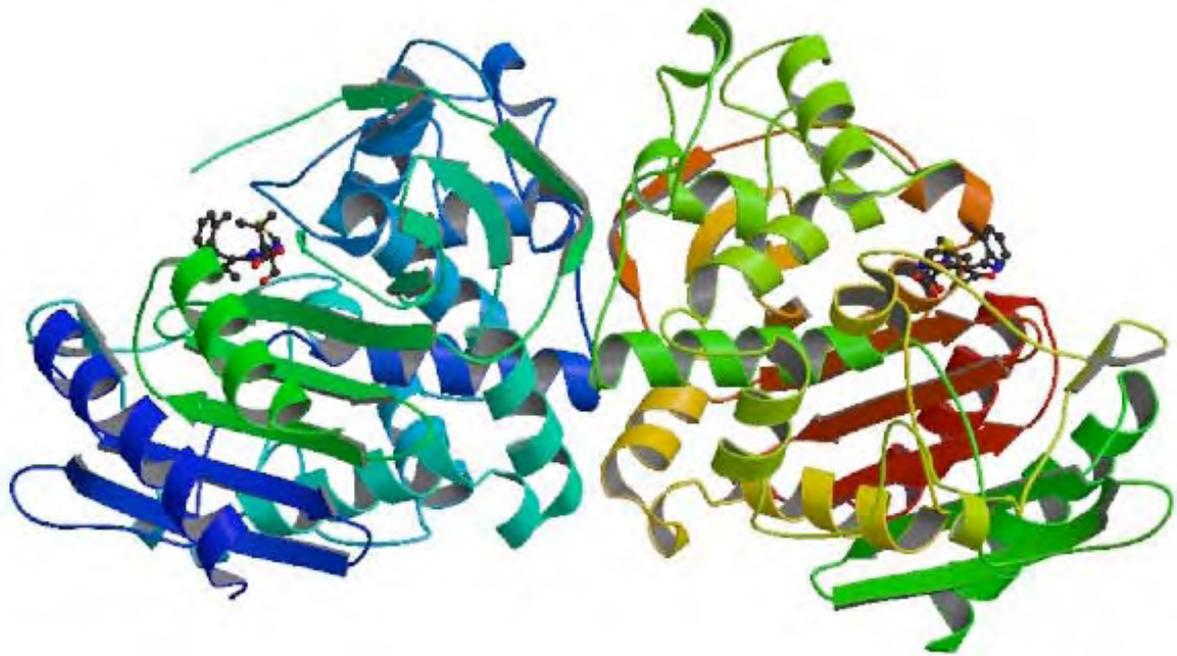


Ein Antibiotikaresistenzmechanismus: β -Lactamase



von **Stephanie Kalchschmid** und **Helena Stupperich**
Seminar Kurs „Gentechnik und Ethik“
am Albert-Einstein Gymnasium Wiblingen in Ulm

Inhaltsverzeichnis

1.	Zusammenfassung	2
2.	Einleitung	2
3.	Material und Methoden	5
3.1	Chemikalien	5
3.2	Geräte und Mikroorganismen	6
3.3	Methoden	6
3.4	Molekularbiologische Methoden	8
4.	Ergebnisse	9
4.1	Erstellen eines β -Lactamase-Testsystems	9
4.2	Messung der β -Lactamase bei verschiedenen Mikroorganismen	12
4.3	Lokalisation und Eigenschaften der β -Lactamase	15
4.4	Hemmung der β -Lactamasen	16
4.5	Nachweis von Antibiotika in Milch	17
5.	Diskussion	19
6.	Literatur	24

1. Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde die β -Lactamase als häufig verbreiteter Antibiotikaresistenzmechanismus untersucht. Dabei wurde gefunden:

1. Es konnte ein einfacher Test entwickelt werden, mit dem die β -Lactamase nachgewiesen werden kann. Der Test beruht auf dem Messen eines Farbumschlags des pH-Indikators Phenolrot.
2. In sechs verschiedenen Gram-positiven und Gram-negativen Bakterien wurden unterschiedliche β -Lactamase-Aktivitäten gefunden. Ein besonders aktives Enzym wurde in *Staphylococcus aureus* nachgewiesen.
3. Verschiedene Beweise wurden dafür gefunden, dass die β -Lactamase ein Enzym ist. Die β -Lactamase-Aktivität ist hitzeempfindlich. Bereits bei 50°C tritt eine irreversible Hitzeinaktivierung ein. Außerdem konnte in *E. coli* DH5 α -Kulturen gezeigt werden, dass die β -Lactamase-Aktivität an das Vorhandensein eines Plasmides gebunden ist und somit durch ein Gen codiert wird.
4. Wir konnten mit einem einfachen, biologischen Test Antibiotika in Lebensmittelproben nachweisen. Dieser Test beruht auf der Wachstumshemmung des Antibiotika-empfindlichen *Bacillus stearothermophilus*.

2. Einleitung

Antibiotika, die wir heute zur Behandlung von Infektionskrankheiten bei Menschen und Tieren verwenden, werden durch Bakterien hergestellt (Glick und Pasternak, 1995). Diese Bakterien müssen einen Schutzmechanismus gegen das Antibiotikum entwickeln, um nicht durch ihr eigenes Produkt getötet zu werden. Beim Übergang dieses Schutzmechanismus auf andere Bakterienarten entwickelt sich so ein Resistenzmechanismus gegen das Antibiotikum. Die Verbreitung der Resistenz erfolgt dann insbesondere über Plasmide, die leicht von Bakterium zu Bakterium weitergegeben werden können (Hof und Dörries, 2005).

Solche Schutz- bzw. Resistenzmechanismen folgen häufig zwei Grundprinzipien (Hof und Dörries, 2005). Zum einen können die antibiotisch wirksamen Moleküle che-

misch verändert werden, z.B. durch Spaltung einer Bindung im Antibiotikummolekül oder durch Anhängen einer chemischen Gruppe. Zum anderen können aber auch die Zielmoleküle (Biosyntheseenzyme) dieser Antibiotika verändert werden, so dass das Antibiotikum nicht mehr gebunden werden kann.

Durch die Verbreitung der Resistenzen in menschen- und tierpathogenen Bakterien werden immer mehr Antibiotika unwirksam (Daschner und Frank, 2005). Dies wird durch den hohen jährlichen Verbrauch, der weltweit circa 40 000 Tonnen beträgt (Schmid, 2002), gefördert. Da wir nur eine begrenzte Anzahl von Antibiotika zur Verfügung haben und die Entwicklung neuer Wirksubstanzen langsamer verläuft als die Resistenzbildung, wirkt sich diese Ausbreitung der Antibiotikaresistenzen erheblich auf die Behandlung von Krankheiten aus (Daschner und Frank, 2005).

Etwa dreiviertel aller angewendeten Antibiotika sind vom β -Lactamtyp (Schmid, 2002). β -Lactamantibiotika werden durch β -Lactamasen inaktiviert, die den β -Lactamring dieser Antibiotika spalten. β -Lactamasen sind daher als ein Resistenzmechanismus anzusehen (Kayser et al., 2001).

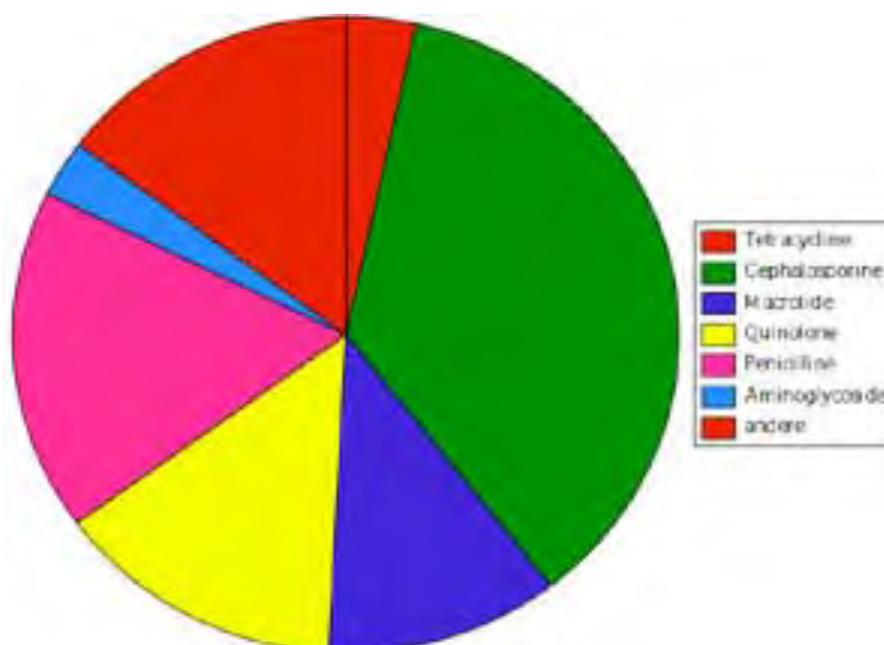


Abbildung 1: Der weltweite, jährliche Verbrauch verschiedener Antibiotika. β -Lactamantibiotika sind Cephalosporine und Penicilline.

