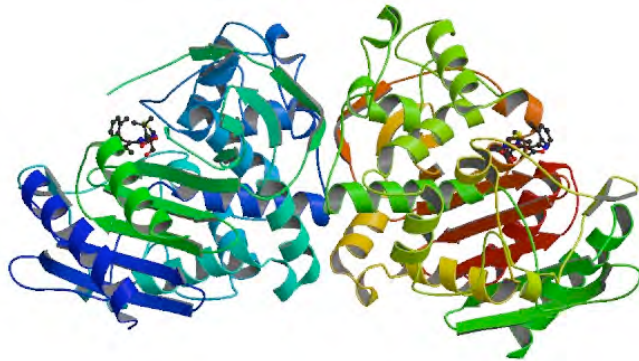


## $\beta$ -Lactamase



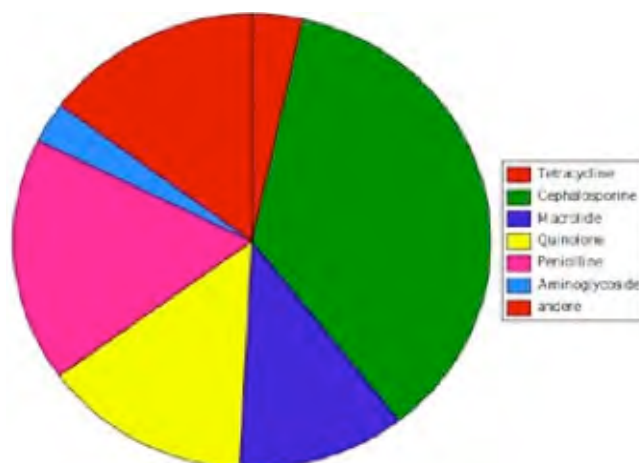
Ein Antibiotikaresistenzmechanismus

## Einleitung

- Antibiotika werden durch Bakterien und Pilze hergestellt
  - Entwicklung eines Schutz- bzw. Resistenzmechanismus gegen das eigene AB.
  - Übergang des Resistenzmechanismus auf andere Bakterienarten (häufig durch Plasmide)
- Schutz- bzw. Resistenzmechanismen folgen häufig zwei Grundprinzipien.
  - Antibiotisch wirksame Moleküle können chemisch verändert werden
  - Veränderung der Zielmoleküle (Biosyntheseenzyme) dieser Antibiotika, so dass das Antibiotikum nicht mehr gebunden werden kann.

- Antibiotika werden unwirksam durch Verbreitung der Resistenzen in Bakterien.
  - Hoher jährlicher Verbrauch der AB: ca. 40 000 Tonnen
  - Ausbreitung der Antibiotikaresistenzen wirkt sich erheblich auf die Behandlung von Krankheiten aus.
- Etwa dreiviertel aller angewendeten Antibiotika sind vom  $\beta$ -Lactamtyp.

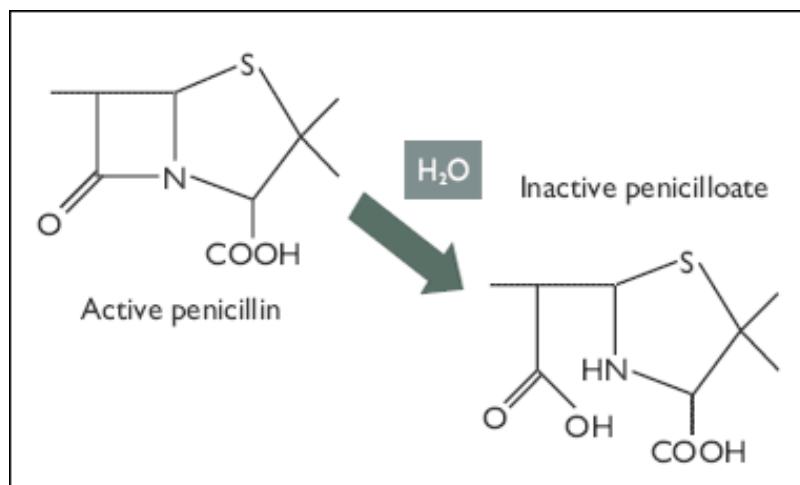
### Jährlicher, weltweiter Verbrauch der AB



## $\beta$ -Lactamase

- $\beta$ -Lactamase ist ein Enzym, welches Penicillin bindet und für die Spaltung des  $\beta$ -Lactamringes verantwortlich ist.
- Ist das *bla*-Gen in den Bakterien vorhanden und wird es dort expremiert, so wird das  $\beta$ -Lactamantibiotikum durch die gebildete  $\beta$ -Lactamase inaktiviert.
- Die  $\beta$ -Lactamase spaltet den  $\beta$ -Lactamring und bildet dabei eine Säure.

