylase inhibitors. *Antimicrob.Agents Chemother.* 44[5], 1181-1185. 2000.
- Waley, S.G.**  $\beta$ -Lactamase: mechanism of action. P:198-228. in M.I. Page (ed.), *The chemistry of  $\beta$ -Lactams*. A. and P. Blackie, London. 1992.
- Walsh, T. R., Payne, D. J., MacGowan, A. P., and Bennett, P. M.** A clinical isolate of *Aeromonas sobria* with three chromosomally mediated inducible beta-lactamases: a cephalosporinase, a penicillinase and a third enzyme, displaying carbapenemase activity. *J.Antimicrob.Chemother.* 35[2], 271-279. 1995.
- Walsh, T. R., Hall, L., MacGowan, A. P., and Bennett, P. M.** Sequence analysis of two chromosomally mediated inducible beta-lactamases from *Aeromonas sobria*, strain 163a, one a class D penicillinase, the other an AmpC cephalosporinase. *J.Antimicrob.Chemother.* 36[1], 41-52. 1995.
- Walsh, T. R., Payne, D. J., MacGowan, A. P., and Bennett, P. M.** A clinical isolate of *Aeromonas sobria* with three chromosomally mediated inducible beta-lactamases: a cephalosporinase, a penicillinase and a third enzyme, displaying carbapenemase activity. *J.Antimicrob.Chemother.* 35[2], 271-279. 1995.
- Walsh, T. R., Gamblin, S., Emery, D. C., MacGowan, A. P., and Bennett, P. M.** Enzyme kinetics and biochemical analysis of ImiS, the metallo-beta-lactamase from *Aeromonas sobria* 163a. *J.Antimicrob.Chemother.* 37[3], 423-431. 1996.
- Walsh, T. R., Stunt, R. A., Nabi, J. A., MacGowan, A. P., and Bennett, P. M.** Distribution and expression of beta-lactamase genes among *Aeromonas* spp. *J.Antimicrob.Chemother.* 40[2], 171-178. 1997.

**Walsh, T. R., Neville, W. A., Haran, M. H., Tolson, D., Payne, D. J., Bateson, J. H., MacGowan, A. P., and Bennett, P. M.** Nucleotide and amino acid sequences of the metallo-beta-lactamase, ImiS, from *Aeromonas veronii* bv. sobria. *Antimicrob. Agents Chemother.* 42[2], 436-439. 1998.

**West, A. H. and Stock, A. M.** Histidine kinases and response regulator proteins in two-component signaling systems. *Trends Biochem. Sci.* 26[6], 369-376. 2001.

**Westphal, K.** Sind Anhydromuramylpeptide auch bei *Aeromonas* spp. die Mediatoren für die Induktion der chromosomalen  $\beta$ -Laktamase? Dissertation. 2003.

**WHO, World Health Organisation.** World Health Report. 2004.

**Wiedemann, B., Pfeifle, D., Wiegand, I., and Janas, E.**  $\beta$ -Lactamase induction and cell wall recycling in gram-negative bacteria. *Drug Resistance Updates I:* 223-226. 1998.

