

Die Initiierung der AmpC-Lactamase-Induktion in *Enterobacter cloacae*

Dieter Pfeifle, Eva Janas, Irith Wiegand und Bernd Wiedemann, Bonn

PBP und lytische Transglykosylasen sind an der Regulation der Beta-Lactamase-Expression beteiligt. Diese Enzyme regulieren den Spiegel an löslichen Anhydromuramylpeptiden im periplasmatischen Raum. Wir haben Induktionsstudien mit *E.-coli*-Mutanten durchgeführt, bei denen ein-vier *D,D*-Carboxypeptidasen deletiert sind. In Mutanten, denen drei oder vier *D,D*-Carboxypeptidasen fehlen, war die basale Beta-Lactamase-Aktivität deutlich erhöht. Die gleichzeitige Hemmung der essentiellen PBP 1a, 1b durch Cefsulodin oder PBP 2 durch Mecillinam führte zu einer starken Beta-Lactamase-Induktion. Daraus folgern wir, dass star-

ke Beta-Lactamase-Induktoren alle *D,D*-Carboxypeptidasen und die essentiellen PBP 1a, 1b und/oder PBP 2 hemmen. Die Hemmung der lytischen Transglykosylase Slt 70 kann die Beta-Lactamase-Induktion jedoch unterdrücken.

Schlüsselwörter: Beta-Lactamase-Induktion, Penicillin-Bindeproteine, lytische Transglykosylase, Slt 70, *Enterobacter cloacae*

PBP and lytic transglycosylases are involved in the regulation of the beta-lactamase expression by determining the level of anhydromuramylpeptides in the periplasmic space.

*We have performed induction studies on *E. coli* mutants lacking one to four PBP with *D,D*-carboxypeptidase activity. In mutants lacking three or four *D,D*-carboxypeptidasen the basal beta-lactamase activity was obviously increased. The concomitant inhibition of the essential PBP 1a, 1b by cefsulodin or PBP 2 by mecillinam results in strong beta-lactamase induction. Therefore we conclude that a strong beta-lactamase inducer has to inhibit all *D,D*-carboxypeptidasen as well as the essential PBP 1a, 1b and/or PBP2. However, inhibition of the lytic transglycosylase Slt 70 can limit the beta-lactamase induction.*

Keywords: Beta-lactamase induction, penicillin-binding proteins, lytic transglycosylases, Slt 70, *Enterobacter cloacae*.

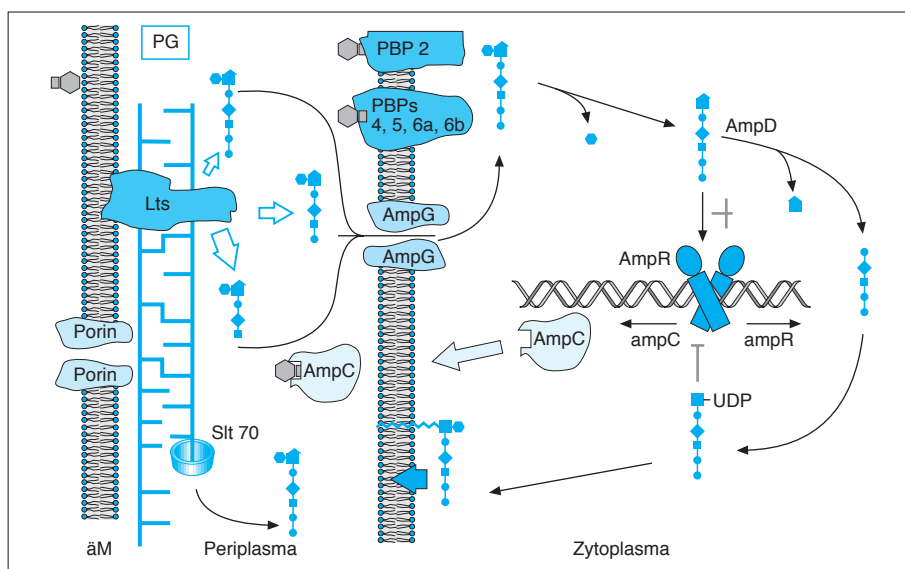


Abb. 1. Modell für die Induktion der AmpC-Beta-Lactamase.

