

**Untersuchungen zur Induktion und zum  
Transfer der Vancomycin-Resistenz vom  
VanA-Typ sowie zur Flavophospholipol-  
Resistenz in *Enterococcus faecium***

Dissertation

zur Erlangung des naturwissenschaftlichen Doktorgrades  
der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Sabine Riedl

aus Uffenheim

Würzburg, 2002

Eingereicht am:

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzender: Professor Dr. R. Hedrich

Gutachter: Professor Dr. Dr. h. c. J. Hacker

Gutachter: Professor Dr. J. Kreft

Tag des Promotionskolloquiums:

Doktorurkunde ausgehändigt am:

Herrn Professor Dr. Dr. h. c. J. Hacker danke ich für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes, für die Überlassung des Themas, sowie für sein stetes Interesse am Fortgang meiner Arbeit.

Bei Herrn Professor Dr. J. Kreft möchte ich mich für die freundliche Übernahme des Zweitgutachtens dieser Arbeit bedanken.

Mein besonderer Dank gilt meinem Betreuer Herrn Dr. Knut Ohlsen für seine wissenschaftliche Anleitung und Unterstützung, sowie seine Diskussionsbereitschaft während meiner Doktorarbeit.

Die vorliegende Arbeit wurde durch die Firma Intervet Innovation GmbH (Frankfurt) gefördert. Ich danke Herrn Dr. R. Röpke und Herrn Dr. M. Hoyer für die gute Zusammenarbeit, sowie Herrn Dr. P. Schmid und Herrn Dr. M. McConville für die Überlassung diverser Enterokokken-Isolate.

Weiterhin möchte ich mich bei Herrn Professor Dr. W. Witte, Herrn Dr. I. Klare und Herrn Dr. G. Werner (Robert Koch-Institut, Wernigerode) für das Interesse an dieser Arbeit, für wertvolle Anregungen und für die Überlassung verschiedener Enterokokken-Isolate bedanken. Ebenso danke ich Herrn Professor Dr. M. S. Gilmore (University of Oklahoma, USA) für seine Diskussionsbereitschaft, sowie für die Bereitstellung einiger Stämme. Bei Herrn Dr. H. Smidt (Universität Wageningen, Niederlande) möchte ich mich für die Überlassung des konjugativen Transposons Tn916 bedanken. Des Weiteren danke ich Frau Professor Dr. R. Hakenbeck (Universität Kaiserslautern) sowie Herrn Dr. Shwan Rachid für die Unterstützung bei der Durchführung der [<sup>3</sup>H] Penicillin-Bindeprotein Studien.

Darüber hinaus möchte ich mich herzlich bei meinen Laborkolleginnen Katja Dietrich, Isabel Löbner, Dagmar Kapfhammer, Sibylle Oswald, Melanie Emmerth, Barbara Middendorf, Karin Lindner und Hilde Merkert für ihre freundliche Hilfsbereitschaft bedanken, sowie bei allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Institutes für die angenehme Arbeitsatmosphäre am Röntgenring.

Nicht zuletzt danke ich meinen Eltern und meiner restlichen Familie für die liebe Unterstützung während des Studiums und der Promotion.

<b>1. ZUSAMMENFASSUNG.....</b>	<b>1</b>
<b>1. SUMMARY.....</b>	<b>3</b>
<b>2. EINLEITUNG.....</b>	<b>5</b>
2.1 DIE GATTUNG <i>ENTEROCOCCUS</i> .....	5
2.2 ENTEROKOKKEN ASSOZIIERTE INFEKTIONEN.....	5
2.3 VIRULENZFAKTOREN BEI ENTEROKOKKEN.....	6
2.4 ANTIBIOTIKARESISTENZEN BEI ENTEROKOKKEN.....	7
2.5 DIE GLYCOPEPTIDRESISTENZ IN ENTEROKOKKEN.....	9
2.6 EPIDEMIOLOGIE VON VRE.....	13
2.7 FLAVOPHOSPHOLIPOL.....	14
2.8 ZIELSETZUNG DIESER ARBEIT.....	17
<b>3. MATERIAL.....</b>	<b>18</b>
3.1 BAKTERIENSTÄMME.....	18
3.2 PLASMIDE.....	19
3.3 OLIGONUKLEOTIDE.....	20
3.4 ANTIKÖRPER.....	20
3.5 CHEMIKALIEN UND ENZYME.....	21
3.6 MEDIEN, AGARPLATTEN UND ANTIBIOTIKA.....	21
3.6.1 <i>Medien</i> .....	21
3.6.2 <i>Agarplatten</i> .....	23
3.6.3 <i>Antibiotika</i> .....	23
3.7 GERÄTE.....	24
<b>4. METHODEN.....</b>	<b>25</b>
4.1 BESTIMMUNG DER BAKTERIENSPEZIES.....	25
4.2 BESTIMMUNG DER MINIMALEN HEMMKONZENTRATION.....	25
4.3 <i>IN VITRO</i> -FILTERKONJUGATION.....	25
4.4 ISOLIERUNG VON RIFAMPICIN- UND FUSIDINSÄURE-RESISTENTEN REZIPIENTEN.....	26
4.5 PULSFELD-GELELEKTROPHORESE (PFGE).....	27
4.5.1 <i>Gesamt-DNS-Isolierung aus Enterokokken</i> .....	27
4.5.2 <i>Restriktionsspaltung</i> .....	27
4.5.3 <i>Pulsfeldgelelektrophorese</i> .....	27

4.5.4	Lösungen.....	28
4.6	SDS-POLYACRYLAMIDGEL-ELEKTROPHORESE (SDS-PAGE) DER GESAMTZELLPROTEINE VON ENTEROKOKKEN.....	28
4.6.1	Isolierung von Gesamtzellproteinen.....	29
4.6.2	Chemikalien.....	29
4.6.3	Herstellung eines Polyacrylamidgels.....	30
4.6.4	Elektrophorese-Lauf.....	30
4.6.5	Anfärben des Gels.....	30
4.7	HERSTELLUNG EINES VAN <sub>A</sub> -LIGASE ANTIKÖRPERS.....	31
4.7.1	Klonierung, Expression und Aufreinigung des VanA-Ligase Proteins.....	31
4.7.2	Herstellung polyklonaler VanA-Ligase Antikörper.....	32
4.8	WESTERN BLOT.....	33
4.9	ISOLIERUNG VON PLASMID-DNS.....	34
4.9.1	Isolierung von Plasmid-DNS aus <i>E. coli</i> im kleinen Maßstab.....	34
4.9.2	Isolierung von Plasmid-DNS aus <i>E. coli</i> im mittleren Maßstab.....	35
4.10	ISOLIERUNG CHROMOSOMALER DNS AUS ENTEROKOKKEN-STÄMMEN.....	36
4.11	POLYMERASE KETTEN REAKTION (PCR).....	36
4.12	SPALTUNG VON DNS MITTELS RESTRIKTIONSENDONUKLEASEN.....	36
4.13	HORIZONTALE GELELEKTROPHORESE.....	37
4.14	AUFREINIGUNG VON DNS-FRAGMENTEN AUS AGAROSEGELEN.....	37
4.15	AUFREINIGUNG VON PCR-FRAGMENTEN.....	38
4.16	LIGATION VON PCR-FRAGMENTEN.....	38
4.16.1	Klonierungsvektor.....	38
4.16.2	„Shuttle“-Vektoren.....	38
4.17	TRANSFORMATION.....	39
4.17.1	Herstellung CaCl <sub>2</sub> -kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen.....	39
4.17.2	Transformation CaCl <sub>2</sub> -kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen.....	39
4.17.3	Herstellung elektrokompetenter Enterokokken-Zellen.....	39
4.17.4	Transformation elektrokompetenter Enterokokken-Zellen.....	39
4.18	SOUTHERN BLOT-ANALYSE.....	40
4.19	MARKIERUNG DER SONDE, HYBRIDISIERUNG UND ENTWICKLUNG DES BLOTS.....	40
4.20	NORTHERN BLOT-ANALYSE.....	41
4.20.1	RNA Gelelektrophorese.....	41
4.20.2	Blotten der RNA.....	42

4.21 SEQUENZIERUNG .....	42
4.21.1 LiCor-Sequenzierung.....	42
4.21.2 ABI-Sequenzierung.....	43
4.22 TRANSPOSONMUTAGENESE .....	43
4.22.1 In vitro-Filterkonjugation.....	43
4.22.2 Selektion der Transkonjuganten.....	44
4.22.3 Inverse PCR.....	44
4.22.4 Markierung der Penicillin-Bindeproteine mit [ <sup>3</sup> H]Penicillin.....	44
4.23 SEQUENZANALYSEN .....	45
4.24 VERWENDETE COMPUTERPROGRAMME.....	45
<b>5. ERGEBNISSE.....</b>	<b>46</b>
5.1 EINFLUSS VON FLAVOPHOSPHOLIPOL UND VANCOMYCIN AUF DEN KONJUGATIVEN TRANSFER VON VANCOMYCIN-RESISTENZ-PLASMIDEN .....	46
5.1.1 Charakterisierung der Donorstämme und des Rezipienten.....	46
5.1.2 Einfluss von FPL auf die Übertragungsrate von konjugativen VanA- Plasmiden .....	47
5.1.3 Einfluss von Vancomycin auf die Transferrate von konjugativen VanA- Plasmiden .....	50
5.1.4 Genomische Charakterisierung der Transkonjuganten-Klone .....	50
5.2 UNTERSUCHUNGEN ZUR INDUKTION DES <i>VAN</i> A-OPERONS DURCH ANTIBIOTIKA UND UMWELTFAKTOREN.....	53
5.2.1 Herstellung eines polyklonalen VanA-Ligase Antikörpers.....	53
5.2.2 Nachweis des VanA-Ligase Proteins durch VanA-Ligase Antikörper .....	55
5.3 TRANSPOSONMUTAGENESE ZUR IDENTIFIZIERUNG DER PUTATIVEN FPL- RESISTENZDETERMINANTE IN <i>E. FAECIUM</i> .....	61
5.3.1 In vitro-Filterkonjugation.....	61
5.3.2 Selektion der Transkonjuganten.....	61
5.3.3 Genetische Charakterisierung der Mutanten .....	61
5.3.4 Charakterisierung der Tn916 Insertionsstellen und der flankierenden chromosomalen Sequenzen.....	62
5.3.5 Phänotypische Charakterisierung der Mutanten .....	66
5.3.6 Sequenzvergleiche des Threonyl-tRNA Synthetase Gens und des Penicillin- Bindeprotein Gens zwischen <i>E. faecium</i> und <i>E. faecalis</i> .....	68
5.3.7 Versuche zur Komplementation des FPL <sup>S</sup> -Phänotyps .....	68

5.3.8	Transkriptionsanalyse des Penicillin-Bindeproteins.....	69
5.3.9	Penicillin-Bindeprotein Studien mit [ <sup>3</sup> H]Penicillin.....	70
5.3.10	Sequenzanalysen bei einem FPL <sup>s</sup> und FPL <sup>r</sup> Stammpaar.....	71
5.4	VERSUCHE ZUR ÜBERTRAGBARKEIT DER FPL-RESISTENZDETERMINANTE ZWISCHEN FPL-RESISTENTEN UND FPL-SENSITIVEN <i>E. FAECIUM</i> -STÄMMEN .....	73
5.4.1	Auswahl der Donor-und Rezipientenstämmen .....	73
5.4.2	In vitro-Filterkonjugationsexperimente.....	73
<b>6.</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>75</b>
6.1	EINFLUSS VON FLAVOPHOSPHOLIPOL UND VANCOMYCIN AUF DEN KONJUGATIVEN TRANSFER VON VANCOMYCIN-RESISTENZ PLASMIDEN.....	75
6.2	UNTERSUCHUNGEN ZUR INDUKTION DES <i>vanaA</i> -OPERONS .....	79
6.3	TRANSPOSONMUTAGENESE ZUR IDENTIFIZIERUNG DER PUTATIVEN FPL-RESISTENZ-DETERMINANTE IN <i>E. FAECIUM</i> .....	84
6.4	VERSUCHE ZUR ÜBERTRAGBARKEIT DER FPL-RESISTENZDETERMINANTE ZWISCHEN FPL-RESISTENTEN UND FPL-SENSITIVEN <i>E. FAECIUM</i> -STÄMMEN .....	91
<b>7.</b>	<b>LITERATUR .....</b>	<b>93</b>
<b>8.</b>	<b>ANHANG .....</b>	<b>108</b>
8.1	SEQUENZEN .....	108
8.1.1	„Alignment“ eines 187 bp umfassenden Sequenzbereiches der Mutanten ...	108
8.1.2	Insertionsstelle von Tn916 im Gen für die Threonyl-tRNA Synthetase.....	109
8.1.3	„Alignment“ von 4078 bp (4,1 kb) des Stammpaares <i>E. faecium</i> ATCC 6569, FPL <sup>r</sup> (110)/FPL <sup>s</sup> (111) .....	109
8.2	DENSITOMETRISCHE AUSWERTUNG .....	116
8.3	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....	117
8.4	ERKLÄRUNGEN .....	119
8.5	PUBLIKATIONEN, PRÄSENTATIONEN UND BERICHTEN .....	120
8.6	LEBENS LAUF .....	121

## 1. Zusammenfassung

Enterokokken gelten primär als opportunistische Erreger mit geringer Pathopotenzen. Sie zeichnen sich allerdings durch ausgeprägte natürliche und erworbene Resistenzen gegen eine Vielzahl von Antibiotika aus und sind daher häufig die Ursache für schwere nosokomiale Infektionen. Besorgniserregend ist hierbei insbesondere das Auftreten von Vancomycin-resistenten Enterokokken. Glycopeptidantibiotika, wie Vancomycin und Teicoplanin, werden als Reserveantibiotika gegen multiresistente gram-positive Erreger, wie zum Beispiel Methicillin-resistente *Staphylococcus aureus*-Stämme (MRSA) eingesetzt. In Europa entstand vor allem durch den massiven Einsatz des Glycopeptidantibiotikums Avoparcin, das bis 1997 als Leistungsförderer in der Tiermast verwendet wurde, ein Reservoir für Vancomycin-resistente Enterokokken (VRE). Der VanA-Typ der Glycopeptidresistenz, welcher zuerst in *Enterococcus faecium* beschrieben wurde, ist die in Zentraleuropa vorherrschende Variante der Glycopeptidresistenz. Das Transposon Tn1546, das die *vanA*-Resistenzdeterminante kodiert, liegt häufig auf großen konjugativen Plasmiden vor und kann zwischen Enterokokken-Stämmen transferiert werden.

In dieser Arbeit wurde der direkte Einfluss von Vancomycin und eines weiteren Antibiotikums, Flavophospholipol (FPL), auf die Rate des konjugativen Transfers des *vanA*-Operons in *E. faecium* untersucht. Das Phosphoglycolipidantibiotikum FPL wird derzeit als Leistungsförderer in der Tiermast eingesetzt. Beide Antibiotika induzieren die Expression der Glycopeptidresistenz vom VanA-Typ. Es konnte gezeigt werden, dass Flavophospholipol in unterschiedlichen Konzentrationen die Häufigkeit des Transfers von konjugativen VanA-Plasmiden sowohl in klinischen *E. faecium*-Isolaten, als auch in *E. faecium*-Stämmen aus Tierfaeces signifikant hemmte. Vancomycin zeigte keinen signifikanten Effekt auf die Transferrate der VanA-Plasmide. Somit konnte nachgewiesen werden, dass in *E. faecium* kein funktionaler Zusammenhang zwischen der Induktion des *vanA*-Operons durch Vancomycin und FPL und der Transferfrequenz der konjugativen VanA-Plasmide unter dem Einfluss der beiden Antibiotika besteht.

Weiterhin wurde die Induktion des *vanA*-Operons unter dem Einfluss verschiedener Antibiotika in einem *E. faecium*-Isolat näher untersucht. Hierbei wurde die Expression des 39 kDa VanA-Ligase Proteins direkt durch das Western Blot-Verfahren dargestellt. Eine Induktion der Expression des VanA-Ligase Proteins erfolgte durch Inhibitoren der späten

Phase der Zellwandsynthese, wie Vancomycin, Flavophospholipol, Bacitracin und Tunicamycin. Außerdem konnte eine leichte Induktion des VanA-Ligase Proteins durch Fosfomycin, Cefalexin und Cefuroxim, Meropenem und Clindamycin nachgewiesen werden. Somit konnte gezeigt werden, dass Cefuroxim und Clindamycin zwei Antibiotika, die in klinischen Studien eine Besiedelung mit VRE begünstigen, auch eine geringe Zunahme der VanA-Ligase Expression bewirken. Zudem wurde deutlich, dass durch den Einfluss von Hitzestress und osmotischem Stress keine Induktion der 39 kDa VanA-Ligase Bande erfolgt.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war die Identifizierung einer putativen Resistenzdeterminante gegen Flavophospholipol. Die Eigenschaft der FPL-Resistenz konnte nicht durch *in vitro*-Filterkonjugation von FPL-resistenten auf FPL-sensitive *E. faecium*-Stämme übertragen werden. Zur molekularen Untersuchung der Resistenz gegen Flavophospholipol wurde ein resistenter *E. faecium*-Stamm durch das konjugative Transposon Tn916 mutagenisiert. In allen identifizierten FPL-sensitiven Mutanten war die Insertionsstelle des Transposons und dessen Orientierung im Chromosom identisch und es deletierte ein 1,5 kb großer genomischer Bereich „downstream“ der Transposon-Insertionsstelle. Dieser Bereich umfasste das 3'-Endes des Gens für eine putative Threonyl-tRNA Synthetase und den Genlocus für einen putativen Transkriptionsregulator. Die Sequenzen in allen Mutanten begannen ca. 200 bp vor dem Startcodon eines Gens für ein putatives Penicillin-Bindeprotein (PBP). In Northern Blot-Analysen konnte gezeigt werden, dass die Transkription des putativen PBP in der Mutante 64/3-1 schwächer war als im Wildtyp 64/3. Außerdem wurden durch [<sup>3</sup>H] Penicillin-Markierung von PBP-Extrakten Unterschiede im Expressionsmuster der Penicillin-Bindeproteine im Wildtyp und in der Mutante deutlich. Während im Wildtyp fünf Penicillin-Bindeproteine zu erkennen waren, fehlten PBP2 und PBP3 in der Mutante 64/3-1. Die Größe von PBP3 entsprach hierbei der geschätzten Größe des putativen PBP von 79 kDa. In der Mutante 64/3-1 fand wahrscheinlich durch den Verlust eines putativen Regulators oder wichtiger regulatorischer Bereiche eine Veränderung im Expressionsmuster der Penicillin-Bindeproteine statt, welche zum FPL-sensitiven Phänotyp führte. In dieser Arbeit konnte zudem gezeigt werden, dass Flavophospholipol in *E. faecium* an PBP2 und PBP3 bindet und es sich hierbei um bifunktionale „high molecular weight“ Penicillin-Bindeproteine mit Transglycosylase- und Transpeptidase-Untereinheit handeln muss.

## 1. Summary

Enterococci are primary opportunistic pathogens. Species of this genus are inherently resistant to many antimicrobial agents and readily acquire additional resistances, which is likely the reason why enterococci have become prominent nosocomial pathogens. During the past decade, vancomycin-resistant enterococci (VRE) have emerged in hospital settings. Glycopeptides, such as vancomycin and teicoplanin are the antibiotics of last resort for the treatment of methicillin-resistant staphylococci (MRSA). In Europe, the use of the glycopeptide antibiotic avoparcin as a growth promoter in food animals may have played a role in the development of vancomycin resistant enterococci. In Central Europe, the VanA-type is the most frequent genotype of acquired glycopeptide resistance. The *vanA* gene cluster is located on transposons of the Tn1546 type, which are integrated into conjugative plasmids, and can therefore be transferred among enterococcal strains.

In this study, the influence of vancomycin and flavophospholipol (FPL) on the conjugative transfer of *vanA* plasmids was determined in several *Enterococcus faecium* strains. FPL is a phosphoglycolipid antibiotic used as a growth promoter in animal husbandry. Both antibiotics have an inducing effect on the *vanA* operon. We showed that subinhibitory concentrations of FPL inhibit the transfer of *vanA* plasmids. This inhibitory effect is dose-dependent and was observed both in clinical and animal isolates of *E. faecium*. Vancomycin had no significant effect on the transfer rate of *vanA* plasmids. These results suggest that there is no functional link between the induction of vancomycin resistance of VanA-type and the frequency of transfer of conjugative *vanA* plasmids in *E. faecium*.

Furthermore, the influence of some antibiotics on the VanA ligase protein expression was examined by Western-blotting analysis. Induction of the 39 kDa protein could be detected after addition of some cell-wall active agents such as vancomycin, flavophospholipol, bacitracin and tunicamycin. Fosfomycin, cefalexine and cefuroxime as well as meropenem and clindamycin had a weaker inducing effect on the VanA ligase protein expression. Consequently, it could be shown that cefuroxime and clindamycin two antibiotics which promote an increased colonisation with VRE, are also weak inducers of the *vanA* operon. Heat- and osmotic stress had no effect on the expression of the VanA ligase.

A further objective of this study was the identification of a putative Flavophospholipol resistance determinant. Transfer of the FPL resistance between *E. faecium* strains could not

---

be detected in filter mating experiments. For the molecular analysis of the Flavophospholipol resistance an insertional mutagenesis was carried out in a FPL<sup>r</sup> *E. faecium* strain using the conjugative transposon Tn916. The chromosomal insertion sites of the transposon were identical in all identified mutants with a 1.5 kb sequence deletion downstream of Tn916. Sequence analysis of the deleted area revealed homology to the 3'-end of a putative threonyl-tRNA synthetase gene and the gene of a putative regulator. The sequences in all mutants began about 200 bp upstream of the startcodon of a putative penicillin-binding protein (PBP) gene. The transcription of this penicillin-binding protein was weaker in the transposonmutant 64/3-1 than in the wildtype 64/3 as could be shown by Northern hybridisation. Further, binding-studies using [<sup>3</sup>H] penicillin showed differences in the expression pattern of the penicillin-binding proteins between wildtype and mutant 64/3-1. The wildtype contained five PBP, while PBP2 and PBP3 were not marked in mutant 64/3-1. The size of PBP3 corresponds with an estimated size of the putative penicillin-binding protein of 79 kDa. This results suggest that the change in the penicillin-binding protein expression pattern of FPL<sup>s</sup> mutant 64/3-1 may be caused by the loss of a putative regulator or an important regulatory sequence. The PBP studies also show that FPL binds to PBP2 and PBP3 in *E. faecium* and these are likely bifunctional high molecular weight penicillin-binding proteins with transglycosylase- and transpeptidase-modules.

## 2. Einleitung

### 2.1 Die Gattung *Enterococcus*

Enterokokken sind gram-positive, fakultativ anaerobe Kokkenbakterien, die den Magen-Darmtrakt des Menschen und verschiedener Tierarten besiedeln. Die Bakterien sind sehr widerstandsfähig und wachsen bei Temperaturen von 10°C bis 45°C, bei pH-Werten bis zu 9,6 und in 6,5% NaCl. Außerdem können sie Austrocknung und eine Erwärmung bis zu 60°C für 30 Minuten überdauern (Murray, 1990, Sherman, 1937). Die Enterokokken, welche serologisch der Lancefield-Gruppe D angehören, wurden bis Mitte der achtziger Jahre zu den Streptokokken gerechnet, dann allerdings auf Grund genetischer Unterschiede in die eigene Gattung *Enterococcus* innerhalb der Familie der *Streptococcaceae* eingeordnet (Schleifer und Klipper-Balz, 1984). Bis jetzt konnten 27 Enterokokken-Spezies identifiziert werden: *Enterococcus faecalis*, *E. faecium*, *E. durans*, *E. hirae*, *E. munditii*, *E. avium*, *E. pseudoavium*, *E. malodoratus*, *E. raffinosus*, *E. gallinarum*, *E. casseliflavus*, *E. flavescens*, *E. cecorum*, *E. columbae*, *E. sulfureus*, *E. saccharolyticus*, *E. dispar*, *E. asini*, *E. solitarius*, *E. seriolicida*, *E. haemoperoxidus*, *E. moraviensis*, *E. ratti*, *E. villorum*, *E. gilvus*, *E. pallens* und *E. porcinus* (Devriese et al., 1992, Devriese et al., 1993, Euzéby, 2002). Beim Menschen ist das Hauptreservoir für Enterokokken der Darmtrakt, außerdem können sie Mund- und Vaginalflora besiedeln und gelten als Bakterien mit geringer Pathopotenzen.

### 2.2 Enterokokken assoziierte Infektionen

Enterokokken sind primär opportunistische Pathogene. Bei Infektionen, die durch diese Keime verursacht werden, konnten neben *E. faecalis* und *E. faecium* gelegentlich auch die Arten *E. gallinarum*, *E. raffinosus*, *E. casseliflavus*, *E. avium*, *E. pseudoavium*, *E. malodoratus*, *E. munditii*, *E. durans* und *E. hirae* aus Patientenmaterial isoliert werden (Facklam und Collins, 1989, Murray, 1990). Enterokokken verursachen neben Harnwegsinfekten schwere nosokomiale Infektionen, wie Entzündungen des Bauchraumes, des Zwischenbauchraumes und der Gallenblase, meist als Folge eines operativen Eingriffes. Weniger häufig sind Entzündungen der Knochen, der Gelenke oder der Hirnhäute. Gefürchtete Komplikationen solcher im Krankenhaus erworbener Infektionen sind Endokarditiden (Entzündungen der Herzinnenhaut) und Septikämien (systemische Erkrankung nach Übertritt der Erreger in die Blutbahn). Daten, die vom amerikanischen „National Nosocomial Infections Surveillance System“ im Zeitraum von 1989 bis 1998

gesammelt wurden, belegen, dass Enterokokken auf Intensivstationen zu den häufigsten Isolaten aus postoperativen Wundinfektionen gehören. Außerdem werden sie zu den drei am häufigsten differenzierten Keimen gerechnet, die bei Intensivpatienten aus Blutkulturen und bei Harnwegsinfekten isoliert werden konnten (Fridkin und Gaynes, 1999). Der Fortschritt in der Medizin-Technologie und in der Behandlung, wie der Einsatz von Kathetern und Implantaten, sowie die Verabreichung von Chemotherapeutika und Medikamenten zur Immunsuppression haben die Bedeutung von Bakterien mit geringer Pathopotenzt erhöht. Hierbei ist ein kritischer Schritt vor allem der intensive Einsatz von Breitspektrum-Antibiotika. Durch den Selektionsdruck wird das Wachstum von intrinsisch resistenten Keimen, wie z. B. Enterokokken, begünstigt (Gold, 2001).

### 2.3 Virulenzfaktoren bei Enterokokken

Die Kenntnis über Virulenzfaktoren der Gattung *Enterococcus* ist bis jetzt sehr begrenzt. *E. faecalis* gilt als die virulentere Art. Epidemiologische Studien zeigen, dass 90% der Enterokokkeninfektionen durch diese Art verursacht werden, die restlichen 10% fast ausschließlich durch *E. faecium*. Virulenz-Determinanten wurden vorwiegend für *E. faecalis*-Stämme und weniger häufig für *E. faecium*-Isolate beschrieben (Eaton und Gasson, 2001, Franz et al., 2001). Die Aggregationssubstanz ist ein Pheromon-induzierbares Oberflächen-Protein und dient der Verklumpung von *E. faecalis*-Zellen während des Konjugationsprozesses (Clewell, 1993). Dieses Protein trägt auch zur Adhäsion der Bakterien an eukaryotische Zellen bei, wobei Integrine die putativen Rezeptoren darstellen. Diese Adhäsion verstärkt die Internalisation von *E. faecalis* durch menschliche intestinale Zellen (Kreft et al., 1992, Olmsted et al., 1994). Die Aggregationssubstanz konnte nicht nur bei *E. faecalis* nachgewiesen werden, sondern in seltenen Fällen auch bei *E. faecium* (Mundy et al., 2000). Das Protein-Toxin Cytolysin hat zytotoxische Aktivität und induziert entzündliche Prozesse (Jett et al., 1995). Das Toxin wurde in 60% der *E. faecalis*-Isolate aus klinischen Epidemien nachgewiesen (Callegan et al., 1999, Gilmore et al., 1994, Jett et al., 1994). In Endocarditis-Modellen konnte gezeigt werden, dass die meisten cytolytischen *E. faecalis*-Stämme auch die Aggregationssubstanz exprimieren. Die beiden Virulenzfaktoren scheinen bei der Infektion synergistisch zu wirken (Chow et al., 1993). Kürzlich wurde das „Enterococcal Surface Protein“ (Esp) beschrieben. Esp steigert die Persistenz von *E. faecalis* in der Blase, was in experimentellen Harnwegsinfekten nachgewiesen werden konnte (Shankar et al., 2001). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass eine Esp-Variante unter Vancomycin-resistenten und sensitiven *E. faecium* Klinik-Isolaten hoch konserviert ist (Baldassarri et al., 2001, Woodford et al., 2001). Ein weiterer Virulenz-

assoziierter Faktor ist die Gelatinase. Diese Proteinase wurde in *E. faecalis*-Isolaten aus Septikämien nachgewiesen (Vergis et al., 2002). Die Gelatinase hydrolysiert neben Collagen auch Casein und Hämoglobin (Kreft et al., 1992).

Kürzlich wurden in dem ersten in den USA isolierten Vancomycin-resistenten *E. faecalis*-Stamm (Sahm et al., 1989) und in einem Vancomycin-sensitiven epidemischen *E. faecalis*-Isolat (Huycke et al., 1991) die Gene für die Virulenz-assoziierten Determinanten Esp und Cytolysin, sowie für die Aggregationssubstanz auf einem 150 kbp großen genomischen Bereich beschrieben (Shankar et al., 2002), der zahlreiche Charakteristika einer Pathogenitätsinsel (PAI) aufweist (Hacker und Kaper, 2000). Der 150 kb große Bereich unterscheidet sich bezüglich seines geringeren G+C-Gehaltes (32,2%) vom restlichen *E. faecalis* Genom (37,5%). Außerdem wurden für diese erste beschriebene Pathogenitätsinsel der Gattung *Enterococcus* terminale Duplikationen an der Insertionsstelle, sowie Gene für Transposasen und Transkriptionsregulatoren detektiert (Shankar et al., 2002). Das 5'-Ende der PAI weist Homologie zu Strukturgenen des Konjugationsapparates der Enterokokken-Plasmide pAM373 und pAD1 auf. Außerdem wurde eine Region mit Homologie zu einem Transferorigin (*oriT*) identifiziert (Francia et al., 2001). Allerdings war die Pathogenitätsinsel nicht durch *in vitro*-Filterkonjugation auf einen *E. faecalis*-Rezipientenstamm übertragbar. Dennoch erscheint der Transfer der PAI evolutionär von großer Bedeutung zu sein, da der 150 kbp Bereich in vielen Antibiotika-resistenten pathogenen *E. faecalis*-Isolaten identifiziert werden konnte (Shankar et al., 2002).

#### 2.4 Antibiotikaresistenzen bei Enterokokken

Intrinsische (natürliche) und erworbene Resistenzen gegen eine Anzahl von Antibiotika sind für die Gattung *Enterococcus* charakteristisch (Gold und Moellering, 1996). Dabei besitzen einige Spezies, wie vor allem *E. faecium*, ein höheres intrinsisches Resistenzpotential als andere. So sind Enterokokken natürlich resistent gegen Cephalosporine, Clindamycin und auf niedrigem Niveau gegen Penicilline und Aminoglycoside (Gold und Moellering, 1996, Moellering und Krogstad, 1979). Die Resistenz gegen moderate Konzentrationen von Ampicillin ist auf die Produktion des „low affinity“ Penicillin-Bindeproteins 5 zurückzuführen (Canepari et al., 1986, Fontana et al., 1983, Williamson et al., 1985). Die intrinsische Resistenz gegen Aminoglycoside basiert auf einer verminderten Aufnahme des Antibiotikums durch die Bakterienzelle. *E. faecium* trägt zusätzlich oft ein chromosomal kodiertes Gen für eine Aminoglycosid-N-

Acetyltransferase (*aac6'*), welche Resistenz gegen Tobramycin, Kanamycin und Netilmicin vermittelt (Costa et al., 1993). Für die Behandlung schwerer Enterokokkeninfektionen werden ein zellwandaktives Antibiotikum, üblicherweise ein  $\beta$ -Lactam (Ampicillin oder Penicillin) zusammen mit einem Aminoglycosid (Gentamicin oder Streptomycin) eingesetzt, um eine synergistische bakterizide Wirkung zu erreichen. Hierbei erfolgt eine verstärkte Aufnahme des Aminoglycosid-Antibiotikums in die Bakterienzelle, bedingt durch den gleichzeitigen Angriff der zellwandaktiven Substanz (Moellering und Wennerstein, 1971). Durch die Entwicklung einer Hochresistenz gegen eines der beiden Antibiotika wird der Effekt wirkungslos. Solche Hochresistenzen entstehen entweder durch Mutationen oder den Erwerb von Resistenzgenen. Der horizontale Gentransfer erfolgt mittels konjugativer Systeme, entweder durch Plasmide oder durch konjugative Transposons. So zeigt *E. faecium* in einer Häufigkeit von 60% eine Resistenz gegen Penicillin-Konzentrationen, die deutlich höher sind als bei den Organismen, die gegen  $\beta$ -Lactame intrinsisch resistent sind. Diese erworbene Resistenz wird durch eine gesteigerte Expression des Penicillin-Bindeproteins 5 oder durch dessen verminderte Affinität zu dem  $\beta$ -Lactam-Antibiotikum erreicht (Fontana et al., 1983, Fontana et al., 1996, Klare et al., 1992a, Ligozzi et al., 1996, Rybkine et al., 1998, Zorzi et al., 1996). Weiterhin konnte in einigen *E. faecalis*-Isolaten die Produktion von  $\beta$ -Lactamasen nachgewiesen werden, welche offensichtlich aus *Staphylococcus aureus* stammen (Zscheck und Murray, 1991). Die Hochresistenz gegen Aminoglycoside wird häufig durch den Erwerb von Aminoglycosid-modifizierenden Enzymen vermittelt. Bis jetzt konnten die Gene für eine Aminoglycosid-Nucleotidyl-Transferase (ANT), für eine Aminoglycosid-Acetyltransferase (AAC) und eine Aminoglycosid-Phosphotransferase (APH) identifiziert werden. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass durch ein Fusionsprotein mit 2''-Aminoglycosid-Phosphatase und 6'-Aminoglycosid-Acetyltransferase-Aktivität (2''-APH-6'-AAC) eine Hochresistenz gegen alle bekannten Aminoglycosid-Antibiotika vermittelt wird. Eine Ausnahme stellt Streptomycin dar. Die Unempfindlichkeit gegen dieses Antibiotikum basiert entweder auf ribosomaler Resistenz oder auf der enzymatischen Modifikation des Antibiotikums durch eine Aminoglycosid-Nucleotidyl-Transferase (Gold und Moellering, 1996, Patterson und Zervos, 1990). Andere erworbene genetische Determinanten vermitteln Hochresistenz gegen Macrolide, Lincosamide (*ermB*), Tetrazyklin (*tetM*, *tetN*) und Chloramphenicol (*cat*). Weiterhin können chromosomale Mutationen zur Resistenz gegen Rifampicin und Fusidinsäure führen (Gold, 2001, Klare et al., 2001).

Glycopeptide gelten als wichtige Reserveantibiotika und werden zur Therapie gegen multiresistente Keime eingesetzt. Im Jahre 1988 wurde das Auftreten von Vancomycin-resistenten Enterokokken (VRE) erstmals in Frankreich und in England beschrieben (Shlaes et al., 1989, Uttley et al., 1989). Seitdem konnte eine fast weltweite Verbreitung beobachtet werden. Auch gegen Quinupristin/Dalfopristin, eine neue semisynthetische Antibiotika-Kombination, die zur Behandlung gram-positiver Erreger und Glycopeptid-resistenter Enterokokken entwickelt wurde, konnten Resistenzgene identifiziert werden, allerdings ist deren klinische Verbreitung noch gering. Quinupristin/Dalfopristin besteht aus einer Kombination von Streptogramin A und B. Die Streptogramin-Acetyltransferasen SatA (synonym VatD) und SatG (synonym VatE) vermitteln Resistenz gegen Streptogramin A und das *ermB*-Gencluster gegen Streptogramin B (Klare et al., 2001, Thal und Zervos, 1999).

## 2.5 Die Glycopeptidresistenz in Enterokokken

Glycopeptide wie Vancomycin und Teicoplanin interagieren mit dem C-terminalen D-Alanyl-D-Alanin (D-Ala-D-Ala) Rest der Peptidoglycanvorläufer der Zellwandsynthese. Durch die Bildung dieses Komplexes wird die Transglycosylierungs- und die Transpeptidierungsreaktion verhindert und somit der Einbau der Vorläufer in die bakterielle Zellwand. Der Mechanismus der Glycopeptidresistenz zeichnet sich durch einen alternativen Weg der Peptidoglycansynthese aus, bei dem Zellwandvorläufer synthetisiert werden, die geringe Affinität zu Vancomycin aufweisen. Die chemische Struktur von Vancomycin ist in Abbildung 1 dargestellt.

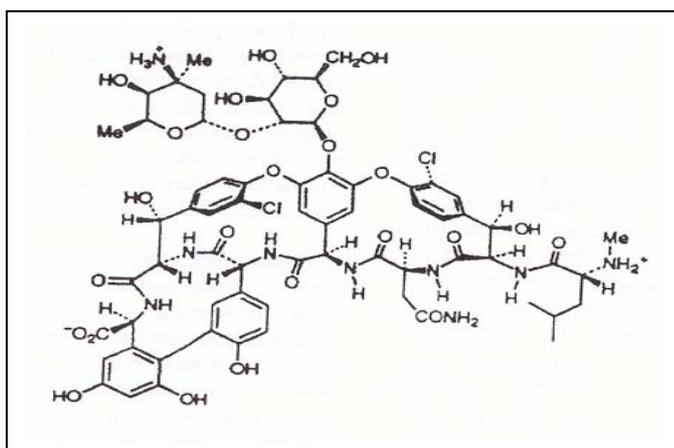


Abb. 1: Struktur von Vancomycin.

---

Die Glycopeptidresistenz ist phänotypisch und genotypisch heterogen. Bis jetzt wurden vier verschiedene Typen einer erworbenen Resistenz beschrieben (Arthur et al., 1996b, Fines et al., 1999, Perichon et al., 1997). Diese unterscheiden sich auf Grund ihrer Transfereigenschaften, des Resistenz-Levels und des Spektrums der Glycopeptide, gegen die der jeweilige Stamm resistent ist. Die verschiedenen Typen der Glycopeptidresistenz in Enterokokken und deren Eigenschaften sind in Tabelle 1 dargestellt. Der VanA-Typ zeichnet sich durch eine Hochresistenz gegen Vancomycin und Teicoplanin aus und wird durch das Transposon Tn1546 oder nahe verwandte Elemente vermittelt (Arthur et al., 1993). Stämme, die den VanB-Typ der Glycopeptidresistenz tragen, sind gegen variable Konzentrationen von Vancomycin, nicht aber gegen Teicoplanin resistent (Arthur et al., 1993). Die VanA- und VanB-Typen wurden vorwiegend in *E. faecium*- und *E. faecalis*-Stämmen gefunden. Weniger häufig sind die erworbenen Glycopeptidresistenzen vom VanD- und VanE-Typ. Enterokokken vom VanD-Typ sind gegen variable Konzentrationen von Vancomycin und Teicoplanin resistent (Perichon et al., 1997). Der VanE-Typ vermittelt Resistenz gegen geringe Konzentrationen von Vancomycin und wurde kürzlich in *E. faecalis* beschrieben (Fines et al., 1999). Der VanC-Typ der Glycopeptidresistenz ist eine intrinsische Eigenschaft der Arten *E. gallinarum*, *E. casseliflavus* und *E. flavescens* (Leclercq et al., 1992, Navarro et al., 1994) und vermittelt den Stämmen Resistenz gegen geringe Vancomycin-Konzentrationen (siehe Tab. 1). Bei den VanA-, VanB- und VanD-Phänotypen der Vancomycinresistenz wird das endständige D-Alanin durch D-Lactat ersetzt, bei den VanC- und VanE-Phänotypen durch D-Serin. Durch den Austausch von D-Alanin durch D-Lactat geht eine Wasserstoffbrückenbindung verloren, die für die Bindung von Vancomycin an den Zellwandvorläufer wichtig ist. Dadurch wird die Affinität für Glycopeptide beträchtlich reduziert (Arthur et al., 1996b). Der Austausch von D-Alanin durch D-Serin verändert nicht die Wasserstoffbrückenbindungen, sondern führt zu einer Konformationsänderung, welche die Affinität von Vancomycin leicht reduziert (Perichon und Courvalin, 2000).

