

Aus dem Max von Pettenkofer-Institut für Hygiene und Medizinische Mikrobiologie  
der Ludwig-Maximilians-Universität München  
ehem. Vorstand: Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Jürgen Heesemann



Über die Antibiotikaresistenz bei *Yersinia enterocolitica*:  
In vitro und in vivo Untersuchungen

Dissertation  
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von  
Enno Storz

aus  
Hamburg

2018



**Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München**

Berichterstatter:

**Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Jürgen Heesemann**

Mitberichterstatter:

**PD Dr. Dimitrios Frangoulidis**

**Prof. Dr. Rika Dränert**

**Prof. Dr. Johannes Bogner**

Dekan:

**Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel**

Tag der mündlichen Prüfung: **25.10.2018**

Die vorliegende Arbeit wurde am Max von Pettenkofer-Institut für Hygiene und Medizinische Mikrobiologie der Ludwig-Maximilians-Universität München unter der Betreuung von Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Jürgen Heesemann angefertigt.

Eidesstattliche Versicherung:

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema „Über die Antibiotikaresistenz bei *Yersinia enterocolitica*: In vivo und in vitro Untersuchungen“ selbstständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München, den 01.11.2017

.....

Enno Storz





**Inhaltsverzeichnis**

**Zusammenfassung** ..... VIII

**1. Einleitung**..... 1

1.1. Genus *Yersinia*..... 1

1.2. *Yersinia enterocolitica* ..... 1

1.2.1. Nomenklatur, Taxonomie und Differenzierung ..... 1

1.2.2. Pathogenität und Klinik ..... 2

1.2.3. Pathogenese der Yersiniose ..... 4

1.2.4. Die Milz als Spiegel der Infektion ..... 4

1.2.5. Virulenzfaktoren ..... 5

1.2.5.1. Chromosomale Virulenzfaktoren..... 6

1.2.5.1.1. Typ-III-Sekretionssystem Ysa ..... 6

1.2.5.1.2. Invasin (Inv) ..... 6

1.2.5.1.3. Attachment-invasion-locus (Ail) ..... 7

1.2.5.1.4. Flagellen ..... 7

1.2.5.1.5. Lipopolysaccharid (LPS)..... 7

1.2.5.1.6. Yersiniabactin (Ybt) ..... 8

1.2.5.1.7. *Yersinia*-hitzestabiles Enterotoxin (Yst)..... 8

1.2.5.1.8. Mucoid-*Yersinia*-Faktor (Myf) ..... 9

1.2.5.2. Extrachromosomale Virulenzfaktoren ..... 9

1.2.5.2.1. *Yersinia*-Adhäsın A (YadA) ..... 9

1.2.5.2.2. Typ-III-Sekretionssystem Ysc-T3SS ..... 10

1.3.  $\beta$ -Laktam-Antibiotika..... 12

1.3.1. Einführung ..... 12

1.3.2. Wirkmechanismus..... 16

1.4.  $\beta$ -Laktam-Resistenzmechanismen..... 17

1.4.1. Modifikation der Penicillin-Bindungsproteine..... 18

1.4.2. Porine ..... 19

1.4.2.1. Einführung ..... 19

1.4.2.2. Porin OmpF (Outer membrane protein F)..... 20

1.4.3. Multi-Drug-Effluxsysteme ..... 21

1.4.3.1. Einführung ..... 21

1.4.3.2. AcrAB-TolC ..... 22

1.4.4.  $\beta$ -Laktamasen ..... 24

1.4.4.1. Einführung ..... 24

## Inhaltsverzeichnis

1.4.4.2.	Klassifikation.....	25
1.4.4.2.1.	Ambler-Klassifikation.....	25
1.4.4.2.2.	Bush-Klassifikation.....	25
1.4.4.3.	$\beta$ -Laktamasen bei <i>Y. enterocolitica</i> .....	27
1.5.	Ziel und Fragestellung.....	29
<b>2.</b>	<b>Material und Methoden.....</b>	<b>30</b>
2.1.	Geräte.....	30
2.2.	Molekularbiologische Fertigprodukte („Kits“).....	31
2.3.	Antibiotika, Chemikalien und Fertigmedien – Bezugsquellen.....	31
2.4.	Größenstandards.....	33
2.5.	Puffer, Lösungen und Gele.....	34
2.6.	Nährmedien, Medienzusätze und Antibiotika.....	36
2.6.1.	Nährmedien.....	36
2.6.2.	Medienzusätze.....	36
2.6.3.	Antibiotika.....	37
2.6.3.1.	Antibiotika – in vitro.....	37
2.6.3.2.	Antibiotika – in vivo.....	38
2.7.	Bakterienstämme, Plasmide und Oligonukleotide.....	38
2.7.1.	Bakterienstämme und Plasmide.....	38
2.7.2.	Oligonukleotide.....	40
2.8.	Antikörper zur indirekten Immunfluoreszenzfärbung von Gewebeschnitten.....	43
2.9.	Mikrobiologische Methoden.....	45
2.9.1.	Kultivierung von Bakterienstämmen.....	45
2.9.2.	Lagerung und Kryokonservierung von Bakterienstämmen.....	45
2.9.3.	Herstellung und Lagerung von Infektionsaliquots.....	45
2.9.4.	Bestimmung der definierten Keimzahl.....	45
2.9.5.	Bestimmung der optischen Dichte.....	46
2.9.6.	Durchführung von Wachstumskurven.....	46
2.9.7.	Herstellung elektrokompenter Bakterien.....	46
2.9.8.	Kontrolle auf das Vorhandensein des pYV-Plasmids.....	47
2.9.8.1.	Kontrolle mittels Agglutinationstest.....	47
2.9.8.2.	Kontrolle mittels PCR.....	47
2.9.9.	Eliminierung des pYV-Plasmids.....	47
2.9.10.	Antimikrobielle Empfindlichkeitstestung – in vitro.....	48
2.9.10.1.	Antibiotika-Plättchendiffusionstest („Hemmhoftest“).....	48
2.9.10.2.	MHK-Bestimmung auf Nährböden („E-Teststreifen“).....	48
2.9.10.3.	MHK-Bestimmung in Flüssigkultur („Mikrodilutionsverfahren“).....	48

2.10. Genetische und molekularbiologische Methoden .....	49
2.10.1. Isolierung von Nukleinsäuren .....	49
2.10.2. Konzentrationsbestimmung von DNS.....	49
2.10.3. Aufreinigung von DNS mittels Präzipitation .....	49
2.10.4. DNS-Amplifikation mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) .....	50
2.10.5. Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR).....	51
2.10.6. Aufreinigung von PCR Produkten .....	51
2.10.7. Agarosegel-Elektrophorese und Dokumentation .....	52
2.10.8. Sequenzierung von DNS .....	52
2.10.9. Sequenzspezifische Spaltung und Ligation von DNS.....	52
2.10.10. Transformation elektrokompenter Bakterien .....	53
2.10.11. Herstellung von chromosomalen Deletionsmutanten .....	53
2.10.11.1. Vorbereitung der Bakterienkulturen .....	53
2.10.11.2. Erstellung der Oligonukleotide für die Mutagenese .....	54
2.10.11.3. Generierung der einzubringenden Genkassette.....	54
2.10.11.4. Transformation und Selektion der chromosomalen Deletionsmutanten .....	55
2.10.12. Konstruktion von Plasmiden.....	55
2.10.12.1. Konstruktion von pACE .....	55
2.10.12.2. Konstruktion von <i>pacrB</i> .....	56
2.11. Proteinchemische Methoden.....	57
2.11.1. Präparation von Ganzzelllysaten.....	57
2.11.2. Isolierung von „ <i>Yersinia</i> outer proteins“ (Yops).....	57
2.11.3. Präparation der Außenmembranproteine .....	57
2.11.4. SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE).....	58
2.11.5. „Coomassie Blue“-Färbung .....	58
2.12. Tierexperimentelle Methoden.....	59
2.12.1. Allgemeines .....	59
2.12.2. Mauspassage .....	59
2.12.3. Mausinfektions-Antibiotikatherapie-Modell.....	59
2.12.4. Immunfluoreszenzmikroskopie von Milz-Kryomikrotomschnitten.....	60
2.12.4.1. Anfertigung von Serienschnitten der Milz.....	60
2.12.4.2. Immunfluoreszenzfärbung und Mikroskopie von Gewebeschnitten .....	61
2.13. Proteinbestimmung mittels MALDI-TOF .....	61
<b>3. Ergebnisse.....</b>	<b>62</b>
3.1. Die $\beta$ -Laktamasen von <i>Y. enterocolitica</i> .....	62
3.1.1. Genomweite Suche nach $\beta$ -Laktamasen .....	62
3.1.2. Detektion der Aktivität von möglichen Metallo- $\beta$ -Laktamase-Genen.....	62
3.1.3. Herstellung der chromosomalen $\beta$ -Laktamase-Deletionsmutanten .....	63

## Inhaltsverzeichnis

3.2. Charakterisierung der $\beta$ -Laktamase-Deletionsmutanten in vitro .....	64
3.2.1. Wachstumsverhalten.....	64
3.2.2. Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration mittels Agardiffusionstest („E-Teststreifen“) .....	65
3.2.3. MHK-Bestimmungen der $\beta$ -Laktamase-Deletionsmutanten in Flüssigkultur („Mikrodilutionsverfahren“).....	67
3.3. Optimierung und Analyse der Antibiotikatherapieversuche im <i>Yersinia</i> -Mausinfektionsmodell .....	70
3.3.1. Einfluss der Anzuchtbedingungen für Yersinien aus infiziertem Milzgewebe auf die Anzahl der KBE.....	70
3.3.2. Anpassung der Infektionsdosis für Antibiotikatherapieversuche .....	71
3.3.3. Wachstumsverhalten in vivo.....	72
3.3.4. Die Rolle der $\beta$ -Laktamasen für Antibiotikaresistenz in vivo .....	74
3.3.4.1. Modifikation des Therapieprotokolls von <i>Scavizzi et al.</i> .....	74
3.3.4.2. Einfluss der $\beta$ -Laktamasen auf die Nettoüberlebensrate nach Ampicillinbehandlung .....	76
3.3.4.3. Einfluss der $\beta$ -Laktamasen auf die Nettoüberlebensrate nach Cefotaximbehandlung .....	78
3.3.4.4. Einfluss der $\beta$ -Laktamasen auf die Nettoüberlebensrate nach Ceftriaxonbehandlung .....	81
3.3.4.5. Einfluss der $\beta$ -Laktamasen auf die Nettoüberlebensrate nach Meropenembehandlung .....	82
3.3.4.6. Einfluss der $\beta$ -Laktamasen auf die Nettoüberlebensrate nach Gentamicinbehandlung.....	84
3.3.5. Immunfluoreszenzmikroskopische Untersuchung der infizierten Milz.....	85
3.3.5.1. Immunfluoreszenzmikroskopische Milzdarstellung.....	85
3.3.5.2. Immunfluoreszenzmikroskopische Darstellung der <i>Yersinia</i> -infizierten Milz (Kryomikrotomschnitte) .....	86
3.3.5.3. Immunfluoreszenzmikroskopische Untersuchung von Kryomikrotomschnitten infizierter Milzen nach Antibiotikatherapie ....	88
3.4. Untersuchungen zur Rolle der Acr-Effluxpumpe im Bezug auf die Antibiotikaresistenz .....	91
3.4.1. Herstellung der chromosomalen <i>acrB</i> -Deletionsmutanten.....	91
3.4.2. Wachstumsverhalten in vitro .....	92
3.4.3. Bestimmung der In-vitro-Antibiotikasensitivität bei <i>acrB</i> -Deletion .....	94
3.4.3.1. Antibiotikaplättchen-Diffusionstest („Hemmhoftest“).....	94
3.4.3.2. MHK-Bestimmung der <i>acrB</i> -Deletionsmutanten mittels Agardiffusionstest („E-Teststreifen“).....	96
3.4.3.3. MHK-Bestimmung der <i>acrB</i> -Deletionsmutanten im Flüssigmedium („Mikrodilutionsverfahren“).....	98
3.4.3.3.1. MHK-Bestimmung der <i>acrB</i> -Deletionsmutanten für Ampicillin im Flüssigmedium.....	98
3.4.3.3.2. MHK-Bestimmung der <i>acrB</i> -Deletionsmutanten für weitere klinisch relevante Antibiotika im Flüssigmedium..	101

3.5.	Charakterisierung der <i>acrB</i> -Deletionsmutanten in vivo .....	103
3.5.1.	Wachstumsverhalten <i>acrB</i> -Deletionsmutanten in vivo.....	103
3.5.2.	Einfluss von AcrB auf die Antibiotikaresistenz in vivo.....	104
3.5.2.1.	Einfluss der AcrB-Effluxpumpe auf die Nettoüberlebensrate bei Ampicillinbehandlung .....	104
3.5.2.2.	Einfluss der AcrB-Effluxpumpe auf die Nettoüberlebensrate bei Doxyzyklinbehandlung.....	105
3.6.	Die Rolle von <i>ompF</i> für die Meropenemresistenz .....	108
3.6.1.	Herstellung und Charakterisierung einer meropenemresistenten Spontanmutante (Mem <sup>R</sup> ).....	108
3.6.2.	Herstellung und Charakterisierung einer <i>ompF</i> Deletionsmutante .....	110
3.6.3.	Bestimmung des Antibiotikasensitivitätsprofils (MHK) der <i>ompF</i> - Deletionsmutante .....	112
3.6.3.1.	Bestimmung der Hemmhofdurchmesser verschiedener Antibiotika für JB580v $\Delta ompF$ .....	112
3.6.3.2.	MHK-Bestimmung bei JB580v $\Delta ompF$ mittels Agardiffusionstest („E-Teststreifen“)......	113
3.6.3.3.	MHK-Bestimmung bei JB580v $\Delta ompF$ im Flüssigmedium („Mikrodilutionsverfahren“)......	114
3.6.3.3.1.	MHK-Bestimmung von Ampicillin im Flüssigmedium .....	114
3.6.3.3.2.	MHK-Bestimmung bei JB580v $\Delta ompF$ hinsichtlich verschiedener Antibiotika im Flüssigmedium .....	115
<b>4.</b>	<b>Diskussion</b> .....	117
4.1.	Antibiotikawirkung bei <i>Y. enterocolitica</i> 1B im Vergleich.....	117
4.2.	Einfluss der Testsysteme auf die Höhe der ermittelten MHK.....	119
4.3.	Die Bedeutung der $\beta$ -Laktamasen bei der Antibiotikaresistenz von <i>Y. enterocolitica</i> .....	119
4.3.1.	$\beta$ -Laktamase-abhängige Antibiotikaresistenz in vitro.....	119
4.3.2.	$\beta$ -Laktamase-abhängige Antibiotikaresistenz in vivo .....	120
4.3.2.1.	Antibiotikaresistenz von JB580v in vivo .....	120
4.3.2.2.	Der Beitrag der $\beta$ -Laktamasen bei der $\beta$ -Laktam-Antibiotikaresistenz von JB580v in vivo .....	122
4.4.	Immunfluoreszenzmikroskopische Untersuchungsergebnisse .....	124
4.5.	Die Bedeutung von OmpF bei der Antibiotikaresistenz von <i>Y. enterocolitica</i> .....	125
4.6.	Die Bedeutung von AcrB bei der Antibiotikaresistenz von <i>Y. enterocolitica</i> .....	126
4.7.	Weitere mögliche Ursachen der Antibiotikaresistenz.....	128
<b>5.</b>	<b>Ausblick</b> .....	130

<b>6. Literaturverzeichnis</b> .....	131
<b>7. Tabellenverzeichnis</b> .....	151
<b>8. Abbildungsverzeichnis</b> .....	152
<b>9. Abkürzungen</b> .....	154
<b>10. Danksagung</b> .....	157
<b>11. Lebenslauf</b> .....	158
<b>12. Publikationen</b> .....	159
12.1. Originalpublikationen .....	159
12.2. Übersichtsartikel .....	159
12.3. Vorträge .....	159
12.4. Poster .....	159
<b>13. Anhang</b> .....	160
13.1. MHK-Bestimmungen der <i>acrB</i> -Deletionsmutanten im Flüssigmedium („Mikrodilutionsverfahren“) .....	160
13.1.1. Bestimmung der $MHK_{Ctx}$ bei den <i>acrB</i> -Deletionsmutanten im Flüssigmedium ...	160
13.1.2. Bestimmung der $MHK_{Mem}$ bei den <i>acrB</i> -Deletionsmutanten im Flüssigmedium .	162
13.1.3. Bestimmung der $MHK_{Cn}$ bei den <i>acrB</i> -Deletionsmutanten im Flüssigmedium....	163
13.1.4. Bestimmung der $MHK_{Do}$ bei den <i>acrB</i> -Deletionsmutanten im Flüssigmedium....	164
13.1.5. Bestimmung der $MHK_{Cip}$ bei den <i>acrB</i> -Deletionsmutanten im Flüssigmedium ...	165
13.2. Einfluss der <i>ompF</i> -Deletion auf die MHK verschiedener Antibiotika bei JB580v im Flüssigmedium („Mikrodilutionsverfahren“) .....	166
13.2.1. Bestimmung der $MHK_{Ctx}$ bei JB580v $\Delta ompF$ im Flüssigmedium .....	166
13.2.2. Bestimmung der $MHK_{Mem}$ bei JB580v $\Delta ompF$ im Flüssigmedium .....	167
13.2.3. Bestimmung der $MHK_{Cn}$ bei JB580v $\Delta ompF$ im Flüssigmedium.....	168
13.2.4. Bestimmung der $MHK_{Do}$ bei JB580v $\Delta ompF$ im Flüssigmedium.....	169

13.2.5. Bestimmung der $MHK_{Cip}$ bei JB580v $\Delta ompF$ im Flüssigmedium .....	170
13.3. Sequenzierungsergebnisse von JB580v <sup>MemR</sup> $\Delta blaA / \Delta ampC / \Delta acrB$ .....	171
13.3.1. Gen-Analyse von <i>ompF</i> bei JB580v <sup>MemR</sup> $\Delta blaA / \Delta ampC / \Delta acrB$ .....	171
13.3.2. Gen-Analyse von <i>micF</i> bei JB580v <sup>MemR</sup> $\Delta blaA / \Delta ampC / \Delta acrB$ .....	172

### Zusammenfassung

Antibiotika stellen bei bakteriellen Infektionen immer noch die Therapie der Wahl dar. Doch kann sich die in vitro ermittelte Sensitivität von Bakterien gegenüber ihrer Sensitivität in vivo zum Teil beträchtlich unterscheiden. Antibiotika zeigen gelegentlich in vivo nur eine geringe Wirkung, obwohl der Keim bei der Sensitivitätsaustestung („Antibiogramm“) in vitro als hoch empfindlich gegenüber diesem Wirkstoff eingestuft wurde. Auch existieren bisher kaum adäquate auf den Menschen übertragbare Tierinfektionsmodelle, um bakterielle Infektionen sowie den Therapieverlauf und mögliche neue Therapieansätze zu untersuchen. Bei der von *Yersinia enterocolitica* induzierten Yersiniose ist der Infektionsverlauf und der Organbefall bei der Maus dem beim Menschen vergleichbar und eignet sich somit besonders gut als Beispielmodell. Daher wurden in der vorliegenden Arbeit von *Yersinia enterocolitica* JB580v (Biotyp 1B, Serotyp O:8) genetisch definierte Mutanten hinsichtlich potentieller Resistenzfaktoren hergestellt und diese auf ihre Antibiotikaempfindlichkeit in vitro und in vivo untersucht. Hierbei wurden unterschiedliche Resistenzmechanismen mit dem Fokus auf die  $\beta$ -Laktamasen berücksichtigt. Zur Beurteilung der Rolle der  $\beta$ -Laktamasen bei der Antibiotikaresistenz erfolgte die chromosomale Deletion der beiden bereits bekannten  $\beta$ -Laktamase-Gene *blaA* (Gen der Penicillinase BlaA) und *blaB* (Gen der Cephalosporinase BlaB, auch *ampC* bzw. AmpC genannt). Des Weiteren wurde das Gen der Effluxpumpenkomponente AcrB aus dem Effluxsystem AcrAB-TolC sowie das Gen von OmpF, einem Hauptvertreter der Porine, deletiert.

Während die Deletion von *blaB* zu keiner signifikanten Veränderung der Antibiotikasensitivität in vitro führte, zeigte die *blaA*-Deletionsmutante eine erhöhte Empfindlichkeit gegenüber den getesteten Penicillinen. Bei den übrigen getesteten Antibiotika (u. a. auch Cephalosporine und Carbapeneme) waren in vitro keine Resistenzänderungen nachweisbar.

Die Deletion von *acrB*, dem Gen des Effluxsystems AcrAB-TolC, führte in vitro zu einer erhöhten Anfälligkeit der *Yersinia*-Mutante gegenüber Cefuroxim, Ciprofloxacin, Doxzyklin sowie Tetrazyklin, Chloramphenicol, Nalidixinsäure und Novobiocin.

Die *ompF*-Deletionsmutante zeigte im Vergleich zum Ausgangsstamm unter den gewählten Testbedingungen in vitro keine klinisch relevante Veränderung der Empfindlichkeit gegenüber den getesteten Antibiotika, sodass hier auf eine Austestung in vivo verzichtet wurde.

Im Mausinfektionsmodell konnte aus den infizierten Milzen vom Ausgangsstamm und den  $\beta$ -Laktamase-Deletionsmutanten eine vergleichbare Anzahl an Bakterien rückisoliert werden. Bei der nicht therapierten Effluxpumpen-Deletionsmutante war die „Nettoüberlebensrate“ (d. h. die Anzahl der aus der jeweiligen infizierten Mäusemilz rückisolierten Yersinien) signifikant geringer, was dafür spricht, dass AcrB einen möglichen Fitness- bzw. Virulenzfaktor bei *Yersinia enterocolitica* während des untersuchten Infektionszeitraums darstellt.

Durch intravenöse Gaben verschiedener in der Humanmedizin verwendeter Antibiotika wurde des Weiteren deren Wirksamkeit gegenüber dem Ausgangsstamm sowie gegenüber den  $\beta$ -Laktamase-Deletionsmutanten vergleichend untersucht. Aufgrund ihrer Substratspezifität führte die i.v.-Gabe von Ampicillin bei der *blaA*-Deletionsmutante und die i.v.-Gabe von Cefotaxim bei der *blaB*-Deletionsmutante zu einer verringerten Nettoüberlebensrate im Vergleich zum Ausgangsstamm.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass die getesteten  $\beta$ -Laktam-Antibiotika (Ampicillin, Cefotaxim, Ceftriaxon, Meropenem) trotz einer hohen Sensitivität in vitro eine zum Teil unerwartet deutlich geringere antibakterielle Wirksamkeit gegenüber *Y. enterocolitica* im Vergleich zu den getesteten Nicht- $\beta$ -Laktam-Antibiotika Gentamicin und Doxyzyklin aufwiesen. Die Effluxpumpen-Deletionsmutante JB580v  $\Delta$ *acrB* wurde in vivo bezüglich ihrer Sensitivität gegenüber Doxyzyklin getestet. Hierbei zeigte die Mutante eine höhere Empfindlichkeit gegenüber diesem Antibiotikum als der Ausgangsstamm.

Um Aufschluss über die Mikrokolonie-Abszess-Bildung von *Y. enterocolitica* im Rahmen der Antibiotikatherapie zu erhalten (zu der es bisher noch keine Untersuchungen gibt), wurden zusätzlich Kryomikrotomschnitte infizierter Mäusemilzen immunfluoreszenzmikroskopisch nach der Antibiotikatherapie untersucht. Hierbei konnte bestätigt werden, dass das histologische Bild mit der rückisolierten Bakterienzahl korrelierte: Durch die i.v.-Gabe von Doxyzyklin und Gentamicin wurde die Bildung von Mikrokolonie-Abszess-Formationen in der Milz erfolgreich verhindert. Die neutrophile polymorphnukleäre Leukozyten-Rekrutierung fiel geringer aus als bei der untherapierten Kontrollmilz. Demgegenüber zeigten die  $\beta$ -Laktam-Antibiotika Ampicillin, Cefotaxim und Meropenem praktisch keine Wirkung: Ungeachtet einer Vielzahl an umgebenden Neutrophilen waren hier große Mikrokolonie-Abszess-Formationen abgrenzbar.

Abschließend kann festgestellt werden, dass die im klinischen Alltag verwendeten Standardtestmethoden nicht immer übertragbare Ergebnisse für eine erfolgreiche antibakterielle Therapie liefern. Insbesondere bei der Entwicklung neuer Substanzen und Wirkstoffkombinationen sowie der Austestung multiresistenter Bakterien sollte man sich nicht ausschließlich nur auf In-vitro-Testergebnisse verlassen, sondern nach Möglichkeit auch eine In-vivo-Austestung in Betracht ziehen, um die tatsächliche antibakterielle Wirksamkeit bzw. bakterielle Resistenz zu ermitteln.



## 1. Einleitung

### 1.1. Genus *Yersinia*

Yersinien sind gramnegative, fakultativ anaerobe, stäbchenförmige bis kokkoide Bakterien, die zur Division der Proteobacteria, genauer zur Subdivision der  $\gamma$ -Proteobacteria und der Familie der *Enterobacteriaceae* zählen (Bottone 1977).

Der Gattungsname *Yersinia* würdigt die Verdienste des Arztes und Bakteriologen Alexandre Émile Jean Yersin, der den Pesterreger *Yersinia pestis* als Erster 1894 in Hongkong isolierte und beschrieb (Yersin 1894; Van Loghem 1944). Humanpathogen sind neben *Y. pestis* auch die enteropathogenen *Yersinia*-Arten *Y. enterocolitica* und *Y. pseudotuberculosis* (Verursacher der Yersiniose, Carniel and Mollaret 1990).

Darüber hinaus gibt es auch eine fischpathogene Art, *Y. ruckeri*, die die Rotmaulerkrankung bei der Fischfamilie *Salmonidae* verursachen (Tobback et al. 2007). Eine zunehmende Anzahl von *Yersinia*-Arten wurde und wird in der Umwelt isoliert und charakterisiert. Damit umfasst die Gattung *Yersinia* inzwischen über 17 Arten (*Y. aldovae*, *Y. aleksiciae*, *Y. bercovieri*, *Y. enterocolitica*, *Y. entomophaga*, *Y. frederiksenii*, *Y. intermedia*, *Y. kristensenii*, *Y. massiliensis*, *Y. mollaretii*, *Y. nurmii*, *Y. pekkanenii*, *Y. pestis*, *Y. pseudotuberculosis*, *Y. rohdei*, *Y. ruckeri* und *Y. similis*) (Kaneuchi et al. 1989; Sulakvelidze 2000; Sprague and Neubauer 2005; Merhej et al. 2008; Sprague et al. 2008; Murros-Konttinen et al. 2011a; Murros-Konttinen et al. 2011b).

### 1.2. *Yersinia enterocolitica*

#### 1.2.1. Nomenklatur, Taxonomie und Differenzierung

1934 erstmalig isoliert und 1939 charakterisiert, wurde die serologisch und biochemisch uneinheitliche Art zunächst u. a. als *Bacterium enterocoliticum*, *Pasteurella X* und *Y. pseudotuberculosis* Typ B bezeichnet, bis sie 1964 den mikrobiologisch begründeten, aktuell gebräuchlichen Namen *Yersinia enterocolitica* erhielt (McIver and Pike 1934; Schleifstein and Coleman 1939; Schleifstein and Coleman 1943; Knapp and Thal 1963; Mittal et al. 2007).

*Y. enterocolitica* Stämme können in 6 biochemisch unterschiedliche Biotypen unterteilt werden. Der Biotyp 1A gilt i.d.R. als nicht pathogen für Mensch und Maus. Er kommt in der Umwelt aber auch im Darm gesunder Menschen vor. In seltenen Fällen kann dieser Biotyp jedoch auch Sepsen und Wundinfektionen bei abwehrschwachen Menschen verursachen. Die Biotypen 2-5 sind enteropathogen für Menschen, mäßig mauspathogen, und vorwiegend in Europa und Japan vertreten (Stämme der ‚Alten Welt‘).

## Einleitung

In den USA wird vornehmlich der Biotyp 1B, welcher als hoch pathogen für Mäuse und mäßig pathogen für Menschen gilt, nachgewiesen (Stämme der ‚Neuen Welt‘) (*Wauters et al. 1987; Carniel 2001; Wren 2003*).

Eine weitere Differenzierung erfolgt serologisch z. B. mit spezifischen Antisera anhand der unterschiedlichen Zusammensetzung der Flagellen (H-Antigen) oder der terminalen Polysaccharide des Lipopolysaccharids (O-Antigen) (*Bialas et al. 2012*).

### 1.2.2. Pathogenität und Klinik

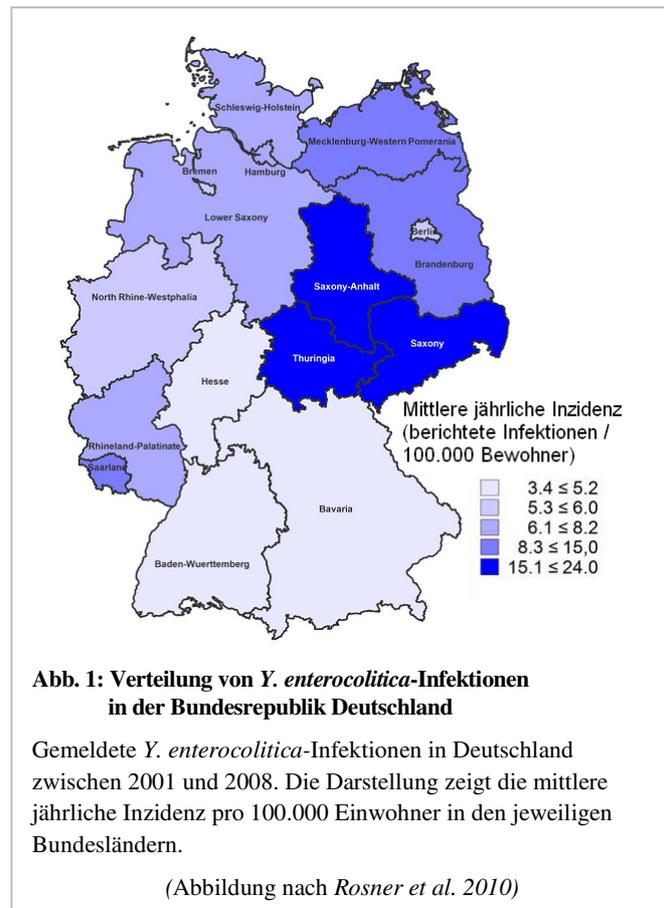
Die meldepflichtige Yersiniose wird in Deutschland als dritthäufigste Ursache der bakteriellen Enteritis registriert. Nach einem stetigen Rückgang der Infektionen bis zum Jahr 2014, kam es im Jahr 2015 erstmals wieder zu einem Anstieg der gemeldeten Fallzahlen (*Robert-Koch-Institut 2015; Robert-Koch-Institut 2017*). Bei einer Untersuchung gesunder Blutspender betrug die Prävalenz von *Y. enterocolitica* O:3/O:9-spezifischen Serumantikörpern der Klasse IgG in Deutschland sogar bis zu 43 %, was für eine hohe Anzahl bereits überstandener akuter bzw. subklinischer Infektionen spricht (*Maki-Ikola et al. 1997*).

Als Erreger der Yersiniose verursachen *Y. enterocolitica* und *Y. pseudotuberculosis* mannigfaltige Symptome, die vom Serotyp des Erregers und auch vom Alter, dem Immunstatus und chronischen Grunderkrankungen (z. B. Leberzirrhose, Diabetes mellitus, Malnutrition, Hämochromatose, immunsuppressive Therapie u. a.) abhängen (*Cover and Aber 1989*). Kleinkinder leiden häufiger an Bauchschmerzen, wässriger (selten blutiger) Diarrhö, Fieber, Übelkeit oder Erbrechen. Bei älteren Kindern und jungen Erwachsenen manifestiert sich die Erkrankung eher als „Pseudoappendizitis“ oder als terminale Ileitis mit mesenterialer Lymphadenitis, die in Kombination mit Fieber nicht selten zu der Fehldiagnose „akute Appendizitis“ führen (*Heesemann et al. 1993a; Fredriksson-Ahoma et al. 2006*).

Nach Abklingen der Darminfektion mit subakuter systemischer Dissemination (transiente Bakteriämie) können postinfektiöse extraintestinale Krankheitsbilder entstehen wie z. B. Erythema nodosum, reaktive Arthritis (>60 % der Betroffenen sind HLA-B27 positiv), Morbus Reiter, Glomerulonephritis, Uveitis anterior oder eine chronisch-rezidivierende Ileokolitis mit schwer nachweisbarer bakterieller Persistenz (*Laitinen et al. 1977; Hoogkamp-Korstanje et al. 1988; Cover and Aber 1989*).

Besonders gefürchtet sind Infektionen mit *Y. enterocolitica* über Bluttransfusionen. Zwar befindet sich das Wachstumsoptimum des Erregers bei ca. 27 °C, aufgrund seiner Psychrotrophie kann er sich aber schon ab 4 °C, also auch in Blutprodukten (insb. Erythrozytenkonzentraten) während gekühlter Lagerung, vermehren. Bei der Transfusion dieser Blutprodukte kommt es dann zur Übertragung einer relativ hohen Keimzahl, die bei den zuvor geschwächten Empfängern häufig zur *Yersinia*-Sepsis und sogar zum Tod führen kann (*Bottone 1997; Strobel et al. 2000; Guinet et al. 2011*).

Eine Aufnahme von humanpathogenen *Y. enterocolitica* erfolgt überwiegend oral über kontaminierte Nahrungsmittel oder verunreinigtes Trinkwasser (Thompson and Gravel 1986; Tauxe et al. 1987). Das Hauptreservoir für *Y. enterocolitica* ist das Schwein (Bottone 1999). Die Übertragung auf den Menschen findet vor allem über den Verzehr von rohem oder nicht ausreichend durcherhitztem Schweinehackfleisch statt. Die gebietsweise deutlich voneinander abweichenden gemeldeten Fallzahlen bzw. Infektionen erklären sich plausibel durch den regional unterschiedlichen Verzehr von rohem Mett in Deutschland (s. Abb. 1). Die auffallend hohe Zahl an infizierten Kleinkindern



steht dieser Aussage nicht entgegen, da laut einer Studie des Robert-Koch-Instituts ein großer Teil von ihnen ebenfalls rohes Schweinehackfleisch zu sich nahm (Rosner et al. 2010; Robert-Koch-Institut 2012; Robert-Koch-Institut 2017).

Der Nachweis von *Y. enterocolitica* in Lebensmitteln und Stuhlproben ist aufgrund der intrinsischen Resistenz gegenüber einigen antimikrobiell wirksamen Substanzen durch die Verwendung von *Yersinia*-selektiven CIN-Nährböden (diese enthalten u. a. Gallensalze sowie die Antibiotika Cefsulodin, Irgasan und Novobiocin) leicht möglich (Schiemann 1979; Schiemann 1980; Devenish and Schiemann 1981; Schiemann 1982). Aufgrund ihres psychrotrophen Wachstumsverhaltens kann der Erreger auch mittels Kälteanreicherung gut isoliert werden (Adams et al. 1991).

Nach Ingestion beträgt die Inkubationszeit zwischen einem und elf Tagen (Cover and Aber 1989). Es folgt eine im Durchschnitt 1-2 Wochen andauernde symptomatische Krankheitsphase, die Erreger können aber durchschnittlich noch nach ca. 6 Wochen im Stuhl nachgewiesen werden (Marks et al. 1980). In einzelnen Fällen können durch eine Erregerpersistenz rezidivierende Beschwerden über Jahre hinweg auftreten (Hoogkamp-Korstanje et al. 1988). Da eine Infektion i. d. R. selbstlimitierend verläuft, ist eine antibakterielle Therapie nur bei Risikopatienten, komplizierten Verläufen und extraintestinaler Beteiligung angezeigt. Empfohlen werden hier Tetracykline, Cotrimoxazol bzw. Fluorchinolone allein oder in Kombination mit Gentamicin oder Cephalosporine der 3. Generation (insb. bei Sepsis, Hämochromatose, Leberinsuffizienz u. a.).

Eine natürliche Resistenz besteht bei *Y. enterocolitica* gegenüber einigen Penicillinen und Cephalosporinen der 1. Generation, die jedoch biotypspezifisch ist (s. hierzu auch Kapitel 1.4.4.3) (Cornelis and Abraham 1975; Bottone 1997; Stock and Wiedemann 1999).

### 1.2.3. Pathogenese der Yersiniose

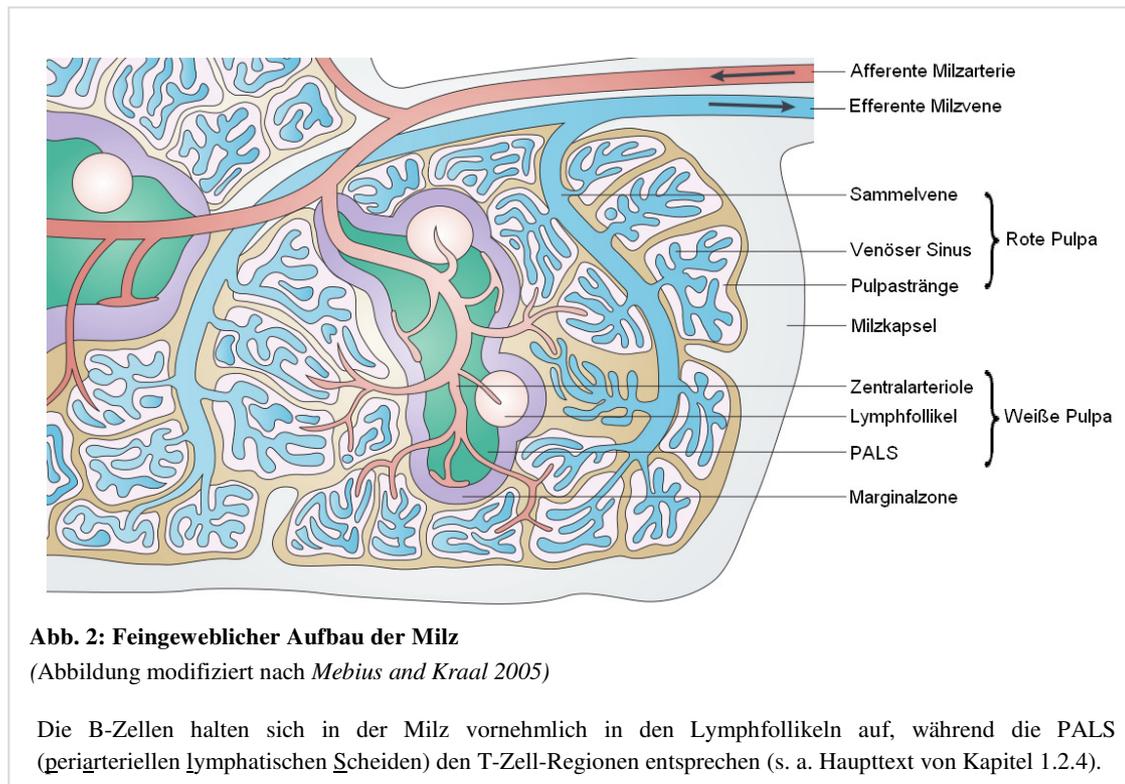
Im Vergleich zum Erreger *Y. pestis*, der über Flohbisse von infizierten Tieren (Beulenpest oder septische Form) oder Aerosole (primäre Lungenpest) übertragen wird, erfolgt die übliche Infektion mit *Y. enterocolitica* über die orale Aufnahme (Wren 2003). Sobald die Yersinien nach Passage des Magens den Dünndarm erreichen, ermöglicht ihnen die Aufnahme durch die M-Zellen der Peyer-Plaques, die sich vor allem im terminalen Ileum und der Appendix vermiformis befinden, die Barrierefunktion des Darmepithels zu durchbrechen (Hanski et al. 1989). Nach der Transzytose vom Darmlumen in die Peyer-Plaques, können sich die Bakterien innerhalb der dortigen Lymphfollikel extrazellulär replizieren und monoklonale Mikrokolonien bilden (d. h. Koloniebildung aus Einzelbakterien) (Simonet et al. 1990; Oellerich et al. 2007; Trulzsch et al. 2007). Nach ca. 6 Tagen kommt es zum vermehrten Zelluntergang und deutlichen Alterationen der Gewebearchitektur, die auch durch die vermehrte Leukozytenrekrutierung begünstigt wird. Von hier gelangen die Yersinien über Lymph- und Blutgefäße in die mesenterialen Lymphknoten bzw. Leber, Milz und andere Organe, wo sie ebenfalls monoklonale Mikrokolonien bilden (s. a. Kapitel 1.2.4) (Autenrieth and Firsching 1996; Grassl et al. 2003; Oellerich et al. 2007).

### 1.2.4. Die Milz als Spiegel der Infektion

Bei der experimentellen Yersinieninfektion im Mausmodell wird die Erregerbesiedelung bzw. Bakterienlast der Milz als Maß der Virulenz herangezogen. Die Milz stellt bei Säugetieren ein wichtiges lymphatisches Organ dar, das bereits bei der feingeweblichen Untersuchung makroskopisch in 2 Funktionsareale – die rote und die weiße Pulpa – unterteilt werden kann. Die rote Pulpa erhielt ihre Bezeichnung aufgrund der hohen Konzentration an Erythrozyten und Eisenverbindungen (rotbräunliche Farbe). Die alten und geschädigten Blutzellen (insb. Erythrozyten und Thrombozyten) werden hier herausgefiltert sowie pathologische Antigene aus dem Blutstrom durch phagozytierende Zellen „ausortiert“. Zudem dient sie als Speicher für Thrombozyten und Monozyten (Swirski et al. 2009).

Die weiße Pulpa, die von der roten Pulpa umhüllt wird, besteht aus Lymphfollikeln, in denen die Differenzierung der B-Lymphozyten stattfindet (B-Zellregion), und den an den Zentralarterien angelagerten periarteriellen lymphatischen Scheiden (PALS), in denen sich die T-Lymphozyten aufhalten (T-Zellregion). Den Übergang von roter zu weißer Pulpa markiert die Marginalzone (MZ).

Die hier sitzenden Marginalzonen-Makrophagen und dendritischen Zellen (DZ) filtern als erste Instanz pathologische Antigene aus dem Blut und präsentieren diese den Lymphozyten in der weißen Pulpa.



Als eisenreiches, lymphatisches Organ stellt die Milz eines der bevorzugten Zielorgane für *Y. enterocolitica* während der systemischen Infektion dar. Ihre Kolonisation lässt Rückschlüsse auf die Schwere der systemischen Infektion zu, während die interindividuellen Schwankungen der Besiedelung gering auszufallen scheinen (*Autenrieth et al. 1993*).

Aufgrund dieser Tatsachen wurde in den folgenden Mausinfektionsversuchen die Milz exemplarisch als Surrogat für die systemische Infektion mit *Y. enterocolitica* verwendet und genauer untersucht.

### 1.2.5. Virulenzfaktoren

Entscheidend für die Pathogenität ist eine Vielzahl von Virulenzfaktoren, deren Genexpression temperaturabhängig ist (*Marceau 2005*). Einige sind chromosomal, andere sind auf einem ca. 70 kb großen *Yersinia*-Virulenzplasmid (pYV-Plasmid) lokalisiert (*Gemski et al. 1980*), das nur bei pathogenen Yersinien nachgewiesen werden kann. Das pYV-Plasmid spielt eine wichtige Rolle bei der Infektion von Gewebe und bei der Überwindung des Immunsystems (*Zink et al. 1980; Cornelis et al. 1998*).

### 1.2.5.1. Chromosomale Virulenzfaktoren

#### 1.2.5.1.1. Typ-III-Sekretionssystem Ysa

Bei *Y. enterocolitica* 1B sind derzeit zwei eigenständige Typ-III-Sekretionssysteme (T3SS) bekannt. Neben Ysc-T3SS (*Yersinia* secretion), das vom pYV-Plasmid kodiert wird und essenziell für die Pathogenese während der extrazellulären Vermehrung ist (s. a. Kapitel 1.2.5.2.2), existiert der chromosomal kodierte *Yersinia*-Sekretionsapparat (Ysa-T3SS), welcher mit seinen 16 bisher bekannten Effektorproteinen, den sog. Ysps (*Yersinia* secreted proteins), in den frühen Stadien der intestinalen Wirtsbesiedelung eine wichtige Funktion in der Pathogenität einnimmt (Haller et al. 2000; Matsumoto and Young 2006; Witowski et al. 2008). Zeigen *ysaV*-Mutanten, welche nicht in der Lage sind Ysps zu sezernieren, eine geringere Pathogenität bei der peroralen Applikation im Mausinfektionsmodell im Vergleich zum Wildtyp, so ist ein signifikanter Unterschied zwischen den isogenen Stämmen bei intraperitonealer Inokulation nicht mehr erkennbar. Die mittlere letale Dosis (LD<sub>50</sub>) bei BALB/c-Mäusen nach peroraler Applikation ist für den Ausgangsstamm 8081v mit  $2,97 \times 10^6$  KBE (koloniebildende Einheiten) im Vergleich zur *ysaV*-Deletionsmutante mit  $2,60 \times 10^7$  KBE um fast das Zehnfache geringer, während sich die LD<sub>50</sub> nach i.p.-Inokulation mit  $1,0 \times 10^3$  KBE bzw.  $3,4 \times 10^3$  KBE nicht signifikant unterscheiden (Haller et al. 2000). Um die Ysps-Effektorproteine in vitro im Kulturüberstand in ausreichender Menge nachweisen zu können, kann deren vermehrte Abgabe durch Natriumchlorid-Zugabe bei 27 °C induziert werden (Haller et al. 2000).

#### 1.2.5.1.2. Invasin (Inv)

Eine Schlüsselrolle zu Beginn der intestinalen Invasion kommt dem 92 kDa großen Zelladhäsion Invasin (Inv) zu, das in der äußeren Membran verankert ist (Isberg et al. 1987; Pepe and Miller 1990). Seine hohe Expressionsrate bei einer Umgebungstemperatur von 25 °C bewirkt, dass Inv bei der Internalisierung von *Y. enterocolitica* bereits vielfach in der äußeren Membran verankert ist. Es vermittelt im terminalen Ileum die  $\beta_1$ -Integrin-abhängige Aufnahme der Bakterien in die M-Zellen der Peyer-Plaques und steigert so die Invasion um ein Vielfaches (Miller and Falkow 1988; Isberg and Leong 1990; Pepe and Miller 1993; Schulte et al. 2000; Trulzsch et al. 2007). Die Expression ist vom Serotyp abhängig. Während die Expression von Inv bei den Serotypen O:8 und O:9 bei 37 °C deutlich abnimmt, zeigt der Serotyp O:3 eine konstitutive Expression bei beiden Temperaturen (Uliczka et al. 2011). Des Weiteren bewirken ein saurer pH und eine hohe Osmolarität in der Umgebung auch bei 37 °C eine vermehrte Expression (Isberg et al. 1988; Pepe et al. 1994; Pepe et al. 1995). Auch wenn Inv ein wichtiger Pathogenitätsfaktor ist, bewirkt eine Deletion des Gens keinen Unterschied in der LD<sub>50</sub> nach peroraler oder i.p.-Applikation im Vergleich zum Wildtyp im Mausinfektionsmodell (Pepe and Miller 1993).

### 1.2.5.1.3. Attachment-invasion-locus (Ail)

Obwohl noch relativ wenig über das Protein Ail bekannt ist, vermutet man, dass es eine wichtige Rolle in der Pathogenität von *Y. enterocolitica* spielt, da es nur in pathogenen Stämmen gefunden wird. Das 17 kDa große Protein ist in der äußeren Membran verankert, an der Zelladhäsion und -penetration von Epithelzellen (insbesondere CHO-Zellen, aber nicht MDCK-Zellen) beteiligt (Miller and Falkow 1988). Es vermittelt zudem Serumresistenz und ermöglicht so u. a. ein verbessertes Überleben während der Zirkulation im Blutstrom (Falkow 1991; Bliska and Falkow 1992; Miller et al. 2001). Ail ist ein wichtiges Adhäsion von *Y. pestis*, da *inv* und *yadA* durch Mutationen nicht exprimiert werden (Rosqvist et al. 1988; Simonet et al. 1996; Parkhill et al. 2001; Felek et al. 2010). In vitro zeigt es die höchste Expression bei 37 °C (Pierson and Falkow 1993). Ail ist wahrscheinlich auch für die „Injektion“ von Yop-Effektorproteinen mittels Ysc-T3SS wichtig (Felek and Krukoniš 2009; Tsang et al. 2010).

### 1.2.5.1.4. Flagellen

Bei Raumtemperatur ist *Y. enterocolitica* motil. Die hierfür benötigte peritriche Begeißelung (Flagellen), deren Expression bei 37 °C reprimiert ist, hat eine wichtige Rolle in der frühen Phase der Infektion. Sie bewirkt eine gezielte Motilität zu und Anlagerung an die M-Zellen und fördert somit die Invasion (Young et al. 2000). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die Flagellen von *Y. enterocolitica* wichtig für die Bildung von Biofilmen sind (Kim et al. 2008).

### 1.2.5.1.5. Lipopolysaccharid (LPS)

Das Lipopolysaccharid ist ein Hauptbestandteil der äußeren Membran von gramnegativen Bakterien. Es bewirkt eine hydrophile Oberfläche und bietet so u. a. Schutz vor Phagozytose. Ein LPS-Molekül besteht aus drei Regionen (I – III): (I) aus dem in der äußeren Membran verankerten Lipid A, das bei Raumtemperatur (21 °C) gebildet vornehmlich in hexa-acylierter Form vorliegt (Rebeil et al. 2004; Perez-Gutierrez et al. 2010). In dieser Form stimuliert das LPS die Rekrutierung weiterer Immunzellen über die Aktivierung des Toll-Like-Rezeptors (TLR)-4 (Poltorak et al. 1998; Rebeil et al. 2004; Perez-Gutierrez et al. 2010; Reinés et al. 2012). In hexa-acylierter Form kann Lipid A über seine negative Ladung sog. CAMPs (cationic antimicrobial peptides) vermehrt binden und neutralisieren. (II) Die zweite Region stellt das Kern-Oligosaccharid mit seinen inneren und äußeren Kern-Teilen dar, das neben seiner Funktion als Virulenzfaktor für die Integrität der äußeren Membran und die Resistenz gegenüber Serum, hydrophoben Substanzen und CAMPs wichtig ist. (III) Die dritte Region umfasst das O-Polysaccharid (O-Antigen), dessen variabler Aufbau zur Charakterisierung des Bakteriums mittels serologischer Methoden genutzt wird (Zhang et al. 1997; Skurnik et al. 1999).

Das O-Antigen wird zur Ausbildung der vollen Virulenz benötigt (*al-Hendy et al. 1992*). Sein Vorhandensein beeinflusst die Expression anderer Virulenzfaktoren, Mutationen bewirken eine verringerte Kolonisation in den Peyer-Plaques und Funktionsänderungen anderer Virulenzfaktoren (*Nikaido and Vaara 1985; Zhang et al. 1997; Bengoechea et al. 2004; Silhavy et al. 2010*). Die optimale Expression des vollständigen O-Antigens liegt bei 22-25 °C. Bei 37 °C wird überwiegend unvollständiges LPS, d. h. überwiegend tetra-acyliertes Lipid A mit kurzkettigem O-Antigen und abgeschwächter Endotoxinwirkung, produziert, das eine geringere Immunantwort des Wirts bewirkt (*Bengoechea et al. 2004; Rebeil et al. 2004; Perez-Gutierrez et al. 2010*).

### **1.2.5.1.6. Yersiniabactin (Ybt)**

Die Aufnahme von Eisen aus der Umgebung ist eine wesentliche Voraussetzung für die Ausbildung der vollständigen Pathogenität im Mausinfektionsmodell, da sie essenziell für die Vermehrung im Wirt und die Ausbildung einer systemischen Infektion ist (*Carniel 2001*). Um sich vor bakterieller Besiedelung zu schützen, wird Eisen im Blutstrom von Säugetieren hauptsächlich proteingebunden transportiert. Yersiniabactin ist eine heterozyklische Verbindung, die als Siderophor Eisen (Fe<sup>III</sup>-Ionen) auch aus eukaryoten Proteinen komplexieren und so dem Bakterium durch Wiederaufnahme bereitstellen kann. *Y. enterocolitica* kann hiermit die vom Wirt künstlich geschaffene Eisenknappheit überwinden und den Wirt erfolgreich kolonisieren. 11 Gene, welche für die Biosynthese (*irp1, irp2, ybtE, ybtS, ybtT, ybtU*), die Wiederaufnahme (*fyuA, ybtP, ybtQ, ybtX*) und die Genregulation (*ybtA*) notwendig sind, befinden sich innerhalb der „High-Pathogenicity-Island“ (HPI), einem chromosomalen Abschnitt, der nur bei dem mausletalen Biotyp 1 B vorkommt (*Heesemann et al. 1993b; Carniel 2001; Perry and Fetherston 2011*). Während die Synthese und die Internalisierung des mit Eisen beladenen Yersiniabactins in Grundzügen verstanden werden, ist die Freisetzung von Yersiniabactin noch weitestgehend unbekannt.

### **1.2.5.1.7. Yersinia-hitzestabiles Enterotoxin (Yst)**

Ein weiterer chromosomaler Pathogenitätsfaktor ist das hitzestabile Enterotoxin Yst, welches vornehmlich in pathogenen Stämmen nachgewiesen werden kann (*Pai and Mors 1978; Delor et al. 1990*). Das Expressionsmaximum liegt in vitro bei Temperaturen um 26 °C, die Transkription kann aber auch bei 37 °C bei einem Ileum Darminhalt-ähnlichen pH von 7,5 induziert werden (*Amirmozafari and Robertson 1993; Mikulskis et al. 1994*). Über die Aktivierung der Guanylatcyclase in der Darmmukosa und des damit verbundenen intrazellulären Anstiegs von cGMP verursacht es die typisch wässrige Diarrhö (*de Sauvage et al. 1991; Delor and Cornelis 1992*).

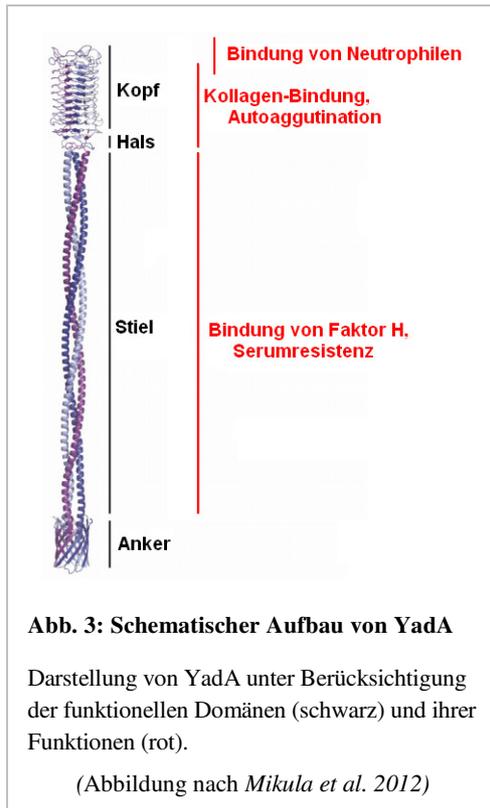
#### 1.2.5.1.8. Mucoïd-*Yersinia*-Faktor (Myf)

Der Myf ist ein Polymer aus 21 kDa großen Proteinuntereinheiten, der nach Translokation über die äußere Membran eine fibrilläre Kapsel bildet, die das Bakterium umhüllt (Iriarte et al. 1993). Der *myf*-Locus besteht aus 5 Genen: *myfA*, *myfB*, *myfC*, *myfE* und *myfF*, wobei *myfA* die o. g. Untereinheit bildet, *myfB* und *myfC* für die Pilusbildung und den Transport verantwortlich sind und *myfE* und *myfF* für 2 Transkriptionsfaktoren kodieren (Iriarte and Cornelis 1995). *MyfA* ist bei den virulenten Serotypen von *Y. enterocolitica* hoch konserviert und galt lange als spezifischer Virulenzfaktor, konnte aber auch bei apathogenen Biotyp 1A-Stämmen – wenn auch in deutlich veränderten, variablen Sequenzen – nachgewiesen werden (Diaz et al. 1985; Toyos et al. 1986; Iriarte et al. 1993; Batzilla et al. 2011). Die Bedeutung des Myf für die Pathogenität ist noch nicht geklärt. *MyfA* ist zu 44 % identisch mit dem pH 6-Antigen von *Y. pestis*, im Gegensatz zu *Psa* von *Y. pseudotuberculosis* und vielen anderen Fimbrien-Antigenen vermittelt es aber keine Hämagglutination (Iriarte et al. 1993).

#### 1.2.5.2. Extrachromosomale Virulenzfaktoren

##### 1.2.5.2.1. *Yersinia*-Adhäsın A (YadA)

Um die *Yersinia*-spezifische Pathogenität im Wirt entfalten zu können, benötigt *Y. enterocolitica* das ca. 70kb große Plasmid pYV (*Yersinia*-Virulenz) (Cornelis et al. 1987). Auf diesem Virulenzplasmid befindet sich u. a. das Gen für das kollagenbindende *Yersinia*-Adhäsın A (YadA), das bei 37 °C als Homotrimer in der Außenmembran über den C-Terminus fixiert ist und die gesamte Oberfläche mit einer fibrillären Matrix bedeckt (Kapperud et al. 1985; Kapperud et al. 1987; Emödy et al. 1989; El Tahir and Skurnik 2001). Das trimere Autotransporter-Adhäsın stellt einen Prototyp der Typ-Vc-Sekretionssysteme dar (Muller et al. 2011). Das Trimer besitzt eine Lollipop-artige Struktur mit einer N-terminalen Kopf- und Halsregion, auf die ein helikaler (*coiled-coil*) Stiel und eine Ankerregion C-terminal folgen (s. a. Abb. 3) (Hoiczky et al. 2000; Nummelin et al. 2004; Mikula et al. 2012).



Die Transkription von *yadA*, dessen Protein zunächst als Protein 1, P1 bzw. Yop1 bezeichnet wurde, ist vom Transkriptionsaktivator LcrF abhängig, welcher die Expression bei 37 °C (aber nicht bei 30 °C) Ca<sup>2+</sup>-unabhängig ermöglicht (Bolin et al. 1982; Skurnik et al. 1984; Skurnik and Wolf-Watz 1989; Lambert de Rouvoit et al. 1992; Skurnik and Toivanen 1992).

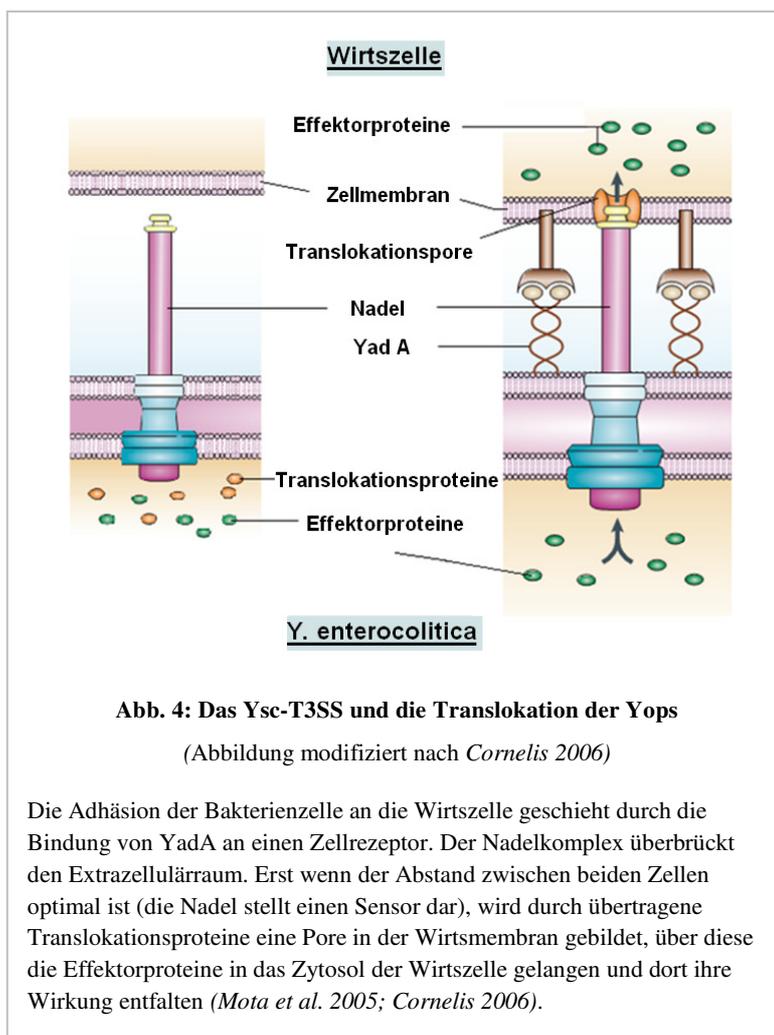
Während YadA bei *Y. pseudotuberculosis* verzichtbar für die Virulenz erscheint, ist das Gen bei *Y. pestis* durch eine Basendeletion mit Leserasterverschiebung zum Stop-Kodon sogar vollständig deaktiviert und wirkt bei Rekomplettierung als Antivirulenzfaktor (Rosqvist et al. 1988; Skurnik and Wolf-Watz 1989; Han and Miller 1997). Bei *Y. enterocolitica* ist YadA aber essentiell für die Krankheitsentstehung und die Persistenz in den Peyer-Plaques und der Milz im

Mausinfektionsmodell. Eine Deletion von YadA bei *Y. enterocolitica* führt im Mausinfektionsmodell zur Avirulenz (Bolin et al. 1982; Skurnik and Wolf-Watz 1989; Pepe et al. 1995). YadA vermittelt *Yersinia*-Zellaggregation (Autoagglutination), Komplementlyseresistenz (Überleben in Humanserum), *Yersinia*-Bindung an extrazellulären Matrixproteinen (ECM z. B. Fibronectin, Kollagen), Adhärenz an Epithelzellen und professionellen Phagozyten (z. B. polymorphkernige Neutrophile) sowie an der intestinalen Mucosa (Heesemann et al. 1983; Heesemann and Grüter 1987; Emödy et al. 1989; Roggenkamp et al. 1996).

#### 1.2.5.2.2. Typ-III-Sekretionssystem Ysc-T3SS

Der Großteil der ca. 70 auf dem pYV-Plasmid befindlichen Gene kodieren für das Typ-III-Sekretionssystem Ysc-T3SS, die zugehörigen Translokations- und Effektorproteine, sog. *Yersinia* outer proteins (Yops), und deren Chaperone (Cornelis and Wolf-Watz 1997). Der Ysc-Apparat, ein Nadelkomplex, der die innere und äußere Membran des Bakteriums durchspannt, injiziert bei Anlagerung an die Zielzelle – v. a. Makrophagen und polymorphkernige Neutrophile (PMN) – die Yops in deren Zytosol, wo sie ihre Wirkung entfalten und so den Abwehrmechanismen des Immunsystems entgegenwirken. Sie hemmen Zytoskelettlagerungen und damit die Phagozytose (Visser et al. 1995; Iriarte and Cornelis 1998). Weiterhin reduzieren sie die Freisetzung von Chemokinen und pro-inflammatorischen Zytokinen, was eine Anlockung weiterer Phagozyten unterbindet (Boland and Cornelis 1998). Auch die Aktivierung von

B- und T-Lymphozyten kann über die Freisetzung von Yops inhibiert werden (Yao *et al.* 1999). Dies alles erleichtert den Yersinien die extrazelluläre Vermehrung im lymphatischen Gewebe. (Cornelis 2002) Die Sekretion der Yops über das T3SS, die *in vivo* durch den Zellkontakt zu den Zielzellen initiiert wird (daher auch die Bezeichnung kontaktabhängiges Sekretionssystem), kann *in vitro* u. a. durch Calciummangel bei 37 °C angeregt werden (Heesemann and Laufs 1983; Heesemann *et al.* 1986; Cornelis and Wolf-Watz 1997).



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

#### 1.3.1. Einführung

*Y. pestis* und *Y. pseudotuberculosis* haben keine spezifischen Antibiotikaresistenzgene im Chromosom, wogegen *Y. enterocolitica* 2  $\beta$ -Laktamase-Gene im Chromosom hat. Inzwischen sind Multiresistenzplasmide bei *Y. pestis* beschrieben. Trotzdem wird zur Behandlung von *Y. pestis/Y. pseudotuberculosis* kein  $\beta$ -Laktam-Antibiotikum zur Therapie empfohlen.

Die Gruppe der  $\beta$ -Laktam-Antibiotika umfasst auf proliferierende Erreger bakterizid-bakteriolytisch wirkende Antiinfektiva, deren charakteristisches Merkmal der  $\beta$ -Laktam-Ring in ihrer Strukturformel (meistens bityklische Moleküle) darstellt. Eine Unterteilung ist anhand ihrer zweiten Ringstruktur (Kernstruktur) möglich (*Dalhoff et al. 2006*).

Hier unterscheidet man zurzeit 4 Gruppen:

- (I)  $\beta$ -Laktame mit einem gesättigten fünfgliedrigen Ring
  - a. Pename,  $\beta$ -Laktame mit einem Thiazolidin-Ring (z. B. Ampicillin)
  - b. Carbapeneme,  $\beta$ -Laktame mit einem Pyrrolidin-Ring
  - c. Clavame bzw. Oxapeneme,  $\beta$ -Laktame mit einem Oxazolidin-Ring (z. B. Clavulansäure)
  
- (II)  $\beta$ -Laktame mit einem ungesättigten fünfgliedrigen Ring
  - a. Peneme,  $\beta$ -Laktame mit einem 2,3-Dihydrothiazol-Ring (z. B. Faropenem)
  - b. Carbapeneme,  $\beta$ -Laktame mit einem 2,3-Dihydro-1H-Pyrrol-Ring (z. B. Meropenem)
  
- (III)  $\beta$ -Laktame mit einem ungesättigten sechsgliedrigen Ring
  - a. Cepheme,  $\beta$ -Laktame mit einem 3,6-Dihydro-2H-1,3-Thiazin-Ring (z. B. Ceftriaxon)
  - b. Carbacepheme,  $\beta$ -Laktame mit einem 1,2,3,4-Tetrahydropyridin-Ring (z. B. Loracarbef)
  - c. Oxacepheme,  $\beta$ -Laktame mit einem 3,6-Dihydro-2H-1,3-Oxazin-Ring (z. B. Moxalactam)
  
- (IV) Monozyklische  $\beta$ -Laktame, die Monobactame (z. B. Aztreonam).

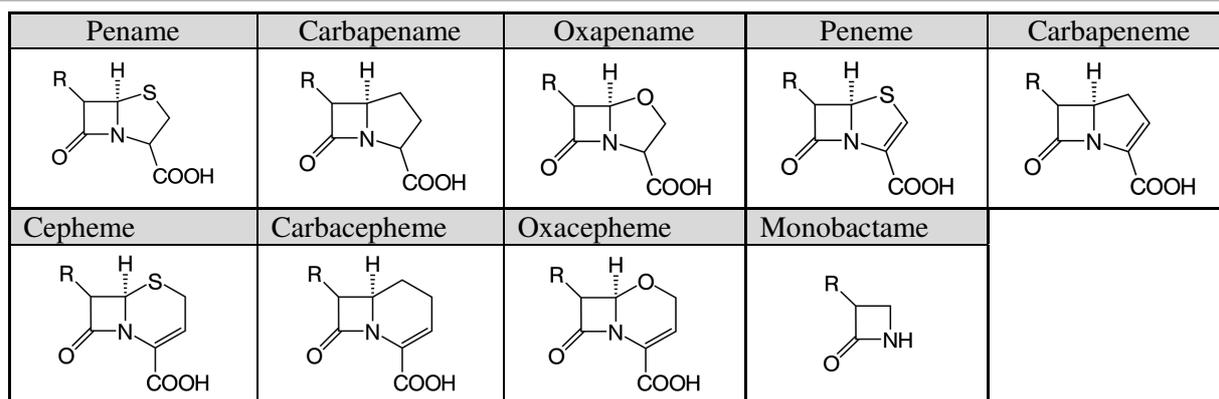


Abb. 5: Die Kern-Strukturen der  $\beta$ -Laktam-Antibiotika

Die Peneme, nach ihrem bekanntesten Vertreter Penicillin G auch Penicilline genannt, lassen sich in ihrer Struktur von der 6-Aminopenicillansäure (6-APA) ableiten (*Batchelor et al. 1959; Cole 1966*). Weiter unterteilt werden sie in  $\beta$ -Laktamase sensible (z. B. Benzylpenicillin) und resistente (z. B. Oxacillin) Penicilline mit engem Wirkspektrum sowie Penicilline mit weitem Wirkspektrum (z. B. Piperacillin).

Den Cephemen gemeinsam ist der Cephem-Ring (s. Abb. 5). Sie setzen sich zusammen aus den Cephalosporinen (z. B. Cefotaxim) und den Cephamycinen (z. B. Cefoxitin). Die Cephalosporine basieren auf der 7-Aminocephalosporinsäure (7-ACA), die aus dem natürlich vorkommenden von *Acremonium chrysogenum* produzierten Cephalosporin C gewonnen werden kann (*Abraham and Newton 1961; Parmar et al. 1998*). Sie lassen sich nach ihrer Wirkung und Stabilität gegenüber  $\beta$ -Laktamasen entsprechend ihrer Entstehungsgeschichte in 1.-5. Generation Cephalosporine unterteilen, wobei z. B. Cephalosporine der 3. Generation verglichen zur 1. Generation eine erhöhte Stabilität gegenüber  $\beta$ -Laktamasen und ein breiteres Wirkspektrum besitzen, dieses sich aber vom grampositiven in den gramnegativen Bereich verschiebt (*Archer and Kitchell 1966; Karow and Lang-Roth 2012*). Auch wenn die Untergliederung in 4. und 5. Generation Cephalosporine noch nicht allgemein akzeptiert ist, zeigen ihre Mitglieder ein erweitertes Spektrum gegenüber gramnegativen und grampositiven Bakterien bei gleichzeitig erhöhter  $\beta$ -Laktamase-Stabilität.

Die Cephamycine sind im Vergleich zu den Cephalosporinen auch gut gegenüber anaeroben Bakterien wirksam und besitzen eine höhere Stabilität gegenüber einigen  $\beta$ -Laktamasen. Sie besitzen an der 7- $\alpha$ -Position eine Methoxy-Gruppe (*Nagarajan et al. 1971; Mascaretti 2003*). Sie werden häufig in die Kategorie der 2. Generation Cephalosporine eingruppiert (z. B. Cefoxitin oder Cefotetan), weshalb die Cephem-Gruppe nicht selten mit den Cephalosporinen gleichgesetzt wird.

Zu berücksichtigen ist bei einer kalkulierten antibakteriellen Therapie, dass beinahe alle Cephalosporine keine ausreichende Wirksamkeit gegenüber Listerien, Mykoplasmen, MRSA und Enterokokken besitzen (*Karow and Lang-Roth 2012*). Dies kann aber durch die gleichzeitige Gabe von Aminoglykosiden oder Makroliden umgangen werden.

**Tabelle 1: Einteilung der oralen Cephalosporine entsprechend der PEG.**

(Paul-Ehrlich-Gesellschaft für Chemotherapie e.V.)

Orale Cephalosporine (nach Scholz et al. 1999)		
Gruppe:	Hauptindikationen:	Vertreter (exemplarisch):
Gruppe 1	Infektionen von Haut und Weichteilen, eingeschränkt auch Atemwege	Cefalexin
		Cefaclor
Gruppe 2	Infektionen von Haut, Weichteilen und Atemwegen sowie unkomplizierte Harnwegsinfektionen	Cefprozil
		Cefuroxim
Gruppe 3	Komplizierte Atemwegsinfektionen, Erkrankungen durch Enterobacteriaceae, Infektionskrankheiten immundefizienter Patienten.	Cefpodoxim
		Ceftibuten
		Cefixim

Die Klassifikation in Generationen stimmt weitestgehend mit der Einteilung der Paul-Ehrlich-Gesellschaft für Chemotherapie e. V. (nachfolgend PEG genannt) überein, welche eine Einteilung in Gruppen (Gruppe 1, 2, 3a, 3b, 4 und 5) entsprechend ihrer Wirksamkeit zur besseren Praktikabilität empfiehlt (s. a. Tabelle 1 und Tabelle 2) (Scholz et al. 1999; Vogel et al. 1999; Bodmann et al. 2010).

In dieser Arbeit wird vornehmlich die zurzeit international gebräuchlichere Einteilung in Generationen verwendet.

**Tabelle 2: Einteilung der parenteralen Cephalosporine entsprechend der PEG.**

(Paul-Ehrlich-Gesellschaft für Chemotherapie e.V.)

Parenterale Cephalosporine (nach Vogel et al. 1999; Bodmann et al. 2010)		
Gruppe:	Wirksamkeit:	Vertreter (exemplarisch):
Gruppe 1	Gut wirksam gegenüber grampositiven, aber nur schwach gegenüber gramnegativen Bakterien.	Cefazolin
Gruppe 2	Verschiebung der Wirksamkeit vom grampositiven ins gramnegative Erregerspektrum.	Cefuroxim
		Cefotiam
Gruppe 3a	Bessere Aktivität im gramnegativen Bereich bei schwächerer Wirkung gegen Staphylokokken.	Cefotaxim
		Ceftriaxon
Gruppe 3b	Ähnliches antibakterielles Wirkspektrum wie Gruppe 3a, jedoch zusätzlich gute Pseudomonas-Aktivität.	Ceftazidim
Gruppe 4	Schmales antibakterielles Spektrum, Therapeutisch relevant ist nur die Aktivität gegen <i>P. aeruginosa</i> .	Cefepim
		Cefpirom
Gruppe 5	Wirksam gegen anaerobe Bakterien, unzureichend gegen Staphylokokken. Wirksamkeit gegen gramnegative Bakterien zwischen Gruppe 2 und Gruppe 3a/b	Ceftobiprol

Die Carbapeneme (z. B. Meropenem) basieren auf dem aus *Streptomyces catteya* gewonnenen Thienamycin (*Birnbaum et al. 1985*). Sie ähneln in ihrem Grundgerüst den Penicillinen (Penamen), wobei das Schwefelatom an Position 1 gegen ein Kohlenstoffatom ausgetauscht und eine ungesättigte Kohlenstoff-Kohlenstoff-Doppelbindung vorhanden ist. Sie besitzen im klinischen Gebrauch derzeit das breiteste Wirkspektrum (auch gegenüber vielen Anaerobiern), sind äußerst stabil gegenüber  $\beta$ -Laktamasen, zeigen aber auch das stärkste Induktionspotential für die Derepression von  $\beta$ -Laktamase-Genen (z. B. *ampC/ampR*) (*Edwards et al. 1989; Theuretzbacher 2004; Karow and Lang-Roth 2012*).

Die Peneme sind wie die Carbapeneme ungesättigt, besitzen ein Schwefelatom im Ring und werden vollsynthetisch hergestellt. Der zurzeit einzige Vertreter Faropenem besitzt eine sehr gute Wirksamkeit auch gegenüber anaeroben Bakterien und ist im Gegensatz zu den Carbapenemen oral verfügbar (*Woodcock et al. 1997*).

Monobactame (z. B. Aztreonam) haben – wie bereits erwähnt – eine monozyklische Struktur. Sie sind  $\beta$ -Laktamase-stabil, zeigen keine Kreuzhypersensitivitätsreaktionen zu Penicillinen und werden als Reserveantibiotika gegen resistente aerobe gramnegative Erreger eingesetzt (*Karow and Lang-Roth 2012*). Da sie im Gastrointestinaltrakt nicht resorbiert werden, müssen sie parenteral verabreicht werden.

$\beta$ -Laktam-Antibiotika entfalten ihre bakterizide Wirkung v. a. im Zellwandbereich (Peptidsequenz). Aufgrund der selektiven Wirkung auf bakterientypische Transpeptidasen besitzen sie eine gute Verträglichkeit und eine große therapeutische Breite (*Karow and Lang-Roth 2012*).

Einige Penicilline werden in der Klinik zusammen mit  $\beta$ -Laktamase-Inhibitoren (Clavulansäure, Sulbactam oder Tazobactam) kombiniert. Diese besitzen selbst keine bzw. nur eine geringe antibakterielle Wirkung, inaktivieren aber die  $\beta$ -Laktamasen, indem sie mit ihnen irreversible Verbindungen bilden, und machen die Bakterien somit anfälliger gegenüber den gleichzeitig applizierten  $\beta$ -Laktam-Antibiotika (*Livermore 1993; Essack 2001; Drawz and Bonomo 2010*).

Seit der Erstbeschreibung des Penicillins durch Alexander Fleming 1929 kamen zur Gruppe der  $\beta$ -Laktam-Antibiotika allein bis 1992 noch über 50 Penicilline, 70 Cephalosporine, 3 Carbapeneme und ein Monobactam hinzu, um der schnell fortschreitenden Resistenzentwicklung entgegenzuwirken (*Fleming 1929; Neu 1992*). Während die ersten Wirkstoffe zunächst von Pilzen (*Penicillium notatum, Acremonium chrysogenum* (ehemals *Cephalosporium acremonium*) u. a.) gewonnen wurden, werden neuere  $\beta$ -Laktam-Antibiotika halb- bzw. vollsynthetisch hergestellt.