Daher haben wir uns mit dem Antibiotikaresistenzmechanismus β -Lactamase beschäftigt. β -Lactamase ist ein Enzym (EC 3.5.2.6), welches Penicillin bindet und für die Spaltung des β -Lactamringes verantwortlich ist. Der β -Lactamring ist in den β -Lactamantibiotika, wie z.B. den Penicillinen und Cephalosporinen, enthalten. Durch diese β -Lactamantibiotika wird die Zellwandbiosynthese der Bakterien gehemmt, wodurch die Festigkeit der Bakterienzellhüllen stark reduziert wird und somit die Zellen platzen (Hof und Dörries, 2005).

Das Gen für die β -Lactamase ist das so genannte *bla*-Gen. Die Abkürzung *bla* steht für **beta-Lactamase**. Ist dieses *bla*-Gen in den Bakterien vorhanden und wird es dort expremiert, so wird das β -Lactamantibiotikum durch die gebildete β -Lactamase inaktiviert. Sie spaltet den β -Lactamring und bildet dabei eine Säure. Die Säurebildung kann daher zum Nachweis der β -Lactamase verwendet werden.

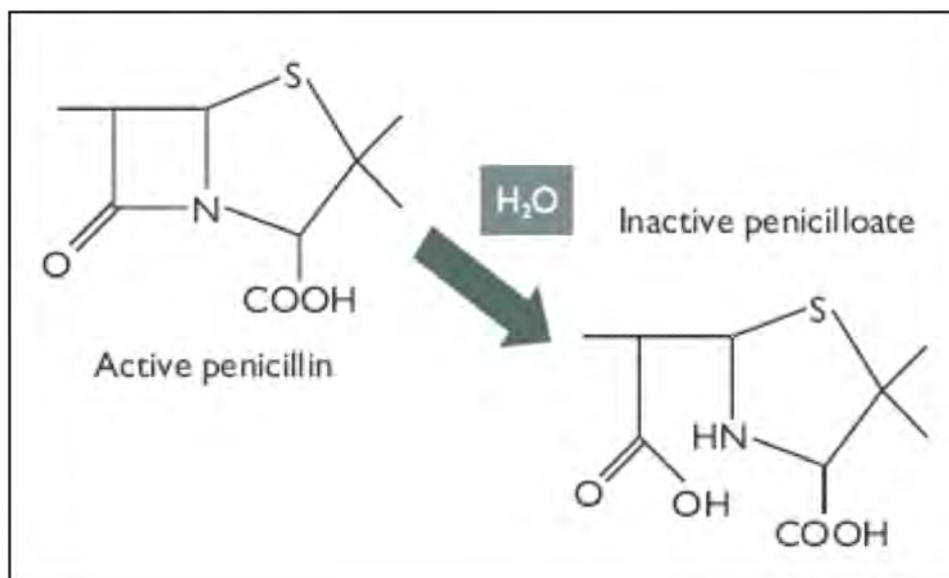


Abbildung 2: Spaltung des β -Lactamringes durch β -Lactamase und Bildung einer Penicillinsäure.

Die β -Lactamase kommt in Gram-positiven Bakterien wie *Staphylococcus aureus*, und in Gram-negativen Bakterien wie *E. coli* vor. Helena hat während den ganzen

Versuchen mit den Gram-negativen Bakterien gearbeitet und Stephanie mit den Gram-positiven.

Ziel dieser Arbeit ist es, einen einfachen, im Gymnasium durchführbaren Test zum Nachweis der β -Lactamase zu entwickeln. Damit soll ein wichtiger Antibiotikaresistenzmechanismus untersucht werden. Als Testprinzip wird die Säurebildung durch den Farbumschlag eines pH-Indikators verwendet. Außerdem sollen Tests zur Lokalisation und zu Eigenschaften der β -Lactamase durchgeführt werden. Abschließend wird ein Test auf Antibiotika in Lebensmittelproben durchgeführt, um die Verbreitung von Antibiotika in der Nahrung messen zu können

3. Material und Methode

3.1 Chemikalien

Die Chemikalien und Antibiotika in p.A-Qualität wurden von Fluka (Taufkirchen) oder von Merck (Darmstadt) bezogen. Clavulansäure wurde in Dragees als Kombinationspräparat zusammen mit Amoxicillin von Merckle Ratiopharm bezogen.

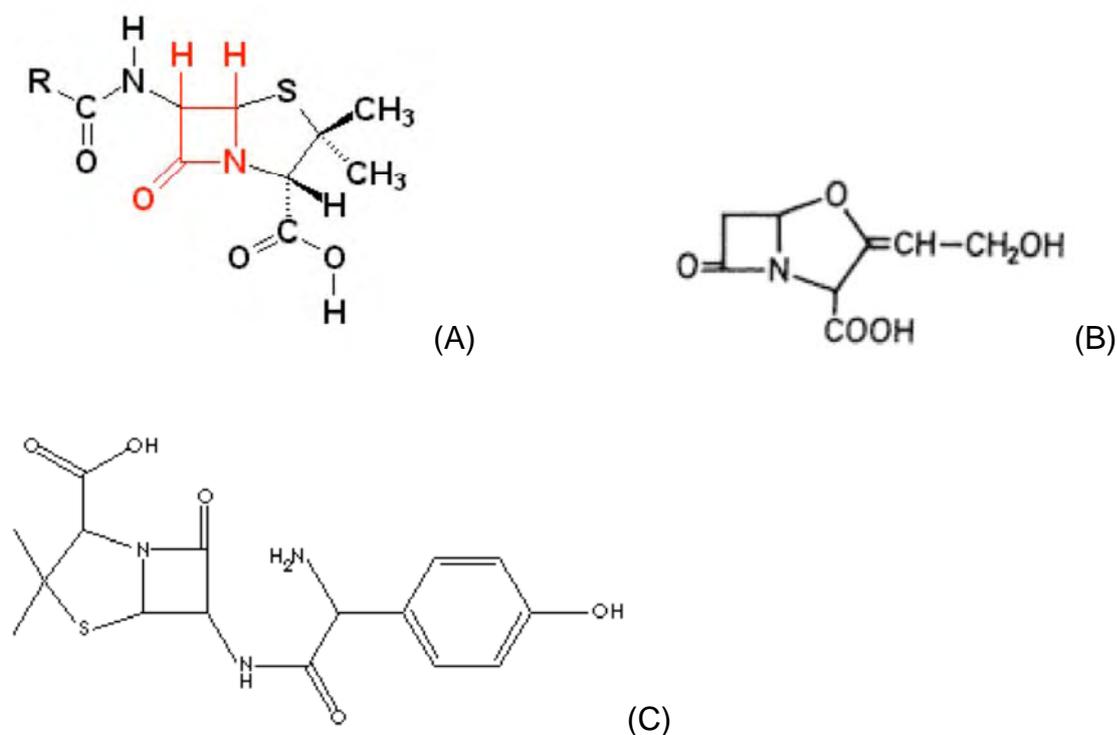


Abbildung 3: Strukturformeln von Penicillin (A), Clavulansäure (B) und Amoxicillin (C).