Tab. 1: Typen und Eigenschaften der Glycopeptidresistenz bei Enterokokken.

	VanA	VanB	VanC	VanD	VanE
MHK V <sup>a</sup> µg/ml	64->1024	4-1024	2-32	64-256	16
MHK T <sup>b</sup> µg/ml	16-512	<0,5	<0,5	4-32	0,5
Verbreitung	<i>E. faecium</i> <i>E. faecalis</i> <i>E. hirae</i> <i>E. durans</i> <i>E. gallinarum</i>	<i>E. faecalis</i> <i>E. faecium</i> <i>E. gallinarum</i>	<i>E. gallinarum</i> <i>E. casseliflavus</i> <i>E. flavescens</i>	<i>E. faecium</i>	<i>E. faecalis</i>
Genetische Determinante	erworben	erworben	intrinsisch	erworben	erworben
Konjugation	ja	ja	nein	n.n. <sup>c</sup>	n.n. <sup>c</sup>

<sup>a</sup> Vancomycin, <sup>b</sup> Teicoplanin, <sup>c</sup> nicht nachgewiesen

Der VanA-Typ der Glycopeptidresistenz wurde zuerst in *E. faecium* beschrieben (Arthur et al., 1993, Brisson-Noël, et al., 1990, Dutka-Malen et al., 1990, Leclercq et al., 1988) und ist die in Zentraleuropa vorherrschende Variante der Glycopeptidresistenz (Klare und Witte, 1997). Das Transposon Tn1546, das die *vanA*-Resistenzdeterminante kodiert, liegt häufig auf großen konjugativen Plasmiden vor und kann zwischen Enterokokken-Stämmen transferiert werden (Evers et al., 1996, Heaton et al., 1996, Leclercq et al., 1988, Leclercq et al., 1989, Werner et al., 1999). Es besteht die Möglichkeit, dass die VanA-Determinante von *E. faecium* oder *E. faecalis* auf virulente und hochresistente Bakterien, wie z. B. Methicillin-resistente *S. aureus*-Stämme, übertragen werden kann. Kürzlich wurde gezeigt, dass ein *S. aureus*-Stamm dasselbe Sex-Pheromon produziert, welches bei *E. faecalis* den Plasmid-Transfer von Sex-Pheromon-Plasmiden induziert. Die Produktion dieses Pheromons durch *S. aureus*, in der Nähe eines Vancomycin-resistenten Enterokokken-Stammes, könnte einen Transfer des *vanA*-Operons zur Folge haben (Showsh et al., 2001). In einem Laborexperiment konnte der VanA-Transfer auf einen *S. aureus*-Stamm bereits nachgewiesen werden (Noble et al., 1992). Kürzlich wurden in den USA die ersten beiden Vancomycin-resistenten klinischen *S. aureus*-Isolate (MHK 64µg/ml bzw > 128 µg/ml) beschrieben. Die *vanA*-Resistenzdeterminante konnte jeweils nachgewiesen werden, die Stämme sind außerdem Oxacillin-resistent (*mecA*) (Miller et al., 2002, Sievert et al., 2002). Da das eine Isolat zusammen mit einem Vancomycin-resistenten *E. faecalis*-Stamm isoliert

wurde, vermuten die Autoren, dass die *vanA*-Resistenzdeterminante durch genetischen Transfer von *E. faecalis* auf *S. aureus* übertragen worden sein könnte (Sievert et al., 2002). Bisher waren nur Vancomycin-intermediär-resistente *S. aureus* (VISA) Klinik-Isolate beschrieben worden (MHK 8-16 µg/ml) (Srinivasan et al., 2002). Der Mechanismus dieser intermediären Resistenz bei Staphylokokken ist nicht bekannt. Vermutlich können die Bakterien dem Angriff von Vancomycin an den Zellwandvorläufern durch eine dickere, unorganisiertere Zellwandstruktur entgehen (Sieradzki und Tomasz, 1999).

Die Organisation des Transposons Tn1546 ist in Abbildung 2 A dargestellt. Die drei Gene *vanA*, *vanH* und *vanX* des *vanA*-Genclusters sind für die Ausprägung der Resistenz notwendig und ausreichend (Arthur et al., 1992b) und scheinen von Glycopeptid-produzierenden Bakterien zu stammen (Marshall et al., 1998). Die VanH Dehydrogenase reduziert Pyruvat zu D-Lactat (Arthur et al., 1992a). Die VanA-Ligase verknüpft die Depsipeptide D-Alanin und D-Lactat (D-Ala-D-Lac) (Bugg et al., 1991), welche die Dipeptide D-Ala-D-Ala im Peptidoglycansyntheseweg ersetzen. Die VanX D,D-Dipeptidase hydrolysiert die Dipeptide D-Ala-D-Ala, welche durch den endogenen, chromosomalen Zellwandsyntheseweg gebildet werden (Reynolds et al., 1994). Der distale Teil von Tn1546 enthält das Gen für eine D,D-Carboxypeptidase (*vanY*), die durch die Hydrolyse von schon geknüpften D-Ala-D-Ala Bindungen an membrangebundenen Peptidoglycanvorläufern zur Glycopeptidresistenz beiträgt (Arthur et al., 1996b) (siehe Abb. 2 B). VanZ vermittelt durch einen bisher unbekanntem Mechanismus die Resistenz gegen Teicoplanin (Arthur et al., 1995). Die Expression der Gene des *vanA*-Genclusters wird durch das Zwei-Komponenten-System VanRS reguliert. Das System besteht aus einer membranständigen Sensor-Kinase VanS und einem cytoplasmatischen Response-Regulator VanR, der im phosphorylierten Zustand als transkriptionaler Aktivator des *vanA*-Operons dient. Die Regulator- und Resistenzgene werden von zwei verschiedenen Promotoren transkribiert. Die Transkription der Regulatorgene *vanRS* erfolgt vom Promotor P<sub>R</sub> und die Gene *vanH*, *vanA*, *vanX*, *vanY* und *vanZ* werden zusammen von dem Promotor P<sub>H</sub> transkribiert. VanRS kontrolliert den Level der Expression der Resistenzgene. Eine Induktion des *vanA*-Genclusters erfolgt wenn Glycopeptide im Nährmedium vorhanden sind (Arthur et al., 1992b, Evers et al., 1996).

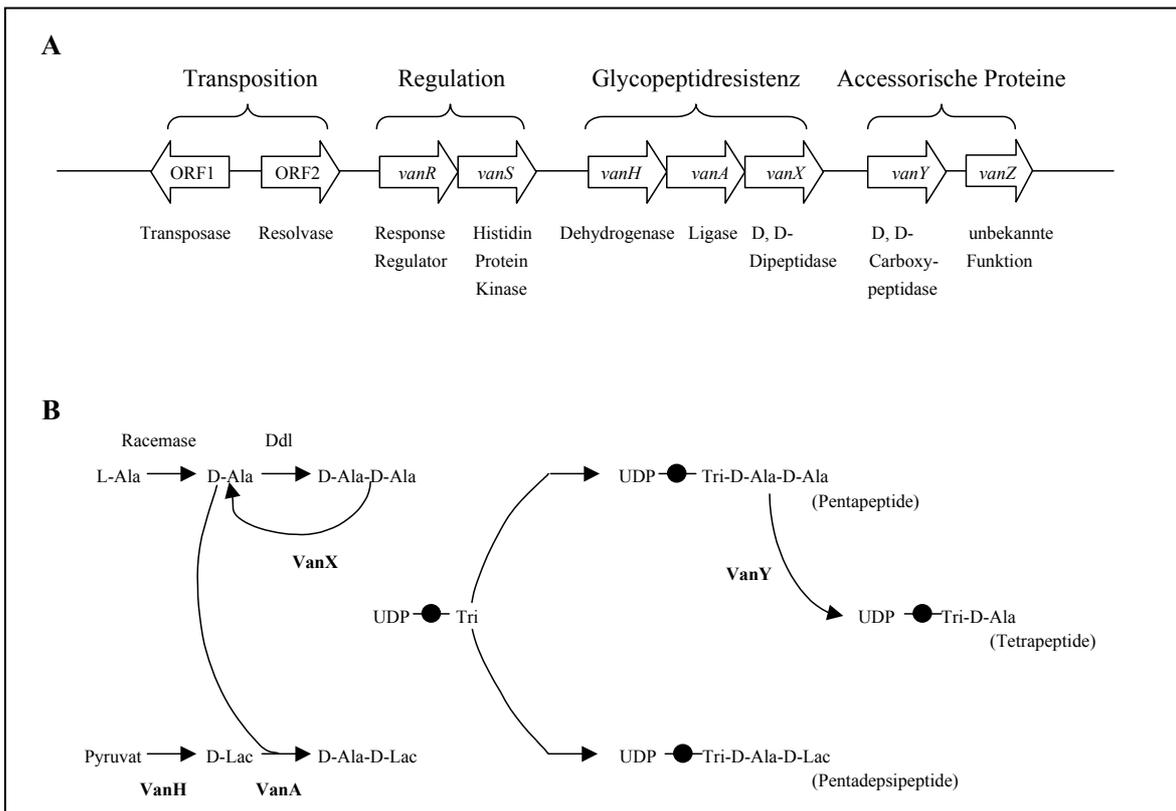


Abb. 2: VanA-Typ der Glycopeptidresistenz (modifiziert nach Perichon und Courvalin, 2000). (A): Organisation des Transposons Tn/546. Die Pfeile zeigen die Gene und deren Orientierung. (B): Schematische Darstellung der Synthese der Peptidoglycanvorläufer in einem Stamm mit VanA-Typ der Glycopeptidresistenz nach Induktion mit einem Glycopeptid. Abkürzungen: Ddl = D-Ala:D-Ala Ligase; ● = N-Acetyl-Muraminsäure

## 2.6 Epidemiologie von VRE

In den USA sind VRE in Krankenhäusern weit verbreitet, wobei vor allem Vancomycin-resistente *E. faecium*-Stämme vorherrschen. Aus einer Studie des „National Nosocomial Infections Surveillance System“ geht hervor, dass von 1994 bis 1998 die VRE-Isolate in Krankenhäusern um 47% zunahm (Mundy et al., 2000, Hospital Infections Program, 1999). Neuere Studien belegen, dass der Nachweis von Vancomycin-resistenten Enterokokken in Krankenhäusern in den USA bei ca. 15% liegt, in Deutschland hingegen bei ca. 1% (Harbarth et al., 2001). Die hohe Prävalenz von VRE in amerikanischen Krankenhäusern ist offensichtlich auf den übermäßigen Einsatz von Vancomycin, von Breitspektrum-Cephalosporinen und von Antibiotika, die gegen Anaerobier wirksam sind, zurückzuführen (Donskey et al., 2000, Patterson, 2001, Tokars et al., 1999). Außerdem konnte gezeigt werden, dass Krankenhauspersonal als Überträger von VRE fungiert. Diese Personen übertragen die Vancomycin-resistenten Enterokokken durch kontaminierte Hände, Handschuhe oder verwendete medizinische Geräte auf Patienten, bei denen sich

daraufrhin eine Infektion mit den Keimen entwickeln kann (Beezhold et al., 1997, Bonten et al., 1996, Livorese et al., 1992).

In Europa tragen andere epidemiologische Parameter zur Verbreitung von VRE bei. Hier war vor allem der Einsatz des Glycopeptid-Antibiotikums Avoparcin als Leistungsförderer in der Tiermast für die Selektion von VRE verantwortlich. Dadurch entstand vor allem in Schweine- und Geflügelmastbetrieben ein Reservoir für VRE. Für diese Bakterien konnte eine Kreuzresistenz zwischen Avoparcin und Vancomycin gezeigt werden. Somit werden durch diesen Futtermittelzusatz Vancomycin-resistente Enterokokken selektioniert (Bager et al., 1997, Klare et al., 1995b, Witte, 1997). In Europa wurde Avoparcin bis zu einem EU-weiten Verbot im April 1997 als Leistungsförderer in der Tiermast eingesetzt. So wurden z. B. in Dänemark im Jahre 1994 24 kg Vancomycin zur Therapie in der Humanmedizin und gleichzeitig 24 000 kg Avoparcin als Futtermittel-Zusatz in der Tiermast verwendet. VRE wurden in Deutschland aus Fleischprodukten, wie z. B. Geflügel und Schweinefleisch isoliert. Die Bakterien können so über die Nahrungskette zum Menschen gelangen (Klare et al., 1995a, Klare et al., 1995b, Chadwick et al., 1996). Aus neueren Studien in Dänemark, wo der Gebrauch von Avoparcin bereits 1995 verboten wurde, geht hervor, dass die Verbreitung von VRE in Geflügel von 72% im Jahre 1995 auf knapp 6% im Jahre 2000 zurückging. Diese epidemiologischen Studien belegen den Rückgang der resistenten Bakterien in Nutztierpopulationen nach Wegfall des selektiven Druckes durch das Antibiotikum (Aarestrup et al., 2001).

## 2.7 Flavophospholipol

Flavophospholipol (FPL), synonym Moenomycin A oder Bambermycin ist ein Phosphoglycolipidantibiotikum, das aus *Streptomyces bambergiensis* isoliert wurde (Huber, 1979). Es besteht aus einer Oligosaccharidkette, die über eine Phosphorsäure-Diester-Bindung an den C<sub>25</sub>-Alkohol Moenicol gebunden ist (siehe Abb. 3) (Fehlhaber et al., 1990). Flavophospholipol hat keinen klinischen Nutzen, da die Substanz schlecht absorbiert wird. Das Antibiotikum wird in der Tiermast als Leistungsförderer für die Aufzucht von Schweinen, Kälbern und Geflügel eingesetzt (Huber, 1979). Das Wirkungsspektrum ist dem von Penicillin ähnlich; FPL wirkt vorwiegend gegen gram-positive Bakterien, vor allem gegen Staphylokokken und Streptokokken. Gram-negative Bakterien sind resistent, da die Substanz die äußere Membran nicht durchdringen kann. *E. faecium* galt lange Zeit als intrinsisch resistent gegen das Antibiotikum (Dutta et al., 1982, Dutta et al., 1984), neuerdings konnten aber auch sensible Stämme isoliert werden (Aarestrup et al., 1998).

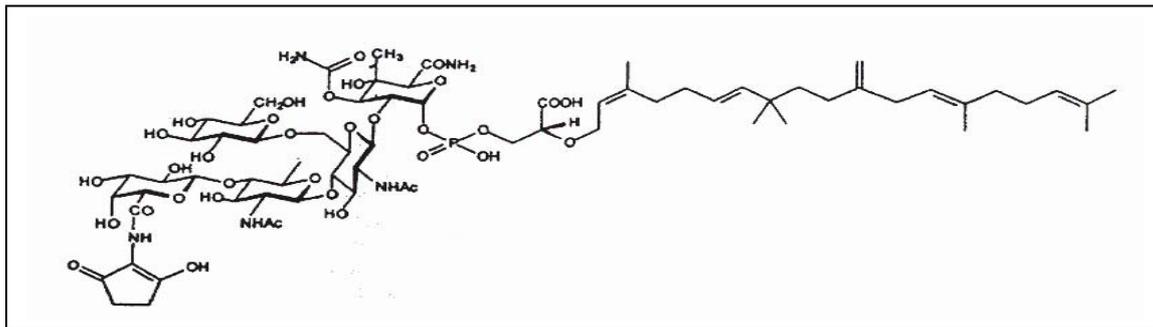


Abb. 3: Struktur von Moenomycin A.

Flavophospholipol hemmt wie Vancomycin die Transglycosylierungsreaktion der Zellwandsynthese. Allerdings erfolgt dies bei FPL durch einen anderen Mechanismus. Peptidoglycan besteht aus sich wiederholenden  $\beta$ -1,4-verknüpften N-Acetyl-Glucosamyl-N-Acetyl-Muramyl-Untereinheiten, die durch kurze Peptidseitenketten quervernetzt sind (Bugg, 1999). Die Peptidoglycansynthese, die von einem membrangebundenen Undecaprenyl ( $C_{55}$ )-gebundenen Disaccharid-Vorläufer (Lipid II) ausgeht, wird durch zwei nachfolgende Reaktionen komplettiert. Eine Transglycosylierungsreaktion verknüpft die N-Acetyl-Glucosamyl-N-Acetyl-Muramyl-Pentapeptide zu unverzweigten Glycansträngen (van Heijenoort, 2001) und eine nachfolgende Transpeptidierungsreaktion führt zur Quervernetzung der Peptid-Einheiten der unterschiedlichen Stränge (Bugg, 1999). Beide Reaktionen werden von „high-molecular-weight“-Penicillin-Bindeproteinen katalysiert (Goffin und Ghuysen, 1998). Diese Penicillin-Bindeproteine sind bifunktional; sie besitzen eine Transglycosylase- und eine Transpeptidase-Untereinheit. Jede dieser Domänen kann spezifisch durch Antibiotika inhibiert werden. Während die  $\beta$ -Lactamantibiotika kovalent an einen essentiellen Serin-Rest der Transpeptidase-Untereinheit binden, inhibiert FPL die Zellwandsynthese durch Bindung an die Transglycosylase-Untereinheit (Goldman und Gange, 2000, van Heijenoort, 2001). Es konnte gezeigt werden, dass FPL reversibel an die Penicillin-Bindeproteine 1a und 1b von *E. coli* bindet (Rechenberg und Höltje, 2000, Stembra et al., 2002, Terrak et al., 1999, van Heijenoort et al., 1987). Auf Grund verschiedener Beobachtungen wurde ein Modell über den Wirkungsmechanismus des Antibiotikums postuliert. Es wird angenommen, dass FPL über die  $C_{25}$ -Moenicol-Untereinheit in der Zytoplasmamembran verankert liegt. Anschließend erfolgt eine hochselektive Erkennung der Oligosaccharid-Untereinheit an der Substrat-Bindungsstelle der Transglycosylase-Untereinheit des „high-molecular-weight“-Penicillin-Bindeproteins (Ritzler et al., 1997, Stembra et al., 2002, Terrak et al., 1999).

---

Flavophospholipol-Derivate könnten in der Humanmedizin, vor allem bei der Bekämpfung von Infektionen, die durch multiresistente gram-positive Keime hervorgerufen werden, eine wichtige Rolle spielen. Kürzlich wurden synthetische Disaccharid-Derivate basierend auf der FPL Disaccharid-Untereinheit auf ihre Wirkung getestet (Baizman et al., 2000, Sofia et al., 1999). Diese Analoga waren bakterizid gegen gram-positive Bakterien (Baizman et al., 2000). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass FPL mit dem Penicillin-Bindeprotein 2a eines Methicillin-resistenten *S. aureus*-Stammes interagiert (Graves-Woodward und Pratt, 1999). Somit könnte die Inhibition der Transglycosylierungsreaktion einen vielversprechenden Ansatz für das Design neuer Therapeutika gegen Antibiotika-resistente Bakterien sein.

## 2.8 Zielsetzung dieser Arbeit

Die *vanA*-Resistenzdeterminante wird meist von konjugativen Plasmiden kodiert und kann daher zwischen Enterokokken-Stämmen transferiert werden. Da Flavophospholipol und Vancomycin die Expression der *vanA*-Resistenzgene induzieren, sollte in dieser Arbeit untersucht werden, ob der Einfluss der beiden Antibiotika auch eine Veränderung der Transferrate der konjugativen VanA-Plasmide zur Folge hat. Weiterhin sollte der Einfluss von verschiedenen Antibiotika, sowie von Hitze- und osmotischem Stress auf die Expression des 39 kDa VanA-Ligase Proteins untersucht werden. Der Nachweis des Proteins sollte hierbei immunologisch durch die Bindung eines spezifischen VanA-Ligase Antikörpers im Western Blot erfolgen.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war die Aufklärung des Resistenzmechanismus gegen Flavophospholipol in *E. faecium*. Diese Enterokokken-Spezies galt lange als intrinsisch resistent gegen FPL. Jedoch wurden neuerdings Flavophospholipol-sensitive *E. faecium*-Stämme beschrieben, was auf einen spezifischen FPL-Resistenzmechanismus in *E. faecium* hindeutet. Um die genetische Ursache der FPL-Resistenz zu analysieren, sollte ein FPL<sup>r</sup> *E. faecium*-Stamm durch das konjugative Transposon Tn916 mutagenisiert werden. Daraufhin sollte in FPL-sensitiven Klonen die Transposon-Insertionsstelle charakterisiert werden. Außerdem sollte die konjugative Übertragbarkeit der putativen FPL-Resistenzdeterminante überprüft werden.

### 3. Material

#### 3.1 Bakterienstämme

Die in dieser Arbeit verwendeten *E. coli*- und *Enterococcus*-Stämme sind in Tabelle 2 und 3 aufgeführt.

Tab. 2: In dieser Arbeit verwendete *E. coli*-Stämme.

E. coli K-12-Stämme	Charakteristika	Quelle
DH5 $\alpha$	F <sup>-</sup> , <i>endA1</i> , <i>hsdR17</i> (r <sub>k</sub> <sup>-</sup> , m <sub>k</sub> <sup>-</sup> ), <i>supE44</i> , <i>thi-1</i> , <i>recA1</i> , <i>GyrA96</i> , <i>relA1</i> , $\lambda^-$ , $\Delta(\text{argF-lac})\text{U169}$ , $\Phi 80\text{dlacZ } \Delta\text{M15}$	Sambrook, et al., 1989
M15	Nal <sup>s</sup> , Str <sup>s</sup> , Rif <sup>s</sup> , Thi <sup>-</sup> , Lac <sup>-</sup> , Ara <sup>+</sup> , Gal <sup>+</sup> , Mtl <sup>-</sup> , F <sup>-</sup> , RecA <sup>+</sup> , Uvr <sup>+</sup> , Lon <sup>+</sup>	Qiagen

Tab. 3: In dieser Arbeit verwendete Enterokokken-Stämme.

Stamm	Herkunft	Resistenzen, MHK-Werte ( $\mu\text{g/ml}$ )
<i>E. faecium</i> AW2	Abwasser, Klare et al., 1992b	VAN>1024; FPL 16
<i>E. faecium</i> 2E121198	Schwein, HR Vet	VAN>1024; FPL>128
<i>E. faecium</i> 2121198	Schwein, HR Vet	VAN>1024; FPL>128
<i>E. faecium</i> 9191198	Schwein, HR Vet	VAN>1024; FPL>128
<i>E. faecium</i> 70/90	Klinisches Isolat, Klare et al., 1992b	VAN>1024; FPL 16
<i>E. faecium</i> 6011	Klinisches Isolat, Klare et al., 1992b	VAN>1024; FPL 16
<i>E. faecium</i> 64/3	RKI, Wernigerode	RIF, FUS, FPL>128
<i>E. faecium</i> 3C080998	Huhn, HR Vet	FPL>128
<i>E. faecium</i> 21151098	Huhn, HR Vet	FPL>128
<i>E. faecium</i> 4E031298	Huhn, HR Vet	FPL>128
<i>E. faecium</i> 19031298	Huhn, HR Vet	FPL>128
<i>E. faecium</i> 1D301098	Huhn, HR Vet	FPL>128
<i>E. faecium</i> 15301098	Huhn, HR Vet	FPL>128
<i>E. faecium</i> 23131198	Huhn, HR Vet	FPL>128
<i>E. faecium</i> 1B181298	Huhn, HR Vet	FPL>128

<i>E. faecium</i> 36031298	Huhn, HR Vet	FPL>128
<i>E. faecium</i> 22261098	Schwein, HR Vet	FPL>128
<i>E. faecium</i> 25301098	Schwein, HR Vet	FPL>128
<i>E. faecium</i> 3E281098	Schwein, HR Vet	FPL>128
<i>E. faecium</i> 2260700	Huhn, HR Vet	FPL 0,5
<i>E. faecium</i> 15141099	Huhn, HR Vet	FPL 0,5
<i>E. faecalis</i> JH2-2	Jacob et al., 1974	RIF, FUS, Tn916 (TE)
<i>E. faecium</i> 110	ATCC 6569, Inversk, Schottland	FPL>128
<i>E. faecium</i> 111	ATCC 6569, Inversk, Schottland	FPL 8

Legende: RKI, Robert Koch-Institut Berlin, Zweig Wernigerode; HR Vet, Firma Hoechst Roussel Vet, Frankfurt am Main; VAN, Vancomycin, FPL, Flavophospholipol; RIF, Rifampicin; FUS, Fusidinsäure; TE, Tetrazyklin

### 3.2 Plasmide

Die in dieser Arbeit verwendeten Plasmide sind in Tabelle 4 dargestellt.

Tab. 4: In dieser Arbeit verwendete Plasmide.

Plasmide	Charakteristika	Quelle
pGEM-T Easy	Vektorsystem für die direkte Klonierung von PCR-Produkten, Ap <sup>r</sup>	Promega
pQE30	Expressions-Plasmid, Ap <sup>r</sup>	Qiagen
pREP4	Repressor-Plasmid, Km <sup>r</sup>	Qiagen
pSR1	pGEM-T Easy; enthält ein 1,1 kb Fragment (VanA-Ligase)	diese Arbeit
pSR2	pQE30; enthält ein 1,1 kb Fragment (VanA-Ligase)	diese Arbeit
pHPS9	„shuttle“ Vektor, Cm <sup>r</sup> , Em <sup>r</sup>	Haima et al., 1990
pRB473	„shuttle“ Vektor, Ap <sup>r</sup> , Cm <sup>r</sup>	Brückner, 1992
pSR3	pHPS9; enthält ein 2,4 kb Fragment (putativer Regulator)	diese Arbeit
pSR4	pRB473; enthält ein 2,4 kb Fragment (putativer Regulator)	diese Arbeit

### 3.3 Oligonukleotide

Die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide sind in Tabelle 5 aufgeführt.

Tab. 5: In dieser Arbeit verwendete Oligonukleotide.

Bezeichnung	Sequenz 5'-3'	Annealingtemperatur
E.fae up	GCA AGG CTT CTT AGA GA	54°C
E.fae down	CAT CGT GTA AGC TAA CTT C	54°C
VanAKpnI	GGT ACC AAT AGA ATA AAA GTT GCA ATA CT	53°C
VanAHindIII	AAG CTT CCA ACG AAC ACC GTG TAC TA	53°C
Tn916 uni	ACC ATT GCG AAG CGT CGC TCT GA	50°C
TetM rev	CAT TTG TTT GAT GAT GAG GGT GC	50°C
BG 285	GAC CTT GAT AAA GTG TGA TAA GTC	55°C
BG 286	CTC GAA AGC ACA TAG AAT AAG GC	55°C
BG 289	GCA TCA ACA TGA GCT AAA ACT CC	55°C
BG 290	TAT CAT GTG ATT CTA AAG TAT CCG	55°C
PBP S. oralis rev	TTG GTC CGT ATG CCA CGA TA	55°C
Thr 256	CAT CGT CCA GTA GTT ATC CA	55°C
PBP S. mitis rev	CTT GAT CAG TAA CAC CGA AG	55°C
PBP gesamt rev 2	TGC CGA GTA AAC GGT GTT CA	55°C
Van 1	CTT GTA TGG ATC CAT CTT CAC	55,5°C
Van 2	GTG GTG TAC ATC GAA TTC AAG	55,5°C

### 3.4 Antikörper

Der in dieser Arbeit verwendete VanA-Ligase Antikörper wurde von der Firma immunoGlobe, Antikörpertechnik GmbH, Großostheim, Deutschland hergestellt.

### 3.5 Chemikalien und Enzyme

Die verwendeten Chemikalien, Enzyme, Antibiotika und Nährstoffe wurden von den Firmen Amersham, Boehringer, Difco, Eurogentec, Fluka, Gibco-BRL, Merck, New England Biolabs, Oxoid, Pharmacia, Promega, Qiagen, Roth, Serva und Sigma bezogen.

#### Folgende Kits wurden verwendet:

- ECL, Amersham Pharmacia Biotech Europe, Freiburg, Deutschland
- GENECLEAN III Kit, Q·Biogene, Europe
- PCR-Purification Kit, Qiagen, Hilden, Deutschland
- Plasmid Midi Kit, Qiagen, Hilden, Deutschland
- pGEM-T Easy Vector System, Promega, Madison, USA
- The QIAexpressionist™, Qiagen, Hilden, Deutschland
- Thermo Sequenase Fluorescence-labelled Primer Cycle Sequencing kit, Amersham
- Pharmacia Biotech Europe, Freiburg, Deutschland

### 3.6 Medien, Agarplatten und Antibiotika

Medien für Flüssigkulturen und Agarplatten wurden bei 120°C und 1 bar Druck für 20 min autoklaviert. Hitzelabile Zusätze wurden sterilfiltriert und nach dem Abkühlen der Lösungen auf 40-50°C zugegeben.

#### 3.6.1 Medien

<u>LB-Medium</u>	10 g Bactotrypton 5 g Hefeextrakt 5 g NaCl ad 1 l Aqua dest.
<u>BHI-Medium</u>	37 g Brain Heart Infusion (Oxoid) ad 1 l Aqua dest.
<u>MH-Medium</u>	12 g Müller-Hinton Medium (Oxoid) Ad 1 l Aqua dest.

CDM-Medium (chemisch definiertes Medium):

Es wurden fünf Chemikalien-Gruppen getrennt vorbereitet und nach dem Autoklavieren (Gruppen 1 und 5) bzw. nach Sterilfiltration (Gruppen 2, 3 und 4) zusammengegeben. Der pH-Wert jeder Gruppe wurde auf 7,0 eingestellt. Die Mengenangaben beziehen sich auf 1 l Medium.

Gruppe 1

FeSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	5 mg
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	200 mg
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	200 mg
MgSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O	5 mg
MnSO <sub>4</sub>	5 mg

zusammen lösen in :100 ml H<sub>2</sub>OGruppe 2

Alanin	100 mg
Arginin	100 mg
Aspartat	100 mg
Cystein	50 mg
Glutamat	100 mg
Glycin	100 mg
Histidin	100 mg
Isoleucin	100 mg
Leucin	100 mg
Lysin	100 mg
Methionin	100 mg
Phenylalanin	100 mg
Prolin	100 mg
Hydroxyprolin	100 mg
Serin	100 mg
Tryptophan	100 mg
Tyrosin	100 mg
Valin	100 mg

lösen in \*:

H<sub>2</sub>O (NaOH)  
H<sub>2</sub>O  
H<sub>2</sub>O (KOH)  
H<sub>2</sub>O (NaOH)  
H<sub>2</sub>O (NaOH)  
H<sub>2</sub>O  
H<sub>2</sub>O (NaOH)  
H<sub>2</sub>O (KOH)  
H<sub>2</sub>O, heiß (KOH)  
H<sub>2</sub>O  
H<sub>2</sub>O (KOH)  
H<sub>2</sub>O (HCl)  
H<sub>2</sub>O  
H<sub>2</sub>O  
H<sub>2</sub>O (HCl)  
H<sub>2</sub>O (HCl)  
H<sub>2</sub>O (KOH)  
H<sub>2</sub>O (KOH)

Gruppe 3

p-Aminbenzoesäure	0,2 mg
Biotin	0,2 mg
Niacinamid	1 mg
β-Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid	2,5 mg
Pyridoxamin	1 mg
Riboflavin	2 mg

lösen in :

20 µl H<sub>2</sub>O  
40 µl H<sub>2</sub>O, heiß  
100 µl H<sub>2</sub>O  
250 µl H<sub>2</sub>O (HCl)  
1,54 ml H<sub>2</sub>O/Ethanol  
30 ml H<sub>2</sub>O/ Ethanol

<u>Gruppe 4</u>		<u>lösen in *:</u>
Adenin	20 mg	H <sub>2</sub> O (HCl/NaOH)
Guanin-Hydrochlorid	20 mg	H <sub>2</sub> O (HCl/NaOH)
Uracil	20 mg	H <sub>2</sub> O (HCl/NaOH)
<u>Gruppe 5</u>		<u>zusammen lösen in :</u>
Glukose	5000 mg	100 ml H <sub>2</sub> O (warm)
CaCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O	10 mg	
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	300 mg	
NaHCO <sub>3</sub>	500 mg	

\*jeweils der kleinstmöglichen Menge H<sub>2</sub>O, wobei nach Bedarf Säure bzw. Base zugegeben wird.

### 3.6.2 Agarplatten

Zu den jeweiligen Medien wurden 15 g Agar pro Liter hinzugefügt.

### 3.6.3 Antibiotika

Die in dieser Arbeit verwendeten Antibiotika sind in Tabelle 6 dargestellt.

Tab. 6: In dieser Arbeit verwendete Antibiotika.

Antibiotikum	Stocklösung (gelöst in)
Ampicillin	100 mg/ml (H <sub>2</sub> O)
Bacitracin	8 mg/ml (H <sub>2</sub> O)
Cefalexin	32 mg/ml (H <sub>2</sub> O)
Cefepim	32 mg/ml (H <sub>2</sub> O)
Ceftriaxon	32 mg/ml (H <sub>2</sub> O)
Cefuroxim	32 mg/ml (H <sub>2</sub> O)
Chloramphenicol	10 mg/ml (100% Ethanol)
Clindamycin	32 mg/ml (H <sub>2</sub> O)
D-Cycloserin	32 mg/ml (H <sub>2</sub> O)
Erythromycin	10 mg/ml (70% Ethanol)
Flavophospholipol	16 mg/ml bzw. 1 mg/ml (H <sub>2</sub> O)
Fosfomycin	1 mg/ml (H <sub>2</sub> O)
Fusidinsäure	20 mg/ml (100% Ethanol)
Kanamycin	25 mg/ml (H <sub>2</sub> O)

Meropenem	4 mg/ml (H <sub>2</sub> O)
Metronidazol	32 mg/ml (H <sub>2</sub> O)
Penicillin G	2 mg/ml (H <sub>2</sub> O)
Rifampicin	3 mg/ml (70% Ethanol)
Tetrazyklin	10 mg/ml (70% Ethanol)
Tunicamycin	2 mg/ml (H <sub>2</sub> O)
Vancomycin	50 mg/ml bzw. 1mg/ml (H <sub>2</sub> O)

### 3.7 Geräte

Autoklaven	Webeco
Brutschränke	Heraeus
Elektrophoresekammern	horizontal: Hartenstein (Würzburg); vertikal: Eigenbau, (Mechanikwerkstatt)
Minigelkammer	Protean II xi, BioRad
Filme	Hyperfilm ECL
Heizblöcke	Eppendorf - Thermostat 5320, Liebisch
Magnetrührer	GLW
Mikroliterpipetten	Gilson, Eppendorf
Mikroskope	Leitz, Zeiss
Mikrowellengerät	Siemens
Netzgeräte	Desaga 500/200; Consort E455
PCR-Thermocycler	bio-med Thermocycler 60
pH-Meter	WTW pH 523, Metrohm-Herisau
Photometer	Pharmacia
Schüttelinkubator	Clim-O-Shake (Braun-Melsungen)
Spannungsgerät	BioRad PowerPac
Sterilarbeitsbank	NuAire II Type A/B3, Heraeus Lamin Air HBB2448, Flow Gelaire
Ultraschallgerät	Branson Sonifier B12
Videoprinter	Mitsubishi, BioRad
Vortexer	GLW
Waagen	Sartorius 2403, Satorius Feinwaage
Wasserbad	GFL 1083
Zentrifugen	Hettich Mikroliter Zentrifuge; Beckmann J2-21 und J-21B mit JA10 und JA20 Festwinkelrotoren; Heraeus Sepatech Minifuge RF; Heraeus Biofuge 13 und 15; Eppendorf

## 4. Methoden

### 4.1 Bestimmung der Bakterienspezies

Die in dieser Arbeit verwendeten Enterokokken-Stämme wurden sowohl durch die biochemische Differenzierung nach Devriese et al. (1993) als auch durch die molekulargenetische Methode nach Dutka-Malen et al. (1995) als *E. faecium* charakterisiert. Die biochemische Methode erlaubt eine Differenzierung innerhalb der Enterokokken-Gruppen bis auf Speziesebene durch einen Vergleich der Verwertung verschiedener Zucker. Diese Methode wurde vor allem für die Unterscheidung der Arten *E. faecium* und *E. faecalis* verwendet. *E. faecium* kann die Zucker Melibiose und L-Arabinose verwerten, *E. faecalis* nicht. *E. faecalis* kann Pyruvat fermentieren, *E. faecium* nicht. Die molekulargenetische Methode beruht auf der Amplifikation des Gens, das für die D-Alanin:D-Alanin-Ligase kodiert und für *E. faecium* spezifisch ist. Die hierfür verwendeten Oligonukleotide (*E. fae up*/ *E. fae down*) sind unter 3.2 aufgeführt.

### 4.2 Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration

Zur Bestimmung der Resistenzen verschiedener Enterokokken-Stämme wurde die minimale Hemmkonzentration (MHK) der entsprechenden Bakterien im Bouillon-Verdünnungstest ermittelt. Dabei wurden ausgehend von einer Antibiotikum-Stammlösung (1 mg/ml) Verdünnungsreihen des Antibiotikums in Müller-Hinton-Nährmedium hergestellt. Es wurden 2 ml der Stammlösung mit 5,82 ml Müller-Hinton-Nährmedium (entspricht einer Antibiotikum-Konzentration von 256 µg/ml) gemischt. Davon wurden 0,5 ml zu einer Verdünnungsreihe pipettiert, in der 0,5 ml Medium vorgelegt waren. Nach den Verdünnungsschritten wurde in jedes Röhrchen 0,5 ml Nährbouillon pipettiert, die  $10^5$ - $10^6$  Bakterien aus einer 4 h gewachsenen Bakterienzwischenkultur enthielt. Anschließend wurden die Proben für 24 h bei 37°C inkubiert. Der MHK-Wert entspricht der niedrigsten Konzentration des Antibiotikums, bei der kein Wachstum mehr zu erkennen ist.

### 4.3 *In vitro*-Filterkonjugation

Die Untersuchung der Konjugationsfähigkeit der Determinanten für verschiedene Antibiotikaresistenzen wurde auf Nitrozellulosefiltern durchgeführt. Der enge Kontakt der Bakterien, der dadurch erreicht wird, ist eine wichtige Voraussetzung für eine erfolgreiche Konjugation bei *Enterococcus faecium*. Eine Übernachtskultur des Donor- und des

Rezipientenstammes in Brain-Heart-Infusion (BHI) wurde 1:5 verdünnt und bei 37°C für 3 h inkubiert. Daraufhin wurde je 1 ml Donor- und Rezipientenkultur in einem Röhrchen gemischt. Das Medium wurde über einen Nitrozellulosefilter mittels Unterdruck (Wasserstrahlpumpe) abgesaugt. Die Unterseite des Filters wurde auf einer BHI-Agarplatte platziert, die Bakterien befanden sich dabei auf der Oberseite. Die Inkubation des Ansatzes erfolgte für 24 h bei 37°C. Anschließend wurde das Bakteriensediment in 1 ml 0,9% NaCl aufgenommen. Es wurden entsprechende Verdünnungen ( $10^{-3}$ - $10^{-5}$ ) zu je 100 µl auf BHI-Selektionsplatten ausplattiert. Für die Selektion der Donorstämme wurden 50 µg/ml Vancomycin bzw. 16 µg/ml Flavophospholipol (FPL) eingesetzt. Die Rezipienten wurden mit 20 µg/ml Fusidinsäure und 30 µg/ml Rifampicin selektioniert. Für die Selektion der Transkonjuganten wurden 20 µg/ml Fusidinsäure, 30 µg/ml Rifampicin und 50 µg/ml Vancomycin bzw. 16 µg/ml Flavophospholipol (FPL) eingesetzt.