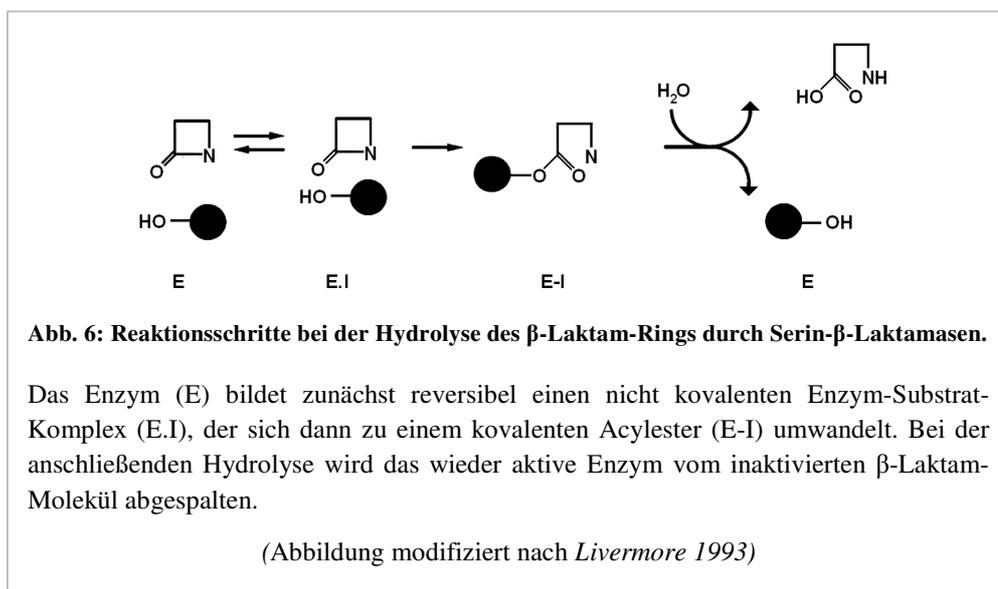
Die Wirksamkeit von Antibiotika wird *in vitro* häufig mit der minimalen Hemmkonzentration (MHK) angegeben. Diese bezeichnet die minimale Konzentration eines antimikrobiellen Hemmstoffes, welche das sichtbare mikrobielle Wachstum einer Übernachtskultur hemmt (*Andrews 2001*).

### 1.3.2. Wirkmechanismus

Ein wichtiger Bestandteil der Zellwand von grampositiven als auch gramnegativen Bakterien ist das Peptidoglykan (auch Murein genannt), das für die Integrität der Zelle eine zentrale Rolle spielt (*Weidel and Pelzer 1964*). Es wirkt dem erhöhten inneren osmotischen Druck entgegen und verhindert so das Platzen des Bakteriums, was selbst während der Proliferation gewährleistet sein muss.

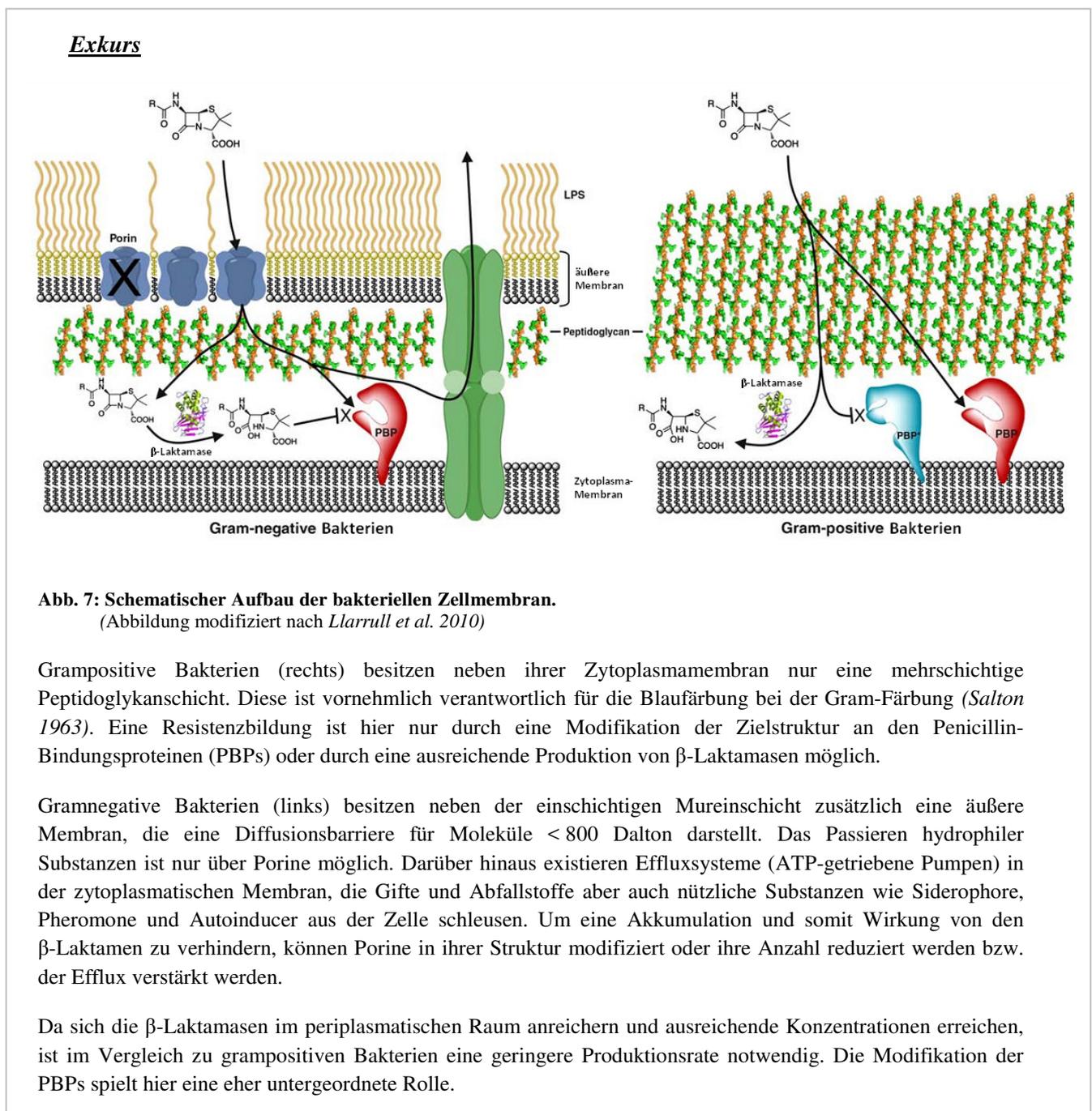
Bei der Synthese des Mureins sind Transpeptidasen und Carboxypeptidasen – sog. Penicillin-Bindungsproteine (PBP) – involviert, wobei die neu gebildete Peptidoglykanstränge durch Transpeptidasen netzartig miteinander ligiert werden (*Bugg and Walsh 1992*). Die  $\beta$ -Laktam-Antibiotika sind Strukturanaloga der terminalen D-Alanyl-D-Alanin-Dipeptide dieser Stränge. Sie binden im Aktivitätszentrum der PBP, machen diese so wirkungslos und verhindern die Peptidvernetzung (*Holtje 1998*). Es entstehen Zellwanddefekte bei proliferierenden Bakterien, welche unterstützt durch die gleichzeitige Wirkung von Autolysinen (Amidasen) und der Produktion von radikalen Sauerstoffspezies letztendlich zu Zelluntergang und Lyse führen (*Tomasz et al. 1970; Tomasz 1979; Waxman et al. 1980; Kohanski et al. 2007; Kohanski et al. 2010*).

Darüber hinaus werden auch bakterielle Autolysine durch die  $\beta$ -Laktam-verursachte Zellwandschädigung induziert, die die Bakteriolyse beschleunigen (*Normark and Normark 2002*).



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

Die Wirksamkeit von  $\beta$ -Laktam-Antibiotika ist abhängig von der Erreichbarkeit der Zielstruktur, der Fähigkeit diese zu inaktivieren und der Hydrolysestabilität gegenüber  $\beta$ -Laktamasen. Bakterien haben unterschiedliche Resistenzmechanismen entwickelt, um sich der bakteriziden Wirkung der  $\beta$ -Laktam-Antibiotika zu entziehen (Poole 2004). Um eine hohe Resistenz zu erreichen, ist häufig ein Zusammenspiel verschiedener Mechanismen notwendig.



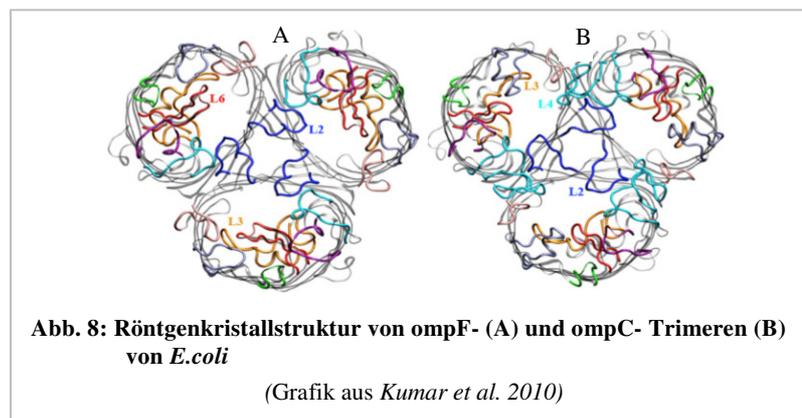
#### 1.4.1. Modifikation der Penicillin-Bindungsproteine

Penicillin-Bindungsproteine (PBP) kommen bei nahezu allen Bakterien (nicht bei zellwandlosen Bakterien wie z. B. *Mykoplasma* spp.) vor. Es gibt zahlreiche Varianten, die sich in ihrer Anzahl (i. d. R. zwischen vier bis acht verschiedene PBP), Menge, Größe (ca. 30 bis 120 kDa) und Affinität zu  $\beta$ -Laktam-Antibiotika voneinander unterscheiden (*Georgopapadakou and Liu 1980*). Da sie eine große strukturelle Ähnlichkeit zu den  $\beta$ -Laktamasen besitzen, erscheint die Entwicklung aus einem gemeinsamen Vorläuferenzym („Homologie“) wahrscheinlich, zumal alle PBP die Fähigkeit besitzen – wenn auch nur in weit geringerem Umfang –  $\beta$ -Laktame zu hydrolisieren (*Amanuma and Strominger 1980; Ghuysen 1994; Knox et al. 1996; Kong et al. 2010*). In der Zytoplasmamembran verankert ragen die PBP bei gramnegativen Bakterien in den periplasmatischen Raum (*Paul et al. 1992*). Mit ihren enzymatischen Funktionen (Carboxypeptidase-, Endopeptidase-, Transpeptidase- und Transglykosylase-Aktivität) sind sie ein essentieller Bestandteil der Peptidoglykansynthese und -modifikation und nehmen eine Schlüsselrolle bei der Zellseptierung und -teilung ein (*Holtje 1998*). Ihre Hemmung kann zu Wachstumsanomalien, Replikationsinhibition oder Bakterizidie führen (*Spratt 1975*). Da die PBP die Zielstrukturen der  $\beta$ -Laktam-Antibiotika sind, können Mutationen im Bereich der Bindungsstelle zu einer geringeren Affinität und somit geringeren Wirksamkeit der  $\beta$ -Laktam-Antibiotika führen (*Blumberg and Strominger 1974; Spratt 1980; Waxman and Strominger 1983; Tomasz 1986; Georgopapadakou 1993*). Um jedoch ein hohes Resistenzniveau (hohe MHK) erreichen zu können, sind häufig Mutationen an mehreren PBP notwendig, da die  $\beta$ -Laktam-Antibiotika oft nicht-selektiv an verschiedene PBP gleichzeitig binden und somit an verschiedenen Stellen wirken können (*Spratt 1994*). Insbesondere für grampositive Bakterien stellen PBP-Alterationen einen bedeutenden Schutz dar, da ihnen die äußere Membran und somit eine wichtige Diffusionsbarriere gegenüber den  $\beta$ -Laktam-Antibiotika fehlt und diese direkt an den PBP wirken können. Als eindruckliches Beispiel ist hier das Bakterium *Streptococcus pneumoniae* zu nennen, das seine Resistenz gegenüber  $\beta$ -Laktam-Antibiotika lediglich über die Veränderung der PBP erhält (*Spratt 1994*).

## 1.4.2. Porine

### 1.4.2.1. Einführung

Im Gegensatz zu grampositiven Bakterien besitzen gramnegative Bakterien eine äußere Membran. Diese besteht aus einer asymmetrisch angeordneten Phospholipiddoppelschicht mit verschiedenen Lipoproteinen und Lipopolysacchariden an der Oberfläche. Sie dient u. a. als Permeabilitätsbarriere und schützt das Bakterium so vor dem unkontrollierten Einstrom von gefährdenden Stoffen wie Gallensalzen, Lysozym oder Antibiotika (*Silhavy et al. 2010*). Der Austausch hydrophiler Substanzen mit der Umgebung wird über spezielle Transmembranproteine, sog. Porine, gewährleistet. Diese machen ca. 70 % der Außenmembran-Proteine aus und bewirken einen Siebeffekt (*Nikaido 1992; Isaeva et al. 2012*). Porine erlauben die passive Diffusion von kleinen hydrophilen Substanzen (wie Ionen, Nährstoffen und „Abfallprodukten“) bis zu einem Molekulargewicht (MG) von ca. 600 Da über die äußere Membran. Die Permeationsrate solcher Moleküle hängt ab von ihrer Größe, ihrer Ladung und ihrer Konfiguration (*Nikaido and Vaara 1985*). Größere, hydrophobe oder mehrfach negativ geladene Moleküle mit sperrigen Seitenketten passieren die Porine weitaus schlechter als kleine, kompakte, zwitterionische oder einfach negativ geladene Moleküle (*Yoshimura and Nikaido 1985*). Auch  $\beta$ -Laktam-Antibiotika müssen die äußere Membran überwinden, um an ihren Zielort zu gelangen. Da für die Wirksamkeit der  $\beta$ -Laktam-Antibiotika die Konzentration im periplasmatischen Raum entscheidend ist, spielt ihre Membranpenetrationsfähigkeit eine wichtige Rolle (*Heesemann 1993*). Aufgrund ihrer hydrophilen Eigenschaft geschieht die Translokation vornehmlich über Porine (*Yoshimura and Nikaido 1985*). Kommt es durch eine Mutation zu einer Reduktion der Anzahl der Porine oder einer Modifikation des Porinlumens, zum Wechsel des Porins oder der Expression von Porin-blockierenden Molekülen, kann dies zu einer verminderten Diffusion der passierenden Stoffe über die äußere Membran und somit langsameren Akkumulation im periplasmatischen Raum führen (*Pages et al. 2008*). Eine Resistenzentwicklung kann die Folge sein, teils auch gegenüber mehreren chemisch nichtverwandten Antibiotikaklassen (*Delcour 2009*). Bei gramnegativen Bakterien führt eine alleinige Verringerung der Permeabilität der äußeren Membran häufig nur zu einem geringfügigen Anstieg der Resistenz, kann aber mit anderen Resistenzmechanismen synergistisch wirken (*Nikaido 1989; Nikaido 1994*).



### 1.4.2.2. Porin OmpF (Outer membrane protein F)

Zu den Hauptvertretern der Porine zählen die integralen Membranproteine OmpC und OmpF. Beide Porine weisen bei *Y. enterocolitica* strukturell eine ähnliche  $\beta$ -„barrel“-Struktur mit 16  $\beta$ -Strängen und gleicher Anzahl an extrazellulären langen „loops“ (L1-L8) als auch periplasmatischen kurzen „turns“ (T1-T8) auf und bilden in der äußeren Membran durch Trimerisierung eine Pore (s. a. Abb. 8) (Vostrikova et al. 2013). Der Innendurchmesser wird begrenzt durch L3, das in das Porinlumen ragt und in den Öffnungsmechanismus involviert ist (Guzev et al. 2005).

Trotz ihrer strukturellen Ähnlichkeit unterscheiden sich beide Porine in wesentlichen Punkten: OmpF bildet bei *E. coli* einen größeren Kanal (funktionelle Querschnittsfläche („solvent accessible area“)  $25 \text{ \AA}^2$ ) als OmpC (funktionelle Querschnittsfläche  $18,6 \text{ \AA}^2$ ), was eine schnellere Diffusion von Nährstoffen (bis 600 Da), aber auch schädlichen Substanzen wie Antibiotika in den periplasmatischen Raum ermöglichen kann (Kumar et al. 2010). Bei *Y. enterocolitica* hat OmpF eine höhere molekulare Masse (38,2 kDa) und besitzt eine höhere Leitfähigkeit als OmpC (37,5 kDa) (Vostrikova et al. 2013).

Des Weiteren wird die Expression von OmpC und OmpF reziprok reguliert. Kommt es z. B. zu einem Anstieg der Osmolarität im Medium oder einer Temperaturerhöhung auf  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ , wird vermehrt OmpC gebildet und gleichzeitig die Expression von OmpF reduziert (Brzostek and Raczkowska 2007; Vostrikova et al. 2013). Einige Faktoren, die bei *E. coli* zu einer verringerten Expression von OmpF führen, sind in Tabelle 3 genannt.

Da eine rasche Anpassung des Bakteriums an seine Umgebung lebenswichtig ist, kann die Genexpression von *ompF* sowohl bei der Transkription als auch posttranskriptional beeinflusst werden (Pratt et al. 1996; Delihias and Forst 2001).

Doch selbst bereits in die Membran inserierte OmpF-Porine können inaktiviert werden, z. B. durch niedrige pH-Werte und Bindung von z. T. selbst produzierten Polyaminen z. B. Spermin, Spermidin und Cadaverin (Kanalkblockade) (Delcour 2009).

**Tabelle 3:** Faktoren, die zu einer verringerten OmpF-Expression führen.

(nach Pratt et al. 1996; Delihias and Forst 2001)

Oxidativer Stress
Hydrogenperoxid
Anstieg der Osmolarität
Temperaturanstieg
Nährstoffe
Schwache Säuren
Hypochlorige Säure
Geringer pH-Wert
Antibiotika
Kationische Peptid-Antibiotika
Infektion mit $\lambda$ -Phagen
Gallensalze
Salizylat
Ethanol
$\text{Cu}^{2+}$

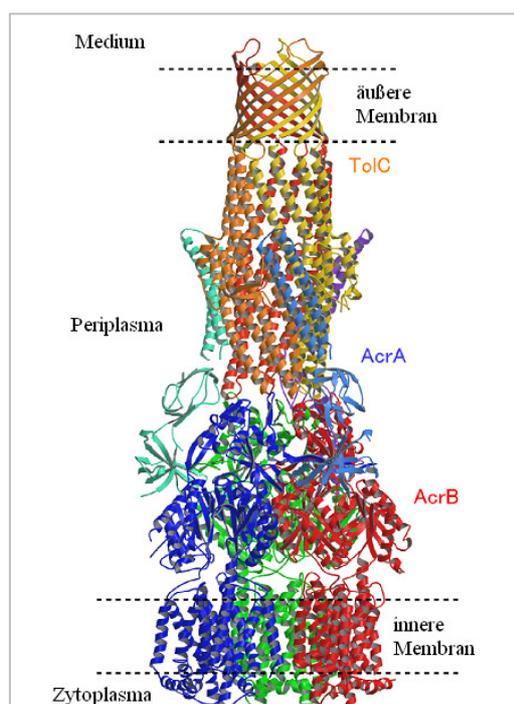
### 1.4.3. Multi-Drug-Effluxsysteme

#### 1.4.3.1. Einführung

Um die intrazelluläre Akkumulation zytotoxischer Substanzen zu verhindern, besitzen Zellen – prokaryotische wie eukaryotische – verschiedene Effluxsysteme (*Tseng et al. 1999; Van Bambeke et al. 2000*). Neben einigen substratspezifischen Transportsystemen gibt es auch Effluxpumpen mit einer sehr breiten Substratspezifität, sog. „*Multi-Drug-Resistance*“ (MDR)-Effluxpumpen. Diese „pumpen“ Intermediärmetabolite, aber auch Quorum-sensing-Moleküle und Siderophore sowie aus der Umgebung aufgenommene Schadstoffe (z. B. Gallensalze) aktiv über die Zellmembran in die Umgebung. Das Ausschleusen von Antibiotika führt – ggf. in Kombination mit einer verminderten Membranpermeabilität (s. o.) – zu einer intrinsischen Resistenz gegenüber vielen unterschiedlichen Substanzklassen (*Nikaido 1996; Nikaido 1998b*).

Die MDR-Effluxpumpen, insb. die Familie der „*Resistance-Nodulation-Division*“- (RND)-Transporter, sind aber zusätzlich oft Ursache von erworbenen Resistenzen gegenüber Antibiotika, Desinfektionsmitteln und Antiseptika. Aufgrund ihrer Fähigkeit, Wirkstoffe chemisch nichtverwandter Substanzklassen gleichzeitig aus den Zellen zu schleusen, entstehen so multiresistente Keime, die nicht selten Schwierigkeiten bei der medikamentösen Therapie infizierter Patienten bereiten (*Alekshun and Levy 2007*). Eine Resistenzzunahme durch den Effluxmechanismus kann durch verschiedene Ursachen bedingt sein: **(I)** eine Mutation oder Amplifikation der kodierenden Gene, die zu einer Erhöhung der Aktivität oder der Expressionsrate führen, **(II)** eine Mutation in spezifischen oder globalen Regulatorgenen, die die Expression des Komplexes erhöhen, **(III)** den Gentransfer durch horizontalen Gentransfer (z. B. Transposon oder Plasmid) (*Ma et al. 1994; Martinez-Freijo et al. 1998; Piddock 2006*).

Im Vergleich zum Wildtyp zeigen Deletionsmutanten der Effluxpumpen eine bis zu 100-fach reduzierte MHK bei hydrophoben Antibiotika – bei amphipathischen Antibiotika immerhin noch eine bis achtfach reduzierte MHK (*Hancock 1997*).



**Abb. 9: Modell des AcrAB-TolC-Komplexes.**  
(Abbildung modifiziert nach *Murakami 2008*)

**AcrA:** Periplasmatisches Adaptorprotein (3x)

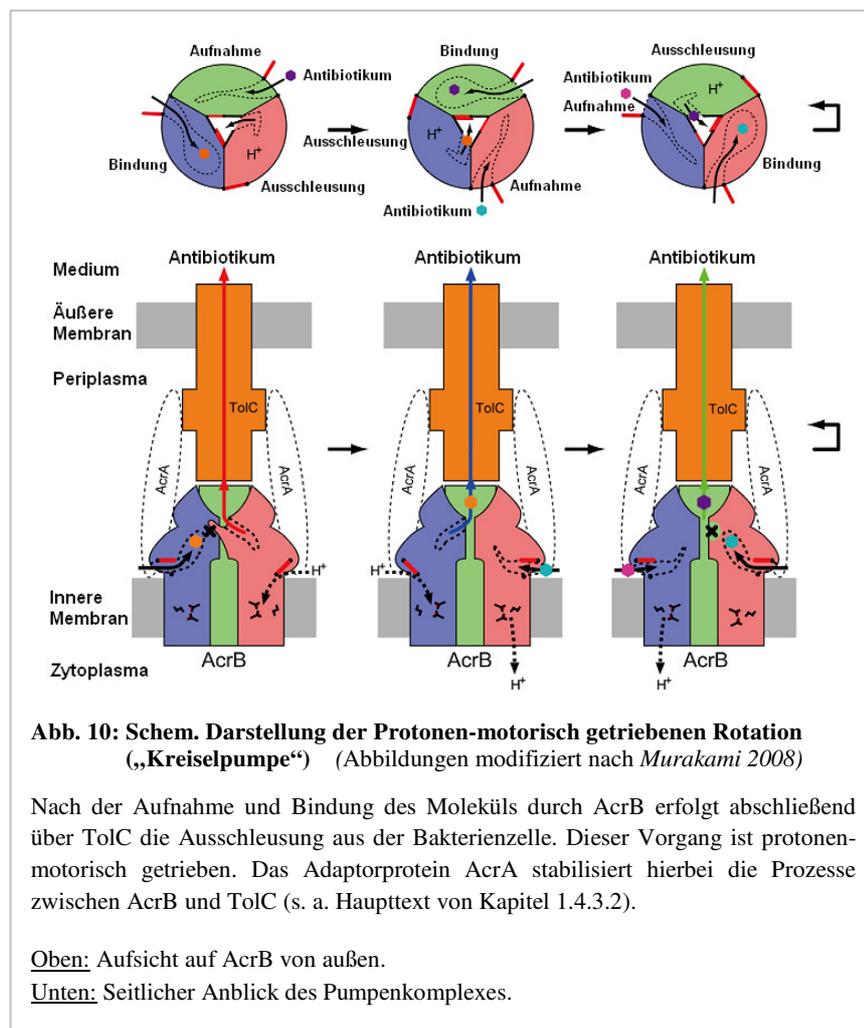
**AcrB:** In der Zytoplasmamembran verankertes Transportprotein (Effluxpumpe) (3x)

**TolC:** Außenmembrankanal (3x)

Jeweils 3 Protomere bilden hierbei ein Homotrimer (s. a. Kapitel 1.4.3.2).

### 1.4.3.2. AcrAB-TolC

Der aus drei Komponenten bestehende Effluxpumpen-Komplex AcrAB-TolC aus der RND-Familie ist ein Hauptvertreter der Effluxsysteme bei gramnegativen Bakterien (*Lomovskaya et al. 2002; Nikaido and Takatsuka 2009*). Er besitzt den RND-typischen Aufbau aus einem in der Zytoplasmamembran verankerten Transportprotein (AcrB), einem tunnelbildenden Außenmembranprotein (TolC) und einem periplasmatischen Adaptorprotein (AcrA) (s. a. Abb. 9) (*Lomovskaya et al. 2002*).



Die Effluxpumpenkomponente AcrB besteht aus 3 Protomeren, die zusammen ein Homotrimer bilden (*Murakami et al. 2002*). Die asymmetrischen Protomere zeigen jeweils eine unterschiedliche Konformation, die die einzelnen Stadien des Transportvorgangs (Aufnahme, Bindung, Ausschleusung) widerspiegeln (s. a. Abb. 10) (*Seeger et al. 2006; Murakami 2008*). Verankert in der inneren Membran, ragt AcrB in den periplasmatischen Raum, wo es mit dem Außenmembrankanale TolC in Verbindung steht (*Tamura et al. 2005*).

Das Außenmembranprotein TolC bildet als Homotrimer einen Kanal mit einem inneren Durchmesser von 35 Å, der sich in der geschlossenen, unverbundenen Konformation nach proximal auf 4 Å verjüngt und zu einer geringen Leitfähigkeit führt (*Koronakis et al. 2000*). Erst durch die Interaktion mit dem Adaptorprotein AcrA wird die Öffnung und somit die Passage von Molekülen eingeleitet (*Andersen 2003*). AcrA ist ein aus mehreren Dimeren bestehendes Lipoprotein mit Verankerung in der inneren Membran, während das Protein in den periplasmatischen Raum ragt und die Interaktionen von AcrB und TolC zwischen beiden Membranen stabilisiert (*Zgurskaya and Nikaido 1999a; Zgurskaya and Nikaido 2000; Mikolosko et al. 2006*).

Der Komplex bildet eine die innere und äußere Membran durchspannende Pore und kann Moleküle bereits aus dem Periplasma bzw. der äußeren Grenzschicht der inneren Membran aufnehmen und mittels protonenmotorischer Kraft (sekundär aktiver Transporter) nach extrazellulär ausschleusen (*Zgurskaya and Nikaido 1999b; Murakami 2008*). Aufgrund seiner breiten Substratspezifität und hohen Transportrate vermittelt er eine intrinsische Toleranz gegenüber vielen lipo- und amphiphilen Substanzen unabhängig von der Ladung (*Ma et al. 1994; Nikaido 2001*).

Einige Substanzen, die von AcrAB-TolC aus der Zelle geschleust werden, sind in Tabelle 4 angegeben.

**Tabelle 4:** Substrate von AcrAB-TolC

(nach *Ma et al. 1994; Nikaido 1996; Nikaido 1998a*)

SDS	Novobiocin
Triton X-100	Erythromycin
Gallensalze	Fusidinsäure
Kurze Fettsäuren	Tetrazyklin
Acriflavin	Chloramphenicol
Kristallviolett	Nalidixinsäure
Ethidiumbromid	Fluorchinolone
Mitomycin C	Rifampicin
Ethanol (4 %)	β-Laktame

#### 1.4.4. $\beta$ -Laktamasen

##### 1.4.4.1. Einführung

$\beta$ -Laktamasen sind bakterielle Enzyme, die den  $\beta$ -Laktam-Ring von  $\beta$ -Laktam-Antibiotika hydrolytisch spalten und diese so inaktivieren. Sie können chromosomal oder plasmidkodiert sein und werden sowohl bei grampositiven als auch gramnegativen Bakterien beschrieben. Da grampositive Bakterien nur eine Zytoplasmamembran besitzen, müssen die von ihnen gebildeten  $\beta$ -Laktamasen entweder im Peptidoglykan bzw. in der zytoplasmatischen Membran verankert sein oder in sehr großer Menge an die Umgebung abgegeben werden, um ausreichende Wirkspiegel zu erreichen. So können auch benachbarte sensible Bakterien vor der bakteriziden Wirkung der  $\beta$ -Laktam-Antibiotika geschützt werden (*Nielsen and Lampen 1982; Theuretzbacher 1998*). Im Gegensatz hierzu müssen gramnegative Bakterien nur geringe Mengen an  $\beta$ -Laktamasen bilden, da sich diese aufgrund der vorhandenen äußeren Membran im periplasmatischen Raum akkumulieren und so rasch wirksame Konzentrationen entstehen können (*Nielsen and Lampen 1982; Bebrone 2007*).

Der Nachweis von  $\beta$ -Laktamasen erfolgte bereits 1940 – noch vor der Markteinführung des Penicillins (*Abraham and Chain 1940*). Doch nicht erst seit der breiten medizinisch-therapeutischen Anwendung von  $\beta$ -Laktam-Antibiotika stellen  $\beta$ -Laktamasen für Bakterien einen Überlebensvorteil dar. Mit ihnen können Bakterien an Orten überleben und neue Habitate erschließen, die durch die  $\beta$ -Laktam-Produktion von Pilzen für andere nicht besiedelbar sind (Umweltselektion).

Mit dem medizinischen Gebrauch von  $\beta$ -Laktam-Antibiotika nahm der Anteil der klinisch relevanten Krankheitserreger mit  $\beta$ -Laktamasen und somit der resistenten Keime bereits kurz nach der Einführung der  $\beta$ -Laktam-Antibiotika sprunghaft zu. Zeigten sich in frühen Studien zunächst alle getesteten Stämme von *Staphylococcus aureus* sensibel gegenüber Penicillin, waren 1946 14 % und 1953 bereits ca. 80 % der untersuchten Klinikisolate resistent (*Medeiros 1997*).

Die Übertragung von Resistenzgenen mittels Transduktion (selten), Transformation und vor allem Konjugation ermöglicht den Erwerb einer Resistenz innerhalb einer Generation (horizontaler Gentransfer), gelegentlich auch über Speziesgrenzen hinweg und sorgt so für eine rasche Verbreitung und Resistenzentwicklung gegenüber neuen antimikrobiellen Substanzen (*Alekshun and Levy 2007*).

Des Weiteren ist es nicht überraschend, dass bereits über 1000 verschiedene  $\beta$ -Laktamasen beschrieben werden konnten, von denen über 150 ein erweitertes Spektrum (*extended spectrum  $\beta$ -lactamase*, kurz: „ESBL“) aufweisen (*Bradford 2001; Bush and Fisher 2011*). Bei der Klassifikation dieser großen heterogenen Hydrolasengruppe haben sich zwei Systeme, die Ambler- und die Bush-Klassifikation, durchgesetzt.

#### 1.4.4.2. Klassifikation

##### 1.4.4.2.1. Ambler-Klassifikation

Die Ambler-Klassifikation richtet sich nach dem molekularen Aufbau der  $\beta$ -Laktamasen und unterteilt sie anhand ihres Nukleotid- bzw. Aminosäuresequenzhomologiegrades in vier Klassen (A-D), wobei die Klassen A, C und D zu den Serin- $\beta$ -Laktamasen und die Klasse B zu den Metallo- $\beta$ -Laktamasen gehören (*Ambler 1980; Jacoby and Munoz-Price 2005*).

In Klasse A befinden sich vornehmlich plasmidkodierte und Breitspektrum- $\beta$ -Laktamasen (z. B. TEM- oder SHV-Typ) (*Jacoby and Munoz-Price 2005*).

Die auch breit wirksamen  $\beta$ -Laktamasen der Klasse B (z. B. NDM-1) lassen sich aufgrund des im aktiven Zentrum gebundenen zweiwertigen Zinkions nur durch Eisenchelatoren wie EDTA inhibieren (*Bebrone 2007*).

Klasse C umfasst die vornehmlich chromosomal kodierten, häufig durch  $\beta$ -Laktame induzierbaren AmpC- $\beta$ -Laktamasen, welche Cephalosporine der 1.-3. Generation inaktivieren können und resistent gegenüber  $\beta$ -Laktamase-Inhibitoren sind (*Jacoby and Munoz-Price 2005*). Unter Selektionsdruck, wie z. B. bei inkonsequenter antimikrobieller medikamentöser Therapie, entstehen hier rasch dereprimierte Mutanten mit konstitutiv hoher AmpC-Produktion, die immer häufiger eine Herausforderung in der Therapie infizierter Patienten darstellen (*Jacoby 2009*).

Zur Klasse D zählen die gegenüber Oxacillin resistenten OXA- $\beta$ -Laktamasen, die hauptsächlich in *Pseudomonas aeruginosa*-Stämmen zu finden sind und sich z. T. von Clavulansäure inhibieren lassen (*Bradford 2001; Jacoby and Munoz-Price 2005*).

##### 1.4.4.2.2. Bush-Klassifikation

Die Bush-Klassifikation, die nach mehrfacher Überarbeitung auch BJM-Klassifikation (nach ihren Autoren K. Bush, G. A. Jacoby und A. A. Medeiros) genannt wird, orientiert sich anhand der enzymatischen Funktion bzw. Substratspezifität und des Inhibitorprofils der Moleküle (*Bush 1989; Bush et al. 1995; Bush and Jacoby 2010*). Die Einteilung und ihre Besonderheiten sind in Tabelle 5 zusammengefasst.

# Einleitung

**Tabelle 5: Bush-Klassifikation der  $\beta$ -Laktamasen**  
(nach *Bush and Jacoby 2010*)

Bush-Jacoby Gruppe (2009)	BJM-Gruppe (1995)	Molekulare Subklasse	Charakteristische Substrate	Inhibiert durch		Charakteristische Eigenschaften	Repräsentative Vertreter
				CLS oder TZB	EDTA		
1	1	C	Cephalosporine	Nein	Nein	Stärkere Hydrolyse von Cephalosporinen als Benzylpenicillin; hydrolysiert Cephamycine	<i>E. coli</i> AmpC, P99, ACT-1, CMY-2, FOX-1, MIR-1
1e	nv	C	Cephalosporine	Nein	Nein	Gesteigerte Hydrolyse von Ceftazidim u. oft anderen Oxyimino- $\beta$ -Laktamen	GC1, CMY-37
2a	2a	A	Penicilline	Ja	Nein	Stärkere Hydrolyse von Benzylpenicillin als Cephalosporinen	PC1
2b	2b	A	Penicilline u. frühe Cephalosporine	Ja	Nein	Ähnliche Hydrolyse von Cephalosporinen u. Benzylpenicillin	TEM-1, TEM-2, SHV-1
2be	2be	A	Breitspektrum-Cephalosporine, Monobactame	Ja	Nein	Erhöhte Hydrolyse von Oxyimino- $\beta$ -Laktamen (Cefotaxim, Ceftazidim, Ceftriaxon, Cefepim, Aztreonam)	TEM-3, SHV-2, CTX-M-15, PER-1, VEB-1
2br	2br	A	Penicilline	Nein	Nein	Resistenz gegenüber Clavulansäure, Sulbactam u. Tazobactam	TEM-30, SHV-10
2ber	nv	A	Breitspektrum-Cephalosporine, Monobactame	Nein	Nein	Gesteigerte Hydrolyse von Oxyimino- $\beta$ -Laktamen kombiniert mit Resistenz gegenüber Clavulansäure, Sulbactam u. Tazobactam	TEM-50
2c	2c	A	Carbenicillin	Ja	Nein	Gesteigerte Hydrolyse von Carbenicillin	PSE-1, CARB-3
2ce	nv	A	Carbenicillin, Cefepim	Ja	Nein	Gesteigerte Hydrolyse von Carbenicillin, Cefepim u. Cefpirom	RTG-4
2d	2d	D	Cloxacillin	Variabel	Nein	Gesteigerte Hydrolyse von Cloxacillin o. Oxacillin	OXA-1, OXA-10
2de	nv	D	Breitspektrum-Cephalosporine	Variabel	Nein	Hydrolysiert Cloxacillin o. Oxacillin u. Oxyimino- $\beta$ -Laktame	OXA-11, OXA-15
2df	nv	D	Carbapeneme	Variabel	Nein	Hydrolysiert Cloxacillin o. Oxacillin u. Carbapeneme	OXA-23, OXA-48
2e	2e	A	Breitspektrum-Cephalosporine	Ja	Nein	Hydrolysiert Cephalosporine. Inhibiert durch Clavulansäure, aber nicht durch Aztreonam	CepA
2f	2f	A	Carbapeneme	Variabel	Nein	Gesteigerte Hydrolyse von Carbapenemen, Oxyimino- $\beta$ -Laktamen u. Cephamycinen	KPC-2, IMI-1, SME-1
3a	3	B (B1)  B (B3)	Carbapeneme	Nein	Ja	Breitspektrum-Hydrolyse inkl. Carbapenemen, aber nicht Monobactamen	IMP-1, VIM-1, CerA, IND-1  L1, CAU-1, GOB-1, FEZ-1
3b	3	B (B2)	Carbapeneme	Nein	Ja	Bevorzugte Hydrolyse von Carbapenemen	CphA, Sfh-1
nv	4	Unbekannt.					

CLS: Clavulansäure TZB: Tazobactam  
„nv“: nicht vorhanden

### 1.4.4.3. $\beta$ -Laktamasen bei *Y. enterocolitica*

Im Gegensatz zu *Y. pestis* und *Y. pseudotuberculosis* besitzt *Y. enterocolitica* zwei chromosomal kodierte  $\beta$ -Laktamasen, BlaA und BlaB (in der Literatur wird BlaB auch als AmpC bezeichnet) (Cornelis and Abraham 1975). Nach der Genexpression gelangen die Proteine, BlaA bereits gefaltet über das Tat-System und BlaB noch ungefaltet über das Sec-System, in den periplasmatischen Raum, wo sie ihre Wirkung entfalten (Schriefer et al. 2013).

BlaA gehört nach der Ambler-Klassifikation zu den Klasse A  $\beta$ -Laktamasen und wird konstitutiv exprimiert (Seoane and Garcia Lobo 1991b; Seoane and Garcia Lobo 1991a). Sie hat ein Molekulargewicht (MG) von ca. 20 kDa, hydrolysiert vornehmlich Penicilline, z. B. Carbenicillin, und ist nicht durch Aztreonam, teilweise aber durch Cloxacillin und vollständig durch Clavulansäure inhibierbar (Cornelis and Abraham 1975; Pham et al. 1991; Pham and Bell 1992). Unter Berücksichtigung des Gen-Ortes und der Nukleotid- und Aminosequenz scheint BlaA schon lange im Chromosom integriert zu sein. Der C+G-Gehalt des Gens beträgt 47,3 %. Die Region, die an das 5'-Ende anschließt, besitzt einen C+G-Gehalt von 40,9 % und die 3'-Region von nur 34,3 % – wobei diese Werte für *Y. enterocolitica* typisch sind (Seoane and Garcia Lobo 1991b).

BlaB gehört zu den Klasse C  $\beta$ -Laktamasen. Sie hat ein Molekulargewicht von ca. 34 kDa (Cornelis and Abraham 1975). Ihre Transkription ist durch  $\beta$ -Laktame (z. B. 6-APA oder Imipenem) induzierbar. Sie vermittelt Resistenzen v. a. gegen Cephalosporine der 1. Generation (1. Gruppe) wie Cephalothin und Cephalosporin C und ist vollständig inhibierbar durch Cloxacillin und Aztreonam (Cornelis 1975; Pham et al. 1991; Seoane and Garcia Lobo 1991a; Pham and Bell 1992).

BlaA und BlaB zeigen eine spezifische pH-abhängige Aktivitätskurve. Der Kurvenverlauf von BlaA hat einen relativ steilen Verlauf und ihr Maximum liegt bei pH 6,5. BlaB zeigt einen flacheren Kurvenanstieg und das Maximum liegt bei pH 7,5 (Cornelis and Abraham 1975).

Neben der pH-Abhängigkeit zeigt BlaA von *Y. enterocolitica* Serotyp O:8 eine temperaturabhängige Aktivitätskurve mit dem Aktivitätsmaximum bei ca. 45 °C, doch zeigt sie noch eine deutliche Aktivität bei 15 °C bzw. 55 °C (Schriefer et al. 2013).

Obwohl *Y. enterocolitica* zwei chromosomale  $\beta$ -Laktamasen produziert, zeigt jeder Biotyp aufgrund unterschiedlicher Genexpression der beiden Gene ein charakteristisches Resistenzmuster gegenüber einigen Penicillinen und Cephalosporine der 1. Generation (Gruppe 1) (Cornelis and Abraham 1975; Stock and Wiedemann 1999; Stock et al. 2000). Gegenüber den getesteten Cephalosporinen der 3. Generation sind jedoch alle *Y. enterocolitica* Bio-/Serotypen in vitro gleichermaßen sensibel (Pham et al. 2000).

Auch bei den Eigenschaften von BlaA und BlaB zeigen sich Unterschiede: Bei Biotyp 1A wurde anstelle von BlaB eine BlaB-ähnliche  $\beta$ -Laktamase beschrieben, die zwar die gleiche Aktivität wie BlaB besitzt, sich aber im isoelektrischen Punkt unterscheidet

## Einleitung

(Pham *et al.* 1991). Bei Biotyp 1B Yersinien hingegen zeigt sich neben BlaB eine für den Biotyp spezifische BlaA-ähnliche zweite  $\beta$ -Laktamase, die sich im isoelektrischen Punkt von BlaA anderer Yersinien unterscheidet und auch eine geringere Aktivität bei der Hydrolyse von Ampicillin und Carbenicillin zeigt und somit zu einer Borderlinerresistenz gegenüber diesen Substanzen führt (Pham *et al.* 2000). Auch die Induzierbarkeit der Klasse C  $\beta$ -Laktamase ist sehr variabel und spezifisch für jeden Biotyp. So sind BlaB von Biotyp 1B und die BlaB-ähnliche  $\beta$ -Laktamase von Biotyp 1A hoch induzierbar, bei Biotyp 5 zeigt sich kaum eine Induktion und bei Biotyp 4 ist sie abhängig vom Phagentyp des Stammes (Pham *et al.* 2000). Der Nachweis mittels der Plättchen-Diffusionsmethode gestaltet sich bei Biotyp 1B jedoch schwierig, da hier das basale Expressionsniveau von BlaB sehr gering ist (Pham *et al.* 2000).

Im Mausinfektionsmodell konnten Scavizzi *et al.* beim mausletalen *Y. enterocolitica* WA-Stamm (Biotyp 1B, Serotyp O:8) die Ineffektivität bestimmter  $\beta$ -Laktam-Antibiotika trotz einer ausgeprägten Sensitivität *in vitro* aufzeigen (Scavizzi *et al.* 1987). Zeigten Amoxicillin, Cefotaxim und Imipenem *in vitro* bei einem Inokulum von  $10^7$  KBE/ml eine MHK von 16  $\mu\text{g/ml}$ , 0,125  $\mu\text{g/ml}$  bzw. 0,5  $\mu\text{g/ml}$ , wurde das Wachstum der Bakterien *in vivo* trotz hoher applizierter Antibiotikakonzentrationen als Einmalgabe kaum beeinflusst.

Der in dieser Arbeit verwendete Biotyp 1B (Serotyp O:8) von *Y. enterocolitica* wird in der Literatur u. a. als resistent gegenüber Benzylpenicillin, Oxacillin, Amoxicillin, Carbenicillin, Tircacillin, Ampicillin und Cephalothin, jedoch sensibel gegenüber Mezlocillin, Azlocillin, Amoxicillin/Clavulansäure, Ampicillin/Sulbactam, Cefotaxim, Cefuroxim, Imipenem und Meropenem beschrieben (Preston *et al.* 1994; Stock and Wiedemann 1999).

## 1.5. Ziel und Fragestellung

Die notwendigen Sensitivitätstestungen von Erregern („Antibiogramm“) haben in der Infektionsmedizin bei der Auswahl der geeigneten antimikrobiellen Therapie infizierter Patienten – insbesondere unter Berücksichtigung der steigenden Resistenzentwicklung – eine zunehmende Relevanz.

Die *in vitro* ermittelte Antibiotikaempfindlichkeit und die Effektivität einer Substanz gegenüber Bakterien *in vivo* können sich z. T. erheblich unterscheiden. So zeigen die Ergebnisse aus *In-vitro*-Testungen und die daraus abgeleiteten Empfehlungen nicht immer die erwartete Wirksamkeit *in vivo*. Welche Rolle die zwei chromosomalen  $\beta$ -Laktamase-Gene hier z. B. bei *Y. enterocolitica* spielen, gilt es weiter zu erforschen. Zeigt doch *Y. pseudotuberculosis* – eine Yersinienart, die keine funktionsfähigen  $\beta$ -Laktamasen besitzt – im Mausinfektionsmodell trotz fehlender  $\beta$ -Laktamasen eine signifikante Resistenz gegenüber bestimmten  $\beta$ -Laktam-Antibiotika (*Lemaitre et al. 1991*).

In der vorliegenden Arbeit soll nun der Einfluss bzw. der Beitrag der  $\beta$ -Laktamasen BlaA und BlaB vom *Y. enterocolitica* Stamm JB580v (Biotyp 1B, Serotyp O:8) auf die Antibiotikaresistenz gegenüber  $\beta$ -Laktam-Antibiotika *in vitro* und *in vivo* im Mausinfektionsmodell vergleichend untersucht werden. Hierfür wurden vom Ausgangsstamm zunächst gentechnisch  $\beta$ -Laktamase-Deletionsmutanten hergestellt, die anschließend *in vitro* mit bereits etablierten Methoden wie dem Agardiffusionstest und der Mikrodilutionsmethode auf ihre MHK untersucht wurden. Für die *In-vivo*-Testungen wurde das parenterale (intraperitoneale Infektion, i.p.) Mausinfektionsmodell gewählt. *Y. enterocolitica* eignet sich hierbei besonders zur Untersuchung der Fragestellung, da die systemische Infektion im Mausinfektionsmodell und beim Menschen vergleichbar ist (z. B. Ausbildung von Abszessen in den inneren Organen wie Milz und Leber) und auch die perorale Infektion in der Maus zur systemischen Infektion führt.

Da die antibakterielle Wirkung von  $\beta$ -Laktam-Antibiotika neben der Aktivität der  $\beta$ -Laktamasen auch von weiteren bakteriellen Resistenzmechanismen wie dem Vorhandensein von Porinen in der äußeren Membran, die den Einstrom antibakterieller Stoffe regulieren, sowie Effluxsystemen, die toxische Substanzen aus der Zelle schleusen, abhängt, galt es den Einfluss auch dieser Resistenzfaktoren zu bestimmen. Hierfür wurde das Gen für die Effluxpumpenkomponente AcrB bzw. das Gen für das Porin OmpF chromosomal deletiert und ihr Einfluss auf die Antibiotikaresistenz bei *Y. enterocolitica* *in vitro* und *in vivo* untersucht.

Um parallel hierzu Aufschluss über die Mikrokolonie-Abszess-Bildung von *Y. enterocolitica* im Rahmen der Antibiotikatherapie zu erhalten, wurden zusätzlich Kryomikrotomschnitte infizierter Mäusemilzen immunfluoreszenzmikroskopisch nach der Antibiotikatherapie untersucht.

Zur Vermeidung von Verwechslungen wird in dieser Arbeit für BlaB (AmpC-Variante) die auch übliche Bezeichnung AmpC verwendet.

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Geräte

Für die Durchführung der vorliegenden Arbeit wurden neben der regulären Standardlaborausstattung die in Tabelle 6 genannten Geräte verwendet.

**Tabelle 6: Verwendete Geräte und Instrumente**

Geräteart	Gerätmodell	Firma
Analysenwaage	Pt 1200, R160P	Sartorius (Göttingen)
Brutschränke	INP-500, IPP400	Memmert (Schwabach)
	Typ B20	Heraeus (Hanau)
Durchflusszytometer	FACS Canto II	BD Bioscience (Heidelberg)
Elektrophoreskammer	Mini-PROTEAN 3	Bio-Rad (München)
Elektroporationsgerät	Gene Pulser II	Bio-Rad (München)
Elektroporationsküvetten		Eurogentec (Seraing)
Fluoreszenzmikroskop	BX61	Olympus (Hamburg)
Gel-Dokumentation	GelDoc EQ	Bio-Rad (München)
Handdispenser	Multipette plus	Eppendorf (Hamburg)
Heizblock	Typ 50126101	Liebisch (Bielefeld)
Kryomikrotom	Kryostat CM1950	Leica Biosystems (Nussloch)
Kühlzentrifuge	3K30, 1K15	Sigma (Osterode)
Mikrotiterplatten, steril	12-, 24-, 48-, 96-well	Nunc (Roskilde, Dänemark)
Mikrotiterplattenmessgerät	FLUOStar Optima	BMG Labtech (Offenburg)
Mikrowelle	KOC-985TBA	Daewoo Electronics (Butzbach)
PCR-Cycler	Unocycler	VWR (Darmstadt)
pH-Meter	pH 211	Hanna Instruments (Kehl)
Spektralphotometer	Ultraspec 3100 pro	Amersham Biosciences (Freiburg)
Pipetten	Eppendorf Research 10-1000	Eppendorf (Hamburg)
	Eppendorf Research plus 2,5	Eppendorf (Hamburg)
Spannungsquelle	Power Pac 300	Bio-Rad (München)
Sterilwerkbank	Herasafe HS 12	Heraeus (Hanau)
Thermomixer	Thermomixer 5436	Eppendorf (Hamburg)
	Thermomixer comfort	Eppendorf (Hamburg)
Ultraschall-Applikator	Sonifier 250	Branson (Danbury)
Waage	Kern KB, Kern PLS 10-3	Kern & Sohn (Balingen)
Wasserbad	WB7	Memmert (Schwabach)
Zentrifuge	Varifuge 3.OR	Heraeus (Hanau)
	Sorvall RC5C	Kendro (Langenselbold)

## 2.2. Molekularbiologische Fertigprodukte („Kits“)

Für die Durchführung der vorliegenden Arbeit wurden die in Tabelle 7 genannten Fertigprodukte („Kits“) für molekularbiologische Verfahren – wenn nicht anders beschrieben – gemäß den Empfehlungen des Herstellers verwendet.

**Tabelle 7: Verwendete „Kits“**

Bezeichnung	Verwendetes Protokoll	Hersteller
<i>Nucleobond AX 100</i>	<i>High-copy plasmid purification</i>	Macherey-Nagel (Düren)
<i>NucleoSpin Extract II</i>	<i>PCR clean up DNA extraction from agarose gels</i>	Macherey-Nagel (Düren)
<i>NucleoSpin Plasmid QuickPure</i>	<i>Isolation of high-copy plasmid DNA from E. coli</i>	Macherey-Nagel (Düren)
<i>NucleoBond PC100</i>	<i>Plasmid DNA purification</i>	Macherey-Nagel (Düren)
<i>High Pure RNA Isolation Kit</i>	<i>Isolation of Total RNA from Bacteria</i>	Roche Diagnostics (Mannheim)
<i>Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis Kit</i>	<i>Standard RT-PCR Procedure</i>	Roche Diagnostics (Mannheim)
<i>DNA-free Kit</i>	<i>DNA-free Procedure</i>	Ambion (Austin, TX, USA)
<i>Rapid DNA Ligation Kits</i>	<i>Insertion of Foreign DNA into Plasmid Vector</i>	Fermentas (St. Leon-Rot)

## 2.3. Antibiotika, Chemikalien und Fertigmedien – Bezugsquellen

Bei der Durchführung der vorliegenden Arbeit wurden die in Tabelle 8 aufgezählten Antibiotika und antibiotikahaltigen Tests, sowie die u. a. in Tabelle 9 aufgezählten Substanzen verwendet. Die Lagerung entsprach den Empfehlungen des Herstellers.

**Tabelle 8: Antibiotika, antibiotikahaltige Tests - Bezugsquellen**

Substanz	Firma
Ampicillin (Amp)	Ratiopharm (Ulm)
Carbenicillin (Cb)	Roth (Karlsruhe)
Cefotaxim (Ctx)	Pharmore (Ibbenbüren)
Ceftriaxon (Crx)	Hexal (Holzkirchen)
Chloramphenicol (Cm)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Doxyzyklin (Do)	Ratiopharm (Ulm)
Gentamicin (Cn)	Ratiopharm (Ulm)
Kanamycin (Km)	Roth (Karlsruhe)
Meropenem (Mem)	AstraZeneca (Wedel)
Spectinomycin (Sp)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Tetrazyklin (Tet)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Antibiotika-Testplättchen	Oxoid (Wesel)
ETest	BioMérieux (Nürtingen)
M.I.C.Evaluator Streifen	Oxoid (Wesel)

**Tabelle 9: Chemikalien, Fertigmitteln, weitere Substanzen - Bezugsquellen**

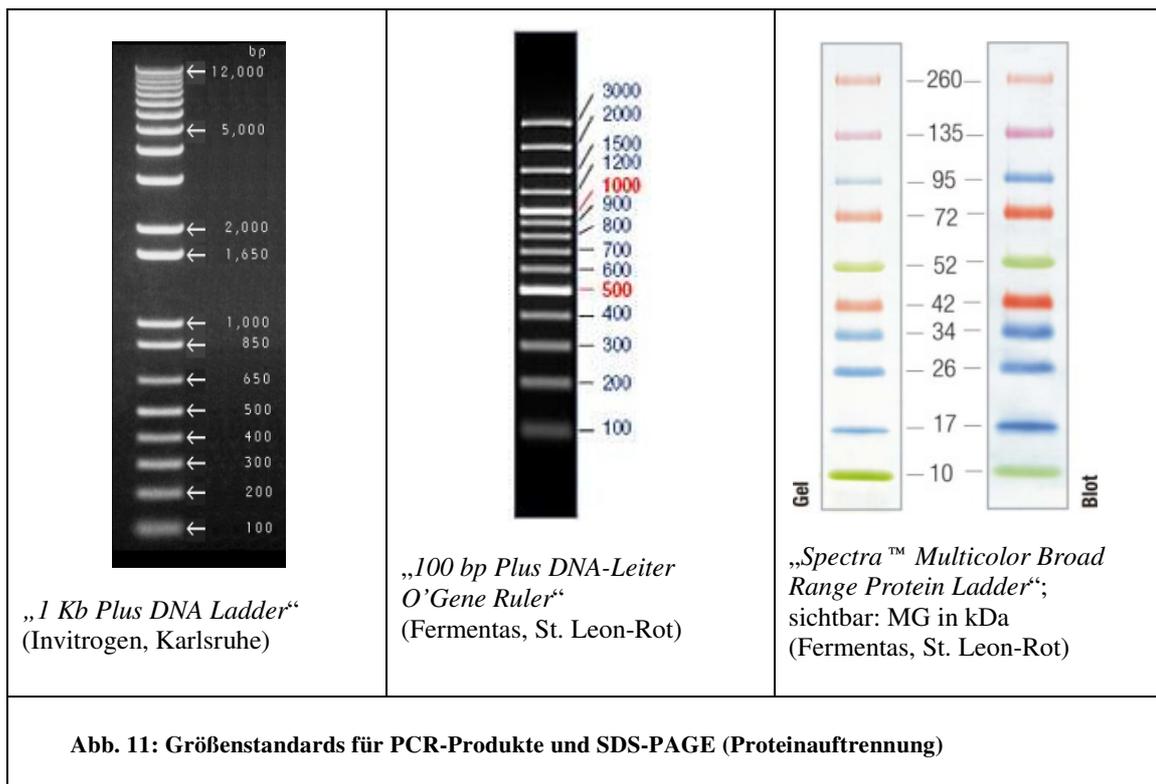
<b>Substanz</b>	<b>Firma</b>
Aceton	Merck (Darmstadt)
Acrylamid/Bisacrylamid (30 %/0,8 %) (Protogel)	Serva (Heidelberg)
Agar BactoAgar	BD Bioscience (Heidelberg)
Agarose	Genaxxon (Biberach)
Ammoniumpersulfat	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Aqua ad injectabilia	B. BRAUN (Melsungen)
Arabinose	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Brain Heart Infusion (BHI)	Oxoid (Wesel)
Bromphenolblau	Roth (Karlsruhe)
Coomassie Brilliant Blau R250	Merck (Darmstadt)
4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Essigsäure	Roth (Karlsruhe)
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Roth (Karlsruhe)
Ethylenglycoltetraacetat (EGTA)	Roth (Karlsruhe)
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Glycerin	Roth (Karlsruhe)
Glycin	MP Biomedicals (Eschwege)
Hefeextrakt	MP Biomedicals (Eschwege)
Isopropanol	Merck (Darmstadt)
Isopropyl-β-D-Thiogalactopyranosid (IPTG)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Isotone Kochsalzlösung (NaCl (0,9%))	B. BRAUN (Melsungen)
Lysozym	Biomol Feinchemikalien (Hamburg)
β-Mercaptoethanol	Roth (Karlsruhe)
Methanol	Merck (Darmstadt)
Mowiol	Calbiochem / Merck (Darmstadt)
Mueller-Hinton (MH-) Trockenpulver	Oxoid (Wesel)
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Serva (Heidelberg)
Nährböden – CIN-Agar	Oxoid (Wesel)
Nährböden – Mueller-Hinton-(MH)-Agar	Oxoid (Wesel)
Nährböden – Schafsblut-Agar	Oxoid (Wesel)
Phosphatgepufferte Salzlösung (D-PBS 1x)	Invitrogen (Karlsruhe)
Phusion Flash High-Fidelity PCR Master Mix	New England Biolabs (Frankfurt)
Polysorbat-20 (Tween-20)	AppliChem (Darmstadt)
Red-Taq DNA-Polymerase 2X Master Mix	VWR (Ismaning)
Restriktionsenzyme, auch FastDigest™ (inkl. Puffer)	Fermentas (St. Leon-Rot)
RPMI 1640	Invitrogen (Karlsruhe)
Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder	Fermentas (St. Leon-Rot)
Testserum zur Agglutination <i>Y. enterocolitica</i> O:8	Sifin (Berlin)
T4-DNA-Ligase (5 U/μl)	Invitrogen (Karlsruhe)
T4 DNA-Ligase (2000000 U/ml)	New England Biolabs (Frankfurt)
Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Biomol Feinchemikalien (Hamburg)
Tissue Tek O.C.T. Compund	Sakura (Alphen aan den Rijn, Niederlande)
Tris-(hydroxymethyl)-Aminomethan (TRIS)	MP Biomedicals (Ohio)
Triton X-100	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)

Fortsetzung von Tabelle 9

Substanz	Firma
Trypton	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Xylencyanol	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Ziegenserum, prä-immun	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)

2.4. Größenstandards

Bei der Gelelektrophorese von PCR-Produkten wurden je nach erwarteter Produktgröße entweder die „1 Kb Plus DNA Ladder“ (Invitrogen, Karlsruhe) oder „100 bp Plus DNA-Leiter O’Gene Ruler“ (Fermentas, St. Leon-Rot) als Größenstandard verwendet. Als Größenstandard bei der Auftrennung von Proteinen mittels SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese („SDS-PAGE“) diente die „Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder“ (Fermentas, St. Leon-Rot).



## 2.5. Puffer, Lösungen und Gele

In Tabelle 10 bis Tabelle 13 sind die bei der Durchführung der Versuche verwendeten molekularbiologischen, biochemischen, immunologischen Puffer und Lösungen aufgelistet.

**Tabelle 10: Puffer, Lösungen und Gele (Molekularbiologie/Genetik)**

Bezeichnung	Mengenangabe	Substanz	pH-Wert
<b>Gelelektrophorese-Puffer (TAE (1x)) für Standard-Agarosegele</b>	40 mM	Tris	8,2
	40 mM	Essigsäure	
	1 mM	EDTA	
	ad 1 l	H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	
<b>DNA-Auftragspuffer (10x)</b>	30 %	Glycerin	
	0,25 %	Bromphenolblau	
	0,25 %	Xylencyanol in TAE (1x)	
<b>Agarosegel</b>	1,0 - 1,5 %	Agarose in TAE (1x)	
<b>Ethidiumbromid-Färbebad zur DNA-Färbung</b>	0,5 – 1 mg	Ethidiumbromid	
	1000 ml	H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	

**Tabelle 11: Puffer und Lösungen (Immunhistologie)**

Bezeichnung	Mengenangabe	Substanz	pH-Wert
<b>TBS (10x)</b>	1 M	Tris	7,5
	1,5 M	NaCl	
	ad 1 l	H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	
<b>TBS-T (1x)</b>	1 l	TBS (1x)	
	0,1 %	Tween-20	
<b>Immunfluoreszenz-Blockierlösung</b>	5 ml	TBST (1x)	
	2,5 %	Ziegenserum	
<b>Mowiol-Eindeckellösung (für die Mikroskopie)</b>	33,6 g	Mowiol 4-88	8,5
	96 ml	0,2 M Tris	
	48 ml	H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	
	48 ml	Glycerin	

Die Mowiol-Eindeckellösung wurde vor Zugabe des Glycerins auf 50 °C erhitzt, danach bei 50 °C über Nacht gerührt, anschließend zentrifugiert (2000 U/min, 4 °C, 8 min) und aliquotiert bei -20 °C gelagert.

Tabelle 12: Puffer und Lösungen (Proteinchemie)

Bezeichnung	Mengenangabe	Substanz	pH-Wert
<b>Coomassie Blau-Färbelösung</b>	25 %	Isopropanol	
	10 %	Essigsäure	
	0,05 %	Coomassie Brilliant Blau R250	
<b>Außenmembran-Waschpuffer (200 mM Tris-HCl)</b>	24,22 g ad 1 l	Tris H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	8,0
<b>Lyse-Puffer</b> (zur Membranproteinisolierung)	50 ml 17,115 g 0,0186 g	200 mM Tris-HCl Saccharose EDTA	8,0
<b>Lysozym-Lösung</b> (zur Sphäroblastenbildung)	2 mg ad 1 ml	Lysozym 200 mM Tris-HCl	8,0
<b>Extraktionspuffer</b> (für innere Membran)	12,5 ml 0,1 g 1 ml ad 50ml	200 mM Tris-HCl MgCl <sub>2</sub> Triton X-100 H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	8,0
<b>SDS-Laufpuffer (10x)</b>	30,3 g 144,1 g 10 ml (1%) ad 1 l	Tris Glycin SDS H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	
<b>SDS-Auftragspuffer</b>	5 ml 20 ml 5 ml 2,5 ml 25 mg 4,9 ml ad 1 l	1 M MgCl <sub>2</sub> 10 % SDS Glycerol β-Mercaptoethanol Bromphenolblau 1 M Tris H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	pH 8,8

Tabelle 13: Zusammensetzung der Polyacrylamidgele (SDS-PAGE)

Substanzen (ml)	Sammelgel (5 ml) 2,5 %	Trenngel (10 ml)						
		6 %	8 %	10 %	11 %	12 %	14 %	16 %
H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	3,2	4,0	3,2	2,6	2,2	1,9	1,2	0,6
1 M Tris pH 8,8		3,75	3,75	3,75	3,75	3,75	3,75	3,75
750 mM Tris pH 6,8	0,7							
30 % Acrylamid-Lsg.	0,83	2,0	2,7	3,3	3,7	4,0	4,7	5,3
10 % SDS	0,1	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
10 APS	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04
10 TEMED	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2

## 2.6. Nährmedien, Medienzusätze und Antibiotika

### 2.6.1. Nährmedien

In Tabelle 14 sind die bei der Durchführung der Versuche verwendeten Nährmedien und mit den hierfür benötigten Bestandteilen aufgezählt (s. Tabelle 9 für Bezugsquellen). Nach dem Ansetzen wurden alle Nährmedien unverzüglich bei 121 °C für 20 min bei 1 bar Dampfdruck sterilisiert. Zur Herstellung von Nährbodenagar wurde dem Flüssigmedium 16 g Agar-Trockenpulver vor dem Autoklavieren hinzugefügt. Dem SOC-Medium wurde die steril-filtrierte Glucose erst nach dem Autoklavieren zugegeben. Die Bezugsquellen der einzelnen Komponenten sind in Tabelle 9 aufgelistet.

**Tabelle 14: Nährmedien – Ansätze (Mikrobiologie)**

Bezeichnung	Mengenangabe	Substanz
<b>Brain Heart Infusion (BHI)</b>	37 g	BHI
	ad 1 l	H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>
<b>Einfriermedium</b>	0,85 ml	LB-Medium
	0,15 ml	Glycerin (Gly)
<b>Luria Bertani (LB)-Medium</b>	10 g	Trypton
	5 g	Hefeextrakt
	5 g	NaCl
	ad 1 l	H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub> (End-pH 7,5)
<b>Mueller-Hinton (MH)-Medium</b>	38 g	MH-Trockenpulver
	ad 1 l	H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>
<b>SOC-Medium</b>	10 g	Trypton
	5 g	Hefeextrakt
	0,3 g	NaCl
	0,09 g	KCl
	1,02 g	MgCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O
	1,23 g	MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O
	ad 500 ml	H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>
	20 mM	steril filtrierte Glucose

### 2.6.2. Medienzusätze

Bei Bedarf wurden den o. g. Medien und Nährböden nach dem Autoklavieren verschiedene Zusätze beigefügt. Von diesen wurden zunächst steril filtrierte Stammlösungen hergestellt, die gekühlt und lichtgeschützt aufbewahrt wurden. Tabelle 15 zeigt die verwendeten Medienzusätze an.

**Tabelle 15: Medienzusätze**

Substanz	Lösungsmittel	Konzentration der Stammlösung	Endkonzentration
L-Arabinose	H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	0,2 g/ml	0,02 g/ml
Calciumchlorid (CaCl <sub>2</sub> )	H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	100 mmol	0,2-1,0 mmol
$\alpha,\alpha'$ -Dipyridyl	H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	8 mmol	80-160 $\mu$ mol
EGTA	H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	500 mmol	1-5 mmol
Glucose	H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	1 mol	20 mmol
IPTG	H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	1 mol	1 mmol
Kaliumchlorid (KCl)	H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	1 mol	100 mmol
Magnesiumchlorid (MgCl <sub>2</sub> )	H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	1 mol	2-10 mmol

### 2.6.3. Antibiotika

#### 2.6.3.1. Antibiotika – in vitro

Bei Bedarf wurden den o. g. Medien und Nährböden nach dem Autoklavieren verschiedene Antibiotika hinzugefügt. Von diesen wurden zunächst steril filtrierte Stammlösungen hergestellt, die tiefgekühlt und lichtgeschützt entsprechend den Empfehlungen des Herstellers aufbewahrt wurden (hierzu s. a. *Andrews 2001*). Tabelle 16 führt die verwendeten Antibiotika auf.

**Tabelle 16: Antibiotika – in vitro**

Substanz	Lösungsmittel	Konzentration der Stammlösung	Endkonzentration
Ampicillin (Amp)	H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	100 mg/ml	100 $\mu$ g/ml
Carbenicillin (Cb)	H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	250 mg/ml	250 $\mu$ g/ml
Cefotaxim (Ctx)	H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>		
Chloramphenicol (Cm)	70% Ethanol	2 mg/ml	20 $\mu$ g/ml
Doxyzyklin (Do)	H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>		
Gentamicin (Cn)	H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>		
Kanamycin (Km)	H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	5 mg/ml	50 $\mu$ g/ml
Meropenem (Mem)	H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>		
Nalidixinsäure (Nal)	0,5 N NaOH	6 mg/ml	60 $\mu$ g/ml
Spectinomycin (Sp)	H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	5 mg/ml	50 $\mu$ g/ml
Tetrazyklin (Tet)	70% Ethanol	2 mg/ml	20 $\mu$ g/ml

### 2.6.3.2. Antibiotika – in vivo

Für die Durchführung der In-vivo-Mausversuche wurden die in Tabelle 17 genannten für den Humangebrauch zugelassenen Antibiotika verwendet. Vor jeder i.v.-Gabe (jeweils 100 µl Volumen) wurden diese mit isotoner Kochsalzlösung (NaCl (0,9%)) neu gelöst bzw. auf die benötigte Konzentration herunterverdünnt.

**Tabelle 17: Antibiotika – in vivo**

Substanz	Lösungsmittel	Endkonzentration
Ampicillin (Amp)	NaCl (0,9%)	5,50 mg / 100µl (entspricht ca. 250 mg/kg)
Cefotaxim (Ctx)	NaCl (0,9%)	5,50 mg / 100µl (entspricht ca. 250 mg/kg)
Ceftriaxon (Crx)	NaCl (0,9%)	5,50 mg / 100µl (entspricht ca. 250 mg/kg)
Doxyzyklin (Do)	NaCl (0,9%)	0,55 mg / 100µl (entspricht ca. 25 mg/kg)
Gentamicin (Cn)	NaCl (0,9%)	0,44 mg / 100µl (entspricht ca. 20 mg/kg)
Meropenem (Mem)	NaCl (0,9%)	2,20 mg / 100µl (entspricht ca. 100 mg/kg)

## 2.7. Bakterienstämme, Plasmide und Oligonukleotide

### 2.7.1. Bakterienstämme und Plasmide

Die in dieser Arbeit verwendeten Stämme von *Y. enterocolitica* sind überwiegend Derivate des pYV-positiven Stammes JB580v, einer restriktionsdefizienten Mutante des Stammes 8081 (Biovar 1 B, Serovar O:8), dessen komplettes Chromosom bereits sequenziert und veröffentlicht wurde (*Thomson et al. 2006*). Bei JB580v wurde die Restriktionsendonuklease YenI eines spontan nalidixinsäureresistenten Klon deletiert, um Transformationen effizient zu erhöhen (*Kinder et al. 1993*).

Im Vergleich zu den schwach mausvirulenten Biovaren 2-5 ist dieser mausvirulente Stamm (Biovar 1 B, Serovar O:8) für Mausinfektionsversuche besonders geeignet (die LD<sub>50</sub> bei einer intraperitonealen Infektion beträgt ca. 1,0 x 10<sup>3</sup> KBE) (*Hayashidani et al. 1995; Haller et al. 2000*).

In Tabelle 18 und Tabelle 19 sind die bei der Durchführung der Arbeit verwendeten Bakterienstämme, in Tabelle 20 und Tabelle 21 die jeweiligen Plasmide aufgeführt. Zur Analyse, Bearbeitung von DNS-Sequenzen und Planung genetischer Manipulationen an unten genannten Stämmen und Plasmiden wurde das Programm DNAMAN (Version 5.2.9; Lynnon Biosoft Corporation; Quebec, Kanada) verwendet. Soweit nicht anders gekennzeichnet wurde immer mit pYV<sup>+</sup> *Y. enterocolitica*-Stämmen gearbeitet.

Tabelle 18: Verwendeter *E. coli*-Stamm

Bakterienstamm	Phäno- bzw. Genotyp	Bezugsquelle / Referenz
DH5 $\alpha$	<i>supE44</i> $\Delta$ <i>lacU169</i> ( $\phi$ 80 <i>lacZ</i> $\Delta$ M15) <i>hsdR17</i> <i>recA1</i> <i>endA1</i> <i>gyrA96</i> <i>thi-1</i> <i>relA1</i>	(Hanahan 1983)

Tabelle 19: Verwendete *Y. enterocolitica*-Stämme, Serotyp O:8, Biotyp 1 B

Bakterienstamm	Phäno- bzw. Genotyp	Bezugsquelle / Referenz
JB580v (Ausgangsstamm)	Restriktionsendonuklease YenI $^{-}$ ( $\Delta$ <i>yenI</i> ) spontan Nal $^R$ , Derivat von 8081v	(Kinder et al. 1993)
JB580v $\Delta$ <i>ampC</i>	<i>ampC</i> -Deletionsmutante von JB580v, Km $^R$ , Nal $^R$ , AmpC $^{-}$	Diese Arbeit
JB580v $\Delta$ <i>ampC</i> ( <i>pampC</i> )	JB580v $\Delta$ <i>ampC</i> , <i>pampC</i> , Kan $^R$ , Tet $^R$ , Nal $^R$ , AmpC $^{+}$	Diese Arbeit
JB580v $\Delta$ <i>blaA</i>	<i>blaA</i> -Deletionsmutante von JB580v, Cm $^R$ , Nal $^R$ , BlaA $^{-}$	Diese Arbeit
JB580v $\Delta$ <i>blaA</i> ( <i>pblaA</i> )	JB580v $\Delta$ <i>blaA</i> , <i>pblaA</i> , Cm $^R$ , Tet $^R$ , Nal $^R$ , BlaA $^{+}$	Diese Arbeit
JB580v $\Delta$ <i>ampC</i> / $\Delta$ <i>blaA</i>	<i>ampC</i> / <i>blaA</i> -Doppeldelentionsmutante von JB580v, Km $^R$ , Cm $^R$ , Nal $^R$ , BlaA $^{-}$ , AmpC $^{-}$	Diese Arbeit
JB580v $\Delta$ <i>acrB</i>	<i>acrB</i> -Deletionsmutante von JB580v, Sp $^R$ , Nal $^R$ , AcrB $^{-}$	Diese Arbeit
JB580v $\Delta$ <i>acrB</i> ( <i>pacrB</i> )	JB580v $\Delta$ <i>acrB</i> , <i>pacrB</i> , Sp $^R$ , Cm $^R$ , Nal $^R$ , AcrB $^{+}$	Diese Arbeit
JB580v $\Delta$ <i>blaA</i> / $\Delta$ <i>ampC</i> / $\Delta$ <i>acrB</i>	<i>ampC</i> / <i>blaA</i> / <i>acrB</i> -Dreifachdeletionsmutante von JB580v, Km $^R$ , Cm $^R$ , Sp $^R$ , Nal $^R$ , BlaA $^{-}$ , AmpC $^{-}$ , AcrB $^{-}$	Diese Arbeit
JB580v <sup>MemR</sup> $\Delta$ <i>blaA</i> / $\Delta$ <i>ampC</i> / $\Delta$ <i>acrB</i>	Spontan Mem $^R$ Mutante von JB580v $\Delta$ <i>blaA</i> / $\Delta$ <i>ampC</i> / $\Delta$ <i>acrB</i> , Km $^R$ , Cm $^R$ , Sp $^R$ , Nal $^R$ , Mem $^R$ , BlaA $^{-}$ , AmpC $^{-}$ , AcrB $^{-}$	Diese Arbeit
JB580v $\Delta$ <i>bla</i> / $\Delta$ <i>ampC</i> / $\Delta$ <i>acrB</i> ( <i>pacrB</i> )	JB580v $\Delta$ <i>bla</i> / $\Delta$ <i>ampC</i> / $\Delta$ <i>acrB</i> , <i>pacrB</i> , Km $^R$ , Cm $^R$ , Sp $^R$ , Nal $^R$ , BlaA $^{-}$ , AmpC $^{-}$ , AcrB $^{+}$	Diese Arbeit
JB580v ( <i>pACE</i> )	JB580v + <i>pACE</i> , Tet $^R$ , Nal $^R$	Diese Arbeit
JB580v ( <i>piv2</i> (K))	JB580v + <i>piv2</i> (K), Km $^R$ , Nal $^R$	Diese Arbeit
JB580v ( <i>piv2</i> (T))	JB580v + <i>piv2</i> (T), Tet $^R$ , Nal $^R$	Diese Arbeit
JB580v $\Delta$ <i>acrB</i> ( <i>piv2</i> (K))	<i>acrB</i> -Deletionsmutante von JB580v ( <i>piv2</i> (K)), Km $^R$ , Sp $^R$ , Nal $^{R-}$ , AcrB $^{-}$	Diese Arbeit
JB580v $\Delta$ <i>acrB</i> ( <i>piv2</i> (T))	<i>acrB</i> -Deletionsmutante von JB580v ( <i>piv2</i> (T)), Tet $^R$ , Sp $^R$ , Nal $^{R-}$ , AcrB $^{-}$	Diese Arbeit
JB580v $\Delta$ <i>ompF</i>	<i>ompF</i> -Deletionsmutante von JB580v, Cm $^R$ , Nal $^R$ , OmpF $^{-}$	Diese Arbeit
WA-c	Derivat von WA-314 ( <i>pYV</i> $^{+}$ ), <i>pYV</i> -Verlustmutante, Nal $^R$	(Heesemann and Laufs 1983)
WA <sup>RS</sup>	Restriktionsendonuklease YenI Deletionsmutante von WA-314 (klin. Isolat des Serotyps O:8, Biogruppe 1B mit <i>pYVO8</i> ), Nal $^R$ , YenI $^{-}$	(Heesemann et al. 1984; Antonenko et al. 2003)
WA <sup>RS</sup> $\Delta$ <i>ampC</i> / $\Delta$ <i>blaA</i>	<i>ampC</i> / <i>blaA</i> -Doppeldelentionsmutante von WA <sup>RS</sup> , Cm $^R$ , Nal $^R$ , BlaA $^{-}$ , AmpC $^{-}$	(Schriefer et al. 2013)
WA <sup>RS</sup> $\Delta$ <i>ompF</i>	<i>ompF</i> -Deletionsmutante von WA <sup>RS</sup> , Sp $^R$ , Nal $^{R-}$ , OmpF $^{-}$	Diese Arbeit

**Tabelle 20: Verwendete Klonierungsvektoren**

Plasmid	Phäno- bzw. Genotyp	Bezugsquelle / (Referenz)
pACYC177	Klonierungsvektor, p15a Replikon, Amp <sup>R</sup> , Kan <sup>R</sup>	(Chang and Cohen 1978)
pACYC184	Klonierungsvektor, p15a Replikon, Cm <sup>R</sup> , Tet <sup>R</sup>	(Chang and Cohen 1978)
pCDFDuet-1	Expressionsvektor, T7-Promotor, zwei „multiple cloning sites“, Spec <sup>R</sup>	Novagen, Darmstadt
piv2(K)	pIV2-Plasmid, Kan <sup>R</sup>	(Strauch et al. 2000)
pKD46	λ Red-Rekombinase-Expressionsplasmid (exo, β, γ), repA 101-ts, araC-P <sub>arab</sub> , Amp <sup>R</sup>	(Datsenko and Wanner 2000)
pMOSBlue	Klonierungsvektor, lacZ, f1-ori, „blunt-end“-Enden, Amp <sup>R</sup>	Amersham Biosciences, Freiburg

**Tabelle 21: Hergestellte rekombinante Plasmide für diese Arbeit**

Plasmid	Phäno- bzw. Genotyp	Bezugsquelle / Referenz
pACE	pACYC184 mit entfernter Cm <sup>R</sup> -Kassette, Tet <sup>R</sup>	Diese Arbeit
pampC	pACYC184 mit dem wt-Gen <i>ampC</i> – inseriert in die Cm <sup>R</sup> -Kassette, Tet <sup>R</sup> , AmpC <sup>+</sup>	E.-M. Schriefer, Max von Pettenkofer-Institut, München
pblaA	pACYC184 mit dem wt-Gen <i>blaA</i> – inseriert in die Cm <sup>R</sup> -Kassette, Tet <sup>R</sup> , BlaA <sup>+</sup>	E.-M. Schriefer, Max von Pettenkofer-Institut, München
pacrB	pACYC184 mit dem wt-Gen <i>acrB</i> und dem nativen Promotor des Operon; Cm <sup>R</sup> , AcrB <sup>+</sup>	Diese Arbeit
piv2(T)	pIV2(K)-Plasmid mit ausgetauschter Resistenz, Tet <sup>R</sup>	C. Guggenberger, Max von Pettenkofer-Institut, München

### 2.7.2. Oligonukleotide

In Tabelle 22 sind die bei der Durchführung der Arbeit verwendeten Oligonukleotide (Primer) aufgeführt. Bezogen wurden diese bei Metabion (Martinsried) bzw. Biomers (Ulm) in entsalzter, lyophilisierter und HPLC-aufgereinigter Form. Oligonukleotide mit einer Länge von mehr als 50 Basenpaaren wurden zudem mit dem PAGE-Verfahren aufgereinigt. Die Oligonukleotide wurden nach Lösung und Verdünnung mit H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> auf 100 pmol/μl bis zu ihrer Verwendung bei -20 °C gelagert.