## Spaltung des $\beta$ -Lactamringes

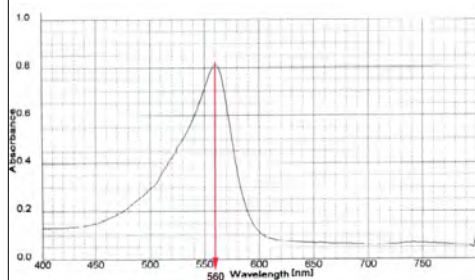


## Methoden

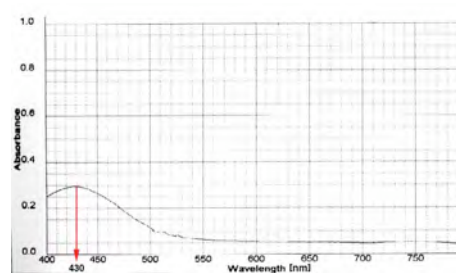
- Optische Dichtemessung
- Titration einer Phenolrotlösung (pH-Indikator) mit Essigsäure
- $\beta$ -Lactamase-Test
- Inaktivierung der  $\beta$ -Lactamase
- Antibiotikatest in Lebensmitteln
- Molekularbiologische Methoden
  - Plasmidisolierung
  - Transformation des Plasmids in *E. coli*

## Ergebnisse

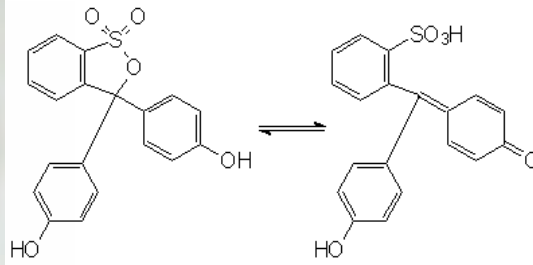
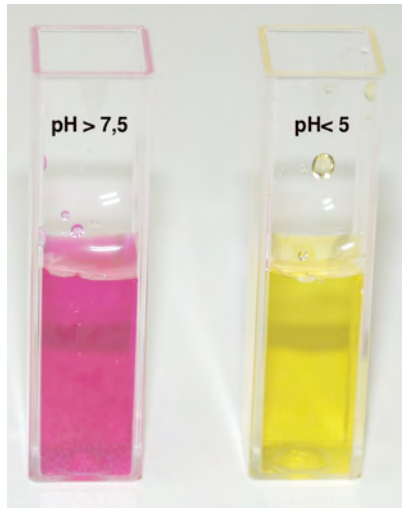
Erstellen eines  $\beta$ -Lactamase-Testsystems



Basischer pH-Bereich (rot)



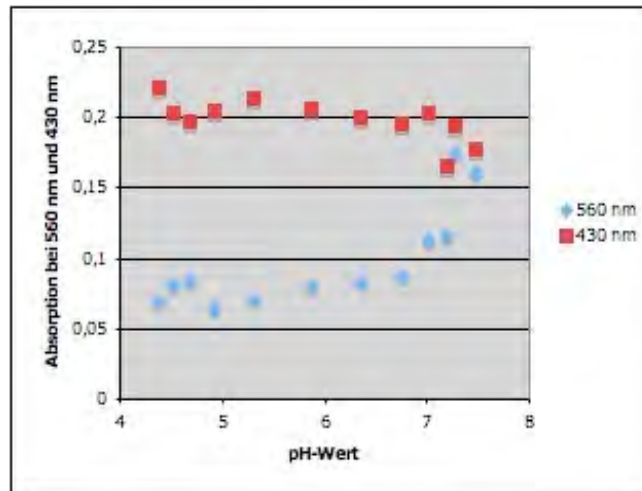
Saurer pH-Bereich (gelb)