#### 4.4 Isolierung von Rifampicin- und Fusidinsäure-resistenten Rezipienten

Für Untersuchungen zum Transfer der Flavophospholipol-Resistenz mittels *in vitro*-Filterkonjugation wurden in geeignete FPL-sensitive *E. faecium*-Stämme Resistenzen zur Selektion eingeführt. Um das Risiko von Spontanmutationen gering zu halten, wurden hierbei zwei Antibiotika verwendet. Durch wiederholte Passagen der Enterokokken-Stämme in BHI-Medium mit ansteigenden Konzentrationen an Fusidinsäure bzw. Rifampicin wurden resistente Klone erzeugt. Resistenzen gegen Fusidinsäure und Rifampicin in den entsprechenden Zielgenen entstehen mit einer Häufigkeit von  $10^{-6}$ - $10^{-7}$ . Bakterien aus einer Übernachtskultur wurden in einer Verdünnung von 1:1000 in frisches BHI-Medium inokuliert, welches 3 µg/ml Rifampicin enthielt. Nach Inkubation über Nacht bei 37°C wurde die Kultur abermals 1:1000 in frischem BHI-Medium verdünnt, welches 30 µg/ml Rifampicin enthielt. Nach weiteren 24 h wurden aus dieser Kultur geeignete Verdünnungen auf BHI-Agarplatten mit 30 µg/ml Rifampicin ausplattiert. Von diesen Selektionsplatten wurde eine einzelne Kolonie in BHI-Medium mit 30 µg/ml Rifampicin und 2 µg/ml Fusidinsäure inokuliert. Nach Inkubation über Nacht wurde die Kultur wiederum 1:1000 in BHI-Medium verdünnt, welches nun 30 µg/ml Rifampicin und 20 µg/ml Fusidinsäure enthielt. Nach weiteren 24 h wurden von dieser Kultur geeignete Verdünnungen auf BHI-Agarplatten mit 30 µg/ml Rifampicin und 20 µg/ml Fusidinsäure ausplattiert. Hiervon wurde eine einzelne Kolonie als Rezipientenstamm für die Filterkonjugationsexperimente verwendet.

## 4.5 Pulsfeld-Gelelektrophorese (PFGE)

### 4.5.1 Gesamt-DNS-Isolierung aus Enterokokken

Aus 10 ml Übernachtskultur in BHI wurden 2 ml abzentrifugiert. Daraufhin wurde das Pellet zweimal in je 1 ml SE-Puffer gewaschen und anschließend in 0,5 ml SE-Puffer resuspendiert. 100 µl dieser Bakteriensuspension wurden mit 900 µl Aqua dest. verdünnt, so dass die optische Dichte  $OD_{600nm}$  zwischen 0,5 und 0,7 lag. Davon wurden 0,5 ml vorgewärmt, mit 0,5 ml „low-melting“-Agarose und 50 µl Lysozym (Stocklösung: 2,5 mg/ml) gemischt und gleich anschließend in eine spezielle Gießvorrichtung (Biorad) pipettiert. Die erkalteten Agarblöckchen wurden in ein Röhrchen mit 3 ml EC-Puffer überführt und für 1 h bei 37°C geschüttelt. Daraufhin wurde der Puffer durch frischen EC-Puffer mit 1 mg/ml Proteinase K ersetzt. Die Proben wurden über Nacht bei 55°C leicht geschüttelt. Anschließend wurden die Blöckchen dreimal für mindestens 1 h in 10 ml TE-Puffer gewaschen. Die Agaroseblöckchen wurden bei 4°C aufbewahrt.

### 4.5.2 Restriktionsspaltung

Die DNS in den Agaroseblöckchen wurde mit dem Restriktionsenzym *SmaI* in One-Phor-All-buffer (Pharmacia) gespalten. Dieses Enzym hat sich für Pulsfeld-Experimente bei Enterokokken bewährt. Es wurde jeweils ein Blöckchen in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß mit Puffer vorinkubiert (1 h, 50°C). Anschließend wurde der Puffer erneuert und mit 20 Units *SmaI* gemischt. Die Restriktionsspaltung erfolgte nun bei 25°C für 4 h.

### 4.5.3 Pulsfeldgelelektrophorese

Dazu wurde ein 1%-iges Agarosegel in 0,5×TBE-Puffer gegossen. Die Agaroseblöckchen mit der gespaltenen genomischen DNS wurden nun in die Taschen des Gels überführt, ebenso der „low range“ PFGE-Marker und der „Lambda Ladder“ PFGE-Marker (New England Biolabs). Die Taschen wurden mit Agarose verschlossen, und das Gel wurde in die Pulsfeldgelapparatur (CHEF-DRIII-System, Biorad) überführt. Als Laufpuffer wurde 1×TBE-Puffer verwendet.

#### Laufparameter:

Kühlgerät auf 12°C, Pumpgeschwindigkeit: 60

Die Dateneingabe des Pulsgebers ist in Tabelle 7 angegeben.

Tab. 7: Dateneingabe des Pulsgebers.

	Block 1	Block 2
initial time	5 s	0,5 s
final time	40 s	10 s
running time	10 h	10 h

Das Gel wurde nach dem Lauf in Ethidiumbromidlösung gefärbt, kurz gewässert und anschließend fotografiert.

#### 4.5.4 Lösungen

##### SE-Puffer

75 mM NaCl  
25 mM EDTA  
pH 7,5

##### TE-Puffer

100 mM Tris/HCl pH 7,5  
10 mM EDTA pH 7,5

##### EC-Puffer

6 mM Tris/HCl pH 7,5  
1 M NaCl  
100 mM EDTA pH 7,5  
0,5% Brij  
0,2% Deoxycholat  
0,5% N-Laurylsulfat

##### Puffer für LGT-Agarose

10 mM Tris/HCl pH 7,5  
10 mM MgCl<sub>2</sub>  
0,1 mM EDTA

#### 4.6 SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE) der Gesamtzellproteine von Enterokokken

Zur Darstellung des VanA-Ligase Proteins wurden aus den Enterokokken-Stämmen Proteine isoliert und unter denaturierenden Bedingungen im SDS-Polyacrylamidgel

aufgetrennt. Als Größenmarker diente der „Full Range Rainbow recombinant protein molecular weight marker“ (Amersham).

#### 4.6.1 Isolierung von Gesamtzellproteinen

1,5 ml einer Übernachtskultur wurden in 23,5 ml frisches BHI-Medium überführt. Die Kultur wurde ohne Schütteln bei 37°C bis zu einer optischen Dichte von OD<sub>600nm</sub> von 0,18 inkubiert. Danach wurden die Bakterien abzentrifugiert und das Pellet wurde einmal mit kaltem Phosphatpuffer (0,05 M; pH 7,5) mit zugesetztem Proteinaseinhibitor („Complete<sup>TM</sup>“, Roche) gewaschen. Das Zellpellet wurde in 30 µl Phosphatpuffer aufgenommen und in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Nach Zugabe von 5 µl Lysozym (50 mg/ml) und 1 µl DNase (1 mg/ml) wurde der Ansatz bei 37°C für 1 h inkubiert. Danach wurden die Proben mit 4×Laemmli-Puffer gemischt und für 5 min bei 95°C aufgeköcht. Anschließend wurde kurz abzentrifugiert und eine geeignete Menge des Überstands auf das Gel aufgetragen.

#### 4.6.2 Chemikalien

##### Gel

Acrylamid/bis-Acrylamid (30%/ 0,4%)  
1,5 M Tris-HCl-Puffer (pH 8,8)  
0,5 M Tris-HCl-Puffer (pH 6,8)  
10% SDS-Lösung  
TEMED und 10% Ammoniumpersulfat

##### 10×SDS-Laufpuffer

Tris 30 g  
Glycin 144 g  
SDS 10 g  
Aqua dest. ad 1 l

##### Färbelösung

0,05% Coomassie-Blue R 250  
50% Methanol  
10% Eisessig  
40% Aqua dest.

##### Entfärbelösung

5% Methanol  
7% Eisessig  
88% Aqua dest.

##### 4×Laemmli-Puffer

5 ml β-Mercaptoethanol  
2 ml 3,125 M Tris/HCl (pH 6,8)  
8 ml 25% SDS  
10 ml 86% Glycerin  
20 mg Bromphenolblau

### 4.6.3 Herstellung eines Polyacrylamidgels

Zur Darstellung des VanA-Ligase Proteins aus *E. faecium* hat sich die Verwendung von 10% Proteingelen bewährt.

<u>Trenngel:</u>	Acrylamid/bis-Acrylamid (30%/ 0,4%)	3,3 ml
	1,5 M Tris-HCl-Puffer (pH 8,8)	2,5 ml
	10% SDS-Lösung	0,1 ml
	Aqua dest.	4,0 ml
	TEMED	0,004 ml
	10% Ammoniumpersulfat	0,1 ml

Das Trenngelgemisch wurde sofort in die Gießvorrichtung pipettiert und mit Isopropanol überschichtet.

<u>Sammelgel:</u>	Acrylamid/bis-Acrylamid (30%/ 0,4%)	0,83 ml
	0,5 M Tris-HCl-Puffer (pH 6,8)	0,63 ml
	10% SDS-Lösung	0,05 ml
	Aqua dest.	3,4 ml
	TEMED	0,005 ml
	10 % Ammoniumpersulfat	0,05 ml

Nach dem Auspolymerisieren des Trenngels wurde das Sammelgel auf das Trenngel gegossen und der Kamm eingesetzt.

### 4.6.4 Elektrophorese-Lauf

Für die Auftrennung der Proteine im elektrischen Feld wurde die Apparatur BioRad-Mini-ProteanII Cell (BioRad) verwendet. Der Elektrophorese-Lauf erfolgte bei konstanten 32 mA (für zwei Gele) bei 24 mA (für ein Gel).

### 4.6.5 Anfärben des Gels

Nach der Elektrophorese wurde das Gel aus der Apparatur genommen und für 30 min in der Färbelösung geschwenkt. Danach wurde für 30 min entfärbt. Das Gel wurde eingescannt oder in Aqua dest. aufbewahrt.

## 4.7 Herstellung eines VanA-Ligase Antikörpers

### 4.7.1 Klonierung, Expression und Aufreinigung des VanA-Ligase Proteins

Für die Klonierung, die Überexpression und die Aufreinigung des rekombinanten VanA-Ligase Proteins wurde das System „The QIAexpressionist™“ (Qiagen) verwendet. Mit diesem System werden rekombinante Proteine überexprimiert, mittels sechs angehängter Histidinreste an eine Nickel-Nitrilotriessigsäure-Agarose Matrix (Ni-NTA-Agarose) gebunden und anschließend mit geeigneten Puffern eluiert. Das *vanA*-Ligase Gen wird 5' im gleichen Leserahmen wie der N-terminale 6×His „tag“ in den Vektor pQE30 kloniert. Der Vektor kodiert für ein  $\beta$ -Lactamase Gen, welches Resistenz gegen Ampicillin vermittelt. Die Expression des rekombinanten Proteins basiert auf einem T5 Promotor Transkriptions-Translationssystem. Das Promotor-Operator Element besteht aus einem T5 Phagen-Promotor und „downstream“ zwei *lac* Operator-Sequenzen, welche in „cis“ durch das *lac* Repressor-Protein Lac I reprimiert werden. Der Repressor wird von dem Plasmid pREP4 kodiert. Dieses Plasmid vermittelt Resistenz gegen Kanamycin und liegt im „QIAexpress“ *E. coli* Stamm M15 [pREP4] vor. Die Expression des rekombinanten VanA-Ligase Proteins kann im Stamm *E. coli* M15 [pREP4] durch Zugabe von Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactosid (IPTG) induziert werden. IPTG bindet an Lac I und inaktiviert somit dessen Funktion. Nun kann die RNA-Polymerase der Wirtszelle die Sequenzen „downstream“ des Promotors transkribieren und die Transkripte können zu dem rekombinanten Protein translatiert werden. Genauere Informationen sind dem Handbuch zu entnehmen.

Ein Klon des Stammes *E. coli* M15 [pREP4]/[pQE30-VanA-Ligase] wurde über Nacht in 20 ml LB-Medium mit dem Zusatz von 100  $\mu$ g/ml Ampicillin und 25  $\mu$ g/ml Kanamycin inkubiert. Von dieser Kultur wurden 5 ml in 245 ml frisches LB-Medium mit 100  $\mu$ g/ml Ampicillin und 25  $\mu$ g/ml Kanamycin überführt. Diese Bakterienkultur wurde für 3 h bei 37°C geschüttelt bis eine  $OD_{600nm}$  von 0,56 erreicht war. Nun erfolgte die Induktion mit 1 mM IPTG. Nach weiterer Inkubation für 4 h wurden die Zellen abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 25 ml Lysispuffer aufgenommen und in zwei 50 ml Falkonröhrchen überführt. Die Zellen wurden fünfmal für jeweils 30 s sonifiziert. Die Proben wurden zwischen den Schritten jeweils für 3 min auf Eis gestellt. Die Zelltrümmer wurden abzentrifugiert. Um die Expression des rekombinanten VanA-Ligase Proteins und den Zellaufschluss zu überprüfen, wurden vor der Zugabe von IPTG, vor und nach dem Sonifizieren Aliquots von je 1 ml entnommen und im Proteingel überprüft. Die

Aufreinigung des VanA-Ligase Proteins erfolgte unter nativen Bedingungen. Dazu wurden 20 ml des Überstands mit 3 ml Ni-NTA-Agarose gemischt und bei 4°C für 1 h geschüttelt. Danach wurde die Probe über eine Säule („Ni-NTA Spin column“) gegossen, die mit Lysispuffer equilibriert war. Die Säulenmatrix wurde 4-5 mal mit Waschpuffer gewaschen, der 40 mM Imidazol enthielt. Nun folgten fünf Elutionsschritte mit Elutionspuffer, der Imidazol in ansteigender Konzentration enthielt. Imidazol bindet wie Histidin an die Ni-NTA Matrix der Säule. Steigt die Konzentration des Imidazols auf 100 bzw. 250 mM, werden die Histidin-Reste von der Matrix verdrängt und das Protein löst sich von der Säule. Der erste Puffer enthielt 100 mM Imidazol, der zweite 200 mM Imidazol. Danach wurde dreimal mit 250 mM Imidazol eluiert. Von jeder Fraktion wurde ein Aliquot von 50 µl entnommen, um die Effektivität der Elution im Proteingel zu überprüfen. Die Aufreinigung erfolgte bei 4°C, aufbewahrt wurden die Proteine bei –80°C.

Verwendete Puffer:

Lysispuffer

100 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
300 mM NaCl  
10 mM Imidazol  
pH 8,0 (mit NaOH)

Waschpuffer

100 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
300 mM NaCl  
20 mM Imidazol  
pH 8,0 (mit NaOH)

Elutionspuffer

50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
300 mM NaCl  
100, 200 oder 250 mM Imidazol  
pH 8,0 (mit NaOH)

Alle Puffer waren mit dem Proteinaseinhibitor („Complete<sup>TM</sup>“, Roche) versetzt.

#### **4.7.2 Herstellung polyklonaler VanA-Ligase Antikörper**

Das aufgereinigte rekombinante VanA-Ligase Protein wurde zur Herstellung spezifischer Kaninchenantikörper verwendet. Dazu wurde zunächst der Elutionspuffer mittels Dialyse durch 1×PBS-Puffer ersetzt. Die Konzentration des VanA-Ligase Proteins wurde durch die Methode nach Bradford bestimmt. Die Firma immunoGlobe (Großostheim) verwendete jeweils 500 µg rekombinante VanA-Ligase Proteinlösung zur Immunisierung eines

Kaninchens. Es wurden 100 µl VanA-Ligase Proteinlösung (5 mg/ml) mit 100 µl Montanide gemischt und dem Kaninchen gespritzt. Danach wurden zweimal im Abstand von zwei Wochen wiederum 100 µl der Proteinlösung (5 mg/ml) und 100 µl MISA injiziert. Zwei Wochen später erfolgte die erste Testblutung. Nach weiteren zwei Wochen wurde erneut mit 100 µl VanA-Ligase Proteinlösung (5 mg/ml) und 100 µl MISA immunisiert. Vierzehn Tage später wurde die zweite Testblutung durchgeführt und nach zwei Wochen wurden erneut 100 µl der Proteinlösung (5 mg/ml) und 100 µl MISA injiziert. Nach weiteren zwei Wochen erfolgte erneut eine Testblutung und vier Wochen später die finale Blutung.

#### **4.8 Western Blot**

Das Western Blot-Verfahren wurde zum immunologischen Nachweis des VanA-Ligase Proteins eingesetzt. Die Proteine wurden wie beschrieben im SDS-Polyacrylamid-Gel elektrophoretisch aufgetrennt. Anschließend erfolgte deren Transfer auf eine Nitrozellulose-Membran mittels eines Graphit-Blotters. Dafür wurden Whatman-Papiere und die Nitrozellulose-Membran auf Gelgröße zurechtgeschnitten. Die Graphitplatte auf der Anodenseite wurde mit Aqua dest. befeuchtet, darauf wurden sechs Lagen mit Anodenpuffer I und drei Lagen mit Anodenpuffer II getränkte Whatman-Papiere gelegt. Hierauf wurde nun die ebenfalls mit Anodenpuffer II befeuchtete Nitrozellulose-Membran und das Gel möglichst luftblasenfrei platziert. Obenauf wurden drei Lagen Whatman-Papier gelegt, welche mit Kathodenpuffer getränkt waren. Zum Schluss wurde die mit Aqua dest. befeuchtete Graphitplatte der Kathode aufgesetzt. Der Transfer der Proteine erfolgte bei konstanten 56 mA. Anschließend wurde die Membran für eine Stunde in 5% Magermilchpulver in 1×TBS Puffer geblockt. Als primärer Antikörper wurde der in dieser Arbeit hergestellte spezifische VanA-Ligase Antikörper 1:1000 verdünnt zugegeben. Die Inkubation der Membran erfolgte über Nacht bei 4°C. Am nächsten Tag wurde diese dreimal für je 5 min mit 1×TBS Puffer gewaschen. Anschließend wurde die Membran mit dem sekundären Antikörper inkubiert. Hierbei handelte es sich um einen Anti-Kaninchen IgG Antikörper, der 1:2000 verdünnt, in 1×TBS Puffer mit 5% Magermilchpulver eingesetzt wurde. Der Nachweis des Protein-Antikörper-Komplexes erfolgte mit dem ECL-Reagenz (Amersham) nach Herstellerangaben.

Anodenpuffer I

0,3 M Tris

20% Methanol

Aqua dest.

Anodenpuffer II

25 mM Tris

20% Methanol

Aqua dest.

Kathodenpuffer

25 mM Tris

40 mM Amino-Caprone

20% Methanol

Aqua dest.

1×TBS Puffer

20 ml Tris-HCl pH 7,5

30 ml 5 M NaCl

Aqua dest. ad 1 l

#### 4.9 Isolierung von Plasmid-DNS

Bei dieser Methode werden die Zellen mit NaOH lysiert. Diese alkalischen Bedingungen führen zur Denaturierung von chromosomaler und Plasmid-DNS. Durch Zugabe von Natriumacetat werden die chromosomale DNS und andere zelluläre Bestandteile präzipitiert. Die Plasmid-DNS befindet sich im Überstand der Lösung und wird mit Isopropanol gefällt.

##### 4.9.1 Isolierung von Plasmid-DNS aus *E. coli* im kleinen Maßstab

Von einer unter Selektionsdruck gewachsenen Übernachtskultur wurden 1,5 ml Bakterien abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 150 µl Puffer I (P I) aufgenommen und mit der gleichen Menge Puffer II (P II) versetzt. Der Ansatz wurde vorsichtig gemischt und bei Raumtemperatur für 5 min inkubiert. Anschließend wurden 150 µl Puffer III (P III) zugegeben und das Reaktionsgefäß für 10 min auf Eis gestellt. Danach wurde die Probe für 10 min bei 13000 U/min zentrifugiert, der Überstand wurde sofort darauf vorsichtig abgenommen und mit 0,7 Volumen Isopropanol versetzt. Nach einem weiteren Inkubationsschritt für 10 min auf Eis wurde die ausgefällte Plasmid-DNS für 15 min bei 13000 U/min abzentrifugiert. Das Pellet wurde mit eiskaltem 70% Ethanol gewaschen und bei Raumtemperatur getrocknet. Anschließend wurde die DNS in 50 µl 50 mM Tris-Puffer (pH 8,5) aufgenommen. Die mit dieser Methode isolierte Plasmid-DNS konnte nun direkt für eine PCR-Reaktion oder eine Restriktionsspaltung eingesetzt werden.

verwendete Puffer:

<b>P I</b>	50 mM Tris/HCl pH 8,0 10 mM EDTA 100 µg/ml RNase A	<b>P II</b>	200 mM NaOH 1% SDS	<b>P III</b>	3 M NaAcetat pH 4,8
------------	---	-------------	-----------------------	--------------	------------------------

**4.9.2 Isolierung von Plasmid-DNS aus *E. coli* im mittleren Maßstab**

Diese Plasmidpräparation erfolgte unter Verwendung des „Midi Plasmid Purification Kit“ der Firma Qiagen. Von dem gewünschten Bakterienstamm wurde eine Übernachtskultur in 100 ml LB-Medium unter Selektionsdruck angeimpft und bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Kultur bei 5000 U/min für 10 min bei 4°C pelletiert und der Überstand verworfen. Die Zellen wurden in 4 ml P I resuspendiert. Nach Zugabe von 4 ml P II und vorsichtigem Mischen wurde der Ansatz für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 4 ml PIII zugegeben, der Ansatz erneut geschwenkt und für 15 min auf Eis inkubiert. Nun wurde die Probe in JA 20-Röhrchen in der Kühlzentrifuge bei 15000 U/min für 30 min bei 4°C abzentrifugiert. Der Überstand wurde nochmals für 15 min zentrifugiert, um möglichst alle Partikel zu sedimentieren. Währenddessen wurde eine Säule tip-100 (Qiagen) mit 4 ml Puffer QBT äquilibriert. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand vorsichtig abgenommen und auf die Säule gegeben. Die an die Säulenmatrix gebundene DNS wurde zweimal mit jeweils 10 ml Puffer QC gewaschen und dann mit 5 ml Puffer QF in ein frisches Röhrchen eluiert. Nun wurde die im Eluat enthaltene DNS mit 0,7 Volumen Isopropanol bei Raumtemperatur ausgefällt und anschließend bei 15000 U/min für 30 min bei 4°C abzentrifugiert. Das DNS-Pellet wurde mit 5 ml eiskaltem 70% Ethanol gewaschen, zentrifugiert (15000 U/min, 15 min, 4°C) und nachdem es getrocknet war, in 50-200 µl 50 mM Tris-Puffer (pH 8,5) aufgenommen.

<b>QBT</b>	750 mM NaCl 50 mM MOPS pH 7,0 15% Ethanol 0,15% Triton X-100	<b>QC</b>	1 M NaCl 50 mM Tris/HCl pH 7,0 15% Ethanol	<b>QF</b>	1,25 M NaCl 50 mM Tris/HCl pH 8,5 15% Ethanol
------------	--	-----------	---	-----------	--

#### 4.10 Isolierung chromosomaler DNS aus Enterokokken-Stämmen

Aus einer Übernachtskultur wurden 4 ml abzentrifugiert. Das Pellet wurde mit 1 ml TE-Puffer gewaschen und daraufhin in 100 µl TES-Puffer (10 mM Tris/HCl pH 7,5, 25% Sucrose und 15 µl EDTA pH 8,0) aufgenommen. Dieser Puffer diente der Stabilisierung der chromosomalen DNS. Daraufhin wurden 10 µl Lysozym (50 mg/ml) und 5 µl RNase (10 mg/ml) zugegeben. Der Ansatz wurde vorsichtig invertiert und bei 37°C inkubiert, bis er klar und viskös erschien. Anschließend wurden 375 µl TE-Puffer, 225 µl 10% SDS und 20 µl Proteinase K (Stocklösung: 10 mg/ml) hinzu pipettiert und das Reaktionsgefäß wurde nach vorsichtigem Schwenken für 30 min bei 37°C inkubiert. Nach Zugabe von 150 µl 5 M Natriumperchlorat wurde die Probe mit 0,5 Volumen Chloroform/Isoamylalkohol-Gemisch (24:1) versetzt und für mindestens 1,5 h kräftig geschüttelt, um die chromosomale DNS zu extrahieren, die sich in der oberen, wässrigen Phase befand. Danach wurde für 15 min bei 13000 U/min zentrifugiert und der Überstand mit einer Pipette vorsichtig abgenommen. Anschließend wurde die chromosomale DNS mit dem 2,5fachen Volumen 100% Ethanol gefällt und 10 min bei 13000 U/min pelletiert. Nun wurde die DNS mit 70% Ethanol gewaschen und nach dem Trocknen in 50 µl 50 mM Tris-Puffer (pH 8,5) aufgenommen. Die chromosomale DNS wurde im Kühlschrank aufbewahrt.

#### 4.11 Polymerase Ketten Reaktion (PCR)

PCR-Ansätze wurden für analytische PCR-Reaktionen mit dem Supermix (Gibco) durchgeführt. Sollte das PCR Produkt nachfolgend kloniert werden, wurde die DAP-Goldstar-Polymerase (Eurogentec) verwendet, welche „proof reading“-Aktivität besitzt. Die Reaktionsansätze wurden jeweils nach Herstellerangaben durchgeführt. Die Oligonukleotide wurden von der Firma Sigma-ARK bezogen. Die Denaturierungstemperatur für die DNA betrug 95°C, die Polymerisationstemperatur 68°C, die Polymerisationsdauer richtete sich nach der Größe des zu amplifizierenden DNS-Stückes, wobei für 1000 Nukleotide 1 min gerechnet wurde. Die Hybridisierungstemperatur ist abhängig von der Schmelztemperatur der Oligonukleotide. Diese wurde nach folgender Formel berechnet:  $T_s = 69,3 + 0,41 (G+C)\% - 650 / \text{Länge des Oligonukleotids}$ . Meist wurden 30 PCR-Zyklen durchlaufen.

#### 4.12 Spaltung von DNS mittels Restriktionsendonukleasen

Die Spaltung von Plasmid-DNS, sowie chromosomaler DNS wurde in Ansätzen von 10-50 µl Endvolumen durchgeführt. Die Enzymmenge richtete sich nach der eingesetzten

Menge an DNS, wobei laut Definition 1  $\mu\text{g}$  DNS mit einer Einheit des entsprechenden Enzyms (1 „unit“) in einer Stunde unter optimalen Temperaturbedingungen vollständig gespalten wird.

Restriktionsansatz:

- 0,5-1  $\mu\text{g}$  DNS
- 10fach Restriktionspuffer
- Enzym
- Restvolumen: steriles Aqua dest.

Die Restriktionsenzyme wurden größtenteils von der Firma Pharmacia bezogen. Für analytische Spaltungen haben sich Ansätze mit 10  $\mu\text{l}$  Endvolumen bewährt, für präparative entsprechend der DNS Konzentration Spaltansätze bis zu 40  $\mu\text{l}$ . Die Ansätze mit Plasmid-DNS werden üblicherweise 1 h bei 37°C inkubiert, chromosomale DNS wird über Nacht gespalten. Die Restriktionsreaktion wurde durch die Zugabe von Probenpuffer (0,25% Bromphenolblau, 0,25% Xylenxyanol, 50% Glycerin, 1% SDS, 1×TAE, 0,1 M EDTA) abgestoppt.

#### **4.13 Horizontale Gelelektrophorese**

Lineare DNS-Fragmente können auf Grund ihrer negativen Ladungen der Größe nach in einem elektrischen Feld aufgetrennt werden. Es wurde 1% Agarose in 1×TAE (hergestellt aus 50fach Stocklösung: 242 g Tris, 57,1 ml Eisessig, 100 ml 0,5 M EDTA pH 8,0, ad 1 l Aqua dest.) aufgekocht. Nach Abkühlung auf ca. 50°C wurde die Lösung luftblasenfrei in eine Gelkammer mit eingesetztem Kamm gegossen. Nach Erstarren des Gels wurde die Kammer mit Laufpuffer (1×TAE) gefüllt und der Kamm entfernt. Die mit Probenpuffer vermischten Proben und ein DNS-Größenstandard (1 kb DNS-Leiter, GIBCO BRL) wurden in die Taschen des Gels pipettiert und anschließend bei 90-100 V elektrophoretisch aufgetrennt. Nach Beendigung des Laufes wurde das Gel in einem Ethidiumbromidbad gefärbt, unter UV-Licht ausgewertet und fotografiert.

#### **4.14 Aufreinigung von DNS-Fragmenten aus Agarosegelen**

Für die Reinigung der DNS-Fragmente wurde u.a. der „Qiaquick Gel Extraction Kit“ der Firma Qiagen verwendet. Die Zusammensetzung der verwendeten Puffer ist dem mitgelieferten Handbuch zu entnehmen. Die gewünschte DNS-Bande wurde unter UV-Licht mit einem Skalpell aus dem Agarosegel ausgeschnitten und in ein Eppendorfgefäß überführt. Das Gelstück wurde gewogen und mit 3fachem Volumen Puffer QG versetzt. Der Ansatz wurde 10 min bei 50°C inkubiert, wobei mehrmals gemischt wurde. Nach

vollständigem Lösen der Agarose erfolgte die Adsorption der DNS an die Matrix der „Qiaquick“-Säule. Anschließend wurde für 1 min bei 13000 U/min abzentrifugiert und mit 750 µl Wasch-Puffer gewaschen. Die Elution der DNS-Fragmente von der Säulen-Matrix erfolgte mit 50 mM Tris-Puffer (pH 8,5) oder mit sterilem Aqua dest.

#### 4.15 Aufreinigung von PCR-Fragmenten

Für die Aufreinigung von PCR-Fragmenten wurde ebenfalls der „Qiaquick Gel Extraction Kit“ der Firma Qiagen nach Angaben des Herstellers verwendet.

#### 4.16 Ligation von PCR-Fragmenten

##### 4.16.1 Klonierungsvektor

Als Klonierungsvektor wurde das „pGEM-T Easy Vektor System“ von Promega verwendet. Der Vektor liegt in linearisierter Form vor und trägt 3'-Tymidin-Überhänge. Diese verhindern nicht nur eine Religation des Vektors, sondern ermöglichen eine effiziente Ligation von PCR-Produkten, die am 5'-Ende einen überhängenden Adeninrest tragen. Die multiple Klonierungsstelle des Vektors liegt in der  $\alpha$ -Peptid-Region des Enzyms  $\beta$ -Galactosidase. Durch Insertionsinaktivierung ist eine einfache Blau/Weiß-Selektion auf IPTG/X-Gal-Indikatorplatten möglich.

##### Standardansatz:

2 × T4 Ligationspuffer	5 µl
pGEM-T Easy Vektor	1 µl
PCR-Produkt	1-3 µl
T4 DNA-Ligase	1 µl
Aqua dest. ad 10 µl	

Die Ligations-Reaktion erfolgte über Nacht bei 16°C.

##### 4.16.2 „Shuttle“-Vektoren

Soll ein kloniertes PCR-Fragment von *E. coli* in einen gram-positiven Organismus überführt werden, müssen „Shuttle“-Vektoren eingesetzt werden. Dafür müssen sowohl der Vektor als auch das PCR-Produkt, das aus der multiplen Klonierungsstelle des Vektors pGEM-T Easy gespalten wird, mit kompatiblen Restriktionsenzymen geschnitten werden. Bei der „sticky end“ Klonierung sollten Vektor und Insert im molaren Verhältnis 1:5 vorliegen. Für die Ligationsreaktion wurden 5×Ligationspuffer und 1 µl T4-DNA-Ligase von Gibco BRL verwendet. Das Endvolumen sollte 10 µl nicht überschreiten.

## 4.17 Transformation

### 4.17.1 Herstellung CaCl<sub>2</sub>-kompetenter *E. coli*-Zellen

200 ml LB-Medium wurden mit 500 µl einer Übernachtskultur angeimpft und bei 37°C bis zu einer OD<sub>600nm</sub> von maximal 0,6 geschüttelt. Die Kultur wurde für 10 min auf Eis gestellt und anschließend in einer Kühlzentrifuge abzentrifugiert (10 min, 6000 U/min, 4°C). Das Zellpellet wurde in 100 ml eiskalter, steriler 0,1 M CaCl<sub>2</sub>-Lösung resuspendiert und ca. 20 min auf Eis inkubiert. Danach wurden die Zellen erneut abzentrifugiert, in 10 ml eiskalter sterilfiltrierter 0,1 M CaCl<sub>2</sub>/15% Glycerin aufgenommen und nochmals für 15 min auf Eis inkubiert. Die kompetenten Zellen wurden in 250 µl Aliquots in vorgekühlte Eppendorfgefäße gefüllt und bei –80°C eingefroren.

### 4.17.2 Transformation CaCl<sub>2</sub>-kompetenter *E. coli*-Zellen

Ein Aliquot kompetenter Zellen wurde auf Eis aufgetaut, mit dem Ligationsansatz gemischt und für 30-45 min auf Eis gestellt. Die Aufnahme der DNS in die Zelle erfolgte durch einen Hitzeschritt für 90 s bei 42°C. Anschließend wurde das Reaktionsgefäß sofort für 5 min auf Eis gestellt. Der Ansatz wurde dann mit 1 ml LB-Medium aufgefüllt und 2 h bei 37°C inkubiert. Danach wurden die Zellen abzentrifugiert und der Überstand bis auf 100 µl verworfen. In der verbleibenden Flüssigkeit wurden die Zellen resuspendiert und auf eine Selektionsplatte ausplattiert.

### 4.17.3 Herstellung elektrokompeter Enterokokken-Zellen

100 ml einer Übernachtskultur in BHI wurden abzentrifugiert (4°C, 10 min, 5000 U/min) und der Überstand wurde verworfen. Anschließend wurden die Bakterien in drei Waschschritten mit 100% Volumen, 50% Volumen und schließlich mit 10% Volumen sterilem Aqua dest. gewaschen. Nach dem Resuspendieren der Zellen in sterilem Aqua dest./ 10% Glycerin wurden die Zellen in Aliquots zu 70 µl bei –80°C aufbewahrt.

### 4.17.4 Transformation elektrokompeter Enterokokken-Zellen

Die Zellen wurden einem elektrischen Feld ausgesetzt, das in den Membranen für kurze Zeit Poren entstehen lässt, so dass DNS-Moleküle ins Zellinnere gelangen können. Die kompetenten Zellen wurden auf Eis aufgetaut. Dazu wurden 200 ng der zu transformierenden Plasmid-DNS pipettiert. Der Ansatz wurde 3-5 min auf Eis inkubiert und dann in einer kalten 1 mm Elektroporationsküvette einem elektrischen Feld von 1,8 kV ausgesetzt. Sofort anschließend wurde 1 ml BHI-Medium in die Küvette gegeben und der

gesamte Ansatz wurde in ein Reaktionsgefäß überführt. Die Probe wurde zur phänotypischen Expression für 1-2 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden 100 µl und die restlichen 900 µl auf Selektionsplatten mit dem entsprechenden Antibiotikum ausplattiert und über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

#### **4.18 Southern Blot-Analyse**

Diese Methode wurde unter Verwendung des VakuGene Blotter's (Pharmacia) durchgeführt. Die DNS wurde mit geeigneten Restriktionsenzymen geschnitten und auf einem Agarose-Gel elektrophoretisch aufgetrennt. Nach der Gelelektrophorese wurde das Gel zunächst mit Ethidiumbromid angefärbt und anschließend zusammen mit einem angelegten fluoreszierenden Lineal fotografiert. Danach wurde das Gel in Depurinierungslösung (0,25 N HCl) gelegt und vorsichtig geschüttelt (15 min). Anschließend wurde das Gel für 20 min in Denaturierungslösung (1,5 M NaCl und 0,5 M NaOH) und zuletzt für 20-30 min in Neutralisierungslösung (0,5 M Tris/HCl pH 7,5 und 1,5 M NaCl) geschwenkt. Zum Blotten wurde eine Nylon-Membran zugeschnitten, die 2 bis 4 mm größer war als das Gel. Die Membran wurde kurz in 10 x SSC geschwenkt. Währenddessen wurde die poröse Trägerplatte der Blottkammer mit Aqua dest. befeuchtet und mit der glatten Seite nach oben in die Kammer eingelegt. Danach wurden die Membran, die Maske und zuletzt das Gel auf die Trägerplatte gelegt. Anschließend wurde der Rahmen geschlossen und für ca. 60 min Vakuum angelegt (50 mbar). Das Gel wurde während dieser Zeit mehrmals mit 20 x SSC (600 ml 5 M NaCl; 200 ml 1,5 M Na-Citrat, pH 7,0; 200 ml Aqua dest.) überschichtet. Nach dem Blotten wurde die Membran kurz in 2 x SSC geschwenkt. Anschließend wurde die Nylon-Membran auf einem Whatman-Papier getrocknet. Nun wurde die DNS im Stratagene-UV-Cross-Linker kovalent an die Membran gebunden.

#### **4.19 Markierung der Sonde, Hybridisierung und Entwicklung des Blots**

Die DNS-Sonden-Markierung und die anschließende Hybridisierung wurde unter Verwendung des ECL Kits der Firma Amersham durchgeführt. Bei dieser Methode bilden positiv-geladene Komplexe des Enzyms Meerrettich-Peroxidase (Labelling-Reagenz) mit der negativ geladenen DNS elektrostatische Bindungen aus. Durch die Zugabe von Glutaraldehyd werden diese schwachen Bindungen in kovalente Enzym-DNS-Bindungen umgewandelt. Nach der Hybridisierungsreaktion werden die Detektionslösungen auf die Nylonmembran gegeben. Detektionslösung I enthält Wasserstoffperoxid, dessen Reduktion

durch die Peroxidase mit einer Lichtreaktion gekoppelt ist, bei der durch Oxidation von Luminol (Detektionslösung II) Blaulicht freigesetzt wird.

Die Nylon-Membran wurde in einem Hybridisierungsröhrchen mit 42°C warmem Hybridisierungsmix bedeckt und bei 42°C im Hybridisierungsofen für eine Stunde vorhybridisiert. Währendessen wurde die Sonde markiert. 300 ng DNS in 10 µl Aqua dest. wurden für 5 min bei 95°C denaturiert und anschließend sofort für 5 min auf Eis abgekühlt. Danach wurde kurz abzentrifugiert. Nun wurden jeweils 10 µl Labelling-Reagenz und Glutaraldehyd zugegeben. Danach wurde der Ansatz für 10 min bei 37°C inkubiert und schließlich zum Hybridisierungsmix pipettiert. Am nächsten Tag wurde der Blot zweimal für 10 min mit vorgewärmter Waschlösung I (0,5xSSC und 0,4% SDS) bei 50°C und anschließend zweimal für 5 min in Waschlösung II (2xSSC) bei Raumtemperatur gewaschen. Daraufhin wurde die Membran mit einem 1:1 Gemisch der beiden Detektionslösungen bedeckt, für 1 min geschwenkt und dann in Frischhaltefolie eingeschlagen. Der Blot wurde in eine Exponierkassette gelegt. In der Dunkelkammer wurde ein Autoradiographiefilm aufgelegt und nach geeigneter Exponierzeit entwickelt.

#### **4.20 Northern Blot-Analyse**

Beim Arbeiten mit RNA ist es wichtig, dass alle verwendeten Puffer und Verbrauchsmaterialien RNase frei sind. Es sollte immer mit Handschuhen gearbeitet werden und alle Lösungen müssen mit DEPC-Wasser angesetzt werden. DEPC Wasser wird hergestellt, indem 0,1% DEPC zu Aqua dest. hinzugegeben wird. Diese Lösung wird über Nacht bei 37°C inkubiert und anschließend für 30 min autoklaviert.

##### **4.20.1 RNA Gelelektrophorese**

Zunächst wurde ein 1,2%-iges Agarose/ Formaldehyd-Gel hergestellt. Dazu wurden 4,2 g Agarose in 304,5 ml DEPC-Wasser in der Mikrowelle aufgekocht. Nach dem Abkühlen auf ca. 60°C wurden 16,2 ml 37% Formaldehyd und 35 ml MOPS-Puffer zugegeben. Die Lösung wurde gemischt und in die Gießvorrichtung gegossen. Die RNA-Proben wurden wie folgt denaturiert:

RNA	30 µg
MOPS	1×
Formamid	50%
Formaldehyd	7%
Aqua dest. ad	50 µl

Dieses Gemisch wurde für 15 min bei 55°C inkubiert, daraufhin wurde 10 µl Ladepuffer hinzugegeben und die Proben wurden in die Taschen des Gels pipettiert. Als Laufpuffer wurde 10 × MOPS-Puffer verwendet. Das Gel lief bei 5-7,5 V/cm für 3-4 h, bis die Bromphenolblau-Bande des Ladepuffers über  $\frac{3}{4}$  des Gels gewandert war. Das Gel wurde nun für 30 min in DEPC-Wasser gewaschen, mit Ethidiumbromid gefärbt und fotografiert.

#### 4.20.2 Blotten der RNA

Der Transfer der RNA auf eine Nylonmembran wird wie für den Southern Blot beschrieben durchgeführt, allerdings entfallen die Depurinierungs-, Denaturierungs- und Neutralisierungsschritte. Die Nylonmembran wurde vor dem Blotten für 5 min in Aqua dest. geschwenkt, anschließend für weitere 5 min in 20×SSC. Der Transfer der RNA auf die Membran erfolgt bei 50 mbar für 2 h, wobei das Gel ständig mit 20×SSC bedeckt war. Anschließend wurde die Nylonmembran vorsichtig mit 2×SSC gewaschen und bei Raumtemperatur getrocknet. Die RNA wurde im Stratagene-UV-Cross-Linker kovalent an die Membran gebunden.