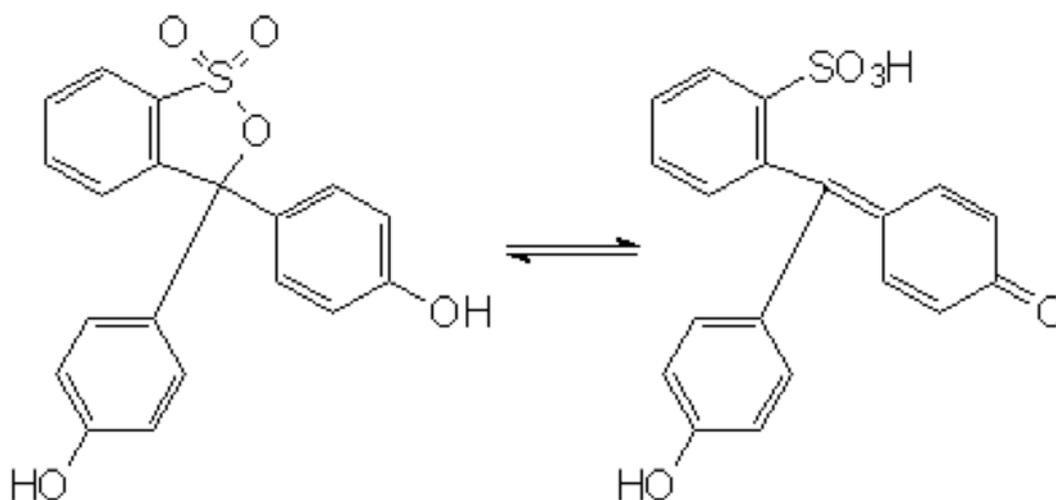


Abbildung 4: Strukturformel und pH-Reaktion des pH-Indikators Phenolrot. Links die Form unter basischen, rechts unter sauren Bedingungen.

3.2 Geräte und Mikroorganismen

Spektralphotometer 3000 von Amersham-Pharmacia (Freiburg) mit reduzierten Plastikküvetten ($d = 1 \text{ cm}$).

Bakterienstämme: *E. coli* DH5 α , *E. coli* DH5 α mit Plasmid pUC18, *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, *Streptococcus agalactiae* (Risikogruppe 2), *Staphylococcus aureus* (Risikogruppe 2) wurden aus der Stammsammlung der Abteilung Mikrobiologie und Biotechnologie der Universität Ulm entnommen. Mit den Organismen der Risikogruppe 2 wurde ausschließlich in einem S2-Labor der Abteilung gearbeitet.

Züchtung der Bakterienstämme: Die Bakterien wurden in 20 ml Röhren mit Alukappe gezüchtet, die 5 ml LB-Medium (Merck, Darmstadt) enthielten. Bei Bedarf wurde diesem Medium 50 μl Antibiotikum pro Milliliter zugesetzt. Für Agarplatten in Plastikpetrischalen wurde diesem Medium 1,5 % Agar-Agar zugefügt.

3.3 Methoden

Optische Dichtemessung

Das Wachstum der Bakterien wurde durch photometrische Messung in Plastikküvetten ($d = 1 \text{ cm}$) bei 600 nm gemessen. Dazu wurde $0,5 \text{ ml}$ der Kultur mit 2 ml Wasser gemischt (1:5 Verdünnung).

Titration einer Phenolrotlösung mit Essigsäure

Phenolrot wurde in 20 ml Tris/HCl-Puffer (50 mM) $\text{pH } 7,5$ gelöst. Dazu wurde jeweils 1 ml 5%ige Essigsäure hinzugegeben. Dann wurde der pH -Wert und im Photometer die Absorptionen der Lösung bei 430 nm und 560 nm gemessen. Es wurde bis zum pH -Wert $4,38$ titriert.

β -Lactamase-Test

1 ml Bakteriensuspension (optische Dichte $1 - 1,3$) wurde bei 13000 g zwei Minuten in der Tischzentrifuge (Minispin, $1,5 \text{ ml}$ Eppendorfreaktionsgefäße) abzentrifugiert. In die Überstände und die Niederschläge wurden je $100 \mu\text{l}$ Penicillin mit Phenolrot hinzugegeben und anschließend eine Stunde bei Raumtemperatur stehen gelassen.

Dann wurden $10 \mu\text{l}$ der Suspension mit $990 \mu\text{l}$ Wasser gemischt und im Photometer gemessen. $50 \mu\text{l}$ des Kulturüberstandes wurden auf $100 \mu\text{l}$ Penicillin mit Phenolrot gegeben, gemischt und im Photometer gemessen.

Inaktivierung der β -Lactamase

Es wurden zwei Experimente zur Inaktivierung der β -Lactamase durchgeführt. Zum einen wurde das Enzym durch Hitze inaktiviert, zum anderen mit dem β -Lactamaseinhibitor Clavulansäure.

Die Hitzeinaktivierung der β -Lactamase in *E. coli*-Zellen wurde wie folgt durchgeführt: 1 ml *E. coli*-Übernachtskultur wurde abzentrifugiert (2 min , 13000 g). Der Zelniederschlag in $100 \mu\text{l}$ destilliertem Wasser aufgenommen und bei Raumtemperatur (Kontrolle) bzw. bei Temperaturen von 50°C , 70°C , 80°C , 95°C für 20 min inkubiert. Anschließend wurden diese Suspensionen in Microwell-Platten pipetiert und mit $100 \mu\text{l}$ Phenolrotreagenz versetzt. Diese Ansätze wurden weitere 30 min bei 37°C inkubiert und dann fotografiert.

Hemmung durch Clavulansäure: In jeweils zwei Eppendorfgefäße wurden je 1 ml *E. coli* (DH5 α , pUC18) oder *Staphylococcus aureus* gegeben. Diese wurden bei 13000

g zwei Minuten abzentrifugiert und die Überstände verworfen. Auf die vier Zelnieder schläge wurden dann einmal 100 µl Amoxicillin und Phenolrotreagenz, sowie jeweils einmal 100 µl Amoxicillin, Clavulansäure (Merckle Ratiopharm) und Phenolrotreagenz gegeben. Von diesen vier Testansätzen wurden dann je 10 µl entnommen, mit je 990 µl Wasser gemischt und im Photometer bei 430 nm und 560 nm gemessen.

Phenolrotreagenz: 2 ml einer 0,5 %igen Phenolrotlösung werden mit 16,6 ml Wasser verdünnt. Dann werden 20 x 1000000 units Penicillin G zugegeben. Mit 1 M NaOH wird das Reagenz auf einen violetten Farbton (pH 8,5) eingestellt. Aliquots können eine Woche bei minus 20 °C eingefroren werden.

Antibiotikatest in Lebensmitteln

Es wurde je einmal 0,2 ml Milch mit Antibiotikum (5 µg/ml Ampicillin) und einmal 0,2 ml Milch ohne Antibiotikum in je ein Delvo-Teströhrchen (DSM, Düsseldorf) mit Nährboden gegeben. Der Nährboden enthält neben Wachstumssubstraten auch Zellen des thermophilen *Bacillus stearothermophilus*. Daher wird der Ansatz drei Stunden bei 56°C inkubiert. Nach dieser Inkubationszeit ist der Ansatz mit Milch und Antibiotikum (1 – 10 µg/ml) weiterhin blau gefärbt und die Milch ohne Antibiotika hat sich gelb gefärbt. Die Farbänderung des pH-Indikators Bromkresolpurpur wird durch Säurebildung des wachsenden *Bacillus stearothermophilus* verursacht.

3.4 Molekularbiologische Methoden

Plasmide wurden aus 1 ml *E. coli* DH5α-Übernachtskultur mit dem Qiagen-Plasmidkit (Hilden) isoliert (nugi-zentrum.de).

1 ml *E. coli*-Kultur wurde in ein Eppendorfgefäß gegeben und bei 5000 g fünf Minuten abzentrifugiert. Der Überschlag wurde weggeschüttet, auf den Niederschlag 250 µl des Puffers P1 gegeben und dieser somit resuspendiert. Anschließend wurde 250 µl des Puffer P2 hinzugegeben, die Substanz gemischt und anschließend für fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde 350 µl des Puffers N3 hinzugegeben, wieder gemischt und für zehn Minuten bei voller Leistung abzentrifugiert. Im Überstand sollte nun das Plasmid enthalten sein, weshalb dieser auf eine QIAprep-Säule gegeben wurde, welche in einem 2 ml Zentrifugenröhrchen steckte. Die QIAprep-Säule wurde dann für 60 Sekunden abzentrifugiert, der Durchlauf ver-

worfen und die QIAprep-Säule wurde mit 0,5 ml des Puffers PB ausgewaschen. Danach wurde diese wieder für 60 Sekunden abzentrifugiert, der Durchlauf verworfen und auf die Säule wurde 0,75 ml des Puffers PE aufgetragen. Diese wurde wieder abzentrifugiert und der entstandene Durchlauf verworfen. Um den Puffer PE vollständig zu entfernen, wurde die Säule noch einmal eine Minute lang abzentrifugiert. Anschließend wurde die QIAprep-Säule auf ein frisches 1 ml Eppendorfgefäß gebracht und 50 µl Wasser dazupipetiert. Danach wurde eine Minute gewartet und dann noch einmal eine Minute lang abzentrifugiert.