**Strukturformel von Phenolrot:**

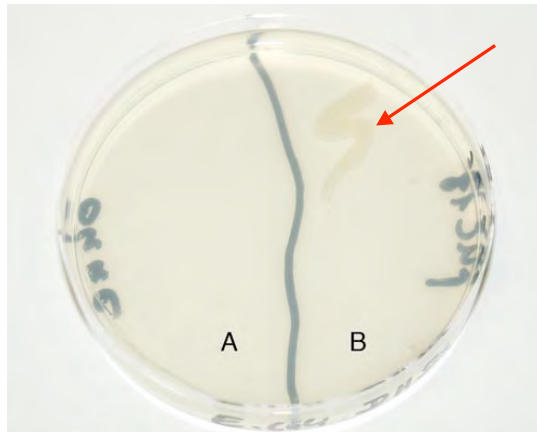
- Links: basisch
- Rechts: sauer

## Titrationskurve



## Messung der $\beta$ -Lactamase

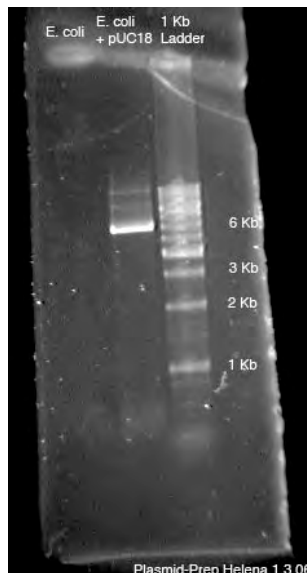
Gram-negative Bakterien



A: *E. coli* ohne pUC18

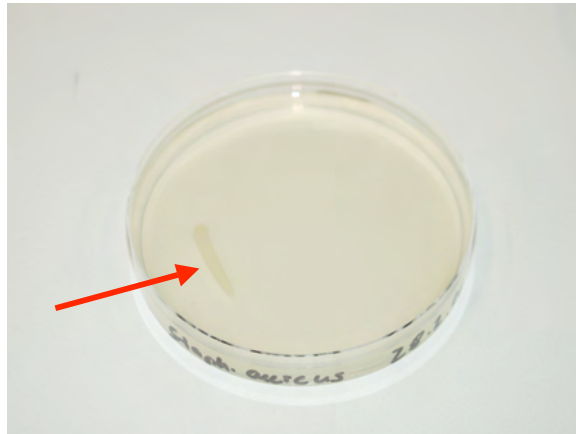
B: *E. coli* mit pUC18 (Amp<sup>r</sup>)

## Plasmidisolierung aus *E. coli*

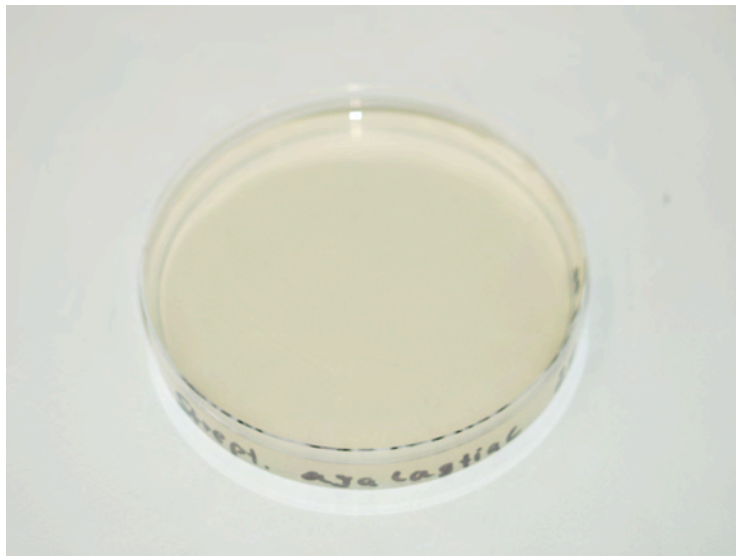


- **Linke Spur:** *E. coli*-Stamm
- **Mittlere Spur:** *E. coli*-Stamm mit pUC18
- **Rechte Spur:** Längenstandard