#### 10×MOPS-Puffer

41,8 g MOPS werden in 800 ml DEPC-Wasser gelöst, der pH wird mit NaOH auf 7,0 eingestellt. Danach werden 16,6 ml 3 M Na-Acetat und 20 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0) zugegeben. Das Volumen wird mit DEPC-Wasser auf einen Liter aufgefüllt.

#### 5×RNA Ladepuffer

Deionisiertes Formamid	3084 µl
0,5 M EDTA pH 8,0	80 µl
37% Formaldehyd	720 µl
Bromphenolblau-Lösung	16 µl
86% Glycerin	2 ml
MOPS	4 ml
DEPC-Wasser ad 10 ml	

### 4.21 Sequenzierung

#### 4.21.1 LiCor-Sequenzierung

Die Methode beruht auf der Verlängerung eines Oligonukleotid-Primers, der komplementär zum Anfang des zu sequenzierenden Matrizenstrangs ist. Die

doppelsträngige Plasmid-DNS wird zuerst hitzedenaturiert. Nach Hybridisierung des Primers mit dem Matrizenstrang erfolgt die Primerverlängerung, wobei es unter Verwendung der jeweiligen Didesoxynukleotide (ddNTP's) in den vier Sequenzierungsansätzen zu statistisch verteilten Kettenabbrüchen kommt. Bei der Sequenzierungs-PCR liegt die Annealing-Temperatur der Primer 2°C unter deren Schmelztemperatur. Die PCR-Ansätze werden mit dem „<sup>T7</sup>Sequencing™-Kit“ (Pharmacia), nach Anleitung des Herstellers durchgeführt. Bei der automatischen DNS-Sequenzierung (LiCor-Sequencer Modell 4000 der Firma MWG-Biotech) wird ein fluoreszenzmarkierter Primer verwendet. Die Reaktionsansätze werden auf dem Sequenziergel elektrophoretisch aufgetrennt und dabei von einem Laserstrahl abgetastet.

#### 4.21.2 ABI-Sequenzierung

Bei dieser Methode sind die Didesoxynucleotide mit einem Fluorezenz-Farbstoff markiert. Für die Sequenzierungs-PCR (in einem Reaktionsgefäß angesetzt), wird der „ABI PRISM™ Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit“, nach Anleitung des Herstellers, verwendet. Während einer PCR-Amplifikation durch die spezifisch modifizierte Taq-Polymerase „AmpliTaq DNA Polymerase, FS“ werden Fluoreszenz-markierten Didesoxynukleotide eingebaut, was zum Kettenabbruch führt. Hier können neben Plasmid-DNS auch PCR-Produkte sequenziert werden.

### 4.22 Transposonmutagenese

#### 4.22.1 *In vitro*-Filterkonjugation

Für die *in vitro*-Filterkonjugation zur Übertragung des Transposons Tn916 wurde der Stamm *E. faecalis* JH2-2 als Donor verwendet. Dieser Stamm trägt chromosomal kodiert eine Kopie des konjugativen Transposons Tn916 (*tetM*) und ist somit Tetrazyklin-resistent. Als Rezipient wurde ein Transkonjugant des Stammes *E. faecium* 64/3 mit einem Plasmid, auf dem das *vanA*-Gencluster (*Van<sup>r</sup>*) kodiert vorliegt, verwendet. Dieser Stamm ist Tetrazyklin-sensitiv, Vancomycin- und Flavophospholipol-resistent. Eine Übernachtskultur des Donor- und des Rezipientenstammes in BHI wurde 1:5 verdünnt und bei 37°C für 3 h inkubiert. Daraufhin wurden je 2 ml Donor- und 0,5 ml Rezipientenkultur in einem Röhrchen gemischt. Das Medium wurde über einen Nitrozellulosefilter mittels Unterdruck (Wasserstrahlpumpe) abgesaugt. Die Unterseite des Filters wurde auf eine BHI-Agarplatte platziert, die Bakterien befanden sich dabei auf der Oberseite. Die Inkubation des Ansatzes erfolgte für 24 h bei 37°C. Anschließend wurde das Bakteriensediment in 1 ml 0,9% NaCl

aufgenommen. Es wurden entsprechende Verdünnungen ( $10^{-1}$ - $10^{-3}$ ) zu je 100  $\mu$ l auf BHI-Selektionsplatten ausplattiert.

#### 4.22.2 Selektion der Transkonjuganten

Die Selektion der Transkonjuganten erfolgte auf Masterplatten mit 50  $\mu$ g/ml Vancomycin und 10  $\mu$ g/ml Tetrazyklin. Durch Überstreichen auf Duplikatplatten mit 25  $\mu$ g/ml Vancomycin, 5  $\mu$ g/ml Tetrazyklin und 10  $\mu$ g/ml Flavophospholipol konnten die Klone identifiziert werden, die durch die Transposonmutagenese FPL sensibel geworden waren.

#### 4.22.3 Inverse PCR

Die chromosomalen Fragmente, welche die *Tn916* Insertionsstelle flankieren, wurden durch inverse PCR amplifiziert. Die chromosomale DNS wurde *NsiI* verdaut. Dieses Restriktionsenzym schneidet einmal in *Tn916* in der Resistenzdeterminante *tetM*. Die DNS wurde in einer Konzentration von 0,5 ng/ $\mu$ l ligiert. Diese selbstligierte DNS diente nun als Template für die inverse PCR. Als Primer wurden divergente Oligonukleotidpaare verwendet, die homolog zu den jeweiligen Enden von *Tn916* sind und somit eine Amplifikation der flankierenden chromosomalen Bereiche ermöglichten (Smidt et al., 1999). Für den Bereich „upstream“ *Tn916* das Primerpaar: BG285, BG290, für den „downstream“-Bereich die Oligonukleotide: BG286, BG289 (s. 3.2.). Die Wahl der Primer erfolgte basierend auf der Nukleotidsequenz von *Tn916* (GenBank accession no. U09422).

PCR-Ansatz:	MgCl <sub>2</sub>	2 mM
	dNTP's	200 mM
	Primer jeweils	2 ng
	Template	5 ng
	DAP-Goldstar-Polymerase	1 U

Amplifikation: 2 min denaturieren bei 94°C; danach 35 Zyklen: 94°C für 20 s, 55°C für 30 s, 68°C für 3 min; danach finale Extension für 7 min bei 68°C.

#### 4.22.4 Markierung der Penicillin-Bindeproteine mit [<sup>3</sup>H] Penicillin

Aus einer Übernachtskultur wurden 2 ml Bakteriensuspension in 38 ml frisches BHI-Medium inokuliert und bis zu einer OD<sub>600nm</sub> von 0,2 bei 37°C inkubiert. Danach wurden die Bakterien abzentrifugiert (6000 U/min, 10 min) und der Überstand abgegossen. Die Zellen wurden in 20  $\mu$ l STM+-Puffer (50 mM Tris/HCl pH 7,2; 2 mM MgCl<sub>2</sub>; 6,7 %

Saccharose; 0,5 mg/ml Cellulosyl und 0,8 mg/ml Lysozym) resuspendiert und für 1 h bei 37°C inkubiert. Das Lysat wurde bei –80°C aufbewahrt. Das Zelllysate wurde für 30 min mit 20 µM FPL bei 37°C inkubiert. Danach wurde die Probe mit saturierenden Mengen [<sup>3</sup>H] Penicillin versetzt (1µCurie) und für weitere 30 min bei 37°C inkubiert. Daraufhin wurden die Proben durch SDS-PAGE (s. 4.6) aufgetrennt. Das Gel wurde getrocknet und zusammen mit einem Röntgenfilm in eine Exponierkassette gelegt. Die Kassette wurde bis zur Entwicklung des Filmes nach drei Wochen bei –80°C gelagert.

#### 4.23 Sequenzanalysen

Die Analysen der Sequenzen in dieser Arbeit erfolgte durch Vergleich mit den Contigs folgender Sequenzierungsprojekte:

- „Doe Joint Genome Institute“, University of California, USA ([http://www.jgi.doe.gov/JGI\\_microbiol/enterococcus/](http://www.jgi.doe.gov/JGI_microbiol/enterococcus/)), für *E. faecium*
- „TIGR“, the Institute for genomic research, Rockville, USA (<http://www.tigr.org/>) für *E. faecalis*

#### 4.24 Verwendete Computerprogramme

- NCBI Blast N, Blast P (Altschul et al., 1997)
- NCBI ORF finder („open reading frame finder“)
- NCBI Blast 2 sequences
- DIALIGN 2.1 (Morgenstern et al., 1999)
- Biocapt
- Bio ID

## 5. Ergebnisse

### 5.1 Einfluss von Flavophospholipol und Vancomycin auf den konjugativen Transfer von Vancomycin-Resistenz-Plasmiden

Vancomycin und Flavophospholipol (FPL) induzieren die Expression des *vanA*-Operons (Allen und Hobbs, 1995, Baptista et al., 1996, Grissom-Arnold et al., 1997, Handwerger et al., 1990, Lai et al., 1996). Daher wurde in dieser Arbeit untersucht, ob diese Antibiotika auch den Transfer von VanA-Plasmiden beeinflussen. Die *vanA*-Resistenzdeterminante wird häufig von großen konjugativen Plasmiden kodiert und kann zwischen Enterokokken-Stämmen transferiert werden (Evers et al., 1996, Heaton et al., 1996, Leclercq et al., 1988, Leclercq et al., 1989, Werner et al., 1999). Es wurden *in vitro*-Filterkonjugationsexperimente durchgeführt, wobei Vancomycin-resistente *E. faecium*-Stämme vom VanA-Typ als Donoren und ein Vancomycin-sensitiver *E. faecium*-Stamm als Rezipient eingesetzt wurden. Die Bakterien waren während des Konjugationsprozesses verschiedenen Konzentrationen der Antibiotika FPL und Vancomycin ausgesetzt.

#### 5.1.1 Charakterisierung der Donorstämme und des Rezipienten

Die verwendeten Bakterienstämme sind unter 3.1 in Tabelle 3 aufgeführt. Für die Konjugationsexperimente wurden *E. faecium*-Isolate aus Abwasser (AW2), aus Schweinefaeces (2E121198, 2121198 und 9191198), sowie aus Patientenmaterial (70/90 und 6011) eingesetzt. Diese Donorstämme sind Vancomycin-resistent (MHK >1024 µg/ml) und tragen die *vanA*-Resistenzdeterminante. Das *vanH*-Gen wurde durch PCR-Analysen nachgewiesen (verwendete Oligonukleotide: Van 1 und Van 2). Zusätzlich sind alle Donoren FPL-resistent (MHK >128 µg/ml) oder intermediär-resistent (MHK 16 µg/ml) (siehe 3.1, Tab. 3). Der ausgewählte Rezipientenstamm *E. faecium* 64/3 ist gegen die Antibiotika Rifampicin und Fusidinsäure resistent. Somit war durch die vorhandenen Resistenzmarker eine eindeutige Selektion der Donoren, des Rezipienten und der Transkonjuganten für die Konjugationsexperimente gewährleistet. Die verwendeten Stämme wurden mittels Pulsfeldgelelektrophorese typisiert. Wie in Abbildung 4 zu erkennen ist, zeigten die Stämme unterschiedliche *Sma*I-Restriktionsmuster. Die Stämme sind also nicht klonal miteinander verwandt.

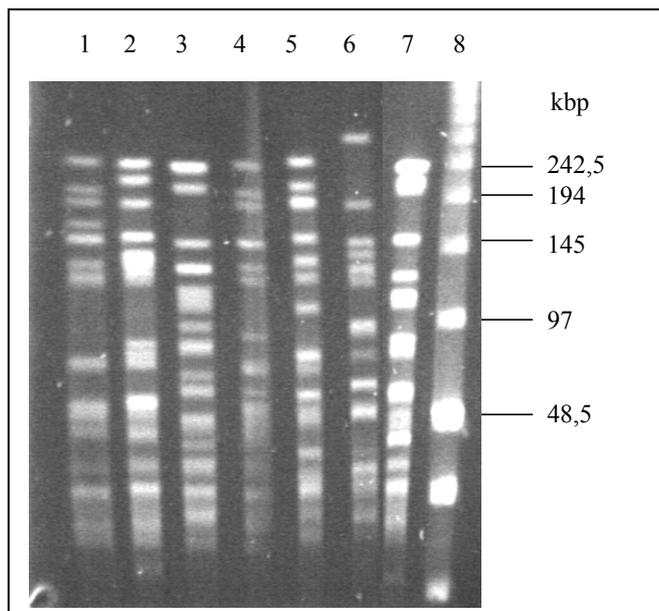


Abb. 4: *Sma*I gespaltene chromosomale DNS der in den Konjugationsexperimenten untersuchten Stämme nach Auftrennung durch Pulsfeldgelelektrophorese. Spur 1: Stamm *E. faecium* 2E121198, Spur 2: Stamm *E. faecium* 2121198, Spur 3: Stamm *E. faecium* 9191198, Spur 4: Stamm *E. faecium* 6011, Spur 5: Stamm *E. faecium* AW2, Spur 6: Stamm *E. faecium* 70/90, Spur 7: Stamm *E. faecium* 64/3, Spur 8: PFGE-Marker.

### 5.1.2 Einfluss von FPL auf die Übertragungsrate von konjugativen VanA-Plasmiden

Der Einfluss von FPL auf die Transferrate von VanA-Plasmiden wurde durch *in vitro*-Filterkonjugationsexperimente untersucht. Dazu wurden mehrere Konjugationsreihen durchgeführt. Die Agarplatten, auf denen die Konjugationsfilter inkubiert wurden, enthielten verschiedene FPL-Konzentrationen (0,05 µg/ml, 0,25 µg/ml, 1 µg/ml, 8 µg/ml und 16 µg/ml). Dieses Konzentrationsspektrum wurde ausgewählt, da Grissom-Arnold et al. (1997) bereits durch 0,06 µg/ml Flavophospholipol eine Induktion des Vancomycin Resistenz-Operons nachweisen konnten. Dagegen waren in einer Arbeit von Allen und Hobbs (1995) 10-40 µg/ml des Antibiotikums nötig, um das *vanA*-Operon zu induzieren. Für jede Konjugationsreihe wurde jeweils eine Platte ohne Antibiotikum zur Kontrolle mitgeführt. Nach der Konjugation wurden die Donorzellen auf Agarplatten mit Vancomycin, die Transkonjuganten auf Platten mit Vancomycin, Rifampicin und Fusidinsäure und die Rezipientenzellen auf Selektionsplatten mit Rifampicin und Fusidinsäure selektioniert. Die Konjugationsrate wurde aus dem Quotienten der Anzahl der Kolonien der Transkonjuganten durch die Anzahl der Kolonien des Rezipienten errechnet.

Die Konjugationsraten in allen sechs getesteten Stämmen wurden durch FPL in Konzentrationen  $>1 \mu\text{g/ml}$  signifikant reduziert (siehe Abb. 5 und Tab. 8). Bei den Isolaten aus Abwasser und Schweinefaeces konnte eine deutliche Inhibition bereits bei einer Konzentration des Antibiotikums von  $1 \mu\text{g/ml}$  nachgewiesen werden, wohingegen Konzentrationen von  $8 \mu\text{g/ml}$  und  $16 \mu\text{g/ml}$  nötig waren, um bei den beiden klinischen Isolaten eine sechs- bis neunfache Reduktion des VanA-Transfers zu bewirken (siehe Tab. 8). Bei dem Isolat aus Abwasser (AW2) und bei den beiden Stämmen aus Schweinefaeces (2E121198 und 2121198) konnte eine signifikante Reduktion der Transferrate bei FPL-Konzentrationen  $<1 \mu\text{g/ml}$  beobachtet werden (siehe Abb. 5 A). Die stärkste Inhibition des konjugativen Transfers in allen getesteten Stämmen erfolgte bei FPL-Konzentrationen von  $8 \mu\text{g/ml}$  und  $16 \mu\text{g/ml}$  (Abb. 5). FPL hemmte den genetischen Transfer der *vanA*-Resistenzdeterminante im Stamm 2E121198 bis zu 70fach, im Stamm 9191198 bis zu 60fach und im Stamm 2121198 bis zu 52fach (siehe Tab. 8). In den klinischen Isolaten 70/90 und 6011 reduzierte sich die Transferrate um das neun- bzw. achtfache. Die Ergebnisse zeigen, dass FPL den *vanA*-Gentransfer konzentrationsabhängig inhibiert und dass dieser Effekt in den Isolaten aus Schweinefaeces stärker ausgeprägt ist, als in den klinischen *E. faecium*-Isolaten.

Tab. 8: Effekt von FPL auf die Transferrate von VanA-Plasmiden<sup>a</sup>.

Stamm	0,05 $\mu\text{g/ml}$	0,25 $\mu\text{g/ml}$	1 $\mu\text{g/ml}$	8 $\mu\text{g/ml}$	16 $\mu\text{g/ml}$
AW2	2fach	4fach	19fach	23fach	40fach
2E121198	n. s. <sup>b</sup>	4fach	3fach	67fach	70fach
2121198	n. s.	3fach	18fach	22fach	52fach
9191198	n. s.	n. s.	19fach	29fach	60fach
70/90	n. s.	n. s.	n. s.	8fach	9fach
6011	n. s.	n. s.	n. s.	6fach	8fach

<sup>a</sup>Die Zahlen entsprechen dem Faktor, mit dem die Transferrate der Plasmide bei der entsprechenden FPL-Konzentration gehemmt wurde. Alle dargestellten Faktoren sind signifikant mit  $p \leq 0,05$  (Mann-Whitney U-Test). Die Transferraten unter dem Einfluss des Antibiotikums wurden mit den Transferraten einer Kontrollgruppe ohne FPL verglichen.

<sup>b</sup>n. s. = nicht signifikant

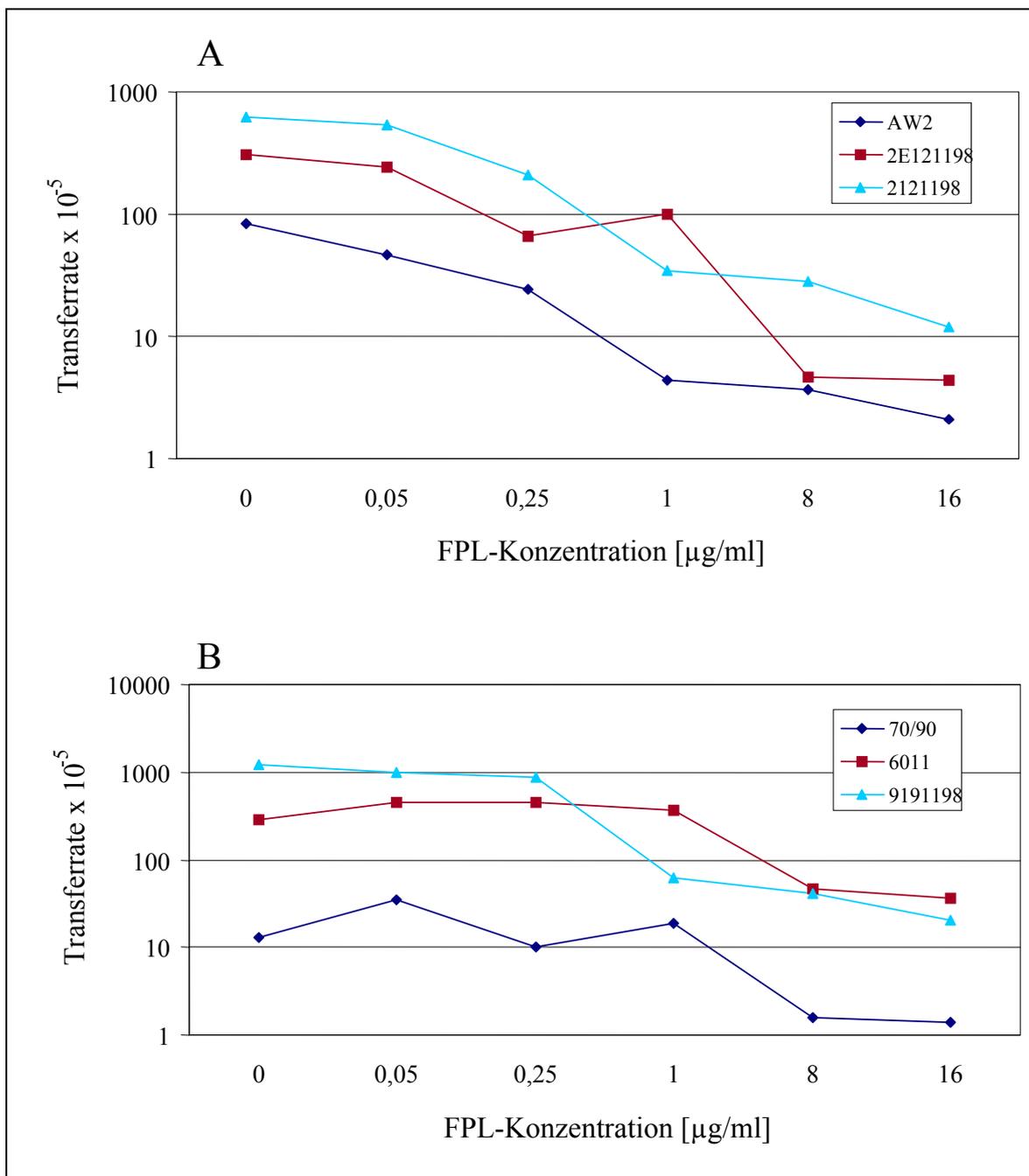


Abb. 5: Einfluss verschiedener FPL-Konzentrationen auf die Transferrate der VanA-Plasmide in den *E. faecium*-Donorstämmen AW2, 2E121198 und 2121198 (A) und 70/90, 6011 und 9191198 (B). Es wurden jeweils drei unabhängige Konjugationsreihen durchgeführt; dargestellt ist eine typische Serie.

### 5.1.3 Einfluss von Vancomycin auf die Transferrate von konjugativen VanA-Plasmiden

Weiterhin wurde der Effekt von Vancomycin auf die Transferrate der VanA-Plasmide getestet. Dazu wurden *in vitro*-Filterkonjugationsexperimente mit verschiedenen Konzentrationen des Antibiotikums Vancomycin (0,05 µg/ml, 0,25 µg/ml, 1 µg/ml, 4 µg/ml und 8 µg/ml) durchgeführt. Wie in Abbildung 6 dargestellt, hatte Vancomycin keinen signifikanten Effekt auf die Transferraten der VanA-Plasmide. Auch bei hohen Konzentrationen des Antibiotikums (4 µg/ml und 8 µg/ml), die oberhalb der MHK des Rezipienten gegen Vancomycin liegen, war die Transferrate nicht signifikant verändert. Bei diesen hohen Antibiotika-Konzentrationen konnte eine Verringerung der Anzahl der Rezipienten- und der Transkonjuganten-Kolonien beobachtet werden. Dies lässt darauf schließen, dass die Übertragung der VanA-Plasmide mit relativ hoher Frequenz auch bei Vancomycin-Konzentrationen stattfindet, die oberhalb der MHK des Rezipienten liegen. Bei den Stämmen 70/90 und 2121198 war eine leichte, jedoch nicht signifikante Zunahme der Konjugationsrate zu erkennen (siehe Abb. 6).

### 5.1.4 Genomische Charakterisierung der Transkonjuganten-Klone

Um die Transkonjuganten auf genomischer Ebene zu charakterisieren wurde eine Pulsfeldgelelektrophorese-Analyse durchgeführt. Dazu wurden neun Transkonjuganten-Kolonien aus einem FPL-Konjugationsexperiment (*E. faecium* 2E121198 × *E. faecium* 64/3) ausgewählt. Die *Sma*I-Restriktionsmuster der untersuchten Transkonjuganten-Klone waren identisch mit dem Muster des Rezipienten 64/3, aber unterschiedlich zu dem des Donorstammes 2E121198. Dies zeigt, dass alle getesteten Transkonjuganten-Klone aus Rezipienten nach Aufnahme des VanA-Plasmids vom Donor hervorgingen. (siehe Abb. 7 A). Die Übertragung der *vanA*-Determinante wurde zusätzlich durch Southern Blot-Hybridisierung überprüft. Dazu wurde eine *vanA*-spezifische Sonde eingesetzt. Bei allen Transkonjuganten und dem Donorstamm ist jeweils ein Hybridisierungssignal zu erkennen. Der Rezipientenstamm hingegen weist keine Bande auf (siehe Abb. 7 B).

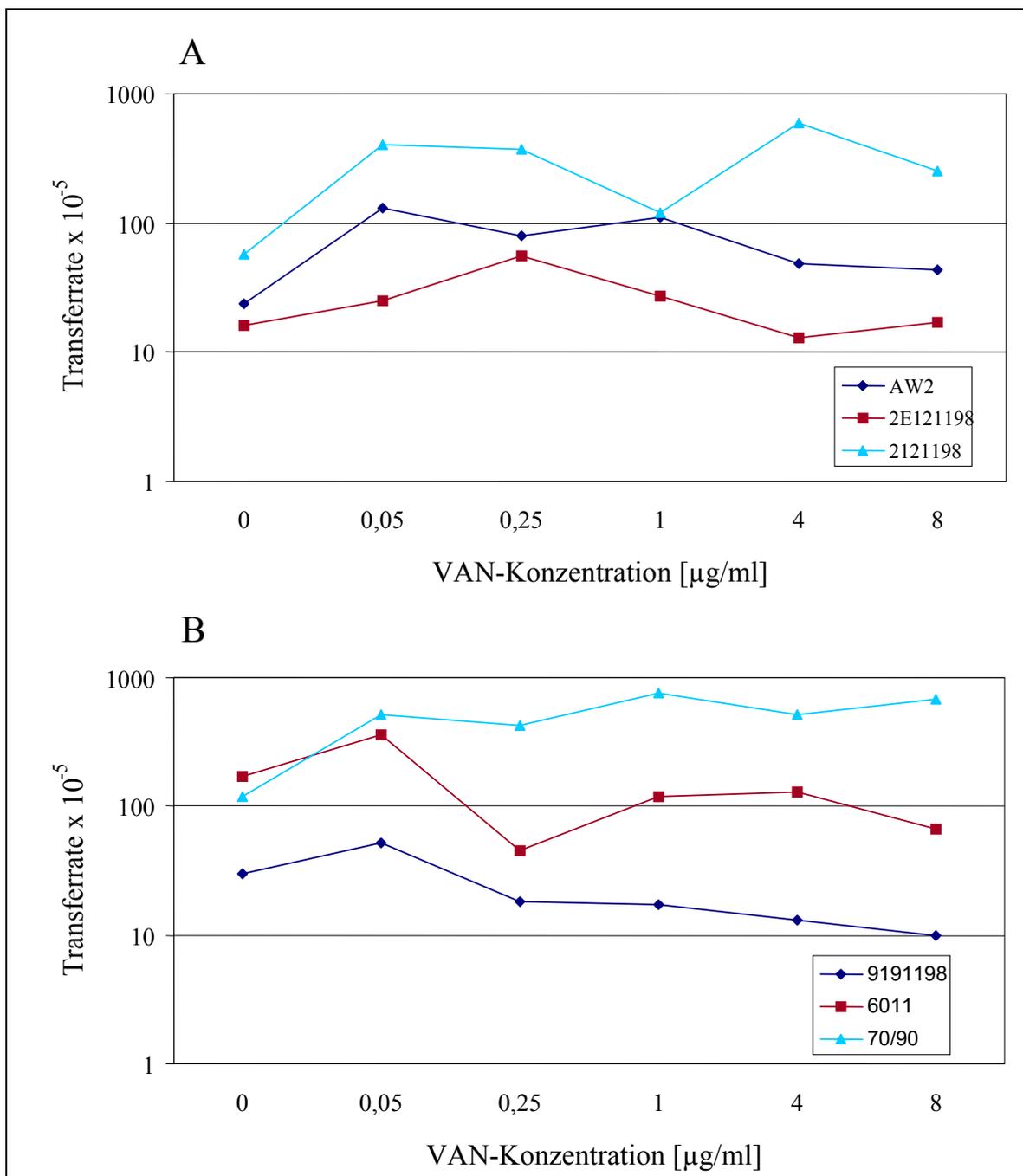


Abb. 6: Einfluss verschiedener Vancomycin-Konzentrationen auf die Transferrate der VanA-Plasmide in den *E. faecium*-Donorstämmen AW2, 2E121198 und 2121198 (A) und 9191198, 6011 und 70/90 (B). Es wurden jeweils drei unabhängige Konjugationsreihen durchgeführt; dargestellt ist eine typische Serie.

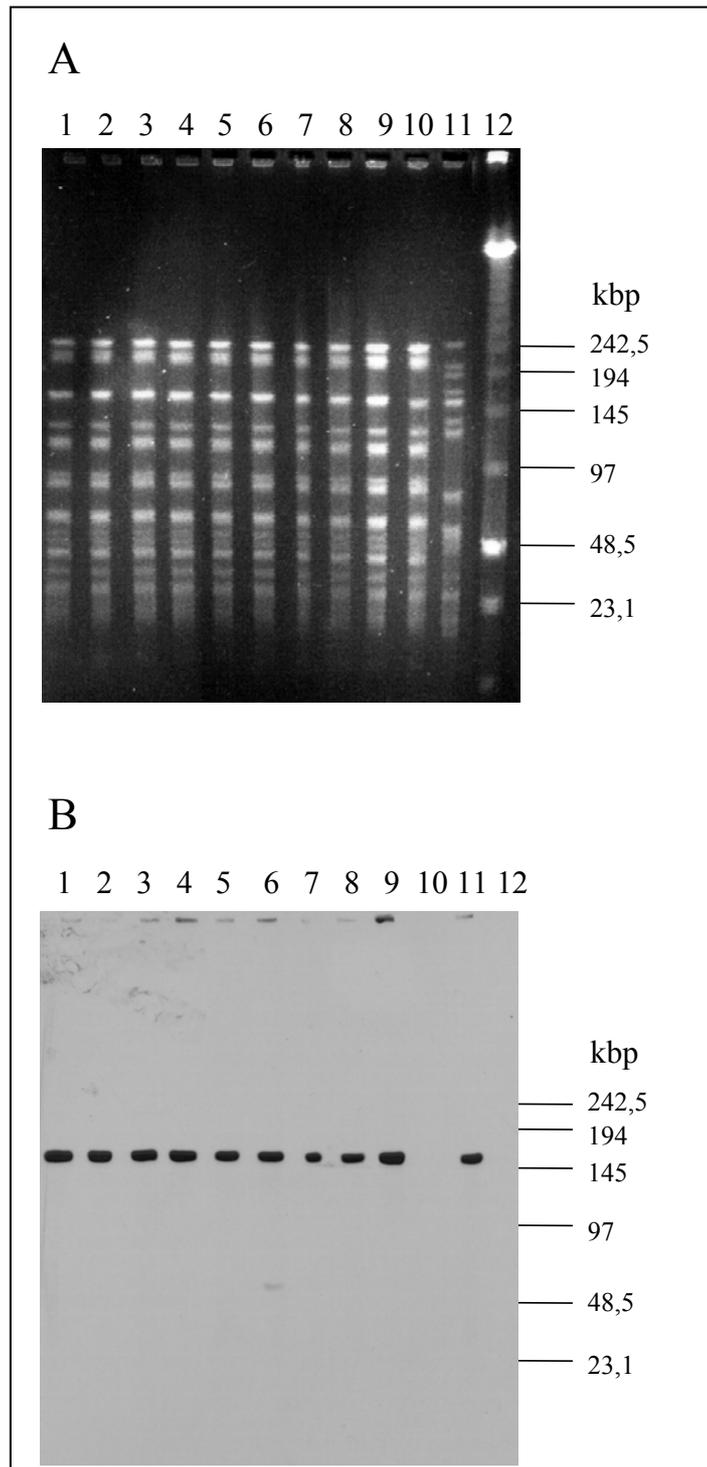


Abb. 7: (A): *Sma*I gesplante chromosomale DNS der getesteten *E. faecium*-Stämme nach Auftrennung durch Pulsfeldgelelektrophorese. (B): korrespondierender Southern Blot, hybridisiert mit einer *vanA*-spezifischen Sonde. Spuren 1-9: *E. faecium* Transkonjuganten, Spur 10: *E. faecium* Rezipient 64/3, Spur 11: *E. faecium* Donorstamm 2E121198, Spur 12: PFGE-Marker.

## 5.2 Untersuchungen zur Induktion des *vanA*-Operons durch Antibiotika und Umweltfaktoren

Die Induktion des *vanA*-Resistenz-Operons durch Glycopeptidantibiotika, Flavophospholipol und einige zellwandaktive Antibiotika konnte von verschiedenen Arbeitsgruppen nachgewiesen werden (Allen et al., 1995, Baptista et al., 1996, Grissom-Arnold et al., 1997, Handwerger et al., 1990, Lai und Kirsch, 1996). Jedoch waren diese Ergebnisse teilweise widersprüchlich und von keiner dieser Arbeitsgruppen wurde letztendlich die Induktion des VanA-Ligase Proteins direkt untersucht. Daher sollte in dieser Arbeit der Einfluss von verschiedenen Antibiotika, sowie von Stressoren (Hitze und Osmolarität) auf die Expression des 39 kDa VanA-Ligase Proteins untersucht werden. Der Nachweis erfolgte immunologisch unter Verwendung eines spezifischen polyklonalen VanA-Ligase Antikörpers.

### 5.2.1 Herstellung eines polyklonalen VanA-Ligase Antikörpers

#### 5.2.1.1 Klonierung, Expression und Aufreinigung des VanA-Ligase Proteins

Für die Herstellung des rekombinanten VanA-Ligase Proteins wurde das System „The QIAexpressionist<sup>TM</sup>“ (Qiagen) verwendet. Das *vanA*-Ligase Gen wurde in den Expressionsvektor pQE30 kloniert. Daraufhin wurde das rekombinante VanA-Ligase Protein im Stamm *E. coli* M15 überexprimiert und anschließend mittels sechs N-terminal angehängter Histidinreste an eine Nickel-Nitrilotriessigsäure-Agarose Matrix (Ni-NTA-Agarose) gebunden und aufgereinigt (siehe 4.7.1).

Das *vanA*-Ligase Gen des Vancomycin-resistenten *E. faecium*-Stammes 2E121198 wurde unter Verwendung der Oligonukleotide VanAKpnI und VanAHindIII, mit den angehängten Schnittstellen KpnI und HindIII, amplifiziert. Die Auswahl des Primerpaares erfolgte hierbei in Anlehnung an die Sequenz des Transposons Tn1546 (aus *E. faecium* BM4174, „Medline“, „accession number“: M97297). Zunächst wurde das PCR-Produkt in den Vektor pGEM-T Easy subkloniert und durch Sequenzierung verifiziert. Das Insert wurde mit den Restriktionsenzymen KpnI und HindIII aus dem Klonierungsvektor pSR1 geschnitten und in die multiple Klonierungsstelle des Vektors pQE30 umkloniert, der vorher mit KpnI und HindIII geöffnet worden war. Das *van*-Ligase Gen wurde 5' im gleichen Leserahmen wie der N-terminale 6×His-„tag“ in den Vektor pQE30 kloniert. Die Homologie des Oligonukleotids VanAHindIII endet 56 bp nach dem Stopcodon des *vanA*-Ligase Gens. Der Vektor pSR2 [pQE30-*vanA*-Ligase] wurde nun in den *E. coli*-Stamm

M15 [pREP4] transformiert. Das Plasmid pREP4 kodiert für den Repressor *lac I*, der die zwei *lac* Operator Sequenzen vor dem T5 Phagen-Promotor des Vektors pQE30 reprimiert.

Ein Klon des Stammes *E. coli* M15 pSR2/[pREP4] wurde in LB-Medium bis zu einer  $OD_{600nm}$  von 0,560 angezogen (siehe 4.7.1). Die Induktion der Expression des rekombinanten VanA-Ligase Proteins erfolgte durch IPTG, welches an Lac I bindet, somit dessen Repressor-Funktion inaktiviert und die Transkription des rekombinanten VanA-Ligase Proteins vom T5 Promotor ermöglicht. Nach einer weiteren Inkubation für vier Stunden wurden die Bakterien abzentrifugiert, in Lysispuffer aufgenommen und sonifiziert. Die Aufreinigung des VanA-Ligase Proteins erfolgte unter nativen Bedingungen. Der Überstand des Zellaufschlusses wurde mit Ni-NTA-Agarose gemischt und über eine Säule gegossen. Die Säulenmatrix wurde mit Waschpuffer gewaschen, der 40 mM Imidazol enthielt. Die anschließende Elution des rekombinanten VanA-Ligase Proteins von der Ni-NTA-Agarose erfolgte mit Puffern, die Imidazol in Konzentrationen von 100 bis 250 mM enthielten. Dadurch wurden die Histidin-Reste von der Säulenmatrix verdrängt und das Protein löste sich von der Ni-NTA-Agarose (siehe 4.7.1). Von den verschiedenen Schritten der Expression, des Waschens und der Elution des rekombinanten VanA-Ligase Proteins wurden zur Kontrolle der Aufreinigung Aliquots entnommen und durch SDS-PAGE aufgetrennt. Wie in Abbildung 8 dargestellt, wurde das rekombinante VanA-Ligase Protein nach der Induktion im Stamm *E. coli* M15 überexprimiert. In Spur 3 erscheint eine starke Proteinbande von 39 kDa. Während des Waschens ging wenig Protein verloren (Spur 4). Die Elution des VanA-Ligase Proteins erfolgte am effektivsten mit dem Elutionspuffer mit 250 mM Imidazol (Spuren 7 und 8). Mit dieser Methode konnten aus 250 ml Kultur ca. 2 mg rekombinantes VanA-Ligase Protein aufgereinigt werden. Die Proteinkonzentration wurde mittels der Methode nach Bradford bestimmt.

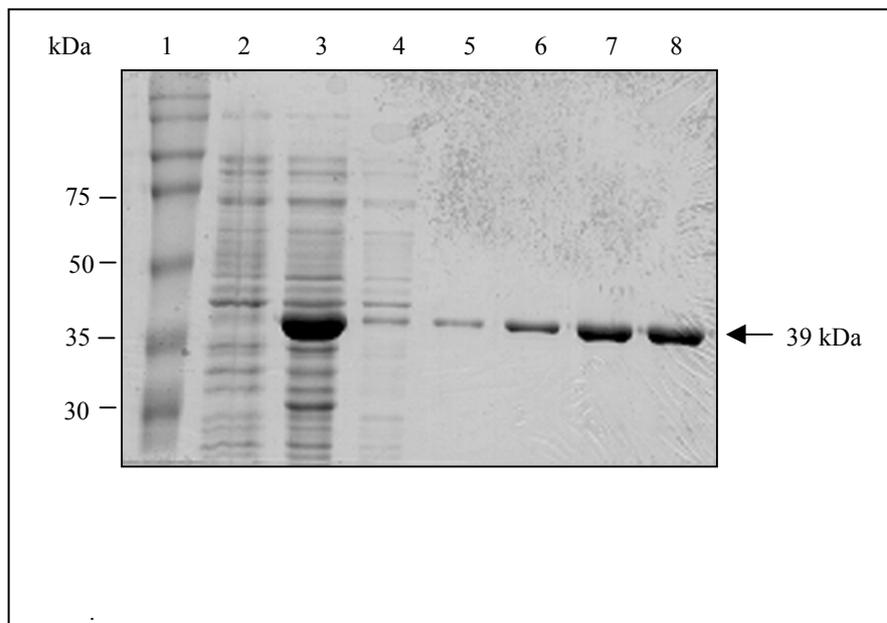


Abb. 8: Auftrennung von Aliquots der verschiedenen Schritte der Expression, der Aufreinigung und der Elution des rekombinanten VanA-Ligase Proteins in der SDS-PAGE. Spur 1: Proteinmarker, Spur 2: Stamm *E. coli* M15 pSR2/[pREP4] vor Induktion durch IPTG, Spur 3: Stamm *E. coli* M15 pSR2/[pREP4] nach Induktion durch IPTG, Spur 4: Waschschrift, Spur 5: Elution mit 100 mM Imidazol im Puffer, Spur 6: Elution mit 200 mM Imidazol im Puffer, Spuren 7 und 8: Elution mit 250 mM Imidazol im Puffer.