Die Induktion der Beta-Lactamase in Enterobacteriaceen wird durch das von unserer Arbeitsgruppe vorgeschlagene Modell beschrieben: Beta-Lactam-Antibiotika gelangen durch die Porine in den periplasmatischen Raum. Dort binden sie an die Penicillinbindeproteine (PBP) und inaktivieren sie. Starke Induktoren wie Cefoxitin und Imipenem binden an die *D,D*-Carboxypeptidasen (PBP 4, 5, 6a und 6b) und PBP 1 und PBP 2. Die PBP können ihre Funktion nicht mehr erfüllen. Dadurch wird das empfindliche Gleichgewicht zwischen Aufbau und Abbau des Peptidoglykans gestört. Die Slt 70 kann vermehrt Anhydromuramylpeptide freisetzen. Diese diffundieren durch die Permease AmpG in das Zytoplasma, wo sie durch AmpD gespalten werden und für Recyclingprozesse der Zellwand wieder verwendet werden. Alternativ können die Anhydromuramylpeptide mit AmpR in Wechselwirkung treten und so den reprimierten Transkriptionsfaktor in einen Aktivator der Beta-Lactamase-Expression umwandeln.

Bei Resistenz gegenüber Beta-Lactam-Antibiotika bei gramnegativen Bakterien haben Beta-Lactamasen die größte Bedeutung. Diese sind plasmid- oder chromosomalkodiert. Das Problem der chromosomalkodierten Beta-Lactamasen wurde lange Zeit unterschätzt. Sie besitzen ein breiteres Spektrum gegenüber Beta-Lactam-Antibiotika als plasmidkodierte Beta-Lactamasen. Außerdem treten die früher nur chromosomalkodierten Beta-Lactamasen inzwischen auch plasmidkodierte auf.

Die chromosomalkodierten AmpC-Beta-Lactamasen sind durch Beta-Lactam-Antibiotika induzierbar. Diese unterscheiden sich deutlich in ihrer Induktionsfähigkeit. Die Induktorkapazität ist von der Affinität der Beta-Lactame zu den Penicillinbindeproteinen (PBP) abhängig. PBP sind Enzyme, die am Metabolismus der Bakterienzellwand beteiligt sind. Die PBP fungieren als Transpeptidasen, Transglykosylasen, *D,D*-Carboxy-

Für die Verfasser:

Dieter Pfeifle, Institut für Medizinische Mikrobiologie für Pharmazeuten, Meckenheimer Allee 168, 53115 Bonn

Tab. 1. MHK in µg/ml bei *E.-coli*-Stämmen mit Deletionen in den D,D-Carboxypeptidasen. Alle Stämme tragen das Plasmid pBP131, welches die Gene *ampC* und *ampR* von *E. cloacae* besitzt.

Antibiotikum	MC4100 -	JBS100 Δ5, Δ6a	UGM599 Δ5	UGM600 Δ6b	UGM 601 Δ5, Δ6b	UGM602 Δ5, Δ6a, Δ6b	UGM603 Δ4,Δ5,Δ6a, Δ6b	D456 Δ4,Δ5,Δ6
Amoxicillin	4	4	4	4	4	16	64	16
Cefaclor	2	2	2	4	2	16	64	16
Cefazolin	2	1	0,5	4	0,5	4	256	64
Cefuroxim	1	1	0,5	2	0,5	4	16	8
Cefotaxim	0,0625	< 0,0312	< 0,0625	0,125	< 0,0312	0,5	0,5	0,25

Tab. 2. Einfluss von Beta-Lactam-Antibiotika auf die Beta-Lactamase-Induktion in *E.-coli*-Mutanten mit D,D-Carboxypeptidase-deletionen. Alle Stämme tragen das Plasmid pBP131, welches die Gene *ampC* und *ampR* von *E. cloacae* besitzt.

Antibiotikum	MC4100 -	JBS100 Δ5, Δ6a	UGM599 Δ5	UGM602 Δ6b	UGM 601 Δ5, Δ6b	UGM602 Δ5, Δ6a, Δ6b	UGM603 Δ4,Δ5,Δ6a, Δ6b	D456 Δ4,Δ5,Δ6
Ohne	0,45 ^{[0,18]c}	0,67 ^{[0,22]c}	0,4 ^{[0,06]c}	0,48	0,36 ^{[0,06]c}	1,65 ^{[0,25]c}	5,40 ^{[1,5]c}	0,96 ^{[0,43]c}
Cefsulodin	0,43 ^{[0,17]c}	0,61 ^{[0,24]c}	0,22	0,60	0,34	2,66 ^{[0,25]c}	9,10 ^{[1,5]c}	1,37 ^{[0,05]c}
Mecillinam	0,44 ^{[0,08]c}	0,66 ^{[0,21]c}	0,21	0,44	0,28	1,68 ^{[1]c}	14,00 ^{[5,5]c}	2,20 ^{[0,34]c}
Mec./Cef.	0,49 ^{[0,21]c}	0,06 ^{[0,2]c}	0,57	1,23 ^{[0,55]c}	0,48 ^{[0,12]c}	1,76 ^{[0,5]c}	18,86 ^{[7,3]c}	10,75
Aztreonam	0,15 ^{[0,09]c}	0,42 ^{[0,27]c}	0,21	0,35	0,20	1,00 ^{[0,77]c}	5,50 ^{[2,0]c}	0,24 ^{[0,18]c}