Zur Analyse, Bearbeitung von DNS-Sequenzen und Planung genetischer Manipulationen wurde das Programm DNAMAN (Version 5.2.9; Lynnon Biosoft Corporation; Quebec, Kanada) verwendet. Die Auswahl der Oligonukleotide als auch die Berechnung der Schmelztemperatur (T<sub>m</sub>) erfolgte unter Zuhilfenahme des online abrufbaren Programms Primer3 Input (Version 0.4.0, <http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>).

Tabelle 22: Verwendete Oligonukleotide

Bezeichnung	Sequenz (5' – 3')	Bezugsquelle / Referenz
AmpC_FOR_FRT_Kan	AACCATAGATTGACTTGTTAGATTTTCTATTATCAA GTGCTAAATATAATGAAGTTCCTATTCTCTAGAAA GTATAGGAACTTCTCACTGACACCCTCATCAGTG	E.-M. Schriefer, MvP-I, München
AmpC_FRT_Kan_REV	TTTAACTTATCTCATAGAAGCGCAGCAGAAATGTT TAGCTATCTGTCATCGAAGTTCCTATACTTTCTAGA GAATAGGAACTTCCGTCAAGTCAGCGTAATGCTC	E.-M. Schriefer, MvP-I, München
AmpC_FOR_seq	AGATTTTCCCCTTCGGTTGTG	E.-M. Schriefer, MvP-I, München
AmpC_REV	GTGCAAAAGAAGCTGGGAAG	E.-M. Schriefer, MvP-I, München
Kan_FOR_Test	GCGCAATCACGAATGAATAACGG	E.-M. Schriefer, MvP-I, München
BlaA_FOR_FRT_Cm	AAGGCTAAATGCCACTTACCCTGCCATTTAGCCTT TTTTTATTTCTGAATGAAGTTCCTATTCTCTAGAAA GTATAGGAACTTCTGACGGAAGATCACTTCGCAG	E.-M. Schriefer, MvP-I, München
BlaA_REV_FRT_Cm	GCCAAAATATCAAAAGCATCTATAGCGGGTAACGT CACCCGCACAGGAAAGAAGTTCCTATTCTCTAGAA AGTATAGGAACTTCTTGAGAAGCACACGGTCCACAC	E.-M. Schriefer, MvP-I, München
BlaA_FOR_seq	CAGGTCATTTCCGACCTGTTC	E.-M. Schriefer, MvP-I, München
BlaA_REV	TGTCACCGAAAAACAGAGGAC	E.-M. Schriefer, MvP-I, München
Cm_FOR_Test	GCCTGATGAATGCTCATCCG	E.-M. Schriefer, MvP-I, München
Spec_Hom_For	AGCAGCCCCGGCTGACACAGCGAAGAAGTCTTAA AAGGAGCCGGTAATTCTGGGTAACCTTTGTATGTGT CC	Diese Arbeit
Spec_Hom_Rev	GTTATTTGGTATATTGATCACAATATAATCATTTCG ACGAAATTGGCTGCGACATTATTTGCCGACTACC	Diese Arbeit
Spec_Seq_For_2	CTGTTAGTGCCTCAACAAGG	Diese Arbeit
Spec_Seq_Rev_2	AGTGTTGTTCCAAACGAGTG	Diese Arbeit
AcrB_Test_For_2	TTGGCGTCTAAGTTACCAAG	Diese Arbeit
Spec_Test_For_2	AGAAGTCACCATTGTTGTGC	Diese Arbeit
Eam1105I_Acr_pro_FOR	TATGACTGAGAGTCTTTGTTGCCGGGTCTCTTC	Diese Arbeit
XhoI_Acr_pro_REV	CCACTCGAGAGATAAACCTCAAGTGTCCGATT	Diese Arbeit
XhoI_AcrB_FOR	CAGCTCGAGATGGCTAAGTTCCTTATTGATCG	Diese Arbeit
Bsu36I_AcrB_REV	CACCTCAGGTTACTTCACCTTATGGTCAACAG	Diese Arbeit
AcrFuKo_967_Test_FOR	TCTCTTCGGCTTGCTGTTG	Diese Arbeit
AcrFuKo_967_Test_REV	TTTCAAGCGAACCTGTGAAC	Diese Arbeit
ompF_FOR_FRT_Cm	GGCTTTTATCATTTTTTAAAGTTCGATCTAAGTCAC AAAGTTCCTGATAGAAGTTCCTATTCTCTAGAAA GTATAGGAACTTCTGACGGAAGATCACTTCGCAG	Diese Arbeit
ompF_REV_FRT_Cm	CTGTCTTTTTTAACTTAGGTCAGCAGATAAACTGCC GGGTTAAGTTTAAACGAAGTTCCTATTCTCTAGAAA GTATAGGAACTTCTTGAGAAGCACACGGTCCACAC	Diese Arbeit

Fortsetzung von Tabelle 22

Bezeichnung	Sequenz (5' – 3')	Bezugsquelle / Referenz
ompF_Seq_FOR_1	CTGAGCATGAGCGCTATTTA	Diese Arbeit
ompF_Seq_1456_REV_1	ATTTAGCACCAACGTTCCAT	Diese Arbeit
ompF_Seq_FOR_2	TTGCTGAATTCGGTTCATTA	Diese Arbeit
ompF_Seq_1409_REV_2	GGTATCGTTCTCTGGCGTAT	Diese Arbeit
pAC_CM_int_608_rev	CCTGCCACTCATCGCAGTAC	Diese Arbeit
ompC_Seq1_for	GGTGGCCAGCGTAGAAATTA	Diese Arbeit
ompC_Test1_rev	AAACCAGCGAAACCAATACG	Diese Arbeit
ompC_Test2_for	AAGACGGCAACAAACTGGAC	Diese Arbeit
ompC_Seq2_rev	CAAGACCGTTGCCTTAAACC	Diese Arbeit
polA_Primer_FOR	GATGTCTGCCAAGTTAGAGC	Diese Arbeit
polA_Primer_REV	CTTATCATCTTCCAGCAAGG	Diese Arbeit
gapA_Primer_FOR	TACCCCTATGTTTCGTTATGG	Diese Arbeit
gapA_Primer_REV	CCAGCTTTAGCATCGAATAC	Diese Arbeit
pYV_virF_745_FOR	GTTGAGCATTACACAAGATGG	Diese Arbeit
pYV_virF_745_REV	TTTTAGTAAGACGGGCTTGG	Diese Arbeit
pKD46_bet_FOR	CCTTTCCTGATAAGCAGAATG	E.-M. Schriefer, MvP-I, München
pKD46_bet_REV	AATCCAAGAGCTTTTACTGC	E.-M. Schriefer, MvP-I, München
pKD46_733_FOR	CTGGTACTTTGCCAACTATGAC	Diese Arbeit
pKD46_733_REV	CCTACCTACGTAACGGACTAAGA	Diese Arbeit
YE1559_FOR	AGATCATTGCAGAAGTTGCTC	Diese Arbeit
YE1559_REV	GTCATCTCCCAAAGGTAACAG	Diese Arbeit
YE2635_FOR	CTTCTTCAATGGAATTGAGC	Diese Arbeit
YE2635_REV	ATACTTCGATGCTGTCATCC	Diese Arbeit
YE0055_FOR	CCAGGTGTCTGTTATCACCT	Diese Arbeit
YE0055_REV	AAATCGTCAACTTCATGACC	Diese Arbeit

## 2.8. Antikörper zur indirekten Immunfluoreszenzfärbung von Gewebeschnitten

In Tabelle 23 sind die bei der Durchführung der Arbeit verwendeten, die Zielstruktur bindenden primären Antikörper für die indirekte Immunfluoreszenzfärbung von Milz-Kryomikrotomschnitten aufgeführt. Diese wurden stets gekühlt und lichtgeschützt gelagert.

**Tabelle 23: Primäre Antikörper zum Nachweis von Immunzellen und Yersinien**

Bezeichnung	Beschreibung	Verdünnung	Referenz	Bezugsquelle
Hamster anti-Maus CD3ε	Syrischer Hamster, IgG2κ; 500A2; Der CD3-Komplex wird auf NK-T-Zellen, Thymozyten und reifen T-Lymphozyten exprimiert. Zur Detektion von <b>T-Lymphozyten</b> .	1:50	( <i>Leo et al. 1987</i> )	BD Pharmingen (Heidelberg)
Ratte anti-Maus CD19	Ratte, IgG2a; 1D3; CD19 ist ein 95kDa Transmembran glykoprotein. Zur Detektion von <b>B-Lymphozyten</b>	1:50	( <i>Krop et al. 1996; Sato et al. 1996</i> )	BD Pharmingen (Heidelberg)
Ratte anti-Maus Ly-6G	Ratte, IgG2a; 1A8; Ly-6G ist ein 21-25kDa GPI-Ankerprotein, das auf Granulozyten exprimiert wird. Zur Detektion von <b>PMN</b>	1:50	( <i>Fleming et al. 1993</i> )	BD Pharmingen (Heidelberg)
Hamster anti-Maus SIGN-R1	Armenischer Hamster, IgG; SIGN-R1 wird als Typ II Transmembran-C-Typ-Lektin auf Marginalzonen-Makrophagen exprimiert. eBio22D1 (22D1); Zur Detektion von <b>Marginalzonenmakrophagen</b> .	1:50	( <i>Kang et al. 2003; Kang et al. 2004</i> )	eBioscience (Frankfurt)
Ratte anti-Maus MARCO	Ratte, IgG1; ED31; Zur Detektion von <b>Marginalzonenmakrophagen</b>	1:400	( <i>Elomaa et al. 1995; van der Laan et al. 1999</i> )	AbD Serotec (Puchheim)
Kaninchen anti- <i>Yersinia</i> (WA-vital)	Kaninchenserum, polyvalent, institutseigen; (Bindung von LPS, YadA, Yops u. a.) Zum indirekten Immunfluoreszenznachweis von <b><i>Y. enterocolitica</i> O:8</b>	1:5000	( <i>Heesemann and Laufs 1983</i> )	J. Heesemann, MvP-I (München)

## Material und Methoden

In Tabelle 24 sind die bei der Durchführung der Arbeit verwendeten sekundären Fluorochrom-konjugierten Antikörper für die Immunfluoreszenzfärbung aufgeführt. Diese wurden stets gekühlt und lichtgeschützt entsprechend den Empfehlungen des Herstellers gelagert.

**Tabelle 24: Sekundäre Antikörper**

<b>Bezeichnung</b>	<b>Beschreibung / Klon</b>	<b>Verdünnung</b>	<b>Bezugsquelle</b>
Anti-Ratte IgG (H+L)	IgG (H+L) Alexa Fluor 647	1:200	Invitrogen (Darmstadt)
Anti-Kaninchen IgG (H+L)	IgG (H+L) Alexa Fluor 555	1:200	Invitrogen (Darmstadt)
Anti-syrischer Hamster IgG (H+L)	IgG (H+L) AlexaFluor 488	1:200	Invitrogen (Darmstadt)
Anti-armenischer Hamster IgG (H+L)	IgG (H+L) AlexaFluor 488	1:200	Dianova (Hamburg)

## 2.9. Mikrobiologische Methoden

### 2.9.1. Kultivierung von Bakterienstämmen

Die in dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme von *Yersinia enterocolitica* und *Escherichia coli* wurden aerob bei 27 °C bzw. 37 °C in Flüssigmedien in einem ausreichend belüfteten Schüttelinkubator bei ca. 180 U/min oder auf Nährböden in einem Brutschrank kultiviert. Als Medien wurden in der Regel LB bzw. BHI verwendet (s. Tabelle 14). Für die Durchführung von Versuchen wurde am Vorabend stets eine neue Übernachtskultur der angelegten Stammkultur in ausreichend Medium angesetzt. Um den Verlust von Plasmiden zu vermeiden, wurden die entsprechenden Antibiotika hinzugefügt. Bei Bedarf wurden den Medien oben genannte Zusätze beigemischt.

### 2.9.2. Lagerung und Kryokonservierung von Bakterienstämmen

Eine kurzzeitige Lagerung von Bakterienstämmen bis zu drei Tagen war auf Nährböden bei 4 °C und entsprechendem Selektionsdruck möglich.

Für eine längerfristige Lagerung eines Bakterienstamms wurden Übernachtskulturen bei 4 °C abzentrifugiert, mit eisgekühltem PBS gewaschen, in Einfriermedium aufgenommen, ggf. aliquotiert und bei -80 °C eingefroren.

### 2.9.3. Herstellung und Lagerung von Infektionsaliquots

Mauspassagierte Bakterienstämme (s. a. Kapitel 2.12.2) wurden in 200 ml LB-Medium bei 27 °C über Nacht kultiviert, am folgenden Morgen abzentrifugiert (6000 U/min, 4 °C 10 min), in 20 ml Einfriermedium resuspendiert, zu 500 µl Portionen aliquotiert und bei -80 °C asserviert.

### 2.9.4. Bestimmung der definierten Keimzahl

Zur Keimzahlbestimmung wurden zwei von den am Vortag eingefrorenen Infektionsaliquots (s. Kapitel 2.9.3) auf Eis aufgetaut, jeweils als Triplikate in Verdünnungsreihen auf antibiotikafreien LB-Nährböden ausplattiert und für 24 - 36 h bei 27 °C bebrütet. Die hier ermittelte Anzahl der koloniebildenden Einheiten (KBE, „*colony forming units*“, CFU) pro Milliliter war Grundlage für die folgenden Mausinfektionsversuche und wurde bei jedem Versuch kontrolliert.

### **2.9.5. Bestimmung der optischen Dichte**

Die optische Dichte (OD) von Bakterienkulturen wurde mit einem Spektralphotometer durch Messungen der Absorption bei einer Wellenlänge von 600 nm ( $OD_{600nm}$ ; nachfolgend  $OD_{600}$  genannt) bestimmt. Das sterile Medium diente jeweils als Leerwert. Ab einer  $OD_{600} \geq 0,3$  wurden die Messproben verdünnt, um eine größere Messgenauigkeit zu erreichen. Als möglicher Richtwert gilt, dass für eine 1 cm x 1 cm Küvette, gefüllt mit einer *Yersinia*/PBS-Suspension, bei einer  $OD_{600} = 0,3$  ungefähr  $5 \times 10^7$  Bakterien in 1 ml Suspension enthalten sind.

### **2.9.6. Durchführung von Wachstumskurven**

Zur besseren Beurteilung und dem Vergleich des bakteriellen Wachstums wurden Wachstumskurven angefertigt. Hierfür wurden zunächst antibiotikafreie Übernachtskulturen der zu untersuchenden Stämme in LB-Medium angelegt, welche am darauf folgenden Morgen mit frischem LB-Medium 1:50 verdünnt und für 2 h bei 27 °C bzw. 37 °C inkubiert wurden. Anschließend wurden die Kulturen mit frischem LB-Medium auf eine  $OD_{600} = 0,05$  herunterverdünnt und bei der gewünschten Temperatur über einen Zeitraum von mind. 12 h schüttelnd inkubiert. Messungen der  $OD_{600}$  fanden mindestens alle 30 min statt. Der Versuch wurde mehrfach durchgeführt, wobei stets der Mittelwert der Einzelmessungen berechnet wurde.

### **2.9.7. Herstellung elektrokompenter Bakterien**

Zur Herstellung elektrokompenter Bakterien wurden Übernachtskulturen der jeweiligen Stämme ungefähr 1:100 in LB-Medium verdünnt und bei 27 °C (für *Y. enterocolitica*) oder 37 °C (für *E. coli*) unter Schütteln erneut inkubiert. Nach dem Erreichen der  $OD_{600}$  von 0,5 - 0,7 wurden die Kulturen für 20 min eisgekühlt, anschließend bei 4 °C und 6000 U/min für 10 min abzentrifugiert und zweimal mit ausreichend vorgekühltem  $H_2O_{bidest}$  gewaschen. Es folgte ein letzter Waschschriff mit auf Eis gekühlter, 10 %-Glycerinlösung.

Das gewonnene Bakterienpellet wurde in ca. 500  $\mu$ l 10 %-Glycerinlösung resuspendiert und als 50  $\mu$ l-Aliquots bei -80 °C bis zur Verwendung eingefroren.

## **2.9.8. Kontrolle auf das Vorhandensein des pYV-Plasmids**

### **2.9.8.1. Kontrolle mittels Agglutinationstest**

Bei Bedarf konnte das Vorhandensein des pYV-Plasmids indirekt über den Nachweis des pYV-kodierten *Yersinia*-Adhäsins YadA mittels Agglutinationstest überprüft werden. Hierzu wurde der zu untersuchende Stamm von *Y. enterocolitica* auf einem Schafsblut-Agarnährboden ausgestrichen und bei 37 °C für ca. 4 h inkubiert. Mit einer Pipettenspitze wurde eine Kolonie abgenommen und auf einem Objektträger mit 3 µl des Agglutinationstestserums Anti-P1-8 30 sec lang vermischt (Heesemann and Laufs 1983). Bildeten sich Agglutinate galt dies als indirekter Nachweis des pYV-Plasmids. Um falsch-positive Ergebnisse ausschließen zu können, wurde parallel eine zweite Probe mit isotonischer Kochsalzlösung (NaCl (0,9%)) durchgeführt.

### **2.9.8.2. Kontrolle mittels PCR**

Das pYV-Plasmid wurde bei Bedarf auch mittels PCR nachgewiesen (s. Kapitel 2.10.4). Hierfür wurde ein Oligonukleotidpaar, das innerhalb von *virF* (Transkriptionsfaktor für Virulenzgene) bindet, gewählt (s. Tabelle 22).

## **2.9.9. Eliminierung des pYV-Plasmids**

Um *Y. enterocolitica*-Stämme vom pYV-Plasmid zu „kurieren“, wurden diese auf LB-Nährböden, denen 0,5 mM MgCl<sub>2</sub> und 0,5 mM EGTA zugesetzt worden war, in verschiedenen Verdünnungsstufen ausgestrichen und bei 37 °C über Nacht inkubiert (pYV-positive Yersinien sind wachstumsgehemmt bei EGTA-CA<sup>2+</sup>-Komplexierung). Am folgenden Tag zeigten sich Kolonien von unterschiedlicher Größe, wobei davon auszugehen ist, dass durch den Verlust des pYV-Plasmids die plasmidlosen Klone bei 37 °C schneller wachsen und somit größere Kolonien als die pYV-haltigen Klone bilden. Es erfolgte eine Überimpfung einer singulären Kolonie auf BHI- und Schafsblut-Agarnährböden zur Reinheitskontrolle sowie vor der Archivierung die Überprüfung des Spontanverlusts des Plasmids mittels PCR.

## **2.9.10. Antimikrobielle Empfindlichkeitstestung – in vitro**

### **2.9.10.1. Antibiotika-Plättchendiffusionstest („Hemmhofstest“)**

Zur Bestimmung des Hemmhofdurchmessers (HHDM; gemessen in mm), der durch antibiotikahaltige Testplättchen beim Wachstum auf Festmedien verursacht wird (Hemmhof = das vom Testkeim um das antibiotikahaltige Testplättchen makroskopisch nicht besiedelte Areal), wurden verschiedene *Y. enterocolitica*-Stämme entsprechend den EUCAST-Empfehlungen auf Mueller-Hinton (MH)-Nährböden ausgestrichen, diese dann mit Antibiotika-Testplättchen beschickt und nach einer Inkubation von 16-20 h abgelesen (EUCAST 2010). Die Inokulation der Nährböden erfolgte mit Bakteriensuspensionen äquivalent zum Standard McFarland 0,5 (entspricht in etwa OD<sub>600</sub> von 0,132) mittels sterilen Wattetupfern. Die Antibiotika-Testplättchen wurden mit einer abgeflamten Pinzette auf dem Nährboden verteilt.

### **2.9.10.2. MHK-Bestimmung auf Nährböden („E-Teststreifen“)**

Zur Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration verschiedener Antibiotika im Agardiffusionstest wurden die zu untersuchenden *Y. enterocolitica*-Stämme entsprechend den EUCAST-Empfehlungen auf MH-Nährböden ausgestrichen, diese dann mit Antibiotika-Teststreifen beschickt und nach einer Inkubation von 16 - 20 h abgelesen (EUCAST 2010). Die Inokulation der Nährböden erfolgte mit Bakteriensuspensionen äquivalent zum Standard McFarland 0,5 (entspricht in etwa OD<sub>600</sub> von 0,132) mittels sterilen Wattetupfern. Die Antibiotika-Teststreifen (ETest<sup>®</sup>- bzw. M.I.C.Evaluator<sup>®</sup>-Streifen; nachfolgend E-Teststreifen genannt) wurden mit einer abgeflamten Pinzette auf dem Nährboden verteilt. Beim Ablesen wurden die Hinweise der Hersteller beachtet.

### **2.9.10.3. MHK-Bestimmung in Flüssigkultur („Mikrodilutionsverfahren“)**

Zur Bestimmung der Antibiotikaempfindlichkeit wurden aus Übernachtskulturen der zu untersuchenden *Y. enterocolitica*-Stämme frische Kulturen in antibiotikafreiem LB-Medium im Verhältnis 1:50 angeimpft und bis zu einer OD<sub>600</sub> von ca. 0,6 schüttelnd bei 27 °C bzw. 37 °C inkubiert. Währenddessen wurde eine 12-Napf-Platte vorbereitet, indem in jeden Napf 1 ml einer definierten in LB-Medium gelösten Menge des zu untersuchenden Antibiotikums pipettiert wurde. Im Anschluss wurden die angewachsenen Bakterienkulturen mit frischem LB-Medium auf OD<sub>600</sub> = 0,02 verdünnt und je 1 ml in die vorbereitete 12-Napf-Platte gegeben. Die Napf-Platten wurden anschließend bei gewünschter Temperatur für 12 h schüttelnd inkubiert. Zum Abschluss wurde die OD<sub>600</sub> im Vergleich zu nicht beimpftem Medium gemessen.

## 2.10. Genetische und molekularbiologische Methoden

### 2.10.1. Isolierung von Nukleinsäuren

Zur Isolierung von Plasmid-DNS aus Bakteriensuspensionen wurden je nach Bedarfsmenge die in Kapitel 2.2 (Tabelle 7) genannten molekularbiologischen „Kits“ laut den Herstellerangaben verwendet. Die so isolierte Plasmid-DNS wurde in 30 - 100  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$  eluiert und bis zu ihrer weiteren Verwendung bei  $-20\text{ }^\circ\text{C}$  gelagert.

Zur Gewinnung der Matrizen-DNS für die Durchführung einer PCR aus Ganzzelllysaten (s. a. Kapitel 2.10.4) wurde entweder eine einzelne Kolonie vom Nährboden entnommen oder 1,5 ml einer Übernachtskultur abzentrifugiert (15.000 U/min für 5 min) und in 100  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$  resuspendiert. Die Bakteriensuspension wurde anschließend bei  $95\text{ }^\circ\text{C}$  für 10 min erhitzt und der Überstand nach erneuter Abzentrifugation (15.000 U/min für 5 min) in ein Reaktionsgefäß überführt.

Zur RNS-Isolierung aus einer Bakteriensuspension wurde das in Kapitel 2.2 (Tabelle 7) genannte molekularbiologische „*High Pure RNA Isolation Kit*“ laut den Herstellerangaben verwendet. Die isolierten Nukleinsäuren wurden in 30 - 100  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$  eluiert und bis zu ihrer weiteren Verwendung bei  $-80\text{ }^\circ\text{C}$  gelagert. In einigen Fällen war zur Generierung DNS-freier RNS-Proben eine zusätzliche Behandlung mit Desoxyribonukleasen notwendig. Hierzu wurde das in Kapitel 2.2 genannte „*DNA-free Kit*“ laut den Empfehlungen des Herstellers verwendet. Zur Bestätigung der Abwesenheit von DNS wurde eine PCR auf die Haushaltsgene *polA* und *gapA* durchgeführt.

### 2.10.2. Konzentrationsbestimmung von DNS

Die Konzentrationsbestimmung erfolgte anhand spektralphotometrischer Absorptionsmessungen von 1:50 verdünnten Lösungen gegenüber  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ . Zum Ausschluss von Verunreinigungen (z. B. durch Proteine) erfolgten stets parallel OD-Messungen bei unterschiedlichen Wellenlängen ( $\text{OD}_{260\text{nm}}$  und  $\text{OD}_{280\text{nm}}$ ), deren Quotient ab einem Wert von 1,8 für eine ausreichende Reinheit spricht.

### 2.10.3. Aufreinigung von DNS mittels Präzipitation

Die quantitative und qualitative Aufreinigung von DNS-Lösungen erfolgte mittels Präzipitation. Hierzu wurden zu 10  $\mu\text{l}$  DNS-Lösung zunächst 36  $\mu\text{l}$  100 % Ethanol (EtOH) und 1,2  $\mu\text{l}$  einer 3 M Natriumacetat-Lösung hinzugegeben, vermengt und 30 min bei  $-80\text{ }^\circ\text{C}$  inkubiert. Dies bewirkte die Dehydratisierung der Nukleinsäuren und deren Fällung. Nach anschließender Zentrifugation mit 15.300 U/min für 15 min wurde das DNS-Pellet vorsichtig mit eiskaltem 70 % unvergälltem Ethanol gewaschen und erneut abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und die Probe für ca. 20 min bei ca.  $25\text{ }^\circ\text{C}$  getrocknet. Abschließend wurde das DNS-Pellet in der gewünschten Menge  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$  resuspendiert.

#### 2.10.4. DNS-Amplifikation mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Amplifikation spezifischer DNS-Abschnitte erfolgte mittels Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction; PCR). Zur Überprüfung von Genabschnitten bzw. Nukleotidsequenzen wurde die temperaturstabile *Red-Taq DNA-Polymerase* für die PCR verwendet. Wurde jedoch eine höhere Genauigkeit benötigt (z. B. für Sequenzierungen oder die Weiterverwendung für Klonierungen) wurde eine *Phusion High-Fidelity Polymerase* mit 3'-5'-Korrekturlese-Exonuklease-Aktivität zur Amplifikation der DNS eingesetzt.

Als Matrizen-DNS diente entweder zuvor isolierte Plasmid-DNS oder das Extrakt eines Ganzzelllysats (s. a. Kapitel 2.10.1). Die verwendeten Oligonukleotide hatten in der Regel einen Bindebereich von 16 - 28 Basenpaaren an der Matrizen-DNS. Bei Bedarf wurden zusätzlich Überhänge am 5'-Ende des Oligonukleotids angefügt, um spezifische Restriktionsschnittstellen oder Homologiearme zu erzeugen. Die Oligonukleotidpaare wurden so gewählt, dass sie möglichst im Schmelztemperaturbereich zwischen 53 °C und 69 °C lagen.

Die Berechnung der Schmelztemperatur ( $T_m$ ) erfolgte unter Zuhilfenahme des online abrufbaren Programms „Primer3 Input“ (Version 0.4.0, <http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>). Der Reaktionsansatz (i. d. R. 50  $\mu$ l) für eine PCR mit der verwendeten *Red-Taq DNA-Polymerase* bestand aus den in Tabelle 25 genannten Bestandteilen. Bei Verwendung der *Phusion High-Fidelity Polymerase* wurde die vom Hersteller empfohlene Zusammensetzung des Reaktionsansatzes gewählt.

**Tabelle 25: Reaktionsansatz einer PCR  
mit *Red-Taq DNA-Polymerase***

Ansatz	
Matrizen-DNS (100 ng/ $\mu$ l)	1,5 $\mu$ l
5'-Oligonukleotid (100 pmol/ $\mu$ l)	0,5 $\mu$ l
3'-Oligonukleotid (100 pmol/ $\mu$ l)	0,5 $\mu$ l
Red-Taq Master Mix (inkl. Polymerase)	25 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	22,5 $\mu$ l
Gesamtvolumen	50 $\mu$ l

Die PCR mit der verwendeten *Red-Taq DNA-Polymerase* durchlief die in Tabelle 26 genannten Reaktionsschritte. Nach der initialen Denaturierung, die zu einer Deaktivierung von thermolabilen Enzymen und der Denaturierung von Proteinen und Nukleinsäuren führt, folgten i. d. R. die 35 Zyklen-PCR (Denaturierung, Hybridisierung der Oligonukleotide (engl. Annealing) und Elongation), die die exponentielle Vermehrung der gewünschten Nukleotidsequenz bewirkt.

Die Hybridisierungstemperatur wurde innerhalb des Intervalls [ $T_m - 5\text{ °C}$ ;  $T_m - 0,5\text{ °C}$ ] oligonukleotidspezifisch gewählt. Je nach Länge der zu amplifizierenden Sequenz musste zusätzlich die Elongationszeit angepasst werden. Nach Abschluss der finalen Elongation wurde das PCR-Produkt bis zur anschließenden Verwendung auf  $4\text{ °C}$  heruntergekühlt, ggf. bei  $-20\text{ °C}$  gelagert.

Bei der Verwendung der *Phusion High-Fidelity Polymerase* wurde das vom Hersteller empfohlene PCR-Protokoll berücksichtigt.

**Tabelle 26: Reaktionsschritte einer PCR**  
mit der *Red-Taq DNA-Polymerase*

Ablauf			Zyklen
1. Initiale Denaturierung	96°C	10 min	1
2. DNS-Amplifikation			35
2.1 Denaturierung	96°C	30 sec	
2.2 Hybridisierung	x °C	30 sec	
2.3 Elongation	72°C	30 sec/kb	
3. Finale Elongation	72°C	10 min	1
4. Kühlung	4°C	∞	1

### 2.10.5. Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)

Zum Transkriptionsnachweis von Genen wurden DNS-freie RNS-Proben (s. a. Kapitel 2.10.1) unter Zuhilfenahme des in Kapitel 2.2 (Tabelle 7) aufgeführten „*Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis Kits*“ nach dem vom Hersteller empfohlenen Protokoll behandelt. Die im ersten Schritt mit der reversen Transkriptase erzeugte komplementäre DNS (engl. complementary DNA, cDNA) wurde in einem zweiten Schritt mittels konventioneller PCR vervielfältigt (s. a. Kapitel 2.10.4).

### 2.10.6. Aufreinigung von PCR Produkten

War die Weiterverwendung des PCR Produktes beabsichtigt, wurde dieses unter Zuhilfenahme des in Kapitel 2.2 (Tabelle 7) genannten „*Kits*“ nach dem jeweiligen Protokoll des Herstellers aufgereinigt, die DNS in  $15 - 50\text{ }\mu\text{l H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$  eluiert und bis zur weiteren Nutzung bei  $-20\text{ °C}$  gelagert.

Bei Bedarf wurde das PCR-Produkt zur erweiterten Aufreinigung zuvor mittels Gelelektrophorese der Größe nach aufgetrennt (s. a. Kapitel 2.10.7).

### **2.10.7. Agarosegel-Elektrophorese und Dokumentation**

Zur Überprüfung bzw. weiterführenden Aufreinigung des PCR-Produkts wurde das Probevolumen mit einem Zehntel DNS-Probenpuffer (10x) vermischt und über ein 1,0 - 1,5 % Agarosegel der Größe und negativen Ladung nach bei 100 V (Analyse) bzw. 80 V (Präparation) über einen Zeitraum von 30 - 120 min getrennt. Zur korrekten Beurteilung der Fragmentgröße wurde stets zusätzlich eine „DNS-Leiter“ als Größenstandard aufgetragen.

Zur Detektion der DNS wurde das Agarosegel zunächst für 10 - 20 min in ein Ethidiumbromid-Färbebad gelegt, sodass sie anschließend auf einem UV-Transilluminator sichtbar gemacht und mittels integrierter Kamera dokumentiert werden konnte. Bei Bedarf konnten hier gezielt DNS-Banden ausgeschnitten und dann gemäß Kapitel 2.10.6 eluiert werden.

### **2.10.8. Sequenzierung von DNS**

Alle in dieser Arbeit hergestellten Deletionsmutanten wurden auf die Korrektheit der veränderten Nukleotidsequenz hin kontrolliert. Hierzu wurden aufgereinigte PCR-Proben der jeweiligen Bereiche zusammen mit den gewünschten Oligonukleotidpaaren – jeweils in ausreichender Konzentration – zur Sequenzierung an die Firma GATC (Konstanz) geschickt. Die erhaltenen Nukleinsäuresequenzen wurden mit dem kostenlosen, online frei zugänglichen Programm Multalin (Version 5.4.1, <http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/>, zuletzt abgerufen am 08.09.2011) analysiert.

### **2.10.9. Sequenzspezifische Spaltung und Ligation von DNS**

Die sequenzspezifische Spaltung von PCR-Produkten und Plasmid-DNS wurde u. a. zur Linearisierung von Plasmiden, dem Erhalt „passender“ PCR-Produkte (mit spezifischen klebrigen Enden (engl. *sticky ends*) oder glatten Enden (engl. *blunt ends*) oder der Kontrolle von Klonierungen benötigt. Hierzu wurden Reaktionsansätze mit verschiedenen Restriktionsendonukleasen und den mitgelieferten Pufferlösungen entsprechend dem vom Hersteller empfohlenen Protokoll verwendet. Die Inkubationszeit betrug bei konventionellen Enzymen i. d. R. 5 - 16 h, bei den „FastDigest“-Enzymen lediglich 5 - 30 min. Nach Hitzeinaktivierung (laut Herstellerangaben) wurden die erhaltenen Produkte entweder direkt für die anschließende Ligation verwendet oder über die Gelelektrophorese separiert und aufgereinigt (s. a. Kapitel 2.10.7).

Die Ligation linearisierter DNS-Fragmente erfolgte mittels einer T4 DNS-Ligase (5 U/ $\mu$ l) nach den Empfehlungen des Herstellers. Der 10  $\mu$ l Reaktionsansatz wurde zunächst bei 16 °C über Nacht inkubiert und anschließend bei 65 °C für 10 min inaktiviert. Bei Verwendung eines „Rapid DNA Ligation Kits“ konnte die Ligationszeit auf 30 min bei 21 °C reduziert werden. Zur Analyse, Bearbeitung von DNS-Sequenzen und Planung

genetischer Manipulationen wurde das Programm „DNAMAN“ (Version 5.2.9; Lynnon Biosoft Corporation; Quebec, Kanada) verwendet.

#### **2.10.10. Transformation elektrokompenter Bakterien**

Elektrokompente Bakterien wurden 20 min lang auf Eis (0 °C) inkubiert, mit der DNS aus ca. 2 µl des Ligationsansatzes (s. a. Kapitel 2.10.9) oder 5 ng Plasmid-DNS (s. a. Kapitel 2.10.1) vermischt und in eine Elektroporationsküvette überführt. Die Transformation erfolgte bei 2,5 kV, 200 Ω und 25 µF. Anschließend wurde die Suspension rasch in 1 ml vorgewärmtes SOC-Medium aufgenommen und bei 400 U/min für 1 h bei 37 °C für *E. coli* oder 27 °C für *Y. enterocolitica* in einem Thermoblock inkubiert. Im Anschluss wurde die gesamte Bakteriensuspension in verschieden großen Portionen (10 µl – 500 µl) zur Selektion auf antibiotikahaltigen Nährböden ausplattiert und bei entsprechender Temperatur (37 °C bzw. 27 °C) im Brutschrank über 24 - 48 h inkubiert. Zur Erfolgskontrolle wurden vor der Asservierung und Weiterarbeit stets Einzelkolonien auf das Vorhandensein der neu eingebrachten DNS mittels PCR überprüft.

#### **2.10.11. Herstellung von chromosomalen Deletionsmutanten**

##### **2.10.11.1. Vorbereitung der Bakterienkulturen**

Die Herstellung von chromosomalen Deletionsmutanten erfolgte nach einer Methode der homologen Rekombination, bei der der zu deletierende Genabschnitt im Chromosom durch ein lineares PCR-Fragment mit ca. 50 bp kurzen Homologiearmen ersetzt wird (s. a. *Datsenko and Wanner 2000*). Dieses entspricht meistens einer Antibiotikakassette zur Selektion.

Zur Vorbereitung wurde der jeweilige Bakterienstamm zunächst elektrokompent gemacht (s. a. Kapitel 2.9.7) und anschließend das temperatursensitive Replikon pKD46 eingebracht (s. a. Kapitel 2.10.10). Dieses ermöglicht die durch L-Arabinose induzierbare Expression des ebenfalls auf dem Plasmid vorhandenen λ-Phagen-Rekombinationssystems.

Mit einer über Carbenicillin selektierten und PCR-positiven Einzelkolonie wurde eine 10 ml Übernachtskultur angesetzt, die am folgenden Morgen 1:50 mit antibiotikahaltigem LB-Medium verdünnt und bei 27 °C schüttelnd inkubiert wurde. Ungefähr 1 h nach Beginn der Inkubation erfolgte die Zugabe von L-Arabinose bis zu einer Endkonzentration von 1 - 2 %. Beim Erreichen einer Bakteriendichte von OD<sub>600</sub> ~ 0,5 wurden die ausreichend induzierten Bakterien elektrokompent gemacht (s. a. Kapitel 2.9.7). Hier erfolgte jedoch ein zusätzlicher zweiter Waschschriff mit der 10 %-Glycerinlösung und die abschließende Aufnahme der Bakterien in nur 300 µl 10 %-Glycerinlösung. Bis zur Weiterverwendung wurden auch diese nach der Schockgefrierung auf Trockeneis bei -80 °C gelagert.

### 2.10.11.2. Erstellung der Oligonukleotide für die Mutagenese

Die Oligonukleotide für die Mutagenese bestehen aus 2 bzw. 3 Segmenten. Am 5'-Ende befindet sich der 50 bp lange Homologiearm, der die identische Nukleotidsequenz wie der angrenzende Bereich des zu deletierenden Gens besitzt. Es folgt bei Bedarf eine FRT (FLP recognition target)-Sequenz, die die Entfernung der eingebrachten Genkassette ermöglicht. Das dritte ca. 20 bp lange Segment dient zur Anlagerung an die Amplifikation der gewünschten zu übertragenden Nukleotidsequenz. Diese entsprach einer Antibiotikaresistenzkassette zur verbesserten Selektion der veränderten Klone. Die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide sind in Tabelle 22 aufgelistet.

Zur Analyse, Bearbeitung von DNS-Sequenzen und Planung genetischer Manipulationen wurde das Programm „DNAMAN“ (Version 5.2.9; Lynnon Biosoft Corporation; Quebec, Kanada) verwendet. Die Auswahl der Oligonukleotide als auch die Berechnung der Schmelztemperatur ( $T_m$ ) erfolgte unter Zuhilfenahme des online abrufbaren Programms „Primer3 Input“ (Version 0.4.0, <http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>).

### 2.10.11.3. Generierung der einzubringenden Genkassette

Die Herstellung des PCR-Fragments erfolgte wie in Kapitel 2.10.4 beschrieben. Zur Amplifikation der DNS wurde eine *Phusion High-Fidelity Polymerase* mit 3'-5'-Korrekturlese-Exonuklease-Aktivität eingesetzt. In die Berechnung der Hybridisierungstemperatur wurde lediglich das dritte Segment, welches für die Amplifikation der Genkassette benötigt wird, miteinbezogen. Als DNS-Matrize dienten folgende Plasmide: pACYC177 für die Kanamycin-Resistenzkassette, pACYC184 für die Chloramphenicol-Resistenzkassette und pCDF-Duet-1 für die Spectinomycin-Resistenzkassette. Angesetzt wurden zwei Reaktionen mit einem Volumen von je 50  $\mu$ l. Zur Auftrennung des PCR-Produkts nach der Größe und Aufreinigung folgte eine Gelelektrophorese (s. a. Kapitel 2.10.7), die Extraktion aus dem Agarosegel und die Elution in insgesamt 50  $\mu$ l  $H_2O_{bidest}$  (s. a. Kapitel 2.10.6). Zur Überprüfung einer unbeabsichtigten Transformation von Matrizen-Plasmiden wurden diese anschließend sequenzspezifisch mit je zwei Restriktionsenzymen gespalten. Gewählt wurden DpnI sowie als zweites BglII für pACYC177 und pACYC184 bzw. BglII für pCDF-Duet-1, da diese nicht innerhalb des PCR-Produktes schneiden. Abschließend wurden die Proben zur Aufreinigung gefällt (s. a. Kapitel 2.10.3), in jeweils 10  $\mu$ l  $H_2O_{bidest}$  eluiert und bei -20 °C eingefroren. Bei Bedarf wurde eine Gelelektrophorese mit 1  $\mu$ l der Probe zur quantitativen und qualitativen Kontrolle durchgeführt (s. Kapitel 2.10.7).

### 2.10.11.4. Transformation und Selektion der chromosomalen Deletionsmutanten

Elektrokompetente Bakterien (s. Kapitel 2.10.11.1) und das aufgereinigte PCR-Produkt (s. Kapitel 2.10.11.3) wurden auf Eis (0 °C) vorinkubiert und dann gemischt und elektroporiert (s. Kapitel 2.10.10). Die Inkubationszeit der Bakteriensuspension betrug hier 2 h. Die erfolgreiche Mutagenese wurde vor Asservierung des Stamms durch PCR und Sequenzierung bestätigt. Durch eine ca. 4 stündige Inkubation des Stamms bei ca. 37 °C konnte das Plasmid i. d. R. entfernt werden. War es auf diesem Weg nicht möglich bzw. war der Stamm für einen Mausversuch gedacht, konnte das Plasmid auch mittels Mauspassage entfernt werden (Selektion auf Plasmidverlust, da nachteilig für Pathogenese) (s. a. Kapitel 2.12.2). Zur vereinfachten Unterscheidung und Selektion der Klone auch während der anschließenden Versuche wurden die Resistenzgenkassetten der Klone im Chromosom belassen.

### 2.10.12. Konstruktion von Plasmiden

#### 2.10.12.1. Konstruktion von pACE

Zur Herstellung des Plasmids pACE, das im Gegensatz zu seinem Ausgangsplasmid keine Chloramphenicol-Resistenzkassette mehr besitzt, wurde das Plasmid pACYC184 für 3 h bei 30 °C mit dem Restriktionsenzym Ppu21I (= BsaAI) verdaut (s. a. Kapitel 2.10.9). Nach einer Hitzeinaktivierung der Restriktionsenzyme bei 65 °C für 20 min folgte die anschließende Ligation des Ansatzes für 45 min bei 21 °C (s. a. Kapitel 2.10.9). Da das Plasmid aufgrund seiner Sequenz zweimal geschnitten wurde, entstanden

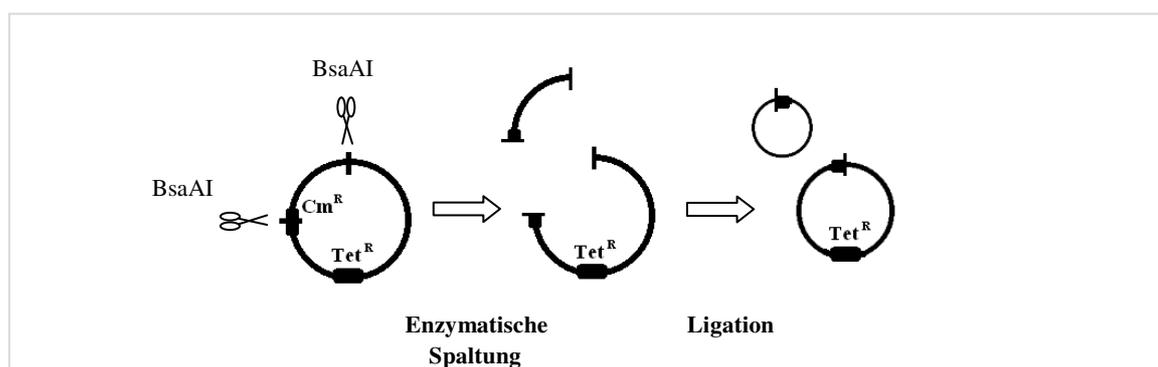


Abb. 12: Schematische Darstellung der Plasmidherstellung (pACE)

1. Das Plasmid pACYC184 mit den Resistenzkassetten für Chloramphenicol und Tetrazyklin wird mit dem Restriktionsenzym BsaAI, das das Plasmid genau zweimal spaltet – davon einmal in der Cm<sup>R</sup>-Kassette und diese inaktiviert – verdaut.
2. Es entstehen 2 unterschiedlich große Fragmente. Nur die Tet<sup>R</sup>-Kassette bleibt funktionsfähig.
3. Durch Ligation entstehen zwei unterschiedlich große zirkuläre Konstrukte, wobei nur eines (pACE) Tet<sup>R</sup> vermittelt und replizierbar ist (Plasmid).

bei der Ligation verschieden große Plasmide (s. a. Abb. 12). Zur Selektion des gewünschten Plasmids („pACE“) folgte zunächst ein paralleler Ausstrich auf einem tetrazyklinhaltigen und einem chloramphenicolhaltigen Nährboden. Bei vom Resistenzmuster in Frage kommenden Klonen wurde das Plasmid isoliert (s. a. Kapitel 2.10.1), mit der Restriktionsendonuklease HindIII, die im Ausgangs- sowie im Wunschplasmid jeweils nur eine Schnittsequenz besitzt, verdaut (s. a. Kapitel 2.10.9) und zur Bestätigung über ein Agarosegel der Größe nach aufgetrennt (s. a. Kapitel 2.10.7).

### **2.10.12.2. Konstruktion von *pacrB***

Zur Erstellung des Plasmids *pacrB* (kodiert für die Effluxkomponente AcrB) wurde die Tetrazyklin-Resistenzkassette des Ausgangsplasmid pACYC184 durch zwei PCR-Produkte ersetzt. Diese waren die mit den Restriktionsenzymen Eam1105I und XhoI geschnittene Promotorregion vor dem AcrAB-Operon und das mit XhoI und HindIII geschnittene Gen *acrB*, die über die XhoI-Schnittstelle miteinander ligiert werden konnten (s. a. Kapitel 2.10.9). Das Ausgangsplasmid wurde mit den Restriktionsenzymen Eam1105I und HindIII geschnitten. Die erfolgreiche Klonierung wurde mittels PCR bestätigt.

## 2.11. Proteinchemische Methoden

### 2.11.1. Präparation von Ganzzelllysaten

Zur Herstellung von Ganzzelllysaten wurde 10 ml frisches LB-Medium 1:50 aus einer Übernachtskultur beimpft und für mind. 4 h unter den gewünschten Bedingungen inkubiert. Anschließend wurden die Kulturen für 10 min auf Eis gekühlt, die OD<sub>600</sub> der jeweiligen Proben bestimmt und 1 ml dieser Bakteriensuspension bei 5000 U/min für 5 min abzentrifugiert. Die Resuspension des Bakterienpellets in SDS-Auftragspuffer erfolgte OD<sub>600</sub>-angeglichen. Die Proben wurden dann für 10 min auf 95 °C erhitzt und bis zur elektrophoretischen Auftrennung (SDS-PAGE) (s. a. Kapitel 2.11.4) bei 4 °C kühl gelagert.

### 2.11.2. Isolierung von „*Yersinia* outer proteins“ (Yops)

Zur Isolierung der von *Y. enterocolitica* in vitro in das Nährmedium abgegebenen Yops wurden zunächst 5 ml eines frischen mit 0,2 % Glucose supplementierten LB-Mediums 1:25 aus einer Übernachtskultur beimpft und für ca. 3 h bei 27 °C bzw. 37 °C schüttelnd inkubiert. Nachfolgend wurden bei Bedarf der Kultur verschiedene Zusätze beigemischt und die Inkubation für 3 h fortgesetzt. Im Anschluss wurde die OD<sub>600</sub> von allen Kulturen bestimmt, jeweils 2 ml bei 4 °C und 8000 U/min für 3 min abzentrifugiert und 1,7 ml des Kulturüberstandes in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Zur Präzipitation der in Lösung befindlichen Yops wurde Trichloressigsäure (TCA) (50%) tropfenweise hinzugefügt (Endkonzentration 10 %) und das Reaktionsgefäß über Nacht bei 4 °C inkubiert. Nach dem Pelletieren der gefällten Proteine (15000 U/min, 4 °C, 30 min) wurde der Überstand verworfen, anschließend zweimal mit 1 ml eisgekühltem Aceton und einmal mit eisgekühltem H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> gewaschen (15000 U/min, 4 °C, 25 min). Das Pellet wurde dann getrocknet und OD<sub>600</sub>-angeglichen in SDS-Auftragspuffer resuspendiert, für 10 min bei 95 °C gekocht und bis zur elektrophoretischen Auftrennung im Polyacrylamidgel (s. a. Kapitel 2.11.4) bei 4 °C kühl gelagert.

### 2.11.3. Präparation der Außenmembranproteine

Zur Isolierung von Außenmembranproteinen wurden zunächst 40 ml einer über Nacht in LB-Medium inkubierten Kultur abzentrifugiert (3000 g, 15 min, 4 °C), der Überstand verworfen und das Sediment zweimal mit 2 ml Außenmembran-Waschpuffer gewaschen (s. a. Kapitel 2.5). Nach Zugabe von 1 ml Lyse-Puffer, 3,2 ml H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> und 100 µl Lysozym-Lösung folgte eine Inkubation für 30 min bei Raumtemperatur. Anschließend wurde die Bakteriensuspension viermal für 45 sec mit Ultraschall behandelt, wobei die Probe intervallweise für 15 sec auf Eis abgekühlt wurde. Größere Zellfragmente wurden daraufhin abzentrifugiert (10000 g, 10 min, 4 °C), der trübe Überstand mit den angereicherten äußeren und inneren Membranen wurde in ein neues Reaktionsgefäß

übertragen. Zur Trennung der Zytoplasmaproteine von den Membranen erfolgte eine Ultrazentrifugation (100000 U/min, 45 min, 4 °C), wobei der Überstand vorsichtig abpipettiert und verworfen wurde. Das Sediment wurde in 5 ml Extraktionspuffer resuspendiert und für 20 min bei Raumtemperatur unter Schwenken inkubiert. Es folgte eine weitere Ultrazentrifugation (100000 U/min, 45 min, 4 °C) zur Separation von den nun im Überstand befindlichen Zytoplasmamembranproteinen. Der Überstand wurde verworfen, das Sediment wurde zweimal mit 5 ml H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> gewaschen und hierbei jeweils in der Ultrazentrifuge (100000 U/min, 45 min, 4 °C) abzentrifugiert. Das Sediment wurde in 100 µl SDS-Auftragspuffer aufgenommen, für 10 min bei 95 °C gekocht und bis zur elektrophoretischen Auftrennung im Polyacrylamidgel bei 4 °C kühl gelagert.

### **2.11.4. SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE)**

Die Auftrennung von in SDS-Probenpuffer denaturierten Membranproteinen nach Molekülmasse erfolgte durch Elektrophorese im Polyacrylamidgel mit SDS (*Laemmli 1970*). Hierfür wurden 0,75 mm dicke Flachgele der Größe 8 cm x 7 cm verwendet. Das Sammelgel hatte standardmäßig eine Acrylamidkonzentration von 2,5 %, wohingegen für das Trenngel je nach Fragestellung eine Konzentration zwischen 6 - 16 % verwendet wurde. Die jeweilige Zusammensetzung ist in Tabelle 13 (s. Kapitel 2.5) aufgeführt. Vor dem Auftragen wurden die Proteinproben zum Aufbrechen der Sekundär- und Tertiärstruktur in SDS-Auftragspuffer aufgenommen und zur vollständigen Solubilisierung bei 95 °C für 10 min erhitzt. Die Gel-Elektrophorese im SDS-Laufpuffer (1 x) erfolgte bei 120 - 150 V für ca. 60 min. Zur korrekten Beurteilung der Proteingröße wurde stets zusätzlich ein Größenstandard mitaufgetragen. Nach dem Abschluss wurden die Gele in „*Coomassie Blue*“-Lösung gefärbt (s. a. Kapitel 2.11.5).

### **2.11.5. „Coomassie Blue“-Färbung**

Zur Darstellung der im Polyacrylamidgel nach der Größe aufgetrennten Proteine wurde das Gel nach der Elektrophorese (s. a. Kapitel 2.11.4) zunächst für 1 - 3 h in der Coomassie Blue-Lösung unter permanentem Schwenken inkubiert, um eine unspezifische Bindung an die basischen Seitenketten der Proteine zu ermöglichen. Die überschüssige Färbelösung wurde im Anschluss durch ein Bad in H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> ausgewaschen. Es folgte die Fotodokumentation.

## 2.12. Tierexperimentelle Methoden

### 2.12.1. Allgemeines

Die Mausinfektionsversuche wurden von der Regierung von Oberbayern genehmigt (Tierversuchsvorhaben: Az.55.2-1-54-2532-65-09) und zwischen Mai 2010 und Januar 2012 durchgeführt. Sie fanden unter Anleitung und Supervision von Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. J. Heesemann statt.

Für die tierexperimentellen Versuche wurden – wenn nicht anders angegeben – weibliche C57Bl/6 Mäuse im Alter von 8 Wochen verwendet. Diese wurden von der Firma Janvier (Saint Berthevin, Frankreich) mindestens eine Woche vor Versuchsbeginn bezogen, unter Quarantänebedingungen gehalten und täglich von den Tierpflegern in der hauseigenen Tierversuchsanlage versorgt. Die Mäuse wurden in Überdruckboxen mit ausreichend sterilem Trinkwasser und Streu gehalten. Während der Versuche wurden die Tiere mindestens zweimal täglich visitiert. Zum Versuchsende wurden die Mäuse gemäß den allgemeinen Empfehlungen mit Kohlenstoffdioxid, das langsam in den Käfig insuffliert wurde, getötet.

### 2.12.2. Mauspassage

Zur Selektion mausvirulenter Klone des gewünschten Bakterienstamms wurde zunächst eine 6 - 10 Wochen alte C57Bl/6 Maus mit ca.  $5 \times 10^6$  in PBS resuspendierten Yersinien intraperitoneal infiziert. Hierzu wurde eine in PBS gewaschene Bakteriensuspension der  $OD_{600} = 0,3$  1:10 mit PBS verdünnt und hiervon 1 ml injiziert (s. a. Kapitel 2.9.5). Am darauffolgenden Tag wurde die infizierte Maus durch  $CO_2$  narkotisiert und getötet. Im Anschluss wurden ihr 5 ml PBS mit einer dünnen Kanüle intraperitoneal appliziert und wieder entnommen (peritoneale Lavage). Die so gewonnene Suspension wurde zügig in Verdünnungsreihen auf *Yersinia*-selektiven CIN-Nährböden oder antibiotikahaltigen Nährböden ausplattiert und für 24 - 36 h bei 27 °C bebrütet. Gewachsene Einzelkolonien wurden in antibiotikahaltigem LB-Medium kultiviert und anschließend bei -80 °C asserviert (s. a. Kapitel 2.9.2). Jeder passagierte Bakterienstamm wurde im Anschluss erneut mittels PCR auf seinen Genotyp überprüft.

### 2.12.3. Mausinfektions-Antibiotikatherapie-Modell

Das in dieser Arbeit verwendete Mausmodell zur Untersuchung der Antibiotikawirksamkeit in vivo basiert auf dem von *Scavizzi et al.* etablierten Mausmodell mit geringen Modifikationen (*Scavizzi et al. 1987*). Weibliche acht Wochen alte C57Bl/6 Mäuse wurden zu Beginn des Versuchs mit  $2 \times 10^6$  koloniebildenden Einheiten (KBE) des jeweiligen Yersinienstammes intraperitoneal (i.p.) infiziert. Diese Dosis wurde gewählt, um eine reproduzierbare systemische Infektion zu erhalten, die nach

Antibiotikabehandlung die Isolierung von Restkeimzellen (überlebenden Yersinien) garantierte (*Scavizzi et al. 1987*). Das Inokulum wurde in einem ausreichenden Volumen von 100 µl isotoner Kochsalzlösung (NaCl (0,9%)) verabreicht, um eine reproduzierbare Dosis zu gewährleisten.

Sechs verschiedene Antibiotika aus unterschiedlichen Klassen (Ampicillin, Cefotaxim, Ceftriaxon, Meropenem, Gentamicin und Doxyzyklin; s. a. Kapitel 2.6.3.2, Tabelle 17) wurden den Tieren nach 27 h p.i. sowie nach weiteren 12 h intravenös (i.v.) appliziert. Die Kontrollgruppe erhielt je 100 µl isotone Kochsalzlösung (NaCl (0,9%)). Die i.v.-Gabe erfolgte jeweils mit Insulinspritzen, um möglichst genaue Mengen zu applizieren. Nach weiteren 12 h wurde der Versuch beendet (Versuchende: 51 h p.i.), den getöteten Mäusen umgehend die Milzen unter sterilen Bedingungen entfernt, diese auf Eis gekühlt und nach mechanischer Homogenisierung im Organmörser in PBS-Verdünnungsreihen auf LB-Nährböden ausplattiert. Nach einer Inkubation von mindestens 30 h bei 27 °C erfolgte die Auszählung der gewachsenen Bakterien als koloniebildende Einheiten (KBE). Die gemessene bakterielle Last der so aus der jeweiligen infizierten Mäusemilz rückisolierten Yersinien wurde „Nettoüberlebensrate“ genannt.

Die Analyse und Auswertung der Mausversuche wurde mit dem Programm „*Graphpad Prism 5*“ durchgeführt. Bei dem durchgeführten nichtparametrischen „*Mann-Whitney-Test*“ (Konfidenzintervall 95%) wurde – wenn nicht anders benannt – stets der Median angegeben.

Milzen, welche für die immunhistochemischen Färbungen vorgesehen waren, wurden nach Entnahme in *Tissue Tek*® eingebettet, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und für mindestens zwei Tage bei -80 °C gelagert.

### **2.12.4. Immunfluoreszenzmikroskopie von Milz-Kryomikrotomschnitten**

#### **2.12.4.1. Anfertigung von Serienschnitten der Milz**

Für die Anfertigung von Serienschnitten der Milz wurden die bei -80 °C in *Tissue Tek*® gefrorenen Organe für 30 min an -20 °C adaptiert und anschließend unter Zuhilfenahme eines Kryomikrotoms Serienschnitte mit einer Schichtdicke von 6 - 8 µm angefertigt, die auf „*Superfrost Plus*“-Objektträgern aufgebracht wurden. Die Präparate wurden bei 4 °C über Nacht getrocknet und bei -20 °C bis zur Weiterverarbeitung gelagert.

#### 2.12.4.2. Immunfluoreszenzfärbung und Mikroskopie von Gewebeschnitten

Zur Lokalisierung und Differenzierung von Yersinien und Immunzellen wurden die vorbereiteten Milz-Serienschnitte mittels zellspezifischer Antigenfärbung sichtbar gemacht. Von Interesse waren vor allem Marginalzonenmakrophagen (MZM), polymorphnukleäre Neutrophile (PMN) und Yersinien, die über die indirekte Immunfluoreszenz dargestellt werden konnten.

Hierzu wurden die Schnitte zunächst für 10 min in eiskaltem Aceton fixiert und bei Raumtemperatur getrocknet. Es folgte die Rehydratisierung in TBST für zweimal 5 min. Zur Reduktion von unspezifischen Antikörperbindungen wurden die Schnitte anschließend mit 5 % Ziegenerum/TBST für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Hierauf folgte eine 45 minütige Inkubation mit 150 µl der Primär-Antikörperlösung bei Raumtemperatur und drei Waschschrte mit TBST. Nach der 45 min andauernden Färbung mit 150 µl der Sekundär-Antikörperlösung schlossen sich weitere drei Waschschrte an, bevor die DAPI-Färbung (DNS-Darstellung) für 5 min durchgeführt wurde. Abschließend wurden die Präparate noch einmal dreifach mit TBST gewaschen, getrocknet und in Mowiol eingebettet. Bis zur Fluoreszenzmikroskopie wurden die Schnitte bei 4 °C lichtgeschützt gelagert.

In Tabelle 23 sind die hierfür verwendeten primären Antikörper angegeben, Tabelle 24 führt die sekundären Antikörperkonjugate auf (s. a. Kapitel 2.8). Die Färbung wurde stets bei Raumtemperatur durchgeführt. Zur verbesserten Kenntlichmachung der unterschiedlichen Zellgruppen wurden die Marginalzonenmakrophagen in grün, die Yersinien in rosa, die PMN in gelb, die T-Lymphozyten in blau und die B-Lymphozyten in rot auf den Bildern der Immunfluoreszenzmikroskopie dargestellt (Falschfärbung).

#### 2.13. Proteinbestimmung mittels MALDI-TOF

Membranproteinbanden im SDS-PAGE wurden mit Hilfe der Matrix-Assisted-Laser-Desorption-Ionisation Time-Of-Flight-(MALDI-TOF)-Analyse identifiziert. Die Proteine wurden hierfür nach der gelelektrophoretischen Größenauftrennung vorsichtig aus den SDS-Gelen ausgeschnitten und in ein sauberes Reaktionsgefäß überführt. Die anschließende Probenbearbeitung und massenspektrometrische Analyse erfolgte im Labor von Herrn Prof. Imhoff im Adolf-Butenandt-Institut der LMU München in einem „*Voyager DE STR*“ (Applied Biosystems, Foster City, USA) im reversen Modus. Die Kalibrierung der Peptidmassen erfolgte intern auf die bekannten Massen der proteolytischen Fragmente nach Trypsinspaltung. Die Auswertung der Spektren erfolgte vor Ort anschließend mit Hilfe der Suchmaschine „*Mascot*“.

### 3. Ergebnisse

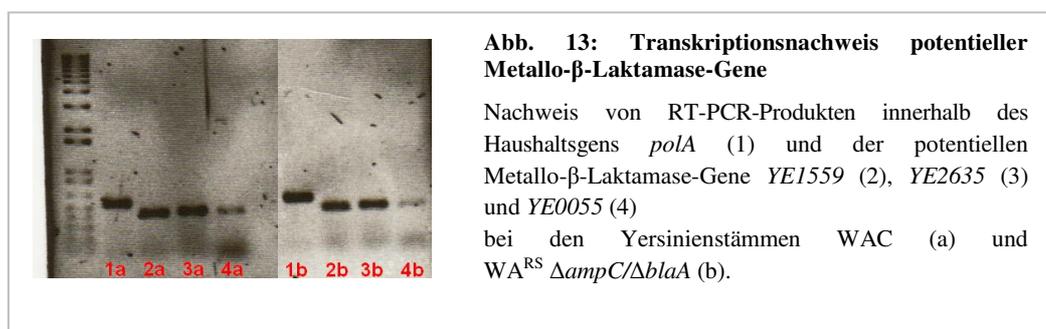
#### 3.1. Die $\beta$ -Laktamasen von *Y. enterocolitica*

##### 3.1.1. Genomweite Suche nach $\beta$ -Laktamasen

Die MHK, ermittelt aus dem *in vitro* ermittelten Antibiotikaempfindlichkeitstest entspricht häufig nicht der vorhergesagten Antibiotikawirksamkeit (*in vivo* MHK). So konnten *Scavizzi et al.* beim Maus-letalen *Y. enterocolitica* WA-Stamm (Biotyp 1B, Serotyp O:8) die Ineffektivität bestimmter  $\beta$ -Laktam-Antibiotika im Maus-Infektionsmodell trotz einer ausgeprägten Sensitivität *in vitro* aufzeigen (*Scavizzi et al. 1987*). Um dieses Phänomen genauer untersuchen zu können, wurde zunächst das gesamte Genom des in dieser Arbeit verwendeten modifizierten *Y. enterocolitica*-Stamms 8081 (Biotyp 1B, Serotyp O:8) nach Genen, welche für  $\beta$ -Laktamasen kodieren könnten, durchsucht (*Thomson et al. 2006*). Neben den bereits oben genannten Genen *blaA* und *ampC* wurden auch die Gene *YE1559*, *YE2635* und *YE0055* als potentielle Metallo- $\beta$ -Laktamase-Gene identifiziert.

##### 3.1.2. Detektion der Aktivität von möglichen Metallo- $\beta$ -Laktamase-Genen

Um festzustellen, ob es sich bei den drei potentiellen Metallo- $\beta$ -Laktamase-Genen *YE1559*, *YE2635* und *YE0055* um *in vitro* aktiv abgelesene Gene handelt, die ggf. eine Resistenz gegenüber  $\beta$ -Laktam-Antibiotika bewirken könnten, wurden in einem ersten Schritt von den ebenfalls zu Biotyp 1B und Serotyp O:8 gehörenden Stämmen WA-C und WA<sup>RS</sup>  $\Delta ampC/\Delta blaA$ , bei dem bereits die beiden  $\beta$ -Laktamasen *ampC* und *blaA* chromosomal deletiert wurden, DNS-freie RNS-Präparate gewonnen. Nach reverser Transkription der isolierten Boten-RNS in cDNS konnte mittels PCR gezeigt werden, dass jedes dieser Gene bei 27°C in LB-Kultur transkribiert wird (s. Abb. 13).

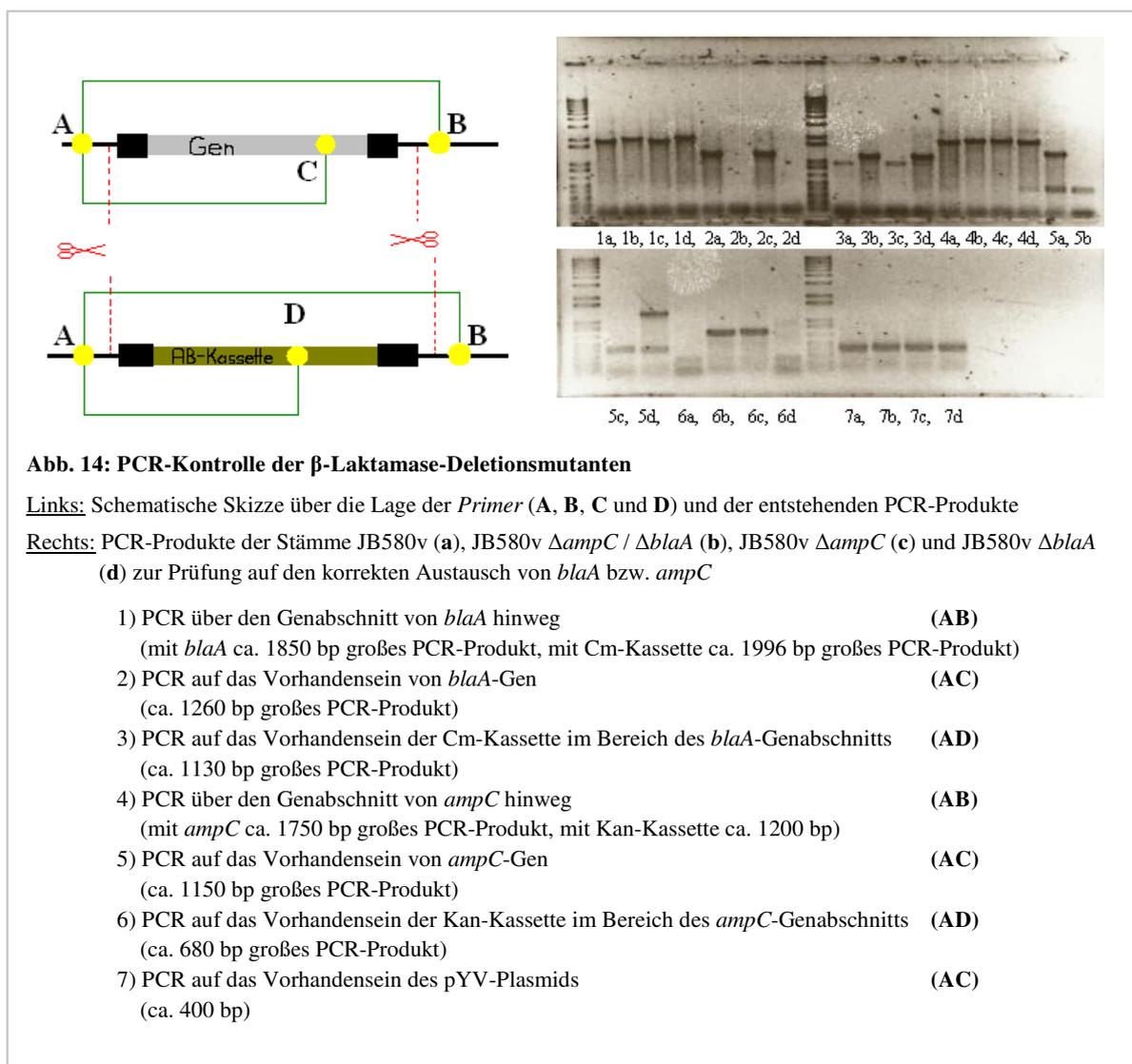


In darauffolgenden Versuchen mit dem chromogenen Cephalosporin Nitrocefin (nach Spaltung Rotfärbung) konnte von *E. Schriefer* (MvP-Institut München) gezeigt werden, dass im Ganzzelllysat der Doppeldeletionsmutante keine  $\beta$ -Laktamase-Aktivität für das Substrat Nitrocefin nachweisbar war (*Schriefer 2012*). Dieses Ergebnis konnte durch Bent

and Young auch für den in dieser Arbeit verwendeten Stamm JB580v bestätigt werden, sodass sich die vorliegende Arbeit auf die bekannten, funktionsfähigen  $\beta$ -Laktamasen BlaA und AmpC von *Y. enterocolitica* JB580v beschränkt hat (Bent et al. 2013).

### 3.1.3. Herstellung der chromosomalen $\beta$ -Laktamase-Deletionsmutanten

Um die Rolle der chromosomalen  $\beta$ -Laktamasen BlaA und AmpC besser zu verstehen und charakterisieren zu können, wurden diese beim Stamm JB580v (Biotyp 1B, Serotyp O:8) deletiert. Die Herstellung der chromosomalen Deletionsmutanten JB580v  $\Delta ampC$ , JB580v  $\Delta blaA$  sowie der Doppeldelentionsmutante JB580v  $\Delta ampC / \Delta blaA$  erfolgte nach dem in Kapitel 2.10.11 genannten Vorgehen. Die einzelnen Mutanten wurden im Anschluss vor dem Beginn der Versuche mittels PCR (s. a. Abb. 14) und Sequenzierung auf ihre Korrektheit überprüft.



### 3.2. Charakterisierung der $\beta$ -Laktamase-Deletionsmutanten in vitro

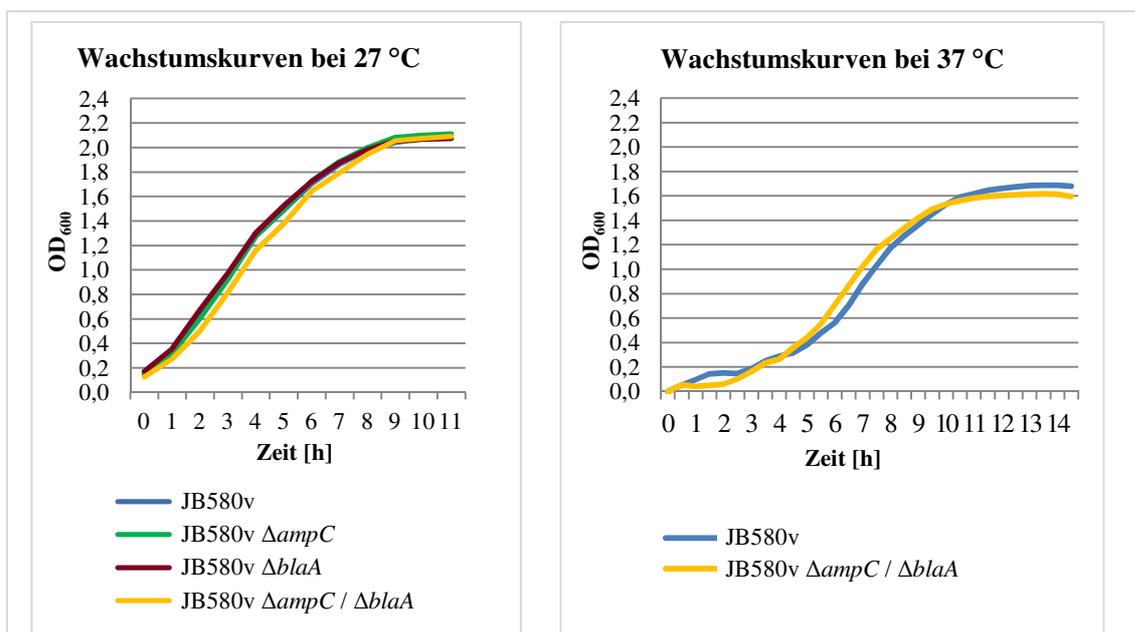
#### 3.2.1. Wachstumsverhalten

Um zu überprüfen, ob durch die genetischen Manipulationen Veränderungen im Wachstumsverhalten auftreten, wurde das Wachstum der Deletionsmutanten im nährstoffreichen LB-Medium unter sauerstoffreicher Schüttelinkubation, bei 27 °C (Wachstumsoptimum) und 37 °C (Körpertemperatur) analysiert. Als Startpunkt der Messung wurde  $OD_{600} \sim 0,1$  als Wachstumsbeginn gewählt.

Bei 27 °C zeigte der Ausgangsstamm JB580v den für bakterielles exponentielles Wachstum typischen S-förmigen Kurvenverlauf mit dem Erreichen des Plateaus (stationäre Phase) nach ca. 11 h (s. Abb. 15 links).

Vergleicht man die Wachstumskurvenverläufe der Deletionsmutanten JB580v  $\Delta ampC$ , JB580v  $\Delta blaA$  und JB580v  $\Delta ampC / \Delta blaA$  mit dem des Ausgangsstamms JB580v, so verlaufen diese ähnlich. Die Deletion der Gene *ampC* oder *blaA* der Einfachmutanten als auch Doppelmutanten führte nicht zur signifikanten Veränderung der Wachstumskurve.

Das Vorhandensein der  $\beta$ -Laktamase-Gene, für sich oder gemeinsam, stellen weder einen Vor- noch einen Nachteil für das bakterielle Wachstum im antibiotikafreien Flüssigmedium unter optimalen Bedingungen dar.



**Abb. 15: Wachstumsverhalten von JB580v und den  $\beta$ -Laktamase-Deletionsmutanten**

Darstellung des Wachstumsverlaufs vom Ausgangsstamm JB580v und der  $\beta$ -Laktamase-Deletionsmutanten im LB-Medium und  $O_2$ -reicher Schüttelinkubation. Die Kurvenverläufe entsprechen einer Mittelung aus 3 unterschiedlichen Messungen. „0 h“ entspricht dem Versuchsbeginn.

Links: Wachstumskurven von JB580v sowie den  $\beta$ -Laktamase-Deletionsmutanten JB580v  $\Delta ampC$ , JB580v  $\Delta blaA$  und JB580v  $\Delta ampC / \Delta blaA$  bei 27 °C.

Rechts: Wachstumskurven von JB580v sowie der isogenen  $\beta$ -Laktamase-Deletionsmutante JB580v  $\Delta ampC / \Delta blaA$  in LB-Medium bei 37 °C.

Die Wachstumskurve von JB580v bei 37 °C zeigt wie erwartet einen typischen S-förmigen Kurvenverlauf (s. Abb. 15 rechts). Die Plateauphase wird jedoch bereits bei einer geringeren OD<sub>600</sub> im Vergleich zur 27 °C-Wachstumskurve erreicht. Auch die Doppeldeletionsmutante zeigt bei 37 °C eine ähnliche Wachstumskurve wie die des Mutterstammes.

Zusammenfassend zeigen die Deletionsmutanten im Vergleich zum Ausgangsstamm unter o. g. Bedingungen weder bei 27 °C noch bei 37 °C einen signifikanten Unterschied vom Beginn der exponentiellen Phase bis zum Erreichen der stationären Phase. Die Gene *ampC* und *blaA* bewirken keine größeren Defizite oder Vorteile beim Wachstum in antibiotikafreier Umgebung – weder für sich alleine noch gemeinsam.

### 3.2.2. Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration mittels Agardiffusionstest („E-Teststreifen“)

Nachfolgend wurden die in dieser Arbeit hergestellten  $\beta$ -Laktamase-Mutanten (s. a. Tabelle 19) auf ihre Sensitivität gegenüber verschiedenen Antibiotika getestet.

Bakterien, die auf Nährböden biofilmartig wachsen, können aufgrund anderer Gen-Expressionsmuster unterschiedliche phänotypische Resistenzausprägungen im Vergleich zu Bakterien mit planktonischem Wachstum zeigen (*Mah and O'Toole 2001*). Daher erfolgte die Resistenztestung sowohl auf Nährböden als auch in Flüssigkultur.