#### 5.2.1.2 Herstellung eines polyklonalen VanA-Ligase Antikörpers

Das aufgereinigte rekombinante VanA-Ligase Protein wurde zur Herstellung spezifischer Kaninchenantikörper verwendet (siehe 4.7.2). Das Antiserum der finalen Blutung wurde direkt für die Detektion von wildtypischem VanA-Ligase Protein im Western Blot verwendet.

#### 5.2.2 Nachweis des VanA-Ligase Proteins durch VanA-Ligase Antikörper

Die Spezifität des polyklonalen VanA-Ligase Antikörpers wurde im Western Blot nachgewiesen. Dazu wurden der Vancomycin-sensitive Stamm *E. faecium* 64/3 und die Van<sup>r</sup>-Stämme *E. faecium* 2E121198, 2121198, 9191198 und 70/90 zur Induktion des *vanA*-Operons in BHI-Medium mit 500 ng/ml Vancomycin inkubiert. Die Proteine wurden isoliert und durch SDS-PAGE aufgetrennt (siehe 4.6). Anschließend wurde die VanA-Ligase im Western Blot-Verfahren nachgewiesen. Verschiedene Versuche zeigten, dass bei einer Verdünnung des VanA-Ligase Antikörpers von 1:1000 die besten Ergebnisse erzielt werden konnten. Der sekundäre Antikörper, ein Anti-Kaninchen IgG Antikörper, wurde 1:2000 verdünnt eingesetzt. Wie in Abbildung 9 deutlich wird, konnte das 39 kDa VanA-Ligase Protein in den Van<sup>r</sup>-Stämmen *E. faecium* 2E121198, 2121198, 9191198 und 70/90

detektiert werden (Spuren 2-5). Diese Stämme tragen das *vanA*-Resistenz-Operon. In Spur 6 wurde zur Kontrolle das rekombinante VanA-Ligase Protein aufgetragen. In Spur 1 wurden die Proteine des Van<sup>s</sup>-Stammes *E. faecium* 64/3 aufgetrennt. Hier fehlt die VanA-spezifische 39 kDa Bande.

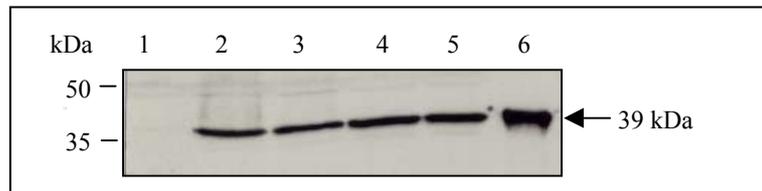


Abb. 9: Nachweis des 39 kDa VanA-Ligase Proteins im Western Blot. Spur 1: Stamm *E. faecium* 64/3, Spur 2: Stamm *E. faecium* 2E121198, Spur 3: Stamm *E. faecium* 2121198, Spur 4: Stamm *E. faecium* 9191198, Spur 5: Stamm *E. faecium* 70/90, Spur 6: rekombinantes VanA-Ligase Protein.

### 5.2.2.1 Induktion des VanA-Ligase Proteins durch Antibiotika

Nachdem die Spezifität des VanA-Ligase-Antikörpers nachgewiesen werden konnte, wurde die Induktion des *vanA*-Operons durch verschiedene Antibiotika untersucht. Zunächst wurde der Einfluss verschiedener Zellwandsyntheseinhibitoren analysiert. Getestet wurden hierbei zwei Antibiotika, welche die frühe Phase der Zellwandsynthese hemmen, D-Cycloserin und Fosfomycin, sowie fünf Antibiotika, welche die späte Phase der Zellwandsynthese hemmen: Tunicamycin, Bacitracin, Vancomycin, Flavophospholipol und Penicillin G (siehe Tab. 9).

Tab. 9: Eingesetzte Zellwandsyntheseinhibitoren, ihre Wirkungsweise und die für die Versuche verwendeten Konzentrationen.

Antibiotikum	Wirkungsweise	Konzentration
D-Cycloserin	verhindert den Einbau von D-Ala in die wachsende Pentapeptidkette	32 µg/ml
Fosfomycin	verhindert die Verknüpfung der N-Acetyl-Glucosamin- und N-Acetyl-Muraminsäure-Untereinheiten	1 µg/ml
Tunicamycin	verhindert die Bindung von N-Acetyl-Glucosamin-N-Acetyl-Muraminsäure an den Bactoprenolcarrier	2 µg/ml
Bacitracin	verhindert die Dephosphorylierung des Bactoprenolcarriers	8 µg/ml
Vancomycin	verhindert die Transglycosylierungsreaktion der Zellwandsynthese	0,5 µg/ml
Flavophospholipol	verhindert die Transglycosylierungsreaktion der Zellwandsynthese	0,5 µg/ml
Penicillin G	verhindert die Transpeptidierungsreaktion der Zellwandsynthese	2 µg/ml

Für die Induktionsversuche mit den Zellwandsyntheseinhibitoren wurde der Stamm *E. faecium* 2E121198 ausgewählt. Die jeweiligen Antibiotika wurden in Konzentrationen von  $\frac{1}{4}$  der MHK eingesetzt (siehe Tab. 9), mit Ausnahme von Vancomycin und Flavophospholipol, die bereits in geringen Konzentrationen die Expression des *vanA*-Operons induzieren. Für Vancomycin wurde die stärkste Induktion bei einer Konzentration von 0,5 µg/ml beschrieben (Grissom-Arnold et al., 1997). Für die Induktion durch FPL wurden unterschiedliche Daten veröffentlicht. Grissom-Arnold et al. (1997) konnten bereits durch 0,06 µg/ml Flavophospholipol eine Induktion des Vancomycin Resistenz-Operons nachweisen, während bei Allen und Hobbs (1995) 10-40 µg/ml des Antibiotikums nötig waren, um das *vanA*-Operon zu induzieren. Daher wurde der Einfluss verschiedener FPL-Konzentrationen auf die Expression des VanA-Ligase Proteins getestet. Der Stamm *E. faecium* 2E121198 wurde in BHI-Medium mit verschiedenen Flavophospholipol-Konzentrationen inkubiert. Die Proteine wurden isoliert und durch SDS-PAGE aufgetrennt (siehe 4.6). Anschließend wurden die VanA-Ligase Proteine im Western Blot detektiert.

Dabei konnte eine induzierte Expression des VanA-Ligase Proteins bereits bei einer Konzentration des Antibiotikums von 0,05  $\mu\text{g/ml}$  nachgewiesen werden (siehe Tab. 10).

Tab. 10: Einfluss verschiedener FPL-Konzentrationen auf die Expression des VanA-Ligase Proteins.

FPL-Konzentration [ $\mu\text{g/ml}$ ]	VanA-Ligase Induktion
0,001	-
0,01	-
0,05	+
0,1	+
0,5	+

Der Einfluss von verschiedenen Zellwandsyntheseinhibitoren auf die Expression des VanA-Ligase Proteins ist in Abbildung 10 dargestellt. Die Ermittlung der Intensität der Banden erfolgte durch densitometrische Analyse (siehe Seite 116). Wie in Spur 1 zu erkennen ist, erfolgte eine Expression des 39 kDa VanA-Ligase Proteins bereits bei Inkubation des Stammes *E. faecium* 2E121198 ohne Antibiotikum. Vancomycin induzierte die Expression des VanA-Ligase Proteins um das fünffache (Spur 8), Flavophospholipol um das 4,5fache (Spur 7) und Bacitracin um das vierfache (Spur 4). Nach Inkubation mit Tunicamycin und Fosfomycin war eine zwei- bzw. 1,3fache Induktion der 39 kDa Bande detektierbar (Spuren 5 und 3). Das Antibiotikum D-Cycloserin hatte keinen Einfluss auf die Expression des Proteins (Spur 2). Durch die Inkubation mit Penicillin G verringerte sich die Expression der VanA-Ligase um die Hälfte (Spur 6).

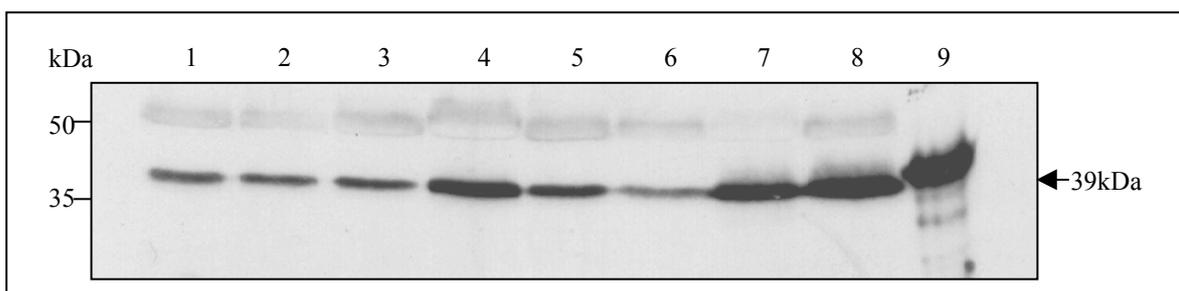


Abb. 10: Western Blot-Analyse der Expression des VanA-Ligase Proteins unter dem Einfluss verschiedener Zellwandsyntheseinhibitoren. Spur 1: Stamm *E. faecium* 2E121198 ohne Antibiotikum. Spur 2: Stamm *E. faecium* 2E121198 mit D-Cycloserin, Spur 3: Stamm *E. faecium* 2E121198 mit Fosfomycin, Spur 4: Stamm *E. faecium* 2E121198 mit Bacitracin, Spur 5: Stamm *E. faecium* 2E121198 mit Tunicamycin, Spur 6: Stamm *E. faecium* 2E121198 mit Penicillin G, Spur 7: Stamm *E. faecium* 2E121198 mit FPL, Spur 8: Stamm *E. faecium* 2E121198 mit Vancomycin, Spur 9: rekombinantes VanA-Ligase Protein. Es wurden mehrere unabhängige Induktionsversuche durchgeführt; dargestellt ist ein typisches Induktionsmuster.

Es ist bekannt, dass nach Behandlung mit Cephalosporinen der II. und III. Generation, sowie Clindamycin und Metronidazol bei Patienten mit Vancomycin-resistenten Enterokokken die Besiedelungs-Dichte dieser Bakterien im Darm zunimmt (Donskey et al., 2000, Patterson, 2001). Daher wurde der Einfluss verschiedener Cephalosporine (Cefalexin, Cefuroxim, Ceftriaxon, Cefepim), sowie Clindamycin, Metronidazol und Meropenem auf die Expression des VanA-Ligase Proteins getestet (siehe Tab.11). Für die Induktionsversuche wurde der Stamm *E. faecium* 2E121198 ausgewählt. Dieser ist gegen die getesteten Antibiotika resistent. Die eingesetzten Antibiotika-Endkonzentrationen entsprachen  $\frac{1}{4}$  der MHK der entsprechenden Antibiotika (siehe Tab. 11).

Tab. 11: Getestete Antibiotika und die für die Versuche eingesetzten Konzentrationen.

Antibiotikum	Gruppe	eingesetzte Konzentration
Cefalexin	Cephalosporine I	32 µg/ml
Cefuroxim	Cephalosporine II	32 µg/ml
Ceftriaxon	Cephalosporine III	32 µg/ml
Cefepim	Cephalosporine IV	32 µg/ml
Meropenem	Carbapeneme	4 µg/ml
Clindamycin	Lincosamine	32 µg/ml
Metronidazol	Nitroimidazole	32 µg/ml

In Abbildung 11 ist der Einfluss verschiedener Cephalosporine, sowie von Meropenem, Clindamycin und Metronidazol auf die Expression des VanA-Ligase Proteins dargestellt. Die Ermittlung der Banden-Intensität erfolgte durch densitometrische Analyse (die absoluten Werte sind auf Seite 116 angegeben). Eine Expression des 39 kDa VanA-Ligase Proteins erfolgte bereits bei Inkubation des Stammes *E. faecium* 2E121198 ohne Antibiotikum (Spur 1). Unter dem Einfluss von Cefalexin und Meropenem war eine 1,5fache Induktion der Expression der 39 kDa Bande detektierbar (Spuren 3 und 6). Eine leichte Induktion um den Faktor 1,3 erfolgte nach Inkubation mit Cefuroxim und Clindamycin (Spuren 2 und 7). Die Antibiotika Cefepim und Metronidazol hatte keinen Einfluss auf die Expression des VanA-Ligase Proteins (Spuren 5 und 8). Nach Inkubation mit Ceftriaxon war die Expression des Proteins um das fünffache reduziert (Spur 4).

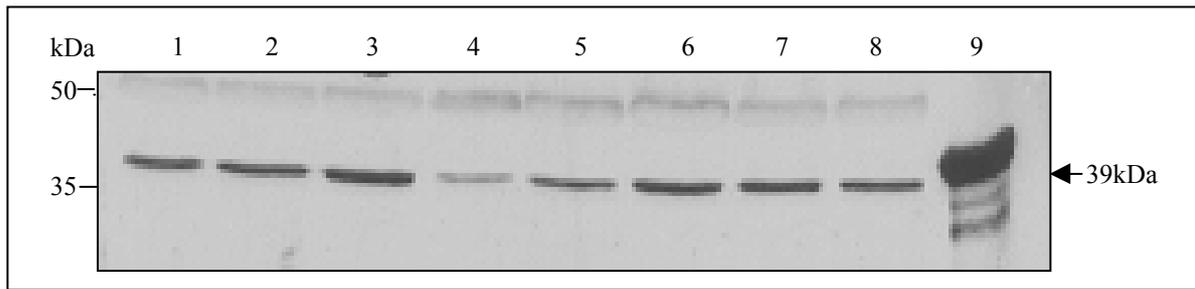


Abb. 11: Western Blot-Analyse der Expression des VanA-Ligase Proteins unter dem Einfluss verschiedener Antibiotika. Spur 1: Stamm *E. faecium* 2E121198 ohne Antibiotikum. Spur 2: Stamm *E. faecium* 2E121198 mit Cefuroxim, Spur 3: Stamm *E. faecium* 2E121198 mit Cefalexin, Spur 4: Stamm *E. faecium* 2E121198 mit Ceftriaxon, Spur 5: Stamm *E. faecium* 2E121198 mit Cefepim, Spur 6: Stamm *E. faecium* 2E121198 mit Meropenem, Spur 7: Stamm *E. faecium* 2E121198 mit Clindamycin, Spur 8: Stamm *E. faecium* 2E121198 mit Metronidazol, Spur 9: rekombinantes VanA-Ligase Protein. Es wurden mehrere unabhängige Induktionsversuche durchgeführt; dargestellt ist ein typisches Induktionsmuster.

### 5.2.2.2 Induktion des VanA-Ligase Proteins durch Umweltfaktoren

Um den Einfluss von Umweltfaktoren auf die Induktion des *vanA*-Operons zu untersuchen, wurde die Expression des VanA-Ligase Proteins unter Hitzestress und osmotischem Stress getestet. Dazu wurde der Stamm *E. faecium* 2E121198 in BHI-Medium mit dem Zusatz von 1% NaCl, 3% NaCl und 5% NaCl, sowie bei 37°C, bei 39°C und bei 41°C angezogen. Der Nachweis der VanA-Ligase erfolgte im Western Blot-Verfahren. Der Immunoblot zeigt, dass weder osmotischer Stress (siehe Abb. 12 A), noch Hitzestress (siehe Abb. 12 B) die Expression des 39 kDa VanA-Ligase Proteins signifikant veränderten.

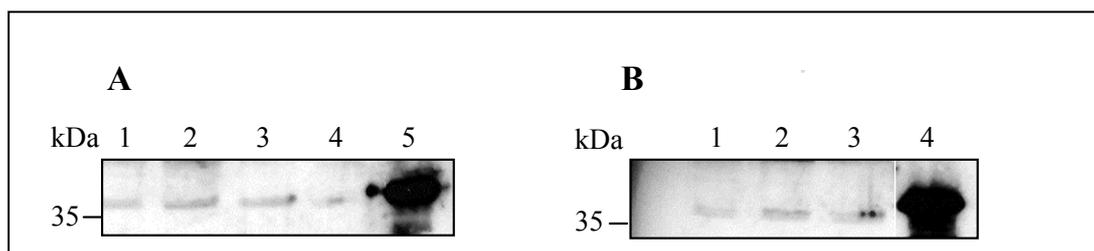


Abb. 12: Western Blot-Analyse der Expression des VanA-Ligase Proteins unter dem Einfluss verschiedener Stressoren. (A): Spur 1: Stamm *E. faecium* 2E121198 ohne Zusatz von NaCl zum Wachstumsmedium, Spur 2: Stamm *E. faecium* 2E121198 mit Zusatz von 1% NaCl, Spur 3: Stamm *E. faecium* 2E121198 mit Zusatz von 3% NaCl, Spur 4: Stamm *E. faecium* 2E121198 mit Zusatz von 5% NaCl, Spur 5: rekombinantes VanA-Ligase Protein. (B): Spur 1: Stamm *E. faecium* 2E121198 inkubiert bei 37°C. Spur 2: Stamm *E. faecium* 2E121198 inkubiert bei 39°C, Spur 3: Stamm *E. faecium* 2E121198 inkubiert bei 41°C, Spur 4: rekombinantes VanA-Ligase Protein.

### 5.3 Transposonmutagenese zur Identifizierung der putativen FPL-Resistenzdeterminante in *E. faecium*

*E. faecium* galt lange Zeit als inhärent resistent gegen Flavophospholipol (Butaye et al., 1998, Dutta et al., 1984). Jedoch wurden in verschiedenen neueren Studien FPL-sensitive *E. faecium*-Stämme beschrieben (Aarestrup et al., 1998, DANMAP 1998, FEFANA 2000). Dabei zeigte sich, dass in Hühnern signifikant häufiger FPL-sensitive *E. faecium*-Isolate vorkommen als in Schweinen. Um die molekulargenetische Ursache der FPL-Resistenz zu analysieren, wurde in dieser Arbeit eine Transposonmutagenese unter Verwendung des konjugativen Transposons Tn916 durchgeführt. Nach der Übertragung des Transposons in einen FPL-resistenten *E. faecium*-Stamm, wurde nach FPL-sensitiven Klonen gesucht und in diesen die Transposon-Insertionsstelle charakterisiert.

#### 5.3.1 *In vitro*-Filterkonjugation

Für die Übertragung des „broad host range“-konjugativen Transposons Tn916 (Jacob et al., 1974) wurde die *in vitro*-Filterkonjugation, wie unter 4.22 beschrieben, durchgeführt. Als Donor diente der Bakterienstamm *E. faecalis* JH2-2, der chromosomal kodiert eine Kopie des konjugativen Transposons Tn916 (*tetM*) trägt. Dieser Stamm ist Tetrazyklin-resistent, Vancomycin- und Flavophospholipol-sensitiv. Als Rezipient wurde ein Transkonjugant des Stammes *E. faecium* 64/3 mit einem Plasmid, auf dem das *vanA*-Gencluster (*Van<sup>r</sup>*) kodiert vorliegt, verwendet. Dieser Stamm ist Tetrazyklin-sensitiv, Vancomycin- und Flavophospholipol-resistent.

#### 5.3.2 Selektion der Transkonjuganten

Die Übertragung von Tn916 vom Donorstamm *E. faecalis* JH2-2 auf den Rezipientenstamm *E. faecium* 64/3 konnte auf Grund der Vancomycin- und der durch das Transposon erworbenen Tetrazyklinresistenz nachgewiesen werden. Durch Überimpfen auf Agarplatten, die neben Vancomycin und Tetrazyklin zusätzlich Flavophospholipol enthielten, konnten sieben Transkonjuganten (64/3-1, 64/3-9, 64/3-12, 64/3-15, 64/3-22, 64/3-25, 64/3-33) identifiziert werden, die nach der Transposonmutagenese FPL-sensitiv geworden waren. Es wurden zwei unabhängige Konjugationsversuche durchgeführt. Von beiden Experimenten wurden insgesamt 2500 Klone gepickt.

#### 5.3.3 Genetische Charakterisierung der Mutanten

Chromosomale DNS FPL-sensitiver Transkonjuganten-Klone wurde mit dem Restriktionsenzym *HindIII* gespalten. Tn916 enthält eine *HindIII*-Schnittstelle, so dass ein

5'-Teilstück von 12,2 kb und ein 3'-Teilstück von 5,8 kb entstand (Flannagan et al., 1994). Die Fragmente wurden im Agarosegel aufgetrennt, auf eine Membran transferiert und mit einer spezifischen Tn916-Sonde hybridisiert (siehe Abb. 13). Während im Rezipientenstamm 64/3 keine der DNS-Fragmente mit der Tn916-Sonde hybridisierten (Spur 1), zeigten sich in den Mutanten 64/3-1, 64/3-9 und 64/3-12 jeweils zwei Banden (Spuren 2, 3 und 4). Bei diesen Klonen integrierte jeweils eine Kopie von Tn916 in das Chromosom. Die identische Größe der Fragmente deutet darauf hin, dass das Transposon in den Transkonjuganten an der gleichen Stelle ins Chromosom inserierte. Im *E. faecalis* Donorstamm waren drei Banden detektierbar (Spur 5). Die oberste Bande (ca. 18 kb) entspricht vermutlich einem zirkulären Fragment, das durch Excision des Transposons entstand.

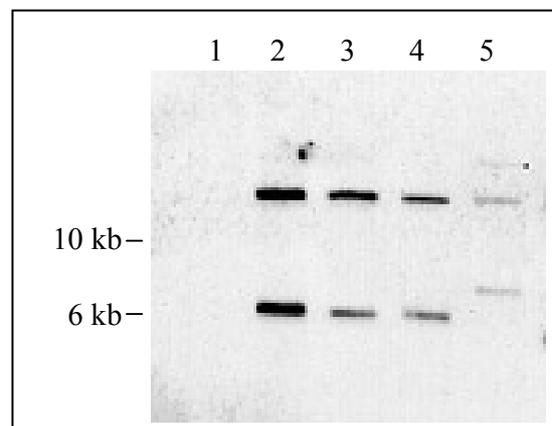


Abb. 13: Southern Blot-Analyse von *Hind*III gespaltener chromosomaler DNS des Rezipientenstammes, der Transposon-Mutanten-Klone und des Donorstammes. Hybridisiert wurde mit einer Tn916 spezifischen Sonde. Spur 1: Rezipientenstamm *E. faecium* 64/3, Spuren 2-4: *E. faecium* Transkonjuganten (64/3-1, 64/3-9 und 64/3-12), Spur 5: *E. faecalis* Donorstamm JH2-2.

### 5.3.4 Charakterisierung der Tn916 Insertionsstellen und der flankierenden chromosomalen Sequenzen

Um die Tn916 flankierenden Bereiche im Chromosom der Transkonjuganten zu amplifizieren, wurden inverse PCR-Reaktionen durchgeführt. Die chromosomale DNS wurde mit *Nsi*I verdaut. Dieses Restriktionsenzym schneidet nur einmal in Tn916 und zwar in der Resistenzdeterminante *tetM*. Die DNS wurde selbstligiert und diente nun als „Template“ für die inversen PCR-Reaktionen. Als Primer wurden divergente Oligonukleotidpaare verwendet, die homolog zu den jeweiligen Enden von Tn916 sind und somit eine Amplifikation der flankierenden chromosomalen Bereiche ermöglichten (Smidt et al., 1999). Unter Verwendung des Oligonukleotidpaares BG 285 und BG 290 konnte in

der FPL<sup>S</sup>-Mutante 64/3-1 ein 2 kb großes Produkt im „upstream“-Bereich von Tn916 amplifiziert werden. Dieses wurde in den Vektor pGEM-T Easy kloniert und anschließend sequenziert. Die Sequenz wurde mit den „contigs“ aus der Datenbank des *E. faecium* Sequenzierprojektes am „Doe Joint Genome Institute“ (University of California, USA) verglichen ([http://www.jgi.doe.gov/JGI\\_microbiol/enterococcus/](http://www.jgi.doe.gov/JGI_microbiol/enterococcus/)). Der sequenzierte Bereich ist homolog zum Gen für eine putative Threonyl-tRNA Synthetase, die auf den „contigs“ 724 und 1238 liegt. Tn916 inserierte 330 bp vor dem putativen Stopcodon des Gens. Die Anordnung der nachfolgenden Gene auf dem „contig“ 1238 ist in Abbildung 14 A dargestellt. Homologievergleiche mittels „BLAST P“ ergaben auf Proteinebene 74% Homologie zu einer putativen Threonyl-tRNA Synthetase aus *Streptococcus pyogenes*. Der putative Transkriptionsregulator ist auf Proteinebene zu 35% homolog zu einem putativen Transkriptionsregulator aus *Lactococcus lactis* und das putative Penicillin-Bindeprotein zeigt auf Proteinebene 42% Homologie zu dem Penicillin-Bindeprotein 2B aus *Streptococcus pneumoniae*. Weitere Homologien sind in Tabelle 12 dargestellt.

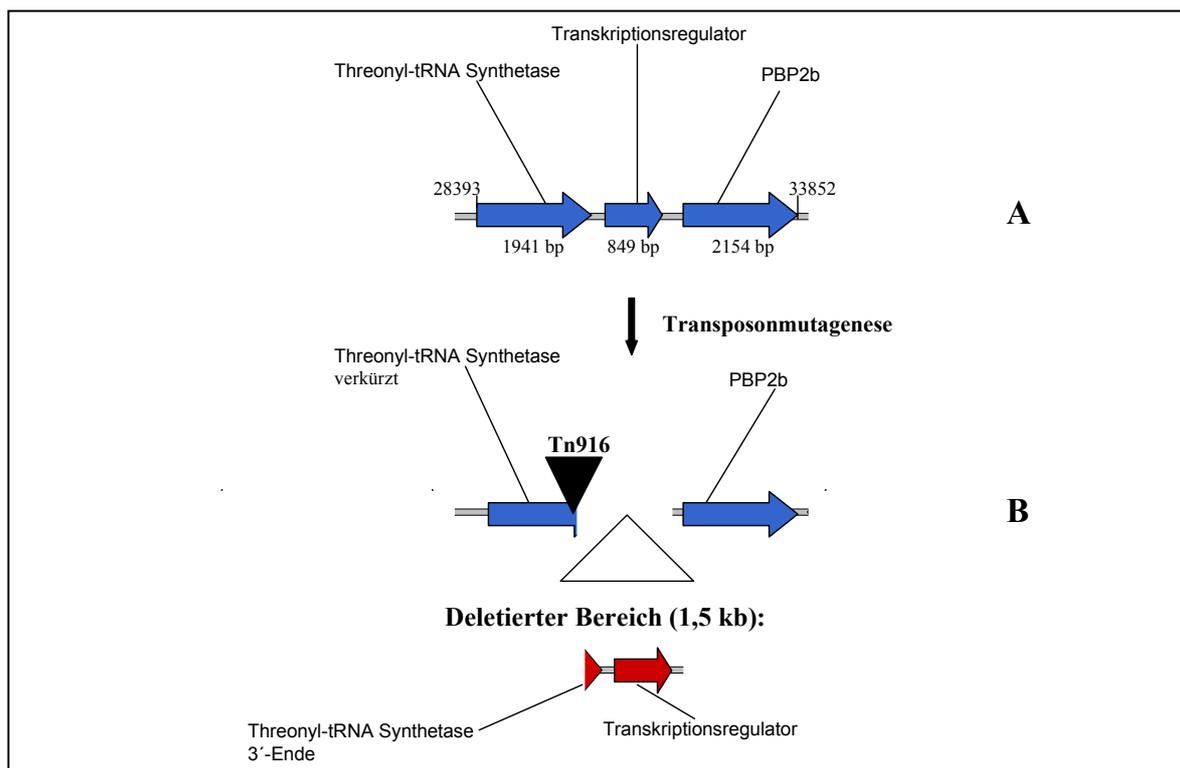


Abb. 14: (A) Genomorganisation im Bereich der Tn916 Insertionsstelle (auf der Grundlage der Sequenzdaten des „Doe Joint Genome Institute“, „contig“ 1238): Gene für die putative Threonyl-tRNA Synthetase, den putativen Transkriptionsregulator und das putative Penicillin-Bindeprotein. (B) Darstellung der Tn916 Insertionsstelle und des deletierten Sequenzbereiches.

Tab. 12: Homologievergleiche („BLAST P“) für die putative Threonyl-tRNA Synthetase, den putativen Transkriptionsregulator und das putative Penicillin-Bindeprotein aus „contig“ 1238. Die Proteine mit der größten Homologie sind fettgedruckt.

Proteine mit signifikanter Ähnlichkeit	Spezies	„E value“	Identität
<b>putative Threonyl-tRNA Synthetase</b>	<i>Streptococcus pyogenes</i> M1 GAS	0,0	74%
Threonyl-tRNA Synthetase	<i>Listeria monocytogenes</i> EGD	0,0	74%
Threonyl-tRNA Synthetase	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	0,0	72%
<b>Putativer Transkriptionsregulator</b>	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	1e-43	35%
Hypothetisches Protein	<i>Staphylococcus aureus</i>	2e-38	31%
Hypothetisches Protein ybbH	<i>Bacillus subtilis</i>	3e-38	34%
<b>Penicillin-Bindeprotein 2B</b>	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	e-153	42%
Penicillin-Bindeprotein 2b	<i>Streptococcus mitis</i>	e-151	42%
Penicillin-Bindeprotein 2B	<i>Streptococcus oralis</i>	e-119	40%

Um die Anordnung der Gene im Stamm 64/3 und in den FPL<sup>s</sup>-Mutanten zu untersuchen, wurde der Bereich chromosomaler DNS „downstream“ des Transposons Tn916 amplifiziert. Dazu wurde der Primer „PBP S oralis rev“ am 3'-Ende des Gens für das putative Penicillin-Bindeprotein (aus „contig“ 1238) gewählt. Als zweites Oligonukleotid wurde für den Stamm 64/3 die Sequenz „Thr 526“ ausgewählt, die direkt „downstream“ der Tn916 Insertionsstelle im Gen für die putative Threonyl-tRNA Synthetase liegt. Für die Mutanten wurde der Primer BG 286 am 3'-Ende von Tn916 verwendet. Die Amplifikationen ergaben für den Stamm 64/3 ein 3,8 kb großes Fragment, für alle

Mutanten jeweils ein Fragment der Größe 2,3 kb (siehe Abb. 15). Die Länge des 3,8 kb Fragmentes aus dem Stamm 64/3 entspricht auf dem „contig“ 1238 der Entfernung von der Insertionsstelle von *Tn916* am 3'-Ende des Gens für die putative Threonyl-tRNA Synthetase bis zur Sequenz des gewählten Oligonukleotids „PBP S oralis rev“ im Gen für das Penicillin-Bindeprotein. Die Sequenz des 3,8 kb PCR Produktes wurde bestimmt und mit der Sequenz in der Datenbank verglichen. Dadurch konnte die Genfolge im Stamm 64/3 im Vergleich zu dem *E. faecium*-Stamm aus dem Sequenzierprojekt des „Doe Joint Genome Institute“ („contig“ 1238) bestätigt werden (siehe Abb. 14 A).

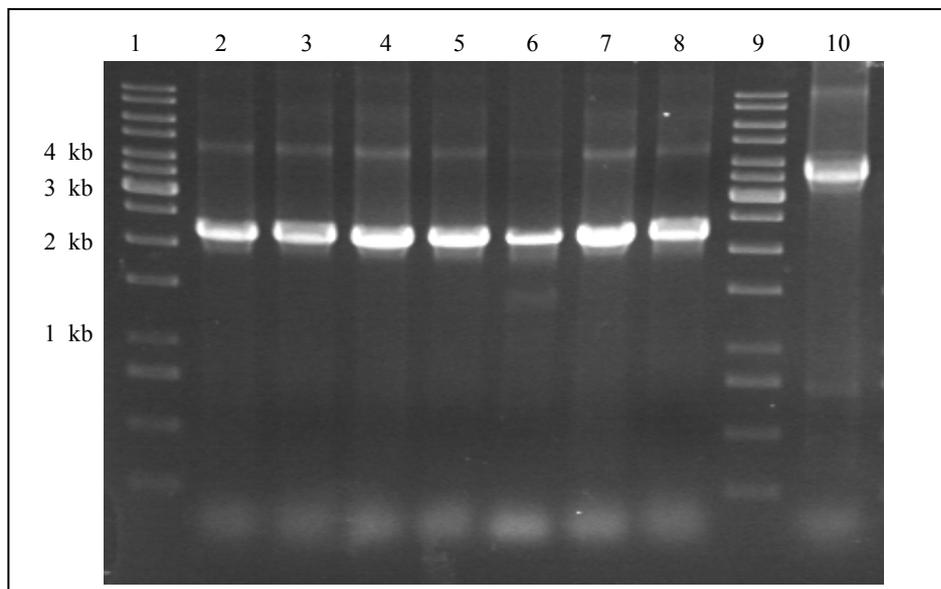


Abb. 15: PCR-Fragmente nach Amplifikation des „downstream“-Bereiches des Gens für die Threonyl-tRNA Synthetase nach *Tn916* Insertion. Spur 1: Marker, Spuren 2-8: *E. faecium*-Mutanten 64/3-1, 64/3-9, 64/3-12, 64/3-15, 64/3-22, 64/3-25, 64/3-33. Spur 9: Marker, Spur 10: *E. faecium*-Stamm 64/3.

Durch die Sequenzierung der 2,3 kb PCR-Produkte der Transposon-Mutanten 64/3-1, 64/3-9, 64/3-12, 64/3-15, 64/3-22, 64/3-25, und 64/3-33 wurde deutlich, dass das Transposon in allen Mutanten in gleicher Orientierung und an der gleichen Stelle im Chromosom inseriert war. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass durch die Insertion von *Tn916* in das Strukturgen der putativen Threonyl-tRNA Synthetase ein Bereich von 1,5 kb „downstream“ des Transposons deletierte (siehe Abb. 14 B). Ab 187 bp vor dem putativen Startcodon des Penicillin-Bindeproteins entspricht die Sequenz in den Mutanten der Sequenz des Wildtyp-Stammes 64/3 (siehe 8.1.1). Somit wurden durch die Transposon-Insertion in allen untersuchten Mutanten der 3'-Bereich der putativen Threonyl-tRNA Synthetase und ein putatives regulatorisches Protein deletiert.

### 5.3.5 Phänotypische Charakterisierung der Mutanten

#### 5.3.5.1 Bestimmung der Bakterienspezies

Um eine erfolgreiche Konjugation des Transposons Tn916 vom Donorstamm *E. faecalis* JH2-2 in den Rezipientenstamm *E. faecium* 64/3 zu bestätigen, wurden die Mutanten mittels der unter 4.1 beschriebenen biochemischen und molekulargenetischen Methoden charakterisiert. Sowohl durch die Verwertung der Zucker Melibiose und L-Arabinose, als auch durch PCR-Analyse zur Amplifikation des Gens, das für die D-Alanin:D-Alanin-Ligase kodiert, konnte bestätigt werden, dass alle Mutanten der Spezies *E. faecium* angehören.

#### 5.3.5.2 Bestimmung der MHK

Zur weiteren Charakterisierung wurde die minimale Hemmkonzentration (MHK) des Stammes 64/3 und der Mutanten gegen die Antibiotika FPL und Ampicillin bestimmt.

Tab. 13: MHK des Stammes 64/3 und der isogenen FPL<sup>s</sup>-Mutanten gegen FPL und Ampicillin.

	Stamm 64/3	Mutanten 64/3-1, -9, -12, -15, -22, -25, -33
MHK, FPL (µg/ml)	>128	4
MHK, Ampicillin (µg/ml)	1	8

Die MHK des Stammes 64/3 gegen FPL (>128 µg/ml) verringert sich in den Mutanten um das 32fache auf 4 µg/ml. Im Gegensatz dazu steigt die MHK gegen Ampicillin von 1 µg/ml im Stamm 64/3 auf 8 µg/ml in den Mutanten an (siehe Tab. 13).

#### 5.3.5.3 Mikroskopische Analyse des Stammes 64/3 und der Mutante 64/3-1

Eine spätlogarithmische Kultur des Stammes 64/3 und der Mutante 64/3-1 wurden im Lichtmikroskop bei 400facher Vergrößerung im Phasenkontrast betrachtet. Bei dem Stamm 64/3 waren einzelne Zellen und kurze Ketten von Bakterien zu erkennen (siehe Abb. 16 A). Bei der Mutante 64/3-1 zeigten sich vermehrt längere Ketten von Bakterien (siehe Abb. 16 B).

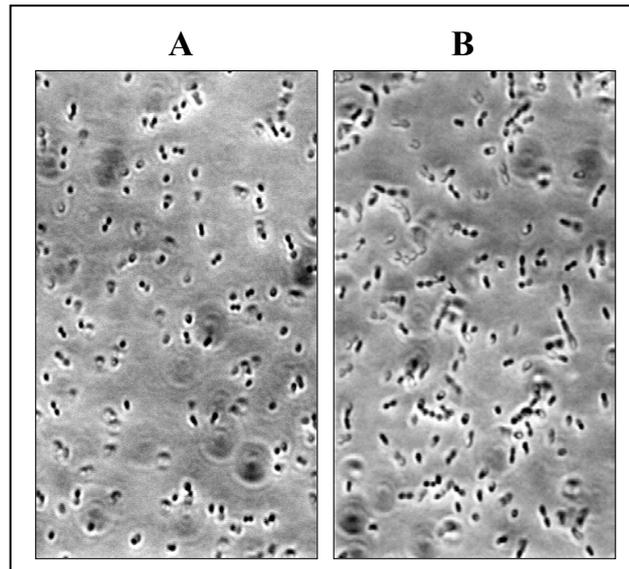


Abb. 16: Lichtmikroskopische Aufnahmen des Stammes *E. faecium* 64/3 (A) und der Mutante 64/3-1 (B) im Phasenkontrast bei 400facher Vergrößerung.

#### 5.3.5.4 Wachstumsversuche in CDM

Um zu untersuchen, ob die Transposoninsertion am 3'-Ende des putativen Threonyl-tRNA Synthetase Gens einen Einfluss auf das Wachstumsverhalten der Mutanten hat, wurden Wachstumsexperimente mit dem Stamm 64/3 und der Mutante 64/3-1 in chemisch definiertem Medium (CDM) ohne die Aminosäure Threonin durchgeführt. Wie aus Abbildung 17 ersichtlich, unterscheidet sich die Wachstumskurve der Mutante 64/3-1 nicht signifikant von der des Stammes 64/3. Der Wildtyp und die Mutante wachsen auch ohne den Zusatz von Threonin im Wachstumsmedium.

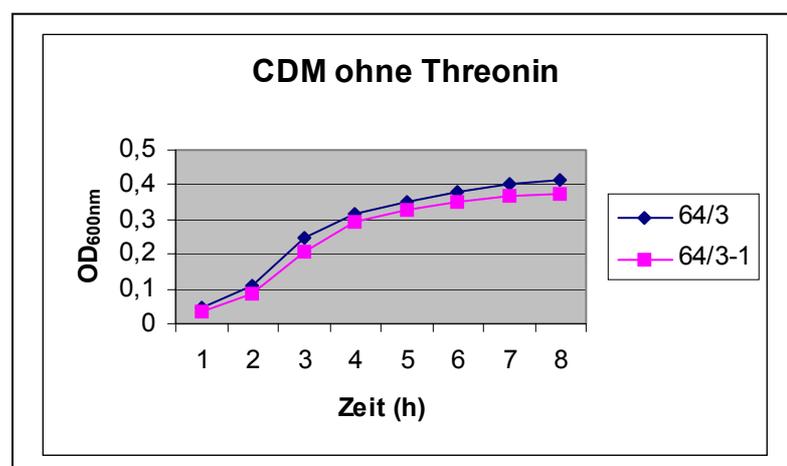


Abb. 17: Wachstumskurven des Stammes *E. faecium* 64/3 und der Mutante 64/3-1 in CDM ohne Threonin.

### 5.3.6 Sequenzvergleiche des Threonyl-tRNA Synthetase Gens und des Penicillin-Bindeprotein Gens zwischen *E. faecium* und *E. faecalis*

Die kodierenden Regionen für die Threonyl-tRNA Synthetase und „downstream“ für das Penicillin-Bindeprotein konnten auch in der verwandten Art *E. faecalis* („TIGR“) nachgewiesen werden. Das Gen für die Threonyl-tRNA Synthetase ist auf Nukleotidebene zu 82% homolog zu dem aus *E. faecium* (siehe Abb. 18). Der putative Transkriptionsregulator fehlt, 168 bp 3' des Threonyl-tRNA Synthetase Gens liegt das Startcodon des Penicillin-Bindeproteins, welches auf Proteinebene zu 54% homolog zu dem in *E. faecium* ist (siehe Abb. 18).