Das isolierte Plasmid wurde auf einem 0,8 %igen Agarosegel analysiert. Dazu wurde 10 µl des Durchlaufs mit 2 µl Loading Dye auf einem Parafilm gemischt und diese Lösung in die Taschen des Agarosegels pipetiert. Das Agarosegel wurde dann für 40 Minuten eine Spannung von 120 V angelegt. Das Agarosegel wurde anschließend für zehn Minuten in Ethidiumbromid (1 µg/100 ml TE-Puffer) gefärbt und anschließend auf dem UV-Transilluminator (312 nm) fotografiert.

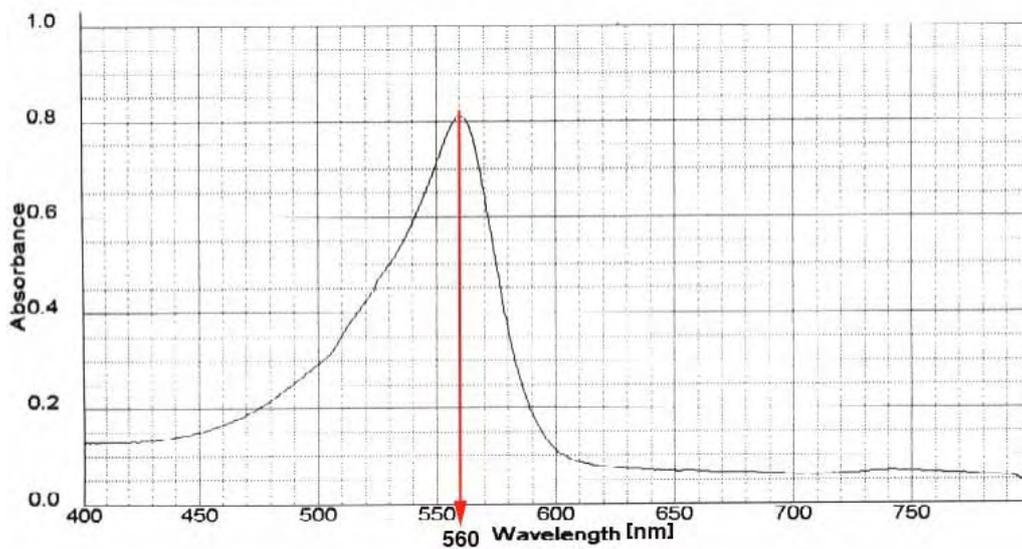
Transformation des Plasmids in *E. coli* DH5α mit der Calciumchlorid-Methode

Durch die Auswertung der Agarosegelelektrophorese der Plasmidisolierung konnte abgeschätzt werden, dass die erhaltene Plasmidlösung etwa 1:640 verdünnt werden musste, um ein 1 µg Plasmid pro 10 µl Lösung zu erhalten. In ein Eppendorfgefäß wurde dann 1 µl Plasmid-DNA mit 639 µl Wasser pipetiert. Dieses wurde dann bei 9000 g 60 Sekunden lang abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und auf den Zelleniederschlag wurde dann 200 µl Glycerin pipetiert. Dieser Vorgang wurde zweimal wiederholt. Anschließend wurden 100 µl Bakteriensuspension (kompetent nach der Calciumchlorid-Methode) und 1 µl Plasmid-DNA in die Küvetten pipetiert. Die Küvetten wurden dann einem Hitzeschock (5 min, 42°C) ausgesetzt. Damit die Bakterien nicht absterben, wurde schnell 1000 µl Medium hinzugegeben. Diese Lösung wurde dann in ein Eppendorfgefäß gefüllt und für eine Stunde auf den Schüttler gestellt. Danach wurde die Lösung für 60 Sekunden bei 9000 g abzentrifugiert. Der Niederschlag wurde dann auf Ampicillin-haltigen LB-Agarplatten (50 µg/ml) ausgestrichen und über Nacht im Brutschrank bei 37°C inkubiert.

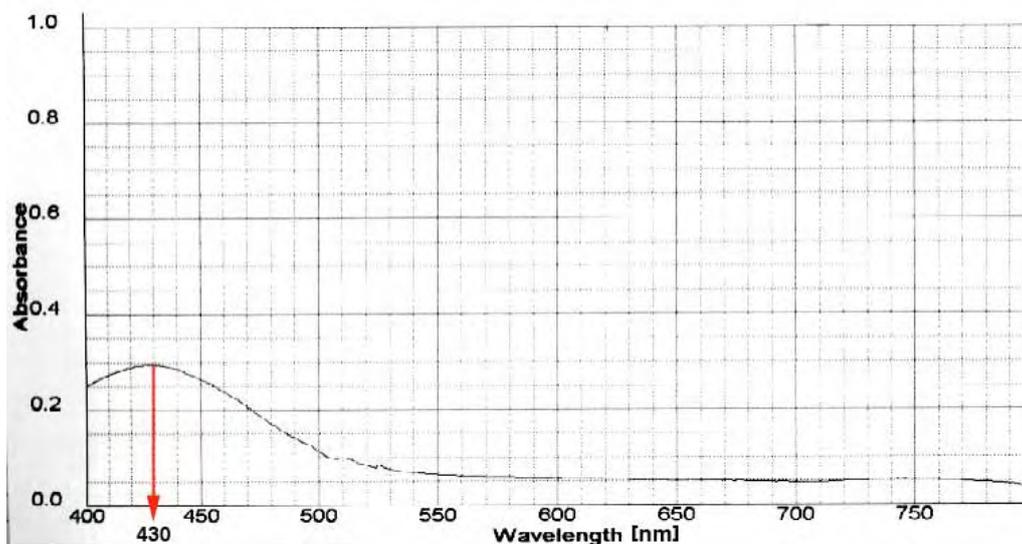
4. Ergebnisse

4.1 Erstellen eines β -Lactamase-Testsystems

Die Spaltung von β -Lactamen durch β -Lactamasen führt zu einer Säurebildung. Diese Säurebildung wird photometrisch durch Farbänderung an einem pH-Indikator gemessen. Als pH-Indikator haben wir Phenolrot verwendet. Die Spektren des Phenolrotindikators im alkalischen und sauren pH-Bereich sind in Abbildung 5 dargestellt.



(A)



(B)

Abbildung 5: Absorption des Phenolrotindikators im basischen (A) und im sauren (B) pH-Bereich.

Diese gemessenen Änderungen im Spektralphotometer sind auch an der Farbe der Lösung in der Küvette zu erkennen (Abb. 6).

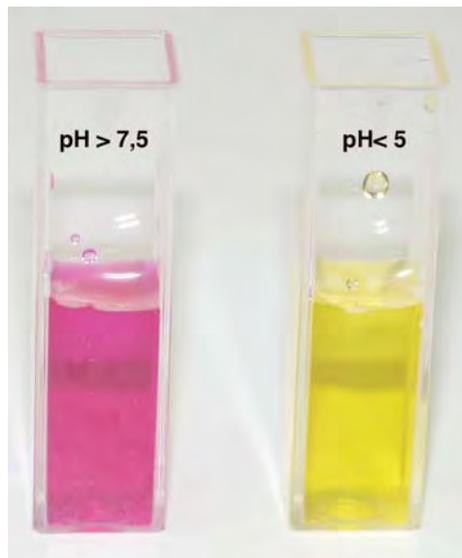


Abbildung 6: Farbe des pH-Indikators Phenolrot bei unterschiedlichen pH-Werten.

Dieser Farbwechsel des pH-Indikators Phenolrot kann in einer Titrationskurve bei 430 nm und 560 nm im Photometer gemessen werden (Abb. 7).