## Gram-positive Bakterien

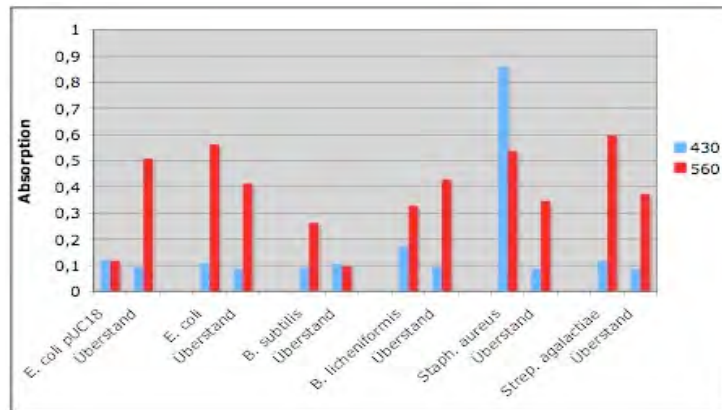


Staphylococcus aureus



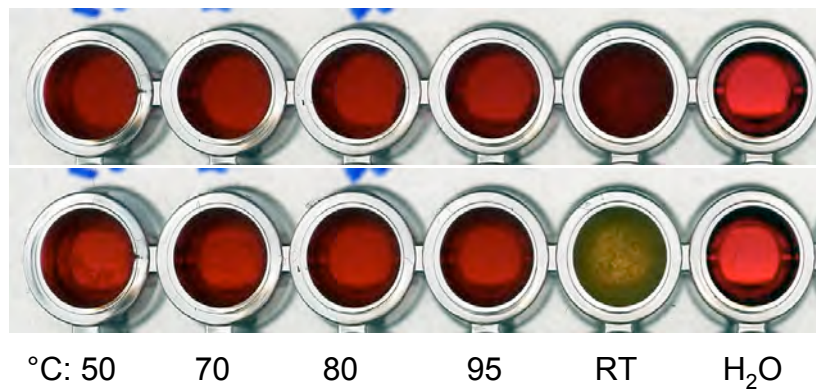
Streptococcus agalactiae

## Lokalisation und Eigenschaften



Hohe blaue Balken stehen für eine hohe  $\beta$ -Lactamase-Aktivität.  
Hohe rote Balken stehen für keine Ansäuerung des pH-Indikators und damit für keine  $\beta$ -Lactamase-Aktivität.

## Hitzeinaktivierung

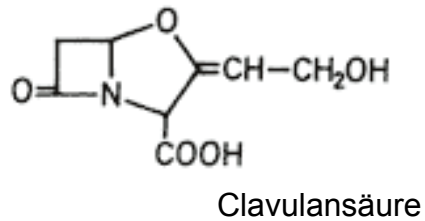
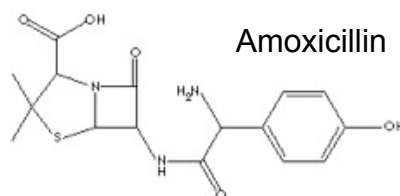


- **Oberer Reihe:** nach Inkubation bei den angegebenen Temp.
- **Untere Reihe:** Nach 50-minütiger Inkubation bei 37°C



## Hemmung der $\beta$ -Lactamasen

- $\beta$ -Lactamasen werden bei pharmazeutischen Anwendungen durch Inhibitoren gehemmt: Clavulansäure ist gebräuchlich.
- Sie ist eine Lactam-analoge Verbindung, die sehr viel fester an  $\beta$ -Lactamasen bindet als ein  $\beta$ -Lactamantibiotikum.



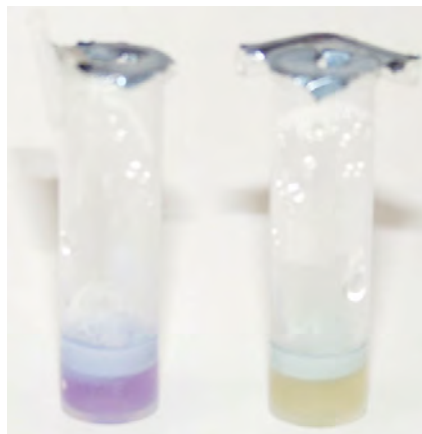
## Hemmung bei *E. coli* durch Clavulansäure