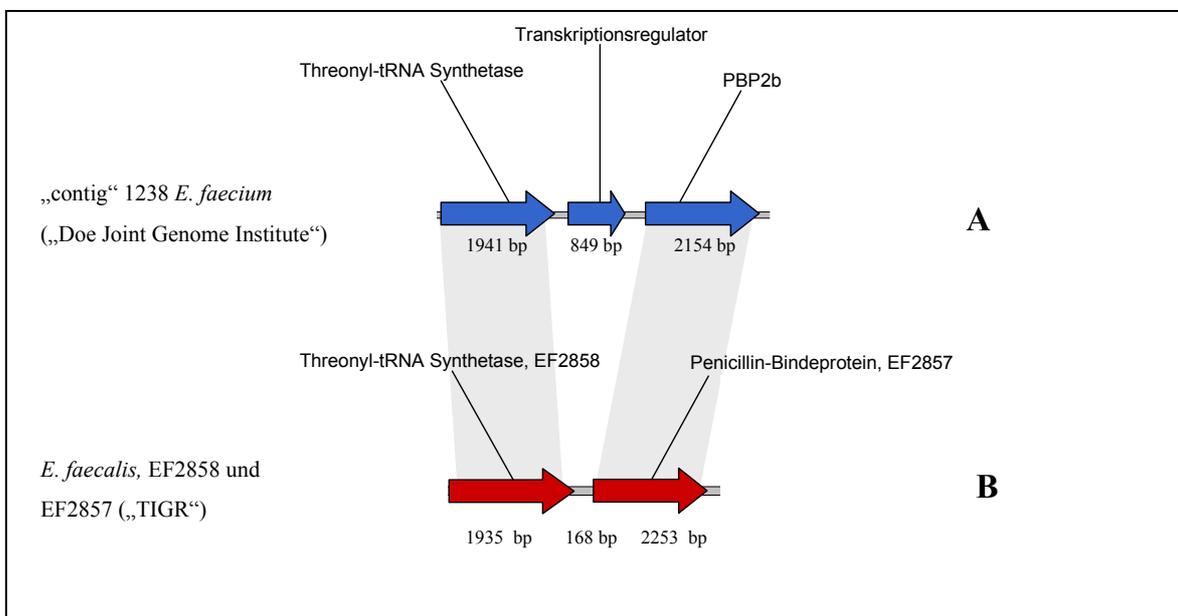


Abb.18: Sequenzvergleiche des Threonyl-tRNA Synthetase Gens und des Penicillin-Bindeprotein Gens zwischen *E. faecium* und *E. faecalis*. Die homologen Bereiche sind mit grauen Balken markiert. (A): Sequenzbereich des „contig“ 1238 („Doe Joint Genome Institute“). (B): Sequenzbereich des „contig“ 10493 („TIGR“).

### 5.3.7 Versuche zur Komplementation des FPL<sup>S</sup>-Phänotyps

Um die Bedeutung des Sequenzbereiches „upstream“ des putativen Penicillin-Bindeproteins für den FPL<sup>S</sup>-Phänotyp auf molekularer Ebene zu untersuchen, sollten die Mutanten mit dem durch die Transposonmutagenese deletierten Bereich komplementiert werden. Dazu wurde ein 2,4 kb großer Sequenzbereich aus dem Stamm 64/3 mittels des Primerpaares „Thr 526“ und „PBP S mitis rev“ amplifiziert. Dieser Bereich umfasst das Ende des Gens für die putative Threonyl-tRNA Synthetase und den putativen Regulator.

Dieser Sequenzbereich wurde amplifiziert, in den Vektor pGEM-T Easy subkloniert, durch Sequenzierung verifiziert und anschließend in die gram<sup>-</sup>/gram<sup>+</sup>-„Shuttle“-Vektoren pHPS9 (pSR3) und pRB473 (pSR4) umkloniert (Brückner, 1992, Haima et al., 1990). Es wurden verschiedene Methoden zur Transformation dieser Vektoren ausprobiert, da *E. faecium*-Stämme sehr schlecht oder nicht transformierbar sind. Die Elektroporation wurde nach verschiedenen Methoden durchgeführt (Cruz-Rodz et al., 1990, Friesenegger et al., 1990 und A. Muscholl-Silberhorn, persönliche Information). Außerdem wurde versucht eine Transformations-Methode für *Staphylococcus epidermidis* anzuwenden (Rachid, 2000). Der Stamm *E. faecalis* JH2-2 konnte mit dem Vektor pSR4 transformiert werden. Alle Versuche die *E. faecium* Mutanten zu transformieren, waren nicht erfolgreich.

### 5.3.8 Transkriptionsanalyse des Penicillin-Bindeproteins

Der Einfluss des 1,5 kb deletierten Sequenzbereiches auf die Transkription des putativen Penicillin-Bindeproteins wurde mittels einer Northern Blot-Analyse untersucht. Die für das Penicillin-Bindeprotein spezifische Sonde wurde hierbei aus dem *E. faecium* Sequenzierprojekt („contig“ 1238) abgeleitet. Wie in Abbildung 19 dargestellt, war die Transkription des Penicillin-Bindeproteins in der Mutante 64/3-1 im Vergleich zum Stamm 64/3 deutlich verringert. Die Länge des Transkripts von ca. 2,1 kb entsprach hierbei der Größe des Gens für das putative Penicillin-Bindeprotein auf dem „contig“ 1238 von 2154 bp.

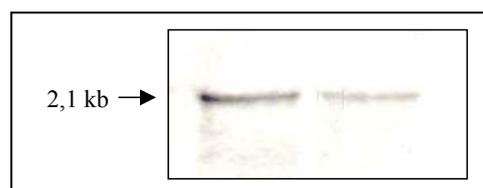


Abb. 19: Northern Blot-Analyse der Transkription des putativen Penicillin-Bindeproteins mit <sup>32</sup>P markierter spezifischer Sonde. Spur 1: *E. faecium* Stamm 64/3; Spur 2: *E. faecium* Mutante 64/3-1.

### 5.3.9 Penicillin-Bindeprotein Studien mit [<sup>3</sup>H] Penicillin

In weiterführenden Experimenten wurden die Penicillin-Bindeproteine (PBP) des Stammes *E. faecium* 64/3 und der FPL<sup>s</sup>-Mutante 64/3-1 mit [<sup>3</sup>H] Penicillin markiert. Dadurch sollten Informationen über den Einfluss von FPL auf die Bindung von  $\beta$ -Lactamantibiotika an die Penicillin-Bindeproteine von *E. faecium* erhalten werden. FPL interagiert mit der Transglycosylase-Untereinheit bifunktionaler „high molecular weight“ Penicillin-Bindeproteine (Stembra et al., 2002, Terrak et al., 1999). Dadurch wird der nachfolgende Schritt der Transpeptidierung sterisch verhindert (Graves-Woodward und Pratt, 1999) und somit bei FPL-sensitiven Stämmen die Zellwandsynthese inhibiert.

Durch die Analyse der Bindung von [<sup>3</sup>H] Penicillin an Penicillin-Bindeproteine, mit und ohne Vorinkubation mit FPL, sollten Erkenntnisse über die Expression bifunktionaler Penicillin-Bindeproteine im Stamm *E. faecium* 64/3 und in der Mutante 64/3-1 erhalten werden. Die Penicillin-Bindeproteine aus Zelllysaten wurden markiert, durch SDS-PAGE aufgetrennt und das Bindungsmuster autoradiographisch bestimmt (siehe 4.22.4).

In Abbildung 20 sind die markierten Penicillin-Bindeproteine des Stammes 64/3 und der Mutante 64/3-1 dargestellt. Im Stamm 64/3 sind 5 Penicillin-Bindeproteine zu erkennen (Spur 4). In Spur 3 wurden die Zelllysate des Stammes 64/3 vor der [<sup>3</sup>H] Penicillin-Markierung mit FPL präinkubiert. Dadurch verschwand das Signal für PBP2 und PBP3 war nur noch sehr schwach detektierbar. Das Bindungsmuster des Wildtyp-Stammes 64/3 unterscheidet sich deutlich von dem der FPL<sup>s</sup>-Mutante 64/3-1. Ohne Präinkubation mit FPL waren nur PBP1, PBP4 und PBP5 deutlich erkennbar (Spur 2). Nach Vorinkubation mit FPL änderte sich das Bandenmuster nicht wesentlich (Spur 1). PBP1 ist in der Mutante 64/3-1 unterschiedlich stark markiert. PBP4 ist nach FPL-Vorinkubation stärker markiert. Diese Ergebnisse deuten an, dass FPL an PBP2 und in geringerem Ausmaß auch an PBP3 bindet. In der FPL<sup>s</sup>-Mutante 64/3-1 scheint die Bindungsfähigkeit von Penicillin an PBP2 und PBP3 gestört zu sein.

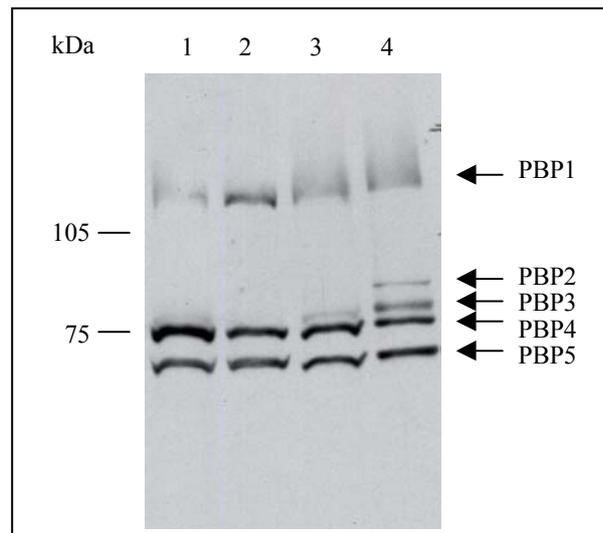


Abb. 20: Penicillin-Bindeproteine des Stammes *E. faecium* 64/3 und der Mutante 64/3-1 mit [ $^3$ H] Penicillin markiert. Spur 1: *E. faecium* FPL<sup>s</sup>-Mutante 64/3-1, nach Vorinkubation mit FPL; Spur 2: *E. faecium* FPL<sup>s</sup>-Mutante 64/3-1 ohne Inkubation mit FPL; Spur 3: Stamm *E. faecium* 64/3 nach Vorinkubation mit FPL; Spur 4: Stamm *E. faecium* 64/3, ohne Inkubation mit FPL.

### 5.3.10 Sequenzanalysen bei einem FPL<sup>s</sup> und FPL<sup>r</sup> Stammpaar

Analysen eines isogenen FPL<sup>r</sup>/FPL<sup>s</sup> Stammpaares sollten zusätzliche Informationen zur Natur der FPL-Resistenz liefern. Dieses Stammpaar wurde von Dr. Mc Conville (Inversek Research, Tranent, Schottland) zur Verfügung gestellt. Dabei handelte es sich um den Stamm *E. faecium* ATCC 6569, der im Mai 1996 als FPL<sup>r</sup> isoliert wurde (MHK >128 µg/ml). Derselbe Stamm wurde im März 2000 als FPL-sensitiv getestet (MHK 8 µg/ml). Der FPL<sup>r</sup>-Stamm wurde in dieser Arbeit als Stamm 110 bezeichnet, der FPL<sup>s</sup>-Stamm als Stamm 111. Zunächst wurden die Gene, die für die D-Alanin:D-Alanin-Ligase kodieren, durch PCR amplifiziert. Dadurch konnte bestätigt werden, dass das Stammpaar der Spezies *E. faecium* angehört (siehe 4.1). Ebenso wurde die Klonalität der Stämme 110 und 111 durch PFGE analysiert. Dabei konnte auf Grund der Ähnlichkeit der Bandenmuster bestätigt werden, dass es sich bei den beiden Proben um denselben Stamm handelt (siehe Abb. 21). Nur im höher molekularen Bereich wurde ein Unterschied deutlich. Eine Bande bei etwa 260 kb, die im FPL<sup>r</sup>-Stamm 110 vorhanden war, verschwand im FPL-sensitiven-Stamm 111. Dafür erschien hier die Bande bei 220 kb als Doppelbande.

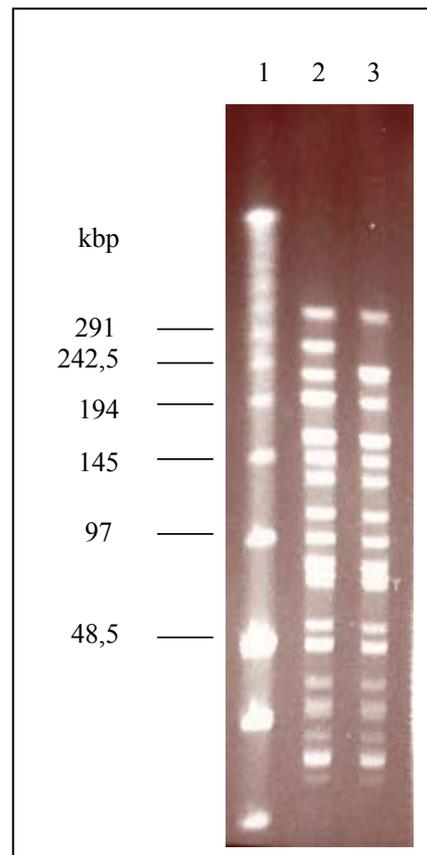


Abb. 21: Pulsfeldgelelektrophorese mit *Sma*I gespaltener chromosomaler DNS des Stammpaares *E. faecium* ATCC 6569. Spur 1: PFGE-Marker, Spur 2: FPL-resistenter Stamm ATCC 6569, Spur 3: FPL-sensitiver Stamm ATCC 6569.

In der vorangegangenen Transposonmutagenese-Untersuchung konnte ein bestimmter Bereich im *E. faecium*-Genom mit der FPL-Sensitivität in Zusammenhang gebracht werden. Durch genomische Analysen des putativen Regulators und des putativen Penicillin-Bindeproteins in dem Stammpaar 110/111 sollte überprüft werden, ob der Verlust der FPL-Resistenz im Stamm 111 auch auf genetische Veränderungen in diesem Bereich zurückgeführt werden kann, oder ob hier andere Ursachen für den Verlust der FPL-Resistenz verantwortlich sind. Von dem Stammpaar wurde jeweils ein 4,1 kb großer Sequenzbereich durch PCR amplifiziert und sequenziert. Dazu wurde das Primerpaar „Thr 526“ (3'-Ende des Threonyl-t-RNA-Synthetase Gens) und „PBP rev 2“ (115 bp nach dem Stopcodon des Penicillin-Bindeprotein Gens) in Anlehnung an „contig“ 1238 des *E. faecium* Sequenzierprojektes ausgewählt. Die PCR-Produkte wurden in den Vektor pGEM-T Easy kloniert und von der Firma Qiagen sequenziert. Durch das „Alignment“ der Sequenzen konnte gezeigt werden, dass die 4,1 kb großen Bereiche in dem Stammpaar auf DNS-Ebene zu 100% homolog sind (siehe 8.1.3). In diesem Fall ist also nicht, wie für die

FPL<sup>S</sup>-Transposonmutante 64/3-1 zeigt, ein deletierter Sequenzbereich oder eine Mutation „upstream“ des putativen Penicillin-Bindeproteins für die veränderte Resistenzlage gegen FPL verantwortlich. Inwieweit das veränderte PFGE-Muster für den Verlust der FPL-Resistenz verantwortlich ist, wurde nicht weiter analysiert.

#### **5.4 Versuche zur Übertragbarkeit der FPL-Resistenzdeterminante zwischen FPL-resistenten und FPL-sensitiven *E. faecium*-Stämmen**

Neuere Untersuchungen, in denen neben FPL-resistenten *E. faecium*-Stämmen auch sensitive Isolate gefunden wurden (Aarestrup et al., 1998, DANMAP 1998, FEFANA 2000) deuten darauf hin, dass eine FPL-Resistenzdeterminante existiert. In dieser Arbeit wurde die Möglichkeit des Transfers der FPL-Resistenz von FPL-resistenten auf FPL-sensitive *E. faecium*-Stämme mittels *in vitro*-Filterkonjugation überprüft. Die Ergebnisse dieser Untersuchung sollten Erkenntnisse zur Übertragbarkeit der FPL-Resistenzdeterminante liefern.

##### **5.4.1 Auswahl der Donor-und Rezipientenstämmen**

Für diesen Versuch wurden 15 *E. faecium*-Stämme als Donoren ausgewählt (siehe Tab. 14). Die Stämme sind alle FPL-resistent (MHK >128 µg/ml). Außerdem wurde der intermediär resistente Stamm 70/90 getestet (MHK 16 µg/ml). Als Rezipienten wurden die zwei FPL-sensitiven *E. faecium*-Stämme 2260700 und 15141099 (MHK 0,5 µg/ml) ausgewählt. Von den zwei Rezipientenstämmen wurden Fusidinsäure- und Rifampicin-resistente Klone selektiert (siehe 4.4). Diese Selektionsmarker ermöglichten nach der Filterkonjugation eine eindeutige Zuordnung der Konjugationspartner. Alle in diesem Versuch verwendeten Stämme wurden molekulargenetisch durch Amplifikation des *ddl* Gens als *E. faecium* bestätigt.

##### **5.4.2 *In vitro*-Filterkonjugationsexperimente**

Die 15 verschiedenen Donorstämme wurden jeweils mit den beiden Rezipienten auf Konjugationsfiltern inkubiert und auf Selektionsplatten ausplattiert. Die Donor- und die Rezipientenstämmen wurden mehrmals in allen Kombinationen untersucht. In keinem der *in vitro*-Filterkonjugationsexperimente konnte ein Transfer der FPL-Resistenzdeterminante nachgewiesen werden (siehe Tab. 14.).

Tab. 14: Donor- und Rezipientenstämme der in vitro-Filterkonjugationsexperimente zur Untersuchung des Transfers der FPL-Resistenzdeterminante.

Donor	Rezipient	Transkonjugant
<i>E. faecium</i> 2E121198	jeweils mit:	n.n.*
<i>E. faecium</i> 2121198	<i>E. faecium</i> 2260700	n.n.
<i>E. faecium</i> 9191198	<i>E. faecium</i> 15141098	n.n.
<i>E. faecium</i> 3C080998		n.n.
<i>E. faecium</i> 21151098		n.n.
<i>E. faecium</i> 4E031298		n.n.
<i>E. faecium</i> 19031298		n.n.
<i>E. faecium</i> 1D301098		n.n.
<i>E. faecium</i> 15301098		n.n.
<i>E. faecium</i> 23131198		n.n.
<i>E. faecium</i> 1B181298		n.n.
<i>E. faecium</i> 36031298		n.n.
<i>E. faecium</i> 22261098		n.n.
<i>E. faecium</i> 25301098		n.n.
<i>E. faecium</i> 3E281098		n.n.
<i>E. faecium</i> 70/90		n.n.

Legende: \*n.n.: nicht nachgewiesen

## 6. Diskussion

### 6.1 Einfluss von Flavophospholipol und Vancomycin auf den konjugativen Transfer von Vancomycin-Resistenz Plasmiden

In dieser Arbeit wurde der Einfluss der Antibiotika Vancomycin und Flavophospholipol auf den konjugativen Transfer von VanA-Plasmiden zwischen verschiedenen *E. faecium*-Stämmen untersucht. Die *vanA*-Resistenzdeterminante liegt häufig auf großen konjugativen Plasmiden und kann daher zwischen Enterokokken-Stämmen transferiert werden (Evers et al., 1996, Heaton et al., 1996, Leclercq et al., 1988, Leclercq et al., 1989, Werner et al., 1999). Das Phosphoglycolipidantibiotikum Flavophospholipol wird als Futtermittelzusatz in der Tiermast eingesetzt, um eine Steigerung der Wachstumsrate zu erzielen. Im Gegensatz zur Verwendung von Antibiotika, die zu prophylaktischen und therapeutischen Zwecken angewendet werden, ist für Leistungsförderer eine Verfütterung subtherapeutischer („nutritiver“) Dosierungen vorgesehen (Richter et al., 1996). Das Glycopeptidantibiotikum Vancomycin dient in der Humanmedizin als Reserveantibiotikum zur Bekämpfung schwerer Infektionen, die durch gram-positive Bakterien hervorgerufen werden. Vancomycin-resistente Enterokokken (VRE), die als Krankenhauskeime ein großes Problem darstellen, konnten in Deutschland auch aus Abwasser (Klare et al., 1993) und aus Fleischprodukten, wie z. B. Geflügel und Schweinefleisch isoliert werden (Klare et al., 1995a, Klare et al., 1995b, Chadwick et al., 1996). Durch den Einsatz des Glycopeptidantibiotikums Avoparcin, das bis 1997 als Leistungsförderer in der Tiermast verwendet wurde, entstand in Schweine- und Geflügelmastbetrieben ein Reservoir für VRE. Für diese Bakterien konnte eine Kreuzresistenz zwischen Avoparcin und Vancomycin gezeigt werden. Somit wurden durch den Futtermittelzusatz Vancomycin-resistente Enterokokken selektiert (Bager et al., 1997, Klare et al., 1995b, Witte, 1997). Durch Pulsfeldgelelektrophorese-Analysen konnte für verschiedene VRE-Stämme eine polyklonale Natur nachgewiesen werden, was auf eine häufige Verbreitung des *vanA*-Genclusters zwischen verschiedenen Stämmen hindeutet (Klare et al., 1995a). Durch Transpositionsereignisse, wie z. B. durch die Integration eines IS-Elements in nicht-kodierende Regionen des *vanA*-Genclusters, entstehen verschiedene strukturelle Typen des *vanA*-Operons (Werner et al., 1997, v. d. Bogaard et al., 2002). *vanA*-Gencluster desselben Typs konnten sowohl in Isolaten aus Schlachtgeflügel, als auch bei landwirtschaftlichem Personal nachgewiesen werden (v. d. Bogaard et al., 2002). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass eine Übertragung der resistenten Enterokokken von den Tieren auf den

Menschen stattfindet. Da untersuchte Enterokokken-Isolate von Schlachtgeflügel und landwirtschaftlichem Personal genetisch unterschiedlich waren, erscheint hierbei ein konjugativer Transfer des VanA-Typs der Glycopeptidresistenz wahrscheinlich (v. d. Bogaard et al., 2002). Für FPL-resistente Enterokokken konnte im Gegensatz zu Avoparcin keine Kreuzresistenz zu den Glycopeptiden aus der Human-medicin nachgewiesen werden. Flavophospholipol induziert aber wie Vancomycin die Expression des *vanA*-Resistenz-Operons (Baptista et al., 1996, Grissom-Arnold et al., 1997, Handwerger et al., 1990, Lai et al., 1996).

Die ersten Hinweise für einen stimulierenden Effekt subinhibitorischer Antibiotika-Konzentrationen auf den Transfer entsprechender Resistenzdeterminanten ergaben Versuche mit einem konjugativen Transposon in *Bacteroides*. Es konnte gezeigt werden, dass durch geringe Tetrazyklin-Konzentrationen der Transfer der Tetrazyklin-Resistenzdeterminante *tetQ* mindestens um das 1000fache induziert wird (Roberts, 1996, Salyers and Shoemaker, 1996, Stevens et al., 1990). Eine zentrale Rolle bei der Aktivierung der Transferfunktionen spielt dabei ein System mit Homologie zu klassischen bakteriellen Zwei-Komponenten-Systemen, RteA und RteB. Die Zelloberflächenkomponente RteA misst Umweltsignale und überträgt nach Aktivierung einen Phosphatrest auf die zytoplasmatische Regulationskomponente RteB, die dadurch aktiviert wird und Genexpressionsfunktionen steuert. Beide Gene bilden mit der Resistenzdeterminante *tetQ* ein Operon. Die Aktivierung des *tetQ*-Promotors führt ebenfalls zur Expression von RteA und RteB, die in nachgeschalteten Regulationskaskaden den Selbsttransfer steuern (Li et al., 1995, Stevens et al., 1992, Stevens et al., 1993). Dieses Beispiel zeigt eindrucksvoll, wie ein Antibiotikum selbst die Verbreitung des spezifischen Resistenzgens kontrollieren kann.

In dieser Arbeit wurde untersucht, ob ein Zusammenhang zwischen der Induktion der Vancomycin-Resistenzgene durch FPL und Vancomycin und einer Veränderung der Transferrate der konjugativen VanA-Plasmide besteht. Es wurden *in vitro*-Filterkonjugationsexperimente mit *E. faecium* Donorstämmen unterschiedlichen Ursprungs durchgeführt. Die verwendeten Donoren stammen aus Abwasser und aus Schweinefaeces. Außerdem wurden Isolate aus der Klinik getestet. Die Donorstämme sind FPL-resistent (MHK >128 µg/ml) oder intermediär resistent (MHK 16 µg/ml) und tragen die *vanA*-Resistenzdeterminante (MHK >1024 µg/ml). Der *E. faecium* Rezipientenstamm ist

ebenfalls FPL-resistent, aber Vancomycin-sensitiv. Die Stämme sind nicht klonal miteinander verwandt, wie durch Pulsfeldgelelektrophorese-Analyse gezeigt werden konnte. Während des Konjugationsvorganges wurden die Bakterien mit FPL in verschiedenen Konzentrationen (0,05 µg/ml bis 16 µg/ml) inkubiert. Dieses Konzentrationsspektrum wurde ausgewählt, weil damit eine Induktion des *vanA*-Resistenz-Operons erreicht werden konnte (Allen und Hobbs, 1995, Grissom-Arnold et al., 1997, Handwerger et al., 1990, Lai und Kirsch, 1996). Grissom-Arnold et al. (1997) konnten eine Induktion des Vancomycin Resistenz-Operons bereits durch 0,06 µg/ml Flavophospholipol nachweisen, während bei Allen und Hobbs (1995) 10-40 µg/ml des Antibiotikums nötig waren, um das *vanA*-Operon zu induzieren. Das in dieser Arbeit getestete Konzentrationsspektrum entsprach auch den physiologischen FPL-Konzentrationen im Darm der Nutztiere, die bis zu 20 ppm betragen kann (R. Röpke, persönliche Information). Durch die Konjugationsexperimente konnte gezeigt werden, dass die Transferraten in allen sechs getesteten Stämmen durch FPL in Konzentrationen >1 µg/ml signifikant reduziert wurden. Die stärkste Inhibition war bei den Isolaten aus Schweinefaeces zu beobachten. Die Transferfrequenz der VanA-Plasmide reduzierte sich bei hohen Konzentrationen des Antibiotikums bis zu 70fach. Bei den untersuchten klinischen Isolaten dagegen war der VanA-Transfer nur um das acht- bis neunfache reduziert. Die Ergebnisse dieses Versuches zeigen, dass kein funktionaler Zusammenhang zwischen der Induktion des *vanA*-Operons durch FPL und der Transferrate der konjugativen VanA-Plasmide besteht.

Frühere Studien zeigten auch, dass FPL den Transfer bestimmter Resistenz-Plasmide in *E. coli* inhibiert (George et al., 1984, Lebek, 1972). Gram-negative Bakterien sind inhärent resistent gegen Flavophospholipol, da das Antibiotikum die äußere Membran nicht durchdringen kann. Die Hemmung des Transfers wurde auf eine erhöhte FPL-Empfindlichkeit der Enterobakterien mit Sex-Pili zurückgeführt. Es wurde spekuliert, dass FPL durch in die Zellwand eingelagerte Pilin-Vorstufen in die Bakterienzelle eindringen kann und somit deren Wachstum inhibiert (Watanabe et al., 1971). Kürzlich konnte auch durch *in vivo*-Experimente nachgewiesen werden, dass Flavophospholipol die intestinale Vermehrung und Verbreitung von multiresistenten *E. coli*-Stämmen in Masttieren signifikant verringert (v. d. Boogard 2002 a).

Die molekularen Ursachen des inhibitorischen Einflusses von Flavophospholipol auf den genetischen Transfer konnte noch nicht aufgeklärt werden. Möglicherweise inhibiert FPL

lytische Transglycosylasen auf konjugativen Plasmiden. Diese Enzyme katalysieren die Spaltung der  $\beta$ -1,4-glycosidischen Bindung zwischen N-Acetyl-Muraminsäure und N-Acetyl-Glucosamin der bakteriellen Mureinschicht. Die lytischen Transglycosylasen haben zusammen mit den Murein-synthetisierenden Enzymen bei gram-positiven und gram-negativen Bakterien wichtige Funktionen bei der Erhaltung der Integrität und Plastizität der Zellwand (Dijkstra und Keck, 1996, Holtje und Tuomanen, 1991). Es konnte gezeigt werden, dass lytische Transglycosylasen, die auf konjugativen Plasmiden kodiert sind, die Passage von Plasmid-DNS während des Konjugationsprozesses erleichtern (Bayer et al., 1995, Bayer et al., 2001, Koonin et al., 1994). Weiterhin ist bekannt, dass FPL bakterielle Transglycosylasen hemmt, die bei der Zellwandsynthese die Verknüpfung von N-Acetyl-Muraminsäure- und N-Acetyl-Glucosamin-Untereinheiten katalysieren (Hoskins et al., 1999, Mani et al., 1998). So konnte durch Affinitätschromatographie nachgewiesen werden, dass Flavophospholipol reversibel an die Transglycosylase-Untereinheit des bifunktionalen Penicillin-Bindeproteins 1b von *E. coli* bindet (Stembra et al., 2002). Flavophospholipol könnte durch Interaktion mit den plasmidkodierten lytischen Transglycosylasen den Transfer von konjugativen Plasmiden hemmen. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass FPL den Transfer der VanA-Plasmide sowohl in FPL-resistenten, als auch in intermediär resistenten *E. faecium*-Stämmen hemmt. FPL könnte durch Interaktion mit spezifischen Komponenten des Konjugationsapparates, wie den lytischen Transglycosylasen, den Transfer der konjugativen VanA-Plasmide hemmen. Vancomycin hingegen hat bei *E. faecium* keinen Einfluss auf den Transfer der VanA-Plasmide. Dieses Antibiotikum wirkt zwar auch als Inhibitor des Transglycosylierungsschrittes der Zellwandsynthese, aber nicht durch direkte Interaktion mit Transglycosylasen, sondern durch Bindung an den carboxy-terminalen D-Alanin Rest der Peptidoglycanvorläufer (Arthur et al., 1996a). Um weitere Hinweise auf die Hemmung des VanA-Plasmid-Transfers durch FPL zu bekommen, müssten Funktion und Struktur des Transferapparates der konjugativen VanA-Plasmide und die Interaktion zwischen FPL und den lytischen Transglycosylasen zukünftig untersucht werden.

Weiterhin wurde in dieser Arbeit der Effekt von Vancomycin auf die Übertragung von VanA-Plasmiden untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass Vancomycin keinen signifikanten Effekt auf die Transferraten der VanA-Plasmide hat. Selbst bei hohen Konzentrationen des Antibiotikums, die oberhalb der MHK des Rezipienten gegen Vancomycin liegen, war die Transferrate nicht signifikant verändert. Bei diesen hohen

Antibiotika-Konzentrationen konnte eine Verringerung der Anzahl der Rezipienten- und der Transkonjuganten-Kolonien beobachtet werden. Dies lässt darauf schließen, dass die Übertragung der VanA-Plasmide mit relativ hoher Frequenz auch bei Vancomycin-Konzentrationen stattfindet, die oberhalb der MHK des Rezipienten liegen. Es konnte gezeigt werden, dass unter Vancomycin Selektionsdruck eine Übertragung der VanA-Plasmide von einem Vancomycin-resistenten *E. faecium*-Stamm auf einen Vancomycin-sensitiven *E. faecium*-Stamm stattfindet.

Epidemiologische Studien zur Verbreitung von Vancomycin-resistenten Enterokokken in amerikanischen Krankenhäusern zeigten, dass VRE-Isolate in den USA im Allgemeinen polyklonalen Ursprungs sind. Dies deutet auf häufigen Transfer der *vanA*-Resistenzdeterminante zwischen Enterokokken-Stämmen hin. Einige nosokomiale Epidemien wurden auch auf monoklonale Verbreitung Vancomycin-resistenter Enterokokken zurückgeführt, andere waren oligoklonalen Ursprungs (Clark et al., 1993, Gold, 2001). Die Resistenzdeterminante kann auch von *E. faecium* auf andere Spezies übertragen werden. In einem Laborexperiment konnte der VanA-Transfer auf einen *S. aureus* Stamm nachgewiesen werden (Noble et al., 1992). Im Juli 2002 wurde in den USA das erste Vancomycin-resistente klinische *S. aureus*-Isolat (VRSA, MHK >128 µg/ml) beschrieben. Die *vanA*-Resistenzdeterminante konnte nachgewiesen werden, der Stamm ist außerdem Oxacillin-resistent (*mecA*). Da der Keim zusammen mit einem Vancomycin-resistenten *E. faecalis*-Stamm isoliert wurde, wird vermutet, dass die *vanA*-Resistenzdeterminante durch genetischen Transfer von *E. faecalis* auf *S. aureus* übertragen wurde (Sievert et al., 2002). Im Oktober 2002 wurde über das zweite dokumentierte klinische VRSA-Isolat berichtet. Dieser Stamm war ebenfalls Vancomycin resistent (MHK 32 µg/ml-64µg/ml). Neben der *vanA*-Determinante konnte auch hier das Oxacillin-Resistenzgen *mecA* nachgewiesen werden (Miller et al., 2002).

## 6.2 Untersuchungen zur Induktion des *vanA*-Operons

Die Gene des *vanA*-Operons vermitteln Resistenz gegen das Glycopeptidantibiotikum Vancomycin. Durch die Synthese von Peptidoglycanvorläufern, bei denen das endständige D-Alanin durch D-Lactat ersetzt ist, wird das Target des Antibiotikums verändert und die Bakterien werden somit resistent. Das *vanA*-Cluster umfasst die drei Gene *vanH*, *vanA* und *vanX*. Das Gen *vanH* kodiert für eine Dehydrogenase, die Pyruvat zu D-Lactat reduziert, *vanA* für eine Ligase, die D-Alanin mit D-Lactat verknüpft. Das Gen *vanX* kodiert für eine

D-D-Dipeptidase, welche schon geknüpfte D-Alanin-D-Alanin Bindungen hydrolysiert. Die Gene werden zusammen von dem Promotor  $P_H$  transkribiert (Arthur et al., 1992a, Bugg et al., 1991, Evers et al., 1996, Reynolds et al., 1994). Die Expression der Resistenzgene wird durch das Zwei-Komponenten-System VanRS reguliert. Es besteht aus einer membranständigen Sensor-Kinase VanS und einem cytoplasmatischen Response-Regulator VanR, der im phosphorylierten Zustand als transkriptionaler Aktivator des *vanA*-Operons dient (Arthur et al., 1992b, Evers et al., 1996). Die Natur des Stimulus, der durch den VanS-Sensor erkannt wird, ist noch unklar. Es konnte nicht nachgewiesen werden, ob die Signalerkennung durch eine direkte Interaktion eines spezifischen Liganden wie z. B. Vancomycin mit dem Sensor bedingt ist oder mehr unspezifisch durch die Anhäufung von Peptidoglycanvorläufern. Eine spezifische Interaktion mit dem Sensor-Protein müsste nicht bestehen, wenn die Signalerkennung auf eine physikalische Veränderung zurückzuführen ist, die durch Inhibition der Peptidoglycansynthese auf die Membran einwirkt (Ulijasz et al., 1996).

Die Induktion des *vanA*-Operons durch Glycopeptidantibiotika, Flavophospholipol und andere Antibiotika wurde von verschiedenen Arbeitsgruppen unter Verwendung unterschiedlicher Systeme und Nachweismethoden untersucht (Allen und Hobbs, 1995, Baptista et al., 1996, Grissom-Arnold et al., 1997, Handwerger et al., 1990, Lai und Kirsch, 1996). Die Arbeitsgruppen erzielten unter Verwendung verschiedener Reporter-gen-Konstrukte wie z. B. einer *vanA-cat*-Fusion (Lai und Kirsch, 1996), einer Promotor- $P_H$ -*lucA*-Fusion (Grissom-Arnold et al., 1997) oder durch chromatographische Messung der freien Pentadepsipeptide (Allen und Hobbs, 1995) zum Teil widersprüchliche Ergebnisse.

In dieser Arbeit wurde die Induktion des 39 kDa VanA-Ligase Proteins im *E. faecium* durch verschiedene Antibiotika, sowie Hitze- und osmotischen Stress immunologisch durch die Bindung eines spezifischen VanA-Ligase Antikörpers im Western Blot untersucht. Zunächst wurde der Einfluss verschiedener Zellwandsyntheseinhibitoren auf die Expression des VanA-Ligase Proteins im Stamm *E. faecium* 2E121198 getestet. Dabei wurden die Antibiotika in Konzentrationen von  $\frac{1}{4}$  MHK eingesetzt, um eine Membran-Dissorganisation, wie sie durch hohe Konzentrationen der Substanzen zustande kommen könnte, auszuschließen. Die Angriffspunkte der untersuchten Antibiotika im Peptidoglycansyntheseweg sind in Abbildung 22 dargestellt. D-Cycloserin und Fosfomycin, zwei Antibiotika, die die frühe Phase der Zellwandsynthese hemmen,

beeinflussten die Expression des VanA-Ligase Proteins in unterschiedlicher Weise. Während D-Cycloserin keinen Effekt zeigte, bewirkte Fosfomycin eine leichte Induktion der Expression der VanA-Ligase. Vancomycin, Flavophospholipol, Bacitracin und in geringerem Maße auch Tunicamycin induzierten die Expression des 39 kDa Proteins. Diese Antibiotika hemmen die späte Phase der Zellwandsynthese. Die stärksten Signale waren in den Proben zu erkennen, die mit Vancomycin und Flavophospholipol inkubiert waren (fünf- bzw. 4,5fache Induktion). Für FPL konnte eine Induktion des VanA-Ligase Proteins bereits bei einer Konzentration des Antibiotikums von 0,05 µg/ml nachgewiesen werden.