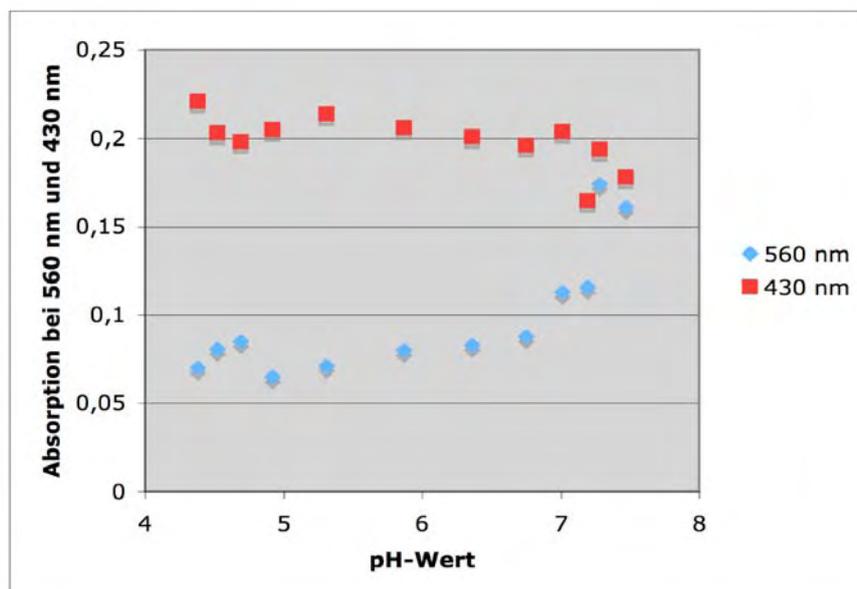


Abbildung 7: Titrationskurve des alkalischen pH-Indikators Phenolrot im Tris/HCl-Puffer pH 7,5 mit 5%iger Essigsäure und Messen der Absorption bei 430 nm und 560 nm im Photometer.

Wie die Abbildungen 5, 6 und 7 zeigen, kann eine neutrale Phenolrotlösung durch Säurebildung einen Farbumschlag erfahren. Im biologischen System wird diese Säurebildung durch die β -Lactamase hervorgerufen (siehe Abb. 13).

4.2 Messung der β -Lactamase bei verschiedenen Mikroorganismen

Der in Kapitel 3.3 beschriebene Phenolrottest wurde zur Testung von β -Lactamasen bei verschiedenen Bakterien eingesetzt. Das Gram-negative Bakterium *E. coli* und die Gram-positiven Bakterien *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, *Streptococcus agalactiae* und *Staphylococcus aureus* wurden auf β -Lactamasen untersucht.

Dabei wurde gefunden, dass *E. coli* nicht auf einer ampicillinhaltigen Agarplatte wachsen kann (siehe Abb. 8 (A)). Wenn *E. coli* das Plasmid pUC18 enthält, dann kann es jedoch wachsen (siehe Abb. 8 (B)).

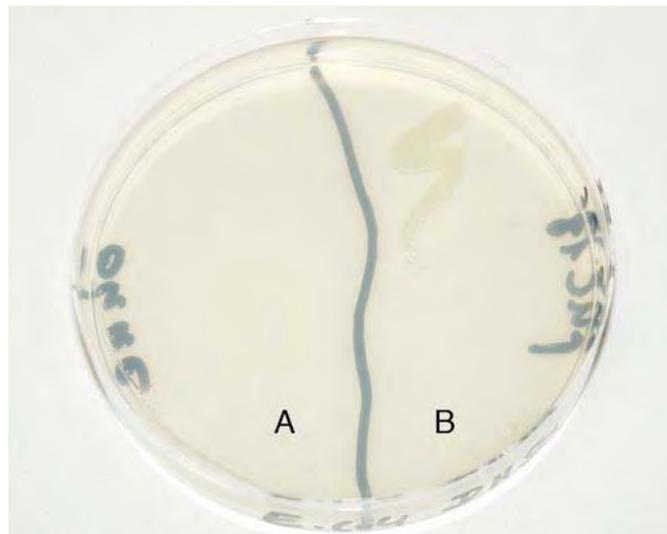


Abbildung 8: Ausstrich von *E. coli* DH5 α ohne Plasmid pUC18 (A) und mit Plasmid pUC18 (B) auf LB-Agarplatten, die das β -Lactamantibiotikum Ampicillin enthalten.

Beide *E. coli*-Kulturen wurden auf Plasmide untersucht. Das Ergebnis ist in Abbildung 9 gezeigt. Aus diesen Befunden ist zu schließen, dass die Ampicillinresistenz mit dem Plasmid pUC18 verknüpft sein muss.

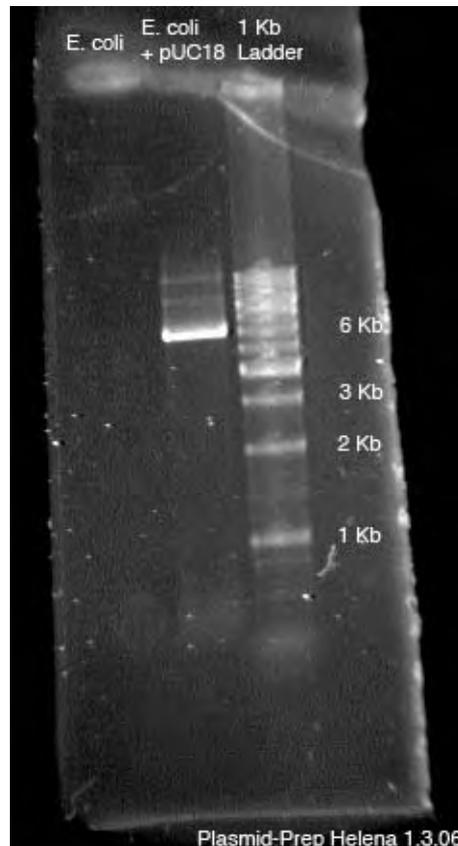


Abbildung 9: Analyse von *E. coli*-Stämmen auf Plasmide durch Agarosegelelektrophorese. Linke Spur: *E. coli*-Stamm, mittlere Spur: *E. coli*-Stamm mit Plasmid pUC18, rechte Spur: Längenstandard. Zahlen: DNA-Länge in Kilobasenpaaren.

Wenn das Plasmid pUC18 tatsächlich der Träger der Ampicillinresistenz ist, so müsste bei seiner Transformation in einen plasmidfreien *E. coli*-Stamm diese Eigenschaft mit übertragen werden.

Die Transformation des Plasmides in *E. coli* scheint aber leider nicht geglückt zu sein, da auf den ampicillinhaltigen LB-Agarplatten keine Bakterien gewachsen waren. Dies kann daran gelegen haben, dass die Bakterien bei dem Hitzeschock abgetötet wurden. Daher konnte bei dieser Kultur auch kein weiterer Kontrollversuch gemacht werden, ob nun das Plasmid mit dem *bla*-Gen in den Bakterien transformiert wurde.

Von den Gram-positiven Bakterien konnte nur der *Staphylococcus aureus* auf einer ampicillinhaltigen Agarplatte wachsen (siehe Abb. 10). Andere Bakterien, wie *Streptococcus agalactiae* (siehe Abb. 11), *Bacillus subtilis* und *Bacillus licheniformis* konnten nicht auf einer ampicillinhaltigen Agarplatte wachsen.



Abbildung 10: Wachstum von *Staphylococcus aureus* auf einer LB-Agarplatte, die das β -Lactamantibiotikum Ampicillin enthält.



Abbildung 11: Ausstrich von *Streptococcus agalactiae* auf einer LB-Agarplatte, die das β -Lactamantibiotikum Ampicillin enthält. Es ist kein Wachstum nachweisbar.

4.3 Lokalisation und Eigenschaften der β -Lactamase

Die verschiedenen Gram-positiven und Gram-negativen Testorganismen wurden auf die Lokalisation und den Eigenschaften ihrer β -Lactamasen untersucht. Aus Kulturen wurden der Überstand und die Zellen analysiert. Das Ergebnis ist in Abbildung 12 dargestellt.