Zur Beurteilung der Antibiotikasensitivität bei biofilmartigem Wachstum wurden JB580v und die Deletionsmutanten JB580v  $\Delta$ *blaA*, JB580v  $\Delta$ *ampC* und JB580v  $\Delta$ *ampC* /  $\Delta$ *blaA* – wie in Kapitel 2.9.10.2 beschrieben – auf MH-Nährböden mit antibiotikahaltigen E-Teststreifen für 16 - 20 h inkubiert und die jeweilige MHK abgelesen. In Tabelle 27 sind die getesteten Antibiotika und ihre In-vitro-Wirksamkeit gegenüber den getesteten Yersinienstämmen aufgeführt. Die untersuchten Bakterienstämme zeigten wie erwartet in ihrer Resistenz gegenüber den Nicht- $\beta$ -Laktam-Antibiotika wie Doxyzyklin mit 1  $\mu$ g/ml oder Gentamicin mit 0,250 - 0,380  $\mu$ g/ml keine signifikanten Unterschiede. Alle Stämme waren gleich sensibel auf die verwendeten Substanzen. Die Deletion einer oder beider  $\beta$ -Laktamasen bewirkte keinen Unterschied in der Resistenz der getesteten zwei Antibiotika.

Bei der Analyse der  $\beta$ -Laktam-Antibiotika gab es jedoch deutliche Abweichungen: In der Gruppe der getesteten Penicilline zeigten JB80v und JB580v  $\Delta$ *ampC* mit jeweils > 32  $\mu$ g/ml eine deutliche Resistenz gegenüber Penicillin G. Die minimale Hemmkonzentration von Penicillin G (MHK<sub>PenG</sub>) ergab für JB580v  $\Delta$ *blaA* 6  $\mu$ g/ml und für die Doppeldeletionsmutante JB580v  $\Delta$ *ampC* /  $\Delta$ *blaA* erwartungsgemäß nur noch 1,5  $\mu$ g/ml. Bei Ampicillin und Piperacillin verhielten sich die Mutanten ähnlich: Zeigte sich zwischen dem Ausgangsstamm und JB580v  $\Delta$ *ampC* in der MHK kein oder nur ein geringer Unterschied, war JB580v  $\Delta$ *blaA* deutlich empfindlicher; die Doppeldeletionsmutante hatte jeweils die geringste MHK. Bei den untersuchten Cephalosporinen der zweiten Generation, Cefuroxim und Cefoxitin, bestand mit 1,5 - 2,0  $\mu$ g/ml bzw. mit 3  $\mu$ g/ml bei den Deletionsmutanten eine ähnliche Sensitivität wie beim Ausgangsstamm JB580v. Vergleichbare Ergebnisse wurden auch mit Cefotaxim,

einem Cephalosporin der dritten Generation, erhalten. Hier ergab sich mit 0,023 - 0,032 µg/ml eine hohe Sensitivität für alle Stämme. In der Gruppe der Carbapeneme besaßen die getesteten Stämme ungeachtet der Deletion einer bzw. beider chromosomaler β-Laktamasen mit 0,190 µg/ml bzw. 0,012 µg/ml jeweils die gleiche Empfindlichkeit gegenüber Imipenem bzw. Meropenem und waren somit in vitro hoch sensibel.

**Tabelle 27: MHK-Bestimmung in Abhängigkeit der β-Laktamasen (E-Teststreifen)**

Stamm [µg/ml] Antibiotikum	JB580v	JB580v <i>ΔampC</i>	JB580v <i>ΔblaA</i>	JB580v <i>ΔampC/ΔblaA</i>
Ampicillin	4	4	0,750	0,190
Cefotaxim	0,032	0,032	0,032	0,023
Cefoxitin	3	3	3	3
Cefuroxim	2	1,500	1,500	1,500
Doxyzyklin	1	1	1	1
Gentamicin	0,250	0,380	0,250	0,250
Imipenem	0,190	0,190	0,190	0,190
Meropenem	0,012	0,012	0,012	0,012
Penicillin G	> 32	> 32	6	1,5
Piperacillin	0,750	0,500	0,190	0,125

Auflistung der gemessenen MHK verschiedener Antibiotika bei biofilmartigen Wachstum auf Nährböden. Die Präparation der Nährböden erfolgte entsprechend den Empfehlungen der EUCAST (*EUCAST 2010*). Getestet wurden der Ausgangsstamm JB580v sowie die β-Laktamase-Deletionsmutanten JB580v *ΔampC*, JB580v *ΔblaA* und JB580v *ΔampC / ΔblaA*. Abgelesen wurde die MHK von E-Teststreifen nach 16-20 h Inkubation bei 37 °C auf Mueller-Hinton-Nährböden entsprechend den Empfehlungen des Herstellers (s. a. Kapitel 2.9.10.2). Die minimale Hemmkonzentration wird angegeben in [µg/ml].

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass *blaA* und *ampC* unter oben verwendeten Bedingungen in vitro keine bzw. keine signifikante Rolle für die MHK gegenüber Gentamicin oder Doxyzyklin spielen. Des Weiteren scheint auch die Sensitivität gegenüber den getesteten Cephalosporinen der 2. und 3. Generation (Gruppe 2 bzw. 3a) bzw. den Carbapenemen durch die chromosomalen β-Laktamasen nicht beeinflusst zu werden. Bei der Resistenz gegenüber den Penicillinen zeigt sich jedoch ein unterschiedliches Verhalten: Die Deletion von *blaA* erhöht die Sensitivität gegenüber den untersuchten Penicillinen, wohingegen die β-Laktamase AmpC keine bzw. lediglich eine geringe Resistenzerhöhung bewirkt. Dieser Phänotyp wird v. a. bei der Doppeldeletionsmutante manifest.

### 3.2.3. MHK-Bestimmungen der $\beta$ -Laktamase-Deletionsmutanten in Flüssigkultur („Mikrodilutionsverfahren“)

Zur Bestimmung der  $\beta$ -Laktamase-abhängigen Antibiotikasensitivität während des planktonischen Wachstums erfolgte die Bestimmung der MHK im Flüssigmedium (12-Napf-Mikrotiterplatte, s. a. Kapitel 2.9.10.3). Hierfür wurden der Ausgangsstamm JB580v sowie die  $\beta$ -Laktamase-Deletionsmutanten JB580v  $\Delta blaA$ , JB580v  $\Delta ampC$  und JB580v  $\Delta ampC / \Delta blaA$  wie in Kapitel 2.9.10.3 beschrieben für 12 h Stunden im nährstoffreichen LB-Medium bei 27 °C (bakterielles Wachstumsoptimum) sowie bei 37 °C (Körpertemperatur, Wachstum bei Infektionsbedingungen) schüttelnd inkubiert. Da sich die Messergebnisse für beide Temperaturen bis auf eine etwas geringere Wachstumsgeschwindigkeit bei 37 °C gleichen und die Messwerte der MHK von *Y. enterocolitica* WA-314 von E. Schriefer bei JB580v bestätigt werden konnten, werden im Folgenden nur die MHK-Werte bei 27 °C beschrieben (Schriefer 2012). Hierbei erfolgt exemplarisch die detaillierte Darstellung der Bestimmung der MHK von Ampicillin (MHK<sub>Amp</sub>) (s. a. Abb. 16). Tabelle 28 fasst die MHK-Werte der untersuchten Antibiotika für die getesteten *Yersinia*-Stämme zusammen.

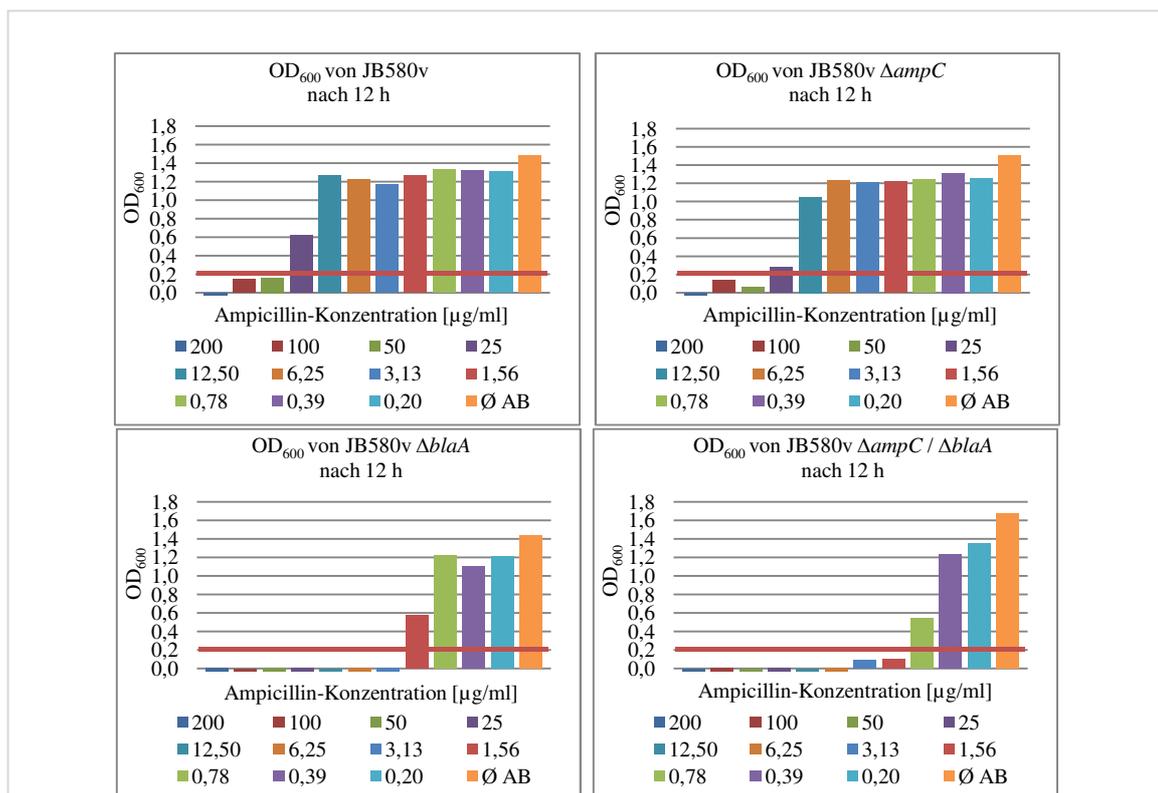


Abb. 16: MHK<sub>Amp</sub> in Abhängigkeit der  $\beta$ -Laktamasen im Flüssigmedium (27 °C)

Zur Bestimmung der MHK von Ampicillin (MHK<sub>Amp</sub>) wurden frisch beimpfte, OD<sub>600</sub> angegliche Bakterienkulturen der Stämme JB580v, JB580v  $\Delta ampC$ , JB580v  $\Delta blaA$  und JB580v  $\Delta ampC / \Delta blaA$  - wie in Kapitel 2.9.10.3 beschrieben - in LB-Medium unter Hinzugabe von unterschiedlichen Antibiotikakonzentrationen (geometrische Verdünnungsreihe) für 12 h bei 27 °C sauerstoffreich schüttelnd inkubiert. Abgebildet ist jeweils die Differenz der OD<sub>600</sub> nach 12 h und zu Beginn des Versuchs. Als Wachstumsnachweis wurde eine Differenz der OD<sub>600</sub>  $\geq$  0,2 festgesetzt (rote Linie). Die MHK-Werte sind mit unterschiedlichen Farbsäulen dargestellt wie „Ø AB“= ohne Antibiotikazusatz

## Ergebnisse

Wie in Abb. 16 ersichtlich, erreicht JB580v am Versuchsende im antibiotikafreien LB-Medium einen OD<sub>600</sub>-Wert (genauer: Differenz OD<sub>600</sub>-Wert<sub>Versuchsende</sub> – OD<sub>600</sub>-Wert<sub>Versuchsbeginn</sub>; nachfolgend zur Vereinfachung weiterhin OD<sub>600</sub>-Wert genannt) von ca. 1,5. Auch eine schrittweise Erhöhung der Endkonzentration auf 12,5 µg/ml Ampicillin im Medium führt zu keiner deutlichen Reduktion der OD. Erst durch die Anhebung der Ampicillinkonzentration auf 25 µg/ml kann eine reduzierte OD<sub>600</sub> von ca. 0,6 am Versuchsende nachgewiesen werden. Die vollständige Hemmung des sichtbaren Wachstums wird ab einer Ampicillinkonzentration von 50 µg/ml erreicht. Die Differenz der gemessenen OD<sub>600</sub> liegt hierbei unterhalb des gewählten Grenzwertes von 0,2.

Die Deletionsmutante JB580v  $\Delta ampC$  verhält sich unter denselben Testbedingungen ähnlich: Durch geringe subinhibitorische Ampicillin-Mengen im Flüssigmedium wird das bakterielle Wachstum (OD<sub>600</sub>) kaum beeinflusst. Erst bei einer Endkonzentration von 25 µg/ml im Medium wird JB580v  $\Delta ampC$  fast vollständig am Wachstum gehindert. Die MHK<sub>Amp</sub> liegt wie beim Elternstamm jedoch erst bei 50 µg/ml. Die Deletion von *blaA* bei JB580v bewirkt hingegen die Ausbildung eines anderen Phänotyps bei der MHK-Bestimmung von Ampicillin: JB580v  $\Delta blaA$  ist deutlich empfindlicher gegenüber Ampicillin. Hier reicht eine Ampicillinkonzentration von 3,13 µg/ml im Medium zur kompletten makroskopischen Wachstumsinhibition aus. Durch die Deletion beider  $\beta$ -Laktamasen liegt die MHK<sub>Amp</sub> bei JB580v  $\Delta ampC / \Delta blaA$  sogar bei nur 1,56 µg/ml.

Beim getesteten Cefotaxim (Cephalosporin der 3. Generation; Gruppe 3a) zeigt sich ein anderes Bild: Hier wiesen der Ausgangsstamm und JB580v  $\Delta ampC / \Delta blaA$  die gleiche MHK von 0,031 µg/ml auf. Auch für das Carbapenem Meropenem wurde für beide Stämme eine MHK von 0,031 µg/ml ermittelt. Die Deletion der  $\beta$ -Laktamasen führte bei diesen beiden Substanzen zu keiner Änderung der Antibiotikasensitivität (MHK).

**Tabelle 28: MHK-Bestimmung in Abhängigkeit der  $\beta$ -Laktamasen (Flüssigmedium)**

<b>Stamm</b> [µg/ml] <b>Antibiotikum</b>	JB580v	JB580v <i><math>\Delta ampC</math></i>	JB580v <i><math>\Delta blaA</math></i>	JB580v <i><math>\Delta ampC / \Delta blaA</math></i>
Ampicillin	50	50	3,13	1,56
Cefotaxim (3.Generation)	0,031	nb	nb	0,031
Doxyzyklin	0,75	nb	nb	0,75
Gentamicin	0,625	0,625	0,625	1,250
Meropenem	0,031	0,031	0,031	0,031

Zur Bestimmung der MHK wurden frisch beimpfte, OD<sub>600</sub> angegliche Bakterienkulturen der Stämme JB580v, JB580v  $\Delta ampC$ , JB580v  $\Delta blaA$  und JB580v  $\Delta ampC / \Delta blaA$  - wie in Kapitel 2.9.10.3 beschrieben - in LB-Medium unter Hinzugabe von unterschiedlichen Antibiotikakonzentrationen (geometrische Verdünnungsreihe) für 12 h bei 27 °C sauerstoffreich schüttelnd inkubiert. Als minimale Hemmkonzentration wurde die Antibiotikadosis in [µg/ml] festgesetzt, bei der am Versuchsende kein signifikantes Wachstum nachgewiesen werden konnte. Als Wachstumsnachweis wurde eine Differenz der OD<sub>600</sub>  $\geq$  0,2 festgesetzt.

„nb“ = nicht bestimmt

Zum Vergleich wurden auch Nicht- $\beta$ -Laktam-Antibiotika getestet. Doxyzyklin bewirkte gleichermaßen beim Ausgangsstamm JB580v und bei der  $\beta$ -Laktamase-Doppeldeletionsmutante bei einer Endkonzentration von 0,75  $\mu\text{g/ml}$  im Medium makroskopisch eine vollständige Wachstumshemmung. Auch gegenüber dem Aminoglykosid Gentamicin zeigten sich beide Stämme mit einer MHK von 0,625 bzw. 1,250  $\mu\text{g/ml}$  ähnlich sensibel.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die Deletion einer oder beider  $\beta$ -Laktamasen erwartungsgemäß keine signifikante Veränderung bei der MHK gegenüber den getesteten Nicht- $\beta$ -Laktam-Antibiotika Gentamicin und Doxyzyklin bewirkt. Auch zeigen sich Ausgangsstamm und die  $\beta$ -Laktamase-Deletionsmutanten gleichsam hoch sensibel gegenüber dem Cephalosporin Cefotaxim und dem Carbapenem Meropenem im Flüssigmedium (Mikrodilutionsverfahren). Weder AmpC noch BlaA scheinen gegenüber diesen  $\beta$ -Laktam-Antibiotika eine klinisch relevante Resistenz zu vermitteln.

Für die Resistenz gegenüber Ampicillin ist auch im Flüssigmedium vornehmlich die Typ A  $\beta$ -Laktamase BlaA bei dem hier untersuchten Stamm JB580v von Bedeutung. Sie vermittelt im Gegensatz zu AmpC eine hohe Resistenz gegenüber dem Aminopenicillin. Die alleinige Deletion von *ampC* hat keinen Einfluss auf die  $\text{MHK}_{\text{Amp}}$ , während die alleinige Deletion von *blaA* die MHK auf 1/16 senkt (4 Verdünnungsstufen). Fehlen beide Gene, fällt die  $\text{MHK}_{\text{Amp}}$  sogar um 5 Verdünnungsstufen. Hier kann ein additiver Effekt vermutet werden.

### 3.3. Optimierung und Analyse der Antibiotikatherapieversuche im *Yersinia*-Mausinfektionsmodell

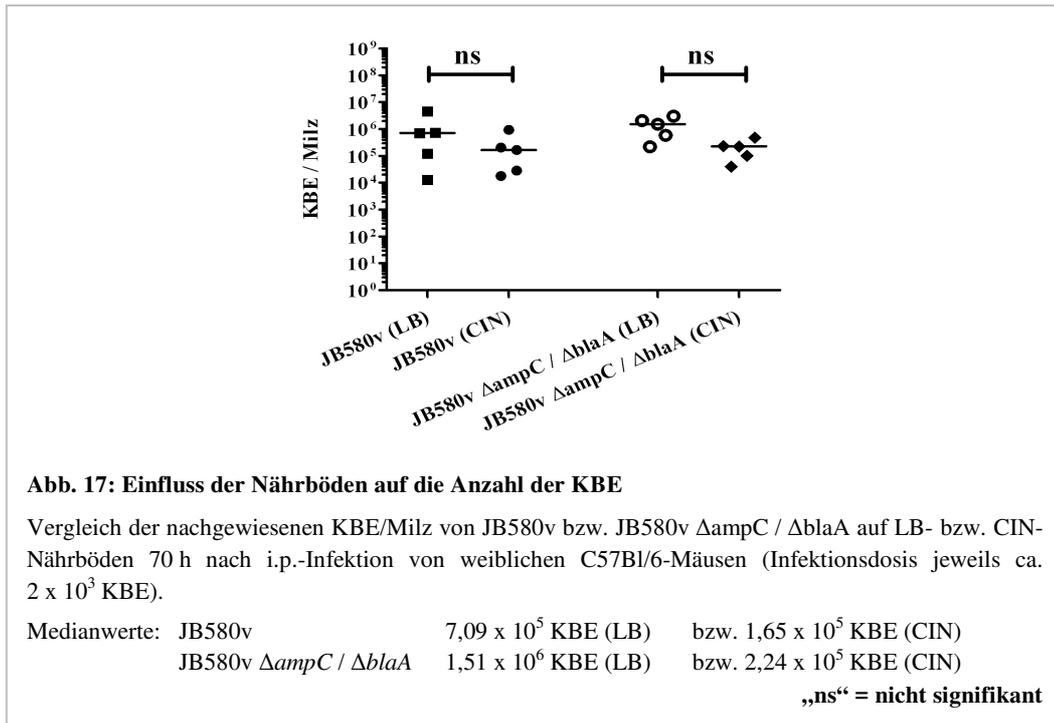
#### 3.3.1. Einfluss der Anzuchtbedingungen für *Yersinien* aus infiziertem Milzgewebe auf die Anzahl der KBE

Nachfolgend sollte die Antibiotikaresistenz der in dieser Arbeit hergestellten  $\beta$ -Laktamase-Deletionsmutanten (s. a. Tabelle 19) im Mausinfektions-Antibiotikatherapie-Modell untersucht werden. Hierfür wurde zunächst der Einfluss der Nährbodenart hinsichtlich der quantitativen Bestimmung der *Yersinien* aus infizierten Milzen überprüft. Es wurden hierbei der *Yersinia*-selektive CIN-Nährboden (enthält die Antibiotika Cefsulodin, Irgasan und Novobiocin sowie u. a. die antimikrobiellen Stoffe Cholat und Desoxycholat) und der nicht-selektive LB-Vollnährboden in Hinsicht auf die *Yersinia*-Rückisolierung aus infizierten Milzen getestet (Schiemann 1979; Schiemann 1980).

Für die Testung wurden Milzlysate (Milzhomogenate nach TritonX-100 Lyse) nach einem Mausinfektionsversuch auf LB- und CIN-Nährböden in geometrischen Verdünnungsreihen ausgestrichen. Es konnte gezeigt werden, dass die Verwendung von CIN-Nährböden („(CIN)“) sowohl beim Ausgangsstamm JB580v als auch bei der Doppeldeletionsmutante JB580v  $\Delta ampC / \Delta blaA$  zu einer deutlichen, jedoch bei diesem Versuch nicht signifikanten Reduktion der KBE führte. Vom selben Homogenat wuchsen auf LB-Nährböden („(LB)“) im Durchschnitt (Median)  $7,09 \times 10^5$  KBE und auf CIN-Nährböden  $1,65 \times 10^5$  KBE des Ausgangsstamms (0,6 log-Stufen Differenz) (s. a. Abb. 17).

Die Doppeldeletionsmutante JB580v  $\Delta ampC / \Delta blaA$  verhielt sich ähnlich: Im Vergleich zu LB-Nährböden ( $1,51 \times 10^6$  KBE) konnten auf CIN-Nährböden mit  $2,24 \times 10^5$  gezählten Kolonien knapp eine log-Stufe weniger *Yersinien* nachgewiesen werden.

Ausgehend von diesem Ergebnis kann die Schlussfolgerung gezogen werden, dass wahrscheinlich aufgrund der o. g. selektiv-wirkenden Inhaltsstoffe ein gewisser Anteil der sich im Milzlysat befindlichen *Yersinien* auf CIN-Nährböden am Wachstum gehemmt wird. Aufgrund dessen wurden für die folgenden Versuche LB-Nährböden verwendet. Eine selektive Anzucht von *Y. enterocolitica* auf CIN-Nährböden, wie sie bei der Keimrückisolierung aus Darminhalt (Kontamination) erforderlich ist, ist bei der Keimrückisolierung aus der sonst sterilen Milz (d. h. hier nur mit *Y. enterocolitica* besiedelt) nicht notwendig.



### 3.3.2. Anpassung der Infektionsdosis für Antibiotikatherapieversuche

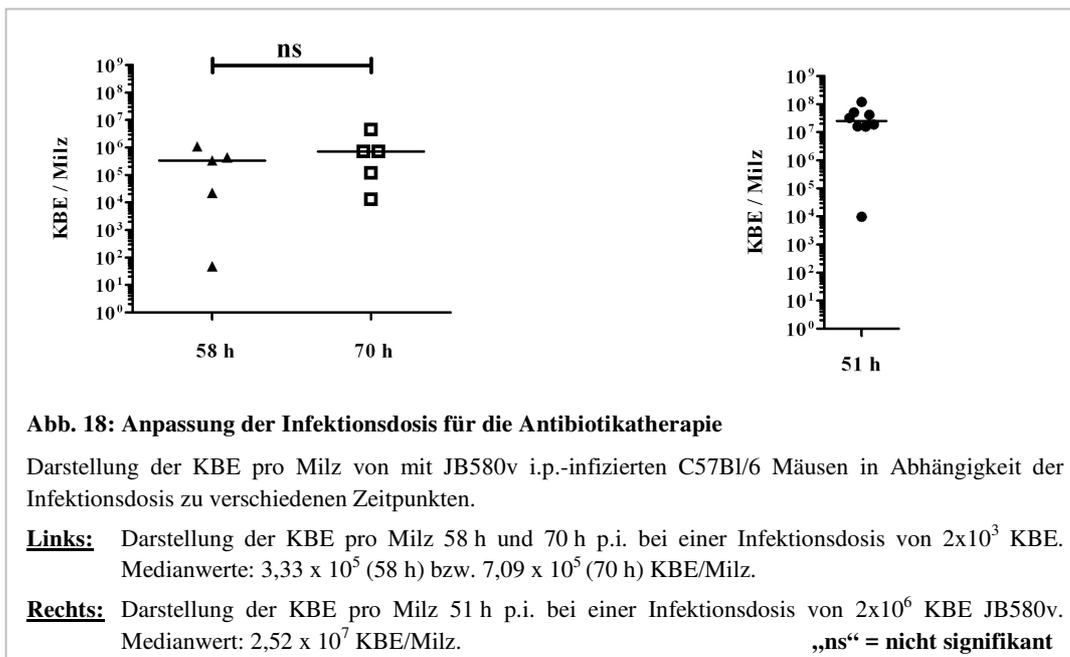
Zur besseren Vergleichbarkeit der Versuche war zunächst die Definition einer bestimmten Infektionsdosis für den Erhalt einer reproduzierbaren, gleichbleibend hohen, systemischen Infektion ohne und mit Antibiotikagaben notwendig. Als Parameter hierfür wurde die bakterielle Besiedelung der Milz (KBE) herangezogen. Zur Dosisfindung wurden C57Bl/6 Mäuse mit einer vorher definierten Menge an JB580v intraperitoneal (i.p.) infiziert.

Abb. 18 zeigt links die Höhe der KBE in der Milz bei einer Infektionsdosis von ca.  $2 \times 10^3$  KBE (i.p.) des Ausgangsstamms JB580v zu den Zeitpunkten 58 h und 70 h *post infectionem* (p.i.) auf. Die Besiedelung der Milz unterschied sich zu den gewählten Zeitpunkten kaum. Der Median der KBE-Werte betrug nach 70 h ca.  $7,09 \times 10^5$  KBE/Milz. Damit war kein signifikanter Anstieg der Bakterienlast (KBE) im Vergleich zum Vormesspunkt bei 58 h ( $3,33 \times 10^5$  KBE/Milz) erkennbar. Es zeigte sich jedoch innerhalb der einzelnen Gruppen eine große Divergenz der Einzelmesswerte von mehreren log-Stufen.

Um eine ähnlich hohe bakterielle Besiedelung der Milzen innerhalb der Gruppen, und somit homogenere Ausgangssituationen für die Antibiotika-Vergleichsstudien, zu erreichen, wurde die Infektionsdosis auf ca.  $2 \times 10^6$  KBE i.p. (in Anlehnung an die Publikation von Scavizzi *et al.* 1987) angehoben.

## Ergebnisse

Wie in Abb. 18 rechts ersichtlich ist, schwankten die Einzelmesswerte der JB580v-Gruppe bei einer Erhöhung der Infektionsdosis von  $2 \times 10^3$  KBE auf  $2 \times 10^6$  KBE bereits nach 51 h p.i. deutlich geringer. Zudem lag der Median der bakteriellen Milzbesiedelung hier mit durchschnittlich  $2,52 \times 10^7$  KBE/Milz mehr als 1 log-Stufe über der Keimlast der Versuchsgruppe mit einer Infektionsdosis von  $2 \times 10^3$  KBE. Aufgrund dieser homogenen Verteilung wurden alle weiteren Versuche mit einer Infektionsdosis von ca.  $2 \times 10^6$  KBE durchgeführt.



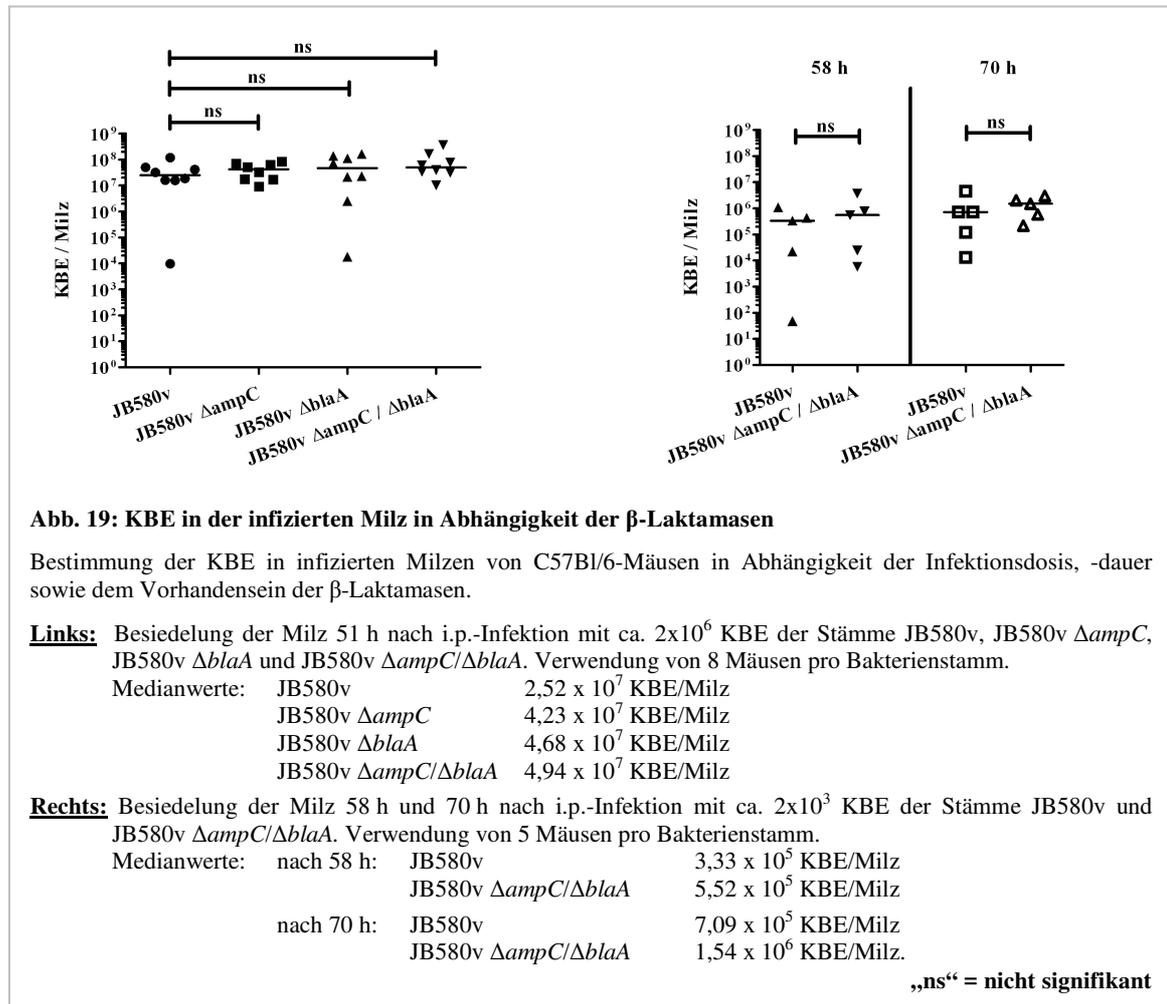
### 3.3.3. Wachstumsverhalten in vivo

Um den Einfluss der  $\beta$ -Laktamasen auf die Besiedelung der Milz einschätzen zu können, wurden Gruppen von C57Bl/6 Mäusen mit einer Dosis von ca.  $2 \times 10^6$  KBE des Ausgangsstammes JB580v oder den Deletionsmutanten JB580v  $\Delta ampC$ , JB580v  $\Delta blaA$ , bzw. JB580v  $\Delta ampC / \Delta blaA$  intraperitoneal (i.p.) infiziert.

Nach 51 h zeigte sich, wie in Abb. 19 links ersichtlich ist, in allen Gruppen eine hohe Besiedelung der Milz bei ungefähr  $5 \times 10^7$  KBE, wobei kein signifikanter Unterschied zwischen JB 580v ( $2,52 \times 10^7$  KBE) und den Deletionsmutanten (JB580v  $\Delta ampC$ :  $4,23 \times 10^7$  KBE; JB580v  $\Delta blaA$ :  $4,68 \times 10^7$  KBE; JB580v  $\Delta ampC / \Delta blaA$ :  $4,94 \times 10^7$  KBE) nachgewiesen werden konnte. Die Abwesenheit der  $\beta$ -Laktamasen beeinflusste unter den oben genannten Bedingungen die Besiedelung der Milz nicht erkennbar.

Um sicherzustellen, dass es sich hierbei nicht um ein Artefakt aufgrund der hohen Infektionsdosis mit der damit verbundenen, sich zeitnah einstellenden, systemischen Entzündungs- und Abwehrreaktion handelt und dass die  $\beta$ -Laktamasen auch bei geringeren Infektionsdosen keine Wirkung auf die Milzbesiedelung (KBE) haben, wurden zum Vergleich Mäuse mit einer Dosis von ca.  $2 \times 10^3$  KBE des Ausgangsstammes bzw.

der Doppeldeletionsmutante JB580v  $\Delta ampC / \Delta blaA$  i.p. infiziert. Sowohl bei 58 h als auch bei 70 h zeigten sich keine signifikanten Unterschiede der KBE-Werte für Milzbesiedelung zwischen dem Ausgangsstamm und der Doppeldeletionsmutante (s. a. Abb. 19 rechts).

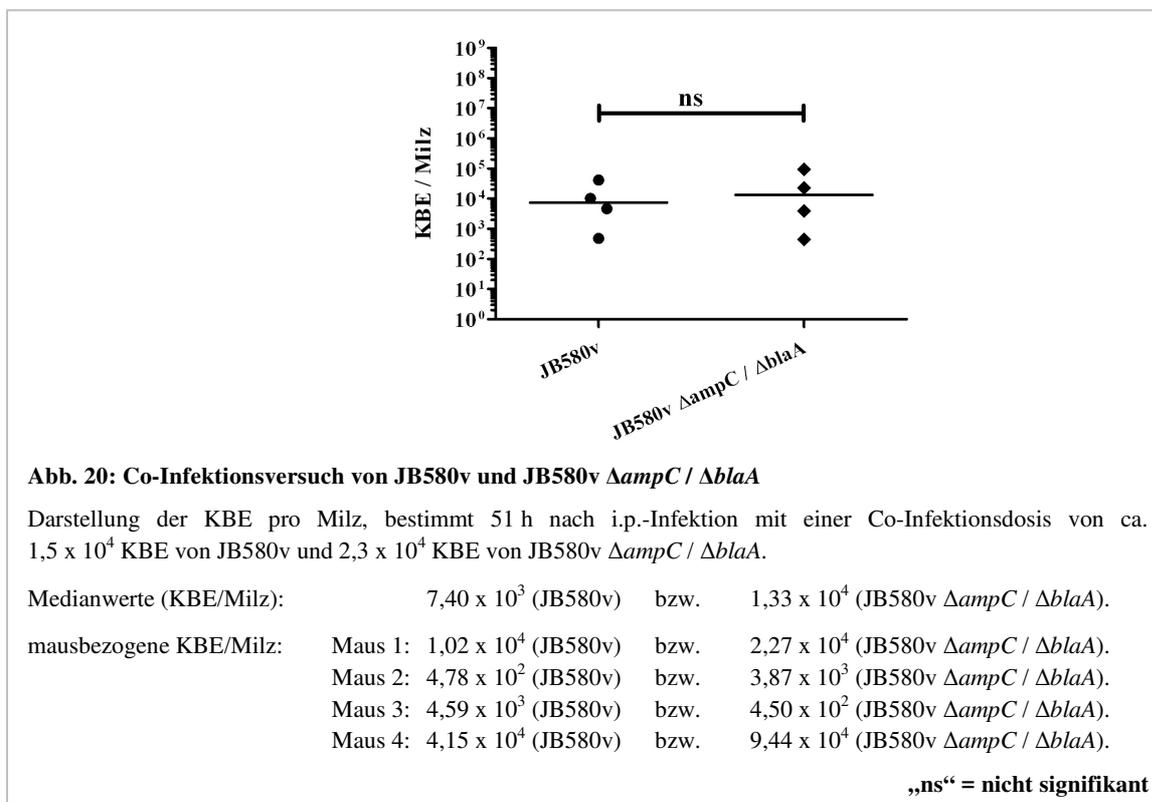


Das Vorhandensein der zwei chromosomal kodierten  $\beta$ -Laktamasen mit unterschiedlichem Expressionsmuster könnte in vivo aufgrund des höheren Stoffwechsels zu einem Wachstumsnachteil gegenüber Mutanten ohne  $\beta$ -Laktamasen im antibiotikafreien infizierten Mausgewebe führen.

Zur genaueren Untersuchung erfolgte deshalb ein Co-Infektionsversuch, bei welchem die zu untersuchenden Mäuse gleichzeitig mit ähnlich hohen Dosen des Ausgangsstamms JB580v und der  $\beta$ -Laktamase-negativen Doppeldeletionsmutante JB580v  $\Delta ampC / \Delta blaA$  infiziert wurden. Zur Bestimmung der Gesamtkeimzahl sowie zur Selektion der Doppelmutante erfolgte 51 h nach intraperitonealer Applikation der Bakterien das Ausbringen geometrischer Verdünnungsreihen des Milzhomogenats auf kanamycinhaltigen sowie auf antibiotikafreien LB-Nährböden. Nach 24 - 48 h wurden daraufhin die jeweiligen Keimzahlen bestimmt.

## Ergebnisse

Es konnte gezeigt werden, dass sich die Bakterienanzahl (KBE) beider Stämme innerhalb einer Maus nicht wesentlich voneinander unterscheiden (s. a. Abb. 20). Das Vorhandensein der  $\beta$ -Laktamasen in der infizierten unbehandelten Maus hat offensichtlich keinen Einfluss auf die bakterielle Kolonisation der Milz.



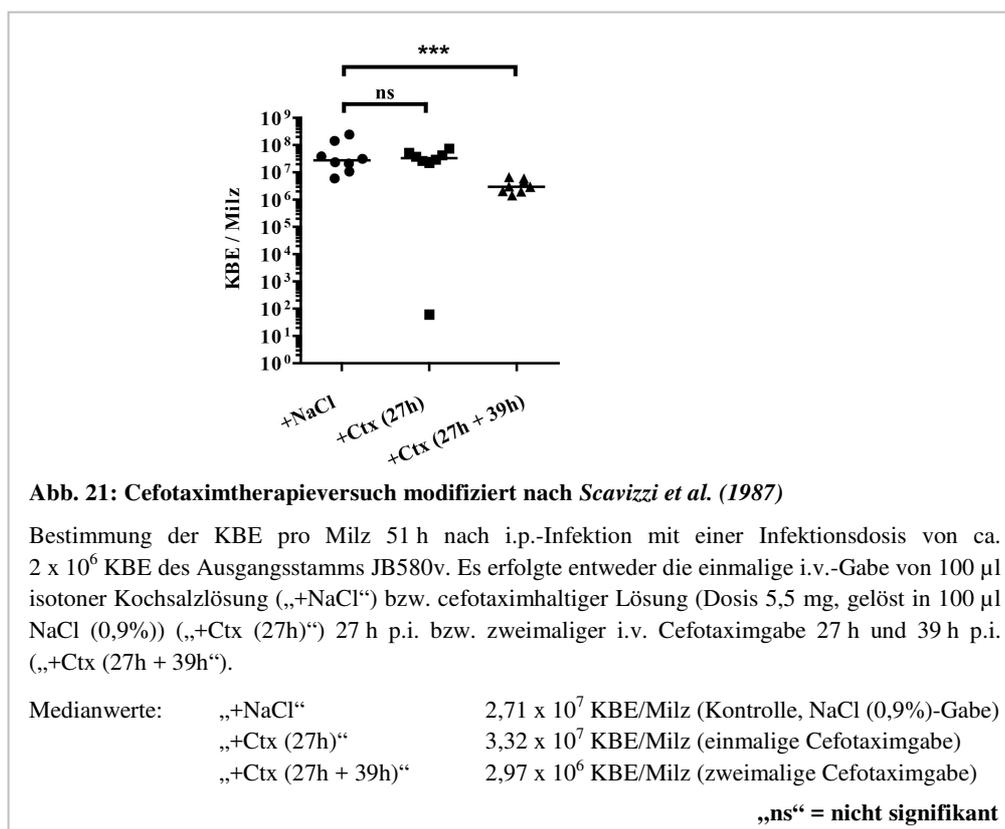
### 3.3.4. Die Rolle der $\beta$ -Laktamasen für Antibiotikaresistenz in vivo

#### 3.3.4.1. Modifikation des Therapieprotokolls von Scavizzi et al.

Um die Vergleichbarkeit der Therapieergebnisse einer früheren Publikation (Scavizzi et al. 1987) auf das hier verwendete Modell zu prüfen, erfolgte zu Beginn ein Cefotaxim-resistenzversuch mit einem nur gering abgewandelten Protokoll (Scavizzi et al. 1987). Nach i.p.-Infektion mit ca.  $2 \times 10^6$  KBE erfolgte nach 27 h die einmalige i.v.-Gabe von 5,5 mg Cefotaxim (entspricht ca. 250 mg/kg KG, „+Ctx (27h)“ bzw. 100  $\mu$ l antibiotikafreier isotonischer Kochsalzlösung („+NaCl“). Nach weiteren 24 h wurden die Milzen entnommen und die Anzahl der KBE bestimmt (s. a. Kapitel 2.12.3).

Es konnte gezeigt werden, dass (I) die Verwendung der o. g. Infektionsdosis zu einem gut reproduzierbaren Ergebnis führt (s. Abb. 21), dass (II) die einmalige i.v.-Gabe von Cefotaxim (Ctx) 24 h nach Gabe keine Änderung in der Bakterienlast der Milz (Median:  $3,32 \times 10^7$  KBE/Milz) im Vergleich zur nicht behandelten Kontrollgruppe (Median:  $2,71 \times 10^7$  KBE/Milz) erkennen lässt und (III) sich somit die Ergebnisse von Scavizzi et al. auch mit geringfügig verändertem Versuchsprotokoll reproduzieren lassen.

Zur Optimierung des Wirkspiegels von Cefotaxim im Blut und somit zur Verbesserung der antibakteriellen Wirksamkeit wurde das Protokoll weiter verändert und Cefotaxim zweimal im Abstand von 12 h (zu den Zeitpunkten 27 h und 39 h p.i.) i.v. verabreicht. Hiermit konnte gezeigt werden, dass Cefotaxim durch die zweimalige i.v.-Gabe eine signifikante Reduktion der bakteriellen Milzbesiedelung um über 1 log-Stufe bewirkte (s. Abb. 21). Es verblieb jedoch weiterhin eine signifikant hohe bakterielle Last in der Milz (Median:  $2,97 \times 10^6$  KBE/Milz).



Unter Berücksichtigung der Ergebnisse von Scavizzi et al. (1987) wurde zur besseren Charakterisierung der  $\beta$ -Laktamasen im Bezug auf die Antibiotikaresistenz von *Y. enterocolitica* für die In-vivo-Versuche folgendes Infektions-Therapie-Protokoll verwendet:

Gruppen von C57Bl/6 Mäusen wurden mit einer Infektionsdosis von ca.  $2 \times 10^6$  KBE der Stämme *Y. enterocolitica* JB580v, JB580v  $\Delta ampC$ , JB580v  $\Delta blaA$  oder JB580v  $\Delta ampC / \Delta blaA$  infiziert. Nach ca. 27 h p.i. erfolgte die erste Antibiotikagabe, die zweite wurde 12 h darauf (39 h p.i.) verabreicht, bevor die Milzen nach weiteren 12 h entnommen wurden (Infektionsende: 51 h p.i.), um die „Nettoüberlebensrate“ – d. h. die Bakterienlast, die aus der infizierten, homogenisierten Milz auf Nährböden rückisoliert werden kann – zu bestimmen. Der nicht antibakteriell therapierten Kontrollgruppe wurden zu den Zeitpunkten 27 h und 39 h p.i. jeweils 100  $\mu$ l isotoner Kochsalzlösung (NaCl 0,9%) in die Schwanzvene injiziert (s. a. Kapitel 2.12.3).

### 3.3.4.2. Einfluss der $\beta$ -Laktamasen auf die Nettoüberlebensrate nach Ampicillinbehandlung

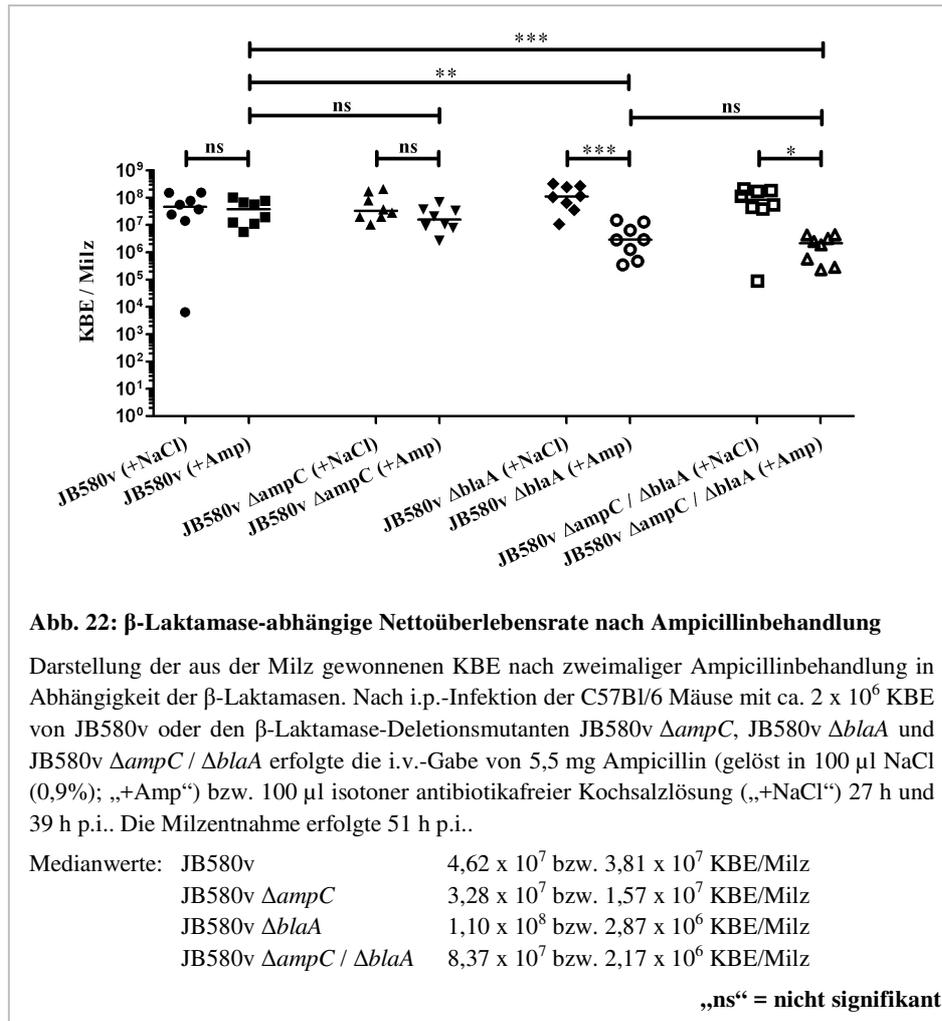
Zur Bestimmung der Wirksamkeit von Ampicillin (Amp) *in vivo* wurde der Testgruppe die Dosis von 5,50 mg Ampicillin (entspricht in etwa 250 mg/kg) gelöst in 100  $\mu$ l isotoner Kochsalzlösung in Anlehnung an die Publikation von *Scavizzi et al. (1987)*, in der die lediglich einmalige Verabreichung von 200 mg/kg KG Amoxicillin beschrieben wurde, zu den Zeitpunkten 27 h und 39 h p.i. i.v. appliziert. Die Kontrollgruppe erhielt jeweils 100  $\mu$ l antibiotikafreie Kochsalzlösung (NaCl 0,9%).

Beim Vergleich der KBE in den Milzen 51 h p.i. waren in der JB580v-Gruppe, die nicht antibakteriell behandelt wurde, durchschnittlich  $4,62 \times 10^7$  KBE/Milz (Median) nachweisbar; in der mit Ampicillin behandelten Gruppe lag der Median bei  $3,81 \times 10^7$  KBE/Milz (s. a. Abb. 22). Zwischen beiden Gruppen war kein signifikanter Unterschied erkennbar, was zeigt, dass Ampicillin *in vivo* keinen Einfluss auf die Fitness von JB580v unter diesen Testbedingungen hatte.

Die  $\Delta ampC$ -Deletionsmutante verhielt sich ähnlich zum Ausgangsstamm. Bei der Gruppe ohne Antibiotikaexposition lag der Median der KBE in der Milz bei  $3,28 \times 10^7$ , nach zweimaliger i.v.-Gabe von Ampicillin waren noch  $1,57 \times 10^7$  KBE/Milz nachweisbar (s. a. Abb. 22). Da zwischen beiden Gruppen kein signifikanter Unterschied in der Nettoüberlebensrate der Bakterien nachzuweisen war, kann davon ausgegangen werden, dass *ampC* keinen wesentlichen Einfluss auf die Ampicillinresistenz *in vivo* besitzt (Ampicillin induziert nicht die *ampC* Expression).

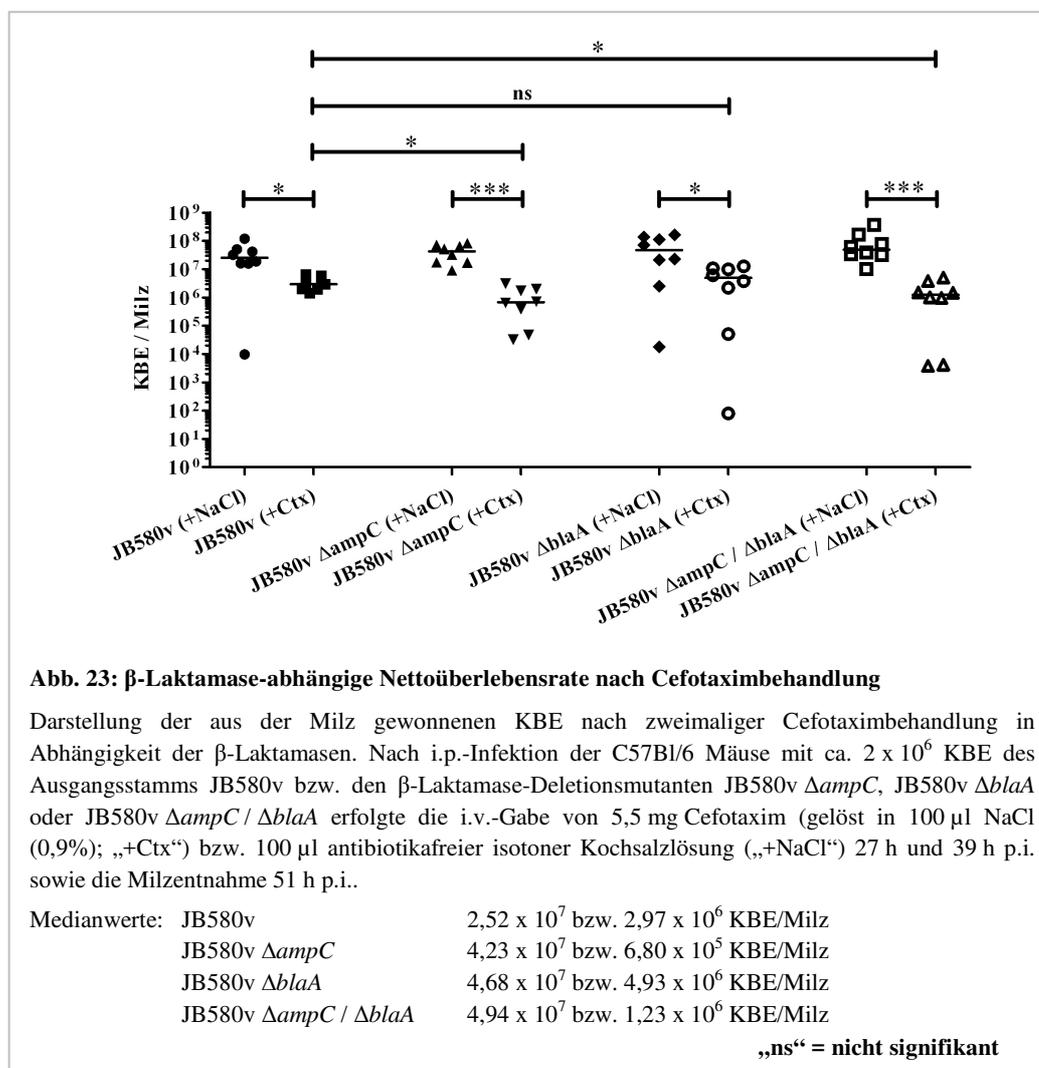
Bei der  $\Delta blaA$ -Deletionsmutante zeigte sich ein anderes Ergebnis: Lag der Median der KBE in der Milz bei den nicht behandelten Mäusen bei  $1,10 \times 10^8$ , war dieser nach zweimaliger i.v.-Gabe von Ampicillin auf  $2,87 \times 10^6$  KBE/Milz abgefallen und somit die Bakterienlast deutlich erniedrigt (s. a. Abb. 22). BlaA vermittelt somit eine partielle Ampicillinresistenz bei JB580v (KBE-Reduktion um 2 log-Stufen).

Vergleichbare Ergebnisse zur  $\Delta blaA$ -Deletionsmutante wurden mit der Doppeldeletionsmutante JB580v  $\Delta ampC / \Delta blaA$  erzielt. Wenn man die KBE der behandelten mit denen der nicht behandelten Gruppe vergleicht, wird deutlich, dass die Doppeldeletion zwar zu einer deutlichen Reduktion der KBE von  $8,37 \times 10^7$  auf  $2,17 \times 10^6$  in der Milz führte, die Abnahme der KBE jedoch genauso groß war wie bei der  $\Delta blaA$ -Deletionsmutante. Somit bewirkte die gleichzeitige Deletion beider  $\beta$ -Laktamasen bezüglich der Ampicillinresistenz *in vivo* keinen zusätzlichen Effekt (s. a. Abb. 22).



### 3.3.4.3. Einfluss der $\beta$ -Laktamasen auf die Nettoüberlebensrate nach Cefotaximbehandlung

Zur Bestimmung der Wirksamkeit von Cefotaxim (Ctx) *in vivo* wurde der Testgruppe die Dosis von 5,50 mg Cefotaxim (entspricht in etwa 250 mg/kg) gelöst in 100  $\mu$ l isotoner Kochsalzlösung (NaCl (0,9%)) nach *Scavizzi et al. (1987)*, die 250 mg/kg KG Cefotaxim jedoch lediglich einmalig verabreichten, zu den Zeitpunkten 27 h und 39 h p.i. i.v. appliziert. Die Kontrollgruppe erhielt jeweils 100  $\mu$ l antibiotikafreie Kochsalzlösung (NaCl 0,9%) intravenös. Die Anzahl der KBE, die von den Milzen 51 h p.i. bestimmt wurden, lag in der JB580v-Gruppe, die nicht antibakteriell behandelt wurde („+NaCl“), durchschnittlich bei  $2,52 \times 10^7$ , in der mit Cefotaxim behandelten Gruppe („+Ctx“) lag der Median der KBE bei  $2,97 \times 10^6$ . Damit konnte gezeigt werden, dass die Behandlung mit Cefotaxim eine signifikante Reduktion der KBE in den Milzen um ca. 1 log-Stufe bewirkte. Die nachgewiesene Keimzahl war jedoch weiterhin relativ hoch (s. a. Abb. 23).



Bei der  $\Delta ampC$ -Deletionsmutante zeigte die zweimalige i.v.-Gabe von Cefotaxim eine Abnahme der KBE in der Milz von  $4,23 \times 10^7$  KBE auf  $6,80 \times 10^5$  KBE und damit eine deutlichere Reduktion (2 log-Stufen) gegenüber dem Ausgangsstamm (s. a. Abb. 23).

Die  $\beta$ -Laktamase AmpC ist für die Resistenzbildung gegenüber Cefotaxim in vivo relevant. Dennoch bestand am Ende des Versuchs auch hier noch eine relativ hohe Keimlast (Cefotaxim ist ein schwacher Induktor der *ampC* Expression).

Die  $\Delta blaA$ -Deletionsmutante zeigte nach zweimaliger Cefotaximbehandlung ein ähnliches Verhalten wie der Ausgangsstamm. Die Antibiotikagabe bewirkte hier im Mittel eine relevante Verminderung der Keimzahl in der Milz von  $4,68 \times 10^7$  KBE („+NaCl“) auf  $4,93 \times 10^6$  KBE („+Ctx“). Zwischen JB580v und der  $\Delta blaA$ -Deletionsmutante zeigte sich kein messbarer Unterschied. Damit kann davon ausgegangen werden, dass die  $\beta$ -Laktamase BlaA unter den o. g. Testbedingungen keinen relevanten Einfluss auf die Resistenz gegenüber dem 3. Generation Cephalosporin Cefotaxim hat (s. a. Abb. 23).

Um die von beiden  $\beta$ -Laktamasen unabhängige Resistenz gegenüber Cefotaxim beurteilen zu können, erfolgte zusätzlich die Austestung der Doppeldeletionsmutante JB580v  $\Delta ampC / \Delta blaA$ . Auch hier kam es im Median zu einer deutlichen Reduktion der in der Milz nachgewiesenen KBE von  $4,94 \times 10^7$  („+NaCl“) auf  $1,23 \times 10^6$  („+Ctx“) und damit einer stärkeren Abnahme als beim Ausgangsstamm JB580v, die dem Niveau der  $\Delta ampC$ -Deletionsmutante entsprach. Diese Ergebnisse erlauben die Schlussfolgerung, dass die gleichzeitige Deletion beider Gene keine vermehrte Sensitivität gegenüber Cefotaxim bewirkte und am Versuchsende weiterhin eine hohe Keimlast in der Milz nachgewiesen werden konnte (s. a. Abb. 23).

Um auszuschließen, dass die antibiotische Wirkung durch die initial erhöhte Infektionsdosis negativ beeinflusst wird, wurde die Wirksamkeit von Cefotaxim beim Ausgangsstamm JB580v und der Doppeldeletionsmutante JB580v  $\Delta ampC / \Delta blaA$  genauer untersucht (s. a. Abb. 24). Hierfür wurden 2 Gruppen („Gruppe A“ und „Gruppe B“) von C57Bl/6-Mäusen mit ca.  $2 \times 10^4$  KBE i.p. infiziert. Anschließend erfolgte die i.v.-Gabe von 5,5 mg Cefotaxim („+Ctx“) bzw. 100  $\mu$ l isotoner Kochsalzlösung („+NaCl“) nach 27 h und 39 h p.i. (Gruppe A) bzw. nach 51 h und 63 h p.i. (Gruppe B). Die Milzen wurden nach weiteren 12 h entnommen (Gruppe A/51h, Gruppe B/75h p.i.) und auf ihre KBE untersucht.

Im Vergleich zu o. g. Versuch wiesen der Ausgangsstamm und die Doppeldeletionsmutante auch bei der reduzierten Infektionsdosis von ca.  $2 \times 10^4$  KBE nach 51 h und nach 75 h ohne antibiotische Behandlung eine ähnlich hohe Keimzahl in der Milz auf: Der Median lag 51 h nach i.p.-Infektion bei  $7,25 \times 10^5$  (JB580v) bzw.  $9,33 \times 10^5$  KBE (JB580v  $\Delta ampC / \Delta blaA$ ), nach 75 h bei  $1,31 \times 10^6$  (JB580v) bzw.  $1,27 \times 10^7$  KBE (JB580v  $\Delta ampC / \Delta blaA$ ).

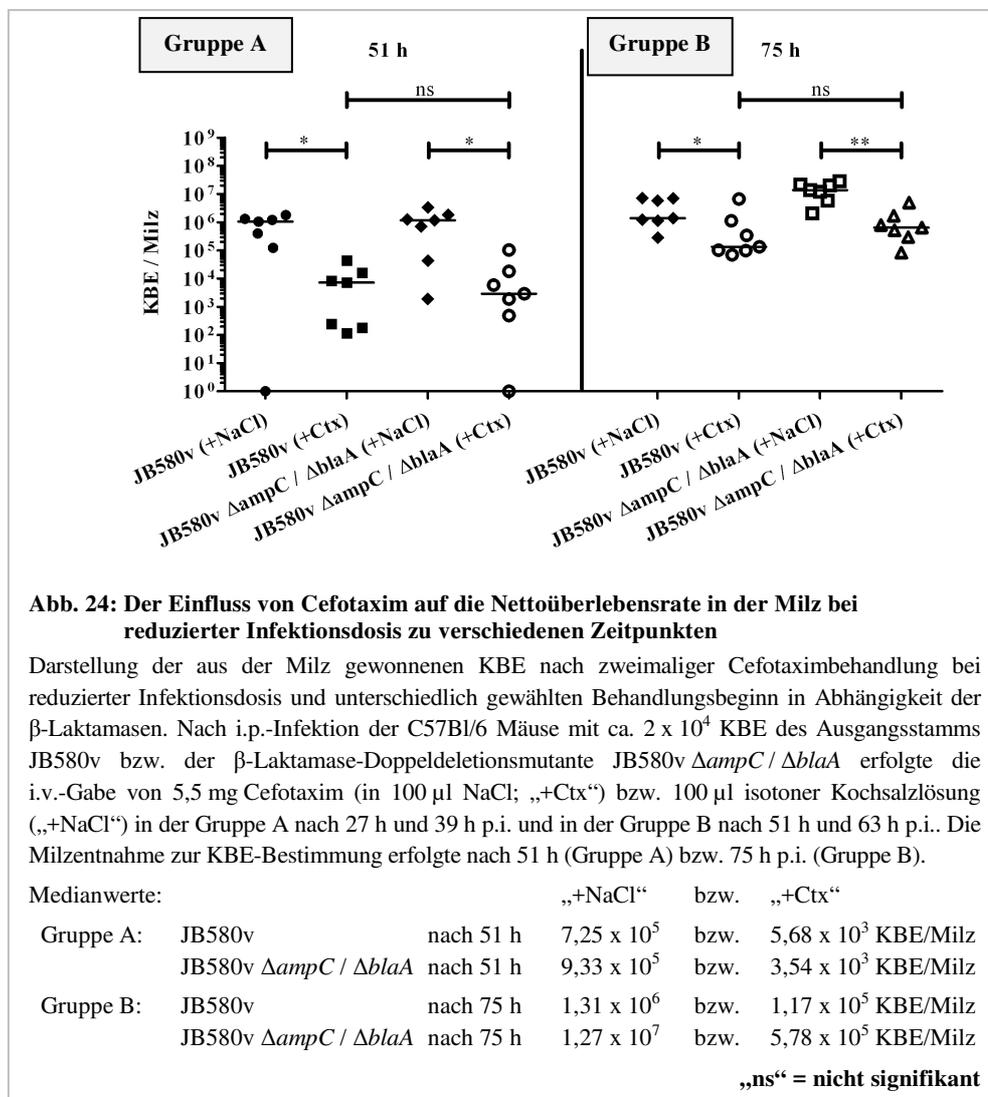
Nach zweimaliger i.v.-Gabe von 5,5 mg Cefotaxim wies der Ausgangsstamm, bei dem die antibakterielle Therapie bereits nach 27 h begonnen wurde (Gruppe A), eine Abnahme der bakteriellen Last von  $7,25 \times 10^5$  auf  $5,68 \times 10^3$  KBE und somit um mehr als 2 log-Stufen auf. Bei JB580v  $\Delta ampC / \Delta blaA$  zeigte sich nach Ende des gleichen

## Ergebnisse

Therapieschemas eine ähnlich große Reduktion der Keimzahl von  $9,33 \times 10^5$  auf  $3,54 \times 10^3$  KBE in der Milz (2,5 log-Stufen).

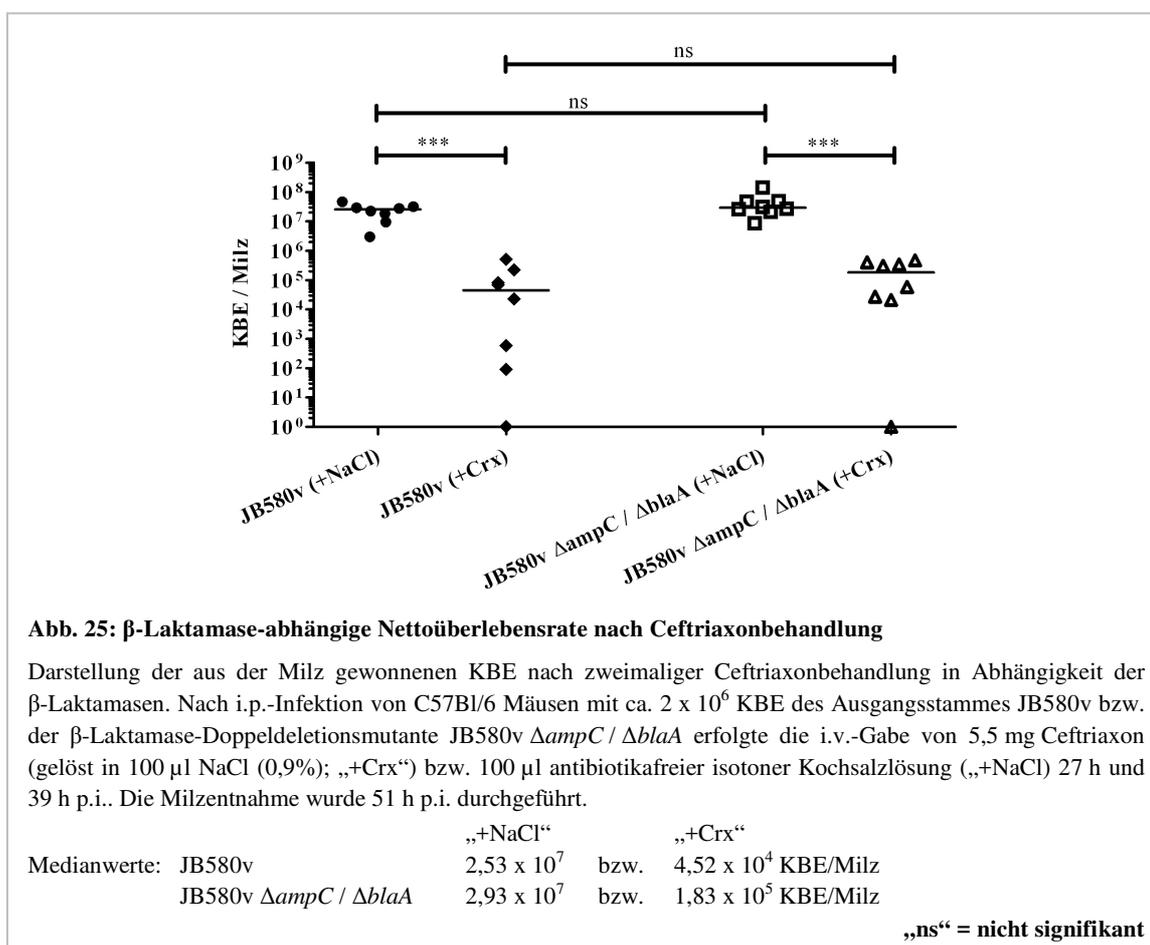
In der Gruppe B (Cefotaximgaben 51h und 63h p.i.) bewirkte die zweimalige intravenöse Cefotaximgabe beim Ausgangsstamm eine Verringerung der bakteriellen Milzbesiedelung von  $1,31 \times 10^6$  auf  $1,17 \times 10^5$  KBE. Bei der Doppeldeletionsmutante reduzierte sich die Keimzahl von  $1,27 \times 10^7$  auf  $5,78 \times 10^5$  KBE. Damit kam es jeweils zu einer Reduktion um etwa 1 log-Stufe.

Bei diesen Versuchen konnte gezeigt werden, dass die  $\beta$ -Laktamasen auch bei einer geringeren Infektionsdosis und verschiedenen langen p.i.-Zeiten keinen signifikanten Einfluss auf die Nettoüberlebensrate von *Y. enterocolitica* bei der getesteten Cefotaximbehandlung haben. Andere Faktoren als die chromosomalen  $\beta$ -Laktamasen könnten für die  $\beta$ -Laktam-Resistenz verantwortlich zu sein.



### 3.3.4.4. Einfluss der $\beta$ -Laktamasen auf die Nettoüberlebensrate nach Ceftriaxonbehandlung

Um einen zu raschen Abfall des therapeutischen Wirkspiegels von Cefotaxim (Ctx) als Ursache für die zum Ende des Versuchs noch erhöhte Bakterienlast in der Milz ausschließen zu können, wurde das strukturell sehr verwandte, im sensiblen Keimspektrum vergleichbare Antibiotikum Ceftriaxon (Crx) verwendet, da dieses aufgrund seiner hohen Plasmaproteinbindung eine deutlich längere Halbwertszeit im Blut hat (5,8 - 8,7 h bei Ceftriaxon im Vergleich zu 0,8 – 1,4 h bei Cefotaxim) (Unowsky *et al.* 1989). Durch den Wechsel der Substanz sollten die Yersinien länger anhaltenden, hohen Wirkspiegeln ausgesetzt werden.



Nach zweimaliger i.v.-Gabe von 5,5 mg Ceftriaxon („+Crx“) bzw. isotoner Kochsalzlösung („+NaCl“) nach dem o. g. Infektionsprotokoll wurde die Keimzahl des Ausgangsstamm JB580 v und der Doppeldeletionsmutante JB580v  $\Delta ampC / \Delta blaA$  in der Milz 51 h p.i. bestimmt (Abb. 25). Beim Ausgangsstamm zeigte sich durch die zweimalige intravenöse Ceftriaxongabe eine Reduktion der nachweisbaren Yersinien von  $2,53 \times 10^7$  KBE („+NaCl“) auf  $4,52 \times 10^4$  KBE („+Crx“) in der Milz (Medianwerte) und damit eine deutlichere Abnahme im Vergleich zur Cefotaximgabe. Die

Doppeldeletionsmutante zeigte im selben Versuch eine Abnahme der KBE von  $2,93 \times 10^7$  („+NaCl“) auf  $1,83 \times 10^5$  („+Crx“). Neben einer deutlichen Reduktion der Keimlast in beiden Gruppen war trotz des Fehlens beider  $\beta$ -Laktamasen bei der Doppeldeletionsmutante eine ähnlich hohe Keimlast wie beim Ausgangsstamm nachweisbar (kein signifikanter Unterschied beider Medianwerte).

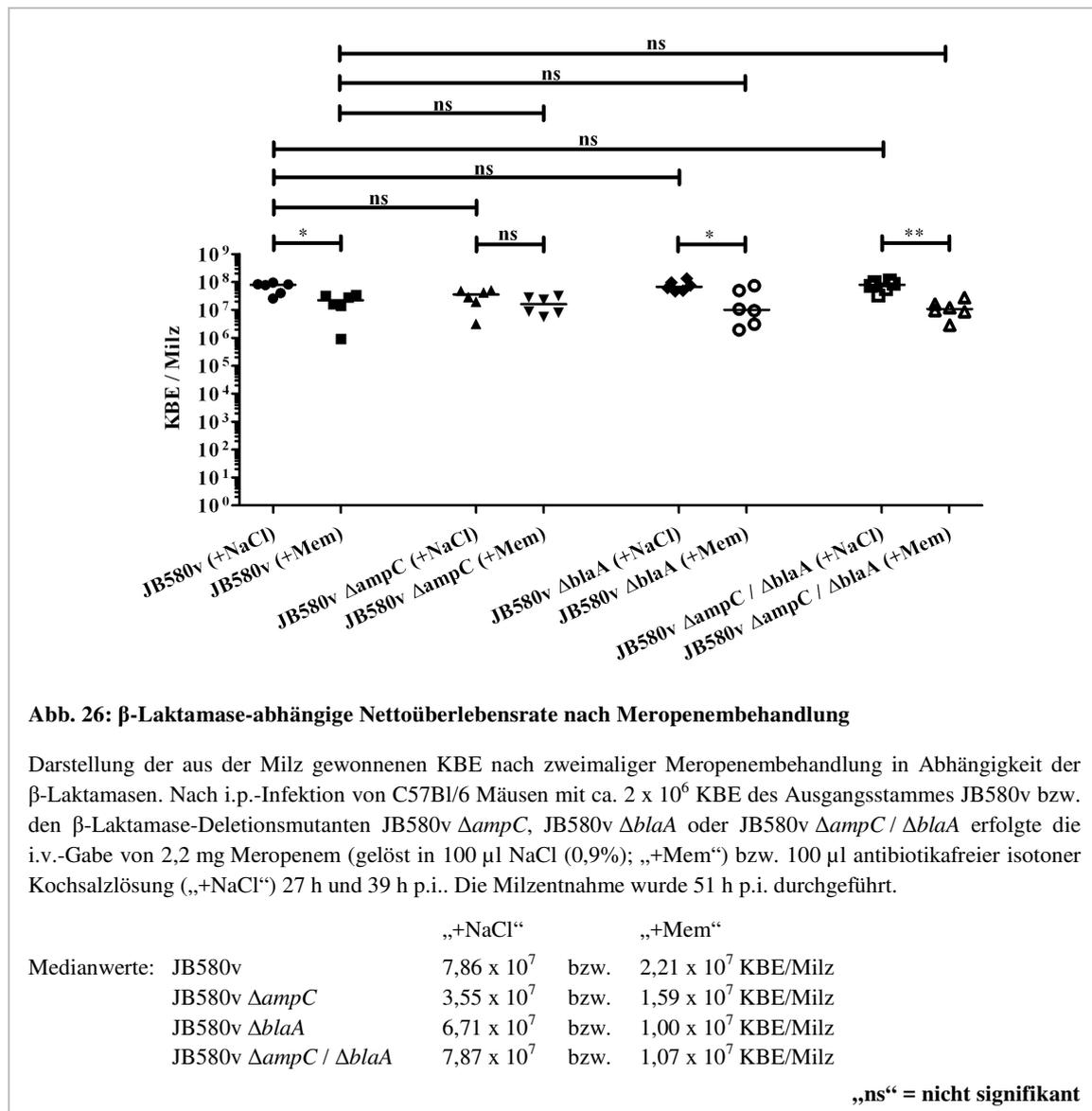
Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass Ceftriaxon gegenüber *Y. enterocolitica* in diesem Versuchsaufbau eine deutlich bessere Wirkung als Cefotaxim hat. Die  $\beta$ -Laktamasen vermitteln keinen signifikanten Einfluss auf die Nettoüberlebensrate von *Y. enterocolitica* unter Ceftriaxonbehandlung.

### **3.3.4.5. Einfluss der $\beta$ -Laktamasen auf die Nettoüberlebensrate nach Meropenembehandlung**

Zur Bestimmung der Wirksamkeit von Meropenem (Mem) in vivo wurde der Testgruppe zweimalig (zu den Zeitpunkten 27 h und 39 h p.i.) die Dosis von 2,20 mg (entspricht ca. 100 mg/kg KG, gelöst in 100  $\mu$ l isotoner Kochsalzlösung) in Anlehnung an die Publikation von Scavizzi *et al.* (1987) intravenös verabreicht. Diese wählten für das Meropenem-ähnliche Antibiotikum Imipenem die einmalige Gabe von 100 mg/kg KG. Der Kontrollgruppe wurde jeweils 100  $\mu$ l isotone Kochsalzlösung (NaCl 0,9%) injiziert. Beim Vergleich der KBE in den Milzen 51 h p.i. waren in der JB580v-Gruppe, die nicht antimikrobiell behandelt wurde („+NaCl“), durchschnittlich  $7,86 \times 10^7$  KBE (Median) nachweisbar, in der mit Meropenem behandelten Gruppe („+Mem“) lag der Median der KBE bei  $2,21 \times 10^7$  KBE (s. a. Abb. 26). Es zeigte sich ein geringer, jedoch signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen, was darauf hinweist, dass Meropenem in vivo nur einen geringen Einfluss auf die Nettoüberlebensrate des Ausgangsstamms unter diesen Testbedingungen hat.

Bei der  $\Delta ampC$ -Deletionsmutante hingegen zeigte sich im Vergleich eine nicht signifikante Reduktion der Yersinien von  $3,55 \times 10^7$  KBE („+NaCl“) auf  $1,59 \times 10^7$  KBE („+Mem“) in der Milz (s. a. Abb. 26). Da zwischen beiden Gruppen kein signifikanter Unterschied in der Nettoüberlebensrate der Bakterien nachzuweisen war, kann davon ausgegangen werden, dass AmpC keinen wesentlichen Einfluss auf die Meropenem-resistenz in vivo hat.

Die zweimalige i.v.-Behandlung der  $\Delta blaA$ -Deletionsmutante mit Meropenem bewirkte eine geringe, jedoch signifikante Abnahme der in der Milz nachgewiesenen Yersinien von  $6,71 \times 10^7$  KBE („+NaCl“) auf  $1,00 \times 10^7$  KBE („+Mem“) (s. a. Abb. 26). Die Deletion von *blaA* bewirkte unter diesen Testbedingungen keine Veränderung der Sensitivität gegenüber Meropenem in vivo.