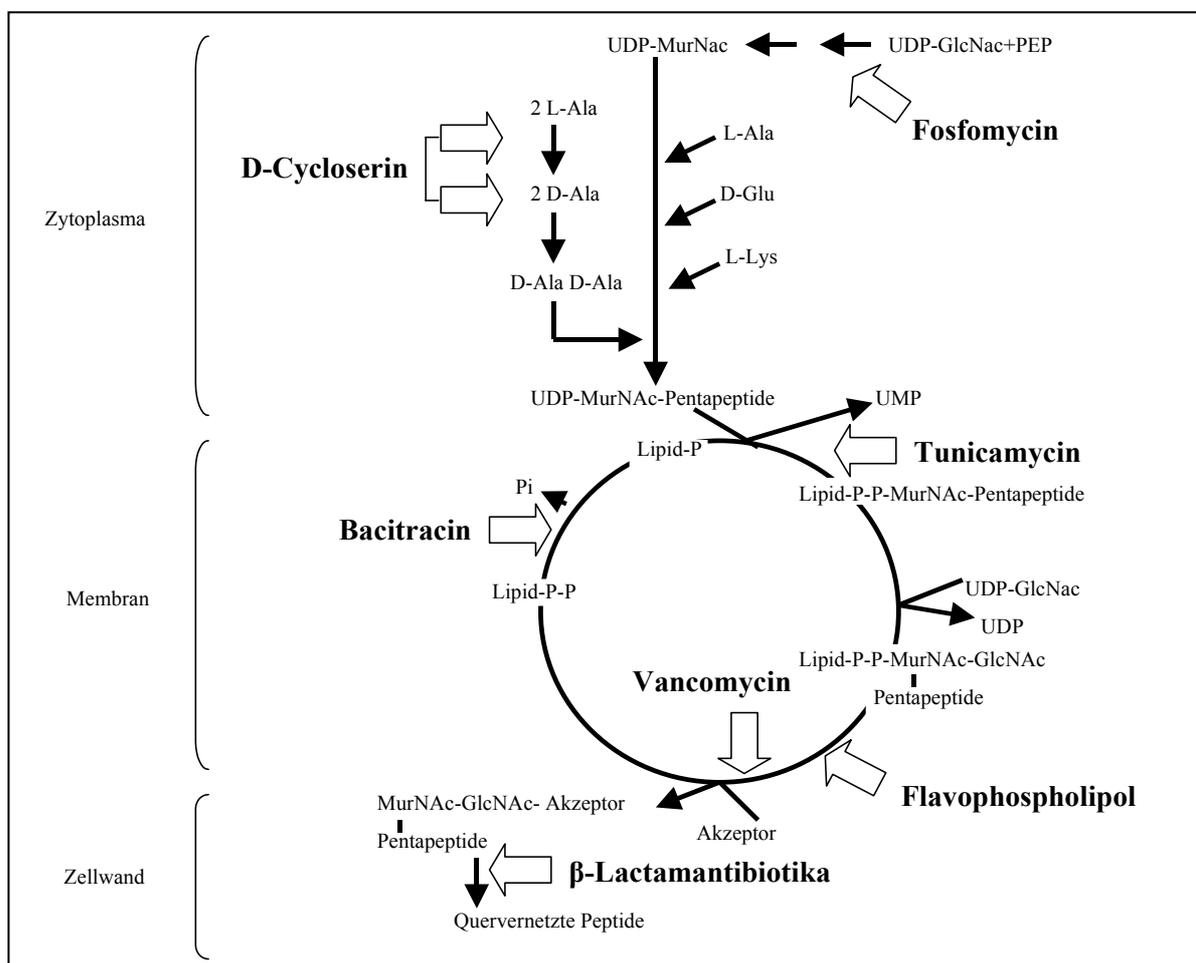


Abb. 22: Angriffspunkte der untersuchten Zellwandsyntheseinhibitoren im Peptidoglycansyntheseweg (modifiziert nach Grissom-Arnold et al., 1997). Abkürzungen: GlcNac = N-Acetyl-Glucosamin; MurNac = N-Acetyl-Muraminsäure; PEP = Phosphoenol-Pyruvat; Lipid-P = Undecaprenyl-Carrier (C55)

Auch Allen und Hobbs (1995), sowie Grissom-Arnold et al. (1997) konnten für Inhibitoren der späten Phase der Zellwandsynthese eine verstärkte Expression des *vanA*-Operons

nachweisen. Penicillin G war in dieser Arbeit kein Induktor. Allen und Hobbs beschrieben eine Induktion durch Penicillin G, bei Grissom-Arnold et al. bewirkte Penicillin G nur in Konzentrationen von 0,5-einfacher MHK eine verstärkte Expression des Promotors  $P_H$ . Ein gemeinsames Merkmal von Antibiotika, die die späte Phase der Zellwandsynthese inhibieren, ist die Akkumulation von UDP-N-Acetyl-Muraminsäure-N-Acetyl-Glucosamin-Pentapeptiden oder von den Undecaprenol-Carrier gebundenen Peptidoglycanvorläufern. Somit scheint eher die Akkumulation von Zellwandvorläufern als eine spezifische Interaktion des Antibiotikums mit dem VanS-Sensor Molekül für die Induktion verantwortlich zu sein (Allen und Hobbs, 1995 und Grissom-Arnold et al., 1997). In einer früheren Arbeit wirkten nur Glycopeptide und FPL induktiv auf das *vanA*-Resistenz-Operon (Handwerger und Kolokatis, 1990). Hier wurden photometrische Messungen zum Vergleich der Wachstumsrate eines Vancomycin-resistenten *E. faecium*-Stammes in Gegenwart von Vancomycin mit und ohne Vorinkubation mit Induktoren durchgeführt. Diese widersprüchlichen Daten könnten darauf zurückzuführen sein, dass bei der von Handwerger und Kolokatis (1990) verwendeten Technik eine leichte Induktion des *vanA*-Operons nicht nachgewiesen werden konnte, da eine „high-level“ Produktion von VanH, VanA und VanX nötig ist, um die Resistenz auszubilden (Baptista et al., 1996).

Weiterhin wurde der Einfluss der Cephalosporine Cefalexin, Cefuroxim, Ceftriaxon und Cefepim, des Carbapenemantibiotikums Meropenem, sowie von Clindamycin und Metronidazol auf die Expression des VanA-Ligase Proteins untersucht. Der getestete Stamm *E. faecium* 2E121198 ist gegen diese Antibiotika resistent. Aus verschiedenen klinischen Studien geht hervor, dass bei Patienten mit VRE im Darm nach Behandlung mit Cephalosporinen der II. und III. Generation, Clindamycin, sowie Metronidazol die Besiedlungsdichte mit Vancomycin-resistenten Enterokokken zunimmt (Donskey et al., 2000, Patterson, 2001, Tokars et al., 1999). Cephalosporine der III. Generation, Clindamycin und Metronidazol sind gegen Anaerobier wirksam. Es wird vermutet, dass durch eine Therapie mit diesen Antibiotika jene Bakterien am Wachstum gehindert werden, die mit den VRE um Nährstoffe oder um Platz zur Besiedlung konkurrieren. Resistente Enterokokken können sich daher bei einer spezifischen Chemotherapie gegen Anaerobier stark vermehren (Donskey et al., 2000). Wenn VRE in einer klinischen Einrichtung vorhanden sind, steigt die Infektionsrate mit diesen Erregern an und es besteht die Gefahr des Ausbruchs einer Epidemie (Bonilla et al., 1997, Morris et al., 1995).

In dieser Arbeit wurde untersucht, ob Antibiotika, die eine Besiedelung mit VRE begünstigen, auch einen Einfluss auf die Induktion des *vanA*-Operons haben. Für die Antibiotika Cefalexin (Cephalosporin der I. Generation), Cefuroxim (Cephalosporin der II. Generation), Meropenem und Clindamycin konnte im Western Blot eine leicht induzierte Expression des VanA-Ligase Proteins nachgewiesen werden. Auch Grissom-Arnold et al. (1997) konnten mittels einer Promotor- $P_H$ -*lucA*-Fusion für  $\beta$ -Lactamantibiotika, wie z. B. Ampicillin und Cefaclor in hohen Konzentrationen eine erhöhte Expression des *vanA*-Operons beobachten. In einer weiteren Studie (Lai und Kirsch, 1996) wurde der Einfluss von 6800 Antibiotika und anderer chemischer Verbindungen auf die VanA-Expression mittels einer *vanA-cat*-Fusion durch Chloramphenicol-Acetyltransferase-Analysen getestet. Hierbei konnte die Induktion des *vanA*-Operons durch weitere Antibiotika gezeigt werden. Dazu gehörten neben zellwandaktiven Substanzen wie Glycopeptide, FPL und Bacitracin in geringerem Maße auch membranaktive Antibiotika wie Polymyxin B und Moxidectin (Lai und Kirsch, 1996). Interessanterweise gehören die induktiven Antibiotika verschiedenen Stoffklassen an und zeigen keine strukturellen Homologien. Eine gemeinsame Eigenschaft aller induktiven Substanzen ist Hydrophobizität oder das Vorhandensein hydrophober Domänen. Dadurch könnten die Moleküle Einfluss auf die Integrität der Zytoplasmamembran ausüben (Lai und Kirsch, 1996). Dies könnte neben der Akkumulation von Peptidoglycan-Vorstufen, die durch die Wirkung zellwandaktiver Antibiotika hervorgerufen wird, als Signal für die *vanA*-Induktion dienen. Somit könnte direkt über Phosphorylierung des Sensors VanS, oder indirekt über „cross talk“ durch heterogene Kinasen, die vom Wirtsgenom kodiert werden, der Regulator VanR phosphoryliert werden. Die Aktivierung des VanR-Response-Regulators durch „cross talk“ kann in *E. faecalis* unabhängig von der Sensor-Kinase VanS erfolgen (Arthur et al., 1999, Baptista et al., 1999). Der Regulator aktiviert durch Bindung an den Promotor  $P_R$  die eigene Transkription, sowie die der Gene des *vanA*-Operons vom Promotor  $P_H$  (Arthur und Quintiliani, 2001). Da die Induktion des VanA-Ligase Proteins durch Fosfomycin, Cefalexin, Cefuroxim, Meropenem und Clindamycin sehr gering ist, ist es wahrscheinlich, dass der VanR Regulator unvollständig durch heterogene Kinasen aktiviert wird. Der Sensor VanS agiert nicht nur als Kinase, sondern im nicht induzierten Zustand als Phosphatase und somit als negativer Regulator für die VanR-kontrollierte Expression der Gene *vanH*, *vanA* und *vanX*. Eine weitere Möglichkeit der Induktion des *vanA*-Operons ist die direkte Interaktion des Antibiotikums mit dem Sensor. Dies scheint nur für Glycopeptide zuzutreffen. Eine starke Induktion durch Vancomycin, Teicoplanin und

Avoparcin konnte von verschiedenen Arbeitsgruppen nachgewiesen werden (Baptista et al., 1996, Grissom-Arnold et al., 1997, Lai und Kirsch, 1996). Getestet wurde auch der Einfluss von Glycopeptid-Derivaten mit sehr schwacher antimikrobieller Aktivität. Auch hierbei konnte eine starke Induktion des *vanA*-Operons nachgewiesen werden. Die Autoren vermuten daher, dass Glycopeptidstrukturen direkt mit der VanS Sensor-Kinase interagieren und somit die Expression der Resistenzgene induzieren (Grissom-Arnold et al., 1997).

In dieser Arbeit konnte die Induktion des *vanA*-Operons durch Vancomycin, FPL, Bacitracin und Tunicamycin in einem *E. faecium*-Stamm direkt durch Darstellung des VanA-Ligase Proteins im Western Blot nachgewiesen werden. Außerdem konnte gezeigt werden, dass die Antibiotika Fosfomycin, Cefalexin, Cefuroxim, Meropenem und Clindamycin eine geringe Zunahme der VanA-Ligase Expression bewirken. Die Antibiotika Cefuroxim und Clindamycin die in klinischen Studien eine Besiedelung mit VRE begünstigen, induzieren also auch eine Expression des *vanA*-Operons. Um die klinische Relevanz dieser Ergebnisse zu untersuchen, müssten weitere Studien zur Kolonisation mit VRE und zur Übertragung der VanA-Plasmide unter dem Selektionsdruck durch diese Antibiotika durchgeführt werden.

### **6.3 Transposonmutagenese zur Identifizierung der putativen FPL-Resistenz-determinante in *E. faecium***

*E. faecium*-Stämme, die in Hühnern und Schweinen als Kommensalen im Darm vorkommen, galten als intrinsisch resistent gegen Flavophospholipol (Butaye et al., 1998, Dutta et al., 1982). Aus neueren Studien wird jedoch ersichtlich, dass aus Schlachttieren vermehrt FPL-sensitive *E. faecium*-Stämme isoliert werden konnten (Aarestrup et al., 1998, DANMAP 1998, FEFANA 2000). Diese Beobachtungen deuten darauf hin, dass nicht alle *E. faecium*-Isolate intrinsisch resistent sind. Als Ursache könnten sekundäre Veränderungen in Strukturgenen stattgefunden haben, die den FPL-sensitiven Phänotyp bedingen. Diese FPL-sensitiven-Subpopulationen kommen vermehrt in Hühnern vor (Aarestrup et al., 1998, DANMAP 1998). Die Resistenzmuster der getesteten *E. faecium*-Stämme aus Schweden, wo keine Futtermittelzusätze verwendet werden, unterscheiden sich nicht signifikant von denen aus anderen EU Staaten (FEFANA 2000). Dies zeigt, dass die untersuchten FPL-resistenten-Stämme diese Resistenz auch ohne Selektionsdruck durch das Antibiotikum ausbilden und behalten. Diese neueren Daten deuten auf einen

spezifischen FPL-Resistenzmechanismus in *E. faecium* hin. Im Gegensatz zu *E. faecium*, gilt die verwandte Art *E. faecalis* als FPL-sensitiv (Devriese et al., 1996). In einigen Studien wurden vereinzelt FPL-resistente *E. faecalis*-Stämme beschrieben (Aarestrup et al., 1998, Kissel, 1998, McConville et al., 1999). Jedoch konnten einige dieser Isolate nach erneuter Charakterisierung nicht mehr der Art *E. faecalis* zugeordnet werden (Aarestrup, persönliche Mitteilung). Daher ist nicht geklärt, ob es tatsächlich FPL-resistente *E. faecalis*-Stämme gibt. Der Mechanismus der Resistenz gegen Flavophospholipol konnte noch nicht aufgeklärt werden.

In dieser Arbeit wurde daher zur Untersuchung der putativen FPL-Resistenzdeterminante eine Transposonmutagenese unter Verwendung des „broad-host-range“ konjugativen Transposons Tn916 durchgeführt (Jacob et al., 1974). Das Transposon wurde mittels Filterkonjugation von dem Donor *E. faecalis* JH2-2 auf den FPL<sup>r</sup>-Rezipienten *E. faecium* 64/3 übertragen. Von 2500 Transkonjuganten konnten sieben Mutanten isoliert werden, die nach der Transposoninsertion FPL-sensitiv geworden waren. Die Mutanten wurden durch biochemische und molekulargenetische Analysen als *E. faecium* bestätigt, um eine Kontamination mit *E. faecalis* JH2-2, dem Tn916 Donorstamm, auszuschließen. Die minimale Hemmkonzentration gegen FPL verändert sich von >128µg/ml im Stamm 64/3 auf 4 µg/ml in den Mutanten. Durch Southern Blot-Analysen konnte gezeigt werden, dass in den Mutanten jeweils eine Kopie von Tn916 inseriert war. Die Tn916 flankierenden Bereiche im Chromosom wurden mittels inverser PCR-Analysen untersucht. Hierbei konnte im „upstream“ Bereich des Transposons ein 2 kb großes Produkt amplifiziert werden. Vergleiche mit der Datenbank des *E. faecium* Sequenzierprojektes am „Doe Joint Genome Institute“ ergaben Homologie zu einem Bereich des „contig“ 1238. Die nachfolgende „Blast Search“ Analyse ergab, dass das Transposon 330 bp vor dem Stopcodon in das Gen für eine putative Threonyl-tRNA Synthetase inseriert war. „Downstream“ und in gleicher Orientierung folgen auf dem „contig“ 1238 die Gene für einen putativen Transkriptionsregulator, welcher auf Proteinebene zu 35% homolog zu einem putativen Transkriptionsregulator aus *Lactococcus lactis* ist, sowie für ein putatives Penicillin-Bindeprotein, mit 42% Homologie zum Penicillin-Bindeprotein 2B aus *Streptococcus pneumoniae*. Der chromosomale Bereich „downstream“ der Transposon-Insertionsstelle wurde in den Mutanten mittels PCR-Analysen überprüft. So konnte für den Stamm 64/3 ein 3,8 kb großes Fragment amplifiziert werden, welches in seiner Länge der Entfernung vom 3'-Ende des putativen Threonyl-tRNA Synthetase Gens, der Sequenz

direkt „downstream“ der Transposon-Insertionsstelle in den Mutanten bis zur Sequenz des gewählten Oligonukleotids im Gen für das putative Penicillin-Bindeprotein auf dem „contig“ 1238 entspricht. In den Mutanten ist dieses Produkt um 1,5 kb kleiner. Durch Sequenzierung dieser 2,3 kb großen PCR-Produkte in den Mutanten und deren „Alignment“ konnte gezeigt werden, dass alle Sequenzen genau 187 bp vor dem putativen Startcodon für das Penicillin-Bindeprotein Gen beginnen. Im Zusammenhang mit der Insertion des Transposons deletierte folglich in allen Mutanten ein 1,5 kb großer Bereich von der Insertionsstelle von Tn916 am 3'-Ende des putativen Threonyl-tRNA Synthetase Gens bis 187 bp vor dem Gen für das putative Penicillin-Bindeprotein. Der deletierte Bereich umfaßt das 3'-Ende des Gens für die putative Threonyl-tRNA Synthetase sowie den Genlocus für den putativen Transkriptionsregulator.

Weiterhin konnte durch die Sequenzierungs-Analysen gezeigt werden, dass die Insertionsstelle des Transposons und dessen Orientierung in allen untersuchten Transkonjuganten identisch ist. Da die Mutanten aus zwei unterschiedlichen Konjugationsversuchen stammten, ist ein klonales Phänomen, zumindest für zwei der Mutanten auszuschließen. Die Insertion von Tn916 erfolgt meist in AT-reiche Sequenzen (Clewell et al., 1995), wobei 5' der Insertionsstelle vermehrt Thymidine und 3' vermehrt Adenosine zu finden sind. Das Transposon inserierte im Gen für die putative Threonyl-tRNA Synthetase ebenfalls in AT-reiche Sequenzen, wie unter 8.1.2 dargestellt. An der Insertionsstelle des Transposons befindet sich im zirkulären Intermediat des Transposons ein 6 bp großer Bereich („coupling sequences“), welcher durch die Excision von Tn916 vom Donor stammt (Scott et al., 1994). In einigen Plasmiden, wie z.B. in pAD1 konnten „hot spots“ für die Tn916 Insertion identifiziert werden, bei denen das Transposon nach Mutagenese-Experimenten an der gleichen Stelle des Plasmids inserierte (Ike et al., 1992).

Der FPL-sensitive Phänotyp steht wahrscheinlich mit der Deletion des 1,5 kb chromosomalen Bereiches im Zusammenhang. Durch diese Deletion könnten verschiedene Faktoren betroffen sein. Die Sensitivität gegen FPL könnte durch den Verlust des 3'-Endes des Gens für die putative Threonyl-tRNA Synthetase, durch die Deletion des putativen Transkriptionsregulators oder durch Deletion wichtiger regulatorischer Elemente für die Transkription des Penicillin-Bindeprotein Gens bedingt sein. Um zu überprüfen, ob die Deletion am 3'-Ende des putativen Gens für die Threonyl-tRNA Synthetase einen Einfluss auf das Wachstumsverhalten der Mutanten hat, wurden Wachstumsexperimente in

chemisch definiertem Medium ohne die Aminosäure Threonin durchgeführt. Sowohl der Wildtyp als auch die Mutante 64/3-1 zeigten Wachstum. Folglich ist die Aminosäure Threonin nicht essentiell für *E. faecium*. Die Wachstumskurven des Stammes 64/3 und der Mutante unterschieden sich nicht signifikant voneinander. Die Wachstumsexperimente deuten darauf hin, dass die Funktion der putativen Threonyl-tRNA Synthetase in der Mutante 64/3-1 durch ein anderes Genprodukt kompensiert werden kann. Bis jetzt konnte im Rahmen des *E. faecium* Sequenzierprojektes am „Doe Joint Genome Institute“ nur ein putatives Threonyl-tRNA Synthetase kodierendes Gen identifiziert werden, welches 70%ige Homologie zu *thrS* aus *Bacillus subtilis* zeigt. Allerdings ist das *E. faecium* Genom noch nicht vollständig annotiert und die Funktion vieler Gene noch unbekannt. Für *B. subtilis* wurden die zwei unabhängigen Threonyl-tRNA Synthetase Gene *thrS* und *thrZ* beschrieben. Es konnte gezeigt werden, dass die Transkription von *thrZ* durch Threonin-Mangel oder durch reduzierte Konzentrationen der Haushalts-Threonyl-tRNA Synthetase ThrS induziert wird (Putzer et al., 1990, Putzer et al., 1992). Dennoch ist nicht auszuschließen, dass die Transposoninsertion am 3'-Ende des Threonyl-tRNA Synthetase Gens eine Beeinträchtigung der Funktion des Enzyms zur Folge hat. Dies könnte sich auf die Zellwandsynthese auswirken, da z. B. in konservierten Bereichen von Penicillin-Bindeproteinen sowie in Muramidasen häufig die Aminosäure Threonin identifiziert wurde (Buist et al., 1995, Goffin und Ghuysen, 1998). Threonyl-tRNA Synthetasen gehören zur Subklasse II a der Aminoacyl-tRNA Synthetasen und besitzen eine ca. 300 bp umfassende C-terminale Domäne, die an den Anticodon-Bereich der entsprechenden tRNA bindet (Moras, 1992). Für die Histidyl-tRNA Synthetase aus *E. coli*, ein weiteres Enzym der Subklasse II a, konnte gezeigt werden, dass nach Deletion der C-terminalen, Anticodon-bindenden Domäne die spezifische Aminoacylierungsreaktion katalysiert wurde, allerdings weniger effizient als vom vollständigen Enzym (Augustine und Francklyn, 1997). Auch die Deletion der Anticodon-bindenden Domäne der Tryptophanyl-tRNA Synthetase (Klasse I) aus *B. subtilis* resultierte in einer 80% Reduktion der Aminoacylierungsaktivität (Jia et al., 2002)

In einer lichtmikroskopischen Analyse, bei 400facher Vergrößerung konnte beobachtet werden, dass die Bakterienzellen des Stammes 64/3 als einzelne Zellen oder in kurzen Ketten vorlagen, wie es für *E. faecium* charakteristisch ist. In der Mutante 64/3-1 konnten auch längere Zellketten von bis zu acht Bakterien beobachtet werden, was auf eine unvollständige Trennung der Tochterzellen bei der Zellteilung hindeutet. Die

mikroskopische Beobachtung und die Veränderung der MHK gegen Ampicillin von 1 µg/ml im Stamm 64/3 auf 8 µg/ml in den Mutanten lässt auf eine Veränderung in der Expression der Penicillin-Bindeproteine (PBP) schließen, da verschiedenen Penicillin-Bindeproteine in *E. faecium* unterschiedlich starke Affinität zu β-Lactamantibiotika haben (Chen et al., 1987). Die Deletion des 1,5 kb großen Bereiches „upstream“ des putativen Penicillin-Bindeprotein Gens könnte dessen Expression durch den Verlust eines Regulators oder durch das Fehlen von regulatorischen Sequenzen beeinflussen. Der putative Regulator, der in den Mutanten nach dem Deletionsereignis fehlt, zeigt keine Homologie zu bekannten Regulatoren der Zellwandsynthese wie z. B. zum „penicillin-binding protein synthesis repressor“ (Psr). Der Regulator Psr wurde zuerst in *Enterococcus hirae* als negativer Regulator des PBP5 („low affinity“ PBP) beschrieben (Fontana et al., 1993). In neueren Studien in *E. faecium* konnte gezeigt werden, dass *psr* auch „upstream“ des Gens für das „low affinity“ PBP5 liegt, aber nicht als dessen Repressor agiert (Rice et al., 2001). Vielmehr fungiert er als globaler Regulator der Zellwandsynthese Gene (Massida et al., 1996). Das putative Penicillin-Bindeprotein des „contig“ 1238 ist auf Proteinebene zu 42% homolog zum Penicillin-Bindeprotein 2B aus *Streptococcus pneumoniae*. Hierbei handelt es sich um ein multimodulares Penicillin-Bindeprotein der Klasse B, Subklasse B5, mit noch unklarer Funktion (Goffin und Ghuysen 1998). Penicillin-Bindeprotein 2B ist in *Streptococcus pneumoniae* essentiell. Es ist nicht möglich, Deletionsmutanten zu isolieren (Kell et al., 1993).

Homologievergleiche mit der verwandten Art *E. faecalis* zeigten, dass auch in diesem Organismus „downstream“ eines Threonyl-tRNA Synthetase Gens, das auf Nukleotidebene zu 82% identisch zu dem in *E. faecium* ist, ein Penicillin-Bindeprotein Gen kodiert liegt. Dieses ist auf Proteinebene zu 54% homolog zu dem Gen für das Penicillin-Bindeprotein auf „contig“ 1238. Das Gen für den putativen Regulator fehlt hier. Zwischen den beiden Genen liegt ein Bereich von 168 bp, welcher keine Homologie zu „contig“ 1238 aufweist. Da die meisten *E. faecalis*-Stämme FPL-sensitiv sind, könnte der fehlende Regulatorbereich im Zusammenhang mit der FPL-Sensitivität in *E. faecalis* stehen. Jedoch führte eine Komplementation mit dem putativen Regulator aus *E. faecium* nicht zu einem FPL<sup>r</sup>-Phänotyp in *E. faecalis*.

In weiterführenden Experimenten wurden die Penicillin-Bindeproteine des Stammes *E. faecium* 64/3 mit [<sup>3</sup>H] Penicillin markiert. Dadurch konnten für den Stamm 64/3

fünf Protein-Banden dargestellt werden. Auch Williamson et al. beschrieben 1986 für 17 Enterokokken-Stämme ein Penicillin-Bindeprotein-Profil von fünf Banden (mit eins-fünf bezeichnet), wobei in einigen Stämmen ein zusätzliches Signal für PBP5 auftaucht, welches als PBP5\* bezeichnet wurde. PBP5 und PBP5\* sind an der Ausprägung der Resistenz gegen  $\beta$ -Lactamantibiotika beteiligt (Williamson et al., 1985). Bisher wurde in *E. faecium* nur das PBP5 näher untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass *E. faecium* durch die Produktion des „low affinity“ PBP5 gegen moderate Konzentrationen von Ampicillin intrinsisch resistent ist. Das Wachstum der Bakterien erfolgte bei Konzentrationen des Antibiotikums, bei denen alle anderen Penicillin-Bindeproteine inaktiviert wurden und somit PBP5 als einzige Transpeptidase für die Zellwandsynthese fungierte (Canepari et al., 1986; Williamson et al., 1985). Weiterhin wurde deutlich, dass in klinischen Isolaten die erworbene Resistenz gegen Ampicillin in höheren Konzentrationen durch eine gesteigerte Expression des PBP5 oder durch dessen verminderte Affinität zu dem  $\beta$ -Lactamantibiotikum erreicht wird (Fontana et al., 1983, Fontana et al., 1996, Klare et al., 1992a, Ligozzi et al., 1996, Rybkine et al., 1998, Zorzi et al., 1996). Sifaoui et al. (2001) führten kürzlich Experimente zum direkten Vergleich der Expression verschiedener PBP5 durch. Die Proteine stammen aus einigen klinischen Isolaten und haben eine unterschiedliche Ausprägung der Ampicillin Resistenz. Hierbei konnte gezeigt werden, dass Veränderungen in der Expression des PBP5 nicht allein für die Ausprägung der Hochresistenz gegen  $\beta$ -Lactame verantwortlich ist.

Weiterhin wurden die Penicillin-Bindeproteine des Stammes *E. faecium* 64/3 und der Mutante 64/3-1 vor der Markierung mit [<sup>3</sup>H] Penicillin mit FPL inkubiert. Dadurch sollten Informationen über den Einfluss von FPL auf die Bindung von Penicillin an die Penicillin-Bindeproteine erhalten werden. FPL bindet an bifunktionale „high molecular weight“ Penicillin-Bindeproteine, wie für das Penicillin-Bindeprotein 1b in *E. coli* und für das Penicillin-Bindeprotein 2a in *S. aureus* beschrieben wurde (Graves-Woodward und Pratt, 1999, Stembra et al., 2002). Außerdem inhibiert das Antibiotikum auch die Aktivität einer monofunktionalen Glycosyltransferase in *S. aureus* (Wang et al., 2001). Es konnte gezeigt werden, dass eine direkte Interaktion zwischen der Pentasaccharid Untereinheit des Antibiotikums und der Substrat-Erkennungsstelle des Transglycosylase-Moduls von PBP1b aus *E. coli* stattfindet (Stembra et al., 2002). Diese Bindung ist reversibel. Der nachfolgende Schritt der Transpeptidierung wird sterisch verhindert (Graves-Woodward und Pratt 1999).

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass FPL an PBP2 und PBP3 des Stammes 64/3 bindet und diese somit sowohl ein Transpeptidase-, als auch eine FPL-sensitive Transglycosylase-Untereinheit besitzen. Flavophospholipol scheint stärker mit PBP2 zu interagieren. PBP3 ist nach Inkubation mit FPL im Stamm 64/3 schwächer markiert, als die vergleichbare Bande ohne FPL-Vorbehandlung. Auch für *S. pneumoniae* konnte gezeigt werden, dass verschiedene Penicillin-Bindeproteine unterschiedlich starke Affinität zu Flavophospholipol haben (Hoskins et al., 1999, Paik et al., 1999). In der Mutante 64/3-1 sind die Banden für PBP2 und PBP3 nicht markiert. PBP4 ist hier nach Inkubation mit FPL auffallend stark markiert. In der FPL-sensitiven Mutante 64/3-1 findet also eine Veränderung im Expressionsmuster der Penicillin-Bindeproteine statt. Durch die Transposonmutagenese könnte ein wichtiger regulatorischer Bereich deletiert sein, der im Zusammenhang mit der Expression der Penicillin-Bindeproteine steht. Wie in der Northern Blot-Analyse deutlich wird, ist die Transkription des putativen Penicillin-Bindeproteins, dessen putatives Startcodon 187 bp „downstream“ des deletierten Bereiches liegt, in der Mutante 64/3-1 schwächer als im Stamm 64/3. Die geschätzte Größe des Proteins von ca. 79 kDa entspricht der Größe des PBP3. Die Verstärkung der Intensität des PBP4 in der Mutante 64/3-1 könnte mit einer verstärkten Expression dieses Proteins, als Kompensation des Verlustes der Aktivität der Penicillin-Bindeproteine PBP3 bzw. PBP2 im Zusammenhang stehen. Wie durch die radioaktive Markierung deutlich wird, bindet FPL in Stamm 64/3 an PBP2, so dass keine Markierung mit [<sup>3</sup>H] Penicillin mehr stattfinden kann. Dies deutet darauf hin, dass die Funktion dieses Proteins in Gegenwart von FPL *in vivo* durch andere Penicillin-Bindeproteine übernommen werden kann. In einem Organismus wirken verschiedene Glycosyl-Transferasen zusammen (Goffin und Ghuysen, 1998). So konnten für *E. coli* vier Enzyme mit Transglycosylaseaktivität beschrieben werden. Die „high molecular weight“- Penicillin-Bindeproteine 1a, 1b, 1c und die monofunktionale Glycosyltransferase (Mgt). Es konnte gezeigt werden, dass nicht alle diese Enzyme essentiell sind. So müssen in *E. coli* die Penicillin-Bindeproteine 1a und 1b vorhanden sein, wohingegen das PBP1c und Mgt nicht essentiell sind (Denome et al., 1999, Di Berardino et al., 1996, Spratt, 1983, Suzuki et al., 1978). In *S. pneumoniae* wurden ebenfalls vier Glycosyl-Transferasen beschrieben. Die „high molecular weight“- Penicillin-Bindeproteine 1a, 1b, 2a und die monofunktionale Glycosyltransferase (Mgt), wobei nur die gemeinsame Expression von PBP1a und PBP2a für die Zelle essentiell ist (Hoskins et al., 1999, Paik et al., 1999). Um Informationen über den genetischen Ursprung der FPL Sensitivität in der *E. faecium* Mutante 64/3-1 auf molekularer Ebene zu

bekommen muss ein geeignetes Vektorsystem gefunden werden, mit dem der FPL<sup>s</sup> Phänotyp komplementiert werden kann. Mit den zur Verfügung stehenden „Shuttle“-Vektoren war es bisher nicht möglich, *E. faecium* zu transformieren. Auch die vollständige Annotation des vom „Doe Joint Genome Institute“ durchgeführten *E. faecium* Sequenzierprojektes könnte weiteren Aufschluss über die Klassifizierung, die Funktion und die Regulation der Penicillin-Bindeproteine geben.

Die möglichen Unterschiede in der Sequenz des putativen Regulators und des Penicillin-Bindeproteins wurden in einem FPL<sup>r</sup>/FPL<sup>s</sup> Stammpaar direkt durch Sequenz-Analysen untersucht. Das Stammpaar, das von M. Mc Conville (Inversek Research, Schottland) zur Verfügung gestellt wurde, war als FPL<sup>r</sup> *E. faecium* isoliert worden. Derselbe Stamm wurde vier Jahre später als FPL<sup>s</sup> getestet. Ein 4,1 kb großer Bereich vom 3'-Ende des Gens für die putative Threonyl-tRNA Synthetase bis 115 bp „downstream“ des putativen Stopcodons des Penicillin-Bindeprotein Gens wurde jeweils sequenziert und miteinander verglichen. Dabei konnten keine Unterschiede in der Sequenz des Stammpaares festgestellt werden. In diesem Fall steht weder ein deletierter Sequenzbereich noch ein Basenaustausch im putativen Regulatorbereich oder im putativen Penicillin-Bindeprotein im Zusammenhang mit dem Verlust der Resistenz gegen Flavophospholipol. Im Pulsfeldgel wurde eine Divergenz zweier Banden des Stammpaares deutlich. Diese Veränderung könnte durch ein chromosomales Rearrangement eventuell im Zusammenhang mit einem Deletionsereignis bedingt sein. Bei diesem Stammpaar könnte der Switch von der FPL-Resistenz zur Sensitivität durch den Verlust anderer chromosomaler Bereiche als in der Mutante 64/3-1 entstanden sein.

#### **6.4 Versuche zur Übertragbarkeit der FPL-Resistenzdeterminante zwischen FPL-resistenten und FPL-sensitiven *E. faecium*-Stämmen**

Falls in *E. faecium* eine putative FPL-Resistenzdeterminante auf konjugativen Plasmiden oder mit konjugativen Transposons assoziiert vorliegt, könnte die FPL-Resistenz auf andere Bakterien, wie z. B. *E. faecalis* übertragen werden. In dieser Arbeit wurde die Möglichkeit des Transfers der FPL-Resistenz von 15 verschiedenen FPL-resistenten *E. faecium* Donorstämmen auf zwei FPL-sensitive *E. faecium* Rezipienten durch *in vitro*-Filterkonjugation überprüft. Mittels dieser Methode konnte kein Transfer der FPL-Resistenz nachgewiesen werden. Wahrscheinlich ist die putative FPL Resistenzdeterminante, wie in der vorangegangenen Transposonmutagenese-Untersuchung gezeigt,

---

chromosomal kodiert und kann somit nicht konjugativ übertragen werden. Weiterhin könnte Inkompatibilität zwischen den untersuchten Donor- und Rezipientenstämmen die konjugative Übertragung von Plasmiden verhindern. Als weitere limitierende Ursache kommt die Methode der *in vitro*-Filterkonjugation selbst in Betracht. Um die Übertragbarkeit der putativen FPL-Resistenzdeterminante *in vivo* zu testen, müssten Versuche mit Nutztieren angeschlossen werden, denen FPL als Futterzusatz verabreicht wird.

## 7. Literatur

- Aarestrup, F. M., F. Bager, N. E. Jensen, M. Madsen, A. Meyling, and H. C. Wegener.** 1998. Surveillance of antimicrobial resistance in bacteria isolated from food animals to antimicrobial growth promoters and related therapeutic agents in Denmark. *APIMS*. **106**:606-622.
- Aarestrup F. M., A. M. Seyfarth, H.-D. Emborg, K. Pedersen, R. S. Hendriksen, and F. Bager.** 2001. Effect of abolishment of the use of antimicrobial agents for growth promotion on occurrence of antimicrobial resistance in fecal enterococci from food animals in Denmark. *Antimicrob. Agents Chemother.* **45**:2054-2059
- Allen, N. E., and J. N. Hobbs Jr.** 1995. Induction of vancomycin resistance in *Enterococcus faecium* by non-glycopeptide antibiotics. *FEMS Microbiol. Lett.* **132**:107-114
- Altschul, S. F., T. L. Madden, A. A. Schäffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller, and D. J. Lipman.** 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* **25**:3389-3402
- Arthur, M., C. Molinas, T. D. H. Bugg, G. D. Wright, C. T. Walsh, and P. Courvalin.** 1992a. Evidence for in vivo incorporation of D-lactate into peptidoglycan precursors of vancomycin-resistant enterococci. *Antimicrob. Agents Chemother.* **36**:867-869
- Arthur, M., C. Molinas, and P. Courvalin.** 1992b. The VanS-VanR two-component regulatory system controls synthesis of depsipeptide peptidoglycan precursors in *Enterococcus faecium* BM4147. *J. Bacteriol.* **174**:2582-2591
- Arthur, M., C. Molinas, F. Depardieu, and P. Courvalin.** 1993. Characterization of Tn1546, a Tn3-related transposon conferring glycopeptide resistance by synthesis of depsipeptide peptidoglycan precursors in *Enterococcus faecium* BM4147. *J. Bacteriol.* **175**:117-127
- Arthur, M., F. Depardieu, C. Molinas, and P. Courvalin.** 1995. The *vanZ* gene of Tn1546 from *Enterococcus faecium* BM 4147 confers resistance to teicoplanin. *Gene.* **154**:87-92
- Arthur, M., F. Depardieu, P. Reynolds, and P. Courvalin.** 1996a. Quantitative analysis of the metabolism of soluble cytoplasmic peptidoglycan precursors of glycopeptide-resistant enterococci. *Mol. Microbiol.* **21**:33-44
- Arthur, M., P. Reynolds, and P. Courvalin.** 1996b. Glycopeptide resistance in enterococci. *Trends Microbiol.* **10**:401-407.
- Arthur, M., F. Depardieu, L. Cabanie, R. Reynolds, and P. Courvalin.** 1998. Requirement of the VanY and VanX D, D-Dipeptidase for glycopeptide resistance in enterococci. *Mol. Microbiol.* **30**:819-830

- Arthur, M., and R. Quintiliani.** 2001. Regulation of VanA- and VanB-type glycopeptide resistance in enterococci. *45*:375-381
- Augustine, J., and C. Francklyn.** 1997. Design of an active fragment of class II aminoacyl-tRNA synthetases and its significance for synthetase evolution. *Biochemistry.* **36**:3473-3482
- Bager, F., M. Madsen, J. Christensen, and F. M. Aarestrup.** 1997. Avoparcin used as a growth promoter is associated with occurrence of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* on Danish poultry and pig farms. *Prev. Vet. Med.* **31**:95-112
- Baizman, E. R., A. A. Branstrom, C. B. Longley, N. Allanson, M. J. Sofia, D. Gange, and R. Goldman.** 2000. Antibacterial activity of synthetic analogues based on the disaccharid structure of moenomycin, an inhibitor of bacterial transglycosylase. *Microbiology* **146**:3129-3140
- Baldassarri, L., L., Bertuccini, M. G. Ammendolia, G. Gherardi, and R. Creti.** 2001. Variant *esp* gene in vancomycin-sensitive *Enterococcus faecium*. *Lancet* **357**:1802
- Baptista, M., F. Depardieu, P. Courvalin, and M. Arthur.** 1996. Specificity of induction of glycopeptide resistance genes in *Enterococcus faecalis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **40**:2291-2295.
- Baptista, M., P. Rodrigues, F. Depardieu, P. Courvalin, and M. Arthur.** 1999. Single cell analysis of glycopeptide resistance gene expression in teicoplanin-resistant mutants of VanB-type *Enterococcus faecalis*. *Mol. Microbiol.* **32**:17-28
- Bayer, M., R. Eferl, G. Zellnig, K. Teferle, A. Dijkstra, G. Koraimann, and G. Hogenauer.** 1995. Gene 19 of plasmid R1 is required for both efficient conjugative DNA transfer and bacteriophage R17 infection. *J. Bacteriol.* **177**:4279-4288.
- Bayer, M., R. Iberer, K. Bischof, E. Rassi, E. Stabentheiner, G. Zelling, and G. Koraimann.** 2001. Functional and mutational analysis of P19, a DNA transfer protein with muramidase activity. *J. Bacteriol.* **183**:3176-3183
- Beezhold, D. W., S. Slaughter, M. K. Hayden, M. Matushek, C. Nathan, G. M. Trenholme, and R. A. Weinstein.** 1997. Skin colonization with vancomycin-resistant Enterococci among hospitalized patients with bacteremia. *Clin. Infect. Dis.* **24**:704-706
- Bonilla H. F., M. A. Zervos, and M. J. Lyons.** 1997. Colonization with vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*: comparison of a long-term care unit with an acute-care hospital. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* **18**:333-339
- Bonten, M. J., M. K. Hayden, C. Nathan, J. van Voorhuis, M. Matushek, S. Slaughter, T. Rice, and R. A. Weinstein.** 1996. Epidemiology of colonization of patients and environment with vancomycin-resistant enterococci. *Lancet.* **348**:1615-1619