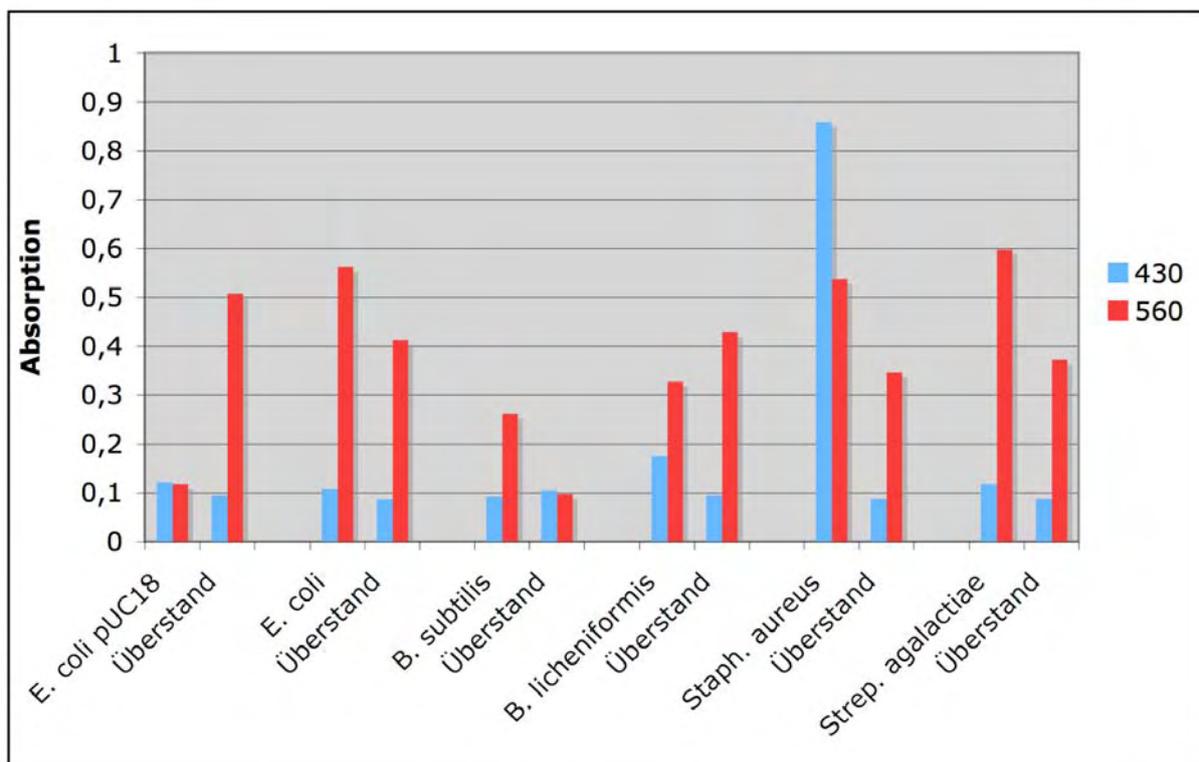


Abbildung 12: Messung der β -Lactamase-Aktivität mit dem Phenolrotreagenz in Zellen verschiedener Bakterien und in deren Kulturüberstand. Hohe blaue Balken (Absorptionsmessung bei 430 nm) stehen für eine hohe β -Lactamase-Aktivität. Hohe rote Balken (Absorptionsmessung bei 560 nm) stehen für keine Ansäuerung des pH-Indikators und damit für keine β -Lactamase-Aktivität.

Diese Abbildung zeigt, dass in den Kulturüberständen in der Regel eine sehr geringe β -Lactamase-Aktivität nachzuweisen ist. Die β -Lactamase kommt in den Nieder-

schlägen vor, also ist sie ein zellgebundenes Protein. Insbesondere *Staphylococcus aureus* hat ein sehr aktives β -Lactamase-Enzym.

Um zu beweisen, dass es sich bei der β -Lactamase-Aktivität um ein Enzym handelt, wurde ein weiterer Test durchgeführt. Proteine und damit auch das Enzym β -Lactamase sind temperaturempfindliche Moleküle. Wenn die Zelniederschläge erhöhten Temperaturen ausgesetzt werden, dann sollte die Enzymaktivität irreversibel gehemmt werden.

Ein solcher Versuch wurde mit *E. coli*-Zellen durchgeführt. Das Ergebnis ist in der nachfolgenden Abbildung gezeigt. Dazu wurden die Zellen 30 Minuten bei 50°C, 70°C, 80°C, 95°C und zur Kontrolle bei Raumtemperatur inkubiert und dann in den Phenolrotttest eingesetzt.

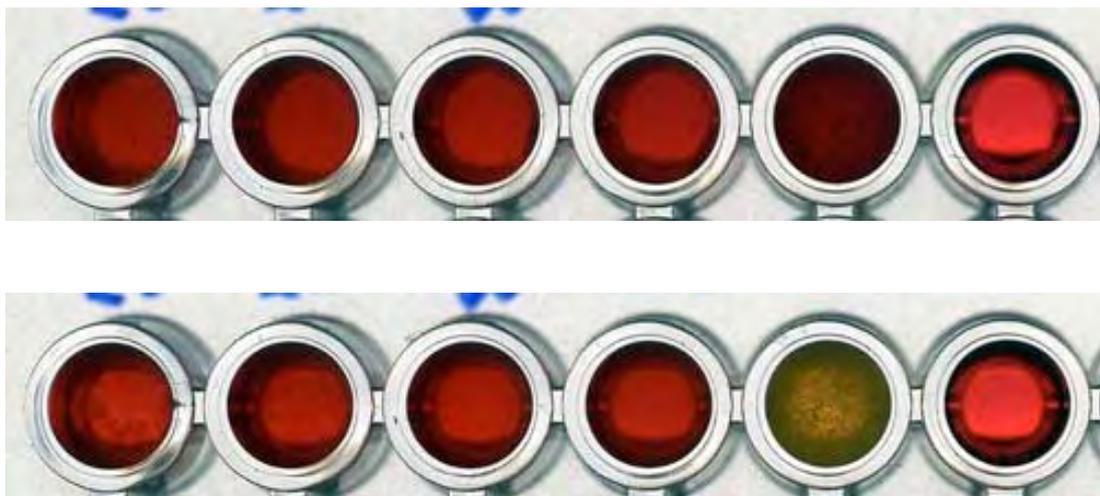


Abbildung 13: β -Lactamase-Aktivität im Phenolrotttest in Abhängigkeit von der Temperatur. Die Ansätze wurden mit 100 μ l *E. coli*-Suspension beimpft und dann 50 Minuten bei 37°C inkubiert. Die Kulturen waren wie folgt vorbehandelt: von links nach rechts 50°C, 70°C, 80°C, 95°C, Raumtemperatur. Ganz rechts Kontrollansatz mit Wasser anstelle einer *E. coli*-Suspension. Obere Reihe vor der Inkubation, untere Reihe nach 50-minütiger Inkubation bei 37°C.

Dieser Test beweist, dass die β -Lactamase ein Enzym ist, das bereits bei 50°C irreversibel inaktiviert wird. Die Zellsuspension, die zur Kontrolle bei Raumtemperatur

inkubiert worden war (untere Reihe 2. von rechts), zeigt den Farbumschlag nach gelb.

4.4 Hemmung der β -Lactamasen

β -Lactamasen werden bei pharmazeutischen Anwendungen durch Inhibitoren gehemmt (Daschner und Frank, 2005). Dies wurde mit der pharmazeutisch eingesetzten Clavulansäure getestet. Clavulansäure ist eine Lactam-analoge Verbindung (siehe Abb. 3B), die sehr viel fester an β -Lactamasen bindet als ein β -Lactamantibiotikum. Lactam-analoge Verbindungen haben zwar den β -Lactamring, besitzen aber andere chemische Gruppen als β -Lactamantibiotika.

Dieser Versuch wurde mit Amoxicillin, einem penicillinähnlichem β -Lactamantibiotikum, und Clavulansäure durchgeführt. Die Kombination ist in Tablettenform im Handel erhältlich. Das Ergebnis dieser Versuche ist in den nachfolgenden Tabellen dargestellt.

Tabelle 1: Hemmung der β -Lactamase bei *E. coli*-Zellen durch Clavulansäure.

		Absorption	Absorption
Inkubation	Ansatz	430 nm	560 nm
t_0	Amoxicillin	0,672	0,65
t_0	Amoxicillin und Clavulansäure	0,581	0,621
$t_{60\text{min}}$	Amoxicillin	0,753	0,541
$t_{60\text{min}}$	Amoxicillin und Clavulansäure	0,479	0,556

Tabelle 2: Hemmung der β -Lactamase bei *Staphylococcus aureus* durch Clavulansäure.

		Absorption	Absorption
Inkubation	Ansatz	430 nm	560 nm
t_0	Amoxicillin	1,078	0,926
t_0	Amoxicillin und Clavulansäure	1,136	0,991
$t_{60\text{min}}$	Amoxicillin	1,169	0,868

t _{60min}	Amoxicillin und Clavulansäure	1,075	0,932
--------------------	-------------------------------	-------	-------

Die Messergebnisse mit *E. coli* und *Staphylococcus aureus* belegen, dass Clavulansäure die Säurebildung aus Amoxicillin und damit die β -Lactamase-Aktivität reduziert.

4.5 Nachweis von Antibiotika in Milch

Da Antibiotika nicht nur bei Menschen, sondern auch bei Tieren eingesetzt werden, kann es sein, dass Milch von einer Antibiotika-behandelten Kuh mit Antibiotika belastet ist. In der Milchindustrie werden daher Antibiotikatests mit Milchproben durchgeführt, um eine Wachstumshemmung der Starterkulturen für die Joghurt- und Käseherstellung zu vermeiden. Einen solchen Test, den so genannten Delvo-Test, haben wir an zwei Proben durchgeführt. Eine Probe enthielt Antibiotika-freie Milch, die andere wurde mit 5 μ g Ampicillin pro Milliliter Milch versetzt.