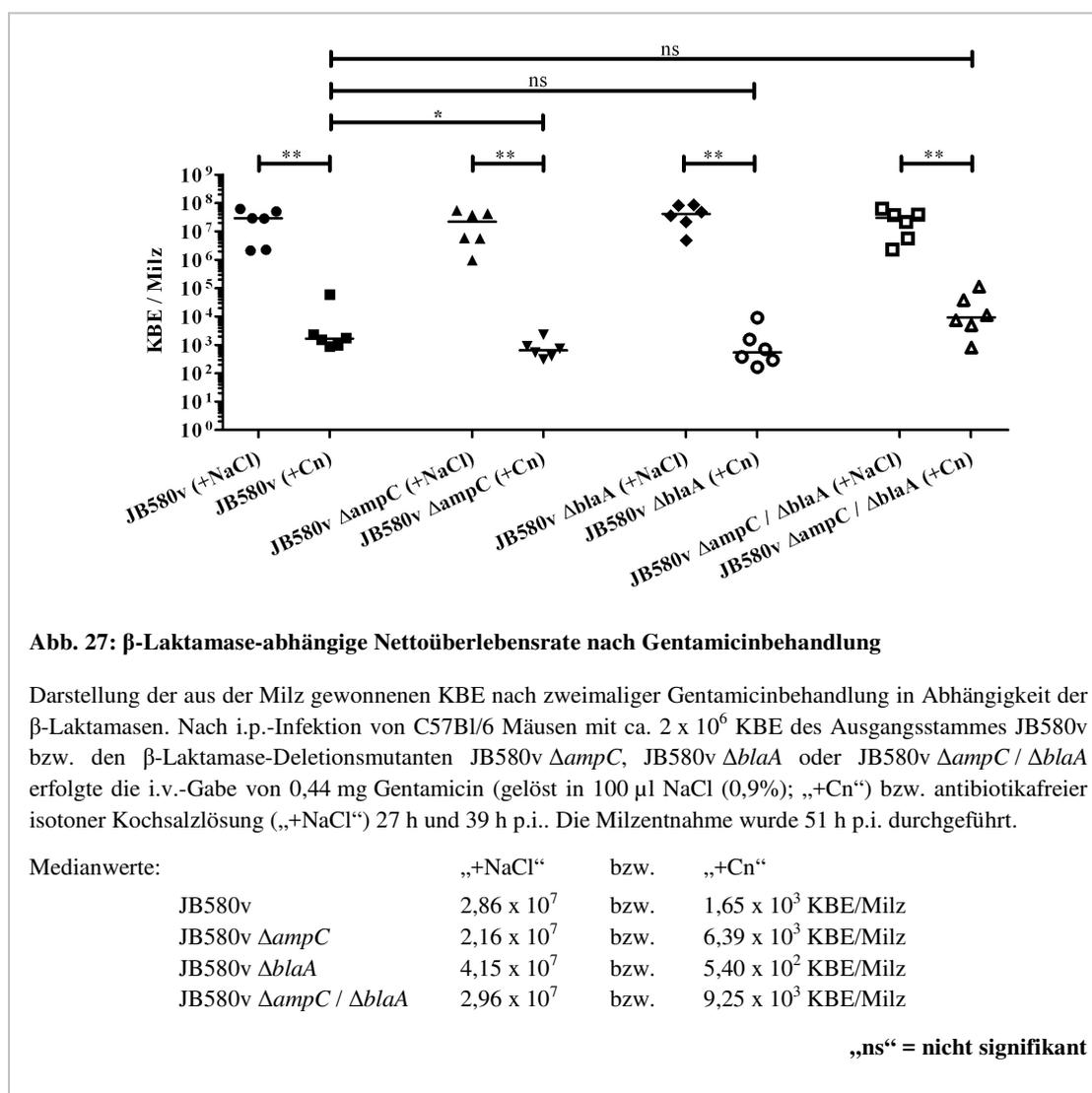


Vergleichbare KBE-Wertepaare ergaben sich mit der Doppeldeletionsmutante JB580v  $\Delta ampC / \Delta blaA$ . Wenn man die KBE der behandelten Gruppe der Keimzahl der nichtbehandelten Gruppe gegenüberstellt, wird deutlich, dass die Meropenemgabe bei der Doppeldeletionsmutante zwar zu einer gewissen Reduktion der Bakterienlast von  $7,87 \times 10^7$  („+NaCl“) auf  $1,07 \times 10^7$  KBE („+Mem“) in der Milz führt, die Abnahme aber genauso groß ist wie beim Ausgangsstamm JB580v. Ein wesentlicher Beitrag der  $\beta$ -Laktamasen für die Nettoüberlebensrate bei der Meropenembehandlung konnte nicht festgestellt werden (s. a. Abb. 26). Im Umkehrschluss kann davon ausgegangen werden, dass für die geringe In-vivo-Sensitivität gegenüber Meropenem andere Resistenzmechanismen verantwortlich sein müssen.

### 3.3.4.6. Einfluss der $\beta$ -Laktamasen auf die Nettoüberlebensrate nach Gentamicinbehandlung

Zur Kontrolle der In-vivo-Wirksamkeit von Nicht- $\beta$ -Laktam-Antibiotika gegen *Y. enterocolitica* wurde das bakterizide, jedoch nicht bakteriolytische Antibiotikum Gentamicin (Cn) unter den gleichen Bedingungen wie die  $\beta$ -Laktam-Antibiotika getestet. Es wurden zweimal 0,44 mg Gentamicin (gelöst in 100  $\mu$ l isotoner Kochsalzlösung) i.v. verabreicht. Dies entspricht in etwa der Einzeldosis, die Scavizzi *et al.* (1987) über 24 h applizierten (20 mg/kg KG). Die Kontrollgruppe erhielt jeweils 100  $\mu$ l antibiotikafreie Kochsalzlösung (NaCl 0,9%).

Die zweimalige Gabe von Gentamicin bewirkte beim Ausgangsstamm JB580v eine signifikante Reduktion der nachweisbaren KBE in der Milz von  $2,86 \times 10^7$  („+NaCl“) auf  $1,65 \times 10^3$  („+Cn“) (Medianwerte) und somit um mehr als 4 log-Stufen (s. a. Abb. 27).



Bei der *ampC*-Deletionsmutante führte die zweimalige Gentamicingabe zu einer Abnahme von  $2,16 \times 10^7$  („+NaCl“) auf  $6,39 \times 10^3$  KBE („+Cn“) (Medianwerte) und somit zu einer ähnlich hohen Verminderung der KBE in der Milz wie beim Ausgangsstamm.

Ein entsprechendes Ergebnis zeigte die *blaA*-Deletionsmutante. Waren am Versuchsende in der unbehandelten Gruppe  $4,15 \times 10^7$  KBE („+NaCl“) in der Milz nachweisbar, waren es in der mit Gentamicin behandelten Gruppe nur noch  $5,40 \times 10^2$  KBE („+Cn“). Auch die aus der Milz rückisolierten KBE der Doppeldeletionsmutante waren nach der Gentamicinbehandlung deutlich reduziert – von  $2,96 \times 10^7$  KBE („+NaCl“) auf  $9,25 \times 10^3$  KBE („+Cn“) (jeweils Medianwerte).

In diesem Versuchsaufbau konnte gezeigt werden, dass bereits eine kurzzeitige Behandlungsdauer mit Gentamicin die Bakterienlast in der Milz um 4 log-Stufen senkt. Folglich stellt Gentamicin in der Behandlung der Yersiniose eine mögliche Therapieoption dar (bei Infektionen mit *Y. pestis* gelten Aminoglykoside als Mittel der 1. Wahl). Wie erwartet beeinflusst die Deletion einer oder gleich beider  $\beta$ -Laktamasen die Nettoüberlebensrate von *Y. enterocolitica* nicht.

### **3.3.5. Immunfluoreszenzmikroskopische Untersuchung der infizierten Milz**

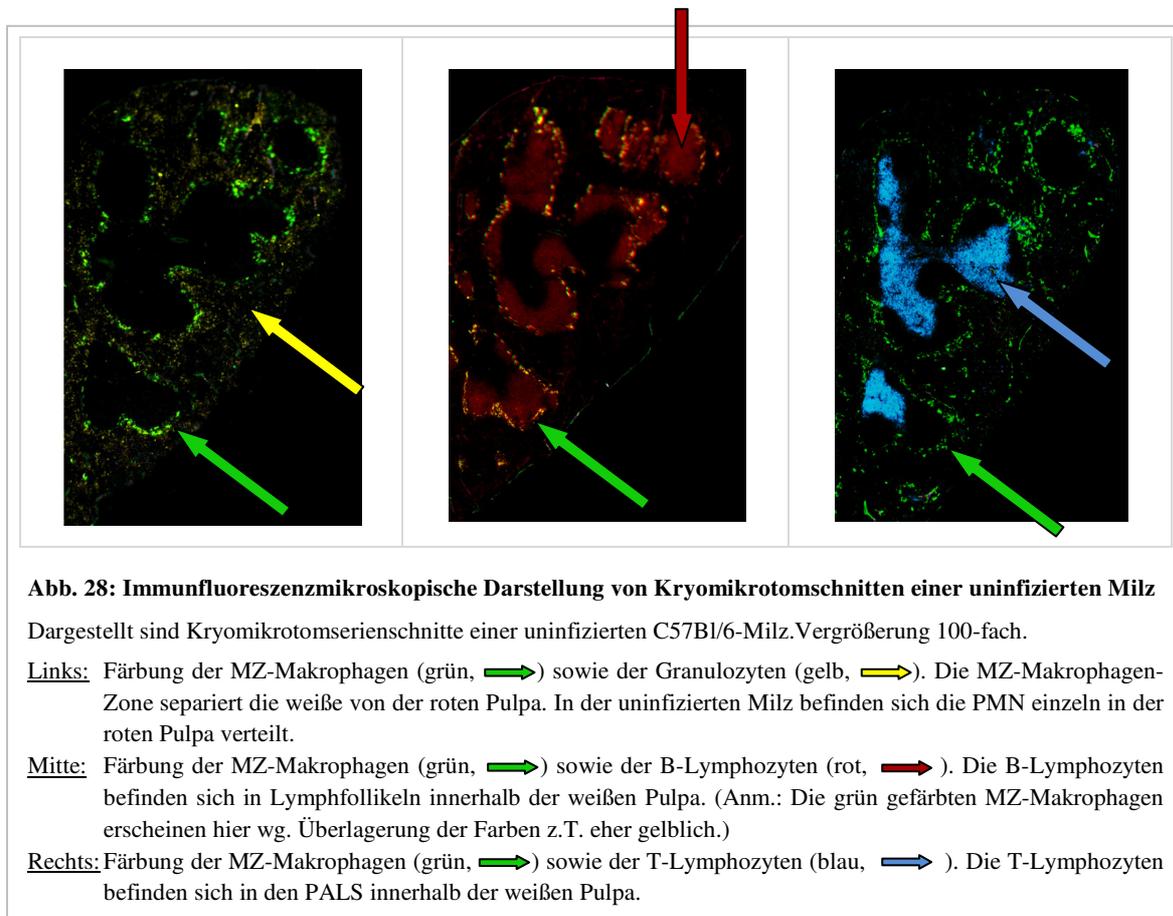
#### **3.3.5.1. Immunfluoreszenzmikroskopische Milzdarstellung**

Um den Einfluss der verwendeten Antibiotika auf die Infektionsherde in der Milz genauer zu charakterisieren, wurden von tiefgefrorenen infizierten und uninfizierten Organen 5-7  $\mu\text{m}$  dicke Serienschnitte mit dem Kryomikrotom angefertigt. Diese wurden mit *Yersinia*-spezifischen und immunzellspezifischen Antikörpern gefärbt und anschließend mittels Immunfluoreszenzmikroskopie ausgewertet. Der schematische feingewebliche Aufbau der Milz ist in Kapitel 1.2.4 beschrieben.

Zur besseren Kenntlichmachung der unterschiedlichen Zellgruppen wurden mittels Fluoreszenzmikroskopie und Falschfarbentechnik die Marginalzonenmakrophagen grün, die Granulozyten (PMN) gelb, die B-Lymphozyten rot, die T-Lymphozyten blau und die Yersinien rosa abgebildet. Nach Färbung einer nichtinfizierten C57Bl/6-Mausmilz lässt sich der feingeweblich, mikroanatomische Aufbau immunfluoreszenzmikroskopisch gut darstellen. In den gefärbten Schnitten (s. Abb. 28) sind die in der Marginalzone (MZ) befindlichen MZ-Makrophagen, die die innenliegende weiße Pulpa von der umgebenden roten Pulpa (s. a. Kapitel 1.2.4) abtrennen, grün gefärbt. In der gesamten roten Pulpa können vereinzelt neutrophile Granulozyten (PMN) dargestellt werden. Aufgrund des reproduzierbar schwachen Fluoreszenzsignals kann davon ausgegangen werden, dass die Gesamtpopulation der PMN in der uninfizierten Milz gering ist. Deutlich davon abzugrenzen sind die innerhalb der weißen Pulpa liegenden PALS (periarteriellen lymphatischen Scheiden), in denen die hier blau dargestellten T-Lymphozyten lokalisiert

## Ergebnisse

sind, sowie die auch in der weißen Pulpa befindlichen hier rot dargestellten Lymphfollikel mit den B-Lymphozyten.

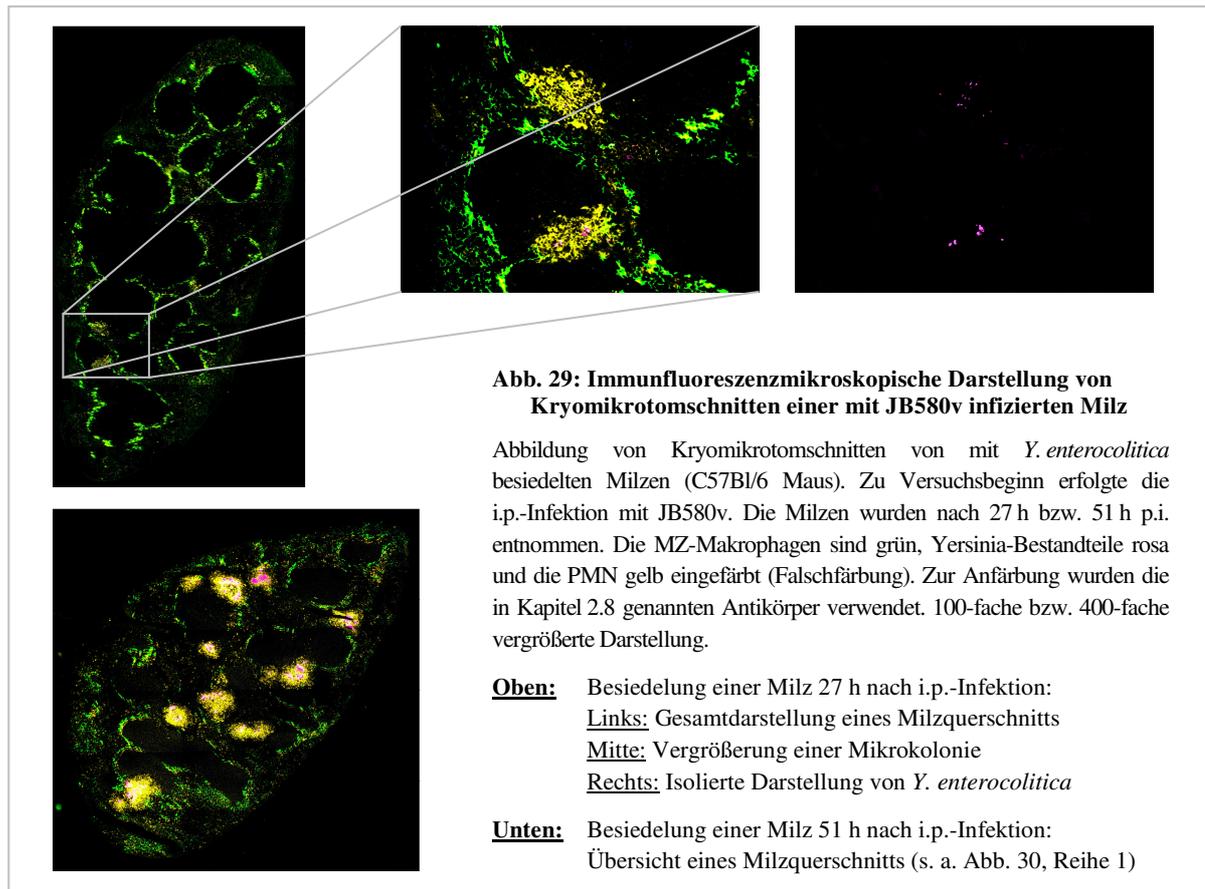


### 3.3.5.2. Immunfluoreszenzmikroskopische Darstellung der *Yersinia*-infizierten Milz (Kryomikrotomschnitte)

Nach erfolgter i.p.-Applikation disseminieren Yersinien wahrscheinlich über den Blutstrom in die Leber, Milz und andere lymphatische Organe. In den Endstromgebieten der Milz werden Yersinien vermutlich im marginalen Sinus „abgefangen“. Die überlebenden Yersinien bilden dann sichtbare Mikrokolonien. Wie bereits gezeigt werden konnte, stammen die Mikroabszesse von einzelnen Bakterien ab (klonale Dissemination) (Oellerich et al. 2007). E. Lenk demonstrierte in ihrer Dissertation, dass die Besiedelung der Milz durch *Y. enterocolitica* vom Marginalzonenbereich ausgeht (Lenk 2011).

Die Immunfluoreszenzmikroskopie der mit *Y. enterocolitica* infizierten Milzschnitte zeigt bereits 27 h nach einer i.p.-Infektion des Ausgangsstamms JB580v in einer Konzentration von ca.  $2 \times 10^6$  KBE (dies entspricht dem Zeitpunkt der ersten Antibiotikagabe) kleine locker gepackte Bakterienverbände im Bereich der Marginalzone. Bereits in diesem frühen Infektionsstadium werden zahlreiche PMN rekrutiert und infiltrieren die Mikrokolonien (s. Abb. 29 oben).

Nach weiteren 24 h (also insgesamt 51 h p.i.) hat die Anzahl und die Größe der bakteriellen Mikrokolonien trotz der bereits vorhandenen PMN und ihrer weiter vermehrten Rekrutierung deutlich zugenommen (s. Abb. 29 unten sowie Abb. 30, Reihe 1). Wie bereits nachgewiesen werden konnte, kommt es bei der Größenzunahme schrittweise zu einer Verdrängung der den Mikrokolonien benachbarten T- und B-Lymphozyten (Lenk 2011). Da für die Akutabwehr die PMNs die maßgebliche Rolle spielen, wurden ausschließlich diese näher analysiert.



Das Wachstum der Kolonien geht von der Marginalzone aus und setzt sich in Richtung der weißen Pulpa fort. Da die bakteriellen Mikrokolonien dicht gedrängt konzentrisch zu wachsen scheinen und im Zentrum keine Anfärbung von *Y. enterocolitica* möglich ist, ist davon auszugehen, dass hier keine intakten Bakterien mehr vorhanden sind.

Die Mikrokolonien sind wolkenartig umgeben von einer Vielzahl rekrutierter PMN, die die Bakterienaggregate auch infiltrieren (nachfolgend auch Mikrokolonie-Abszess-Formation (MKAF) genannt). Vermutlich befinden sich im Zentrum der Mikrokolonien abgestorbene Zellen und Zellfragmente sowie bakterio- und proteolytische freigesetzte Substanzen der PMN, die eine spezifische Immunfärbung verhindern.

Trotz der frühzeitigen Rekrutierung von PMN scheinen diese nicht in der Lage zu sein, bereits kleine Bakterienansammlungen vollständig zu beseitigen. Eine unterstützende antibakterielle Therapie erscheint deshalb insb. bei immunkompromittierten Personen bereits in der Frühphase der Infektion sinnvoll.

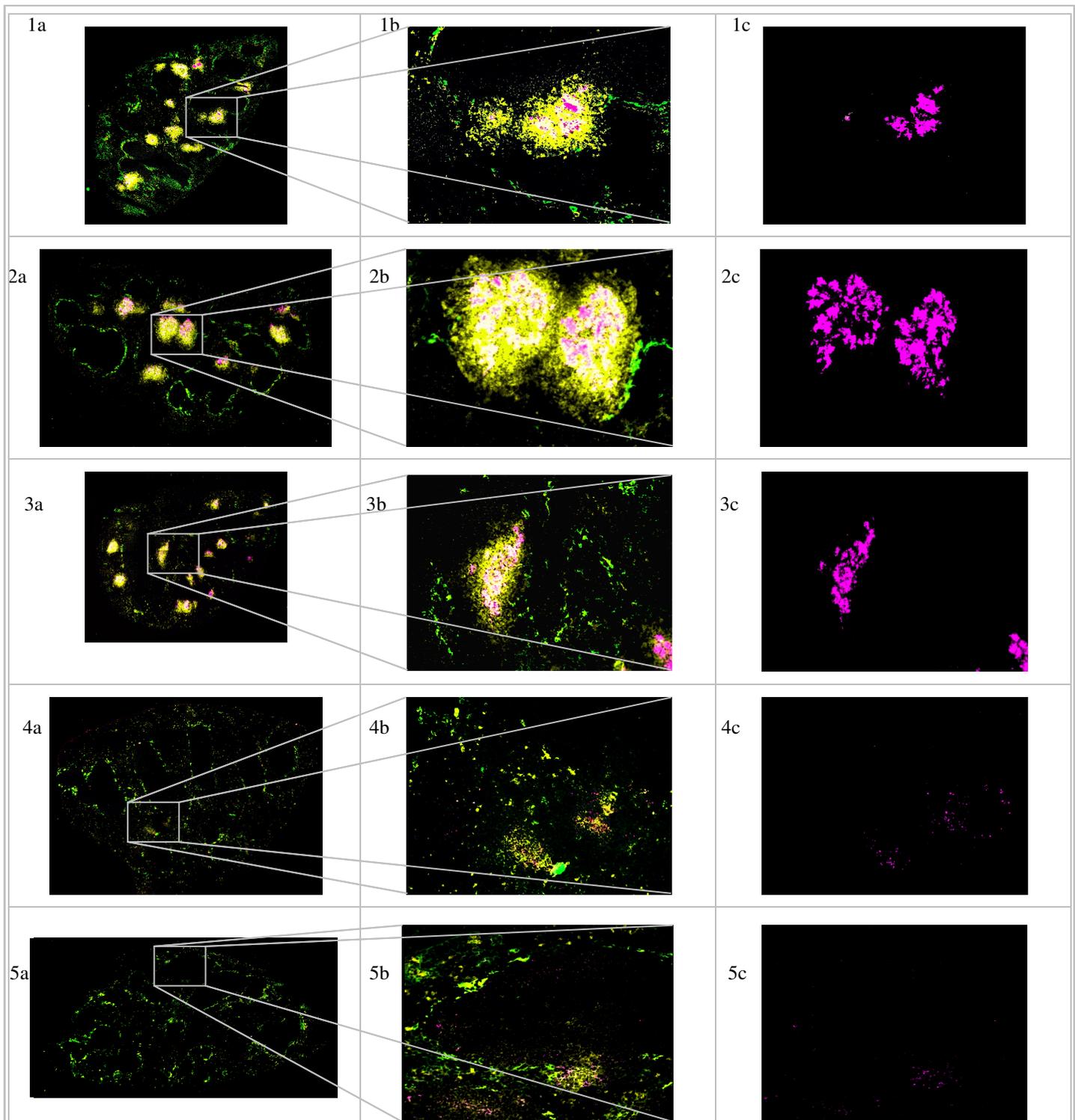
### **3.3.5.3. Immunfluoreszenzmikroskopische Untersuchung von Kryomikrotomschnitten infizierter Milzen nach Antibiotikatherapie**

Nachfolgend wurden Milzen von C57Bl/6-Mäusen, die zuvor mit ca.  $2 \times 10^6$  KBE von *Y. enterocolitica* JB580v i.p.-infiziert wurden und nach 27 h und 39 h p.i. eine i.v.-Antibiotikagabe erhalten hatten, untersucht. Hierbei wurde die Wirkung von Ampicillin und Meropenem als bakterizid-bakteriolytische Wirkstoffe auf histopathologische Veränderungen der infizierten Milz getestet. Als bakterizides – aber nicht bakteriolytisches – Antibiotikum wurde Gentamicin und als bakteriostatisches Antibiotikum Doxyzyklin verwendet. Als Vergleichskontrollen wurden Milzen von Mäusen genommen, die mit derselben Infektionsdosis des gleichen Bakterienstamms infiziert wurden, jedoch keine antibakterielle Therapie erhielten, sodass die bakterielle Besiedelung hier ungehindert voranschreiten konnte (s. a. Abb. 30, 1. Reihe a-c).

Bei den mit Ampicillin behandelten Milzen zeigten sich mehrere große, locker gepackte MKAF über die Milz verteilt. Im Zentrum der bakteriellen MKAF konnte kein *Y. enterocolitica*-Antigen nachgewiesen werden. Umgeben waren die MKAF wolkenartig von PMNs (s. a. Abb. 30, 2. Reihe a-c).

Trotz der zweimaligen i.v.-Gabe von Ampicillin scheint die Mikrokoloniebildung in ähnlichem Umfang fortzuschreiten wie in den Milzen ohne Antibiotikabehandlung (s. a. Abb. 30, 1. Reihe, a-c). Auch bei der Rekrutierung von Granulozyten zeigt sich ein ähnliches Bild. Eine Behandlung mit Ampicillin bewirkt keine erkennbare Veränderung in der Granulozytenrekrutierung.

Somit scheint die zweimalige Ampicillingabe keinen signifikanten Einfluss auf die Fitness von *Y. enterocolitica* JB580v, die PMN-Rekrutierung und das Ausbilden der MKAF in der Milz zu haben.



**Abb. 30: Immunfluoreszenzmikroskopische Darstellung von Kryomikrotomschnitten infizierter Milzen nach Antibiotikagabe**

Nach einer Inkubationszeit von 27 h wurden die mit ca.  $2 \times 10^6$  KBE von JB580v i.p. infizierten C57Bl/6 Mäuse nach dem üblichen Schema zweimalig im Abstand von 12 h mit verschiedenen Antibiotika i.v. behandelt. Nach weiteren 12 h wurden die Milzen entnommen (Infektionsende: 51 h), in flüssigem Stickstoff schockgefroren, geschnitten und gefärbt (trichrome Färbungen, s. a. Kapitel 2.12.4). Die MZ-Makrophagen sind grün, Yersinia-Bestandteile rosa und die PMN gelb eingefärbt (Falschfärbung).

In der **linken Spalte (a)** sind repräsentative Übersichten der jeweiligen Milz dargestellt (Vergrößerung 100x). In der **Mitte (b)** wurde exemplarisch eine Mikrokolonie herausvergrößert. **Ganz rechts (c)** kommen die eingefärbten Yersinien (Anti-Yersinia-Serum) aus der mittleren Abbildung monochrom zur Darstellung. Verwendet wurden die in Kapitel 2.8 genannten Antikörper.

1. Reihe: Kontrollgruppe, nicht antibiotisch behandelte Milz (zweimalige Gabe von isotoner Kochsalzlösung (NaCl 0,9%))  
2. Reihe: Zweimalige Gabe von 5,5 mg Ampicillin  
3. Reihe: Zweimalige Gabe von 2,2 mg Meropenem  
4. Reihe: Zweimalige Gabe von 0,44 mg Gentamicin  
5. Reihe: Zweimalige Gabe von 0,55 mg Doxzyklin

## Ergebnisse

Vergleicht man diese mit den Milzen der Mäuse, die mit Meropenem behandelt worden sind (Meropenem ist stabil gegenüber der  $\beta$ -Laktamasen BlaA und AmpC), zeigt sich kein merklicher Unterschied. Auch hier sind große Mikrokolonien mit massiven Granulozyteninfiltrationen zu sehen, die durch die i.v.-Antibiotikagabe nicht an der Ausbreitung gehindert worden sind (s. a. Abb. 30, 3. Reihe a-c). Genau wie Ampicillin hat auch Meropenem in vivo nach zweimaliger hoch dosierter i.v.-Gabe keinen ersichtlichen Einfluss auf die Mikrokoloniebildung und die PMN-Rekrutierung.

Ganz anders sieht es nach der zweimaligen i.v.-Gabe von Gentamicin aus (s. a. Abb. 30, 4. Reihe a-c). Hier lassen sich nur einige wenige Yersinien in PMN-infiltrierten Regionen nachweisen. Typische *Yersinia*-MKAF können hier nicht gefunden werden. Die Ausbreitung der Bakterien scheint nach der Gabe von Gentamicin nicht vorangeschritten zu sein (s. a. Abb. 30, 4. Reihe a-c im Vergleich zu Abb. 29 (Status 27 h p.i.)). Die Anzahl der rekrutierten Granulozyten ist zu Versuchsende deutlich geringer als in der Kontrollgruppe (keine Antibiotikagabe) und mit der zum Zeitpunkt der ersten Gentamicingabe vergleichbar.

Auch in den mit dem bakteriostatischen Antibiotikum Doxyzyklin behandelten Milzen sind die *Y. enterocolitica*-Mikrokolonien deutlich kleiner (s. a. Abb. 30, 4. Reihe a-c) als in der Kontrollgruppe. Große MKAF lassen sich hier nicht finden. Es zeigen sich einzelne Bakterien im Bereich der Marginalzone, die von einer geringeren Dichte von Granulozyten als in der Kontrollgruppe umgeben werden.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die zweimalige i.v.-Gabe von den  $\beta$ -Laktam-Antibiotika Ampicillin und Meropenem keine Veränderung der Ausbildung von MKAF von *Y. enterocolitica* in der Milz bewirken. Bereits zu Beginn der Milzbesiedelung, wo sich lediglich einzelne Yersinien im Bereich der Marginalzone aufhalten, kommt es am Infektionsherd zu einer Rekrutierung von Granulozyten. Trotz der PMN-Rekrutierung vergrößern sich die Mikrokolonien. Ungeachtet der Antibiotikagabe wachsen die Bakterienhaufen weiter in Richtung der weißen Pulpa. Behandelt man die Mäuse aber mit Gentamicin oder Doxyzyklin, wird die Ausbreitung der Bakterien bereits zu Beginn der Besiedelung gestoppt. Die Granulozytenrekrutierung fällt deutlich geringer aus, die Mikrokoloniebildung wird gestört bzw. die Mikrokolonien werden offensichtlich von den PMN eliminiert.

### 3.4. Untersuchungen zur Rolle der Acr-Effluxpumpe im Bezug auf die Antibiotikaresistenz

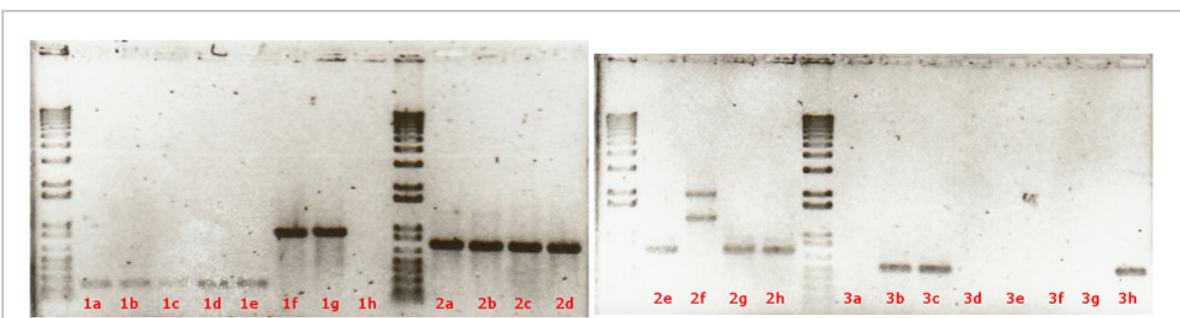
#### 3.4.1. Herstellung der chromosomalen *acrB*-Deletionsmutanten

Um den Beitrag des Effluxsystems AcrAB-TolC für Antibiotikaresistenz, Wachstum und Mausvirulenz bei *Y. enterocolitica* abzuschätzen und zu charakterisieren, wurde das Gen für die Effluxpumpenkomponente AcrB im Stamm JB580v sowie in der Doppeldeletionsmutante JB580v  $\Delta ampC / \Delta blaA$  deletiert. Die Herstellung der chromosomalen Deletionsmutanten erfolgte nach dem in Kapitel 2.10.11 beschriebenen Vorgehen. Die Mutanten wurden im Anschluss mittels PCR (s. a. Abb. 31) und Sequenzierung auf ihre Korrektheit und Vollständigkeit überprüft.

Die zu erwartende Bande (PCR-Produkt) innerhalb des *acrB*-Gens (1) zeigte sich lediglich bei WA-c (1f) und JB580v (1g). Bei den übrigen getesteten Stämmen war durch die Deletion von *acrB* der nachzuweisende Genabschnitt nicht mehr vorhanden bzw. nachweisbar.

Eine längenkorrekte Bande nach PCR auf einen Genabschnitt innerhalb von *virF* (2) (Kontroll-PCR für pYV-Nachweis) konnte bei allen getesteten Stämmen bis auf den pYV-negativen Stamm WA-c (2f) nachgewiesen werden.

Vor der Weiterverwendung der hergestellten Deletionsmutanten JB580v  $\Delta acrB$  (a) und JB580v  $\Delta ampC / \Delta blaA / \Delta acrB$  (d) wurde der Verbleib des pKD46-Expressionsplasmids mittels PCR innerhalb von *bet* ausgeschlossen (3) (Kontroll-PCR für Elimination des Rekombinaseplasmids pKD46).



**Abb. 31: PCR-Kontrolle der *acrB*-Deletionsmutanten**

Darstellung der PCR-Produkte (1-3) von acht verschiedenen Stämmen (a-h) im 5 % Agarosegel nach elektrophoretischer Auftrennung und Propidium-Jodid-Färbung, getrennt durch den DNA-Längenmarker.

Hierbei waren die drei PCR-Produkte (1-3): (1) PCR innerhalb des Gens von *acrB* (*acrB*-Nachweis), (2) PCR innerhalb des Gens von *virF* (pYV-Nachweis) und (3) PCR innerhalb von *bet* (pKD46-Plasmid-Nachweis).

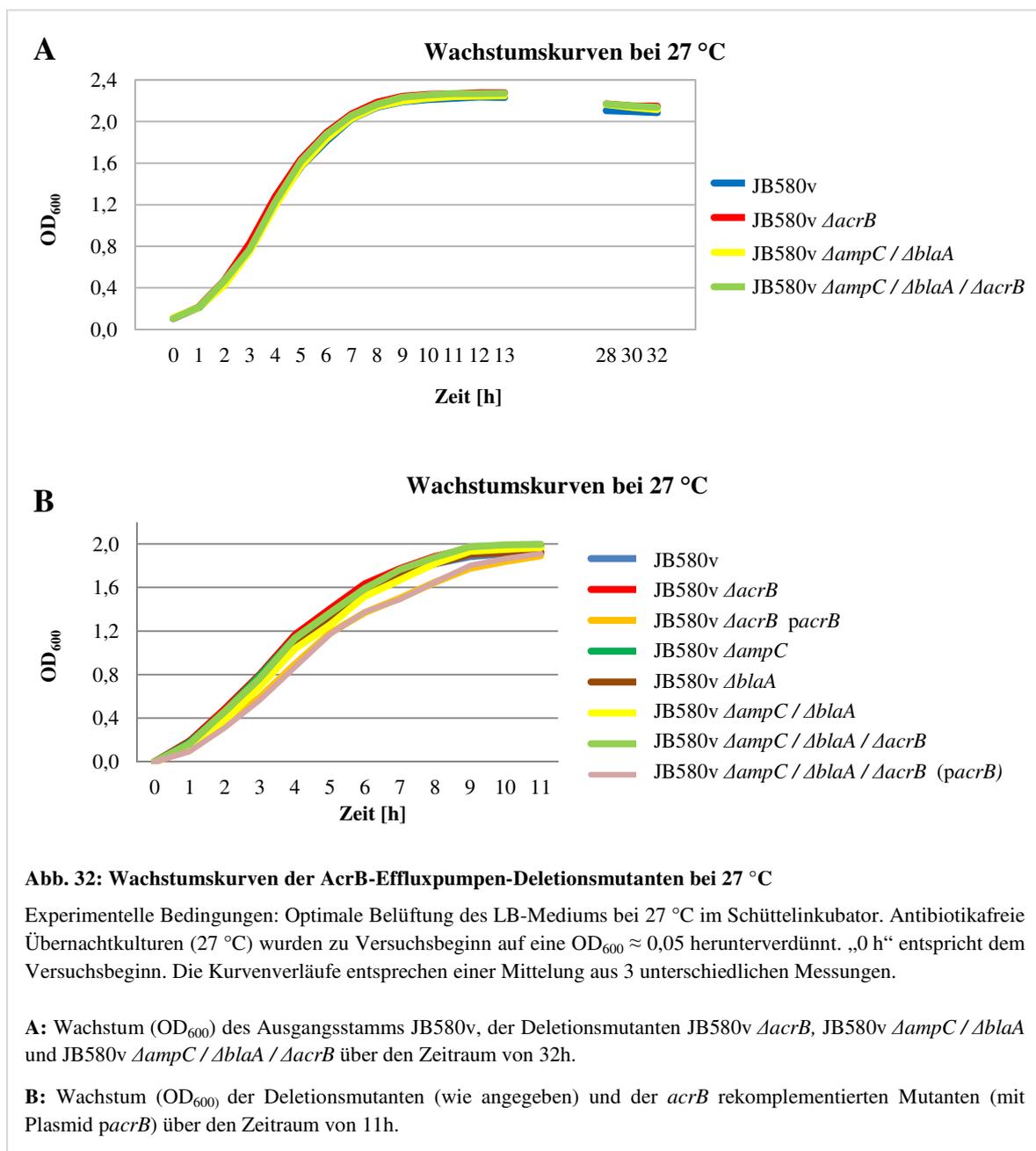
Die getesteten Stämme waren:

- (a) JB580v  $\Delta acrB - acrB^-$ , pYV<sup>+</sup>, pKD46<sup>-</sup>
- (b) JB580v  $\Delta acrB - acrB^-$ , pYV<sup>+</sup>, pKD46<sup>+</sup> - Klon 1
- (c) JB580v  $\Delta acrB - acrB^-$ , pYV<sup>+</sup>, pKD46<sup>+</sup> - Klon 2
- (d) JB580v  $\Delta ampC / \Delta blaA / \Delta acrB - acrB^-$ , pYV<sup>+</sup>, pKD46<sup>-</sup> - Klon 1
- (e) JB580v  $\Delta ampC / \Delta blaA / \Delta acrB - acrB^-$ , pYV<sup>+</sup>, pKD46<sup>-</sup> - Klon 2
- (f) WA-c, pYV<sup>-</sup>
- (g) JB580v, pYV<sup>+</sup>
- (h) JB580v  $\Delta ampC / \Delta blaA / \Delta acrB - acrB^-$ , pYV<sup>+</sup>, pKD46<sup>+</sup>

### 3.4.2. Wachstumsverhalten in vitro

Um festzustellen, ob durch die genetischen Manipulationen signifikante Änderungen im Wachstumsverhalten auftreten, wurde dieses anhand von Wachstumskurven für den Ausgangsstamm und die *acrB*-Deletionsmutanten bei optimalen Bedingungen im LB-Flüssigmedium untersucht.

Betrachtet man zunächst die aus drei unabhängigen Messungen errechnete Wachstumskurve des Ausgangsstamms JB580v bei 27 °C (s. Abb. 32 A), zeigt sich der bereits in Kapitel 3.2.1 beschriebene typische S-förmige Verlauf mit dem Erreichen der Plateauphase nach ca. 12 h. Über die folgenden Stunden der stationären Phase nimmt die gemessene OD<sub>600</sub> im Rahmen der eintretenden Absterbephase langsam ab (dargestellt bis 32 h).

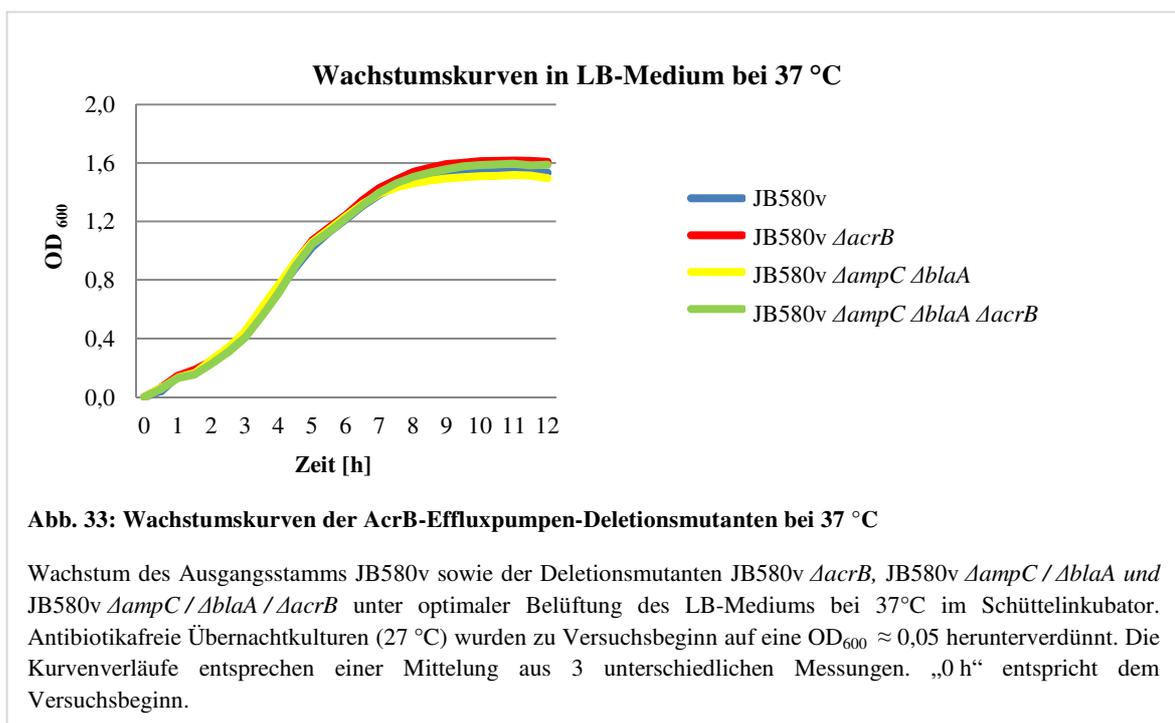


Auch die bereits in Kapitel 3.2.1 beschriebene Wachstumskurve der  $\beta$ -Laktamase-Doppeldeletionsmutante JB580v  $\Delta ampC / \Delta blaA$  zeigt einen deckungsgleichen Verlauf zum Ausgangsstamm, sodass hier bestätigt werden kann, dass die Deletion beider  $\beta$ -Laktamasen keinen Einfluss auf das Wachstumsverhalten bei 27 °C in Flüssigkultur unter optimalen Bedingungen hat.

Beim Vergleich der Wachstumskurven der Effluxpumpen-Deletionsmutanten JB580v  $\Delta acrB$  und JB580v  $\Delta ampC / \Delta blaA / \Delta acrB$  zeigt sich, dass auch deren Kurvenverläufe deckungsgleich zum Ausgangsstamm verlaufen. Auch hier kann anhand der gemessenen optischen Dichte von einem ungestörten exponentiellen Wachstum ausgegangen werden. Die Plateauphase (stationäre Phase) wird ca. 12 h nach Wachstumsbeginn erreicht und die gemessene optische Dichte nimmt während der Absterbephase langsam ab.

Es fällt auf, dass das Wachstum beider Effluxpumpen-Komplementationsmutanten, sowohl von JB580v  $\Delta acrB pacrB$  als auch von JB580v  $\Delta ampC / \Delta blaA / \Delta acrB pacrB$ , im Vergleich zu den anderen Yersinienstämmen etwas verzögert ist (s. Abb. 32 B). Beide Komplementationsmutanten erreichen zwar die gleiche optische Dichte wie die anderen Stämme, jedoch zeitversetzt, sodass der weitere Kurvenverlauf versuchsbedingt nicht mehr abgebildet wird. Das zeitverzögerte Wachstum kann durch das in mehrfacher Kopienzahl vorliegende zusätzliche Expressionsplasmid, das das deletierte Gen *acrB* trägt, erklärt werden: Das Plasmid muss im Rahmen der Zellteilung vervielfältigt und weitervererbt werden. Der hierdurch vermehrte Energiebedarf („metabolische Last“) verlangsamt das Bakterienwachstum.

Die in Abb. 33 dargestellten Wachstumskurven von JB580v sowie der  $\beta$ -Laktamase-Doppeldeletionsmutante JB580v  $\Delta ampC / \Delta blaA$  zeigen bei 37 °C den erwarteten sigmoiden Verlauf mit dem Erreichen der Plateauphase bei einer  $OD_{600}$  von ca. 1,5 nach ca. 10 h (s. a. Kapitel 3.2.1).



Auch die Wachstumskurven der untersuchten Effluxpumpen-Deletionsmutanten JB580v  $\Delta acrB$  und JB580v  $\Delta ampC / \Delta blaA / \Delta acrB$  verlaufen zunächst kongruent mit ihren Elternstämmen. Während diese aber ihre Vermehrungsrate ( $OD_{600}$ ) nach 8 h deutlich verlangsamen, tritt dieser Effekt bei beiden Effluxpumpen-Deletionsmutanten erst etwas später ein, weshalb ihre  $OD_{600}$  beim zeitgleichen Erreichen der Plateauphase mit  $\Delta OD_{600} = +0,1$  im Vergleich zu den Ausgangsstämmen etwas höher liegt.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass die Deletion der  $\beta$ -Laktamasen keinen signifikanten Einfluss auf das Wachstumsverhalten von JB580v unter den verwendeten Testbedingungen bei 27 °C (Wachstumsoptimum) und 37 °C hat. Des Weiteren bewirkt auch die Deletion von  $acrB$  keine signifikante Abweichung im exponentiellen Wachstum unter oben genannten Bedingungen. Lediglich die  $OD_{600}$  der Plateauphase ist bei 37 °C etwas höher als beim Ausgangsstamm, wird aber zur gleichen Zeit erreicht.

Die Anwesenheit des  $acrB$ -Komplementationsplasmids führte unter diesen Bedingungen zu einer Reduktion in der Wachstumsgeschwindigkeit, so dass diese Stämme nach 11 h Wachstum noch nicht die stationäre Phase erreicht hatten.

Bei gleichen Kurvenverläufen und somit ähnlichen Wachstumsgeschwindigkeiten der weiter zu untersuchenden Bakterienstämme wurde – wenn nicht anders erwähnt – die Schüttelinkubation bei 37 °C im LB-Medium als Wachstumsbedingung für die darauf folgenden Resistenztestungen im Flüssigmedium gewählt. Um mögliche Sensitivitätsunterschiede zwischen planktonisch und biofilmartig wachsenden Yersinien zu erkennen, erfolgte auch hier zusätzlich die Resistenzbestimmung auf Nährböden (Mah and O'Toole 2001).

### 3.4.3. Bestimmung der In-vitro-Antibiotikasensitivität bei $acrB$ -Deletion

#### 3.4.3.1. Antibiotikaplättchen-Diffusionstest („Hemmhoftest“)

Zur Beurteilung des Einflusses der Effluxpumpe AcrB im Bezug auf die Antibiotikasensitivität beim biofilmartigen Wachstum in vitro wurden der Ausgangsstamm JB580v, der  $\beta$ -Laktamase-negative Stamm JB580v  $\Delta ampC / \Delta blaA$  sowie die jeweils davon abstammenden Effluxpumpen-Deletionsmutanten JB580v  $\Delta acrB$  und JB580v  $\Delta ampC / \Delta blaA / \Delta acrB$  zur ersten Näherung zunächst – wie in Kapitel 2.9.10.1 beschrieben – auf Nährböden mit antibiotikahaltigen Plättchen für 16-20 h inkubiert und der jeweilige Hemmhofdurchmesser (HHDM) in Millimetern abgelesen. In Tabelle 29 sind die Ergebnisse hierzu aufgeführt.

Vergleicht man die durchschnittlichen HHDM vom Ausgangsstamm mit denen der  $\beta$ -Laktamase-Doppeldelentionsmutante, zeigt sich ein deutlicher Unterschied bei Ampicillin (14 mm vs. 34 mm) und Amoxicillin (8 mm vs. 32 mm). Wie in Kapitel 3.2.2 beschrieben ist, bewirkt die Deletion beider  $\beta$ -Laktamasen eine erhöhte Sensitivität gegenüber diesen Substanzen, was sich in einer vom antibiotikumhaltigen Plättchen ausgehenden weiter reichenden Wachstumshemmung auf MH-Nährböden zeigt. Bei den übrigen Testplättchen mit Cefotaxim (42 mm vs. 41 mm), Imipenem (35 mm vs. 35 mm) und Meropenem (40 mm vs. 39 mm) zeigen sich keine größeren Differenzen im HHDM.

Diese Messungen bestärken die bereits ermittelten MHK-Werte beider Stämme, die keinen signifikanten Resistenzunterschied zwischen  $\beta$ -Laktamase-positiven und -negativen Stämmen für diese Substanzen *in vitro* belegen (s. a. Kapitel 3.2.2).

Stellt man die HHDM des Ausgangsstamms JB580v denen der Effluxpumpen-Deletionsmutante JB580v  $\Delta$ *acrB* gegenüber, zeigt sich bei keinem der getesteten  $\beta$ -Laktam-Antibiotika ein signifikanter Unterschied im HHDM. Auch JB580v  $\Delta$ *ampC* /  $\Delta$ *blaA* und die dazu gehörige Effluxpumpen-Deletionsmutante JB580v  $\Delta$ *ampC* /  $\Delta$ *blaA* /  $\Delta$ *acrB* weisen einen ähnlichen HHDM auf, weshalb ein signifikanter Unterschied bei der Resistenz *in vitro* eher nicht zu erwarten ist.

Ein Vergleich des HHDM vom JB580v mit dem der Effluxpumpen-Deletionsmutante JB580v  $\Delta$ *acrB* für Chloramphenicol zeigt einen deutlichen Unterschied mit 26 mm vs. 37 mm. Auch bei Ciprofloxacin (33 mm vs. 40 mm), Nalidixinsäure (0 mm vs. 12 mm), Novobiocin (0 mm vs. 15 mm), Tetrazyklin (25 mm vs. 30 mm) und Doxyzyklin (25 mm vs. 32 mm) ist der HHDM der Effluxpumpen-Deletionsmutante deutlich größer als beim Ausgangsstamm (s. a. Tabelle 29). Eine erhöhte Empfindlichkeit von JB580v gegenüber diesen Substanzen ist nach Deletion von *acrB* wahrscheinlich. Nachfolgende Testungen beschränken sich aber auf einige in der Humanmedizin gebräuchlichen Substanzen.

**Tabelle 29: Bestimmung des Hemmhofdurchmessers der *acrB*-Deletionsmutanten**

Stamm Ø in [mm] Antibiotikum	JB580v	JB580v $\Delta$ <i>acrB</i>	JB580v $\Delta$ <i>ampC</i> / $\Delta$ <i>blaA</i>	JB580v $\Delta$ <i>ampC</i> / $\Delta$ <i>blaA</i> / $\Delta$ <i>acrB</i>
Amoxicillin	8	8	32	34
Ampicillin	14	14	34	38
Cefotaxim	42	41	41	41
Chloramphenicol	26	37	nb	nb
Ciprofloxacin	33	40	34	41
Doxyzyklin	25	32	24	32
Gentamicin	19	19	18	19
Imipenem	35	35	35	35
Meropenem	40	40	39	40
Nalidixinsäure	0	12	0	12
Novobiocin	0	15	0	15
Tetrazyklin	25	30	25	31

Auflistung der gemessenen Hemmhofdurchmesser (HHDM) verschiedener Antibiotika in [mm]. Die Präparation der Nährböden erfolgte nach den Empfehlungen der EUCAST (EUCAST 2010). Getestet wurden der Ausgangsstamm JB580v, die  $\beta$ -Laktamase-Doppeldeletionsmutante JB580v  $\Delta$ *ampC* /  $\Delta$ *blaA* sowie die davon abstammenden Effluxpumpen-Deletionsmutanten JB580v  $\Delta$ *acrB* und JB580v  $\Delta$ *ampC* /  $\Delta$ *blaA* /  $\Delta$ *acrB*. Die Hemmhöfe wurden nach 16-20 h Inkubation bei 37 °C auf Mueller-Hinton-Nährböden abgelesen (Agardiffusionstest).

„nb“ = nicht bestimmt

### 3.4.3.2. MHK-Bestimmung der *acrB*-Deletionsmutanten mittels Agardiffusionstest („E-Teststreifen“)

Um den Einfluss der Effluxpumpe AcrB auf die Antibiotikaresistenz gegenüber verschiedenen in der Klinik häufig verwendeten Substanzen bei biofilmartigen Wachstum genauer zu charakterisieren, folgte die Bestimmung der MHK mit E-Teststreifen auf MH-Nährböden. Getestet wurden der Ausgangsstamm JB580v, die in dieser Arbeit hergestellten  $\beta$ -Laktamase-Doppeldeletionsmutante JB580v  $\Delta ampC / \Delta blaA$  sowie die jeweils davon abstammenden Effluxpumpen-Deletionsmutanten JB580v  $\Delta acrB$  und JB580v  $\Delta ampC / \Delta blaA / \Delta acrB$  (s. Tabelle 30).

Vergleicht man die Sensitivität der Bakterienstämme gegenüber Ampicillin, zeigt sich, dass für JB580v und JB580v  $\Delta acrB$  mit 4  $\mu\text{g/ml}$  sich gleiche  $MHK_{Amp}$  ergeben. In Anwesenheit der  $\beta$ -Laktamasen hat die alleinige Deletion der Effluxpumpe keinen signifikanten Effekt auf die Resistenz. Im Vergleich zum Ausgangsstamm zeigt die  $\beta$ -Laktamase-Doppeldeletionsmutante mit 0,190  $\mu\text{g/ml}$  eine weit höhere Empfindlichkeit gegenüber Ampicillin. Durch die zusätzliche Deletion von *acrB* verringert sich die gemessene  $MHK_{Amp}$  allenfalls nur geringfügig auf 0,125  $\mu\text{g/ml}$ , wobei dies auch im Rahmen der Messgenauigkeit gewertet werden kann. Eine signifikante Änderung der

**Tabelle 30: MHK-Bestimmung der *acrB*-Deletionsmutanten (E-Teststreifen)**

Stamm [ $\mu\text{g/ml}$ ] Antibiotikum	JB580v	JB580v $\Delta acrB$	JB580v $\Delta ampC / \Delta blaA$	JB580v $\Delta ampC / \Delta blaA / \Delta acrB$
Ampicillin	4,0	4,0	0,190	0,125
Cefotaxim	0,32	0,23	0,23	0,23
Cefoxitin	3,0	3,0	3,0	3,0
Ciprofloxacin	0,375	0,030	0,375	0,030
Cefuroxim	2,0	0,75	1,5	0,125
Doxyzyklin	1,0	0,125	1,0	0,250
Gentamicin	0,250	0,190	0,250	0,250
Imipenem	0,19	0,19	0,19	0,19
Meropenem	0,012	0,012	0,012	0,012
Penicillin G	> 32	> 32	1,5	1,0
Piperacillin	0,750	0,380	0,125	0,064

Auflistung der gemessenen MHK verschiedener Antibiotika. Die Präparation der Nährböden erfolgte entsprechend den Empfehlungen der EUCAST (EUCAST 2010). Getestet wurden der Ausgangsstamm JB580v, die  $\beta$ -Laktamase-Doppeldeletionsmutante JB580v  $\Delta ampC / \Delta blaA$  sowie die davon abstammenden Effluxpumpen-Deletionsmutanten JB580v  $\Delta acrB$  und JB580v  $\Delta ampC / \Delta blaA / \Delta acrB$ . Abgelesen wurde die MHK von E-Teststreifen nach 16-20 h Inkubation bei 37 °C auf Mueller-Hinton-Nährböden entsprechend den Empfehlungen des Herstellers (s. a. Kapitel 2.9.10.2). Die MHK wird angegeben in [ $\mu\text{g/ml}$ ].

MHK<sub>Amp</sub> bewirkt die Deletion von *acrB* unter diesen Testbedingungen nicht.

Ein ähnliches Bild ergibt sich für Penicillin G: Während der Ausgangsstamm und die einfache Effluxpumpen-Deletionsmutante eine MHK<sub>PenG</sub> > 32 µg/ml haben, liegt die MHK<sub>PenG</sub> für JB580v  $\Delta ampC / \Delta blaA$  bei 1,5 µg/ml. Durch die Deletion beider  $\beta$ -Laktamasen ist der Stamm deutlich empfindlicher gegenüber Penicillin G. Durch die zusätzliche Deletion von *acrB* wird der Wert um weniger als den Faktor 0,5 auf lediglich auf 1,0 µg/ml gesenkt. Eine signifikante Wertänderung ist auch hier nicht zu erkennen.

Bei Piperacillin führt – wie bereits gezeigt – die Deletion der  $\beta$ -Laktamasen zu einer deutlichen Reduktion der MHK<sub>Pip</sub> (von 0,750 µg/ml auf 0,125 µg/ml). Die *acrB*-negativen Mutanten zeigen hierbei nur eine geringe, nicht signifikante Veränderung in ihrer MHK<sub>Pip</sub> (JB580v  $\Delta acrB$ : 0,380 µg/ml; JB580v  $\Delta ampC / \Delta blaA / \Delta acrB$ : 0,064 µg/ml). Die Effluxpumpe AcrB scheint keinen signifikanten Anteil zur Resistenz gegenüber den getesteten Penicillinen zu leisten.

Bei der Resistenztestung des Cephalosporins Cefotaxim wurde für JB580v eine MHK<sub>Ctx</sub> von 0,32 µg/ml bestimmt. JB580v  $\Delta acrB$ , JB580v  $\Delta ampC / \Delta blaA$  und JB580v  $\Delta ampC / \Delta blaA / \Delta acrB$  zeigten mit jeweils 0,23 µg/ml eine ähnliche MHK<sub>Ctx</sub>. Dies gilt auch für Cefoxitin: Hier lag der Wert bei allen vier Stämmen bei 3,0 µg/ml.

Bei Cefuroxim (Cfx) zeigte sich jedoch eine Abweichung. Lag die MHK<sub>Cfx</sub> beim Ausgangsstamm JB580v bei 2 µg/ml, war sie bei JB580v  $\Delta acrB$  nur noch bei 0,75 µg/ml. Durch die Deletion beider  $\beta$ -Laktamasen zeigte sich mit 1,5 µg/ml Cefuroxim keine signifikante Änderung der MHK<sub>Cfx</sub>. Die zusätzliche Deletion von *acrB* führte bei JB580v  $\Delta ampC / \Delta blaA / \Delta acrB$  zu einer weiteren Abnahme der MHK<sub>Cfx</sub> auf 0,125 µg/ml.

Weiterhin konnte festgestellt werden, dass die Deletion von *acrB* weder beim Ausgangsstamm noch bei der  $\beta$ -Laktamase-negativen Mutante zu einer Änderung der MHK von Imipenem und Meropenem führte. Diese lag bei Imipenem für alle vier Stämme bei 0,19 µg/ml, bei Meropenem sogar nur 0,012 µg/ml.

Gegenüber Gentamicin zeigen die vier getesteten Stämme mit 0,19 – 0,25 µg/ml ähnliche MHK<sub>Cn</sub>-Werte. Die Effluxpumpe scheint an der Resistenzausbildung nicht beteiligt zu sein. Für Ciprofloxacin konnte das Ergebnis des Plättchen-Diffusionstests bestätigt werden: Zeigten JB580v und JB580v  $\Delta ampC / \Delta blaA$  mit 0,375 µg/ml die gleiche MHK<sub>Cip</sub>, war diese bei den Effluxpumpen-Deletionsmutanten mit 0,030 µg/ml deutlich geringer. Auch für das Antibiotikum Doxyzyklin führte die Deletion von *acrB* zu einer Reduktion der MHK<sub>Do</sub> von 1,0 µg/ml (JB580v und JB580v  $\Delta ampC / \Delta blaA$ ) auf 0,125 µg/ml (JB580v  $\Delta acrB$ ) bzw. 0,250 µg/ml (JB580v  $\Delta ampC / \Delta blaA / \Delta acrB$ ).

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die Effluxpumpe AcrB bei den getesteten  $\beta$ -Laktam-Antibiotika bezüglich der Resistenz auf dem Nähragar allenfalls eine untergeordnete Rolle spielt. Eine klinisch bedeutsame Veränderung der MHK konnte bei Cefuroxim festgestellt werden. Bei den getesteten Nicht- $\beta$ -Laktam-Antibiotika konnte durch die Deletion von *acrB* eine signifikante Reduktion der MHK für Doxyzyklin und Ciprofloxacin nachgewiesen werden. Des Weiteren wird JB580v nach Deletion von *acrB* empfindlicher für Novobiocin und Nalidixinsäure. Die erhöhte Sensitivität gegenüber Novobiocin erschwert die Anzucht der Acr-Effluxpumpen-Mutanten auf CIN-Nährböden.

### 3.4.3.3. MHK-Bestimmung der *acrB*-Deletionsmutanten im Flüssigmedium („Mikrodilutionsverfahren“)

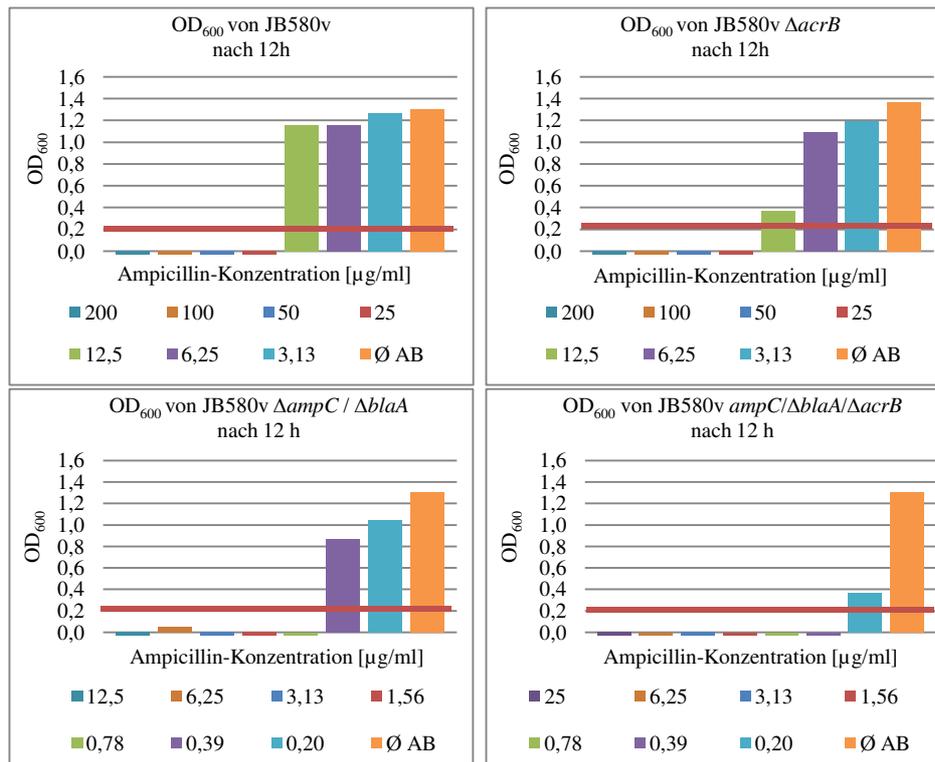
Nachfolgend wurde untersucht, ob die Deletion von *acrB* einen Einfluss auf die MHK verschiedener Antibiotika beim planktonisch wachsenden JB580v hat. Hierzu wurden – wie in Kapitel 2.9.10.3 beschrieben – frische Bakterienkulturen der Stämme JB580v und JB580v  $\Delta$ *acrB*, die mit verschiedenen hohen Antibiotikakonzentrationen versetzt waren (geometrische Verdünnungsreihe), bei 37 °C (und z. T. auch bei 27 °C) für 12 h in flüssigem LB-Medium inkubiert und anhand der ermittelten Differenz der optischen Dichte ( $OD_{600}$  (12h) –  $OD_{600}$  (0h)) die minimale Hemmkonzentration bestimmt. Um die Nettowirkung der Effluxpumpe auf die Ausbildung der  $\beta$ -Laktam-Resistenz unabhängig von den chromosomalen  $\beta$ -Laktamasen AmpC und BlaA zu untersuchen, erfolgte zusätzlich die Austestung der  $\beta$ -Laktamase-negativen Stämme JB580v  $\Delta$ *ampC* /  $\Delta$ *blaA* und JB580v  $\Delta$ *ampC* /  $\Delta$ *blaA* /  $\Delta$ *acrB*. Nachfolgend wird exemplarisch die Testung von Ampicillin genauer beschrieben, während die Ergebnisse der anderen Antibiotika in Tabelle 31 übersichtlich dargestellt und zusammengefasst werden. Die ausführlichen Grafiken sind im Anhang (Kapitel 13.1) zu finden.

#### 3.4.3.3.1. MHK-Bestimmung der *acrB*-Deletionsmutanten für Ampicillin im Flüssigmedium

Um die Rolle der Effluxpumpe AcrB im Bezug auf die Empfindlichkeit gegenüber Ampicillin (Amp) im Flüssigmedium genauer zu untersuchen, erfolgte die Bestimmung der  $MHK_{Amp}$  bei den Stämmen JB580v und JB580v  $\Delta$ *ampC* /  $\Delta$ *blaA* sowie den jeweiligen *acrB*-Deletionsmutanten JB580v  $\Delta$ *acrB* und JB580v  $\Delta$ *ampC* /  $\Delta$ *blaA* /  $\Delta$ *acrB* bei 37 °C (s. a. Abb. 34).

Zunächst wurde die Differenz der erreichten  $OD_{600}$  der getesteten Stämme nach 12 h antibiotikafreier Inkubation im LB-Medium miteinander verglichen. Der Ausgangsstamm JB580v erreichte bei der abschließenden Messung eine  $OD_{600} = 1,30$ . Die Deletionsmutanten JB580v  $\Delta$ *acrB*, JB580v  $\Delta$ *ampC* /  $\Delta$ *blaA* und JB580v  $\Delta$ *ampC* /  $\Delta$ *blaA* /  $\Delta$ *acrB* erreichten nach 12 h  $OD_{600}$ -Werte von 1,37, 1,30 bzw. 1,31. Dieses Ergebnis entspricht den bereits vorher durchgeführten Wachstumskurven, die bei den untersuchten Stämmen einen vergleichbaren Verlauf über die Zeit zeigten (s. a. Kapitel 3.4.2).

Die Ergebnisse der Ampicillin-Verdünnungsreihen des Ausgangsstamms JB580v zeigen, dass das Vorhandensein von Ampicillin bis zu einer Konzentration von 12,5  $\mu$ g/ml im Flüssigmedium lediglich zu einer geringfügigen schrittweisen Abnahme der gemessenen optischen Dichte nach 12 h Inkubation führte (1,27 bei 3,13  $\mu$ g/ml; 1,16 bei 6,25  $\mu$ g/ml; 1,16 bei 12,5  $\mu$ g/ml). Erst eine weitere Verdoppelung der Antibiotikakonzentration auf 25  $\mu$ g/ml im Flüssigmedium bewirkte eine vollständige Hemmung des bakteriellen Wachstums. Bei dieser Konzentration kam es zu keinem Anstieg der optischen Dichte über den Beobachtungszeitraum. Die Konzentration von 25  $\mu$ g/ml Ampicillin im



**Abb. 34: Bestimmung der  $MHK_{Amp}$  bei  $acrB$ -Deletion im Flüssigmedium bei 37 °C**

Zur Bestimmung der  $MHK$  von Ampicillin ( $MHK_{Amp}$ ) wurden frisch beimpfte,  $OD_{600}$  angegliche Bakterienkulturen der Stämme JB580v, JB580v  $\Delta acrB$ , JB580v  $\Delta ampC / \Delta blaA$  und JB580v  $\Delta ampC / \Delta blaA / \Delta acrB$  - wie in Kapitel 2.9.10.3 beschrieben - in LB-Medium unter Hinzugabe von unterschiedlichen Antibiotikakonzentrationen (geometrische Verdünnungsreihen) für 12 h bei 37 °C sauerstoffreich schüttelnd inkubiert. Abgebildet ist jeweils die Differenz von der  $OD_{600}$  nach 12 h und zu Beginn des Versuchs. Als Wachstumsnachweis wurde eine Differenz der  $OD_{600} \geq 0,2$  festgesetzt (rote Linie). „Ø AB“ = ohne Antibiotikazusatz

Flüssigmedium ist somit als minimale Hemmkonzentration ( $MHK_{Amp}$ ) für diesen Stamm unter diesen Testbedingungen anzusehen.

Die Deletionsmutante JB580v  $\Delta acrB$  erreicht nach 12 h ohne Antibiotikazugabe eine  $OD_{600}=1,37$ , die der des Ausgangsstammes entspricht (1,30). Auch hier zeigt sich eine schrittweise Reduktion der  $OD_{600}$  bei ansteigenden Ampicillinkonzentrationen (z. B.  $OD_{600}=1,19$  bei 3,13 µg/ml,  $OD_{600}=1,09$  bei 6,25 µg/ml und  $OD_{600}=0,37$  bei 12,5 µg/ml). Erst bei einer Konzentration von 25 µg/ml setzte eine komplette Wachstumsinhibition ein, ein Anstieg über den Grenzwert von  $OD_{600}=0,2$  konnte nicht nachgewiesen werden. Die Deletion von  $acrB$  führte beim  $\beta$ -Laktamase-positiven Stamm JB580v unter diesen Testbedingungen nicht zu einer Veränderung der  $MHK_{Amp}$ .

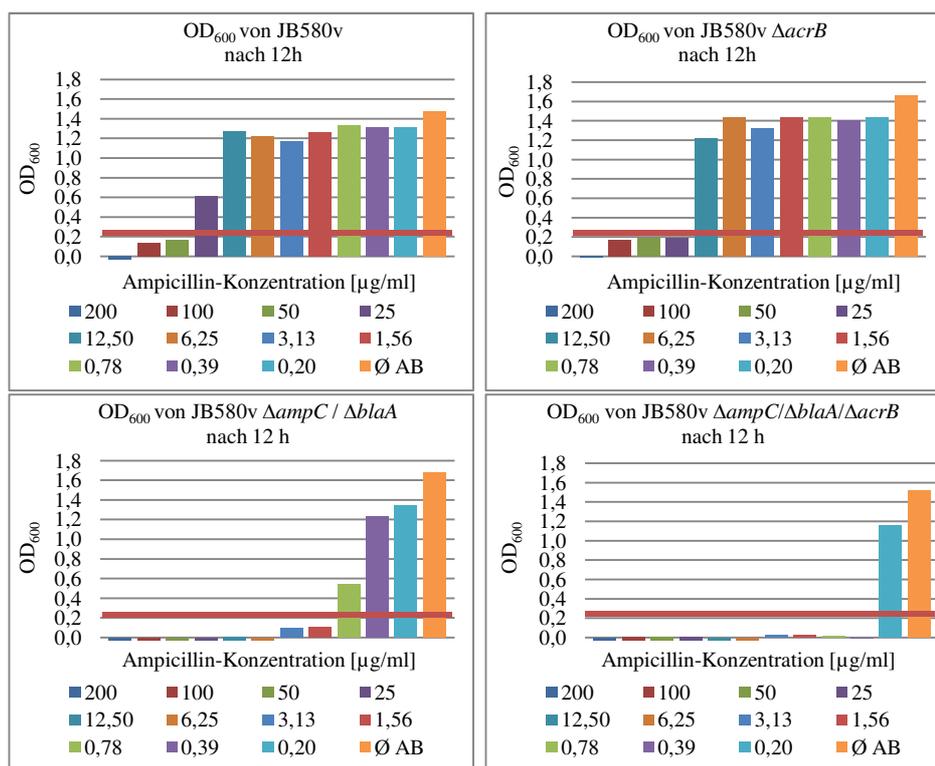
Da es bei einer Konzentration von 12,5 µg/ml Ampicillin zu einer deutlichen Reduktion der gemessenen  $OD_{600}$  im Vergleich zum Elternstamm JB580v kam, erfolgte die Austestung der minimalen Hemmkonzentration bei dem  $\beta$ -Laktamase-negativen Stamm JB580v  $\Delta ampC / \Delta blaA$  und dem  $acrB$ -negativem Tochterstamm JB580v  $\Delta ampC / \Delta blaA / \Delta acrB$ , um die Wirkung der Effluxpumpe im Bezug auf die Resistenz gegenüber Ampicillin in Abwesenheit der  $\beta$ -Laktamasen genauer zu bestimmen.

## Ergebnisse

Die zusätzliche Deletion von *acrB* bewirkte im antibiotikafreien Medium keinen wesentlichen Wachstumsunterschied gegenüber dem Elternstamm JB580v  $\Delta ampC / \Delta blaA$  nach 12 h Inkubation ( $OD_{600}$ : 1,30 vs. 1,31). Durch die schrittweise Erhöhung der Ampicillin-Konzentration konnte bestätigt werden, dass die Deletion beider  $\beta$ -Laktamasen zu einer deutlichen Reduktion der  $MHK_{Amp}$  führt. Die  $MHK_{Amp}$  von JB580v  $\Delta ampC / \Delta blaA$  liegt am Versuchsende bei 0,78  $\mu g/ml$  (s. a. Kapitel 3.2.3).

Die Dreifachdeletionsmutante zeigte bereits bei einer Konzentration von 0,20  $\mu g/ml$  eine deutliche Abnahme in der optischen Dichte (0,37 zu 1,04). Eine vollständige Inhibition des Wachstums wurde bei 0,39  $\mu g/ml$  erreicht. JB580v  $\Delta ampC / \Delta blaA / \Delta acrB$  erscheint damit allenfalls geringfügig sensitiver gegenüber Ampicillin zu sein.

Um zu untersuchen, ob ein Temperaturwechsel von 37 °C auf 27 °C einen Einfluss auf die  $MHK_{Amp}$  hat, wurde der Versuch bei 27 °C wiederholt (s. a. Abb. 35). Nach einer Inkubationszeit von 12 h konnten bei den *Yersinia*-Stämmen bei 27 °C höhere, jedoch untereinander vergleichbare  $OD_{600}$ -Werte gemessen werden (JB580v: 1,48, JB580v  $\Delta acrB$ : 1,66, JB580v  $\Delta ampC / \Delta blaA$ : 1,68 und JB580v  $\Delta ampC / \Delta blaA / \Delta acrB$ : 1,52). Diese Ergebnisse bestätigen, dass eine Deletion des Effluxpumpengens *acrB* nicht



**Abb. 35: Bestimmung der  $MHK_{Amp}$  bei *acrB*-Deletion im Flüssigmedium bei 27 °C**

Zur Bestimmung der  $MHK$  von Ampicillin ( $MHK_{Amp}$ ) wurden frisch beimpfte,  $OD_{600}$  angegliche Bakterienkulturen der Stämme JB580v, JB580v  $\Delta acrB$ , JB580v  $\Delta ampC / \Delta blaA$  und JB580v  $\Delta ampC / \Delta blaA / \Delta acrB$  - wie in Kapitel 2.9.10.3 beschrieben - in LB-Medium unter Hinzugabe unterschiedlicher Antibiotikakonzentrationen (geometrische Verdünnungsreihen) für 12 h bei 27 °C sauerstoffreich schüttelnd inkubiert. Abgebildet ist jeweils die Differenz von der  $OD_{600}$  nach 12 h und zu Beginn des Versuchs. Als Wachstumsnachweis wurde eine Differenz der  $OD_{600} \geq 0,2$  festgesetzt (rote Linie). „ $\emptyset$  AB“ = ohne Antibiotikazusatz

zu einer Änderung des Wachstumsverhaltens von JB580v im LB-Medium bei 27 °C führt.

Das Vorhandensein von Ampicillin bis zu einer Konzentration 12,5 µg/ml im Flüssigmedium bewirkte beim Ausgangsstamm lediglich eine geringe Reduktion der OD<sub>600</sub> bzw. des Wachstums. Mit einer weiteren Erhöhung auf 25 µg/ml Ampicillin nahm die OD<sub>600</sub> weiter ab. Erst ab einer Konzentration von 50 µg/ml wurde das Wachstum vollständig inhibiert. Die MHK<sub>Amp</sub> bei 27 °C lag beim Ausgangsstamm also nur eine Verdünnungsstufe über der bei 37 °C. Bei den Deletionsmutanten JB580v  $\Delta$ *acrB*, JB580v  $\Delta$ *ampC* /  $\Delta$ *blaA* und JB580v  $\Delta$ *ampC* /  $\Delta$ *blaA* /  $\Delta$ *acrB* lagen die ermittelten Werte bei 25 µg/ml, 1,56 µg/ml bzw. 0,39 µg/ml.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass eine Temperaturveränderung von 37 °C auf 27 °C unter diesen Bedingungen zu keiner relevanten Veränderung in der Ampicillinempfindlichkeit führt.

#### 3.4.3.3.2. MHK-Bestimmung der *acrB*-Deletionsmutanten für weitere klinisch relevante Antibiotika im Flüssigmedium

Um die Auswirkung der *acrB*-Deletion im Bezug auf die Antibiotikasensitivität von JB580v bzw. seiner  $\beta$ -Laktamase-negativen Mutante gegenüber weiteren in der Humanmedizin häufig verwendeten Antibiotika im LB-Flüssigmedium zu prüfen, erfolgte die MHK-Testung neben Ampicillin auch für weitere Substanzen (s. a. Tabelle 31). Hierbei konnten weder für Cefotaxim (Ctx) und Meropenem (Mem) noch für Gentamicin (Cn) signifikante Änderungen der MHK durch die *acrB*-Deletion nachgewiesen werden. Gegenüber Doxyzyklin (Do) zeigten die *acrB*-negativen Mutanten eine deutlich erhöhte Sensitivität (MHK<sub>Do</sub> von 0,10 µg/ml – im Vergleich zum jeweiligen Ausgangsstamm mit einer MHK<sub>Do</sub> von 0,78 µg/ml). Durch die Rekplementation mit dem *acrB*-tragenden Vektor *pacrB* konnte das ursprüngliche Resistenzniveau der *acrB*-defizienten Mutanten (MHK<sub>Do</sub>: 0,78 µg/ml) wieder hergestellt werden. Das Vorhandensein von pACE (Kontrolle) bewirkte sogar eine deutliche Erhöhung der MHK<sub>Do</sub> auf 12,5 µg/ml.

Auch gegenüber Ciprofloxacin (Cip) führte die Deletion von *acrB* zu einer signifikanten Sensitivitätserhöhung (MHK<sub>Cip</sub> von JB580v: 1,56 µg/ml; MHK<sub>Cip</sub> von JB580v  $\Delta$ *acrB*: 0,10 µg/ml). Erwartungsgemäß spielte die Deletion der  $\beta$ -Laktamasen hierbei keine Rolle.