^c = Standardabweichung

peptidasen und Endopeptidasen. Sie sorgen dafür, dass neue Peptidoglykanmonomere, die im Zytoplasma gebildet werden, in das wachsende Peptidoglykan eingebaut werden. Durch die Beta-Lactam-Antibiotika werden die PBP gehemmt und können ihre Funktion nicht mehr erfüllen. Dadurch wird das empfindliche Gleichgewicht zwischen Aufbau und Abbau des Peptidoglykans gestört. Durch so genannte lytische Transglykosylasen werden kleine Fragmente – Anhydromuropeptide – aus dem Peptidoglykan freigesetzt. Diese Fragmente bestehen aus einem chemisch modifizierten Disaccharid und einem Peptidrest. Dieser Peptidrest kann aus drei, vier oder fünf Aminosäuren bestehen. Diese Muropeptide wirken als Signalmoleküle für die Beta-Lactamase-Expression. Unsere Arbeitsgruppe konnte zeigen, daß diese Signalmoleküle unter dem Einfluss verschiedener Beta-Lactam-Antibiotika in verschiedenen Mengen freigesetzt werden. Je stärker die Beta-Lactamase-Induktion, umso mehr Anhydromuramylpentapeptid wird freigesetzt.

peptidasen und Endopeptidasen. Sie sorgen dafür, dass neue Peptidoglykanmonomere, die im Zytoplasma gebildet werden, in das wachsende Peptidoglykan eingebaut werden. Durch die Beta-Lactam-Antibiotika werden die PBP gehemmt und können ihre Funktion nicht mehr erfüllen. Dadurch wird das empfindliche Gleichgewicht zwischen Aufbau und Abbau des Peptidoglykans gestört. Durch so genannte lytische Transglykosylasen werden kleine Fragmente – Anhydromuropeptide – aus dem Peptidoglykan freigesetzt. Diese Fragmente bestehen aus einem chemisch modifizierten Disaccharid und einem Peptidrest. Dieser Peptidrest kann aus drei, vier oder fünf Aminosäuren bestehen. Diese Muropeptide wirken als Signalmoleküle für die Beta-Lactamase-Expression. Unsere Arbeitsgruppe konnte zeigen, daß diese Signalmoleküle unter dem Einfluss verschiedener Beta-Lactam-Antibiotika in verschiedenen Mengen freigesetzt werden. Je stärker die Beta-Lactamase-Induktion, umso mehr Anhydromuramylpentapeptid wird freigesetzt.

Durch eine Permease werden die freigesetzten Anhydromuropeptide in das Zytoplasma der Bakterienzelle transportiert. Dort werden diese Muropeptide durch eine Amidase (AmpD) in Zucker- und Peptidanteil gespalten. Die daraus entstehenden Abbauprodukte können dann von der Bakterienzelle für die Peptidoglykansynthese wieder verwendet werden. AmpD ist ein negativer Regulator der Induktion der Beta-Lactamase, da es die Signalmoleküle der Beta-Lactamase-Induktion hydrolysiert. Mutationen im *ampD*-Gen führen zu einer hyperinduzierbaren oder konstitutiven Beta-Lactamase Überproduktion. Werden die Signalmoleküle nicht gespalten, binden sie an ein DNS-Bindeprotein (AmpR). Es reguliert die Expression des *ampC*-Gens. Durch die Wechselwirkung der Anhydromuramylpeptide mit AmpR wird ein Suppressormolekül von AmpR verdrängt. Dies führt dazu, dass AmpR die Beta-

Lactamase-Expression aktiviert (Abb. 1).

Für die Erhöhung der Konzentration des Anhydromuramylpentapeptids und zu der daraus folgenden Beta-Lactamase-Induktion scheinen die PBP eine entscheidende Rolle zu spielen. Die Pentapeptidseitenketten im Peptidoglykan werden durch die D,D-Carboxypeptidasen (PBP 4, 5, 6a und 6b) in Tetrapeptide gespalten. Mutanten mit 1-4-Deletionen in diesen Genen erwiesen sich als ideal, um die Bedeutung der einzelnen PBP für die Beta-Lactamase-Induktion näher zu untersuchen. Die Mutanten wurden mit einem Plasmid, das als Insertion die Gene *ampC* und *ampR* aus *E. cloacae* besitzt, transformiert.

Der Verlust von einer oder zwei D,D-Carboxypeptidasen zeigte keinen Einfluss auf den basalen Beta-Lactamase-Spiegel. In den Dreifachmutanten (ΔPBP 4, 5 und 6a bzw. ΔPBP 5, 6a und 6b) und insbesondere in der Vierfachmutante (ΔPBP 4, 5, 6a und 6b) wurde eine erhöhte Beta-Lactamase-Grundaktivität

sowie eine erhöhte MHK gegenüber Beta-Lactam-Antibiotika festgestellt (Tab. 1, 2). Zur Initiierung der Beta-Lactamase-Induktion ist also die Hemmung aller d,d-Carboxypeptidasen notwendig.