Das Ergebnis dieser dreistündigen Inkubation bei 56°C ist in der nachfolgenden Abbildung dargestellt:



Abbildung 14: Nachweis von Antibiotika in Milchproben. Links Milch mit 5 µg/ml Ampicillin. Rechts Antibiotika-freie Milch.

Der Test liefert einen eindeutigen Befund. In der Antibiotika-haltigen Milchprobe konnte der Testorganismus nicht wachsen; daher fand in dieser Probe auch kein Farbumschlag des pH-Indikators Bromkresolpurpur statt. Im Fall der Antibiotika-freien Milch wächst der Testorganismus und bildet Säure. Daher schlägt der pH-Indikator Bromkresolpurpur von violett nach gelb um.

5. Diskussion

Test: Der in dieser Arbeit vorgestellte Test auf β -Lactamase beruht auf dem Nachweis der Säurebildung durch dieses Enzym. Ein solcher Nachweis ist nicht hochspezifisch, da er durch andere Säuren, wie z.B. EDTA, Ethylendiamin-Tetra-Essigsäure, gestört werden kann. Daher konnten wir keine Hemmung der β -Lactamasen durch EDTA messen. EDTA ist ein Komplexbildner, der die zweiwertigen Metallionen (Brenda-Datenbank) im Enzym binden und damit die Enzymaktivität hemmen würde.

Aktivität: Auch unsere Versuche sprechen dafür, dass die gemessene Aktivität durch Enzyme, nämlich durch β -Lactamasen, ausgelöst wurde. Von diesen Enzymen ist bekannt, dass sie z.B. durch Temperaturen zwischen 40 °C und 50 °C irreversibel denaturiert werden (Brenda-Datenbank). Tatsächlich wurde auch die β -Lactamase aus *E. coli* bereits durch 50 °C denaturiert.

Ein weiterer Hinweis auf ein Enzym ist die Hemmung durch Clavulansäure. Allerdings war die Hemmung in unserem Testansatz nicht besonders deutlich, da in dem zur Verfügung stehenden Handelspräparat die Konzentration des β -Lactams (Amoxicillin) sehr hoch im Vergleich zum Hemmstoff war. Dadurch kommt es am aktiven Zentrum des Enzyms zu einer Konkurrenz von Lactamantibiotikum und Lactam-Inhibitor (kompetitive Hemmung).

Auch unsere molekularbiologischen Versuche sprechen für eine Enzymaktivität, da nur *E. coli*-Zellen, die das Plasmid pUC18 enthalten, β -Lactamase positiv waren. Wie auf der Genkarte des Plasmides zu sehen ist, enthält dieses Plasmid nur drei Gene, von denen eines das *bla*-Gen ist (siehe Abb. 15). Dieses Gen codiert bekanntermaßen für die Ampicillinresistenz, die es den *E. coli*-Zellen ermöglicht in Gegenwart von Penicillinantibiotika zu wachsen.

Auch das Bakterium *Staphylococcus aureus* muss ein *bla*-Gen besitzen, da wir in ihm eine sehr hohe β -Lactamase-Aktivität messen konnten und das Bakterium auf einem Ampicillin-haltigen Nährboden wachsen konnte. In diesem Gram-positiven Organismus haben wir nicht geprüft, ob er ein Plasmid besitzt, welches das *bla*-Gen enthält.

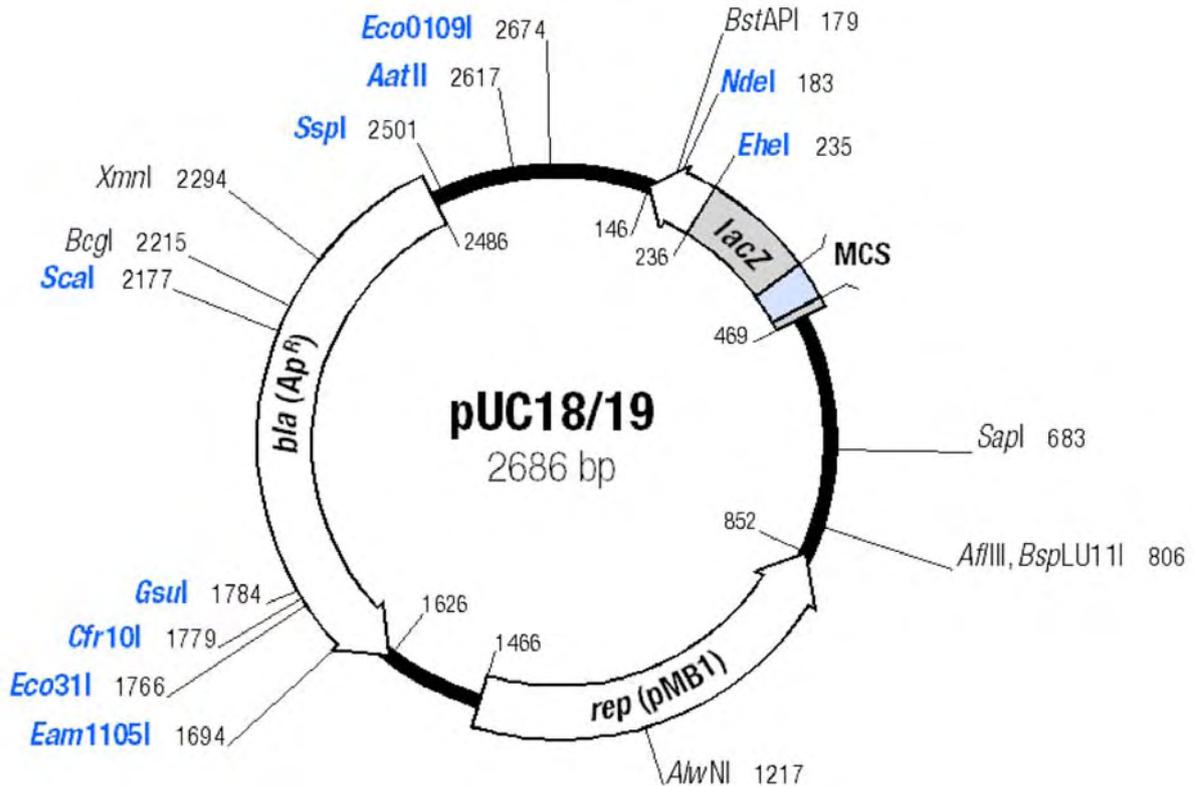


Abbildung 15: Genkarte des Plasmids pUC18.

Lokalisation: Das Enzym kam bei Gram-negativen und bei Gram-positiven Bakterien vor. Beide Bakterienarten unterscheiden sich durch ihren Zellwandaufbau (siehe Abb. 16), jedoch war die β -Lactamase-Aktivität in beiden Fällen an die Zellen gebunden.

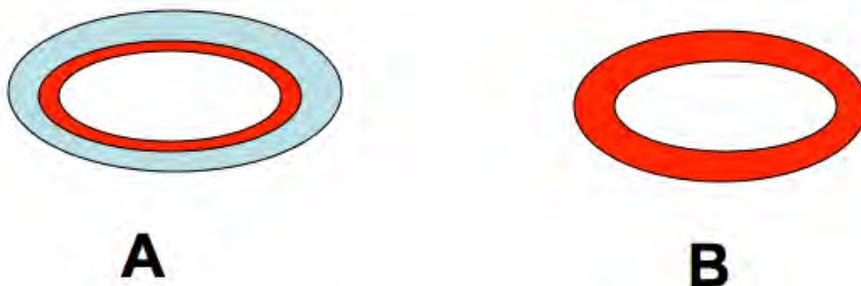


Abbildung 16: Schematischer Zellwandaufbau Gram-negativer (A) und Gram-positiver (B) Bakterienzellen. Die Zellwand ist rot, das Periplasma ist blau dargestellt.

Bei Gram-negativen Zellen könnte die Enzym-Aktivität der β -Lactamase im Periplasma vorkommen. Da es einen solchen Raum bei Gram-positiven Bakterien nicht gibt, muss die β -Lactamase dort direkt an der Zelloberfläche gebunden sein.