**Tabelle 31: MHK-Bestimmung der *acrB*-Deletionsmutanten (Flüssigmedium)**

Stamm [µg/ml] Antibiotikum	JB580v	JB580v <i>ΔacrB</i>	JB580v <i>ΔacrB</i> ( <i>pacrB</i> )	JB580v <i>ΔacrB</i> ( <i>pACE</i> )	JB580v <i>ΔampC</i> / <i>ΔblaA</i>	JB580v <i>ΔampC</i> / <i>ΔblaA</i> / <i>ΔacrB</i>	JB580v <i>ΔampC</i> / <i>ΔblaA</i> / <i>ΔacrB</i> ( <i>pacrB</i> )
Ampicillin	25	25	nb	nb	0,78	0,39	nb
Cefotaxim (3.Generation)	0,0625	0,0313	nb	nb	0,0313	0,0156	nb
Meropenem	0,0313	0,0313	nb	nb	0,0313	0,0625	nb
Gentamicin	0,625	0,625	nb	nb	1,250	0,625	nb
Doxyzyklin	0,78	0,10	0,78	12,5	0,78	0,10	0,78
Ciprofloxacin	1,56	0,10	nb	nb	3,13	0,10	nb

Zur Bestimmung der MHK wurden frisch beimpfte, OD<sub>600</sub> angegliche Bakterienkulturen der Stämme JB580v, JB580v *ΔacrB*, JB580v *ΔampC* / *ΔblaA* und JB580v *ΔampC*/*ΔblaA*/*ΔacrB* - wie in Kapitel 2.9.10.3 beschrieben - in LB-Medium unter Hinzugabe unterschiedlicher Antibiotikakonzentrationen (geometrische Verdünnungsreihen in 12-Napf-Mikrotiterplatten) für 12 h bei 37 °C sauerstoffreich schüttelnd inkubiert. Als minimale Hemmkonzentration wurde die Antibiotikadosis in [µg/ml] festgesetzt, bei der am Versuchsende kein signifikantes Wachstum nachgewiesen werden konnte. Als Wachstumsnachweis wurde eine Differenz der OD<sub>600</sub> > 0,2 festgesetzt.

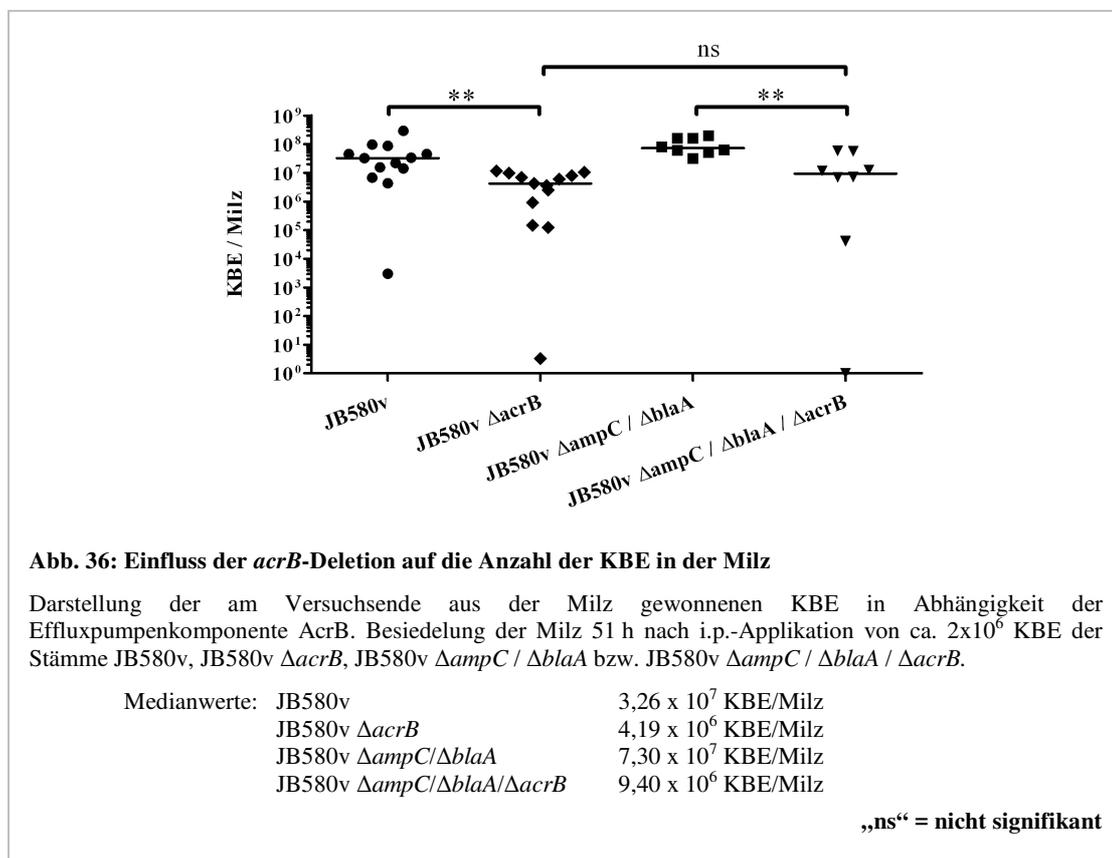
„nb“ = nicht bestimmt

### 3.5. Charakterisierung der *acrB*-Deletionsmutanten *in vivo*

#### 3.5.1. Wachstumsverhalten *acrB*-Deletionsmutanten *in vivo*

Der Effluxpumpenkomplex AcrAB-TolC ist in der Lage u. a. Intermediärmetabolite und Schadstoffe (z. B. Gallensalze) aus der Bakterienzelle zu schleusen (s. a. Kapitel 1.4.3.2). Der Wegfall dieses Effluxpumpensystems, einem Hauptvertreter dieser Gruppe, sollte sich u. a. auch bei der Sensitivität gegenüber bakteriotoxischen Substanzen *in vivo* zeigen. Um die Auswirkungen der *acrB*-Deletion auf die Keimbesiedelung der Milz zu untersuchen, erfolgte die intraperitoneale Applikation von ca.  $2 \times 10^6$  KBE des Ausgangsstammes JB580v oder der in dieser Arbeit hergestellten Deletionsmutanten JB580v  $\Delta$ *acrB*, JB580v  $\Delta$ *ampC* /  $\Delta$ *blaA* bzw. JB580v  $\Delta$ *ampC* /  $\Delta$ *blaA* /  $\Delta$ *acrB* (s. a. Tabelle 19) bei C57Bl/6 Mäusen.

Abb. 36 veranschaulicht die Höhe der bakteriellen Milzbesiedelung 51 h nach intraperitonealer Applikation für die *Yersinia*-Stämme JB580v, JB580v  $\Delta$ *acrB*, JB580v  $\Delta$ *ampC* /  $\Delta$ *blaA* und JB580v  $\Delta$ *ampC* /  $\Delta$ *blaA* /  $\Delta$ *acrB*. Bei den Mäusen, die mit dem Ausgangsstamm JB580v infiziert wurden, entwickelte sich eine hohe bakterielle Keimlast mit  $3,26 \times 10^7$  KBE/Milz (Medianwert). Mit  $7,30 \times 10^7$  KBE/Milz war die Milzbesiedelung durch den  $\beta$ -Laktamase-negative Stamm JB580v  $\Delta$ *ampC* /  $\Delta$ *blaA* ähnlich hoch. Bei beiden Gruppen, die mit den *acrB*-Deletionsmutanten infiziert wurden, konnte eine signifikante geringere Keimzahl nachgewiesen werden ( $4,19 \times 10^6$  KBE/Milz bei JB580v  $\Delta$ *acrB* bzw.  $9,40 \times 10^6$  KBE/Milz bei der Dreifachdeletionsmutante).

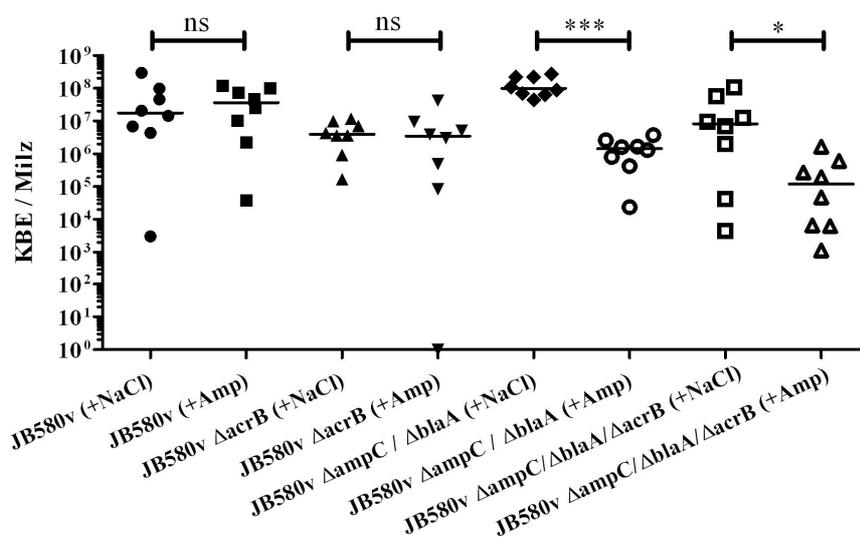


### 3.5.2. Einfluss von AcrB auf die Antibiotikaresistenz in vivo

#### 3.5.2.1. Einfluss der AcrB-Effluxpumpe auf die Nettoüberlebensrate bei Ampicillinbehandlung

Nachfolgend sollte untersucht werden, ob die chromosomale Deletion von *acrB* Einfluss auf die Ampicillinresistenz in vivo hat und die zusätzliche Deletion in der  $\beta$ -Laktamase negativen Mutante einen additiven Effekt zeigt. Hierfür wurden C57Bl/6 Mäuse mit ca.  $2 \times 10^6$  KBE der Stämme JB580v, JB580v  $\Delta$ *acrB*, JB580v  $\Delta$ *ampC* /  $\Delta$ *blaA* bzw. JB580v  $\Delta$ *ampC* /  $\Delta$ *blaA* /  $\Delta$ *acrB* intraperitoneal infiziert. Nach 27 h und 39 h erfolgte jeweils die i.v.-Gabe von 5,5 mg Ampicillin (Amp) (ca. 250 mg/kg KG, gelöst in 100  $\mu$ l NaCl (0,9%); „+Amp“) bzw. 100  $\mu$ l antibiotikafreier Kochsalzlösung („+NaCl“). Nach weiteren 12 h (51 h p.i.) erfolgte die Milzentnahme zur Beurteilung bakteriellen Milzbesiedelung (s. a. Kapitel 2.12.3).

Am Versuchsende (51 h p.i.) waren in den Milzen der nicht antibiotisch behandelten JB580v-Gruppe („+NaCl“) durchschnittlich  $1,73 \times 10^7$  KBE/Milz (Median) nachweisbar, in der mit Ampicillin behandelten Gruppe („+Amp“) lag der Median bei  $3,63 \times 10^7$  KBE/Milz (s. a. Abb. 37). Ein signifikanter Unterschied zwischen beiden



**Abb. 37: AcrB-abhängige Nettoüberlebensrate in der Milz nach Ampicillinbehandlung**

Darstellung der bakteriellen Besiedelung der Milz von C57Bl/6 Mäusen 51 h (KBE/Milz) nach intraperitonealer Applikation von ca.  $2 \times 10^6$  KBE des Ausgangsstamms JB580v bzw. der Deletionsmutanten JB580v  $\Delta$ *acrB*, JB580v  $\Delta$ *ampC* /  $\Delta$ *blaA* und JB580v  $\Delta$ *ampC* /  $\Delta$ *blaA* /  $\Delta$ *acrB*. Die i.v.-Gabe von 5,5 mg Ampicillin (gelöst in 100  $\mu$ l NaCl (0,9%); „+Amp“) bzw. von 100  $\mu$ l antibiotikafreier isotoner Kochsalzlösung („+NaCl“) erfolgte zu den Zeitpunkten 27 h und 39 h p.i.. Die Milzentnahme erfolgte 51 h p.i..

Medianwerte der KBE/Milz bei	„+NaCl“	bzw.	„+Amp“:
JB580v	$1,73 \times 10^7$	bzw.	$3,63 \times 10^7$ KBE/Milz
JB580v $\Delta$ <i>acrB</i>	$3,90 \times 10^6$	bzw.	$3,43 \times 10^6$ KBE/Milz
JB580v $\Delta$ <i>ampC</i> / $\Delta$ <i>blaA</i>	$9,73 \times 10^7$	bzw.	$1,43 \times 10^6$ KBE/Milz
JB580v $\Delta$ <i>ampC</i> / $\Delta$ <i>blaA</i> / $\Delta$ <i>acrB</i>	$8,20 \times 10^6$	bzw.	$1,19 \times 10^5$ KBE/Milz

„ns“ = nicht signifikant

Gruppen zeigte sich nicht, was bedeutet, dass Ampicillin in vivo unter diesen Testbedingungen keine signifikante Änderung auf die Nettoüberlebensrate von JB580v bewirkt.

Die Milzen der mit der  $\Delta acrB$ -Deletionsmutante infizierten, nicht mit Ampicillin behandelten Gruppe („+NaCl“) zeigten eine ähnliche wie bereits in Kapitel 3.5.1 beschriebene, reduzierte Keimzahl. Die bakterielle Besiedelung der Milz war mit  $3,90 \times 10^6$  KBE/Milz im Median fast eine log-Stufe geringer als die des Ausgangsstamms. Jedoch bewirkte auch hier die zweimalige Gabe von Ampicillin („+Amp“) keine signifikante Reduktion der nachgewiesenen Keimzahl. Diese lag 12 h nach der letzten Antibiotikagabe mit  $3,43 \times 10^6$  KBE/Milz auf demselben Niveau wie die der unbehandelten Gruppe.

Bei der Gruppe, die mit der  $\beta$ -Laktamase-negativen *blaA/ampC*-Deletionsmutante infiziert wurde, konnte nach zweimaliger intravenöser Ampicillingabe – wie bereits in Kapitel 3.3.4.2 beschrieben – eine leichte Reduktion der bakteriellen Milzbesiedelung im Vergleich zum Ausgangsstamm gezeigt werden. Die nachgewiesenen KBE in der Milz nahmen durch die zweimalige Antibiotikagabe von  $9,73 \times 10^7$  („+NaCl“) auf  $1,43 \times 10^6$  („+Amp“) (Medianwerte) signifikant ab.

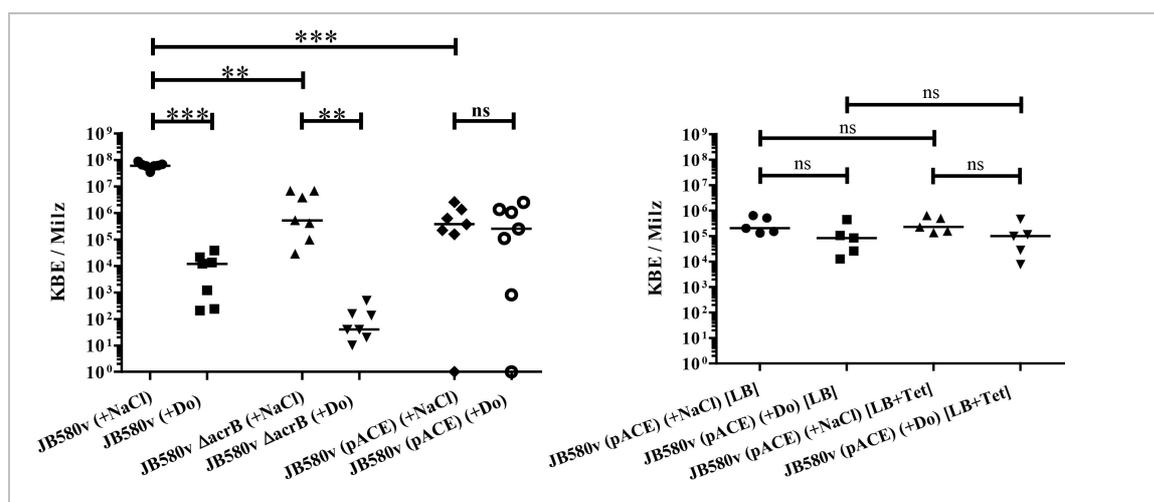
Die Kontrollgruppe („+NaCl“) der Dreifachdeletionsmutante JB580v  $\Delta ampC / \Delta blaA / \Delta acrB$  zeigte ähnlich wie JB580v  $\Delta acrB$  eine vergleichbar verminderte Milzbesiedelung. Durch die Ampicillingabe („+Amp“) nahm diese im Median von  $8,20 \times 10^6$  auf  $1,19 \times 10^5$  KBE/Milz (ca. 1,7 log-Stufen) ab – in etwa genauso viel wie die Gruppe, die mit dem *acrB*-positiven Kontrollstamm infiziert worden war. Die Deletion von *acrB* scheint weder JB580v noch die  $\beta$ -Laktamase-negative Deletionsmutante unter diesen Testbedingungen empfindlicher gegenüber Ampicillin zu machen. AcrB scheint auf die Fitness der Yersinien unter Ampicillin in vivo keinen großen Einfluss zu haben.

### 3.5.2.2. Einfluss der AcrB-Effluxpumpe auf die Nettoüberlebensrate bei Doxyzyklinbehandlung

Nachfolgend sollte die Wirksamkeit von Doxyzyklin (Do) gegenüber dem Ausgangsstamm JB580v als auch der Effluxpumpendeletionsmutante JB580v  $\Delta acrB$  getestet werden. Hierfür wurden C57Bl/6 Mäuse mit ca.  $2 \times 10^6$  KBE der Stämme JB580v, JB580v  $\Delta acrB$  und dem Doxyzyklin-resistenten JB580v (pACE) intraperitoneal infiziert. Nach 27 h und 39 h p.i. erfolgte jeweils die i.v.-Gabe von 100  $\mu$ l Flüssigkeit über die Schwanzvene. Hierbei erhielt die Testgruppe („+Do“) jeweils 0,55 mg Doxyzyklin (entspricht ca. 25 mg/kg KG; gelöst in 100  $\mu$ l NaCl (0,9%)). Der Kontrollgruppe („+NaCl“) wurde zweimal antibiotikafreie isotone Kochsalzlösung (NaCl (0,9%)) i.v. verabreicht. Die Auszählung erfolgte 51 h p.i. auf antibiotikafreien LB-Nährböden („[LB]“) zur Beurteilung der Höhe der bakteriellen Milzbesiedelung (s. a. Kapitel 2.12.3).

## Ergebnisse

In den Milzen der nicht antibiotisch behandelten Kontrollgruppe („+NaCl“) konnten 51 h p.i. durchschnittlich  $6,07 \times 10^7$  KBE/Milz (Median) nachgewiesen werden. In der mit Doxyzyklin behandelten Gruppe („+Do“) lag der Median bei  $1,19 \times 10^4$  KBE/Milz (s. Abb. 38 links). Die Keimlast konnte durch zwei Antibiotikagaben signifikant (ca. 3,5 log-Stufen) reduziert werden. Doxyzyklin erscheint unter diesen Testbedingungen hoch effektiv zu sein (Abb. 38 links). Die Milzen der mit der  $\Delta acrB$ -Deletionsmutante infizierten, nicht antibiotisch behandelten Kontrollgruppe („+NaCl“) zeigten im Vergleich zum Ausgangsstamm die bereits in Kapitel 3.5.1 beschriebene, reduzierte Keimzahl ( $5,27 \times 10^5$  KBE/Milz). Durch die zweimalige Gabe von Doxyzyklin („+Do“) konnte die Keimzahl auf  $4,00 \times 10^1$  KBE/Milz (Median) gesenkt werden.



**Abb. 38: AcrB-abhängige Nettoüberlebensrate in der Milz nach Doxyzyklinbehandlung**

Darstellung der am Versuchsende aus der Milz gewonnenen KBE in Abhängigkeit der Effluxpumpenkomponente AcrB.

**Links:** KBE pro Milz von jeweils 7 C57Bl/6 Mäusen 51 h nach i.p.-Infektion von ca  $2 \times 10^6$  KBE von JB580v, JB580v  $\Delta acrB$  bzw. JB580v (pACE). Zu den Zeitpunkten 27 h und 39 h p.i. erfolgte jeweils die i.v.-Gabe von 100  $\mu$ l Flüssigkeit – die Testgruppe („+Do“) erhielt jeweils 0,55 mg Doxyzyklin (entspricht ca. 25 mg/kg KG), der Kontrollgruppe („+NaCl“) wurde zweimal antibiotikafreie isotone Kochsalzlösung (NaCl (0,9%)) verabreicht. Die Milzentnahme erfolgte 51 h p.i.. Die Auszählung wurde auf antibiotikafreien LB-Nährböden durchgeführt.

Medianwerte der KBE/Milz nach Gabe von	NaCl (0,9%)	bzw.	Doxyzyklin:
JB580v	$6,07 \times 10^7$	bzw.	$1,19 \times 10^4$ KBE/Milz
JB580v $\Delta acrB$	$5,27 \times 10^5$	bzw.	$4,00 \times 10^1$ KBE/Milz
JB580v (pACE)	$3,71 \times 10^5$	bzw.	$2,50 \times 10^5$ KBE/Milz

**Rechts:** KBE pro Milz von jeweils 5 C57Bl/6 Mäusen 51 h nach i.p.-Infektion mit  $2 \times 10^6$  KBE von JB580v (pACE). Zu den Zeitpunkten 27 h und 39 h p.i. erfolgte jeweils die i.v.-Gabe von 100  $\mu$ l Flüssigkeit – die Testgruppe („+Do“) erhielt jeweils 0,55 mg Doxyzyklin (entspricht ca. 25 mg/kg KG; gelöst in NaCl (0,9%)). Der Kontrollgruppe („+NaCl“) wurde zweimal antibiotikafreie isotone Kochsalzlösung (NaCl (0,9%)) verabreicht. Die Milzentnahme erfolgte 51 h p.i.. Die Auszählung der KBE wurde auf antibiotikafreien LB-Nährböden („[LB]“) als auch auf tetrazyklinhaltigen Nährböden („[LB+Tet]“) (Endkonzentration von 20  $\mu$ g/ml Tetrazyklin, s. a. Kapitel 2.6.3.1) durchgeführt.

Medianwerte der KBE/Milz von JB580v (pACE) nach Gabe von	NaCl (0,9%)	bzw.	Doxyzyklin:
auf antibiotikafreien Nährböden („[LB]“)	$2,02 \times 10^5$	bzw.	$8,34 \times 10^4$ KBE/Milz
auf tetrazyklinhaltigen Nährböden („[LB+Tet]“)	$2,28 \times 10^5$	bzw.	$9,99 \times 10^4$ KBE/Milz

„ns“ = nicht signifikant

Die lienale Keimlast der Mausgruppe, die mit dem Tetrazyklin-resistenten Stamm JB580v (pACE) (Kontrollstamm, s. a. Tabelle 31) infiziert worden waren, konnte durch die zweimalige Antibiotikagabe nicht gesenkt werden und entsprach im Wesentlichen der Keimzahl der nicht antibakteriell behandelten Kontrollgruppe (s. a. Abb. 38 rechts). Im Vergleich zum Ausgangsstamm war die Milzbesiedelung jedoch bereits bei der unbehandelten Kontrollgruppe erniedrigt. Der Median lag bei der nicht antibiotisch behandelten Gruppe bei  $3,71 \times 10^5$  KBE/Milz. Nach zweimaliger Doxyzyklingabe lag die Keimlast noch bei  $2,50 \times 10^5$  KBE/Milz.

Um festzustellen, ob es bei Abwesenheit von Doxyzyklin und somit dem fehlenden Selektionsdruck vermehrt zu einem spontanen Plasmidverlust kommt, erfolgte ein weiterer Infektionsversuch mit JB580v (pACE) (Infektionsdosis  $2 \times 10^6$  KBE i.p.). Nach zweimaliger i.v.-Gabe von 0,55 mg Doxyzyklin (gelöst in 100  $\mu$ l NaCl (0,9%)); entspricht ca. 25 mg/kg KG; Testgruppe „+Do“) bzw. 100  $\mu$ l antibiotikafreier isotoner Kochsalzlösung (Kontrollgruppe „+NaCl“) zu den Zeitpunkten 27 h und 39 h p.i. erfolgte 51 h p.i. die Auszählung der rückisolierten Yersinien auf antibiotikafreien LB-Nährböden („[LB]“) sowie auf tetrazyklinhaltigen LB-Nährböden („[LB+Tet]“). Weder die Doxyzyklintherapie (in vivo) noch das Tetrazyklin im Nährbodenagar (in vitro) führte zu einer signifikanten Veränderung der Keimzahl (s. Abb. 38 rechts). Die Anzahl der KBE, die auf tetrazyklinhaltigen Nährböden für die Kontroll- bzw. die Therapiegruppe ( $2,28 \times 10^5$  bzw.  $9,99 \times 10^4$  KBE/Milz) bestimmt wurde, kam der Keimzahl auf antibiotikafreien Nährböden sehr nahe ( $2,02 \times 10^5$  bzw.  $8,34 \times 10^4$  KBE/Milz) (s. a. Abb. 38 rechts). Das Tetrazyklin-Resistenzplasmid pACE war unter Infektionsbedingung auch ohne Doxyzyklingabe in JB580v stabil etabliert und ging nicht verloren.

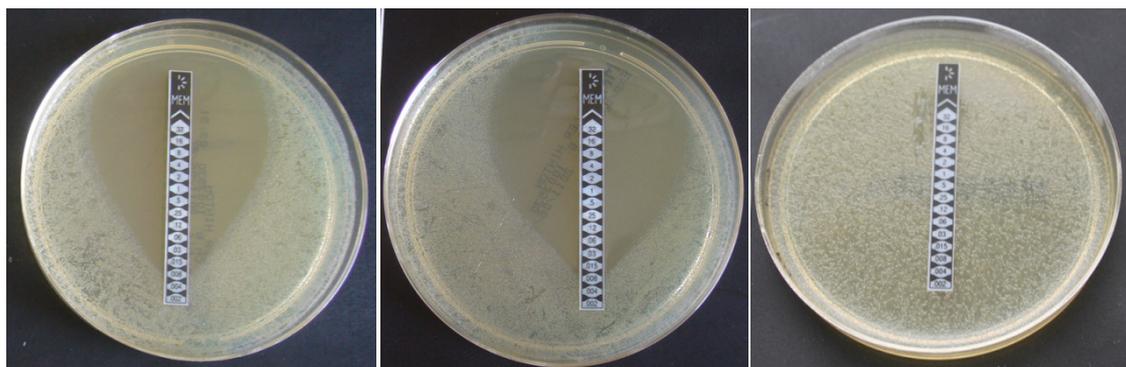
Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die Deletion von *acrB* bei *Y. enterocolitica* nicht nur eine Reduktion der Fitness aufgrund einer Doxyzyklingabe bewirkt, sondern bereits ohne eine antibakterielle Behandlung eine signifikante Abnahme der KBE nachgewiesen werden kann. Die Acr-Effluxpumpe kann somit auch als Virulenzfaktor gesehen werden.

### 3.6. Die Rolle von *ompF* für die Meropenemresistenz

#### 3.6.1. Herstellung und Charakterisierung einer meropenemresistenten Spontanmutante ( $\text{Mem}^R$ )

Um die Ursache des diskrepanten Verhaltens von JB580v im Bezug auf die Sensitivität gegenüber Meropenem (Mem) *in vitro* (hoch sensitiv) und *in vivo* (resistent) zu ermitteln, wurde eine spontan meropenemresistente ( $\text{Mem}^r$ ) Mutante hergestellt. Hierfür wurde JB580v  $\Delta ampC / \Delta blaA / \Delta acrB$  als Elternstamm gewählt, um eine Beteiligung der deletierten Resistenzgene ausschließen zu können. Des Weiteren wurden Flüssigkulturen mit schrittweise aufsteigenden Meropenemkonzentrationen zur Kultivierung bzw. Selektion verwendet. So konnte nach einigen Zwischenschritten eine hoch resistente Spontanmutante selektiert werden (s. Abb. 39).

Während der Ausgangsstamm (links) und die Dreifachdeletionsmutante JB580v  $\Delta ampC / \Delta blaA / \Delta acrB$  (Mitte) jeweils eine  $\text{MHK}_{\text{Mem}}$  von 0,012  $\mu\text{g/ml}$  zeigten, war JB580v<sup>MemR</sup>  $\Delta blaA / \Delta ampC / \Delta acrB$  mit 16  $\mu\text{g/ml}$  hoch resistent gegenüber Meropenem (s. Abb. 39).



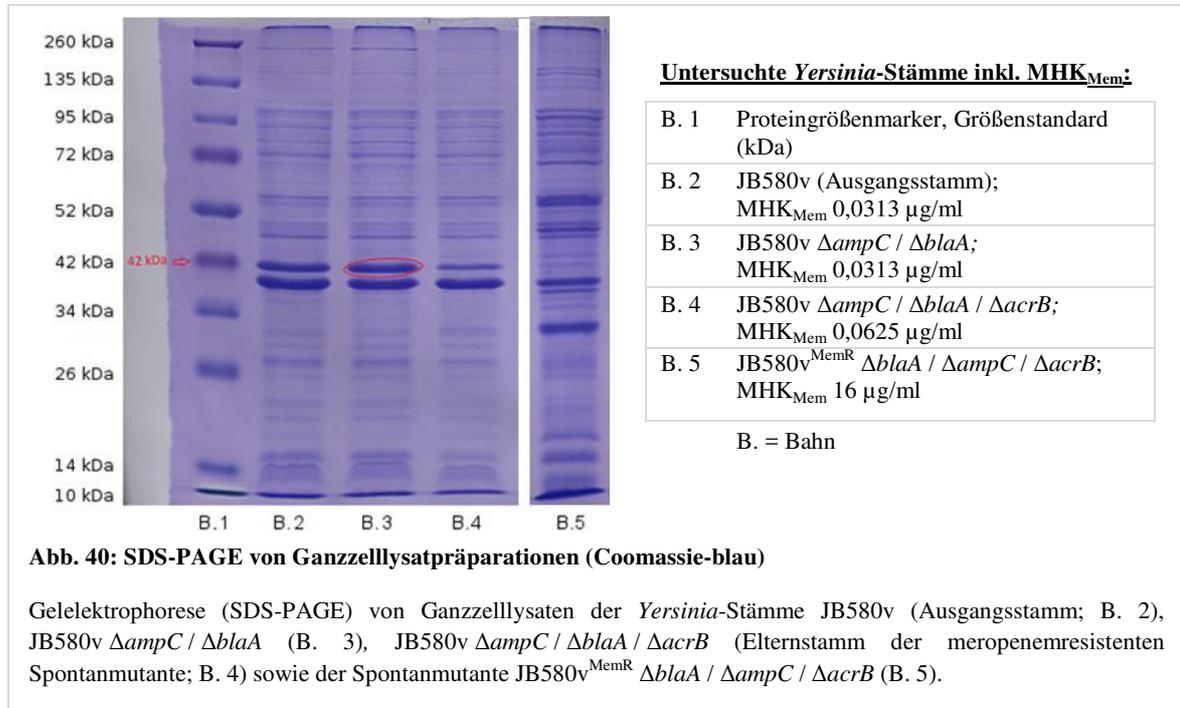
**Abb. 39: Meropenemresistenz-Austestung der spontanen  $\text{Mem}^R$ -Mutante (E-Test)**

Austestung der Meropenemresistenz von JB580v (links), JB580v  $\Delta ampC / \Delta blaA / \Delta acrB$  (Mitte) und der Spontanmutante JB580v<sup>MemR</sup>  $\Delta blaA / \Delta ampC / \Delta acrB$  mittels E-Teststreifen. Die Präparation der Nährböden erfolgte nach den Empfehlungen der EUCAST (EUCAST 2010). Abgelesen wurde die  $\text{MHK}$  [ $\mu\text{g/ml}$ ] jeweils nach 16-20 h Inkubation auf Mueller-Hinton-Nährböden.

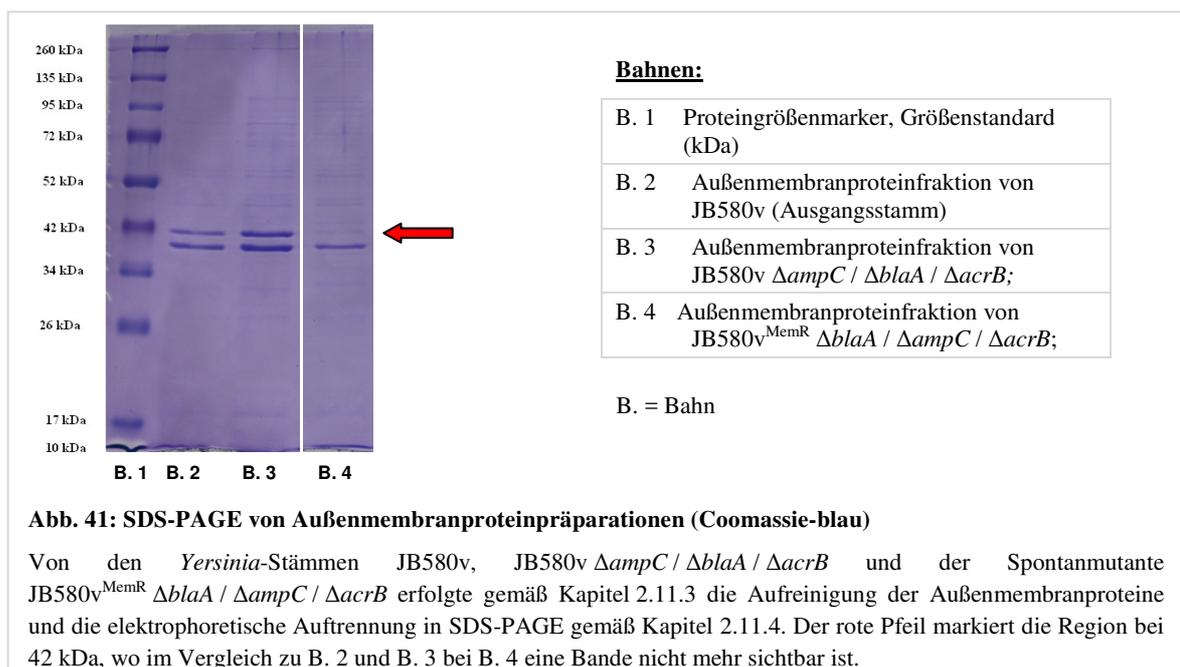
$\text{MHK}_{\text{Mem}}$ :	JB580v	0,012 $\mu\text{g/ml}$
	JB580v $\Delta ampC / \Delta blaA / \Delta acrB$	0,012 $\mu\text{g/ml}$
	JB580v <sup>MemR</sup> $\Delta blaA / \Delta ampC / \Delta acrB$	16 $\mu\text{g/ml}$

Um Veränderungen der Proteinzusammensetzung durch die Spontanmutationen zu erkennen und somit einen Hinweis auf den Grund der erhöhten  $\text{MHK}$  zu erhalten, wurden anschließend Ganzzelllysate von den *Yersinia*-Stämmen JB580v (Bahn 2), JB580v  $\Delta ampC / \Delta blaA$  (Bahn 3), JB580v  $\Delta ampC / \Delta blaA / \Delta acrB$  (Bahn 4) sowie der meropenemresistenten Spontanmutante JB580v<sup>MemR</sup>  $\Delta blaA / \Delta ampC / \Delta acrB$  hergestellt und deren Proteinfraction über eine SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennt (s. a. Abb. 40). Hierbei zeigten sich einige Banden der spontan mutierten,

meropenemresistenten Mutante im Vergleich zu den Elternstämmen deutlich verändert. Besonders auffällig war mit Erreichen der Meropenemresistenz die starke Abschwächung einer Proteinbande bei 42 kDa (rote Markierung).



Da als potentieller Resistenzmechanismus eine Veränderung der Außenmembranprotein-(Omp)-Zusammensetzung vermutet wurde, erfolgte daraufhin die gelelektrophoretische Auftrennung der isolierten Außenmembranproteinfraktion von JB580v, JB580v  $\Delta ampC / \Delta blaA / \Delta acrB$  sowie von JB580v<sup>MemR</sup>  $\Delta blaA / \Delta ampC / \Delta acrB$ .



Wie in Abb. 41 dargestellt, zeigt die Mem<sup>R</sup>-Spontanmutante (Bahn 4) auch hier den Verlust einer Bande bei ca. 42 kDa im Vergleich zum Ausgangsstamm JB580v sowie des Elternstamms JB580v  $\Delta ampC / \Delta blaA / \Delta acrB$ .

Die Identifizierung des ca. 42 kDa Proteins, das bei der Spontanmutante im SDS-PAGE nicht mehr als Bande nachgewiesen werden konnte (s. Abb. 41, Pfeil), erfolgte nach Aufbereitung einer Probe aus dem Elternstamm in einem externen Labor mittels MALDI-TOF-Analyse (s. a. Kapitel 2.13) und ergab eine Übereinstimmung mit dem *Yersinia*-Porin OmpF.

Um festzustellen, ob spontane Genmutationen innerhalb von *ompF* die Ursache für das Fehlen der 42 kDa Bande waren, erfolgte die Sequenzierung des Genabschnitts von JB580v<sup>Mem<sup>R</sup></sup>  $\Delta blaA / \Delta ampC / \Delta acrB$  und der Vergleich zur veröffentlichten Nukleotidsequenz des Elternstamms (*Delihias 2003; Thomson et al. 2006*). Wie in Abb. 55 (Anhang) ersichtlich konnte gezeigt werden, dass es im untersuchten Genabschnitt (Gen einschließlich ca. 100 Basenpaare stromaufwärts) zu keiner Veränderung der Nukleotidsequenz gekommen war. Das Gen selbst war unverändert geblieben. Somit musste eine übergeordnete Genregulation als Ursache für das Fehlen von OmpF (dargestellt im SDS-PAGE) angenommen werden.

Bekanntermaßen wird die Genexpression von *ompF* u. a. durch die *micF*-RNA, eine nicht proteinkodierende RNA, die an vielen verschiedenen zellulären Regulationsprozessen (auch Stressantwort) beteiligt ist, posttranskriptional reguliert (*Delihias and Forst 2001; Delihias 2003*). Aufgrund dessen erfolgte auch die Sequenzierung des kodierenden Genabschnitts einschließlich der davor liegenden Promotorregion. Auch hier konnte kein Unterschied innerhalb des untersuchten Nukleotidsequenzabschnitts im Vergleich zum veröffentlichten Genabschnitt festgestellt werden (s. a. Abb. 56, Anhang). An der verringerten Genexpression ist somit auch keine Veränderung im Genabschnitt von *micF* verantwortlich.

### 3.6.2. Herstellung und Charakterisierung einer *ompF* Deletionsmutante

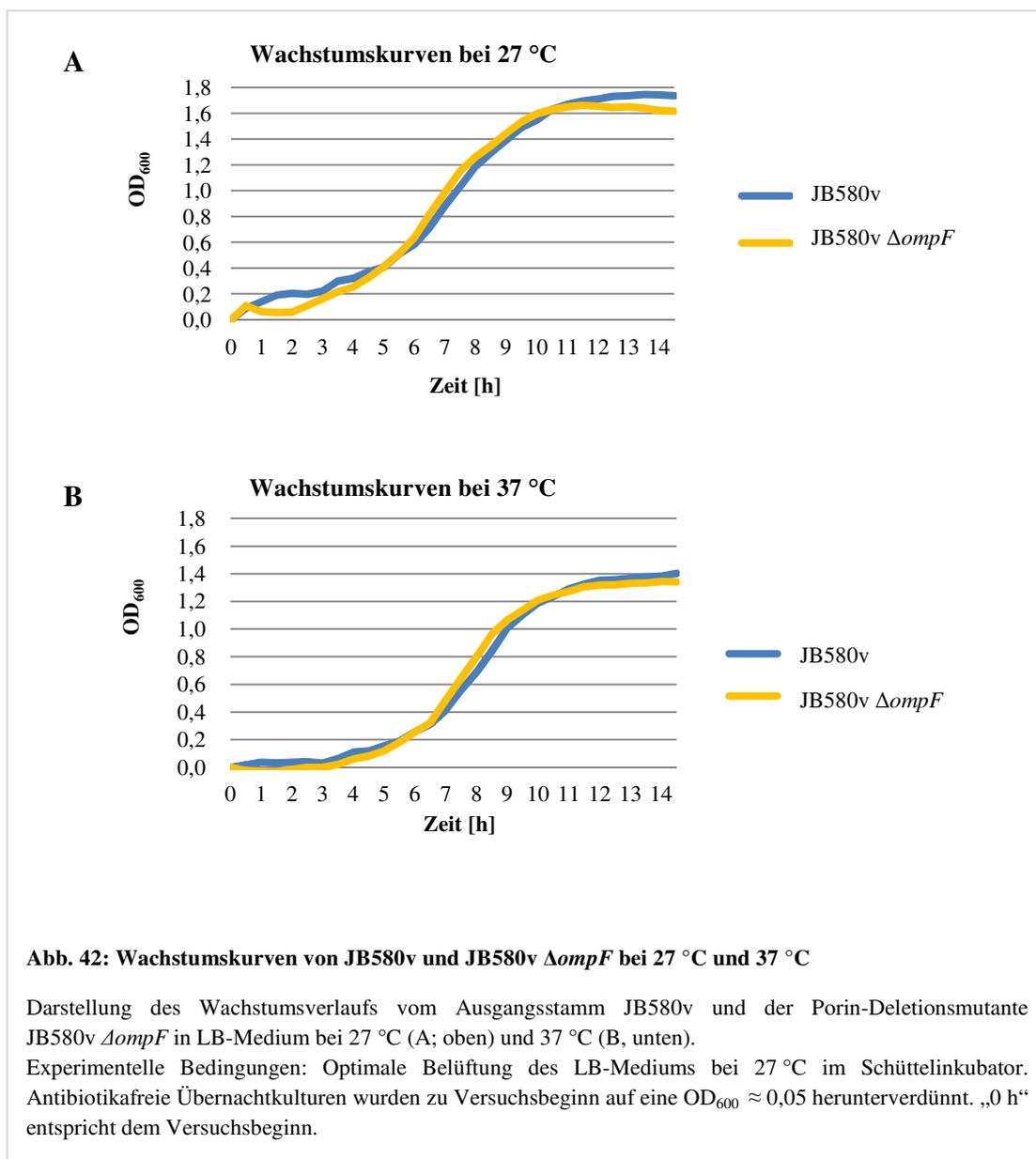
Es erfolgte daraufhin die gezielte chromosomale Deletion des Gens *ompF* im Ausgangsstamm JB580v, um die Rolle des Porins OmpF bei der Antibiotikaresistenz genauer untersuchen zu können (s. Kapitel 2.10.11). Die abschließende Kontrolle zur Bestätigung der korrekten Gendeletion erfolgte mittels PCR und Sequenzierung.

Um festzustellen, ob durch die genetischen Manipulationen signifikante Änderungen im Wachstumsverhalten auftreten, wurde es anhand von Wachstumskurven bei optimaler Belüftung im LB-Medium bei 27 °C (Wachstumsoptimum) und 37 °C (Körpertemperatur) analysiert (s. a. Kapitel 2.9.10.3).

Die Wachstumskurve von JB580v zeigt bei 27 °C (s. Abb. 42 oben) den bereits in Kapitel 3.2.1 beschriebene typische S-förmige Verlauf mit dem Erreichen der stationären Phase nach ca. 12 h bei einer OD<sub>600</sub> von ca. 1,7. Vergleicht man hiermit die Wachstumskurve von JB580v  $\Delta ompF$ , verläuft diese bis zum Erreichen der Plateauphase (OD<sub>600</sub> ca. 1,65) ähnlich. Signifikante Wachstumsunterschiede zwischen beiden Stämmen sind nicht nachweisbar.

Bei 37 °C (s. Abb. 42 unten) zeigt sich ein vergleichbares Bild: Die Wachstumskurven des Ausgangsstamms und der Porinmutante verlaufen ähnlich. Jedoch liegt die stationäre Phase hier für beide Bakterienstämme bereits bei einer optischen Dichte von ca. 1,4 und somit wie erwartet etwas geringer als bei 27 °C.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Deletion von *ompF* keinen wesentlichen Einfluss auf die planktonische Wachstumsgeschwindigkeit bei 27 °C oder bei 37 °C unter den getesteten Bedingungen hat.



### 3.6.3. Bestimmung des Antibiotikasensitivitätsprofils (MHK) der *ompF*-Deletionsmutante

#### 3.6.3.1. Bestimmung der Hemmhofdurchmesser verschiedener Antibiotika für JB580v $\Delta ompF$

Nachfolgend wurde die Porin-Deletionsmutante JB580v  $\Delta ompF$  auf ihre In-vitro-Antibiotikasensitivität getestet. Um mögliche Unterschiede zwischen dem planktonischen und dem biofilmartigen Wachstum detektieren zu können, erfolgte die Testung sowohl auf Nährböden (Antibiotikaplättchen-Diffusionstest und MHK-Bestimmung mittels E-Teststreifen) als auch im Flüssigmedium.

Zunächst erfolgte zur ersten Näherung die Durchführung des in der klinischen Routine häufig verwendeten Antibiotikaplättchen-Diffusionstests auf MH-Nährböden zur Bestimmung des Hemmhofdurchmessers (HHDM). Die Ergebnisse sind in Tabelle 32 aufgeführt.

Beim Vergleich der durchschnittlichen HHDM vom Ausgangsstamm und der Porin-Deletionsmutante JB580v  $\Delta ompF$  ist bei allen getesteten Antibiotika eine ähnlich weitreichende Wachstumshemmung um die antibiotikahaltigen Testplättchen zu erkennen. Signifikante Differenzen im HHDM sind nicht nachweisbar. Von einem klinisch relevanten Resistenzunterschied ist bei diesen Substanzen somit nicht auszugehen.

**Tabelle 32: Bestimmung des Hemmhofdurchmessers von JB580v  $\Delta ompF$**

<b>Stamm</b> <b>Ø in [mm]</b> <b>Antibiotikum</b>	JB580v	JB580v $\Delta ompF$
Ampicillin	14	16
Cefotaxim	44	42
Ciprofloxacin	30	31
Doxyzyklin	25	27
Ertapenem	37	34
Gentamicin	20	21
Imipenem	36	34
Meropenem	38	36
Novobiocin	14	13
Tetrazyklin	25	30
Ticarcillin	21	21

Bestimmung des HHDM [mm] vom Ausgangsstamm JB580v und der Porin-Deletionsmutante JB580v  $\Delta ompF$ . Die Testdurchführung erfolgte entsprechend den Empfehlungen der EUCAST (EUCAST 2010). Das Ablesen der HHDM erfolgte nach 16-20 h Inkubation bei 37 °C auf Mueller-Hinton-Nährböden (s. a. Kapitel 2.9.10.1).

### 3.6.3.2. MHK-Bestimmung bei JB580v $\Delta ompF$ mittels Agardiffusionstest („E-Teststreifen“)

Um den Einfluss des Porins OmpF im Bezug auf die In-vitro-Antibiotikasensitivität gegenüber verschiedenen Antibiotika unterschiedlicher Substanzklassen genauer zu bestimmen, erfolgte die Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration mit antibiotikahaltigen E-Teststreifen. Getestet wurden der Ausgangsstamm JB580v sowie die dazugehörige Porin-Deletionsmutante JB580v  $\Delta ompF$ . Die Ergebnisse sind in Tabelle 33 aufgeführt.

Exemplarisch zeigen beide *Yersinia*-Stämme auf MH-Nährböden eine  $MHK_{Amp}$  von 4  $\mu\text{g/ml}$ . Auch bei den übrigen getesteten Antibiotika konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den MHK-Werten ermittelt werden.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die alleinige Deletion des *ompF* Gens bei *Y. enterocolitica* JB580v bei biofilmartigen Wachstum auf Nährböden unter diesen Testbedingungen zu keiner signifikanten Änderung der Sensitivität (MHK) bei den getesteten Antibiotika führt.

**Tabelle 33: MHK-Bestimmung in Abhängigkeit von *ompF* (E-Teststreifen)**

Stamm [ $\mu\text{g/ml}$ ] Antibiotikum	JB580v	JB580v $\Delta ompF$
Ampicillin	4,0	4,0
Cefotaxim	0,032	0,032
Cefoxitin	3,0	4,0
Ciprofloxacin	0,375	0,375
Cefuroxim	2,0	1,5
Doxyzyklin	1,0	0,75
Ertapenem	0,064	0,094
Gentamicin	0,25	0,125
Imipenem	0,19	0,19
Meropenem	0,012	0,012
Penicillin G	> 32	> 32
Piperacillin	0,75	0,75

Auflistung der bestimmten MHK verschiedener Antibiotika. Die Präparation der Nährböden erfolgte entsprechend den Empfehlungen der EUCAST (EUCAST 2010). Getestet wurden der Ausgangsstamm JB580v sowie der Porin-Deletionsmutante JB580v  $\Delta ompF$ . Abgelesen wurde die MHK von E-Teststreifen nach 16-20 h Inkubation bei 37 °C auf Mueller-Hinton-Nährböden entsprechend den Empfehlungen des Herstellers (s. a. Kapitel 2.9.10.2). Die minimale Hemmkonzentration wird angegeben in [ $\mu\text{g/ml}$ ].

### 3.6.3.3. MHK-Bestimmung bei JB580v $\Delta ompF$ im Flüssigmedium („Mikrodilutionsverfahren“)

#### 3.6.3.3.1. MHK-Bestimmung von Ampicillin im Flüssigmedium

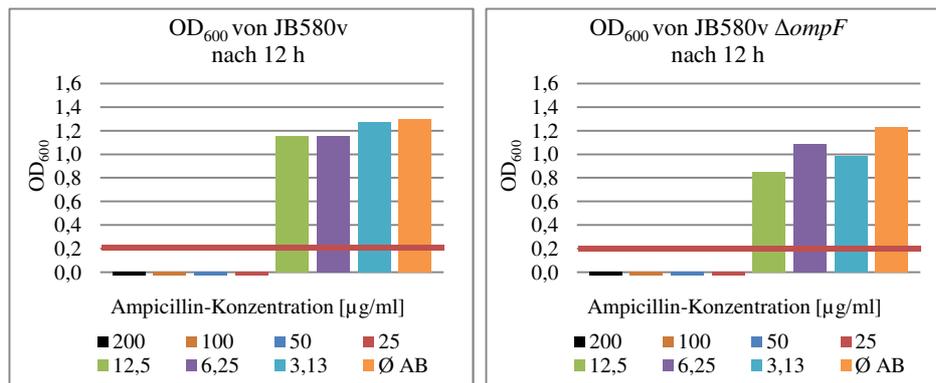
Nachfolgend wurde untersucht, ob die Deletion von *ompF* einen Einfluss auf die MHK verschiedener Antibiotika beim planktonisch wachsenden JB580v hat. Hierzu wurden – wie in Kapitel 2.9.10.3 beschrieben – frische Bakterienkulturen der Stämme JB580v und JB580v  $\Delta ompF$ , die mit verschiedenen hohen Antibiotikakonzentrationen versetzt waren (geometrische Verdünnungsreihe), bei 37 °C bzw. 27 °C in 12-Napf-Mikrodilutionsplatten für 12 h schüttelnd inkubiert und anhand der ermittelten Differenz der optischen Dichte  $OD_{600}$  (12h) –  $OD_{600}$  (0h) die minimale Hemmkonzentration bestimmt. Nachfolgend wird exemplarisch die Testung von Ampicillin (Amp) genauer beschrieben, während die Ergebnisse der anderen Antibiotika in Tabelle 34 übersichtlich dargestellt und zusammengefasst werden. Die ausführlichen Grafiken sind im Anhang (Kapitel 13.2) zu finden.

Zunächst wurde die jeweils erreichte optische Dichte der getesteten Stämme am Versuchsende nach 12 h antibiotikafreier Inkubation bei 37 °C im LB-Medium miteinander verglichen. Der Ausgangsstamm JB580v zeigte bei der abschließenden Messung eine Zunahme der gemessenen  $OD_{600}$ , auf 1,30. Die Deletionsmutante erreichte nach 12 h mit 1,23 einen ähnlich hohen Wert. Dies entspricht jeweils den bereits vorher durchgeführten Wachstumskurven, die bei den untersuchten Stämmen einen vergleichbaren Verlauf über die Zeit zeigten (s. a. Kapitel 3.6.2). Bei 37 °C bewirkte eine Ampicillinkonzentration ab 25  $\mu\text{g/ml}$  eine vollständige Hemmung des sichtbaren Wachstums. Die  $MHK_{Amp}$  beider Stämme unterscheidet sich nicht (s. a. Abb. 43 oben).

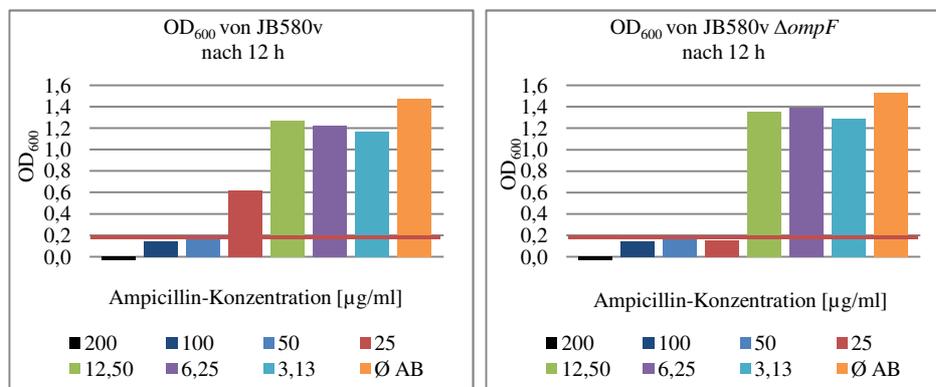
Bei einer Inkubationstemperatur von 27 °C zeigte sich bei beiden Stämmen in den antibiotikafreien Kulturen erwartungsgemäß eine geringfügig höhere OD als bei 37 °C. Die Bestimmung der  $MHK_{Amp}$  ergab formal für den Mutterstamm einen Wert von 50  $\mu\text{g/ml}$  und für die *ompF*-Deletionsmutante 25  $\mu\text{g/ml}$  (wie für 37 °C) (s. a. Abb. 43 unten). Der Unterschied von einer Verdünnungsstufe kann im Rahmen der Messungenauigkeit gewertet werden.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die Deletion von *ompF* in diesem Test weder bei 37°C noch bei 27°C einen Einfluss auf die  $MHK_{Amp}$  hatte.

Oben: 37 °C



Unten: 27 °C

**Abb. 43: MHK<sub>Amp</sub>-Bestimmung bei JB580v  $\Delta ompF$  im Flüssigmedium**

Zur Bestimmung der MHK von Ampicillin (MHK<sub>Amp</sub>) wurden frisch beimpfte, OD<sub>600</sub> angegliche Bakterienkulturen der Stämme JB580v und JB580v  $\Delta ompF$  - wie in Kapitel 2.9.10.3 beschrieben - in LB-Medium für 12 h bei 37 °C (oben) bzw. 27 °C (unten) sauerstoffreich schüttelnd inkubiert. Abgebildet ist jeweils die Differenz der OD<sub>600</sub> nach 12 h und zu Beginn des Versuchs. Als Wachstumsnachweis wurde eine Differenz der OD<sub>600</sub>  $\geq$  0,2 festgesetzt (rote Linie).

„Ø AB“ = ohne Antibiotikazusatz

### 3.6.3.3.2. MHK-Bestimmung bei JB580v $\Delta ompF$ hinsichtlich verschiedener Antibiotika im Flüssigmedium

Um die Auswirkung der *ompF*-Deletion hinsichtlich der Antibiotikasensitivität bei JB580v gegenüber weiteren in der Humanmedizin häufig verwendeten Antibiotika im Flüssigmedium (Mikrodilutionsverfahren) zu prüfen, erfolgte die MHK-Testung neben Ampicillin (Amp) auch für die Substanzen Cefotaxim (Ctx), Meropenem (Mem), Doxyzyklin (Do), Gentamicin (Cn) und Ciprofloxacin (Cip) (s. a. Tabelle 34). Hierbei waren für keine der untersuchten Antibiotika signifikante Unterschiede in der MHK erkennbar. Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die Deletion von *ompF* unter diesen Testbedingungen keinen Einfluss auf die Antibiotikaempfindlichkeit gegenüber o. g. Antibiotika hat.

**Tabelle 34: MHK-Bestimmung in Abhängigkeit von *ompF* (Flüssigmedium)**

<b>Antibiotikum</b> [µg/ml]	<b>Stamm</b>	JB580v	JB580v <i>ΔompF</i>
Ampicillin	(27°C)	50	25
Ampicillin	(37°C)	25	25
Cefotaxim	(27°C)	0,0313	0,0625
Cefotaxim	(37°C)	0,0625	0,0625
Meropenem	(37°C)	0,0313	0,0313
Gentamicin	(37°C)	0,625	0,625
Doxyzyklin	(37°C)	1,25	1,25
Ciprofloxacin	(37°C)	1,56	3,13

Tabellarische Auflistung der im Flüssigmedium bestimmten MHK verschiedener Antibiotika. Zur Bestimmung der MHK wurden frisch beimpfte, OD<sub>600</sub> angegliche Bakterienkulturen vom Ausgangsstamm JB580v sowie der Porin-Deletionsmutante JB580v *ΔompF* - wie in Kapitel 2.9.10.3 beschrieben - in LB-Medium unter Hinzugabe unterschiedlicher Antibiotikakonzentrationen (geometrische Verdünnungsreihen) für 12 h bei 27 °C (Werte hellgrau unterlegt) bzw. 37 °C sauerstoffreich schüttelnd inkubiert. Als minimale Hemmkonzentration wurde die Antibiotikadosis in [µg/ml] festgesetzt, bei der am Versuchsende kein sign. Wachstum nachgewiesen werden konnte. Als Wachstumsnachweis wurde eine Differenz der OD<sub>600</sub> > 0,2 festgesetzt.

## 4. Diskussion

### 4.1. Antibiotikawirkung bei *Y. enterocolitica* 1B im Vergleich

*Y. enterocolitica*, der Erreger der Yersiniose, ist weltweit verbreitet. Bereits 1975 entdeckten Cornelis und Abraham die zwei chromosomal kodierten  $\beta$ -Laktamasen BlaA (Klasse A, konstitutiv exprimierte Penicillinase) und BlaB (Klasse C, induzierbare Cephalosporinase, auch AmpC genannt) bei *Y. enterocolitica* (Cornelis and Abraham 1975; Stock et al. 2000). Obwohl alle humanpathogenen *Y. enterocolitica*-Stämme zwei  $\beta$ -Laktamase-Gene besitzen, unterscheidet sich die Expression der Enzyme je nach Bio- bzw. Serotyp deutlich (Stock et al. 1999; Stock et al. 2000). Die Genregulation ist jedoch noch nicht vollständig erforscht. Unterschiede in der Promotorregion oder in der Sekundärstruktur der mRNA konnten als Ursache hierfür ausgeschlossen werden (Singhal et al. 2014).

In dieser Arbeit wurde der von zahlreichen Forschergruppen untersuchte *Y. enterocolitica*-Stamm JB580v (Biotyp 1B, Serotyp O:8) verwendet und u.a. dessen Sensitivität gegenüber verschiedenen Antibiotika in vitro und in vivo untersucht.

In Tabelle 35 sind die für den Ausgangsstamm JB580v in vitro gewonnenen Ergebnisse zusammengefasst und den Ergebnissen anderer Forschergruppen gegenübergestellt.

**Tabelle 35: Vergleich der MHK verschiedener Antibiotika für *Y. enterocolitica* 1B**

Quelle	MHK [ $\mu\text{g/ml}$ ]			
	(Stock and Wiedemann 1999)	(Bent and Young 2010)	(Schriefer 2012)	Diese Arbeit
Penicillin G	4 - 64	24	nb	> 32
Doxyzyklin	0,25 - 2	nb	nb	1
Gentamicin	0,13 - 1	nb	2	0,25
Amoxicillin	4 - 128	24	nb	nb
Ampicillin	nb	4	4	4
Piperacillin	0,13 - 2	0,75	nb	0,75
Cefuroxim	0,25 - 4	0,75	1	2
Cefoxitin	1-32	nb	2	3
Cefotaxim	0,03 - 1	0,023	0,064	0,032
Ceftriaxon	0,03-0,25	0,023	nb	nb
Imipenem	0,06 - 1	0,25	0,38	0,19
Meropenem	0,03-0,06	nb	nb	0,012
Ciprofloxacin	0,01-0,25	nb	nb	0,375

Auflistung der In vitro-Antibiotikasensitivität von *Y. enterocolitica*, Biotyp 1B, entsprechend verschiedener Veröffentlichungen. Die MHK-Bestimmung wurde auf MH-Nährböden unter Verwendung von E-Teststreifen durchgeführt. Bei der Testung von Stock et Wiedemann wurden verschiedene Serotypen verwendet und diese nicht gesondert unterteilt (Stock and Wiedemann 1999). Bent et Young verwendeten wie in dieser Dissertation den *Yersinia*-Stamm JB580v (Derivat von 8081v) (Bent and Young 2010). E. Schriefer untersuchte den Stamm WA<sup>RS</sup> (Derivat von WA-314) (Schriefer 2012). „nb“ = nicht bestimmt

*Stock et Wiedemann* untersuchten 1999 u. a. die Antibiotikaempfindlichkeit klinischer Isolate des Biotyp 1B von *Y. enterocolitica* (*Stock and Wiedemann 1999*). Vergleicht man die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit mit denen von *Stock et Wiedemann*, so befinden sich die ermittelten MHKs verschiedener Antibiotika innerhalb der von *Stock et Wiedemann* angegebenen MHK-Intervalle. Dennoch sind die Ergebnisse nur bedingt übertragbar, da von *Stock et Wiedemann* zum untersuchten *Yersinia*-Kollektiv nur Biotypen, aber keine Serotypen angegeben und möglicherweise unterschiedliche Serotypen innerhalb eines Biotyps untersucht wurden. Eine Heterogenität der Stämme könnte u. a. die z. T. große Streuung bei den MHK-Werten innerhalb des Biotyps erklären.

*Bent et Young* verwendeten 2010 für ihre Untersuchungen den gleichen *Yersinia*-Stamm (JB580v) wie in dieser Arbeit (*Bent and Young 2010*). Stellt man die von ihnen veröffentlichten MHK-Werte den in dieser Arbeit ermittelten gegenüber, zeigen beide Stämme erwartungsgemäß praktisch gleiche MHK-Werte für die getesteten Antibiotika (s. a. Tabelle 35). Die publizierten Ergebnisse können somit hier bestätigt werden.

*E. Schriefer* untersuchte im Rahmen ihrer Dissertation den *Y. enterocolitica*-Stamm WA-c (Biotyp 1B, Serotyp O:8, Derivat von WA-314; anderer Genotyp als JB580v (*Garzetti et al. 2012*)) u. a. auf seine Sensitivität gegenüber verschiedenen Antibiotika. Auch hier ähneln die MHK-Werte den hier erhobenen Werten für  $\beta$ -Laktam-Antibiotika (s. a. Tabelle 35).

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass bei den analysierten *Yersinia*-Stämmen *in vitro* eine deutliche Sensitivität gegenüber den Nicht- $\beta$ -Laktam-Antibiotika (Doxzyklin, Gentamicin, Ciprofloxacin), den Carbapenemen sowie den Cephalosporinen der 3. Generation besteht. Auch ist bei der Sensitivität gegenüber den Aminopenicillinen eine Diskrepanz zu erkennen. Amoxicillin (orale Verabreichung) und Ampicillin (vornehmlich parenterale Gabe) gelten in der Klinik bzgl. ihres Wirkspektrums und ihrer Aktivität als vergleichbar. In der Publikation von *Bent et Young* unterscheiden sich die MHK-Messungen für *Y. enterocolitica* aber deutlich ( $MHK_{Amp} 4 \mu g/ml$ ,  $MHK_{Ampo} 24 \mu g/ml$ ). Diese Ergebnisse können durch die genannten Publikationen gestützt werden. Würde man sich bei der Auswahl eines Antibiotikums für die Behandlung einer therapiepflichtigen *Y. enterocolitica*-Infektion jedoch lediglich auf diese *In-vitro*-Ergebnisse stützen, wären alle o. g. Antibiotika bis auf Penicillin G und Amoxicillin eine mögliche Therapieoption.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die *In-vitro*-MHK-Bestimmung eines Infektionserregers für bestimmte Antibiotika keine uneingeschränkte Therapieempfehlung erlaubt, da sich die Antibiotikaempfindlichkeit unter *In-vivo*-Bedingungen im Vergleich zu *In-vitro*-Bedingungen unterscheiden kann. Auch bei der Verwendung unterschiedlicher Testsysteme können z. T. therapierelevante Unterschiede bei der MHK-Bestimmung festgestellt werden.

#### 4.2. Einfluss der Testsysteme auf die Höhe der ermittelten MHK

Die Sensitivitätsprüfungen von *Y. enterocolitica* wurden in dieser Arbeit auf Nährböden und in Flüssigkulturen durchgeführt, um zu ermitteln, ob beide Testsysteme bei JB580v ähnliche Ergebnisse zeigen oder ob die Art des Wachstums (biofilmartig vs. planktonisch) Einfluss auf das Resistenzniveau hat.

Bei der Gegenüberstellung der erhobenen MHK-Werte kann festgestellt werden, dass für Doxyzyklin, Gentamicin, Ciprofloxacin aber auch Cefotaxim und Meropenem die ermittelten MHK-Werte beider Testsysteme nahe beieinanderliegen. Nur bei Ampicillin zeigt sich ein signifikanter Unterschied von über zwei Verdünnungsstufen (4 µg/ml vs. 25 µg/ml) – eine Abweichung, durch die der Keim gegenüber Ampicillin entweder als sensibel oder resistent eingestuft werden kann (s. a. Tabelle 36). Dieses substanzspezifische Verhalten, welches abhängig von den Testsystemen ist, könnte Einfluss auf die Effektivität einer antibakteriellen Therapie in der Klinik haben (z. B. bei septischen Patienten).

**Tabelle 36: MHK bei JB580v unter Berücksichtigung der Wachstumsart**

	MHK [µg/ml] auf Nährboden	MHK [µg/ml] in Flüssigkultur
Doxyzyklin	1	0,75
Gentamicin	0,25	0,625
Ampicillin	4	25
Cefotaxim	0,032	0,0625
Meropenem	0,012	0,031
Ciprofloxacin	0,375	0,78

Auflistung der in dieser Arbeit gemessenen MHK-Werte von verschiedenen Antibiotika. Die MHK wurde auf MH-Nährböden (mittels E-Teststreifen) und im LB-Flüssigmedium (geometrische Verdünnungsreihen) nach ca. 12 h Inkubation bei 37 °C bestimmt.

#### 4.3. Die Bedeutung der $\beta$ -Laktamasen bei der Antibiotikaresistenz von *Y. enterocolitica*

##### 4.3.1. $\beta$ -Laktamase-abhängige Antibiotikaresistenz in vitro

Scavizzi *et al.* testeten den *Y. enterocolitica*-Stamm WA (Biotyp 1, Serotyp O:8) auf seine Antibiotikasensitivität in vitro und in vivo. Hierbei war der Stamm in vitro resistent gegenüber Amoxicillin (Ampicillin-ähnlich), jedoch hoch sensibel gegenüber Cefotaxim (3. Generation Cephalosporinen) und Imipenem (Carbapenem). Im Mausinfektionsmodell konnten sie für die genannten drei Substanzen bei *Y. enterocolitica* WA in vivo keine

effektive antibakterielle Wirkung nachweisen (*Scavizzi et al. 1987*). Die Gabe dieser Antibiotika zeigte wider Erwarten keine deutliche Reduktion der Keimzahl.

Welche Rolle die  $\beta$ -Laktamasen bei der Resistenzbildung einnehmen, war in der vorliegenden Arbeit genauer zu untersuchen. Hierzu erfolgte die Deletion der  $\beta$ -Laktamasen bei *Y. enterocolitica* JB580v.

Der Ausgangsstamm war in vitro resistent gegenüber einigen Penemen, jedoch hoch empfindlich gegenüber den getesteten Cephalosporinen und Carbapenemen. Die Deletion von *blaA* führte bei JB580v in vitro zu einer deutlichen Erhöhung der Sensitivität gegenüber den getesteten Penemen Penicillin G, Ampicillin und Piperacillin, während die MHK der anderen  $\beta$ -Laktam-Antibiotika im Test unverändert war. Die *ampC*-Deletionsmutante zeigte in vitro gegenüber keinem der getesteten  $\beta$ -Laktam-Antibiotika eine signifikante Resistenzänderung. Die gleichzeitige Deletion beider  $\beta$ -Laktamasen bewirkte allenfalls eine geringe Zunahme der Sensitivität gegenüber den getesteten Penemen im Vergleich zur *blaA*-Deletionsmutante. Zu vergleichbaren Ergebnissen kamen zwischenzeitlich auch *E. Schriefer* (Stamm WA<sup>RS</sup>, Derivat von WA-314) und *Bent et Young* (Stamm JB580v, Derivat von 8081v) (*Bent and Young 2010*; *Schriefer 2012*). Auch hier konnte jeweils gezeigt werden, dass sich durch die Deletion der  $\beta$ -Laktamasen lediglich die Sensitivität gegenüber den getesteten Penicillinen veränderte und dies erwartungsgemäß vornehmlich durch BlaA, die konstitutiv exprimierte Penicillinase, bedingt war. Die Empfindlichkeit gegenüber den untersuchten Cephalosporinen und Carbapenemen blieb gleich. Einfluss auf die getesteten Nicht- $\beta$ -Laktam-Antibiotika hatte die Deletion beider Gene nicht.

### **4.3.2. $\beta$ -Laktamase-abhängige Antibiotikaresistenz in vivo**

#### **4.3.2.1. Antibiotikaresistenz von JB580v in vivo**

*Scavizzi et al.* zeigten die bereits oben genannten Diskrepanzen des Stamms WA zwischen der In-vitro- und In-vivo-Sensitivität gegenüber bestimmten  $\beta$ -Laktam-Antibiotika auf, die in der vorliegenden Arbeit auch für den Stamm JB580v bestätigt werden konnten. So bewirkte die einmalige i.v.-Gabe von Cefotaxim 24 h p.i. keinen signifikanten Unterschied in der nachgewiesenen bakteriellen Besiedelung der Milz (*Scavizzi et al. 1987*).

Um eine erneute *Yersinia*-Vermehrung zwischen Antibiotikagabe und Milzextraktion (24 h-Intervall) aufgrund eines möglicherweise zu kurz andauernden, antibakteriellen Wirkspiegels als Grund für die weiterhin bestehende hohe Keimlast ausschließen zu können, erfolgte in der vorliegenden Arbeit die Anpassung des In-vivo-Versuchsaufbaus mit der Hinzunahme einer erneuten Antibiotikagabe derselben Dosis 12 h nach der ersten i.v.-Gabe (s. a. Kapitel 3.3.4.1). Dies erfolgte unter der Kenntnis, dass die Serum-Halbwertszeit von Ampicillin in der Maus zwischen 20-30 min beträgt, bei Gentamicin sogar mit nur ca. 15 min beschrieben ist (*Hunter et al. 1973*; *Comber et al. 1975*; *Queiroz et al. 1987*). So konnte im Rahmen meiner Forschung durch die zweimalige

i.v.-Behandlung mit Gentamicin, dem Antibiotikum mit der geringeren Serum-Halbwertszeit, bei JB580v im Durchschnitt eine Keimreduktion in der Milz um 4 log-Stufen nachgewiesen werden (s. a. Abb. 27). Nach zweimaliger intravenöser Ampicillingabe hingegen war kein Unterschied in der Höhe der bakteriellen Milzbesiedelung zu verzeichnen (s. a. Abb. 22). Als Ursache für die geringere Wirksamkeit des  $\beta$ -Laktam-Antibiotikums erscheint eine zu geringe Serum-Halbwertszeit, und somit ein zu kurz andauernder ausreichender Wirkspiegel des Antibiotikums, eher unwahrscheinlich.

Allerdings konnte bei der Cefotaximtestung im Mausinfektions-Antibiotikatherapie-Modell durch die zweite i.v.-Gabe des 3. Generation Cephalosporins eine nachweisbar moderate Reduktion der Keimzahl in der Milz belegt werden. Bei *Scavizzi et al.* und in dieser Arbeit war die KBE in der Milz nach einmaliger intravenöser Cefotaximgabe der KBE der unbehandelten Gruppe ähnlich (*Scavizzi et al. 1987*). Erst die zweimalige intravenöse Cefotaximgabe in dieser Arbeit bewirkte zumindest eine Reduktion um 1 log-Stufe. Dabei besitzt Cefotaxim im Mausmodell eine Halbwertszeit von ca. 20 min (*Inouye et al. 1984*). Durch den Wechsel des Antibiotikums auf Ceftriaxon, das bei gleichem Keimspektrum wie Cefotaxim aufgrund seiner höheren Plasmaproteinbindung eine längere Halbwertszeit im Blutplasma besitzt (im Rahmen eines Pneumokokkeninfektionsmodells mit ca. 1 h für die Maus beschrieben), konnten die KBE in der Milz sogar um 2 log-Stufen reduziert werden (*Unowsky et al. 1989; Wang et al. 2000*). Ein mit Gentamicin vergleichbarer Effekt konnte jedoch auch hierdurch nicht erreicht werden. Dies könnte u. a. dadurch bedingt sein, dass das Aminoglykosid Gentamicin im Gegensatz zu den  $\beta$ -Laktam-Antibiotika nicht nur gegen proliferierende, sondern auch gegen ruhende Bakterien wirkt (*Anonymous 1967*). Der Zeitpunkt der ersten i.v.-Antibiotikagabe wurde anhand vorbestehender Wachstumskinetiken so gewählt, dass sich das bakterielle Wachstum in vivo in der exponentiellen Phase befinden sollte, man also vornehmlich von proliferierenden Bakterien ausgehen kann (*Scavizzi et al. 1987*). Darüber hinaus zeigen Aminoglykoside im Vergleich zu  $\beta$ -Laktam-Antibiotika einen ausgeprägten postantibiotischen Effekt (PAE) gegenüber gramnegativen Bakterien (*Zhanet et al. 1991*). Der PAE beschreibt die Hemmwirkung eines Antibiotikums auf ein Bakterium noch nach dem Abfallen seines Wirkspiegels unter die MHK (*Craig and Vogelman 1987*). Er beruht auf einer wirkstoffspezifischen Bindungsaffinität zu den jeweiligen Zielstrukturen. Während Gentamicin so die bakterielle Proliferation noch nach seiner Elimination aus dem Blutstrom hemmt, können sich gramnegative Keime wie *Y. enterocolitica* zügig nach dem Abfall des  $\beta$ -Laktam-Wirkspiegels vermehren. Die Begründung von *Scavizzi et al.*, dass für die verminderte Wirkung der  $\beta$ -Laktam-Antibiotika die intrazelluläre Replikation von humanpathogenen *Y. enterocolitica* (und somit die schlechtere Erreichbarkeit für die  $\beta$ -Laktam-Antibiotika) verantwortlich sei, trifft nicht zu, da bereits bewiesen werden konnte, dass sich *Y. enterocolitica* vornehmlich extrazellulär vermehrt (*Oellerich et al. 2007*).

Zusammenfassend lässt sich aufgrund dieser Mechanismen die Überlegenheit der Gentamicintherapie gegenüber der  $\beta$ -Laktam-Therapie erklären.

#### 4.3.2.2. Der Beitrag der $\beta$ -Laktamasen bei der $\beta$ -Laktam-Antibiotikaresistenz von JB580v in vivo

Als mögliche Ursache für die fehlende Wirksamkeit von  $\beta$ -Laktam-Antibiotika in vivo könnte u. a. eine erhöhte Expression der vorhandenen  $\beta$ -Laktamasen in Betracht gezogen werden. Hierzu gibt es bereits bei anderen Erregern in der Literatur zahlreiche Beispiele: *Tracz et al.* konnten exemplarisch die deutliche Resistenzzunahme gegenüber dem Cephalosporin Cefoxitin bei *Escherichia coli* N99-0001 (klinisches Isolat) auf eine isolierte Überexpression des  $\beta$ -Laktamase-Gens *ampC* (induzierte Derepression) zurückführen (*Tracz et al. 2005*). *Figueiredo et al.* wiesen sogar die Resistenzentwicklung bei *Acinetobacter baumannii* (klinisches Isolat) gegenüber Carbapenemen während einer Imipenemtherapie aufgrund einer Überexpression des Oxacillinase-Gens *bla(OXA-66)* nach (*Figueiredo et al. 2009*). Zudem hat die Penicillinase BlaA von *Y. enterocolitica* in vitro ihre höchste Aktivität bei einem pH-Wert von ca. 6,5 (*Cornelis and Abraham 1975*). Dies könnte auch eine vermehrte Expression und somit verbesserte Wirkung von BlaA im sauren Milieu – wie z. B. in Abszessen – bewirken.

Ob eine erhöhte Aktivität der  $\beta$ -Laktamasen von *Y. enterocolitica* während der Infektion die Ursache für die nachgewiesene Diskrepanz zwischen der  $\beta$ -Laktam-Resistenz in vitro und in vivo bei *Y. enterocolitica* sein könnte, war unter Zuhilfenahme von den in dieser Arbeit hergestellten  $\beta$ -Laktamase-Deletionsmutanten zu untersuchen. Dies erlaubte differenzierte Aussagen zum spezifischen Beitrag der zwei  $\beta$ -Laktamasen im Bezug auf die  $\beta$ -Laktam-Resistenz von *Y. enterocolitica* JB580v zu treffen.

So konnte gezeigt werden, dass die Deletion von *ampC* aufgrund der Substratspezifität von AmpC (Cephalosporinase) erwartungsgemäß keinen Einfluss auf die Ampicillinresistenz in vivo hatte und die zweimalige i.v.-Ampicillingabe (wie beim Ausgangsstamm) zu keiner Reduktion der bakteriellen Milzbesiedelung führte. Bei der *blaA*-Deletionsmutante (Penicillinase) hingegen konnte die in der Milz nachgewiesene Keimzahl durch die zweimalige i.v.-Gabe von Ampicillin von im Schnitt  $1,10 \times 10^8$  KBE auf  $2,87 \times 10^6$  KBE gesenkt werden (s. a. Abb. 22). Ein additiver Effekt durch die Deletion beider  $\beta$ -Laktamasen war nicht festzustellen. Umgekehrt bewirkte die Deletion von *blaA* bei der Behandlung mit Cephalosporin Cefotaxim keinen Resistenzunterschied zum Ausgangsstamm, während die gleiche Behandlung bei der *ampC*-Deletionsmutante zu einer signifikanten Reduktion der KBE in der Milz führte. Die Behandlung mit dem länger wirksamen Ceftriaxon zeigte verglichen mit Cefotaxim zwar eine weitere Reduktion der Keimzahl, ein signifikanter Unterschied zwischen dem Ausgangsstamm JB580v und der  $\beta$ -Laktamase-negativen *blaA/ampC*-Doppeldelentionsmutante konnte aber nicht festgestellt werden, da keine Induktion von AmpC erfolgt.