Außerdem wurde die Rolle der essentiellen PBP 1, 2 und 3 für den Induktionsmechanismus untersucht. Mit Hilfe von Cefsulodin, Mecillinam und Aztreonam, welche spezifisch PBP 1, PBP 2 und PBP 3 hemmen, konnten wir zeigen, dass die gleichzeitige Hemmung von PBP 1 und PBP 2 bei den Drei- und Vierfachmutanten zu einer weiteren Steigerung der spezifischen Beta-Lactamase-Produktion führt. Ein Beta-Lactam-Antibiotikum mit starker Beta-Lactamase-Induktionskapazität hemmt also alle D,D-Carboxypeptidasen und PBP1 und/oder PBP2.

Die PBP sind jedoch nicht die eigentlichen Enzyme, die die Anhydromuramylpeptide aus dem Peptidoglykan freisetzen. Diese Aufgabe wird von den lytischen Transglykosylasen (Lts) erfüllt.

Fünf Lts sind bisher bekannt. Eine dieser lytischen Transglykosylasen spielt eine besondere Rolle – die Slt 70 (lösliche lytische Transglykosylase). Die dreidimensionale Struktur der Slt 70 ist ringförmig. Das aktive Zentrum befindet sich im Inneren des Ringes. Angenommen wird, dass dieses Enzym entlang der Zuckerketten des Peptidoglykans fortschreitet und das Peptidoglykan in die Anhydromuramylpeptide zerlegt (Abb. 1). Reguliert wird dieses Enzym unter anderem durch Transpeptidbrücken im Peptidoglykan, durch die es angehalten wird. Inhibierung der PBP 4, 5, 6a, 6b, 1 und 2 resultiert in einem Anstieg der Pentapeptidseitenketten im Peptidoglykan und in einer Abnahme an Peptidquervernetzungen. Dadurch kann die Slt 70 vermehrt Anhydromuramylpentapeptide freisetzen.

Bulgecin – ein sulfoniertes Glykopeptid – isoliert aus dem Kulturmedium von *Pseudomonas acidophila*, hemmt die Slt 70 nichtkompetitiv. Durch Verwen-

dung dieses Hemmstoffes konnten wir zeigen, dass die Grundaktivität und die Beta-Lactamase-Induktion in verschiedenen getesteten klinischen Isolaten von *Enterobacter cloacae* stark gesenkt werden kann. Gleichzeitig sinkt die MHK gegenüber AmpC-Beta-Lactamase-instabilen Lactam-Antibiotika.

Durch weitere Aufklärung des molekularen Induktionsmechanismus, insbesondere der Rolle der anderen noch nicht untersuchten lytischen Transglykosylasen, könnten neue Zielstrukturen gefunden werden, deren Hemmung zur Unterbrechung des Induktionsmechanismus führen. Dies könnte eine Strategie zur Entwicklung einer neuen Klasse von Beta-Lactamase-Inhibitoren sein, die direkt an der Freisetzung der Signalmoleküle für die Beta-Lactamase-Induktion eingreifen und nicht erst die gebildete Beta-Lactamase hemmen.

Doktoranden-Stipendium

Die Paul-Ehrlich-Gesellschaft für Chemotherapie e.V. verleiht an Mitglieder der Gesellschaft insgesamt zehn Doktoranden-Stipendien für Dissertationen auf dem Gebiet der antiinfektiösen oder antineoplastischen, klinischen oder experimentellen Chemotherapie. Die Arbeiten sollen aus denjenigen Fachgebieten stammen, die durch die sieben Sektionen der PEG repräsentiert werden: antibakterielle Chemotherapie, antivirale Chemotherapie, antimykotische Chemotherapie, antiparasitäre Chemotherapie, Immunologie, Onkologie, Grundlagen.

Bewerber werden gebeten, ihre Arbeit namentlich dem Schriftführer der Gesellschaft einzureichen. Der Dissertant soll den Inhalt der Arbeit anlässlich einer PEG-Veranstaltung publiziert haben.

Die PEG gewährt ein Stipendium in Höhe von insgesamt **2 000.-DM**. **1 000.- DM** gelangen sofort zur Auszahlung und weitere **1 000.-DM** werden nach der Publikation einer entsprechenden Arbeit im Chemotherapie Journal bereitgestellt.

Bewerber werden gebeten, Ihre Arbeit einzureichen bei:
Prof. Dr. Axel Dalhoff, Bayer AG, Pharma Forschungszentrum, Postfach 101709,
42096 Wuppertal.