Bei vielen Bakterien gibt es bei der Zellwandbiosynthese Enzyme, die in der Vergangenheit als Penicillin-bindende Proteine identifiziert wurden und tatsächlich an der Zelloberfläche lokalisiert sind. Dies erscheint sinnvoll, da die Zellwand eine Oberflächenstruktur der Bakterien darstellt. Heute ist bekannt, dass diese Penicillin-bindenden Enzyme als β -Lactamasen zu bezeichnen sind. Daher werden beide Enzyme auch unter einer gemeinsamen Registrierungsnummer in den Datenbanken, z.B. Brenda, geführt: EC 3.5.2.6.

Die verschiedenen getesteten Gram-positiven und Gram-negativen Organismen enthalten unterschiedliche β -Lactamasen. So konnten wir mit unserem Test nicht eindeutig dieses Enzym in *Bacillus subtilis* und in *Bacillus licheniformis* nachweisen, obwohl auch diese Mikroorganismen die β -Lactamase enthalten sollten (Brenda-Datenbank). Dafür können zwei Gründe von Bedeutung sein:

1. Die Enzym-Aktivität ist vorhanden, aber sehr gering.
2. Die Enzym-Aktivität muss erst durch β -Lactamantibiotika induziert werden.

Durch unsere Testergebnisse können wir nicht zwischen diesen beiden Möglichkeiten entscheiden, da wir z.B. die Nachweisempfindlichkeit unseres Testes nicht geprüft haben. Außerdem wurden unsere Testkulturen nicht mit subletalen Dosen an β -Lactamantibiotika gezüchtet, so dass eine mögliche Induktion nicht eingeleitet werden konnte.

Antibiotika-Testkit: Dieser kommerzielle Test wird in vielen Betrieben der Lebensmittelindustrie eingesetzt. Er hat viele Vorteile, die für den praktischen Einsatz von Bedeutung sind:

1. Er ist preiswert, so dass große Testreihen mit ihm durchgeführt werden können.
2. Er ist sehr empfindlich, so dass mit ihm noch Spuren von Antibiotika in Lebensmitteln wie der Milch nachgewiesen werden können. Die hohe Empfindlichkeit beruht auf dem Testorganismus *Bacillus stearothermophilus*.

3. Es wird in der täglichen Proteinanalytik ein thermophiler Testansatz verwendet, weil bei diesem Temperaturbereich Störungen durch mesophile Kontaminationen ausgeschlossen sind.

Mit diesem Test kann also die Verbreitung der Antibiotika in unserer Umwelt gemessen und damit auch ein möglicher Bereich für Antibiotikaresistenzen bestimmt werden.

Ausblick: Durch die große Menge der Antibiotika, die bei der Behandlung von Krankheiten eingesetzt werden und somit in die Umwelt gelangen, werden die Resistenzbildungen gefördert. Bekanntlich werden in der Humanmedizin 20 – 50 % der Antibiotika unnötig eingesetzt (siehe <http://www.hygiene.uni-luebeck.de/Lehre/Wichtige%20Antibiotika%20und%20Antimykotika.pdf>, S. 43). Demzufolge ist der Mensch durch den hohen Verbrauch der Antibiotika mit verantwortlich für die Ausbreitung der Resistenzen. Daher sollte verantwortungsbewusster mit dem Verbrauch und Einsatz der Antibiotika umgegangen werden und nicht bei jeder Krankheit, die keine unbedingte Antibiotikabehandlung erfordert, diese Wirkstoffe eingesetzt werden. Da viele Patienten das zumeist nicht selbst entscheiden können, sind hier insbesondere die Ärzte in der Pflicht.

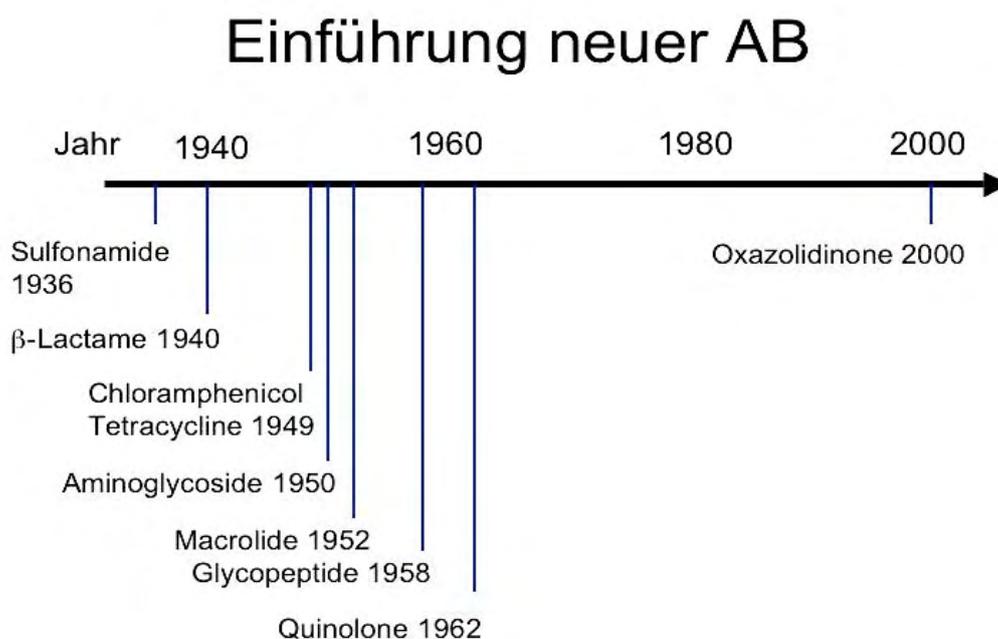


Abbildung 17: Jahre der ersten Einführung neuer Antibiotika.

Durch die Abbildung 17 wird noch einmal deutlich gemacht, dass die Entwicklung neuer Antibiotika nicht beliebig schnell erfolgt und wir damit nicht unbegrenzt viele Antibiotika zur Verfügung haben. Die Resistenzentwicklung ist vermutlich schneller als die Neuentwicklung dieser Wirkstoffe. Es ist daher wirklich wichtig, etwas gegen die Ausbreitung der Resistenzen zu unternehmen. Wir schlagen deshalb vor, dass man den Einsatz von Antibiotika möglichst reduzieren und durch Auflagen stärker kontrollieren sollte.

6. Literatur

Daschner, F.; Frank U. (2005) Antibiotika in der Praxis. 6. Auflage. Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York

Glick, B. R.; Pasternak, J. J. (1995) Molekulare Biotechnologie. Spektrum-Verlag Heidelberg Berlin Oxford

Hof, H.; Dörries, R. (2005) Medizinische Mikrobiologie. 3. Auflage. Thieme-Verlag Stuttgart

Kayser, F. H.; K. A. Bienz; J. Eckert; R. M. Zinkernagel (2001) Medizinische Mikrobiologie. 10. Auflage. Thieme-Verlag Stuttgart

Müller-Esterl, W. (2004) Biochemie. Eine Einführung für Mediziner und Naturwissenschaftler. 1. Auflage .Spektrum-Verlag München

Renneberg, R. (2006) Biotechnologie für Einsteiger. 1. Auflage. Spektrum-Verlag München

Schmid, R. D. (2002) Taschenatlas der Biotechnologie und Gentechnik. Wiley-VCH-Verlag Weinheim

Internetquellen

Titelbild:

<http://www.ebi.ac.uk/msd-srv/msdlite/images/1fcm600.jpg>

Abbildung 2:

http://www.hpa.org.uk/hpa/publications/amr_report_05/images/fig2.gif

Abbildung 3 (A):

<http://www.chemheritage.org/EducationalServices/pharm/antibiot/readings/flocha/flocha03.gif>

Abbildung 3 (B):

<http://www.infektionsnetz.at/test/bilder/strukturformeln/antibiotika/clavulansaeure.gif>

Abbildung 4:

http://ac16.uni-paderborn.de/lehrrveranstaltungen/_aac/prakt/grafik/indi_10.gif

Abbildung 15:

http://dwb.unl.edu/Teacher/NSF/C08/C08Links/www.fermentas.com/TechInfo/NucleicAcids/img/npuc18_19.gif

Einsatz von Antibiotika:

<http://www.hygiene.uni-luebeck.de/Lehre/Wichtige%20Antibiotika%20und%20Antimykotika.pdf>, S. 43

Brenda-Datenbank:

<http://www.brenda.uni-koeln.de>

Nugi:

<http://www.nugi-zentrum.de/experimente/oekologie>

Wir versichern, dass wir die Arbeit selbstständig angefertigt haben und alle benutzten Quellen angegeben haben. Soweit wir Internet-Quellen benutzt haben, haben wir vollständige Ausdrücke beigelegt.

Ulm, den 11.06.06