Die erwartete jeweilige Substratspezifität beider Enzyme (BlaA als Klasse A Penicillinase und AmpC als Klasse C Cephalosporinase) mit einer gewissen Mitwirkung an der Resistenzbildung gegenüber einzelnen Substanzen konnte somit in vivo gezeigt werden. Im Gegensatz zu den gewonnenen In-vitro-Daten konnte für AmpC durch die zugrundeliegende Forschungsarbeit sogar eine Wirksamkeit gegenüber Cefotaxim in vivo gezeigt werden.

Unter Kenntnis der vorab bestimmten hohen Sensitivität *in vitro*, ist die Effektivität der getesteten  $\beta$ -Laktam-Antibiotika *in vivo* im Vergleich zu Gentamicin und Doxyzyklin als deutlich weniger effektiv einzustufen. Eine Überexpression der vorhandenen  $\beta$ -Laktamasen als mögliche Ursache des Resistenzverhaltens *in vivo* ist somit eher auszuschließen. Unterstützt wird dies durch die Erkenntnis, dass die Überexpression von *ampC* *in vitro* das Wachstum von *Y. enterocolitica* deutlich reduziert (Schriefer 2012). Sollte es *in vivo* demnach zu einer vermehrten Expression von *ampC* kommen, hätte vermutlich auch die Proliferation *in vivo* und somit die KBE in der Milz zu Versuchsende reduziert sein müssen.

Des Weiteren muss berücksichtigt werden, dass die zweimalige relativ hohe Dosis von Meropenem, einem  $\beta$ -Laktamase-stabilen Carbapenem, trotz deutlicher Sensitivität im *in vitro*-Versuch weder beim Ausgangsstamm noch bei der Doppeldeletionsmutante zu einer Abnahme der Keimbesiedelung in der Milz führte. Diese von den  $\beta$ -Laktamasen unabhängige Resistenz von JB580v unterstützt die Annahme, dass BlaA und AmpC von *Y. enterocolitica* aufgrund ihrer Substratspezifität gegenüber Meropenem keine Wirkung besitzen, und lässt vermuten, dass ein anderer Resistenzmechanismus die Unempfindlichkeit gegenüber  $\beta$ -Laktam-Antibiotika vermittelt.

Dies wird auch dadurch gestützt, dass im Gegensatz zu *Y. enterocolitica* *Y. pseudotuberculosis* und *Y. pestis* typischerweise keine chromosomalen  $\beta$ -Laktamase-Gene besitzen und die *in vitro* hoch wirksamen  $\beta$ -Laktam-Antibiotika Amoxicillin und Cefotaxim auch bei *Y. pseudotuberculosis* keine ausreichende Wirksamkeit *in vivo* zeigen (Scavizzi *et al.* 1987; Lemaitre *et al.* 1991; Bonacorsi *et al.* 1994). *Y. pestis* hingegen ist *in vivo* empfindlich gegenüber Ampicillin und Cefotaxim (Bonacorsi *et al.* 1994).

*Y. enterocolitica* besitzt als einzige der humanpathogenen Yersinien  $\beta$ -Laktamasen. Die Rolle der  $\beta$ -Laktamasen von *Y. enterocolitica* für die Resistenz ist jedoch nicht völlig geklärt. Das Vorhandensein von zwei chromosomalen  $\beta$ -Laktamasen mit unterschiedlicher Substratspezifität stellt einen verbesserten Schutz gegen bakterizide  $\beta$ -Laktam-Antibiotika und somit einen Überlebensvorteil gegenüber anderen Keimen dar. Die  $\beta$ -Laktamasen bewirken allerdings im Wirt keine wirksame Resistenz gegenüber den getesteten, in der Klinik häufig verwendeten  $\beta$ -Laktam-Antibiotika. Wahrscheinlich bieten BlaA und BlaB vornehmlich einen Schutz gegenüber von Pilzen produzierten „natürlichen Penicillinen“ (z. B. Penicillin G) und Cephalosporinen (Cephalosporin C) z. B. in der Umwelt (s. Kapitel 1.4.4.3). Zu bemerken ist, dass die  $\beta$ -Laktamase-Gene von *Y. enterocolitica* keine mobilen genetischen Elemente darstellen und sie chromosomal kodiert und stabil im Genom verankert sind (Garzetti *et al.* 2012). Aufgrund der restriktiven chromosomalen Stabilität von *Y. enterocolitica* ist nicht davon auszugehen, dass sich *Y. enterocolitica* erst im letzten Jahrhundert durch die Entdeckung, Entwicklung und zunehmend breitere Anwendung von Antibiotika angepasst hat, sondern dass die  $\beta$ -Laktamasen für *Y. enterocolitica* bereits deutlich früher zu einem Überlebensvorteil beitrugen, z. B. als Schutz vor Pilzen, die im selben Umwelthabitat vorkommen können (z. B. Fäkalien, Tierkadaver, ...) und  $\beta$ -Laktam-Antibiotika produzieren. Bei Stabilität in einem relativ breiten Temperaturintervall (15 °C bis 55 °C) zeigt BlaA von *Y. enterocolitica* *in vitro* die höchste Aktivität in einem Temperaturbereich von 30 - 45 °C – übertragen auf den Lebenszyklus von *Y. enterocolitica* bedeutet das eine Anpassung an

warmblütige Tiere nach Besiedelung oder Infektion (Schriefer *et al.* 2013). Doch ist BlaA auch außerhalb des Wirts bei Umwelttemperaturen aktiv. Die maximale Expression könnte so einen besseren Sofortschutz bedeuten, da die bereits produzierten Enzyme auch bei größeren Temperaturschwankungen aktiv sind. Dies könnte *Y. enterocolitica* ermöglichen, sich rasch in einer neuen Umgebung anzusiedeln. Diese Hypothese wird auch durch die Tatsache unterstützt, dass die als nicht humanpathogen geltenden Umweltkeime *Yersinia intermedia* und *Yersinia frederiksenii* die  $\beta$ -Laktamasen BlaA und AmpC produzieren (Mittal *et al.* 2007).

#### 4.4. Immunfluoreszenzmikroskopische Untersuchungsergebnisse

Um die Wirtsantwort und die Antibiotikawirkung auf *Y. enterocolitica* in der Akutphase der Infektion zu untersuchen, wurde eine immunfluoreszenzmikroskopische Analyse mit *Yersinia*- und immunzellspezifischen Antikörpern an Kryomikrotom-Milzschnitten von *Y. enterocolitica* infizierten Mäusen durchgeführt. Hierbei konnte festgestellt werden, dass die Yersinien nach Erreichen der Milz über die Blutstrombahn ca. 27 h p.i. (Zeitpunkt der ersten Antibiotikagabe) erste kleine locker gepackte Mikrokolonien bilden, die nahe der Marginalzone lokalisiert sind und sich in Richtung der weißen Pulpa ausbreiten (s. a. S. 86, Abb. 28 oben).

Bereits in diesem frühen Stadium werden die Mikrokolonien von einer Vielzahl von PMN infiltriert. Obwohl zahlreich vorhanden war es den PMN nicht möglich, die beginnende Koloniebildung von *Y. enterocolitica* zu verhindern und die Bakterien aus der Milz zu eliminieren.

Nach 51 h p.i. (Zeitpunkt der Splenektomie) konnten trotz einer deutlichen Zunahme der PMN vor Ort dicht gepackte Bakterienkolonien nachgewiesen werden (s. a. S. 86, Abb. 28 unten). Selbst die zweimalige intravenöse Gabe von Ampicillin oder Meropenem bewirkte augenscheinlich keine Änderung der Mikrokolonienmorphologie bzw. PMN-Rekrutierung im Vergleich zur nicht behandelten Gruppe (s. a. S. 89, Abb. 30, Zeile 2-3). Durch die Gabe von Gentamicin oder Doxzyklin konnte hingegen die Mikrokoloniebildung frühzeitig unterbrochen werden (s. a. S. 89, Abb. 30, Zeile 4-5). Nach zweimaliger i.v.-Gabe ließen sich in den PMN-infiltrierten Regionen kaum intakte Yersinien nachweisen. Auch die PMN-Rekrutierung war deutlich geringer als in der Vergleichsgruppe.

Eine mögliche Erklärung beruht auf dem Wirkmechanismus der jeweiligen Antibiotika: Während die bakterizid-bakteriolytisch wirkenden  $\beta$ -Laktam-Antibiotika eine Lyse der Bakterienzelle und somit eine Freisetzung von sog. PAMP's („*pathogen-associated molecular patterns*“ = Pathogen assoziierte molekulare Muster; z. B. LPS oder bakterielle DNS) bewirken, die eine Immunstimulation des Wirtes triggern und zu einer vermehrten Chemotaxis von PNM führen, kommt es beim bakteriostatischen Doxzyklin und auch beim bakteriziden (jedoch nicht bakteriolytisch wirkenden) Gentamicin zu einer Hemmung der Proteinbiosynthese. Hierdurch wird u. a. die Produktion von Effektorproteinen (Yops des T3SS, s. a. Kapitel 1.2.5.2.2) gehemmt, wodurch *Y. enterocolitica* u. a. die Yop-abhängige Inhibition der Phagozytose sowie der Bildung

von Sauerstoffradikalen nicht mehr aufrecht erhalten kann (*Songsunghong et al. 2010*). Hierdurch ist es den neu infiltrierenden PMN möglich, die Yersinien zu beseitigen und eine Koloniebildung zu verhindern.

#### 4.5. Die Bedeutung von OmpF bei der Antibiotikaresistenz von *Y. enterocolitica*

Die äußere Membran mit seiner hydrophoben Phospholipiddoppelschicht stellt eine wichtige Barrierefunktion für geladene, hydrophile Stoffe dar (s. a. Kapitel 1.4.2.1). Um dennoch den notwendigen Stoffaustausch hydrophiler Moleküle zu ermöglichen, enthält die äußere Membran verschiedene Porine für einen spezifischen passiven Stoffaustausch. Neben der lebensnotwendigen Aufnahme von Nährstoffen und Salzen bei gleichzeitiger Barrierefunktion gegenüber schädigenden Stoffen wie Gallensalzen, Lysozym und Antibiotika stellen Porine Zielstrukturen für Phagen und Bakteriocine dar, sind z. T. immunogene Antigene, die eine Aktivierung von Phagozyten oder eine Antikörperproduktion des Wirts bewirken oder das Komplementsystem aktivieren (*Achouak et al. 2001*).

Bekanntermaßen kommt es z. B. bei einem sauren pH-Wert, O<sub>2</sub>-Stress oder einer Temperatur von 37 °C (mit Infektionsbedingungen im Wirt vergleichbar) zu einer Reduktion der Expression von OmpF, einem Hauptvertreter der Porine, welches aufgrund seines größeren Innendurchmessers im geöffneten Zustand eine schnelle Passage verschiedener Moleküle (auch Antibiotika) aus dem Extrazellularraum in den periplasmatischen Raum zulässt (*Brzostek and Raczkowska 2007; Kumar et al. 2010; Vostrikova et al. 2013*).

β-Laktam-Antibiotika müssen die äußere Membran überwinden, um an ihren Zielort, das Periplasma, zu gelangen (*Heesemann 1993*). Während die Phospholipiddoppelschicht für Cephalosporine wie Cefazolin aufgrund ihrer Größe, Ladung und Konfiguration kaum durchdringbar ist und diese Stoffe über Porine in den periplasmatischen Raum gelangen müssen, kann Ampicillin durch Diffusion die Lipiddoppelschicht überwinden (*Nikaido et al. 1977; van Alphen et al. 1978; Sawai et al. 1982; Yamaguchi et al. 1982*).

Aufgrund der β-Laktamase-unabhängigen Resistenz gegenüber Meropenem wurde zunächst eine meropenemresistente (β-Laktamase-negative) Spontanmutante von JB580v  $\Delta blaA / \Delta ampC / \Delta acrB$  schrittweise selektioniert und deren Außenmembranproteine analysiert. Hierbei zeigte sich u. a. eine starke Reduktion von OmpF im SDS-PAGE. Die daraufhin vom JB580v angefertigte *ompF*-Deletionsmutante zeigte in vitro jedoch keine signifikanten Unterschiede in der Resistenz gegenüber β-Laktam-Antibiotika im Vergleich zum Ausgangsstamm – weder bei 27 °C noch bei 37 °C. Ein temperaturabhängiges Phänomen konnte somit ausgeschlossen werden.

*Buscher et al.* beschrieben die selektive Resistenzzunahme von *Pseudomonas aeruginosa* gegenüber Imipenem durch einen Porinverlust (ohne Kreuzresistenz gegenüber anderen Antibiotika) (*Buscher et al. 1987*). Die im Rahmen meiner Forschung hergestellte *ompF*-Deletionsmutante zeigt hingegen für Meropenem und alle anderen getesteten Substanzen in vitro das gleiche Resistenzniveau wie der Ausgangsstamm. Eine isolierte OmpF-

Defizienz ist bei *Y. enterocolitica* JB580v demnach nicht für die ausgeprägte Resistenz gegenüber Meropenem verantwortlich. Auch bei anderen gramnegativen Bakterien führt eine alleinige Verringerung der Außenmembranpermeabilität durch Porinverlust häufig allenfalls zu einem geringfügigen Anstieg der Resistenz, diese kann aber mit anderen Resistenzmechanismen synergistisch wirken (Nikaido 1989; Nikaido 1994). Demnach erscheint es sinnvoll, dass es auch bei *Y. enterocolitica* einem Zusammenspiel verschiedener Resistenzmechanismen bedarf, um eine messbare phänotypische Resistenzänderung zu bewirken. Eine Möglichkeit besteht darin, dass Antibiotika nach Wegfall eines Porins auch über andere Porine in den periplasmatischen Raum gelangen können. Bei *E. coli* stellt für Cefotaxim neben OmpF auch OmpC eine mögliche Eintrittspforte dar – jedoch mit einer deutlich geringeren Diffusionsrate als bei OmpF (Yoshimura and Nikaido 1985). Für *Y. enterocolitica* O:9 und O:5 konnte so bereits gezeigt werden, dass die zusätzliche Deletion von *ompF* bei einer *ompC*-Deletionsmutante zu einer Resistenzzunahme gegenüber bestimmten  $\beta$ -Laktam-Antibiotika führte (Brzostek and Hrebenda 1988; Brzostek and Raczkowska 2007). Des Weiteren wurden in der Literatur auch Fälle beschrieben, bei denen neben der Porindefizienz häufig erst das Vorhandensein einer Klasse C- $\beta$ -Laktamase zu einer signifikanten Erhöhung der Carbapenemresistenz führte (Bradford et al. 1997; Stapleton et al. 1999; Armand-Lefevre et al. 2003). Bei der Antibiotikaaustestung der vorliegenden Arbeit im  $\beta$ -Laktamase-positiven Stamm JB580v  $\Delta ompF$  bewirkten BlaA und AmpC entgegen der Erwartung keine Resistenzveränderung (s. a. Tabelle 33).

Des Weiteren kann es sich bei der Reduktion von OmpF in der Außenmembran auch um ein koinzidentielles Epiphänomen handeln. So könnte es möglich sein, dass ein übergeordneter Regulator, welcher die Expression von Genen für die Meropenemresistenz steuert, die Expression von *ompF* herunterreguliert. Diese Hypothese wird dadurch unterstützt, dass sich im SDS-PAGE des Ganzzelllysats bei der Spontanmutante JB580v<sup>MemR</sup>  $\Delta blaA / \Delta ampC / \Delta acrB$  mehrere Banden vom Ausgangsstamm unterschieden (s. a. Abb. 40). Ein wichtiger Regulator, der Teil eines globalen regulierenden Netzwerkes ist, in verschiedene Prozesse eingreift und u. a. die Expression von *ompF* bei umweltbedingten Stresssignalen herunterregulieren kann, ist die nicht-kodierende RNA *micF* (Delihias and Forst 2001; Delihias 2003). Eine selektionsbedingte Mutation in der Gensequenz sowie den flankierenden ca. 250 Basenpaaren konnte bei der Spontanmutante mittels Sequenzierung ausgeschlossen werden (s. a. Abb. 56).

#### 4.6. Die Bedeutung von AcrB bei der Antibiotikaresistenz von *Y. enterocolitica*

Bakterielle Effluxpumpen mit einer sehr breiten Substratspezifität, sog. „Multi-Drug-Resistance“ (MDR)-Effluxpumpen, transportieren neben Siderophoren, Intermediärmetaboliten und Quorum-sensing-Molekülen auch Schadstoffe wie Gallensalze und Antibiotika aktiv aus der Bakterienzelle. Das Ausschleusen von Antibiotika führt – ggf. in Kombination mit einer verminderten Membranpermeabilität (s. o.) – zu einer intrinsischen Resistenz gegenüber vielen unterschiedlichen Substanzklassen (Nikaido 1996; Nikaido 1998b). Durch die erhöhte Expression dieser

Effluxpumpensysteme, insb. der Familie der „*Resistance-Nodulation-Division*“ (RND)-Transporter, entstehen häufig erworbene Resistenzen gegenüber verschiedenen Antibiotika, Desinfektionsmitteln und Antiseptika (s. a. Kapitel 1.4.3). Eine mögliche Erklärung für die Diskrepanz der  $\beta$ -Laktam-Wirksamkeit *in vitro* vs. *in vivo* bei *Y. enterocolitica* könnte eine vermehrte Ausschleusung von Antibiotika unter Infektionsbedingungen durch ein Effluxpumpensystem sein. Welchen Einfluss das Effluxsystem AcrAB-TolC von *Y. enterocolitica* auf die Resistenzbildung gegenüber den getesteten  $\beta$ -Laktam-Antibiotika und anderen Substanzklassen hat, wurde in dieser Arbeit näher untersucht. Um die Nettoleistung des Effluxpumpensystems ohne  $\beta$ -Laktamasen sowie den möglicherweise auftretenden synergistischen Effekt mitbeurteilen zu können, erfolgte die Deletion von *acrB* im Ausgangsstamm JB580v sowie in der  $\beta$ -Laktamase negativen Doppeldeletionsmutante JB580v  $\Delta$ *blaA* /  $\Delta$ *ampC*.

Bei der In-vitro-Sensitivitätsaustestung konnte nachgewiesen werden, dass die Deletion der Effluxpumpe – unabhängig von den  $\beta$ -Laktamasen – keinen signifikanten Einfluss auf die Resistenz der  $\beta$ -Laktam-Antibiotika Ampicillin, Penicillin G, Cefotaxim, Cefoxitin, Imipenem und Meropenem hat. Hingegen konnte eine Reduktion der minimalen Hemmkonzentration für Cefuroxim und eventuell für Piperacillin gezeigt werden. Bei den übrigen getesteten Antibiotika konnte durch die Deletion von *acrB* eine Sensitivitätserhöhung gegenüber Ciprofloxacin, Tetrazyklin und Doxyzyklin sowie Chloramphenicol, Nalidixinsäure und Novobiocin nachgewiesen werden (s. S. 96, Tabelle 30). Ähnliche Effekte konnten bereits für andere Bakterienarten (wie *Y. pestis*) gezeigt werden (*Lister et al. 2012*). AcrAB transportiert insbesondere lipophile Substanzen (auch  $\beta$ -Laktam-Antibiotika mit lipophilen Seitenketten) in den Extrazellulärraum (*Nikaido et al. 1998; Padilla et al. 2010*). *Lim et al.* konnten zeigen, dass AcrB bei *E. coli* eine hohe Effluxkinetik für Ampicillin besitzt und dieses somit ein gutes Pumpensubstrat darstellt. Durch die Deletion von *acrB* wird die MHK von Ampicillin aber kaum verändert (wahrscheinlich aufgrund der guten Membranpermeabilität von Ampicillin) (*Lim and Nikaido 2010*).

Im Mausinfektions-Antibiotikatherapie-Modell zeigte die *acrB*-Deletionsmutante JB580v  $\Delta$ *acrB* 51 h nach intraperitonealer Infektion eine Attenuierung der Virulenz (geringere Überlebensrate, gemessen in KBE) im Vergleich zum Ausgangsstamm JB580v (s. a. S. 103, Abb. 36). AcrB scheint somit bei *Y. enterocolitica* einen Virulenz- bzw. Fitnessfaktor darzustellen. Ein ähnliches Ergebnis konnten *Padilla et al.* auch für AcrB bei *Klebsiella pneumoniae* zeigen (*Padilla et al. 2010*). Auf *Y. pestis* (KIM 1001) scheint dies aber nicht zuzutreffen (*Lister et al. 2012*). Da für die Mausvirulenz von JB580v und WA314 die Biosynthese und Sekretion von Yersiniabactin (Siderophor) sowie die Aufnahme von Ferri-Yersiniabactin essentiell sind, könnte eine Yersiniabactin-Effluxstörung durch  $\Delta$ *acrB* die Virulenzabschwächung erklären.

Die erwartete erhöhte Empfindlichkeit gegenüber Doxyzyklin nach Deletion von *acrB* konnte bei JB580v *in vivo* bestätigt werden (s. a. S. 106, Abb. 38 links). Wahrscheinlich wird durch die Doxyzyklin-bedingte Proteinbiosynthesehemmung aufgrund der sich intrazellulär schneller anreichernden Antibiotikamenge das T3SS der Efflux-Deletionsmutante frühzeitiger und länger als beim Ausgangsstamm gehemmt und somit die Virulenz (T3SS) stärker reduziert. Dies deckt sich mit der Hypothese, dass der

postantibiotische Effekt mit der zytoplasmatischen Verweildauer des jeweiligen Antibiotikums in Zusammenhang steht.

Nach zweimaliger intravenöser Ampicillingabe zeigte JB580v  $\Delta acrB$  im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe keinen signifikanten Unterschied in der Überlebensrate. Auch bei der  $\beta$ -Laktamase-negativen Vergleichsgruppe war durch die Deletion von *acrB* kein Unterschied in der Nettoüberlebensrate zu erkennen. Eine isolierte Überexpression von *acrB* (mit und ohne  $\beta$ -Laktamasen) unter Infektbedingungen als Ursache für die Ampicillinresistenz kann somit ausgeschlossen werden.

### 4.7. Weitere mögliche Ursachen der Antibiotikaresistenz

Als Ursache für einen Wirkverlust der antimikrobiellen Therapie könnte auch ein erniedrigter pH-Wert innerhalb der Mikrokolonie-Abszessformationen (MKAF) und damit eine reduzierte antimikrobielle Wirkung des Antibiotikums selbst in Frage kommen. *Toala et al.* konnten jedoch mit verschiedenen Bakterienarten zeigen, dass die getesteten  $\beta$ -Laktam-Antibiotika – hierunter auch Ampicillin und Cefotaxim – eine verbesserte Wirkung im sauren pH-Bereich besitzen als im basischen Bereich – im Gegensatz zu Gentamicin, bei dem es sich genau umgekehrt verhält (*Toala et al. 1970*). Hier ist die Wirksamkeit im sauren Milieu (durch die Protonierung der Aminogruppe) herabgesetzt (*Anonymous 1967*).

Auch eine erniedrigte O<sub>2</sub>-Konzentration im infizierten Gewebe (aufgrund des vermehrten Umsatzes) könnte zu einer Reduktion der Antibiotikawirksamkeit führen. Es konnte jedoch von *Verklin und Mandell* gezeigt werden, dass eine O<sub>2</sub>-arme Umgebung kaum einen Einfluss auf die Wirksamkeit von Cephalosporinen hat, jedoch die Wirksamkeit von Gentamicin deutlich herabsetzen kann (*Verklin and Mandell 1977*). Da in dem hier verwendeten Mausinfektionsmodell Gentamicin (im Gegensatz zu Cefotaxim) eine exzellente Wirksamkeit gegenüber *Y. enterocolitica* aufweist, ist die Vermutung, ein O<sub>2</sub>-armes Milieu sei für die geringe Wirksamkeit der  $\beta$ -Laktam-Antibiotika verantwortlich, eher auszuschließen.

Die erhöhte  $\beta$ -Laktam-Resistenz von *Y. enterocolitica* in vivo könnte auch durch biofilm-ähnliches Verhalten innerhalb der sich bildenden Mikrokolonien bedingt sein. So konnte eine Resistenzzunahme durch die Biofilmbildung von Bakterien im Vergleich zu ihrem planktonischen Zustand gezeigt werden (*Mah and O'Toole 2001*). Eine Reduktion der Proliferationsrate bis hin zur Bakteriostase könnte in den Mikrokolonien auch zu einer verminderten Antibiotikawirkung führen (*Tuomanen et al. 1986a; Tuomanen et al. 1986b*). *Y. enterocolitica* könnte so „abgekapselt“ in der Mikrokolonie trotz einer potentiell wirksamen antimikrobiellen Therapie unbeschadet überleben. Bei einer hinsichtlich der Proliferationsrate heterogenen Population würden z. B. 90 % der Bakterien (1 log-Stufe) mit hoher Proliferationsrate (Randregion der MKAF) durch das Antibiotikum abgetötet, während 10 % im Zentrum der MKAF in Bakteriostase zwar für Ampicillin geschützt wären, Gentamicin hier aber noch eine ausreichende Wirkung hätte.

Ein weiterer möglicher Resistenzmechanismus gegenüber  $\beta$ -Laktamase-empfindlichen Antibiotika stellt die Produktion und Freisetzung von Außenmembranvesikeln durch Bakterien dar. Besitzen diese im periplasmatischen Raum funktionsfähige  $\beta$ -Laktamasen, können diese wiederum in das Innere der Vesikel aufgenommen werden und so  $\beta$ -Laktam-Antibiotika noch vor Erreichen der Bakterienzelle abfangen. Eine erhöhte Produktion oder eine vermehrte Dichte der Vesikel um die Bakterienzelle bzw. die Mikrokolonie herum, könnte diese effektiv abschirmen. Eine OMV-bedingte Resistenz konnte bereits u. a. von *Schaar et al.* für *M. catarrhalis* gezeigt werden (*Schaar et al. 2011*). Auf *Y. enterocolitica* trifft dies eher nicht zu, da sich eine Resistenz auch in der  $\beta$ -Laktamase-negativen Mutante zeigte.

Schließlich könnte bei *Y. enterocolitica* auch das plasmidkodierte trimere Adhäsın YadA (Lollipop-Struktur, s. a. Abb. 3) in der äußeren Membran aufgrund der dichten Packung eine Diffusionsbarriere für  $\beta$ -Laktam-Antibiotika bilden (*Hoiczky et al. 2000*).

## 5. Ausblick

Forschung, die die bakteriellen Resistenzmechanismen gegenüber Antibiotika untersucht, ist heute wichtiger denn je. Erst die hierdurch gewonnenen Erkenntnisse versetzen uns in die Lage, sehr gezielt neue Wirkstoffe zu entwickeln, mit denen eine effektive Therapie erfolgen kann und die bestmögliche Behandlung des Patienten gewährleistet wird.

Da die Yersiniose bei gesunden Menschen in der Regel selbstlimitierend verläuft, aber bei abwehrschwachen Patienten, älteren Personen und Kleinkindern oftmals eine Antibiotikatherapie erfordert, sollten aufgrund der zunehmenden Antibiotikaresistenzentwicklung in der Bevölkerung die Risikofaktoren dieser verbreiteten Krankheit klar benannt werden, damit eine Infektion und die dadurch möglicherweise verbundene Antibiotikagabe präventiv vermieden und so der wachsenden Resistenzentwicklung entgegengewirkt werden kann.

Auch im Krankenhaus kann die Entstehung und Verbreitung multiresistenter Keime bereits durch Schulungen des medizinischen Personals im Umgang mit Keimpatienten, durch die Anwendung einfacher und effektiver Hygienemaßnahmen und durch die sinnvolle Verwendung antimikrobieller Substanzen deutlich reduziert werden.

Die in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse zeigen u. a., dass die im klinischen Alltag verwendeten Standardtestmethoden möglicherweise nur eine eingeschränkte Zuverlässigkeit hinsichtlich einer Therapieempfehlung besitzen. Insbesondere bei der Entwicklung neuer Substanzen und Wirkstoffkombinationen sowie der Austestung multiresistenter Bakterien sollte man sich in letzter Instanz nicht nur auf In-vitro-Testergebnisse verlassen, sondern unter Umständen auch eine In-vivo-Austestung in Betracht ziehen, um die tatsächliche antibakterielle Wirksamkeit bzw. bakterielle Resistenz in Erfahrung zu bringen.

Durch die Inhibierung bzw. Inaktivierung bakterieller Effluxpumpen ist es prinzipiell möglich, die Erregerempfindlichkeit gegenüber bestimmten Antibiotikaklassen zugunsten einer verbesserten antimikrobiellen Therapie zu erhöhen. Die hierfür benötigten Effluxpumpen-Inhibitoren stellen vielversprechende Substanzen bei der Entwicklung neuer Wirkstoffe und Wirkstoffkombinationen gegen effluxpumpenbedingte intrinsische und erworbene Resistenzen multiresistenter Keime dar (*Lomovskaya et al. 2001; Lomovskaya and Bostian 2006*).

Ein besonderer Aspekt der In-vivo-Untersuchungsergebnisse von Hemmern der Proteinbiosynthese (Tetrazyklin, Doxyzyklin, Gentamicin) und ihre hohe Wirksamkeit könnte durch das Typ 3-Sekretionssystem (T3SS) und die „injizierten“ Yop-Effektoren begründet sein: die Proteinbiosynthese-Hemmung entspräche einer „Entwaffnung“ der Yersinien. Eine ähnlich hohe Wirksamkeit von Tetrazyklin und Chloramphenicol wird bei Infektionen mit intrazellulären Erregern, deren Virulenz auch auf T3SS beruht (wie Chlamydien, Salmonellen und Shigellen), beobachtet. Die Wahl der Antibiotika zur Therapie sollte auch das Virulenzprinzip des Erregers berücksichtigen.

## 6. Literaturverzeichnis

- Abraham, E. P. and Chain, E. (1940). "An enzyme from bacteria able to destroy penicillin. [letter]." Nature **3713 (146)**: 837.
- Abraham, E. P. and Newton, G. G. F. (1961). "The structure of cephalosporin C." Biochem J **79(2)**: 377-393.
- Achouak, W., Heulin, T., et al. (2001). "Multiple facets of bacterial porins." FEMS Microbiol Lett **199(1)**: 1-7.
- Adams, M. R., Little, C. L., et al. (1991). "Modelling the effect of pH, acidulant and temperature on the growth rate of *Yersinia enterocolitica*." J Appl Bacteriol **71(1)**: 65-71.
- al-Hendy, A., Toivanen, P., et al. (1992). "Lipopolysaccharide O side chain of *Yersinia enterocolitica* O:3 is an essential virulence factor in an orally infected murine model." Infect Immun **60(3)**: 870-875.
- Alekshun, M. N. and Levy, S. B. (2007). "Molecular mechanisms of antibacterial multidrug resistance." Cell **128(6)**: 1037-1050.
- Amanuma, H. and Strominger, J. L. (1980). "Purification and properties of penicillin-binding proteins 5 and 6 from *Escherichia coli* membranes." J Biol Chem **255(23)**: 11173-11180.
- Ambler, R. P. (1980). "The structure of beta-lactamases." Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci **289(1036)**: 321-331.
- Amirmozafari, N. and Robertson, D. C. (1993). "Nutritional requirements for synthesis of heat-stable enterotoxin by *Yersinia enterocolitica*." Appl Environ Microbiol **59(10)**: 3314-3320.
- Andersen, C. (2003). "Channel-tunnels: outer membrane components of type I secretion systems and multidrug efflux pumps of Gram-negative bacteria." Rev Physiol Biochem Pharmacol **147**: 122-165.
- Andrews, J. M. (2001). "Determination of minimum inhibitory concentrations." J Antimicrob Chemother **48 Suppl 1**: 5-16.
- Anonymous (1967). "Gentamicin." Br Med J **1(5533)**: 158-159.
- Antonenko, V., Pawlow, V., et al. (2003). "Characterization of a novel unique restriction-modification system from *Yersinia enterocolitica* O:8 1B." FEMS Microbiol Lett **219(2)**: 249-252.
- Archer, R. A. and Kitchell, B. S. (1966). "Chemistry of cephalosporin antibiotics. VI. Carbamate formation in aqueous bicarbonate solutions of 7-ACA." J Org Chem **31(10)**: 3409-3411.

- Armand-Lefevre, L., Leflon-Guibout, V., et al. (2003). "Imipenem resistance in *Salmonella enterica* serovar Wien related to porin loss and CMY-4 beta-lactamase production." Antimicrob Agents Chemother **47**(3): 1165-1168.
- Autenrieth, I. B. and Firsching, R. (1996). "Penetration of M cells and destruction of Peyer's patches by *Yersinia enterocolitica*: an ultrastructural and histological study." J Med Microbiol **44**(4): 285-294.
- Autenrieth, I. B., Vogel, U., et al. (1993). "Experimental *Yersinia enterocolitica* infection in euthymic and T-cell-deficient athymic nude C57BL/6 mice: comparison of time course, histomorphology, and immune response." Infect Immun **61**(6): 2585-2595.
- Batchelor, F. R., Doyle, F. P., et al. (1959). "Synthesis of Penicillin: 6-Aminopenicillanic Acid in Penicillin Fermentations." Nature **183**(4656): 257-258.
- Batzilla, J., Heesemann, J., et al. (2011). "The pathogenic potential of *Yersinia enterocolitica* 1A." Int J Med Microbiol **301**(7): 556-561.
- Bebrone, C. (2007). "Metallo-beta-lactamases (classification, activity, genetic organization, structure, zinc coordination) and their superfamily." Biochem Pharmacol **74**(12): 1686-1701.
- Bengoechea, J. A., Najdenski, H., et al. (2004). "Lipopolysaccharide O antigen status of *Yersinia enterocolitica* O:8 is essential for virulence and absence of O antigen affects the expression of other *Yersinia* virulence factors." Mol Microbiol **52**(2): 451-469.
- Bent, Z. W., Branda, S. S., et al. (2013). "The *Yersinia enterocolitica* Ysa type III secretion system is expressed during infections both in vitro and in vivo." Microbiologyopen **2**(6): 962-975.
- Bent, Z. W. and Young, G. M. (2010). "Contribution of BlaA and BlaB beta-lactamases to antibiotic susceptibility of *Yersinia enterocolitica* biovar 1B." Antimicrob Agents Chemother **54**(9): 4000-4002.
- Bialas, N., Kasperkiewicz, K., et al. (2012). "Bacterial Cell Surface Structures in *Yersinia enterocolitica*." Arch Immunol Ther Exp (Warsz) **60**(3): 199-209.
- Birnbaum, J., Kahan, F. M., et al. (1985). "Carbapenems, a new class of beta-lactam antibiotics: Discovery and development of imipenem/cilastatin." The American Journal of Medicine **78**(6, Supplement 1): 3-21.
- Bliska, J. B. and Falkow, S. (1992). "Bacterial resistance to complement killing mediated by the Ail protein of *Yersinia enterocolitica*." Proc Natl Acad Sci U S A **89**(8): 3561-3565.
- Blumberg, P. M. and Strominger, J. L. (1974). "Interaction of penicillin with the bacterial cell: penicillin-binding proteins and penicillin-sensitive enzymes." Bacteriol Rev **38**(3): 291-335.
- Bodmann, K. F., Grabein, B., et al. (2010). "Empfehlungen zur kalkulierten parenteralen Initialtherapie bakterieller Erkrankungen bei Erwachsenen - Update 2010." Chemother J **19**(6): 179-255.

- Boland, A. and Cornelis, G. R. (1998). "Role of YopP in suppression of tumor necrosis factor alpha release by macrophages during Yersinia infection." Infect Immun **66**(5): 1878-1884.
- Bolin, I., Norlander, L., et al. (1982). "Temperature-inducible outer membrane protein of Yersinia pseudotuberculosis and Yersinia enterocolitica is associated with the virulence plasmid." Infect Immun **37**(2): 506-512.
- Bonacorsi, S. P., Scavizzi, M. R., et al. (1994). "Assessment of a fluoroquinolone, three beta-lactams, two aminoglycosides, and a cycline in treatment of murine Yersinia pestis infection." Antimicrob Agents Chemother **38**(3): 481-486.
- Bottone, E. J. (1977). "Yersinia enterocolitica: a panoramic view of a charismatic microorganism." CRC Crit Rev Microbiol **5**(2): 211-241.
- Bottone, E. J. (1997). "Yersinia enterocolitica: the charisma continues." Clin Microbiol Rev **10**(2): 257-276.
- Bottone, E. J. (1999). "Yersinia enterocolitica: overview and epidemiologic correlates." Microbes Infect **1**(4): 323-333.
- Bradford, P. A. (2001). "Extended-spectrum beta-lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat." Clin Microbiol Rev **14**(4): 933-951, table of contents.
- Bradford, P. A., Urban, C., et al. (1997). "Imipenem resistance in Klebsiella pneumoniae is associated with the combination of ACT-1, a plasmid-mediated AmpC beta-lactamase, and the loss of an outer membrane protein." Antimicrob Agents Chemother **41**(3): 563-569.
- Brzostek, K. and Hrebenda, J. (1988). "Outer-membrane permeability to beta-lactam antibiotics in Yersinia enterocolitica." J Gen Microbiol **134**(6): 1535-1540.
- Brzostek, K. and Raczowska, A. (2007). "The YompC protein of Yersinia enterocolitica: molecular and physiological characterization." Folia Microbiol (Praha) **52**(1): 73-80.
- Bugg, T. D. and Walsh, C. T. (1992). "Intracellular steps of bacterial cell wall peptidoglycan biosynthesis: enzymology, antibiotics, and antibiotic resistance." Nat Prod Rep **9**(3): 199-215.
- Buscher, K. H., Cullmann, W., et al. (1987). "Imipenem resistance in Pseudomonas aeruginosa resulting from diminished expression of an outer membrane protein." Antimicrob Agents Chemother **31**(5): 703-708.
- Bush, K. (1989). "Characterization of beta-lactamases." Antimicrob Agents Chemother **33**(3): 259-263.
- Bush, K. and Fisher, J. F. (2011). "Epidemiological expansion, structural studies, and clinical challenges of new beta-lactamases from gram-negative bacteria." Annu Rev Microbiol **65**: 455-478.

- Bush, K. and Jacoby, G. A. (2010). "Updated functional classification of beta-lactamases." Antimicrob Agents Chemother **54**(3): 969-976.
- Bush, K., Jacoby, G. A., et al. (1995). "A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure." Antimicrob Agents Chemother **39**(6): 1211-1233.
- Carniel, E. (2001). "The Yersinia high-pathogenicity island: an iron-uptake island." Microbes Infect **3**(7): 561-569.
- Carniel, E. and Mollaret, H. H. (1990). "Yersiniosis." Comp Immunol Microbiol Infect Dis **13**(2): 51-58.
- Chang, A. C. and Cohen, S. N. (1978). "Construction and characterization of amplifiable multicopy DNA cloning vehicles derived from the P15A cryptic miniplasmid." J Bacteriol **134**(3): 1141-1156.
- Cole, M. (1966). "Formation of 6-aminopenicillanic acid, penicillins, and penicillin acylase by various fungi." Appl Microbiol **14**(1): 98-104.
- Comber, K. R., Osborne, C. D., et al. (1975). "Comparative effects of amoxycillin and ampicillin in the treatment of experimental mouse infections." Antimicrob Agents Chemother **7**(2): 179-185.
- Cornelis, G. (1975). "Distribution of beta-lactamases A and B in some groups of yersinia enterocolitica and their role in resistance." J Gen Microbiol **91**(2): 391-402.
- Cornelis, G. and Abraham, E. P. (1975). "Beta-lactamases from Yersinia enterocolitica." J Gen Microbiol **87**(2): 273-284.
- Cornelis, G., Laroche, Y., et al. (1987). "Yersinia enterocolitica, a primary model for bacterial invasiveness." Rev Infect Dis **9**(1): 64-87.
- Cornelis, G. R. (2002). "The Yersinia Ysc-Yop 'type III' weaponry." Nat Rev Mol Cell Biol **3**(10): 742-752.
- Cornelis, G. R. (2006). "The type III secretion injectisome." Nat Rev Microbiol **4**(11): 811-825.
- Cornelis, G. R., Boland, A., et al. (1998). "The virulence plasmid of Yersinia, an antihost genome." Microbiol Mol Biol Rev **62**(4): 1315-1352.
- Cornelis, G. R. and Wolf-Watz, H. (1997). "The Yersinia Yop virulon: a bacterial system for subverting eukaryotic cells." Mol Microbiol **23**(5): 861-867.
- Cover, T. L. and Aber, R. C. (1989). "Yersinia enterocolitica." N Engl J Med **321**(1): 16-24.
- Craig, W. A. and Vogelstein, B. (1987). "The postantibiotic effect." Ann Intern Med **106**(6): 900-902.

- Dalhoff, A., Janjic, N., et al. (2006). "Redefining penems." Biochem Pharmacol **71**(7): 1085-1095.
- Datsenko, K. A. and Wanner, B. L. (2000). "One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(12): 6640-6645.
- de Sauvage, F. J., Camerato, T. R., et al. (1991). "Primary structure and functional expression of the human receptor for *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin." J Biol Chem **266**(27): 17912-17918.
- Delcour, A. H. (2009). "Outer membrane permeability and antibiotic resistance." Biochim Biophys Acta **1794**(5): 808-816.
- Delihias, N. (2003). "Annotation and evolutionary relationships of a small regulatory RNA gene *micF* and its target *ompF* in *Yersinia* species." BMC Microbiol **3**: 13.
- Delihias, N. and Forst, S. (2001). "MicF: an antisense RNA gene involved in response of *Escherichia coli* to global stress factors." J Mol Biol **313**(1): 1-12.
- Delor, I. and Cornelis, G. R. (1992). "Role of *Yersinia enterocolitica* Yst toxin in experimental infection of young rabbits." Infect Immun **60**(10): 4269-4277.
- Delor, I., Kaeckenbeeck, A., et al. (1990). "Nucleotide sequence of *yst*, the *Yersinia enterocolitica* gene encoding the heat-stable enterotoxin, and prevalence of the gene among pathogenic and nonpathogenic *Yersinia*." Infect Immun **58**(9): 2983-2988.
- Devenish, J. A. and Schiemann, D. A. (1981). "An abbreviated scheme for identification of *Yersinia enterocolitica* isolated from food enrichments on CIN (cefsulodin-irgasan-novobiocin) agar." Can J Microbiol **27**(9): 937-941.
- Diaz, R., Urrea, E., et al. (1985). "Characterization of a *Yersinia enterocolitica* antigen common to enterocolitis-associated serotypes." J Clin Microbiol **22**(6): 1035-1039.
- Drawz, S. M. and Bonomo, R. A. (2010). "Three decades of beta-lactamase inhibitors." Clin Microbiol Rev **23**(1): 160-201.
- Edwards, J. R., Turner, P. J., et al. (1989). "In vitro antibacterial activity of SM-7338, a carbapenem antibiotic with stability to dehydropeptidase I." Antimicrob Agents Chemother **33**(2): 215-222.
- El Tahir, Y. and Skurnik, M. (2001). "YadA, the multifaceted *Yersinia* adhesin." Int J Med Microbiol **291**(3): 209-218.
- Elomaa, O., Kangas, M., et al. (1995). "Cloning of a novel bacteria-binding receptor structurally related to scavenger receptors and expressed in a subset of macrophages." Cell **80**(4): 603-609.
- Emödy, L., Heesemann, J., et al. (1989). "Binding to collagen by *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pseudotuberculosis*: evidence for *yopA*-mediated and chromosomally encoded mechanisms." J Bacteriol **171**(12): 6674-6679.

- Essack, S. Y. (2001). "The development of beta-lactam antibiotics in response to the evolution of beta-lactamases." Pharm Res **18**(10): 1391-1399.
- EUCAST (2010). "Plättchendiffusionstest zur antimikrobiellen Empfindlichkeitstestung (Version 1.1, Juni 2010)." Retrieved 29.10.2011, from [www.eucast.org](http://www.eucast.org).
- Falkow, S. (1991). "Bacterial entry into eukaryotic cells." Cell **65**(7): 1099-1102.
- Felek, S. and Krukonis, E. S. (2009). "The Yersinia pestis Ail protein mediates binding and Yop delivery to host cells required for plague virulence." Infect Immun **77**(2): 825-836.
- Felek, S., Tsang, T. M., et al. (2010). "Three Yersinia pestis adhesins facilitate Yop delivery to eukaryotic cells and contribute to plague virulence." Infect Immun **78**(10): 4134-4150.
- Figueiredo, S., Poirel, L., et al. (2009). "In vivo selection of reduced susceptibility to carbapenems in Acinetobacter baumannii related to ISAba1-mediated overexpression of the natural bla(OXA-66) oxacillinase gene." Antimicrob Agents Chemother **53**(6): 2657-2659.
- Fleming, A. (1929). "On the antibacterial action of cultures of a Penicillium, with special reference to their use in the isolation of B. influenzae." Br J Exp Pathol **10**: 226-236.
- Fleming, T. J., Fleming, M. L., et al. (1993). "Selective expression of Ly-6G on myeloid lineage cells in mouse bone marrow. RB6-8C5 mAb to granulocyte-differentiation antigen (Gr-1) detects members of the Ly-6 family." J Immunol **151**(5): 2399-2408.
- Fredriksson-Ahomaa, M., Stolle, A., et al. (2006). "Molecular epidemiology of Yersinia enterocolitica infections." FEMS Immunol Med Microbiol **47**(3): 315-329.
- Garzetti, D., Bouabe, H., et al. (2012). "Tracing genomic variations in two highly virulent Yersinia enterocolitica strains with unequal ability to compete for host colonization." BMC Genomics **13**(1): 467.
- Gemski, P., Lazere, J. R., et al. (1980). "Plasmid associated with pathogenicity and calcium dependency of Yersinia enterocolitica." Infect Immun **27**(2): 682-685.
- Georgopapadakou, N. H. (1993). "Penicillin-binding proteins and bacterial resistance to beta-lactams." Antimicrob Agents Chemother **37**(10): 2045-2053.
- Georgopapadakou, N. H. and Liu, F. Y. (1980). "Penicillin-binding proteins in bacteria." Antimicrob Agents Chemother **18**(1): 148-157.
- Ghuysen, J. M. (1994). "Molecular structures of penicillin-binding proteins and beta-lactamases." Trends Microbiol **2**(10): 372-380.
- Grassl, G. A., Bohn, E., et al. (2003). "Interaction of Yersinia enterocolitica with epithelial cells: invasin beyond invasion." Int J Med Microbiol **293**(1): 41-54.
- Guinet, F., Carniel, E., et al. (2011). "Transfusion-transmitted Yersinia enterocolitica sepsis." Clin Infect Dis **53**(6): 583-591.

- Guzev, K. V., Isaeva, M. P., et al. (2005). "Molecular characteristics of OmpF-like porins from pathogenic *Yersinia*." Biochemistry (Mosc) **70**(10): 1104-1110.
- Haller, J. C., Carlson, S., et al. (2000). "A chromosomally encoded type III secretion pathway in *Yersinia enterocolitica* is important in virulence." Mol Microbiol **36**(6): 1436-1446.
- Han, Y. W. and Miller, V. L. (1997). "Reevaluation of the virulence phenotype of the *inv yadA* double mutants of *Yersinia pseudotuberculosis*." Infect Immun **65**(1): 327-330.
- Hanahan, D. (1983). "Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids." J Mol Biol **166**(4): 557-580.
- Hancock, R. E. (1997). "The bacterial outer membrane as a drug barrier." Trends Microbiol **5**(1): 37-42.
- Hanski, C., Kutschka, U., et al. (1989). "Immunohistochemical and electron microscopic study of interaction of *Yersinia enterocolitica* serotype O8 with intestinal mucosa during experimental enteritis." Infect Immun **57**(3): 673-678.
- Hayashidani, H., Ohtomo, Y., et al. (1995). "Sources of sporadic human infection with *Yersinia enterocolitica* serovar O:8 in Aomori Prefecture, Japan." Contrib Microbiol Immunol **13**: 29-32.
- Heesemann, J. (1993). "[Mechanisms of resistance to beta-lactam antibiotics]." Infection **21 Suppl 1**: S4-9.
- Heesemann, J., Algermissen, B., et al. (1984). "Genetically manipulated virulence of *Yersinia enterocolitica*." Infect Immun **46**(1): 105-110.
- Heesemann, J., Gaede, K., et al. (1993a). "Experimental *Yersinia enterocolitica* infection in rodents: a model for human yersiniosis." APMIS **101**(6): 417-429.
- Heesemann, J., Gross, U., et al. (1986). "Immunochemical analysis of plasmid-encoded proteins released by enteropathogenic *Yersinia* sp. grown in calcium-deficient media." Infect Immun **54**(2): 561-567.
- Heesemann, J. and Grüter, L. (1987). "Genetic evidence that the outer membrane protein YOP1 of *Yersinia enterocolitica* mediates adherence and phagocytosis resistance to human epithelial cells." FEMS Microbiology Letters **40**(1): 37-41.
- Heesemann, J., Hantke, K., et al. (1993b). "Virulence of *Yersinia enterocolitica* is closely associated with siderophore production, expression of an iron-repressible outer membrane polypeptide of 65,000 Da and pesticin sensitivity." Mol Microbiol **8**(2): 397-408.
- Heesemann, J., Keller, C., et al. (1983). "Plasmids of human strains of *Yersinia enterocolitica*: molecular relatedness and possible importance for pathogenesis." J Infect Dis **147**(1): 107-115.
- Heesemann, J. and Laufs, R. (1983). "Construction of a mobilizable *Yersinia enterocolitica* virulence plasmid." J Bacteriol **155**(2): 761-767.

Hoiczky, E., Roggenkamp, A., et al. (2000). "Structure and sequence analysis of Yersinia YadA and Moraxella UspAs reveal a novel class of adhesins." EMBO J **19**(22): 5989-5999.

Holtje, J. V. (1998). "Growth of the stress-bearing and shape-maintaining murein sacculus of Escherichia coli." Microbiol Mol Biol Rev **62**(1): 181-203.

Hoogkamp-Korstanje, J. A., de Koning, J., et al. (1988). "Persistence of Yersinia enterocolitica in man." Infection **16**(2): 81-85.

Hunter, P. A., Rolinson, G. N., et al. (1973). "Comparative activity of amoxycillin and ampicillin in an experimental bacterial infection in mice." Antimicrob Agents Chemother **4**(3): 285-293.

Inouye, S., Goi, H., et al. (1984). "In vitro and in vivo antibacterial activities of MT-141, a new semisynthetic cephamycin, compared with those of five cephalosporins." Antimicrob Agents Chemother **26**(5): 722-729.

Iriarte, M. and Cornelis, G. R. (1995). "MyfF, an element of the network regulating the synthesis of fibrillae in Yersinia enterocolitica." J Bacteriol **177**(3): 738-744.

Iriarte, M. and Cornelis, G. R. (1998). "YopT, a new Yersinia Yop effector protein, affects the cytoskeleton of host cells." Mol Microbiol **29**(3): 915-929.

Iriarte, M., Vanooteghem, J. C., et al. (1993). "The Myf fibrillae of Yersinia enterocolitica." Mol Microbiol **9**(3): 507-520.

Isaeva, M. P., Stenkova, A. M., et al. (2012). "Diversity and adaptive evolution of a major porin gene (ompF) in Yersinia pseudotuberculosis." Adv Exp Med Biol **954**: 39-43.

Isberg, R. R. and Leong, J. M. (1990). "Multiple beta 1 chain integrins are receptors for invasin, a protein that promotes bacterial penetration into mammalian cells." Cell **60**(5): 861-871.

Isberg, R. R., Swain, A., et al. (1988). "Analysis of expression and thermoregulation of the Yersinia pseudotuberculosis inv gene with hybrid proteins." Infect Immun **56**(8): 2133-2138.

Isberg, R. R., Voorhis, D. L., et al. (1987). "Identification of invasin: a protein that allows enteric bacteria to penetrate cultured mammalian cells." Cell **50**(5): 769-778.

Jacoby, G. A. (2009). "AmpC beta-lactamases." Clin Microbiol Rev **22**(1): 161-182, Table of Contents.

Jacoby, G. A. and Munoz-Price, L. S. (2005). "The new beta-lactamases." N Engl J Med **352**(4): 380-391.

Kaneuchi, C., Shibata, M., et al. (1989). "Occurrence of Yersinia spp. in migratory birds, ducks, seagulls, and swallows in Japan." Nippon Juigaku Zasshi **51**(4): 805-808.

- Kang, Y. S., Kim, J. Y., et al. (2004). "The C-type lectin SIGN-R1 mediates uptake of the capsular polysaccharide of *Streptococcus pneumoniae* in the marginal zone of mouse spleen." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(1): 215-220.
- Kang, Y. S., Yamazaki, S., et al. (2003). "SIGN-R1, a novel C-type lectin expressed by marginal zone macrophages in spleen, mediates uptake of the polysaccharide dextran." Int Immunol **15**(2): 177-186.
- Kapperud, G., Namork, E., et al. (1985). "Temperature-inducible surface fibrillae associated with the virulence plasmid of *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pseudotuberculosis*." Infect Immun **47**(2): 561-566.
- Kapperud, G., Namork, E., et al. (1987). "Plasmid-mediated surface fibrillae of *Yersinia pseudotuberculosis* and *Yersinia enterocolitica*: relationship to the outer membrane protein YOP1 and possible importance for pathogenesis." Infect Immun **55**(9): 2247-2254.
- Karow, T. and Lang-Roth, R. (2012). Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie. Pulheim, Karow.
- Kim, T. J., Young, B. M., et al. (2008). "Effect of flagellar mutations on *Yersinia enterocolitica* biofilm formation." Appl Environ Microbiol **74**(17): 5466-5474.
- Kinder, S. A., Badger, J. L., et al. (1993). "Cloning of the YenI restriction endonuclease and methyltransferase from *Yersinia enterocolitica* serotype O8 and construction of a transformable R-M+ mutant." Gene **136**(1-2): 271-275.
- Knapp, W. and Thal, E. (1963). "Investigations on the cultural-biochemical, serologic, experimental animal and immunological properties of a type of bacteria called temporarily "Pasteurella X". " Zentralbl Bakteriolog Orig **190**: 472-484.
- Knox, J. R., Moews, P. C., et al. (1996). "Molecular evolution of bacterial beta-lactam resistance." Chem Biol **3**(11): 937-947.
- Kohanski, M. A., Dwyer, D. J., et al. (2010). "How antibiotics kill bacteria: from targets to networks." Nat Rev Microbiol **8**(6): 423-435.
- Kohanski, M. A., Dwyer, D. J., et al. (2007). "A common mechanism of cellular death induced by bactericidal antibiotics." Cell **130**(5): 797-810.
- Kong, K. F., Schneper, L., et al. (2010). "Beta-lactam antibiotics: from antibiosis to resistance and bacteriology." APMIS **118**(1): 1-36.
- Koronakis, V., Sharff, A., et al. (2000). "Crystal structure of the bacterial membrane protein TolC central to multidrug efflux and protein export." Nature **405**(6789): 914-919.
- Krop, I., Shaffer, A. L., et al. (1996). "The signaling activity of murine CD19 is regulated during cell development." J Immunol **157**(1): 48-56.
- Kumar, A., Hajjar, E., et al. (2010). "Structural and dynamical properties of the porins OmpF and OmpC: insights from molecular simulations." J Phys Condens Matter **22**(45): 454125.

- Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." Nature **227**(5259): 680-685.
- Laitinen, O., Leirisalo, M., et al. (1977). "Relation between HLA-B27 and clinical features in patients with yersinia arthritis." Arthritis Rheum **20**(5): 1121-1124.
- Lambert de Rouvroit, C., Sluifers, C., et al. (1992). "Role of the transcriptional activator, VirF, and temperature in the expression of the pYV plasmid genes of *Yersinia enterocolitica*." Mol Microbiol **6**(3): 395-409.
- Lemaitre, B. C., Mazigh, D. A., et al. (1991). "Failure of beta-lactam antibiotics and marked efficacy of fluoroquinolones in treatment of murine *Yersinia pseudotuberculosis* infection." Antimicrob Agents Chemother **35**(9): 1785-1790.
- Lenk, E. (2011). Thesis: "Die Rolle der angeborenen Immunität für die *Yersinia*-Infektion im Mausmodell." Max von Pettenkofer-Institut, München.
- Leo, O., Foo, M., et al. (1987). "Identification of a monoclonal antibody specific for a murine T3 polypeptide." Proc Natl Acad Sci U S A **84**(5): 1374-1378.
- Lim, S. P. and Nikaido, H. (2010). "Kinetic parameters of efflux of penicillins by the multidrug efflux transporter AcrAB-TolC of *Escherichia coli*." Antimicrob Agents Chemother **54**(5): 1800-1806.
- Lister, I. M., Raftery, C., et al. (2012). "*Yersinia pestis* AcrAB-TolC in antibiotic resistance and virulence." Antimicrob Agents Chemother **56**(2): 1120-1123.
- Livermore, D. M. (1993). "Determinants of the activity of beta-lactamase inhibitor combinations." J Antimicrob Chemother **31 Suppl A**: 9-21.
- Llarrull, L. I., Testero, S. A., et al. (2010). "The future of the beta-lactams." Curr Opin Microbiol **13**(5): 551-557.
- Lomovskaya, O. and Bostian, K. A. (2006). "Practical applications and feasibility of efflux pump inhibitors in the clinic--a vision for applied use." Biochem Pharmacol **71**(7): 910-918.
- Lomovskaya, O., Warren, M. S., et al. (2001). "Identification and characterization of inhibitors of multidrug resistance efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa*: novel agents for combination therapy." Antimicrob Agents Chemother **45**(1): 105-116.
- Lomovskaya, O., Zgurskaya, H. I., et al. (2002). "It takes three to tango." Nat Biotechnol **20**(12): 1210-1212.
- Ma, D., Cook, D. N., et al. (1994). "Efflux pumps and drug resistance in gram-negative bacteria." Trends Microbiol **2**(12): 489-493.
- Mah, T. F. and O'Toole, G. A. (2001). "Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents." Trends Microbiol **9**(1): 34-39.
- Maki-Ikola, O., Heesemann, J., et al. (1997). "High frequency of *Yersinia* antibodies in healthy populations in Finland and Germany." Rheumatol Int **16**(6): 227-229.

- Marceau, M. (2005). "Transcriptional regulation in *Yersinia*: an update." Curr Issues Mol Biol **7**(2): 151-177.
- Marks, M. I., Pai, C. H., et al. (1980). "Yersinia enterocolitica gastroenteritis: a prospective study of clinical, bacteriologic, and epidemiologic features." J Pediatr **96**(1): 26-31.
- Martinez-Freijo, P., Fluit, A. C., et al. (1998). "Class I integrons in Gram-negative isolates from different European hospitals and association with decreased susceptibility to multiple antibiotic compounds." J Antimicrob Chemother **42**(6): 689-696.
- Mascaretti, O. A. (2003). Bacteria versus antibacterial agents: an integrated approach. Washington, American Society for Microbiology.
- Matsumoto, H. and Young, G. M. (2006). "Proteomic and functional analysis of the suite of Ysp proteins exported by the Ysa type III secretion system of *Yersinia enterocolitica* Biovar 1B." Mol Microbiol **59**(2): 689-706.
- McIver, M. A. and Pike, R. M. (1934). "Chronic glanders-like infection of face caused by an organism resembling *Flavobacterium pseudomallei* Whitmore." Clinical miscellany, Mary Imogene Basset Hospital, Cooperstown, N.Y. **1**: 16-21.
- Mebius, R. E. and Kraal, G. (2005). "Structure and function of the spleen." Nat Rev Immunol **5**(8): 606-616.
- Medeiros, A. A. (1997). "Evolution and dissemination of beta-lactamases accelerated by generations of beta-lactam antibiotics." Clin Infect Dis **24 Suppl 1**: S19-45.
- Merhej, V., Adekambi, T., et al. (2008). "*Yersinia massiliensis* sp. nov., isolated from fresh water." Int J Syst Evol Microbiol **58**(Pt 4): 779-784.
- Mikolosko, J., Bobyk, K., et al. (2006). "Conformational flexibility in the multidrug efflux system protein AcrA." Structure **14**(3): 577-587.
- Mikula, K. M., Kolodziejczyk, R., et al. (2012). "Yersinia infection tools-characterization of structure and function of adhesins." Front Cell Infect Microbiol **2**: 169.
- Mikulskis, A. V., Delor, I., et al. (1994). "Regulation of the *Yersinia enterocolitica* enterotoxin Yst gene. Influence of growth phase, temperature, osmolarity, pH and bacterial host factors." Mol Microbiol **14**(5): 905-915.
- Miller, V. L., Beer, K. B., et al. (2001). "Identification of regions of Ail required for the invasion and serum resistance phenotypes." Mol Microbiol **41**(5): 1053-1062.
- Miller, V. L. and Falkow, S. (1988). "Evidence for two genetic loci in *Yersinia enterocolitica* that can promote invasion of epithelial cells." Infect Immun **56**(5): 1242-1248.
- Mittal, S., Mallik, S., et al. (2007). "Characteristics of beta-lactamases and their genes (blaA and blaB) in *Yersinia intermedia* and *Y. frederiksenii*." BMC Microbiol **7**: 25.

Mota, L. J., Journet, L., et al. (2005). "Bacterial injectisomes: needle length does matter." Science **307**(5713): 1278.

Muller, N. F., Kaiser, P. O., et al. (2011). "Trimeric autotransporter adhesin-dependent adherence of *Bartonella henselae*, *Bartonella quintana*, and *Yersinia enterocolitica* to matrix components and endothelial cells under static and dynamic flow conditions." Infect Immun **79**(7): 2544-2553.

Murakami, S. (2008). "Multidrug efflux transporter, AcrB--the pumping mechanism." Curr Opin Struct Biol **18**(4): 459-465.

Murakami, S., Nakashima, R., et al. (2002). "Crystal structure of bacterial multidrug efflux transporter AcrB." Nature **419**(6907): 587-593.

Murros-Konttiainen, A., Fredriksson-Ahomaa, M., et al. (2011a). "*Yersinia nurmii* sp. nov." Int J Syst Evol Microbiol **61**(Pt 10): 2368-2372.

Murros-Konttiainen, A., Johansson, P., et al. (2011b). "*Yersinia pekkanenii* sp. nov." Int J Syst Evol Microbiol **61**(Pt 10): 2363-2367.

Nagarajan, R., Boeck, L. D., et al. (1971). "Beta-Lactam antibiotics from *Streptomyces*." Journal of the American Chemical Society **93**(9): 2308-2310.

Neu, H. C. (1992). "The crisis in antibiotic resistance." Science **257**(5073): 1064-1073.

Nielsen, J. B. and Lampen, J. O. (1982). "Membrane-bound penicillinases in Gram-positive bacteria." J Biol Chem **257**(8): 4490-4495.

Nikaido, H. (1989). "Outer membrane barrier as a mechanism of antimicrobial resistance." Antimicrob Agents Chemother **33**(11): 1831-1836.

Nikaido, H. (1992). "Porins and specific channels of bacterial outer membranes." Mol Microbiol **6**(4): 435-442.

Nikaido, H. (1994). "Prevention of drug access to bacterial targets: permeability barriers and active efflux." Science **264**(5157): 382-388.

Nikaido, H. (1996). "Multidrug efflux pumps of gram-negative bacteria." J Bacteriol **178**(20): 5853-5859.

Nikaido, H. (1998a). "Multiple antibiotic resistance and efflux." Curr Opin Microbiol **1**(5): 516-523.

Nikaido, H. (1998b). "The role of outer membrane and efflux pumps in the resistance of gram-negative bacteria. Can we improve drug access?" Drug Resist Updat **1**(2): 93-98.

Nikaido, H. (2001). "Preventing drug access to targets: cell surface permeability barriers and active efflux in bacteria." Semin Cell Dev Biol **12**(3): 215-223.

Nikaido, H., Basina, M., et al. (1998). "Multidrug efflux pump AcrAB of *Salmonella typhimurium* excretes only those beta-lactam antibiotics containing lipophilic side chains." J Bacteriol **180**(17): 4686-4692.

- Nikaido, H. and Takatsuka, Y. (2009). "Mechanisms of RND multidrug efflux pumps." Biochim Biophys Acta **1794**(5): 769-781.
- Nikaido, H., Takeuchi, Y., et al. (1977). "Outer membrane of *Salmonella typhimurium*. Electron spin resonance studies." Biochim Biophys Acta **465**(1): 152-164.
- Nikaido, H. and Vaara, M. (1985). "Molecular basis of bacterial outer membrane permeability." Microbiol Rev **49**(1): 1-32.
- Normark, B. H. and Normark, S. (2002). "Antibiotic tolerance in pneumococci." Clin Microbiol Infect **8**(10): 613-622.
- Nummelin, H., Merckel, M. C., et al. (2004). "The *Yersinia* adhesin YadA collagen-binding domain structure is a novel left-handed parallel beta-roll." EMBO J **23**(4): 701-711.
- Oellerich, M. F., Jacobi, C. A., et al. (2007). "*Yersinia enterocolitica* infection of mice reveals clonal invasion and abscess formation." Infect Immun **75**(8): 3802-3811.
- Padilla, E., Llobet, E., et al. (2010). "*Klebsiella pneumoniae* AcrAB efflux pump contributes to antimicrobial resistance and virulence." Antimicrob Agents Chemother **54**(1): 177-183.
- Pages, J. M., James, C. E., et al. (2008). "The porin and the permeating antibiotic: a selective diffusion barrier in Gram-negative bacteria." Nat Rev Microbiol **6**(12): 893-903.
- Pai, C. H. and Mors, V. (1978). "Production of enterotoxin by *Yersinia enterocolitica*." Infect Immun **19**(3): 908-911.
- Parkhill, J., Wren, B. W., et al. (2001). "Genome sequence of *Yersinia pestis*, the causative agent of plague." Nature **413**(6855): 523-527.
- Parmar, A., Kumar, H., et al. (1998). "Recent trends in enzymatic conversion of cephalosporin C to 7-aminocephalosporanic acid (7-ACA)." Crit Rev Biotechnol **18**: 1-12.
- Paul, T. R., Halligan, N. G., et al. (1992). "A new mercury-penicillin V derivative as a probe for ultrastructural localization of penicillin-binding proteins in *Escherichia coli*." J Bacteriol **174**(14): 4689-4700.
- Pepe, J. C., Badger, J. L., et al. (1994). "Growth phase and low pH affect the thermal regulation of the *Yersinia enterocolitica* *inv* gene." Mol Microbiol **11**(1): 123-135.
- Pepe, J. C. and Miller, V. L. (1990). "The *Yersinia enterocolitica* *inv* gene product is an outer membrane protein that shares epitopes with *Yersinia pseudotuberculosis* *invasin*." J Bacteriol **172**(7): 3780-3789.
- Pepe, J. C. and Miller, V. L. (1993). "*Yersinia enterocolitica* *invasin*: a primary role in the initiation of infection." Proc Natl Acad Sci U S A **90**(14): 6473-6477.

- Pepe, J. C., Wachtel, M. R., et al. (1995). "Pathogenesis of defined invasion mutants of *Yersinia enterocolitica* in a BALB/c mouse model of infection." *Infect Immun* **63**(12): 4837-4848.
- Perez-Gutierrez, C., Llobet, E., et al. (2010). "Role of lipid A acylation in *Yersinia enterocolitica* virulence." *Infect Immun* **78**(6): 2768-2781.
- Perry, R. D. and Fetherston, J. D. (2011). "Yersiniabactin iron uptake: mechanisms and role in *Yersinia pestis* pathogenesis." *Microbes and Infection* **13**(10): 808-817.
- Pham, J. N. and Bell, S. M. (1992). "Beta-lactamase induction by imipenem in *Yersinia enterocolitica*." *Pathology* **24**(3): 201-204.
- Pham, J. N., Bell, S. M., et al. (1991). "A study of the beta-lactamases of 100 clinical isolates of *Yersinia enterocolitica*." *J Antimicrob Chemother* **28**(1): 19-24.
- Pham, J. N., Bell, S. M., et al. (2000). "The beta-lactamases and beta-lactam antibiotic susceptibility of *Yersinia enterocolitica*." *J Antimicrob Chemother* **46**(6): 951-957.
- Piddock, L. J. (2006). "Clinically relevant chromosomally encoded multidrug resistance efflux pumps in bacteria." *Clin Microbiol Rev* **19**(2): 382-402.
- Pierson, D. E. and Falkow, S. (1993). "The ail gene of *Yersinia enterocolitica* has a role in the ability of the organism to survive serum killing." *Infect Immun* **61**(5): 1846-1852.
- Poltorak, A., He, X., et al. (1998). "Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene." *Science* **282**(5396): 2085-2088.
- Poole, K. (2004). "Resistance to beta-lactam antibiotics." *Cell Mol Life Sci* **61**(17): 2200-2223.
- Pratt, L. A., Hsing, W., et al. (1996). "From acids to osmZ: multiple factors influence synthesis of the OmpF and OmpC porins in *Escherichia coli*." *Mol Microbiol* **20**(5): 911-917.
- Preston, M. A., Brown, S., et al. (1994). "Antimicrobial susceptibility of pathogenic *Yersinia enterocolitica* isolated in Canada from 1972 to 1990." *Antimicrob Agents Chemother* **38**(9): 2121-2124.
- Queiroz, M. L., Bathirunathan, N., et al. (1987). "Influence of dosage interval on the therapeutic response to gentamicin in mice infected with *Klebsiella pneumoniae*." *Chemotherapy* **33**(1): 68-76.
- Rebeil, R., Ernst, R. K., et al. (2004). "Variation in lipid A structure in the pathogenic yersiniae." *Mol Microbiol* **52**(5): 1363-1373.
- Reinés, M., Llobet, E., et al. (2012). "Molecular Basis of *Yersinia enterocolitica* Temperature-Dependent Resistance to Antimicrobial Peptides." *J Bacteriol* **194**(12): 3173-3188.
- Robert-Koch-Institut (2012). Epidemiologisches Bulletin 06/12 (13. Februar 2012). Zuletzt abgerufen von [www.rki.de](http://www.rki.de) am 25.10.2017.

- Robert-Koch-Institut (2015). Infektionsepidemiologisches Jahrbuch meldepflichtiger Krankheiten für 2014 (Datenstand: 1. März 2015). Zuletzt abgerufen von [www.rki.de](http://www.rki.de) am 14.04.2016.
- Robert-Koch-Institut (2017). Infektionsepidemiologisches Jahrbuch meldepflichtiger Krankheiten für 2016 (Datenstand: 1. März 2017). Zuletzt abgerufen von [www.rki.de](http://www.rki.de) am 25.10.2017.
- Roggenkamp, A., Ruckdeschel, K., et al. (1996). "Deletion of amino acids 29 to 81 in adhesion protein YadA of *Yersinia enterocolitica* serotype O:8 results in selective abrogation of adherence to neutrophils." Infect Immun **64**(7): 2506-2514.
- Rosner, B. M., Stark, K., et al. (2010). "Epidemiology of reported *Yersinia enterocolitica* infections in Germany, 2001-2008." BMC Public Health **10**: 337.
- Rosqvist, R., Skurnik, M., et al. (1988). "Increased virulence of *Yersinia pseudotuberculosis* by two independent mutations." Nature **334**(6182): 522-524.
- Salton, M. R. (1963). "The relationship between the nature of the cell wall and the Gram stain." J Gen Microbiol **30**: 223-235.
- Sato, S., Ono, N., et al. (1996). "CD19 regulates B lymphocyte signaling thresholds critical for the development of B-1 lineage cells and autoimmunity." J Immunol **157**(10): 4371-4378.
- Sawai, T., Hiruma, R., et al. (1982). "Outer membrane permeation of beta-lactam antibiotics in *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, and *Enterobacter cloacae*." Antimicrob Agents Chemother **22**(4): 585-592.
- Scavizzi, M. R., Alonso, J. M., et al. (1987). "Failure of newer beta-lactam antibiotics for murine *Yersinia enterocolitica* infection." Antimicrob Agents Chemother **31**(4): 523-526.
- Schaar, V., Nordstrom, T., et al. (2011). "Moraxella catarrhalis outer membrane vesicles carry beta-lactamase and promote survival of *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae* by inactivating amoxicillin." Antimicrob Agents Chemother **55**(8): 3845-3853.
- Schiemann, D. A. (1979). "Synthesis of a selective agar medium for *Yersinia enterocolitica*." Can J Microbiol **25**(11): 1298-1304.
- Schiemann, D. A. (1980). "*Yersinia enterocolitica*: observations on some growth characteristics and response to selective agents." Can J Microbiol **26**(10): 1232-1240.
- Schiemann, D. A. (1982). "Development of a two-step enrichment procedure for recovery of *Yersinia enterocolitica* from food." Appl Environ Microbiol **43**(1): 14-27.
- Schleifstein, J. and Coleman, M. B. (1943). *Bacterium enterocoliticum*. Annu. Rep. Division of Laboratories and Research, New York Department of Health. Albany: 56.
- Schleifstein, J. I. and Coleman, M. B. (1939). "An unidentified microorganism resembling *B. lignieri* and *Past. pseudotuberculosis*, and pathogenic for man." N.Y. State J. Med. **39**: 1749-1753.

Scholz, H., Naber, K. G., et al. (1999). "Einteilung der Oralcephalosporine." Chemother J **8**(6): 227-229.

Schriefer, E. M. (2012). Thesis: "Molekulare und biochemische Charakterisierung der  $\beta$ -Laktamasen von *Yersinia enterocolitica* und deren Sekretionsverhalten." Max von Pettenkofer-Institut, München.

Schriefer, E. M., Hoffmann-Thoms, S., et al. (2013). "Yersinia enterocolitica and *Photorhabdus asymbiotica* beta-lactamases BlaA are exported by the twin-arginine translocation pathway." Int J Med Microbiol **303**(1): 16-24.

Schulte, R., Kerneis, S., et al. (2000). "Translocation of *Yersinia enterocolitica* across reconstituted intestinal epithelial monolayers is triggered by *Yersinia* invasin binding to beta1 integrins apically expressed on M-like cells." Cell Microbiol **2**(2): 173-185.

Seeger, M. A., Schiefner, A., et al. (2006). "Structural asymmetry of AcrB trimer suggests a peristaltic pump mechanism." Science **313**(5791): 1295-1298.

Seoane, A. and Garcia Lobo, J. M. (1991a). "Cloning of chromosomal beta-lactamase genes from *Yersinia enterocolitica*." J Gen Microbiol **137**(1): 141-146.

Seoane, A. and Garcia Lobo, J. M. (1991b). "Nucleotide sequence of a new class A beta-lactamase gene from the chromosome of *Yersinia enterocolitica*: implications for the evolution of class A beta-lactamases." Mol Gen Genet **228**(1-2): 215-220.

Silhavy, T. J., Kahne, D., et al. (2010). "The bacterial cell envelope." Cold Spring Harb Perspect Biol **2**(5): a000414.

Simonet, M., Richard, S., et al. (1990). "Electron microscopic evidence for in vivo extracellular localization of *Yersinia pseudotuberculosis* harboring the pYV plasmid." Infect Immun **58**(3): 841-845.

Simonet, M., Riot, B., et al. (1996). "Invasin production by *Yersinia pestis* is abolished by insertion of an IS200-like element within the *inv* gene." Infect Immun **64**(1): 375-379.

Singhal, N., Srivastava, A., et al. (2014). "Structural Variabilities in beta-Lactamase (*blaA*) of Different Biovars of *Yersinia enterocolitica*: Implications for beta-Lactam Antibiotic and beta-Lactamase Inhibitor Susceptibilities." PLoS One **10**(4): e0123564.

Skurnik, M., Bolin, I., et al. (1984). "Virulence plasmid-associated autoagglutination in *Yersinia* spp." J Bacteriol **158**(3): 1033-1036.

Skurnik, M. and Toivanen, P. (1992). "LcrF is the temperature-regulated activator of the *yadA* gene of *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pseudotuberculosis*." J Bacteriol **174**(6): 2047-2051.

Skurnik, M., Venho, R., et al. (1999). "The lipopolysaccharide outer core of *Yersinia enterocolitica* serotype O:3 is required for virulence and plays a role in outer membrane integrity." Mol Microbiol **31**(5): 1443-1462.

Skurnik, M. and Wolf-Watz, H. (1989). "Analysis of the *yopA* gene encoding the YopI virulence determinants of *Yersinia* spp." Mol Microbiol **3**(4): 517-529.

- Songsunthong, W., Higgins, M. C., et al. (2010). "ROS-inhibitory activity of YopE is required for full virulence of *Yersinia* in mice." Cell Microbiol **12**(7): 988-1001.
- Sprague, L. D. and Neubauer, H. (2005). "*Yersinia aleksiciae* sp. nov." Int J Syst Evol Microbiol **55**(Pt 2): 831-835.
- Sprague, L. D., Scholz, H. C., et al. (2008). "*Yersinia similis* sp. nov." Int J Syst Evol Microbiol **58**(Pt 4): 952-958.
- Spratt, B. G. (1975). "Distinct penicillin binding proteins involved in the division, elongation, and shape of *Escherichia coli* K12." Proc Natl Acad Sci U S A **72**(8): 2999-3003.
- Spratt, B. G. (1980). "Biochemical and genetical approaches to the mechanism of action of penicillin." Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci **289**(1036): 273-283.
- Spratt, B. G. (1994). "Resistance to antibiotics mediated by target alterations." Science **264**(5157): 388-393.
- Stapleton, P. D., Shannon, K. P., et al. (1999). "Carbapenem resistance in *Escherichia coli* associated with plasmid-determined CMY-4 beta-lactamase production and loss of an outer membrane protein." Antimicrob Agents Chemother **43**(5): 1206-1210.
- Stock, I., Heisig, P., et al. (1999). "Expression of beta-lactamases in *Yersinia enterocolitica* strains of biovars 2, 4 and 5." J Med Microbiol **48**(11): 1023-1027.
- Stock, I., Heisig, P., et al. (2000). "Beta-lactamase expression in *Yersinia enterocolitica* biovars 1A, 1B, and 3." J Med Microbiol **49**(5): 403-408.
- Stock, I. and Wiedemann, B. (1999). "An in-vitro study of the antimicrobial susceptibilities of *Yersinia enterocolitica* and the definition of a database." J Antimicrob Chemother **43**(1): 37-45.
- Strauch, E., Voigt, I., et al. (2000). "Use of a plasmid of a *Yersinia enterocolitica* biogroup 1A strain for the construction of cloning vectors." J Biotechnol **79**(1): 63-72.
- Strobel, E., Heesemann, J., et al. (2000). "Bacteriological and serological findings in a further case of transfusion-mediated *Yersinia enterocolitica* sepsis." J Clin Microbiol **38**(7): 2788-2790.
- Sulakvelidze, A. (2000). "*Yersinia* other than *Y. enterocolitica*, *Y. pseudotuberculosis*, and *Y. pestis*: the ignored species." Microbes Infect **2**(5): 497-513.
- Swirski, F. K., Nahrendorf, M., et al. (2009). "Identification of splenic reservoir monocytes and their deployment to inflammatory sites." Science **325**(5940): 612-616.
- Tamura, N., Murakami, S., et al. (2005). "Direct interaction of multidrug efflux transporter AcrB and outer membrane channel TolC detected via site-directed disulfide cross-linking." Biochemistry **44**(33): 11115-11121.
- Tauxe, R. V., Vandepitte, J., et al. (1987). "*Yersinia enterocolitica* infections and pork: the missing link." Lancet **1**(8542): 1129-1132.