Inkubation	Ansatz	$E_{430 \text{ nm}}$ (gelb)
$T_{0 \text{ min}}$	Amoxicillin	0,672
$T_{60 \text{ min}}$		0,753
$T_{0 \text{ min}}$	Amoxicillin + Clavulansäure	0,581
$T_{60 \text{ min}}$		0,479

## Hemmung bei *Staphylococcus aureus* durch Clavulansäure

Inkubation	Ansatz	E <sub>430 nm</sub> (gelb)
T <sub>0 min</sub>	Amoxicillin	1,078
T <sub>60 min</sub>		1,169
T <sub>0 min</sub>	Amoxicillin + Clavulansäure	1,136
T <sub>60 min</sub>		1,075

## Biologischer Nachweis von Antibiotika in Milch

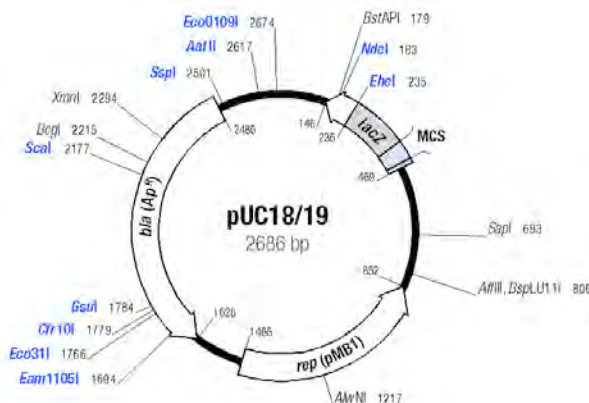


Links Milch mit AB, rechts AB-freie Milch

## Zusammenfassung

- Ein Test zum Nachweis von  $\beta$ -Lactamase wurde gefunden.
  - Der Test beruht auf dem Messen eines Farbumschlags des pH-Indikators Phenolrot
- Es wurde eine unterschiedliche  $\beta$ -Lactamase-Aktivität festgestellt.
- Die Hitzeempfindlichkeit und die Hemmung durch Clavulansäure ist ein Beweis dafür, dass  $\beta$ -Lactamase ein Enzym ist.

- Es muss ein *bla*-Gen vorhanden sein, damit die  $\beta$ -Lactamase gebildet wird. Dadurch kann eine Enzymaktivität nachgewiesen werden.

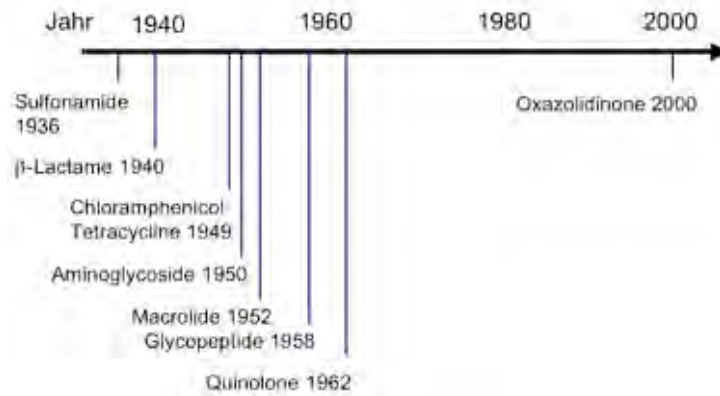


- Die  $\beta$ -Lactamase-Aktivität war in Gram-positiven und Gram-negativen Bakterien an die Zellen gebunden.
- Mit einem Test wurde AB in Lebensmitteln nachgewiesen.
  - Beruht auf der Wachstumshemmung des AB-empfindlichen *Bacillus stearothermophilus*
  - Verbreitung der AB in unserer Umwelt kann durch den Test nachgewiesen werden.

## Ausblick

- Die Resistenzbildungen werden durch die große Menge der eingesetzten AB gefördert
  - 20 - 50 % der AB werden in der Humanmedizin unnötig eingesetzt, weshalb der Mensch mitverantwortlich für die Resistenzausbreitung ist
- Verantwortungsbewussterer Umgang mit dem Verbrauch der AB nötig

## Einführung neuer AB



**Danke für Eure Aufmerksamkeit!**