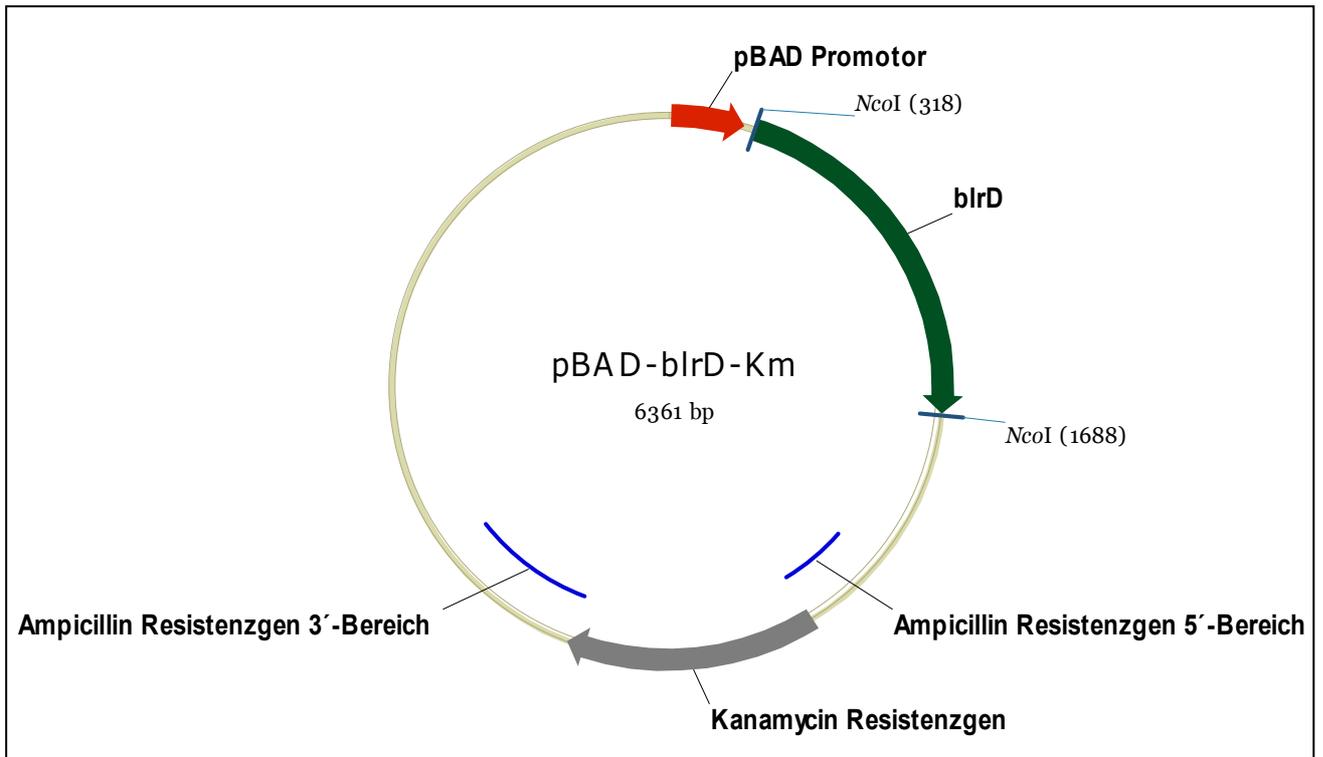
**Wright, G. D., Molinas, C., Arthur, M., Courvalin, P., and Walsh, C. T.** Characterization of vanY, a DD-carboxypeptidase from vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* BM4147. *Antimicrob. Agents Chemother.* 36[7], 1514-1518. 1992.

## 7. Anhang

### 7.1. Vektorkarte

In Abbildung 7.1. ist der in dieser Arbeit erzeugte Vektor pBAD-*blrD*-Km dargestellt, der zur Überexpression des Membranproteins BlrD verwendet wurde.

**Abb. 7.1.** pBAD-*blrD*-Km enthält *blrD* aus *A. hydrophila*, die Kanamycin-Resistenzkassette aus pUTkm2 in dem Expressionvektor pBAD/Myc-His A



---

## 7.2. Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
aD-Peptide	N-Acetylglukosamin- $\beta$ -1,4-(1,6-anhydro)-N-Acetylmuraminsäure-Peptide
aM-Pentapeptide	anhydro-N-Acetylmuraminsäure-Pentapeptide
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
c	Konzentration
CaCl <sub>2</sub>	Calciumchlorid
cDNA	copy-DNA
CT	Threshold Cycle
Cu <sup>2+</sup>	Kupfer
DdcA	D,D-Carboxypeptidase
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	desoxy-Nukleotidphosphat
E	Extinktion
GlcNAc	N-Acetylglukosamin
h	Stunde
H <sub>2</sub> O	Wasser
kb	Kilobasen
KBE	Kolonien bildende Einheit
kDa	Kilodalton
l	Liter
M	molar
MCS	multiple cloning site
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
MHK	minimale Hemmkonzentration
min	Minute
MurNAc	N-Acetylmuraminsäure
o.A.	ohne Angaben
OD	optische Dichte
PBP	Penicillin-Binde-Protein
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PMBN	Polymyxin-B-Nonapeptid
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
Tab.	Tabelle
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Trizma Base)
ÜNK	Übernachtkultur
Upm	Umdrehung pro Minute
UV	Ultra-Violett
V	Volt