- Theuretzbacher, U. (1998). "Beta-Lactamasen und Beta-Lactamase-Inhibitoren." Chemotherapie Journal **7**(4): 136-142.
- Theuretzbacher, U. (2004). "Beta-Lactamasen und Beta-Lactamase-Inhibitoren." Chemother J **13**(5): 206-217.
- Thompson, J. S. and Gravel, M. J. (1986). "Family outbreak of gastroenteritis due to *Yersinia enterocolitica* serotype 0:3 from well water." Can J Microbiol **32**(8): 700-701.
- Thomson, N. R., Howard, S., et al. (2006). "The complete genome sequence and comparative genome analysis of the high pathogenicity *Yersinia enterocolitica* strain 8081." PLoS Genet **2**(12): e206.
- Toala, P., Wilcox, C., et al. (1970). "Effect of pH of medium and size of inoculum on activity of antibiotics against group D *Streptococcus* (*Enterococcus*)." Appl Microbiol **19**(4): 629-637.
- Tobback, E., Decostere, A., et al. (2007). "*Yersinia ruckeri* infections in salmonid fish." J Fish Dis **30**(5): 257-268.
- Tomasz, A. (1979). "The mechanism of the irreversible antimicrobial effects of penicillins: how the beta-lactam antibiotics kill and lyse bacteria." Annu Rev Microbiol **33**: 113-137.
- Tomasz, A. (1986). "Penicillin-binding proteins and the antibacterial effectiveness of beta-lactam antibiotics." Rev Infect Dis **8 Suppl 3**: S260-278.
- Tomasz, A., Albino, A., et al. (1970). "Multiple antibiotic resistance in a bacterium with suppressed autolytic system." Nature **227**(5254): 138-140.
- Toyos, J., Diaz, R., et al. (1986). "Analysis by coagglutination of the distribution of a 24,000-dalton surface protein in *Yersinia* isolates." J Clin Microbiol **23**(4): 804-805.
- Tracz, D. M., Boyd, D. A., et al. (2005). "Increase in ampC promoter strength due to mutations and deletion of the attenuator in a clinical isolate of cefoxitin-resistant *Escherichia coli* as determined by RT-PCR." J Antimicrob Chemother **55**(5): 768-772.
- Trulzsch, K., Oellerich, M. F., et al. (2007). "Invasion and dissemination of *Yersinia enterocolitica* in the mouse infection model." Adv Exp Med Biol **603**: 279-285.
- Tsang, T. M., Felek, S., et al. (2010). "Ail binding to fibronectin facilitates *Yersinia pestis* binding to host cells and Yop delivery." Infect Immun **78**(8): 3358-3368.
- Tseng, T. T., Gratwick, K. S., et al. (1999). "The RND permease superfamily: an ancient, ubiquitous and diverse family that includes human disease and development proteins." J Mol Microbiol Biotechnol **1**(1): 107-125.
- Tuomanen, E., Cozens, R., et al. (1986a). "The rate of killing of *Escherichia coli* by beta-lactam antibiotics is strictly proportional to the rate of bacterial growth." J Gen Microbiol **132**(5): 1297-1304.

- Tuomanen, E., Durack, D. T., et al. (1986b). "Antibiotic tolerance among clinical isolates of bacteria." Antimicrob Agents Chemother **30**(4): 521-527.
- Uliczka, F., Pisano, F., et al. (2011). "Unique cell adhesion and invasion properties of *Yersinia enterocolitica* O:3, the most frequent cause of human Yersiniosis." PLoS Pathog **7**(7): e1002117.
- Unowsky, J., Sattler, J., et al. (1989). "Potencies of ceftriaxone and cefotaxime in a single chamber pharmacokinetic system simulating their in vivo half-lives." Chemotherapy **35**(5): 338-344.
- van Alphen, W., van Seim, N., et al. (1978). "Pores in the outer membrane of *Escherichia coli* K12: involvement of proteins b and e in the functioning of pores for nucleotides." Mol Gen Genet **159**(1): 75-83.
- Van Bambeke, F., Balzi, E., et al. (2000). "Antibiotic efflux pumps." Biochem Pharmacol **60**(4): 457-470.
- van der Laan, L. J., Dopp, E. A., et al. (1999). "Regulation and functional involvement of macrophage scavenger receptor MARCO in clearance of bacteria in vivo." J Immunol **162**(2): 939-947.
- Van Loghem, J. J. (1944). "The classification of the plague-bacillus." Antonie Van Leeuwenhoek **10**(1-2): 15.
- Verklin, R. M., Jr. and Mandell, G. L. (1977). "Alteration of effectiveness of antibiotics by anaerobiosis." J Lab Clin Med **89**(1): 65-71.
- Visser, L. G., Annema, A., et al. (1995). "Role of Yops in inhibition of phagocytosis and killing of opsonized *Yersinia enterocolitica* by human granulocytes." Infect Immun **63**(7): 2570-2575.
- Vogel, F., Naber, K. G., et al. (1999). "Parenterale Antibiotika bei Erwachsenen." Chemother J **8**(1): 3-51.
- Vostrikova, O. P., Isaeva, M. P., et al. (2013). "OmpC-like porin from outer membrane of *Yersinia enterocolitica*: molecular structure and functional activity." Biochemistry (Mosc) **78**(5): 496-504.
- Wang, E., Simard, M., et al. (2000). "In vivo activity and pharmacokinetics of ziracin (SCH27899), a new long-acting everninomicin antibiotic, in a murine model of penicillin-susceptible or penicillin-resistant pneumococcal pneumonia." Antimicrob Agents Chemother **44**(4): 1010-1018.
- Wauters, G., Kandolo, K., et al. (1987). "Revised biogrouping scheme of *Yersinia enterocolitica*." Contrib Microbiol Immunol **9**: 14-21.
- Waxman, D. J. and Strominger, J. L. (1983). "Penicillin-binding proteins and the mechanism of action of beta-lactam antibiotics." Annu Rev Biochem **52**: 825-869.

- Waxman, D. J., Yocum, R. R., et al. (1980). "Penicillins and cephalosporins are active site-directed acylating agents: evidence in support of the substrate analogue hypothesis." Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci **289**(1036): 257-271.
- Weidel, W. and Pelzer, H. (1964). "Bagshaped Macromolecules--a New Outlook on Bacterial Cell Walls." Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol **26**: 193-232.
- Witowski, S. E., Walker, K. A., et al. (2008). "YspM, a newly identified Ysa type III secreted protein of *Yersinia enterocolitica*." J Bacteriol **190**(22): 7315-7325.
- Woodcock, J. M., Andrews, J. M., et al. (1997). "The in-vitro activity of faropenem, a novel oral penem." J Antimicrob Chemother **39**(1): 35-43.
- Wren, B. W. (2003). "The yersiniae--a model genus to study the rapid evolution of bacterial pathogens." Nat Rev Microbiol **1**(1): 55-64.
- Yamaguchi, A., Hiruma, R., et al. (1982). "Phospholipid bilayer permeability of beta-lactam antibiotics." J Antibiot (Tokyo) **35**(12): 1692-1699.
- Yao, T., Meccas, J., et al. (1999). "Suppression of T and B lymphocyte activation by a *Yersinia pseudotuberculosis* virulence factor, yopH." J Exp Med **190**(9): 1343-1350.
- Yersin, A. (1894). "La peste bubonique à Hong-Kong." Annales de l'Institut Pasteur **8**: 662-667.
- Yoshimura, F. and Nikaido, H. (1985). "Diffusion of beta-lactam antibiotics through the porin channels of *Escherichia coli* K-12." Antimicrob Agents Chemother **27**(1): 84-92.
- Young, G. M., Badger, J. L., et al. (2000). "Motility is required to initiate host cell invasion by *Yersinia enterocolitica*." Infect Immun **68**(7): 4323-4326.
- Zgurskaya, H. I. and Nikaido, H. (1999a). "AcrA is a highly asymmetric protein capable of spanning the periplasm." J Mol Biol **285**(1): 409-420.
- Zgurskaya, H. I. and Nikaido, H. (1999b). "Bypassing the periplasm: reconstitution of the AcrAB multidrug efflux pump of *Escherichia coli*." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(13): 7190-7195.
- Zgurskaya, H. I. and Nikaido, H. (2000). "Multidrug resistance mechanisms: drug efflux across two membranes." Mol Microbiol **37**(2): 219-225.
- Zhanel, G. G., Hoban, D. J., et al. (1991). "The postantibiotic effect: a review of in vitro and in vivo data." DICP **25**(2): 153-163.
- Zhang, L., Radziejewska-Lebrecht, J., et al. (1997). "Molecular and chemical characterization of the lipopolysaccharide O-antigen and its role in the virulence of *Yersinia enterocolitica* serotype O:8." Mol Microbiol **23**(1): 63-76.
- Zink, D. L., Feeley, J. C., et al. (1980). "Plasmid-mediated tissue invasiveness in *Yersinia enterocolitica*." Nature **283**(5743): 224-226.

## 7. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Einteilung der oralen Cephalosporine entsprechend der PEG.....	14
Tabelle 2: Einteilung der parenteralen Cephalosporine entsprechend der PEG.....	14
Tabelle 3: Faktoren, die zu einer verringerten OmpF-Expression führen. ....	20
Tabelle 4: Substrate von AcrAB-TolC .....	23
Tabelle 5: Bush-Klassifikation der $\beta$ -Laktamasen.....	26
Tabelle 6: Verwendete Geräte und Instrumente .....	30
Tabelle 7: Verwendete „Kits“ .....	31
Tabelle 8: Antibiotika, antibiotikahaltige Tests - Bezugsquellen.....	31
Tabelle 9: Chemikalien, Fertigm Medien, weitere Substanzen - Bezugsquellen.....	32
Tabelle 10: Puffer, Lösungen und Gele (Molekularbiologie/Genetik).....	34
Tabelle 11: Puffer und Lösungen (Immunhistologie).....	34
Tabelle 12: Puffer und Lösungen (Proteinchemie).....	35
Tabelle 13: Zusammensetzung der Polyacrylamidgele (SDS-PAGE).....	35
Tabelle 14: Nährmedien – Ansätze (Mikrobiologie).....	36
Tabelle 15: Medienzusätze .....	37
Tabelle 16: Antibiotika – in vitro.....	37
Tabelle 17: Antibiotika – in vivo .....	38
Tabelle 18: Verwendeter <i>E. coli</i> -Stamm.....	39
Tabelle 19: Verwendete <i>Y. enterocolitica</i> -Stämme, Serotyp O:8, Biotyp 1 B .....	39
Tabelle 20: Verwendete Klonierungsvektoren .....	40
Tabelle 21: Hergestellte rekombinante Plasmide für diese Arbeit .....	40
Tabelle 22: Verwendete Oligonukleotide .....	41
Tabelle 23: Primäre Antikörper zum Nachweis von Immunzellen und Yersinien.....	43
Tabelle 24: Sekundäre Antikörper .....	44
Tabelle 25: Reaktionsansatz einer PCR.....	50
Tabelle 26: Reaktionsschritte einer PCR .....	51
Tabelle 27: MHK-Bestimmung in Abhängigkeit der $\beta$ -Laktamasen (E-Teststreifen) .....	66
Tabelle 28: MHK-Bestimmung in Abhängigkeit der $\beta$ -Laktamasen (Flüssigmedium) ....	68
Tabelle 29: Bestimmung des Hemmhofdurchmessers der <i>acrB</i> -Deletionsmutanten .....	95
Tabelle 30: MHK-Bestimmung der <i>acrB</i> -Deletionsmutanten (E-Teststreifen).....	96
Tabelle 31: MHK-Bestimmung der <i>acrB</i> -Deletionsmutanten (Flüssigmedium).....	102
Tabelle 32: Bestimmung des Hemmhofdurchmessers von JB580v $\Delta ompF$ .....	112
Tabelle 33: MHK-Bestimmung in Abhängigkeit von <i>ompF</i> (E-Teststreifen).....	113
Tabelle 34: MHK-Bestimmung in Abhängigkeit von <i>ompF</i> (Flüssigmedium).....	116
Tabelle 35: Vergleich der MHK verschiedener Antibiotika für <i>Y. enterocolitica</i> 1B .....	117
Tabelle 36: MHK bei JB580v unter Berücksichtigung der Wachstumsart.....	119

**8. Abbildungsverzeichnis**

Abb. 1: Verteilung von *Y. enterocolitica*-Infektionen in der Bundesrepublik Deutschland.....3

Abb. 2: Feingeweblicher Aufbau der Milz .....5

Abb. 3: Schematischer Aufbau von YadA.....10

Abb. 4: Das Ysc-T3SS und die Translokation der Yops .....11

Abb. 5: Die Kern-Strukturen der  $\beta$ -Laktam-Antibiotika .....13

Abb. 6: Reaktionsschritte bei der Hydrolyse des  $\beta$ -Laktam-Rings durch  
Serin- $\beta$ -Laktamasen.....16

Abb. 7: Schematischer Aufbau der bakteriellen Zellmembran.....17

Abb. 8: Röntgenkristallstruktur von ompF- (A) und ompC- Trimeren (B) von *E.coli* .....19

Abb. 9: Modell des AcrAB-TolC-Komplexes.....21

Abb. 10: Schem. Darstellung der Protonen-motorisch getriebenen Rotation.....22

Abb. 11: Größenstandards für PCR-Produkte und SDS-PAGE (Proteinauftrennung).....33

Abb. 12: Schematische Darstellung der Plasmidherstellung (pACE) .....55

Abb. 13: Transkriptionsnachweis potentieller Metallo- $\beta$ -Laktamase-Gene .....62

Abb. 14: PCR-Kontrolle der  $\beta$ -Laktamase-Deletionsmutanten .....63

Abb. 15: Wachstumsverhalten von JB580v und den  $\beta$ -Laktamase-Deletionsmutanten.....64

Abb. 16:  $MHK_{Amp}$  in Abhängigkeit der  $\beta$ -Laktamasen im Flüssigmedium (27 °C) .....67

Abb. 17: Einfluss der Nährböden auf die Anzahl der KBE .....71

Abb. 18: Anpassung der Infektionsdosis für die Antibiotikatherapie.....72

Abb. 19: KBE in der infizierten Milz in Abhängigkeit der  $\beta$ -Laktamasen.....73

Abb. 20: Co-Infektionsversuch von JB580v und JB580v  $\Delta ampC / \Delta blaA$  .....74

Abb. 21: Cefotaximtherapieversuch modifiziert nach Scavizzi *et al.* (1987) .....75

Abb. 22:  $\beta$ -Laktamase-abhängige Nettoüberlebensrate nach Ampicillinbehandlung .....77

Abb. 23:  $\beta$ -Laktamase-abhängige Nettoüberlebensrate nach Cefotaximbehandlung.....78

Abb. 24: Der Einfluss von Cefotaxim auf die Nettoüberlebensrate in der Milz bei  
reduzierter Infektionsdosis zu verschiedenen Zeitpunkten.....80

Abb. 25:  $\beta$ -Laktamase-abhängige Nettoüberlebensrate nach Ceftriaxonbehandlung.....81

Abb. 26:  $\beta$ -Laktamase-abhängige Nettoüberlebensrate nach Meropenembehandlung .....83

Abb. 27:  $\beta$ -Laktamase-abhängige Nettoüberlebensrate nach Gentamicinbehandlung .....84

Abb. 28: Immunfluoreszenzmikroskopische Darstellung von Kryomikrotomschnitten  
einer uninfizierten Milz .....86

Abb. 29: Immunfluoreszenzmikroskopische Darstellung von Kryomikrotomschnitten  
einer mit JB580v infizierten Milz .....87

Abb. 30: Immunfluoreszenzmikroskopische Darstellung von Kryomikrotomschnitten  
infizierter Milzen nach Antibiotikagabe .....89

Abb. 31: PCR-Kontrolle der *acrB*-Deletionsmutanten .....91

Abb. 32: Wachstumskurven der AcrB-Effluxpumpen-Deletionsmutanten bei 27 °C.....92

Abb. 33: Wachstumskurven der AcrB-Effluxpumpen-Deletionsmutanten bei 37 °C.....93

Abb. 34: Bestimmung der  $MHK_{Amp}$  bei *acrB*-Deletion im Flüssigmedium bei 37 °C .....99

Abb. 35: Bestimmung der  $MHK_{Amp}$  bei *acrB*-Deletion im Flüssigmedium bei 27 °C .....100

Abb. 36: Einfluss der *acrB*-Deletion auf die Anzahl der KBE in der Milz .....103

Abb. 37: AcrB-abhängige Nettoüberlebensrate in der Milz nach Ampicillinbehandlung .....	104
Abb. 38: AcrB-abhängige Nettoüberlebensrate in der Milz nach Doxyzyklinbehandlung....	106
Abb. 39: Meropenemresistenz-Austestung der spontanen Mem <sup>R</sup> -Mutante (E-Test).....	108
Abb. 40: SDS-PAGE von Ganzzelllysatspräparationen (Coomassie-blau).....	109
Abb. 41: SDS-PAGE von Außenmembranproteinpräparationen (Coomassie-blau).....	109
Abb. 42: Wachstumskurven von JB580v und JB580v $\Delta ompF$ bei 27 °C und 37 °C.....	111
Abb. 43: MHK <sub>Amp</sub> -Bestimmung bei JB580v $\Delta ompF$ im Flüssigmedium.....	115
Abb. 44: MHK <sub>Ctx</sub> -Bestimmung bei <i>acrB</i> -Deletion im Flüssigmedium (37 °C).....	160
Abb. 45: MHK <sub>Ctx</sub> -Bestimmung bei <i>acrB</i> -Deletion im Flüssigmedium (27 °C).....	161
Abb. 46: MHK <sub>Mem</sub> -Bestimmung bei <i>acrB</i> -Deletion im Flüssigmedium (37 °C).....	162
Abb. 47: MHK <sub>Ch</sub> -Bestimmung bei <i>acrB</i> -Deletion im Flüssigmedium (37 °C) .....	163
Abb. 48: MHK <sub>Dox</sub> -Bestimmung bei <i>acrB</i> -Deletion im Flüssigmedium (37 °C).....	164
Abb. 49: MHK <sub>Cip</sub> -Bestimmung bei <i>acrB</i> -Deletion im Flüssigmedium (37 °C).....	165
Abb. 50: MHK <sub>Ctx</sub> -Bestimmung bei JB580v $\Delta ompF$ im Flüssigmedium.....	166
Abb. 51: MHK <sub>Mem</sub> -Bestimmung bei JB580v $\Delta ompF$ im Flüssigmedium.....	167
Abb. 52: MHK <sub>Ch</sub> -Bestimmung bei JB580v $\Delta ompF$ im Flüssigmedium .....	168
Abb. 53: MHK <sub>Dox</sub> -Bestimmung bei JB580v $\Delta ompF$ im Flüssigmedium (37 °C).....	169
Abb. 54: MHK <sub>Cip</sub> -Bestimmung bei <i>ompF</i> -Deletion im Flüssigmedium (37 °C).....	170
Abb. 55: Analyse der <i>ompF</i> -Gensequenz von JB580v <sup>MemR</sup> $\Delta blaA$ / $\Delta ampC$ / $\Delta acrB$ .....	171
Abb. 56: Analyse der <i>micF</i> -Gensequenz von JB580v <sup>MemR</sup> $\Delta blaA$ / $\Delta ampC$ / $\Delta acrB$ .....	172

**9. Abkürzungen**

$\alpha$	Anti
AB	Antibiotikum (Ø AB = ohne Antibiotikazusatz)
add	aufzufüllen auf
Ail	Attachment-invasion-locus
AK	Antikörper
Amo	Amoxicillin
Amp	Ampicillin
Aq. ad inj.	Aqua ad injectabilia
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
CAMP	engl.: „cationic antimicrobial peptides“, kationische antimikrobielle Peptide
Cb	Carbenicillin
CFU	engl.: „colony forming units“, auch KBE
Cfx	Cefuroxim
CIN	Cefsulodin-Irgasan-Novobiocin, Yersinia-spezifischer Agar
Cip	Ciprofloxacin
CLS	Clavulansäure
Cm	Chloramphenicol
Cn	Gentamicin
Crx	Ceftriaxon
Ctx	Cefotaxim
Da	Dalton
DAPI	4'-6-Diamidin-2-phenylindol
DNA / DNS	engl.: „deoxyribonucleic acid“; deutsch: Desoxyribonukleinsäure
Do	Doxyzyklin
DPBS	Dulbecco's phosphate buffered saline (PBS ohne Ca <sup>2+</sup> -Ionen)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	doppelt destilliertes Wasser
HCl	Hydrogenchlorid, Salzsäure
HHDM	Hemmhofdurchmesser
HLA	human leukocyte antigen (humane Leukozytenantigene)
HPLC	engl.: „high pressure liquid chromatography“ Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
i.p.	intrapertoneal
Inv	Invasin
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid
KBE	Kolonie-bildende Einheit; engl.: CFU
KCl	Kaliumchlorid
KG	Körpergewicht
Km	Kanamycin
kb	Kilobasenpaare
kDa	kilo-Dalton
LB	„Luria Bertani“-Agar; eigentlich Lysogeny broth
LD <sub>50</sub>	mittlere letale Dosis, letale Dosis für 50% der jeweiligen Population

LPS	Lipopolysaccharid
M	Molar (mol/l)
M-Zelle	Microfold-Zelle
MALDI-TOF	Matrix-Assisted-Laser-Desorption/Ionization Time-Of-Flight Mass spectrometer Matrix-unterstützte Laser-Desorption/Ionisations-Massenspektroskopie
Mem	Meropenem
MG	Molekulargewicht
MH	Mueller-Hinton (Nährmedium)
MHK	minimale Hemmkonzentration
MKAF	Mikrokolonie-Abszess-Formation
mRNS	Messenger- oder Boten-Ribonukleinsäure
MW	Molekulargewicht
Myf	Mucoid- <i>Yersinia</i> -Faktor
MZ	Marginalzone
NaCl	Natriumchlorid
NaCl (0,9%)	isotone Kochsalzlösung mit 0,9% Natriumchlorid
nb	nicht bestimmt (die Testung wurde nicht durchgeführt)
ns	nicht signifikant
nv	nicht vorhanden
OD	optische Dichte
omp	engl.: „outer membrane protein“, Außenmembranprotein
PAE	postantibiotischer Effekt
PAGE	Poly-Acrylamid-Gel-Elektrophorese
PBS	engl.: „phosphate buffered saline“, phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion
PenG	Penicillin G
pH	pH-Wert, Potenz der Wasserstoffionenkonzentration
p.i.	post infektionem; Zeitraum nach der Infektion
Pip	Piperacillin
PMN	polymorphkernige Neutrophile, Granulozyten
SDS	Natriumdodecylsulfat
Spec	Spectinomycin
T3SS	Typ-III-Sekretionssystem
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBS	engl.: „Tris-buffered saline“, Tris-gepufferte Salzlösung
TBS-T	TBS mit Tween 20
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyldiamin
Tet	Tetrazyklin
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-Aminomethan
TRIS-HCl	Tris-(hydroxymethyl)-Aminomethan-Hydrochlorid
Tween 20	Polyoxyethylen(20)-sorbitan-monolaureat
TZB	Tazobactam
U/min	Umdrehungen pro Minute
YadA	<i>Yersinia</i> -Adhäsion A
Ybt	<i>Yersinia</i> bactin
Yop	<i>Yersinia</i> outer protein
Ysc	Yop secretion
Yst	<i>Yersinia</i> -hitzestabiles Enterotoxin



## 10. Danksagung

Zu guter Letzt möchte ich all denjenigen danken, die mich bei der Erstellung der vorliegenden Dissertation unterstützten.

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Dr. Jürgen Heesemann, meinem Doktorvater, der mir dieses höchst interessante Thema bereitgestellt, die Durchführung unter seiner Leitung am Max von Pettenkofer-Institut ermöglichte und mich stets diskussionsbereit mit neuen Aspekten zum wissenschaftlichen Diskurs anregte.

Des Weiteren möchte ich Herrn Prof. Dr. Stefan Endres für die Aufnahme im DFG-geförderten Graduiertenkolleg 1202 danken, welches mir u. a. die Möglichkeit gab, durch die Teilnahme an verschiedenen Vortragsreihen weitere interessante Forschungsgebiete außerhalb meines unmittelbaren Bereichs kennen zu lernen.

Frau Dr. Eva Schriefer möchte ich für die sehr gute Einweisung in die Grundlagen der Laborarbeit danken. Herrn Dr. Andreas Wieser danke ich für die gemeinsame Forschungszeit und die Publikationen, die wir währenddessen verwirklichten.

Darüber hinaus gilt mein Dank allen Kollegen und Kolleginnen des Max von Pettenkofer-Instituts für die tolle Zusammenarbeit sowie die freundliche Atmosphäre im und außerhalb des Labors, auch an die gemeinsamen Veranstaltungen und Feste denke ich noch gerne zurück.

Lebenslauf

## **11. Lebenslauf**

(In der vorliegenden Fassung nicht enthalten)

## 12. Publikationen

Im Rahmen meiner Forschungstätigkeit am Max von Pettenkofer-Institut entstanden folgende wissenschaftliche Beiträge:

### 12.1. Originalpublikationen

Wieser A., **Storz E.**, Liegl G., Peter A., Pritsch M., Shock J., Wai S.N., Schubert S.: „Efficient quantification and characterization of bacterial outer membrane derived nano-particles with flow cytometric analysis.“ *Int J Med Microbiol*; 2014; 304, 1032-1037.

Hafner S., Ehrenfeld M., **Storz E.**, Wieser A.: „Photodynamic Inactivation of *Actinomyces naeslundii* in Comparison With Chlorhexidine and Polyhexanide - A New Approach for Antiseptic Treatment of Medication-Related Osteonecrosis of the Jaw?“ *Journal of oral and maxillofacial surgery*; 2016;74 (3): 516-522.

**Storz E.**, Heesemann J.: „Revisiting the efficacy of antibiotics in treatment of experimental murine *Yersinia enterocolitica* infection in general and the role of beta-lactamase BlaA and BlaB in particular.“ (in Einreichung)

**Storz E.**, Heesemann J.: „The role of efflux in the sensitivity of *Y. enterocolitica* towards antibiotics.“ (in Vorbereitung)

### 12.2. Übersichtsartikel

Wieser A., **Storz E.**, Schubert S. "Biofilme uropathogener *E. coli* in intra- und extrazellulären Nischen." *Der Mikrobiologe*; 2013;23 (1): 40-43.

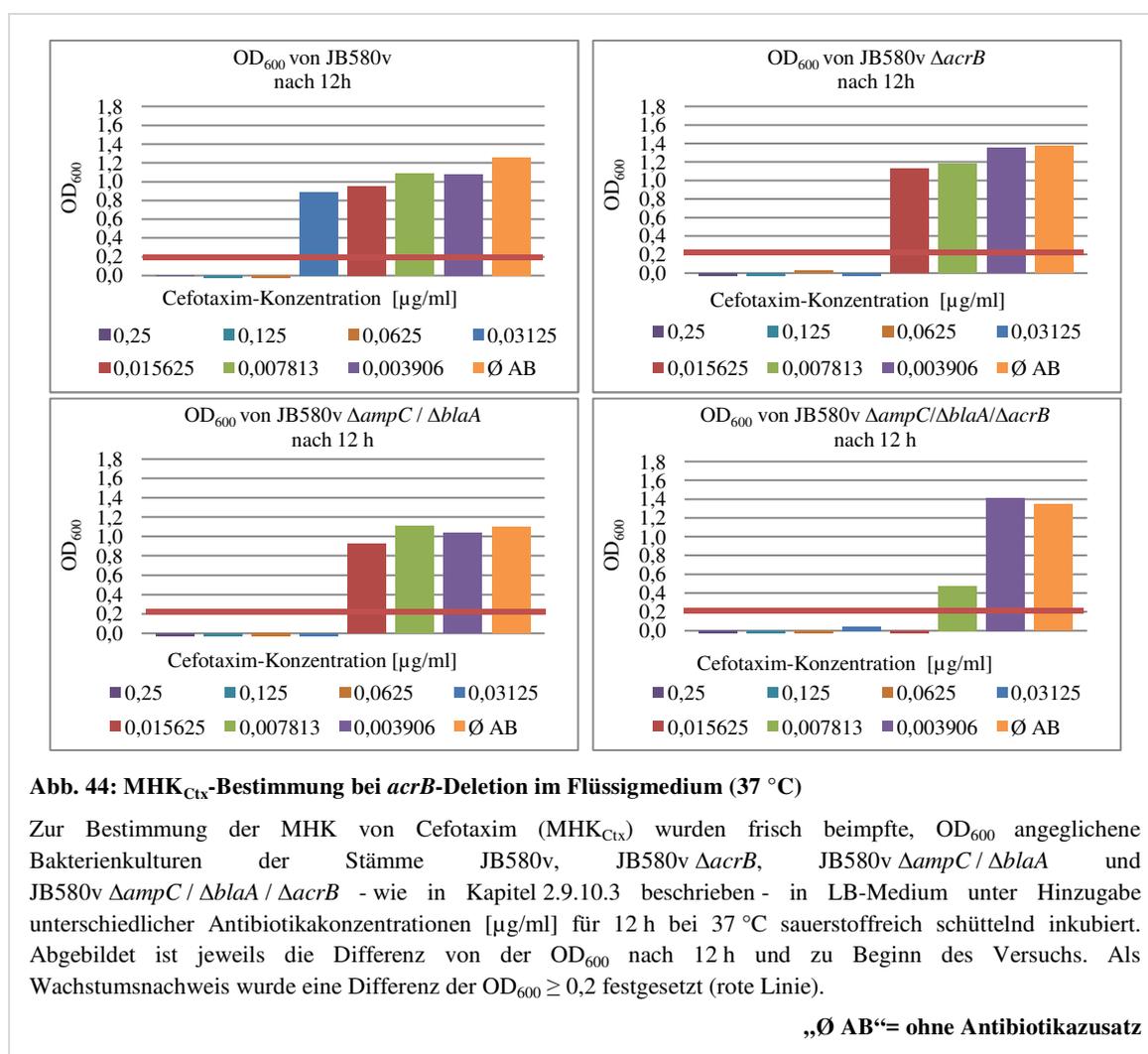
### 12.3. Vorträge

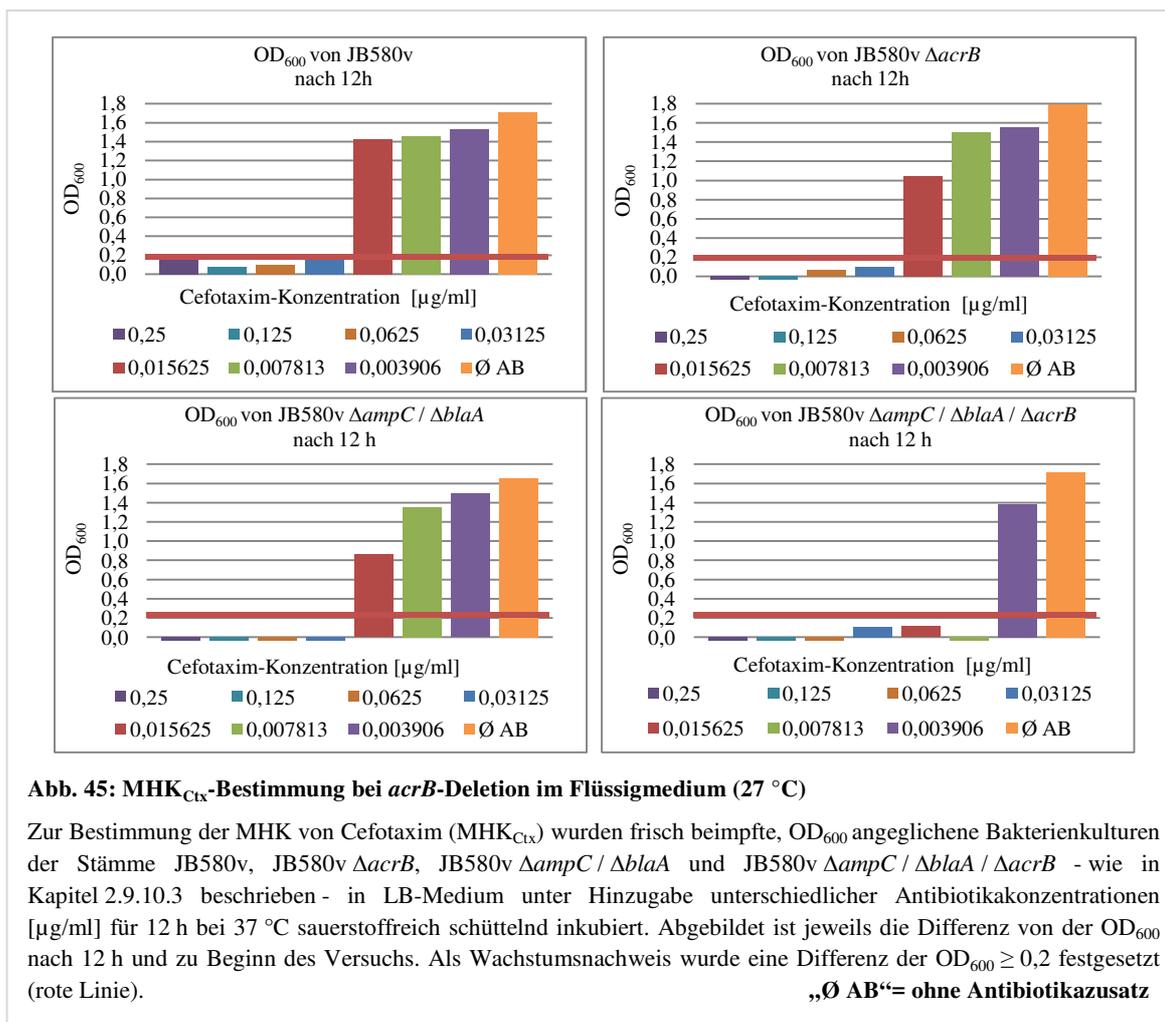
**Storz E.**, Heesemann J.: „*Yersinia* Betalaktamasen – zahnlose Tiger unter Betalaktam-Antibiotikatherapie“; 2. Süddeutsches Chemotherapiegespräch 2011; Ulm.

### 12.4. Poster

Wieser A., Grallert H., **Storz E.**, Liegl G., Sel S., Schubert S.: „Novel phage based agglutination test for *Staphylococcus aureus*.“ Auf dem Kongress der Deutschen Gesellschaft für Mikrobiologie und Hygiene (DGHM) 2012

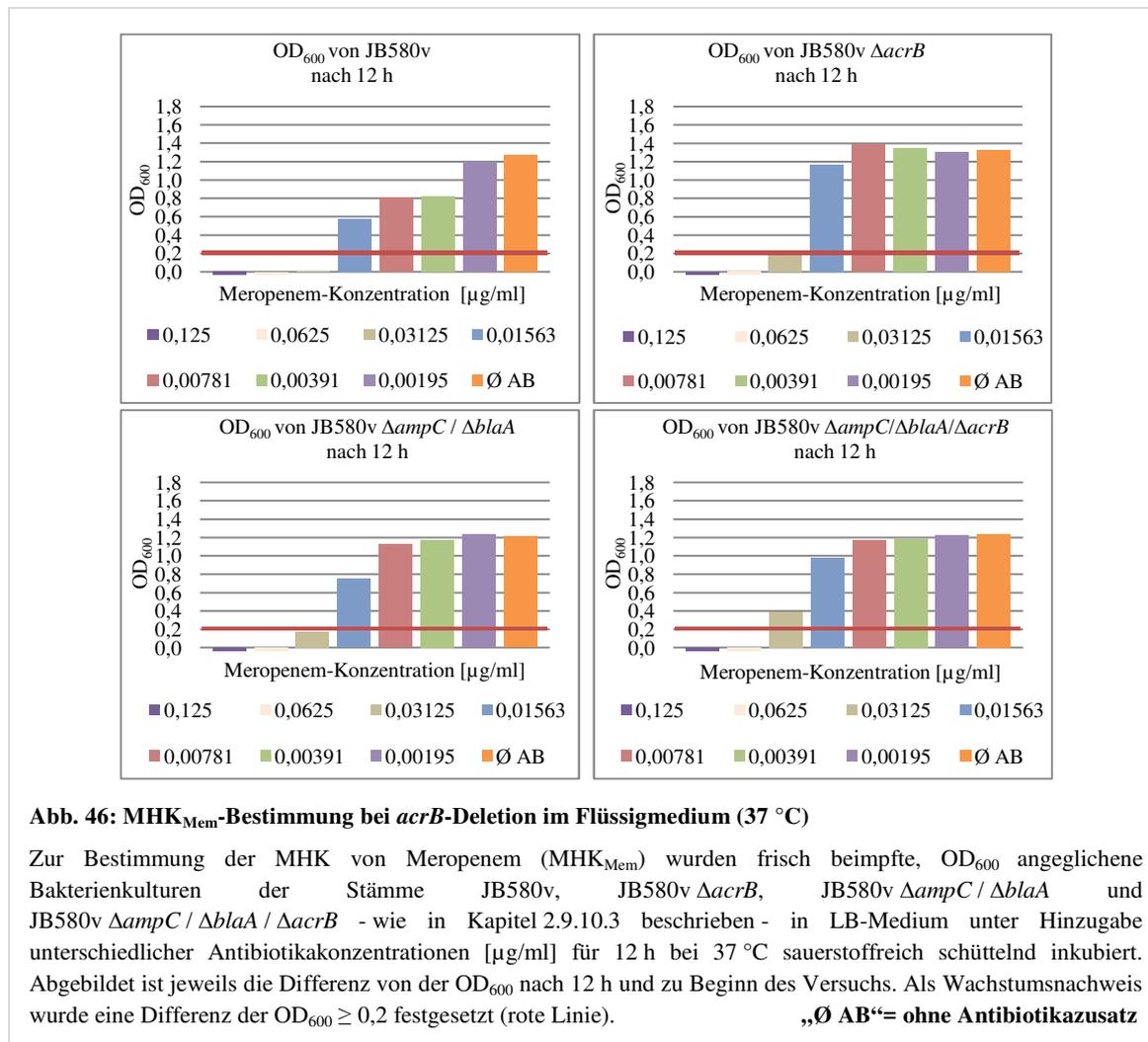
## 13. Anhang

13.1. MHK-Bestimmungen der *acrB*-Deletionsmutanten im Flüssigmedium („Mikrodilutionsverfahren“)13.1.1. Bestimmung der  $MHK_{Ctx}$  bei den *acrB*-Deletionsmutanten im Flüssigmedium



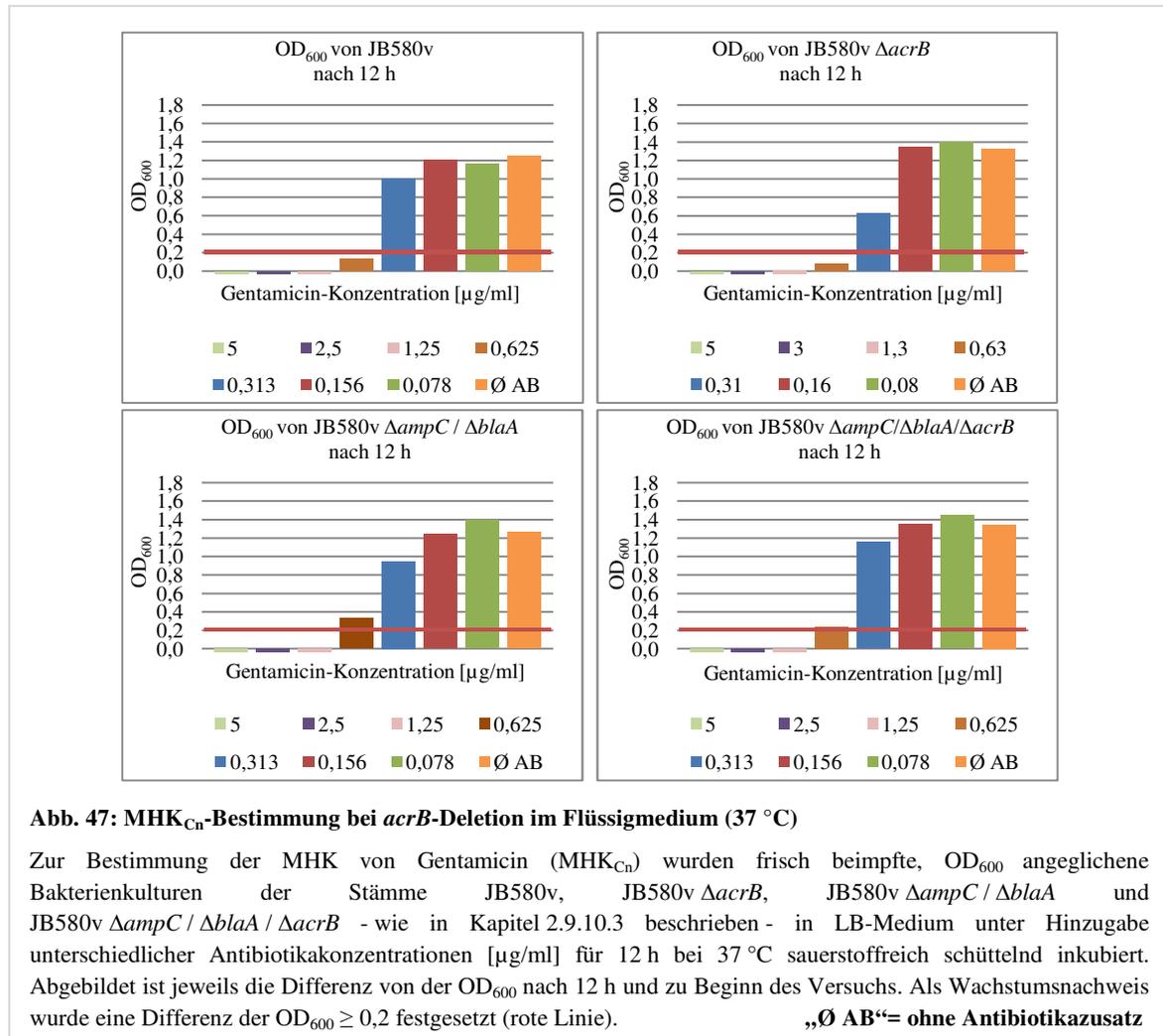
Alle getesteten Stämme waren gegenüber Cefotaxim hoch empfindlich und wurden bereits bei geringen Antibiotikakonzentrationen im Wachstum gehemmt. Bei 27 °C und 37 °C zeigten sich bei den untersuchten Stämmen vergleichbare MHK-Werte. Die Deletion von *acrB* im  $\beta$ -Laktamase-positiven Stamm hatte keinen Einfluss auf die Cefotaxim-Sensitivität. Lediglich bei der Dreifachdeletionsmutante konnte bei beiden Temperaturen eine geringfügige Sensitivitätserhöhung um 1 bzw. 2 Verdünnungsstufen beobachtet werden. Dies erscheint aber aufgrund der hohen Grundsensitivität nur von untergeordneter Relevanz.

### 13.1.2. Bestimmung der $MHK_{Mem}$ bei den *acrB*-Deletionsmutanten im Flüssigmedium



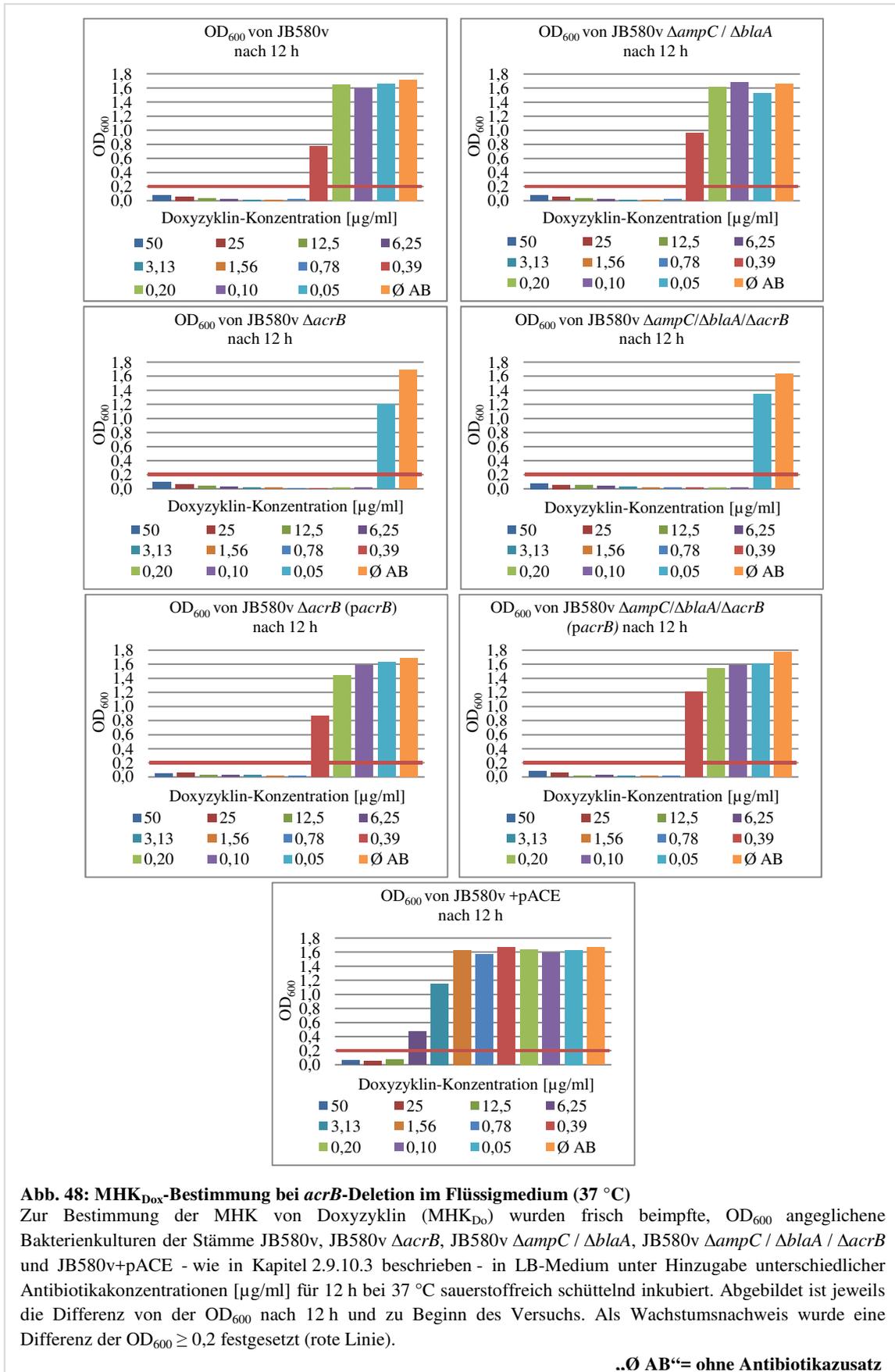
Im Vergleich konnte bei keiner der Deletionsmutanten eine signifikante Veränderung der Meropenem-Sensitivität festgestellt werden. Die deletierten Gene *ampC*, *blaA* und *acrB* scheinen *in vitro* bei 37 °C keinen Beitrag zur Resistenz gegenüber Meropenem zu leisten.

### 13.1.3. Bestimmung der $MHK_{Cn}$ bei den *acrB*-Deletionsmutanten im Flüssigmedium



Die Deletion der AcrB-Effluxpumpe bewirkt unabhängig von den  $\beta$ -Laktamasen bei 37 °C keine Änderung der Resistenzlage von JB580v gegenüber Gentamicin.

### 13.1.4. Bestimmung der $MHK_{D_{0}}$ bei den *acrB*-Deletionsmutanten im Flüssigmedium



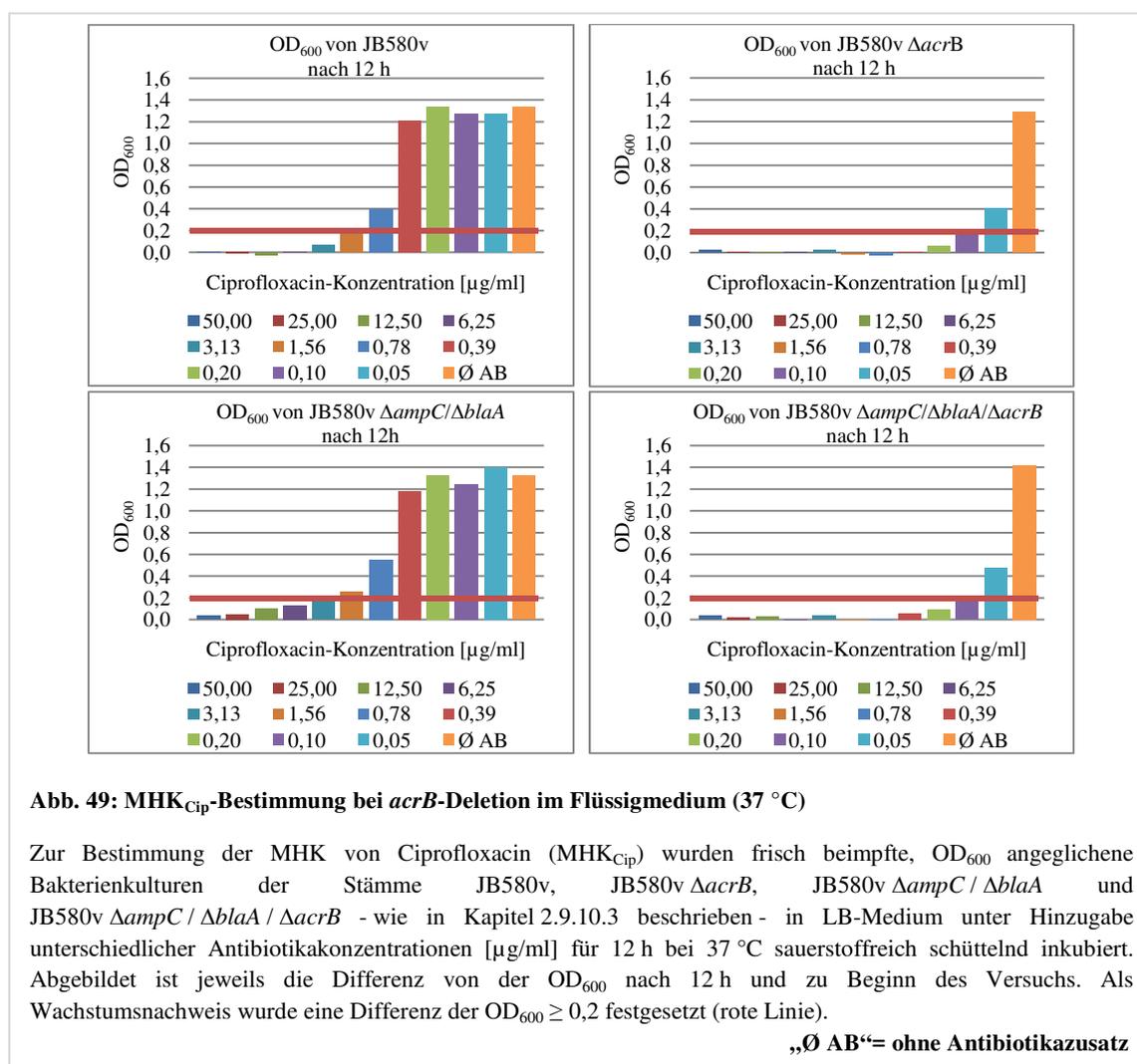
**Abb. 48:**  $MHK_{D_{0x}}$ -Bestimmung bei *acrB*-Deletion im Flüssigmedium (37 °C)

Zur Bestimmung der  $MHK$  von Doxycyclin ( $MHK_{D_{0}}$ ) wurden frisch beimpfte,  $OD_{600}$  angegliche Bakterienkulturen der Stämme JB580v, JB580v  $\Delta acrB$ , JB580v  $\Delta ampC / \Delta blaA$ , JB580v  $\Delta ampC / \Delta blaA / \Delta acrB$  und JB580v+pACE - wie in Kapitel 2.9.10.3 beschrieben - in LB-Medium unter Hinzugabe unterschiedlicher Antibiotikakonzentrationen [ $\mu\text{g/ml}$ ] für 12 h bei 37 °C sauerstoffreich schüttelnd inkubiert. Abgebildet ist jeweils die Differenz von der  $OD_{600}$  nach 12 h und zu Beginn des Versuchs. Als Wachstumsnachweis wurde eine Differenz der  $OD_{600} \geq 0,2$  festgesetzt (rote Linie).

„ $\emptyset$  AB“= ohne Antibiotikazusatz

Die Deletion von *acrB* im Flüssigmedium bei 37 °C führt zu einer deutlich erhöhten Sensitivität von *Y. enterocolitica* JB580v gegenüber Doxyzyklin. Die Komplementation mit dem Plasmid *pacrB* bewirkt eine Angleichung an die  $MHK_{D_0}$  des jeweiligen Ausgangsstamms. Die beiden  $\beta$ -Laktamasen AmpC und BlaA haben keinen signifikanten Einfluss auf die  $MHK_{D_0}$ .

### 13.1.5. Bestimmung der $MHK_{Cip}$ bei den *acrB*-Deletionsmutanten im Flüssigmedium

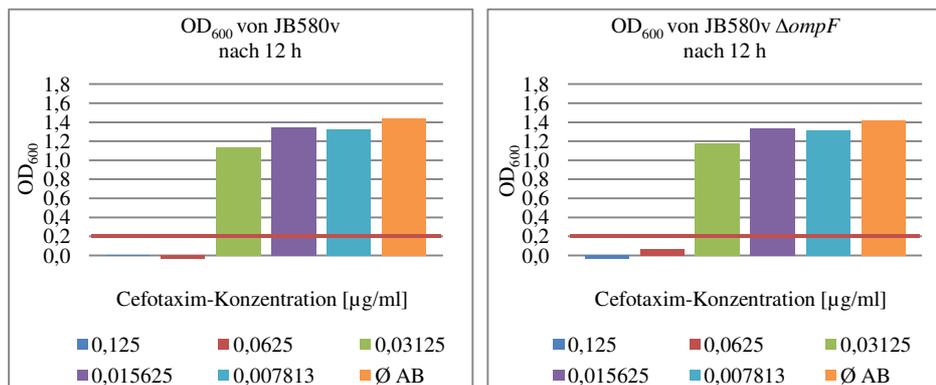


Gegenüber Ciprofloxacin zeigen die *acrB*-Deletionsmutanten im Flüssigmedium bei 37 °C eine deutlich erhöhte Sensitivität im Vergleich zu den jeweiligen Ausgangsstämmen. Die  $\beta$ -Laktamase-Deletionsmutanten haben hingegen, wie erwartet, ein ähnliches Resistenzmuster wie die jeweiligen  $\beta$ -Laktamase-positiven Elternstämme.

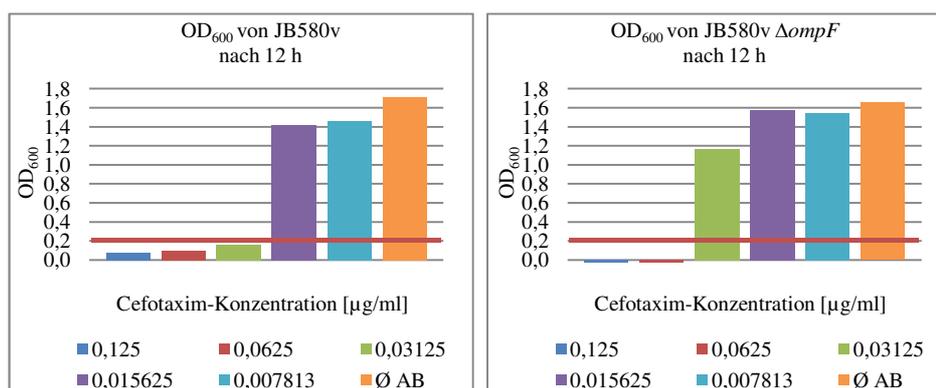
### 13.2. Einfluss der *ompF*-Deletion auf die MHK verschiedener Antibiotika bei JB580v im Flüssigmedium („Mikrodilutionsverfahren“)

#### 13.2.1. Bestimmung der $MHK_{Ctx}$ bei JB580v $\Delta ompF$ im Flüssigmedium

##### MHK<sub>Ctx</sub>-Bestimmung bei 37 °C:



##### MHK<sub>Ctx</sub>-Bestimmung bei 27 °C:



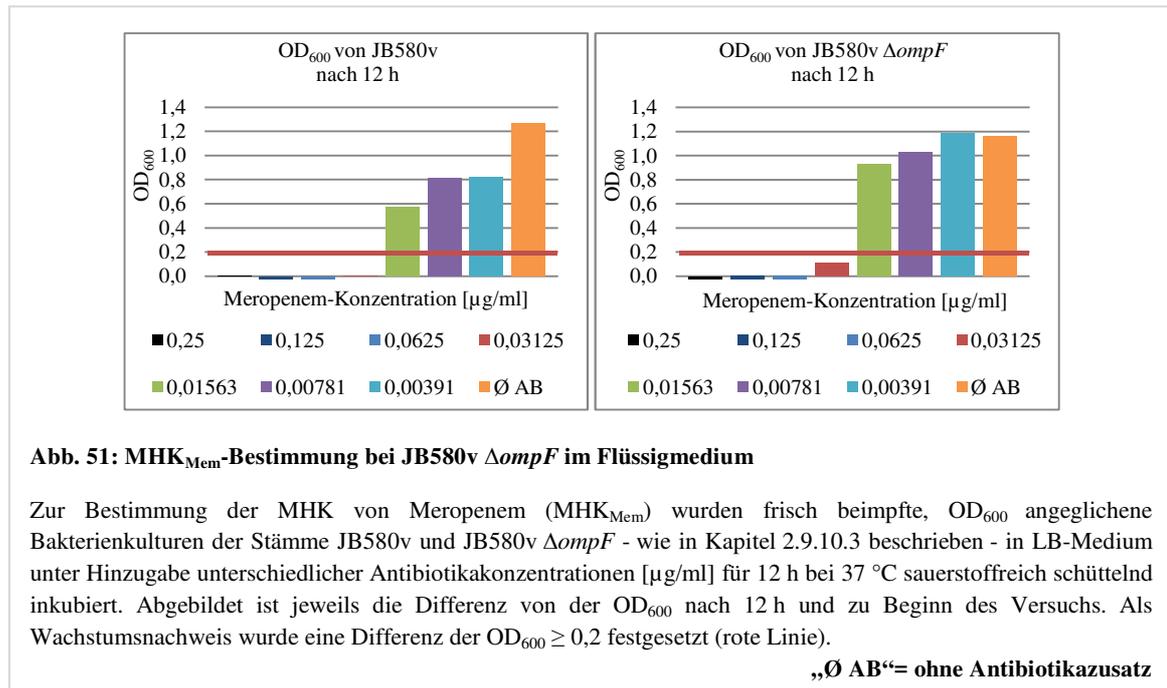
**Abb. 50:  $MHK_{Ctx}$ -Bestimmung bei JB580v  $\Delta ompF$  im Flüssigmedium**

Zur Bestimmung der MHK von Cefotaxim ( $MHK_{Ctx}$ ) wurden frisch beimpfte, OD<sub>600</sub> angegliche Bakterienkulturen der Stämme JB580v und JB580v  $\Delta ompF$  - wie in Kapitel 2.9.10.3 beschrieben - in LB-Medium unter Hinzugabe unterschiedlicher Antibiotikakonzentrationen [µg/ml] für 12 h bei 37 °C (oben) und bei 27 °C (unten) sauerstoffreich schüttelnd inkubiert. Abgebildet ist jeweils die Differenz von der OD<sub>600</sub> nach 12 h und zu Beginn des Versuchs. Als Wachstumsnachweis wurde eine Differenz der OD<sub>600</sub>  $\geq$  0,2 festgesetzt (rote Linie).

„Ø AB“= ohne Antibiotikazusatz

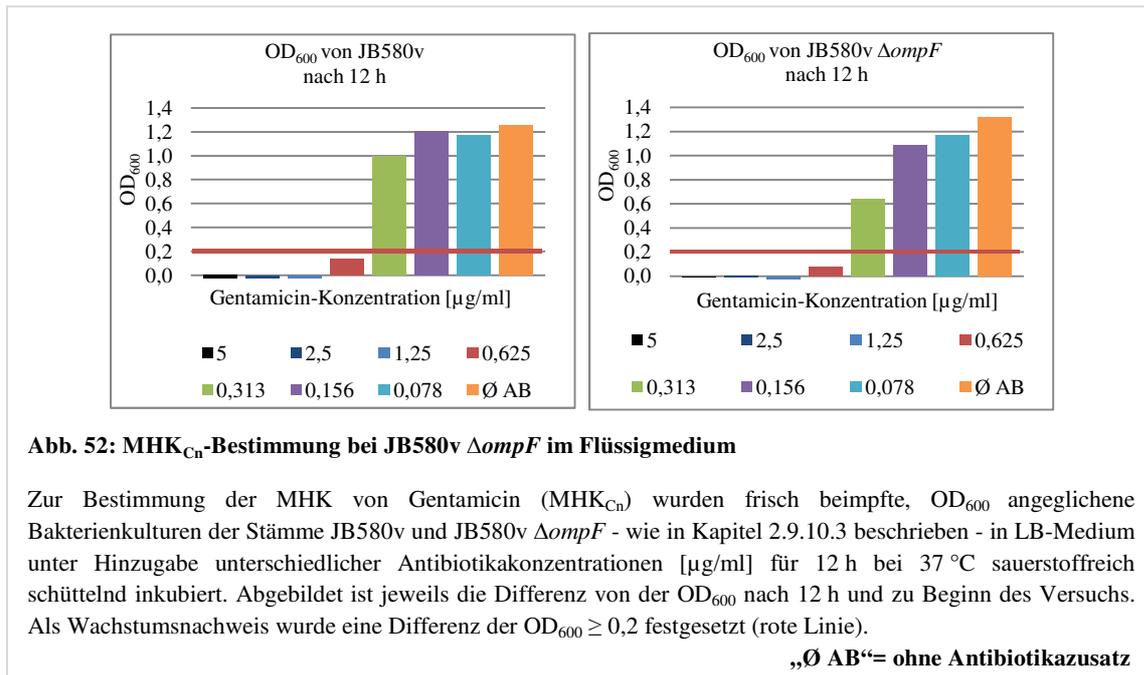
Der Ausgangsstamm JB580v und die Porin-Deletionsmutante JB580v  $\Delta ompF$  waren *in vitro* gegenüber Cefotaxim hoch empfindlich und wurden bereits bei geringen Antibiotikadosen im Wachstum gehemmt. Bei 27 °C und 37 °C zeigten sich bei den untersuchten Stämmen vergleichbare Resistenzlagen. Die Deletion von *ompF* hatte keinen relevanten Einfluss auf die Cefotaxim-Sensitivität.

### 13.2.2. Bestimmung der $MHK_{Mem}$ bei JB580v $\Delta ompF$ im Flüssigmedium



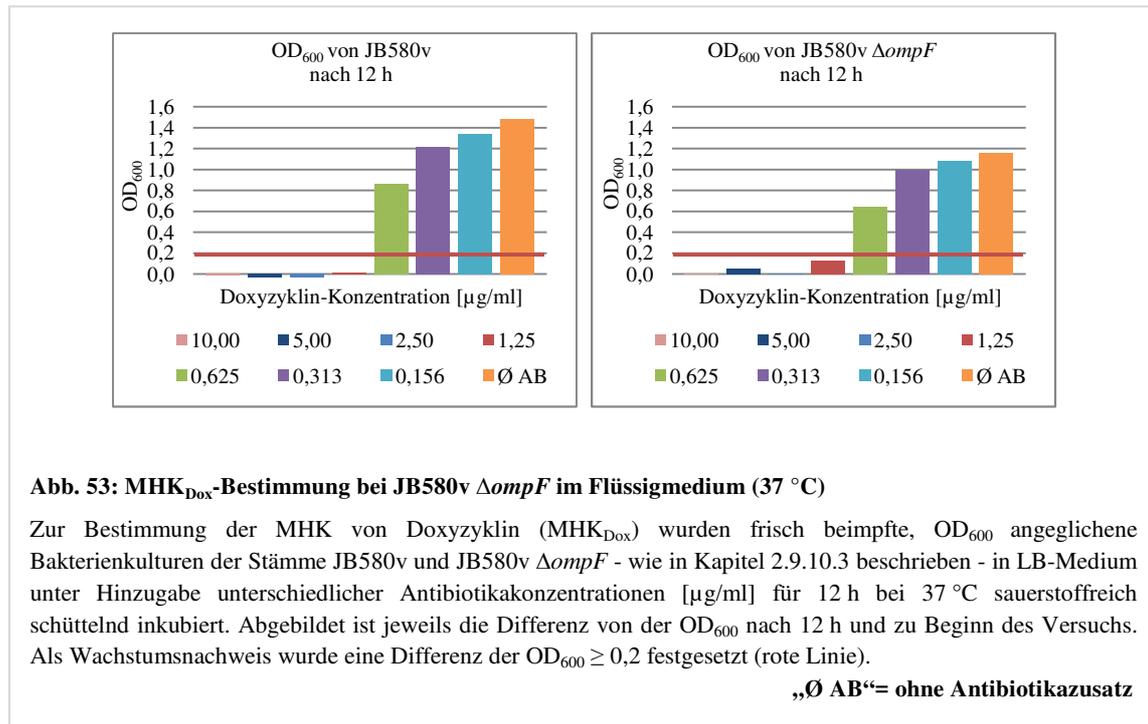
JB580v wurde ab einer Meropenemkonzentration von 0,03125  $\mu$ g/ml vollständig im Wachstum gehemmt. Auch bei der Porin-Deletionsmutante JB580v  $\Delta ompF$  trat bei 0,03125  $\mu$ g/ml die komplette Wachstumsinhibition ein. Beide Stämme sind unter diesen Testbedingungen gleichsam hochempfindlich gegenüber Meropenem. Eine Erhöhung der Resistenz gegenüber Meropenem durch die Deletion von *ompF* ist nicht zu erkennen.

### 13.2.3. Bestimmung der $MHK_{Cn}$ bei JB580v $\Delta ompF$ im Flüssigmedium



Während geringere Antibiotikakonzentrationen das Wachstum allenfalls nur mäßig einschränkten, bewirkte eine Endkonzentration von 0,625  $\mu$ g/ml Gentamicin im Medium die vollständige Inhibition des sichtbaren Wachstums von JB580v. Auch die *ompF*-Deletionsmutante wurde bei einer Endkonzentration von 0,625  $\mu$ g/ml Gentamicin gänzlich im sichtbaren Wachstum gehemmt. Das Ausschalten des Porins *OmpF* bewirkte unter diesen Testbedingungen keine Veränderung in der MHK.

### 13.2.4. Bestimmung der $MHK_{D_{0}}$ bei JB580v $\Delta ompF$ im Flüssigmedium



Nach 12 h Inkubation konnte beim Ausgangsstamm ab einer Konzentration von 0,625  $\mu$ g/ml Doxyzyklin im Medium optisch kein Wachstum über den Grenzwert nachgewiesen werden. Auch bei JB580v  $\Delta ompF$  kam es bei der gleichen Antibiotikakonzentration nach 12 h zu keinem signifikanten Anstieg der optischen Dichte. 0,625  $\mu$ g/ml Doxyzyklin scheinen sowohl den Ausgangsstamm als auch die Porin-Deletionsmutante gleichsam am Wachstum zu hindern. Das Vorhandensein vom OmpF bewirkt unter diesen Testbedingungen keine Veränderung der Sensitivität gegenüber Doxyzyklin.

### 13.2.5. Bestimmung der $MHK_{Cip}$ bei JB580v $\Delta ompF$ im Flüssigmedium

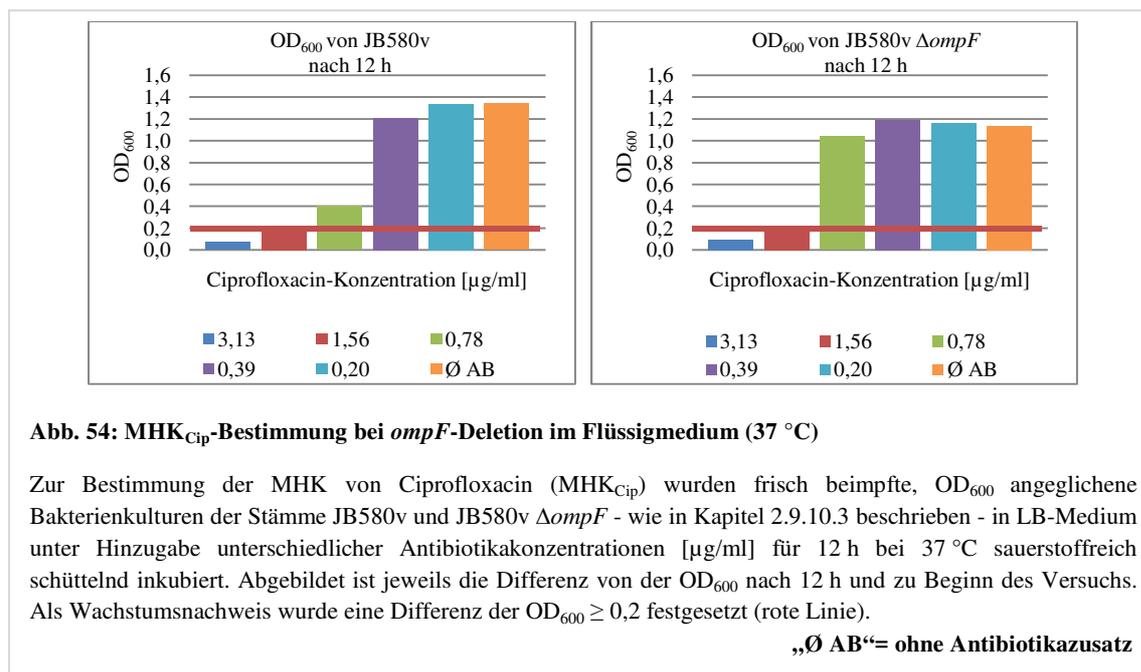


Abb. 54:  $MHK_{Cip}$ -Bestimmung bei *ompF*-Deletion im Flüssigmedium (37 °C)

Zur Bestimmung der  $MHK$  von Ciprofloxacin ( $MHK_{Cip}$ ) wurden frisch beimpfte,  $OD_{600}$  angegliche Bakterienkulturen der Stämme JB580v und JB580v  $\Delta ompF$  - wie in Kapitel 2.9.10.3 beschrieben - in LB-Medium unter Hinzugabe unterschiedlicher Antibiotikakonzentrationen [ $\mu$ g/ml] für 12 h bei 37 °C sauerstoffreich schüttelnd inkubiert. Abgebildet ist jeweils die Differenz von der  $OD_{600}$  nach 12 h und zu Beginn des Versuchs. Als Wachstumsnachweis wurde eine Differenz der  $OD_{600} \geq 0,2$  festgesetzt (rote Linie).

„ $\emptyset$  AB“= ohne Antibiotikazusatz

Nach 12 h sauerstoffreicher Schüttelinkubation erreichte der Ausgangsstamm JB580v bei einer Konzentration von 1,56  $\mu$ g/ml Ciprofloxacin im Medium lediglich eine  $OD_{600}$  von 0,19 und blieb somit unter dem festgesetzten Grenzwert von 0,20. Bei der Deletionsmutante JB580v  $\Delta ompF$  wurde bei einer Konzentration von 1,56  $\mu$ g/ml Ciprofloxacin im Medium nach 12 h ein Messwert von 0,22 ermittelt. Somit liegt die  $MHK$  formal eine Konzentrationsstufe oberhalb des Ausgangsstamms bei 3,13  $\mu$ g/ml. Zusammenfassend ist ein klinisch signifikanter Unterschied jedoch nicht zu erkennen.

13.3. Sequenzierungsergebnisse von JB580v<sup>MemR</sup>  $\Delta blaA / \Delta ampC / \Delta acrB$

13.3.1. Gen-Analyse von *ompF* bei JB580v<sup>MemR</sup>  $\Delta blaA / \Delta ampC / \Delta acrB$

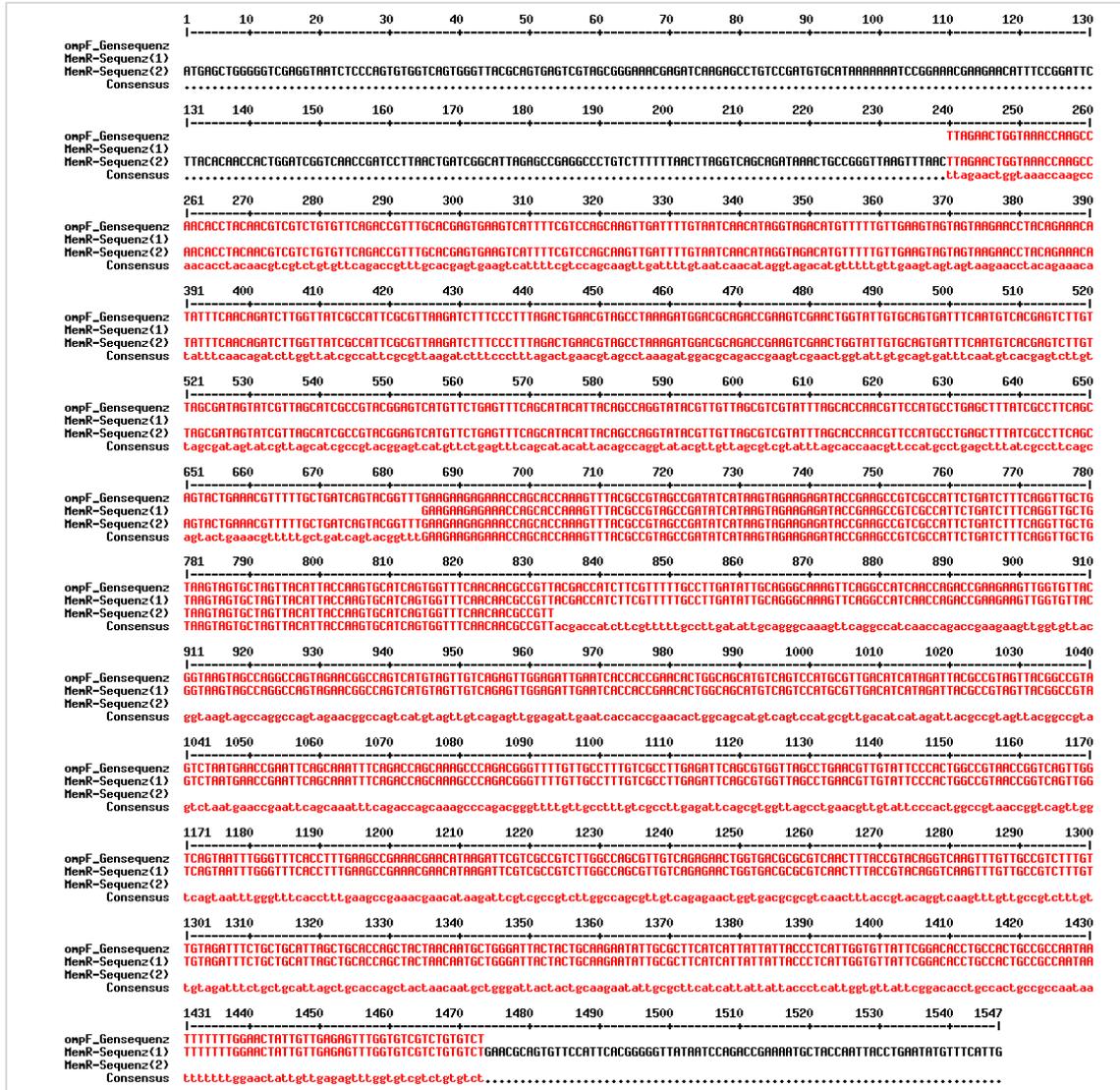


Abb. 55: Analyse der *ompF*-Gensequenz von JB580v<sup>MemR</sup>  $\Delta blaA / \Delta ampC / \Delta acrB$

Vergleich des *ompF* beinhaltenden Genabschnitts von JB580v<sup>MemR</sup>  $\Delta blaA / \Delta ampC / \Delta acrB$  mit der veröffentlichten Gensequenz von *ompF* von *Y. enterocolitica* 8081. Hierbei entspricht „ompF-Gensequenz“ der für das Gen *ompF* hinterlegten Gensequenz (s. a. NC\_008800, Region: 1757957..1759190, zuletzt abgerufen auf <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> am 18.04.16). „MemR-Sequenz(1)“ und „MemR-Sequenz(2)“ entsprechen zwei sich überlappenden Sequenzierungsergebnisse von JB580v<sup>MemR</sup>  $\Delta blaA / \Delta ampC / \Delta acrB$ . Verglichen wurden die Sequenzen mit dem Programm Multalign (Version 5.4.1). Rot markiert sind übereinstimmende Nukleotidsequenzen. „Consensus“ beschreibt die übereinstimmende Sequenz.

13.3.2. Gen-Analyse von *micF* bei JB580v<sup>MemR</sup>  $\Delta blaA / \Delta ampC / \Delta acrB$