- Brisson-Noël, A., S. Dutka-Malen, and C. Molinas, R. Leclercq, and P. Courvalin.** 1990. Cloning and heterospecific expression of the resistance determinant *vanA* encoding high-level resistance to glycopeptides in *Enterococcus faecium* BM4147. *Antimicrob. Agents Chemother.* **34**:924-927
- Brückner, R.** 1992. A series of shuttle vectors for *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli*. *Gene* **122**:187-192
- Bugg, T. D. H., G. D. Wright, S. Dutka-Malen, M. Arthur, P. Courvalin, and C. T. Walsh.** 1991. Molecular basis for vancomycin resistance in *Enterococcus faecium* BM4147: biosynthesis of a depsipeptide peptidoglycan precursor by vancomycin resistance proteins VanH and VanA. *Biochemistry* **30**:10408-10415
- Bugg, T. D. H.** 1999. In: *Comprehensive Natural Products Chemistry*, Vol. 3 (Eds: D. Barton, K. Nakanishi), Elsevier, Amsterdam, p. 241
- Buist, G., J. Kok, K. J. Leenhouts, M. Dabrowska, G. Venema, and A. J. Haandrikmann.** 1995. Molecular cloning and nucleotide sequence of the gene encoding the major peptidoglycan hydrolase of *Lactococcus lactis*, a muramidase needed for cell separation. *J. Bacteriol.* **177**:1554-1563
- Butaye, P., L. A. Devriese, and F. Haesebrouck.** 1998. Effects of different test conditions on MIC of food animal growth-promoting antibacterial agents for enterococci. *J. Clin. Microbiol.* **36**:1907-19011
- Callegan, M. C., M. C. Booth, B. D. Jett, and M. S. Gilmore.** 1999. Pathogenesis of gram-positive bacterial endophthalmitis. *Infect. Immun.* **67**:3348-3356
- Canepari, P., M. M. Lloe, G. Cornaglia, R. Fontana, and G. Satta.** 1986. In *Streptococcus faecium* penicillin-binding protein 5 alone is sufficient for cell growth at sub-maximal but not maximal rate. *J. Gen. Microbiol.* **132**:625-631
- Chadwick R. P., N. Woodford, R. A. Banell, and B. A. Oppenheim.** 1996. Glycopeptid-resistant enterococci isolated from uncooked meat. *J. Antimicrob. Chemother.* **38**:908-909
- Chen, H. Y., and J. D. Williams.** 1987. Penicillin-binding proteins in *Streptococcus faecalis* and *S. faecium*. *J. Med. Microbiol.* **23**:141-147
- Chow, J. W., L. A. Thal, M. B. Perri, J. A. Vazquez, S. M. Donabedian, D. B. Clewell, and M. J. Zervos.** 1993. Plasmid-associated hemolysin and aggregation substance production contribute to virulence in experimental enterococcal endocarditis. *Antimicrob. Agents Chemother.* **37**:2474-2477

- Clark, N. C., R. C. Cooksey, B. C. Hill, J. M. Swenson, and F. C. Tenover.** Characterization of glycopeptide-resistant enterococci from U.S. hospitals. *Antimicrob. Agents Chemother.* **37**:2311-2317
- Clewell, D. B.** 1993. Bacterial sex pheromone-induced plasmid-transfer. *Cell* **73**:9-12
- Clewell, D. B., S. E. Flannagan, and D. D. Jaworski.** 1995. Unconstrained bacterial promiscuity: the Tn916-Tn1545 family of conjugative transposons. *Trends Microbiol.* **3**:229-235
- Costa Y., M. Galimand, R. Leclercq, J. Duval, and P. Courvalin.** 1993. Characterization of the chromosomal *aac(6')-Ii* gene specific for *Enterococcus faecium*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **37**:1896-1903
- Cruz-Rodz, A. L., and M. S. Gilmore.** 1990. High efficiency introduction of plasmid DNA into glycine treated *Enterococcus faecalis* by electroporation. *Mol. Gen. Genet.* **224**:152-154
- DANMAP 98.** Consumption of antimicrobial agents and occurrence of antimicrobial resistance in bacteria from food animals, food and humans in Denmark.
- Denome, S. A., P. K. Elf, T. A. Henderson, D. E. Nelson, and K. D. Young.** 1999. *Escherichia coli* mutants lacking all possible combinations of eight penicillin-binding proteins: viability, characteristics, and implications for peptidoglycan synthesis. *J. Bacteriol.* **181**:3981-3993
- Devriese L. A., M. D. Collins, and R. Wirth.** The genus *Enterococcus*; in Balows A., Trüper H. G., Dworkin M., Harder W., Schleifer K. H. (eds): the Prokaryotes. A Handbook on the Biology of Bacteria: Ecophysiology, Isolation, Identification, Applications. New York, Springer, 1992, vol 2, pp 1465-1481
- Devriese, L. A., B. Pot, and M.D. Collins.** 1993. Phenotypic identification of the genus *Enterococcus* and differentiation of phylogenetically distinct enterococcal species and species groups. *J. Appl. Bacteriol.* **75**:399-408
- Devriese, L. A., and F. Haesebrouck.** 1996. Susceptibility of enterococci and intestinal streptococci from pigs to the growth-enhancing antibiotics Flavomycin and Avoparcin. Proc. Of the 14<sup>th</sup> IPVS Congress, Bologna, Italy, 7-10 July 1996.
- Di Bernardino, M., A. Dijkstra, D. Stüber, W. Keck, and M. Gubler.** 1996. The monofunctional glycosyltransferases of *Escherichia coli* is a member of a new class of peptidoglycan-synthesizing enzymes. Overexpression and determination of the glycan-polymerizing activity. *FEBS Lett.* **392**:184-188
- Dijkstra A. J., and W. Keck.** 1996. Peptidoglycan as a barrier to transenvelope transport. *J. Bacteriol.* **178**:5555-5562

- Donskey, C. J., M. D., T. K. Chowdhry, M. D., M. T. Hecker, M. D., C. K. Hoyer, M. D., Dutka-Malen, S., C. Molinas, M. Arthur, and P. Courvalin.** 1990. The VANA glycopeptide resistance protein is related to D-alanyl:D-alanine ligase cell wall biosynthesis enzymes. *Mol. Gen. Genet.* **224**:364-372
- Dutka-Malen, S., S. Evers, and P. Courvalin.** 1995. Detection of glycopeptide resistance genotypes and identification to the species level of clinically relevant enterococci by PCR. *J. Clin. Microbiol.* **33**:24-27
- Dutta, G. N., and L. A. Devriese.** 1982. Susceptibility of fecal streptococci of poultry origin to nine growth-promoting agents. *Appl. Environm. Microbiol.* **44**:832-837
- Dutta, G. N. and L. A. Devriese.** 1984. Observations on the in vitro sensitivity and resistance of Gram positive intestinal bacteria of farm animals to growth promoting antimicrobial agents. *J. Appl. Bacteriol.* **56**:117-123
- Eaton, T. J., and M. J. Gasson.** 2001. Molecular screening of *Enterococcus* virulence determinants and potential for genetic exchange between food and medical isolates. *Appl. Environm. Microbiol.* **67**:1628-1635
- Euzéby, J. P.** Jan.1998, last update: Nov. 2002. List of bacterial names with standing in nomenclature. <http://www.bacterio.cict.fr/e/enterococcus.html>. Society for systematic and veterinary bacteriology. Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, France.
- Evers, S., R. Quintiliani Jr., and P. Courvalin.** 1996 Genetics of glycopeptide resistance in enterococci. *Microb. Drug Resist.* **2**:219-223.
- Facklam, R. R., and M. D. Collins.** 1989. Identification of enterococcus species isolated from human infections by a conventional test scheme. *J. Clin. Microbiol.* **27**:731-734
- FEFANA 2000.** European Federation Of Animal Feed Additive Manufacturers.
- Fehlhaber, H.-W., M. Girg, G. Seibert, K. Hobert, P. Welzel, Y. van Heijenoort, and J. van Heijenoort.** 1990. A structural revision and new structure-activity relations. *Tetrahedron* **46**:1557-1568
- Fines, M., B. Perichon, P. E. Reynolds, D. F. Sahn, and P. Courvalin.** VanE, a new type of acquired glycopeptide resistance in *Enterococcus faecalis* BM4405. *Antimicrob. Agents Chemother.* **43**:2161-2164
- Flannagan, S. E., L. A. Zitzow, Y. A. Su, and D. B. Clewell.** 1994. Nucleotide sequence of the 18 kb conjugative transposon Tn916 from *Enterococcus faecalis*. *Plasmid* **32**:350-354
- Fontana, R., R. Cerini, P. Longoni, A. Grossato, and P. Canepari.** 1983. Identification of a streptococcal penicillin-binding protein that reacts very slowly with penicillin. *J. Bacteriol.* **155**:1343-1350

- Fontana, R., M. Ligozzi, F. Pittaluga, and G. Satta.** 1996. Intrinsic penicillin resistance in enterococci. *Microb. Drug. Resist.* **2**:209-213
- Francia, M. V., W. Haas, R. Wirth, E. Samberger, A. Muscholl-Silberhorn, M. S. Gilmore, Y. Ike, K. F. Weaver, and D. B. Clewell.** 2001. Completion of the nucleotide sequence of the *Enterococcus faecalis* conjugative virulence plasmid pAD1 and identification of a second transfer origin. *Plasmid.* **46**:117-127
- Franz, C. M. A. P., A. B. Muscholl-Silberhorn, N. M. K. Yousif, M. Vancanneyt, J. Swings, and W. H. Holzapfel.** 2001. Incidence of virulence factors and antibiotic resistance among Enterococci isolated from food. *Appl. Environm. Microbiol.* **67**:4385-4389
- Fridkin, S. K., and R. P. Gaynes.** 1999. Antimicrobial resistance in intensive care units. *Clin. Chest. Med.* **20**:303-316, viii.
- Friesenegger, A., S. Fiedler, L. A. Devriese, and R. Wirth.** 1991. Genetic transformation of various species of *Enterococcus* by electroporation. *FEMS Microbiol. Lett.* **79**:323-328
- George, B. A., and D. J. Fagerberg.** 1984. Effect of bambamycin, in vitro, on plasmid-mediated antimicrobial resistance. *Am J. Vet. Res.* **45**:2336-2341.
- Gilmore, M., R. Segarra, M. Booth, C. Bogie, L. Hall, and C. Clewell.** 1994. Genetic structure of the *Enterococcus faecalis* plasmid pAD1-encoded cytolytic toxin system and its relationship to antibiotic determinants. *J. Bacteriol.* **176**:7335-7344
- Goffin, C., and J.-M. Ghuysen.** 1998. Multimodular penicillin-binding proteins: an enigmatic family of orthologs and paralogs. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62**:1079-1093
- Gold, H. S., and R. C. Moellring Jr.** 1996. Antimicrobial drug resistance. *N. Engl. J. Med.* **335**:1445-1453
- Gold, H. S.** 2001. Vancomycin-resistant enterococci: mechanisms and clinical observations. *Clin. Infect. Dis.* **33**:210-219
- Goldman, R. C., and D. Gange.** 2000. Inhibition of transglycosylation involved in bacterial peptidoglycan synthesis. *Curr. Med. Chem.* **7**:801-820
- Graves-Woodward, K., and R. F. Pratt.** 1999. Interactions of soluble penicillin-binding protein 2a of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with Moenomycin. **38**:19533-10542
- Grissom-Arnold, J., W. E. Alborn, T. I. Nicas, and S. R. Jaskunas.** 1997. Induction of VanA vancomycin resistance genes in *Enterococcus faecalis*: use of a promoter fusion to evaluate glycopeptide and nonglycopeptide induction signals. *Microb. Drug Resist.* **3**:53-64.
- Hacker, J., and J. B. Kaper.** 2000. Pathogenicity islands and the evolution of microbes. *Annu. Rev. Microbiol.* **54**:641-679

- Haima, P., D. v. Sinderen, H. Schotting, S. Bron, and G. Venema.** 1990. Development of a  $\beta$ -Galactosidase  $\alpha$ -complementation system for molecular cloning in *Bacillus subtilis*. *Gene* **86**:63-69
- Handwerger, S., and A. Kolokathis.** 1990. Induction of vancomycin resistance in *Enterococcus faecium* by inhibition of transglycosylation. *FEMS Microbiol. Lett.* **58**:167-170.
- Hanrahan, J. A., A. M. Hujer, R. A. Hutton-Thomas, C. C. Whalen, R. A. Bonomo, and L. B. Rice.** 2000. Effect of antibiotic therapy on the density of vancomycin-resistant enterococci in the stool of colonized patients. *N. Engl. J. Med.* **343**:1925-32
- Harbarth, S., W. Albrich, D. A. Goldmann, and J. Huebner.** 2001. Control of multiply resistant cocci: do international comparisons help? *Lancet Infect. Dis.* **4**:251-261
- Heaton, M. P., L. F. Discotto, M. J. Pucci, and S. Handwerger.** 1996. Mobilization of vancomycin resistance by transposon-mediated fusion of a VanA plasmid with an *Enterococcus faecium* sex pheromone-response plasmid. *Gene.* **171**:9-17
- Holtje J. V., and E. I. Tuomanen.** 1991. The murein hydrolases of *Escherichia coli*: properties, functions and impact on the course of infections in vivo. *J. Gen. Microbiol.* **137**:441-454
- Hoskins, J., P. Matsushima, D. L. Mullen, J. Tang, G. Zhao, T. I. Meier, T. I. Nicas, and S. R. Jaskunas.** 1999. Gene disruption studies of penicillin-binding proteins 1a, 1b, and 2a in *Streptococcus pneumoniae*. *J. Bacteriol.* **181**:6552-6555
- Hospital Infections Program.** 1999. National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) System report, data summary from January 1990-May 1999, issued June 1999. *Am. J. Infect. Control* **27**:520-532
- Huber, G.** 1979. Moenomycin and related phosphorus-containing antibiotics. *Antibiotics* **5**:135-153
- Huycke, M. M., C. A. Spiegel, and M. S. Gilmore.** 1991. Bacteremia caused by hemolytic, high-level gentamicin-resistant *Enterococcus faecalis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **35**:1626-1634
- Ike, Y., S. E. Flannagan, and D. B. Clewell.** 1992. Hyperhemolytic phenomena associated with insertions of Tn916 into the hemolysin determinant of *Enterococcus faecalis* plasmid pAD1. *J. Bacteriol.* **174**:1801-1809
- Jacob, A. E., and S. J. Hobbs.** 1974. Conjugal transfer of plasmid-borne multiple antibiotic resistance in *Streptococcus faecalis* var. *zymogenes*. *J. Bacteriol.* **117**:360-372

- Jaskunas, S. R.** 1999. Gene disruption studies of penicillin-binding proteins 1a, 1b, and 2a in *Streptococcus pneumoniae*. J. Bacteriol. **181**:6552-6555
- Jett, B. D., M. Huycke, and M. Gilmore.** 1994. Virulence of enterococci. Clin. Microbiol. Rev. **7**:462-478
- Jett, B. D., H. G. Jensen, R. V. Atkuri, and M. S. Gilmore.** 1995. Evaluation of therapeutic measures for treating endophthalmitis caused by isogenic toxin-producing and toxin-nonproducing *Enterococcus faecalis* strains. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. **36**:9-16
- Jia, J., F. Xu, X. Chen, L. Chen, Y. Jin, and D. T. P. Wang.** 2002. Two essential regions for recognition in *Bacillus subtilis* tryptophanyl-tRNA synthetase. Biochem. **365**:749-756
- Kell, C. M., U. K. Sharma, C. G. Dowson, C. Town, T. S. Balganes, and B. G. Spratt.** 1993. Deletion analysis of the essentiality of penicillin-binding proteins 1A, 2B and 2X of *Streptococcus pneumoniae*. FEMS Microbiol. Lett. **106**:171-175
- Kissel, A.** 1998. In vitro efficiency of salinomycin sodium and flavophospholipol against bacterial isolates from the gastrointestinal tract of different target species. Hoechst Roussel Vet. Report.
- Klare, I., A. C. Rodloff, J. Wagner, W. Witte, and R. Hakenbeck.** 1992a. Overproduction of a penicillin-binding protein is not the only mechanism of penicillin resistance in *Enterococcus faecium*. Antimicrob. Agents Chemother. **36**:783-787
- Klare, I., E. Collatz, S. Al-Obeid, J. Wagner, A. C. Rodloff and W. Witte.** 1992b. Glycopeptidresistenz bei *Enterococcus faecium* aus Besiedelungen und Infektionen von Patienten aus Intensivstationen Berliner Kliniken und einem Transplantationszentrum. ZAC Zschr. Antimikrob. Antineoplast. Chemother. **10**:45-53
- Klare, I., H. Heier, H. Claus, and W. Witte.** 1993. Environmental strains of *Enterococcus faecium* with inducible high-level resistance to glycopeptides. FEMS Microbiol. Lett. **106**:23-90
- Klare, I., H. Heier, H. Claus, R. Reissbrodt, and W. Witte.** 1995a. VanA-mediated high-level glycopeptide resistance in *Enterococcus faecium* from animal husbandry. FEMS Microbiol. Lett. **125**:165-172
- Klare, I., H. Heier, H. Claus, G. Böhme, S. Marin, G. Selmann, R. Hakenbeck, V. Antanassova, and W. Witte.** 1995b. *Enterococcus faecium* strains with VanA-mediated glycopeptide resistance isolated from animal food-stuffs and fecal samples of humans in the community. Microb. Drug Resist. **1**:256-272
- Klare, I., and W. Witte.** 1997. Glycopeptidresistente Enterokokken: Auftreten, Verbreitung, Resistenzübertragung, Bedeutung. Wien Klin. Wochenschr. **109**:23-90

- Klare, I., G. Werner, and W. Witte.** 2001. Habitats, infections, virulence factors, resistances to antibiotics, transfer of resistance determinants. In: Mühlendorfer, I., Schäfer K. P. (eds): Emerging Bacterial Pathogens. Contrib. Microbiol. Basel, Karger **8**:108-122
- Koonin, E. V., and K. E. Rudd.** 1994. A conserved domain in putative bacterial and bacteriophage transglycosylases. Trends Biochem. Sci. **19**:106-107.
- Kreft, B., R. Marre, U. Schramm, and R. Wirth.** 1992. Aggregation substance of *Enterococcus faecalis* mediates adhesion to cultured renal tubular cells. Infect. Immun. **60**:25-30
- Lai, M. H., and D. R. Kirsch.** 1996. Induction signals for vancomycin resistance encoded by the *vanA* gene cluster in *Enterococcus faecium*. Antimicrob. Agents Chemother. **40**:1645-1648.
- Lebek, G.** 1972. Effect of flavomycin on episomal resistant bacteria. Zbl. Vet. Med. B. **19**:532-539.
- Leclercq, R., E. Derlot, J. Duval, and P. Courvalin.** 1988. Plasmid mediated resistance to vancomycin and teicoplanin in *Enterococcus faecium*. N. Engl. J. Med. **319**:157-161.
- Leclercq, R., E. Derlot, M. Weber, J. Duval, and P. Courvalin.** 1989. Transferable vancomycin and teicoplanin resistance in *Enterococcus faecium*. Antimicrob. Agents Chemother. **33**:10-15.
- Leclercq, R., S. Dutka-Malen, J. Duval, and P. Courvalin.** 1992. Vancomycin resistance gene VanC is specific to *Enterococcus gallinarum*. Antimicrob. Agents Chemother. **36**:2005-2008
- Leclercq, R., and P. Courvalin.** 1997. Resistance to glycopeptides in enterococci. Clin. Infect. Dis. **24**:545-554.
- Li, L. Y., N. B. Shoemaker, and A. A. Salyers.** 1995. Location and characteristics of the transfer region of a *Bacteroides* conjugative transposon and regulation of transfer genes. J. Bacteriol. **177**:4992-4999.
- Ligozzi, M., F. Pittaluga, and R. Fontana.** 1996. Modification of penicillin-binding protein 5 associated with high-level ampicillin resistance in *Enterococcus faecium*. Antimicrob. Agents Chemother. **40**:354-357
- Livorese, L., S. Dias, C. Samuel, B. Romanowski, S. Taylor, P. May, P. Pitsakis, G. Woods, D. Kayne, M. E. Levison, and C. C. Johnson.** 1992. Hospital-acquired infection with vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* transmitted by electronic thermometers. Ann. Intern. Med. **117**:112-116

- Mani, N., P. Sancheti, Z. D. Jiang, C. McNaney, M. DeCenzo, B. Knight, M. Stankis, M. Kuranda, D. M. Rothenstein, P. Sanchet, and B. Knighti.** 1998. Screening systems for detecting inhibitors of cell wall transglycosylation in *Enterococcus*. *J. Antibiotics*. **51**:471-479.
- Marshall, C. G., I. A. D. Lessard, I.-S. Park, and G. D. Wright.** 1998. Glycopeptide antibiotic resistance genes in glycopeptide-producing organisms. *Antimicrob. Agents Chemother.* **42**:2215-2220
- McConville, M.** 1999. Interim data on MIC frequencies of *Enterococcus faecium* isolates from farm animals in six european countries. Inversk Research, Scotland
- Miller, D., V. Urdaneta, A. Weltman, and S. Park.** 2002. Public health dispatch: vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*---Pennsylvania, 2002. Centers for Disease Control and Prevention; Morbidity and Mortality Weekly Report. Oktober 11, **51**:902
- Moellering R. C. Jr., and D. J. Krogstad.** 1979. Antibiotic resistance in enterococci. In: Schlessinger D., ed. *Microbiology*. Washington, DC: American society for Microbiology, 293-298
- Moellering, R., and C. Wennerstein.** 1971. Studies on antibiotic Synergism against enterococci. Effect of various antibiotics on the uptake of <sup>14</sup>C-labelled streptomycin by enterococci. *J. Clin. Inf.* **50**:2580-2584
- Moras, D.** 1992. Structural and functional relationships between aminoacyl-tRNA synthetases. *Trends Biochem. Sci.* **17**:159-164
- Morgenstern, B.** 1999. DIALIGN 2: improvement of the segment-to-segment approach to multiple sequence alignment. *Bioinformatics* **15**:211-218
- Morris J. G., D. K. Shay, and J. N. Hebden.** 1995. Enterococci resistant to multiple antimicrobial agents, including vancomycin: establishment of endemicity in a university medical center. *Ann. Intern. Med.* **123**:250-259
- Mundy, L. M., D. F. Sahn, and M. Gilmore.** 2000. Relationships between enterococcal virulence and antimicrobial resistance. *Clin. Microbiol. Rev.* **13**:513-522
- Murray, B. E.** 1990. The life and times of enterococcus. *Clin. Microbiol. Rev.* **3**:46-65
- Murray, B. E.** 2000. Vancomycin-resistant enterococcal infections. *N. Engl. J. Med.* **342**:710-721
- Navarro, F., and P. Courvalin.** 1994. Analysis of genes encoding D-Alanine:-D-Alanine Ligase-related enzymes in *Enterococcus casseliflavus* and *Enterococcus flavescens*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **38**:1788-1793

- Noble W. C., Z. Virani, and R. G. Cree.** 1992. Co-transfer of vancomycin and other resistance genes from *Enterococcus faecalis* to *Staphylococcus aureus*. FEMS Microbiol. Lett. **72**:195-198
- Olmsted, S., G. Dunny, S. Erlandsen, and C. Wells.** 1994. A plasmid-encoded surface protein on *Enterococcus faecalis* augments its internalization by cultured intestinal epithelial cells. J. Infect. Dis. **170**:1549-1556
- Patterson, J., and M. Zervos.** 1990. High-level gentamycin resistance in *Enterococcus*: Microbiology, genetic basis, and epidemiology. Rev. Inf. Dis. **12**:644-652
- Patterson, J. E.** 2001. Antibiotic utilization. Is there an effect on antimicrobial resistance? CHEST. **119**:426S-430S.
- Perichon, B., P. Reynolds, and P. Courvalin.** 1997. VanD-Type glycopeptide-resistant *Enterococcus faecium* BM4339. Antimicrob. Agents Chemother. **41**:2016-2018
- Perichon, B., and P. Courvalin.** 2000. Update on Vancomycin resistance. Int. J. Clin. Pract. Suppl. **115**:88-93
- Putzer, H., A. A. Brakhage, and M. Grunberg-Manago.** 1990. Independent genes for two threonyl-tRNA synthetases in *Bacillus subtilis*. J. Bacteriol. **172**:4593-4602
- Putzer, H., N. Gendron, and M. Grunberg-Manago.** 1992. Co-ordinate expression of two threonyl-tRNA synthetase genes in *Bacillus subtilis*: control by transcriptional antitermination involving a conserved regulatory sequence. EMBO J. **11**:3117-3127
- Rachid, S.** 2000. Molecular investigations of the influence of environmental factors and subinhibitory antibiotic concentrations on the biofilm formation in *Staphylococcus epidermidis*. Dissertation
- Rechenberg, M., and J.-V. Höltje.** 2000. Two-step procedure for purification and separation of the essential penicillin-binding proteins PBP 1A and 1Bs of *Escherichia coli*. FEMS Microbiol. Lett. **189**:201-204
- Reynolds P. E., F. Depardieu, S. Dutka-Malen, M. Arthur, and P. Courvalin.** 1994. Glycopeptide resistance mediated by enterococcal transposon Tn1546 requires production of VanX for hydrolysis of D-alanyl-D-alanine. Mol. Microbiol. **13**:1065-1070
- Richter, A., W. Löscher und W. Witte.** 1996. Leistungsförderer mit antibakterieller Wirkung: Probleme aus pharmakologisch-toxikologischer und mikrobiologischer Sicht. Der praktische Tierarzt. **7**:605-621
- Ritzeler, O., L. Henning, M. Findeisen, P. Welzel, D. Müller, A. Markus, G. Lemoine, M. Lampilas, and J. van Heijenoort.** 1997. Synthesis of a trisaccharide analogue of

- moenomycin A<sub>12</sub>. Implications of a new moenomycin structure-activity relationship. *Tetrahedron*. **53**:1675-1694
- Roberts, M. C.** 1996. Tertacycline resistance determinants: mechanisms of action, regulation of expression, genetic mobility, and distribution. *FEMS Microbiol. Rev.* **19**:1-24
- Rybkin, T., J. L. Mainardi, W. Sougakoff, E. Collatz, and L. Gutmann.** 1998. Penicillin-binding protein 5 sequence alterations in clinical isolates of *Enterococcus faecium* with different levels of beta-lactam resistance. *J. Infect. Dis.* **178**:159-163
- Sahm, D. F., J. Kissinger, M. S. Gilmore, B. R. Murray, R. Mulder, J. Solliday, and B. Clark.** 1989. In vitro susceptibility studies of vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **33**:1588-1591
- Salyers, A. A., and N. B. Shoemaker.** 1996. Resistance gene transfer in anaerobes: new insights, new problems. *Clin. Infect. Dis.* **23**:S36-34
- Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis.** *Molecular cloning: a laboratory manual*. 2<sup>nd</sup> ed. 1989, Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory.
- Schleifer, K. H., and R. Klipper-Balz.** 1984. Transfer of *Streptococcus faecalis* and *Streptococcus faecium* to the genus *Enterococcus* nom. rev. as *Enterococcus faecalis* comb. nov. and *Enterococcus faecium* comb. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **34**:31-34
- Scott J. R., F. Bringel, D. Marra, G. van Alstine, and C. K. Rudy.** 1994. Conjugative transposition of Tn916: preferred targets and evidence for conjugative transfer of a single strand and for a double-stranded circular intermediate. *Mol. Microbiol.* **11**:10099-108
- Shankar, N., C. V. Lockatell, A. S. Baghdayan, C. Drachenberg, M. S. Gilmore, and D. E. Johnson.** 2001. Role of *Enterococcus faecalis* surface protein Esp in the pathogenesis of ascending urinary tract infection. *Infect. Immun.* **69**:4366-4372
- Shankar, N., A. S. Baghdayan, and M. S. Gilmore.** 2002. Modulation of virulence within a pathogenicity island in vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis*. *Nature* **417**:746-750
- Sherman, J. M.** 1937. The streptococci. *Bacteriol. Rev.* **1**:3-97
- Shlaes, D. M., A. Bouvet, C. Devine, J. H. Shlaes, S. al-Obeid, and R. Williamson.** 1989. Inducible, transferable resistance to vancomycin in *Enterococcus faecalis* A256. *Antimicrob. Agents. Chemother.* **33**:198-203
- Showsh, S., E. H. De Boever, and D. B. Clewell.** 2001. Vancomycin resistance plasmid in *Enterococcus faecalis* that encodes sensitivity to a sex pheromone also produced by *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **45**:2177-2178

- Sieradzki, K. and A. Tomasz.** 1999. Gradual alterations in the cell wall structure and metabolism in vancomycin-resistant mutants of *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* **181**:7566-7570
- Sievert, D. M., M. L. Boulton, G. Stoltman, and 12 other authors.** 2002. *Staphylococcus aureus* resistant to vancomycin---United States, 2002. Centers for Disease Control and Prevention; Morbidity and Mortality Weekly Report. July 5, **51**:565-567
- Sifaoui, F., M. Arthur, L. Rice, and L. Gutmann.** 2001. Role of penicillin-binding protein 5 in expression of ampicillin resistance and peptidoglycan structure in *Enterococcus faecium*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **45**:2594-2597
- Smidt, H., D. Song, J. Oost and W. M. Vos.** 1999. Random transposition by Tn916 in *Desulfobacterium dehalogenans* allows for isolation and characterization of halorespiration-deficient mutants. *J. Bacteriol.* **181**:6882-6888
- Sofia, M., J. N. Allanson, N. Hatzenbuehler, and 23 other authors.** 1999. Discovery of novel disaccharide antibacterial agents using a combinatorial library approach. *J. Med. Chem.* **42**:3193-3198
- Spratt, B. G.** 1983. Penicillin-binding proteins and the future of  $\beta$ -lactam antibiotics. *J. Gen. Microbiol.* **129**:1247-1260
- Srinivasan, A., J. D. Dick, and T. M. Perl.** 2002. Vancomycin resistance in Staphylococci. *Clin. Microbiol. Rev.* **15**:430-438
- Stembra K., A. Buchynskyy, S. Vogel, D. Knoll, A. A. Osman, J. A. Ayala, and P. Welzel.** 2002. Moenomycin-mediated affinity purification of penicillin-binding protein 1b. *Chem. Bio. Chem.* **3**:332-340
- Stevens, A. M., N. B. Shoemaker, and A. A. Salyers.** 1990. Genes on a *Bacteroides* conjugal tetracycline resistance element which mediate production of plasmid-like forms from unlinked chromosomal DNA may be involved in transfer of the resistance element. *J. Bacteriol.* **172**:4271-4279.
- Stevens, A. M., J. M. Sanders, N. B. Shoemaker, and A. A. Salyers.** 1992. Genes involved in production of plasmid-like forms by a *Bacteroides* conjugal chromosomal element share significant amino acid homology with two component regulatory systems. *J. Bacteriol.* **174**:2935-2942.
- Stevens, A. M., N. B. Shoemaker, L. Y. Li, and A. A. Salyers.** 1993. Tetracycline regulation of genes on *Bacteroides* conjugative transposons. *J. Bacteriol.* **175**:6134-6141

- Suzuki, H., Y. Nishimura, and Y. Hirota.** 1978. On the process of cellular division in *Escherichia coli*: a series of mutants of *E. coli* altered in the penicillin-binding proteins. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **75**:664-668
- Terrak, M., T. K. Gosh, J. van Heijenoort, J. van Beeumen, M. Lampilas, J. Aszodi, J. A. Ayala, J.-M. Ghuysen, and M. Nguyen-Disteche.** 1999. The catalytic, glycosyl transferase and acyl transferase modules of the cell wall peptidoglycan-polymerizing penicillin-binding protein 1b of *Escherichia coli*. Mol. Microbiol. **34**:350-364
- Thal, L. A., and M. Zervos.** 1999. Occurrence and resistance to virginiamycin and streptogramins. J. Antimicrob. Chemother. **43**:171-176
- Tokars J. I., S. Satake, and D. Rimland.** The prevalence of colonization with vancomycin-resistant *Enterococcus* at a Veterans' Affair institution. Infect. Control Hosp. Epidemiol. **20**:171-175
- Ulijasz, A. T., A. Grenader, and B. Weisblum.** 1996. A vancomycin-inducible LacZ reporter system in *Bacillus subtilis*: induction by antibiotics that inhibit cell wall synthesis and lysozym. J. Bacteriol. **178**:6305-6309
- Uttley, A. H., R. C. George, J. Naidoo, N. Woodford, A. P. Johnson, C. H. Collins, D. Morrison, A. J. Gilfillan, L. E. Fitch, and J. Heptonstall.** 1989. High-level resistant enterococci causing hospital infections. Epidemiol. Infect. **103**:173-181
- v. d. Bogaard, A. E., R. Willems, N. London, J. Top, and E. E. Stobberingh.** 2002. Antibiotic resistance of fecal enterococci in poultry, poultry farmers and poultry slaughterers. J. Antimicrob. Chemother. **49**:497-505
- van Heijenoort, Y., M. Derrien, and J. van Heijenoort.** 1978. Polymerization by transglycosylation in the biosynthesis of the peptidoglycan of *Escherichia coli* K 12 and its inhibition by antibiotics. FEBS Lett. **89**:141-144.
- van Heijenoort, Y., M. Leduc, H. Singer, and J. van Heijenoort.** 1987. Effects of moenomycin on *Escherichia coli*. J. Gen. Microbiol. **133**:667-674
- van Heijenoort, J.** 2001. Formation of the glycan chains in the synthesis of bacterial peptidoglycan. Glycobiology **Mar**; 25R-36R
- Vergis, E. N., N. Shankar, J. W. Chow, M. K. Hayden, D. R. Snyderman, M. J. Zervos, P. K. Linden, M. M. Wagner, R. R. Muder.** 2002. Association between the presence of enterococcal virulence factors gelatinase, hemolysin, and enterococcal surface protein with bacteremia due to *Enterococcus faecalis*. Clin. Infect. Dis. **35**:570-575

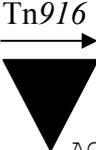
- Vogel, S., A. Buchynskyy, K. Stembra, K. Richter, L. Henning, D. Müller, P. Welzel, F. Maquin, C. Bonhomme, and M. Lampilas.** 2000. Some selective reactions of moenomycin A. M. Bioorg. Med.-Chem.Lett. **10**:1963-1965
- Wang, Q. M., R. B. Perry, R. B. Johnson, W. E. Alborn, W.-K. Yeh, and P. L. Skatrud.** 2001. Identification and characterization of a monofunctional glycosyltransferase from *Staphylococcus aureus*. J. Bacteriol. **183**:4779-4785
- Watanabe, T., Y. Ogata, K. Sugawara, and K. Oda.** 1971. Proc. 7<sup>th</sup> Int. Congr. Chemother., abstr. A-8/11.
- Werner, G., I. Klare, and W. Witte.** 1997. Arrangement of the VanA gene cluster in enterococci of different ecological origin. FEMS Microbiol. Lett. **155**:55-61
- Werner, G., I. Klare, and W. Witte.** 1999. Large conjugative *vanA* plasmids in vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*. J. Clin. Microbiol. **37**:2383-2384.
- Williamsson, R., C. le Bouguenec, L. Gutmann, and T. Horaud.** 1985. One or two low affinity penicillin-binding proteins may be responsible for the range of susceptibility of *Enterococcus faecium* to benzylpenicillin. J. Gen. Microbiol. **131**:1933-1940
- Williamson, R., L. Gutmann, T. Horaud, F. Delbos, and J. F. Acar.** 1986. Use of penicillin-binding proteins for the identification of enterococci. J. Gen. Microbiol. **132**:1929-1937
- Wirth, R., F. Y. An, and D. B. Clewell.** 1986. Highly efficient protoplast transformation system for *Streptococcus faecalis* and a new *Escherichia coli*-*S. faecalis* shuttle vector. J. Bacteriol. **165**:831-836
- Witte, W.** 1997. Impact of antibiotic use in animal feeding on resistance of bacterial pathogens in humans. In: Levy SB, editor. Antibiotic Resistance: Origins, Evolution, Selection, and Spread. Chicester: Wiley, 71-85
- Woodford, N., M. Soltani and K. J. Hardy.** 2001. Frequency of *esp* in *Enterococcus faecium* isolates. Lancet **358**:584
- Zorzi, W., X. Y. Zhou, O. Dardenne, J. Lamotte, D. Raze, J. Pierre, L. Gutamn, and J. Coyette.** 1996. Structure of the low-affinity penicillin-binding protein 5 PBP5fm in wild-type highly penicillin-resistant strains of *Enterococcus faecium*. J. Bacteriol. **178**:4948-4957
- Zscheck, K. K., and B. E. Murray.** 1991. Nucleotide sequence of the  $\beta$ -Lactamase gene from *Enterococcus faecalis* JHH22 and its similarity to staphylococcal  $\beta$ -Lactamase genes. Antimicrob. Agents Chemother. **35**:1736-1740

## 8. Anhang

### 8.1 Sequenzen

#### 8.1.1 „Alignment“ eines 187 bp umfassenden Sequenzbereiches der Mutanten

Dargestellt ist der 187 bp große Sequenzbereich der sieben Mutanten (64/3-1, -9, -12, -15, -22, -25, -33), von der Insertionsstelle des Transposons, 330 bp „upstream“ vom putativen Stopcodon des Threonyl-tRNA Synthetase Gens, bis zum putativen Startcodon des Penicillin-Bindeprotein Gens

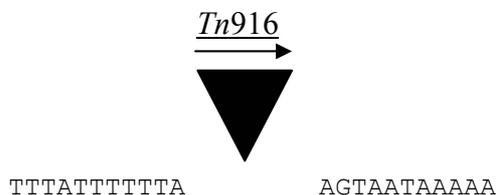
					
64/3-1	AGTAATAAAAA	ATAGTTGAAT	ATGTAAC TTT	AAGTGATTAC	TAGTGAAACA
64/3-9	AGTAATAAAAA	ATAGTTGAAT	ATGTAAC TTT	AAGTGATTAC	TAGTGAAACA
64/3-12	AGTAATAAAAA	ATAGTTGAAT	ATGTAAC TTT	AAGTGATTAC	TAGTGAAACA
64/3-5	AGTAATAAAAA	ATAGTTGAAT	ATGTAAC TTT	AAGTGATTAC	TAGTGAAACA
64/3-22	AGTAATAAAAA	ATAGTTGAAT	ATGTAAC TTT	AAGTGATTAC	TAGTGAAACA
64/3-25	AGTAATAAAAA	ATAGTTGAAT	ATGTAAC TTT	AAGTGATTAC	TAGTGAAACA
64/3-33	AGTAATAAAAA	ATAGTTGAAT	ATGTAAC TTT	AAGTGATTAC	TAGTGAAACA
64/3-1	AAAAGTTGAT	TTTATCTTGA	AATTAGGTAA	AGAATTTCTT	-GCTCCGCCC
64/3-9	AAAAGTTGAT	TTTATCTTGA	AATTAGGTAA	AGAATTTCTT	-GCTCCGCCC
64/3-12	AAAAGTTGAT	TTTATCTTGA	AATTAGGTAA	AGAATTTCTT	-GCTCCGCCC
64/3-15	AAAAGTTGAT	TTTATCTTGA	AATTAGGTAA	AGAATTTCTT	-GCTCCGCCC
64/3-22	AAAAGTTGAT	TTTATCTTGA	AATTAGGTAA	AGAATTTCTT	-GCTCCGCCC
64/3-25	AAAAGTTGAT	TTTATCTTGA	AATTAGGTAA	AGAATTTCTT	aGCTCCGCCC
64/3-33	AAAAGTTGAT	TTTATCTTGA	AATTAGGTAA	AGAATTTCTT	-GCTCCGCCC
64/3-1	ATTTTTTCTT	TTTTATTAAG	AAGTTTTTGG	GTACAATGAA	GCATGAATGT
64/3-9	ATTTTTTCTT	TTTTATTAAG	AAGTTTTTGG	GTACAATGAA	GCATGAATGT
64/3-12	ATTTTTTCTT	TTTTATTAAG	AAGTTTTTGG	GTACAATGAA	GCATGAATGT
64/3-15	ATTTTTTCTT	TTTTATTAAG	AAGTTTTTGG	GTACAATGAA	GCATGAATGT
64/3-22	ATTTTTTCTT	TTTTATTAAG	AAGTTTTTGG	GTACAATGAA	GCATGAATGT
64/3-25	ATTTTTTCTT	TTTTATTAAG	AAGTTTTTGG	GTACAATGAA	GCATGAATGT
64/3-33	ATTTTTTCTT	TTTTATTAAG	AAGTTTTTGG	GTACAATGAA	GCATGAATGT

## Beginn des Penicillin-Bindeproteins

					→
64/3-1	AAATAGGCGT	GAAGGATAG	GAAATGATGA	AAGATTTT <b>AT</b>	<b>G</b>
64/3-9	AAATAGGCTT	TAAGGATAG	GAAATGATGA	AAGATTTT <b>AT</b>	<b>G</b>
64/3-12	AAATAGGCTT	GAAGGATAG	GAAATGATGA	AAGATTTT <b>AT</b>	<b>G</b>
64/3-15	AAATAGGCTT	GAAGGATAG	GAAATGATGA	AAGATTTT <b>AT</b>	<b>G</b>
64/3-22	AAATAGGCTT	TAAGGATAG	GAAATGATGA	AAGATTTT <b>AT</b>	<b>G</b>
64/3-25	AAATAGGCTT	TAAGGATAG	GAAATGATGA	AAGATTTT <b>AT</b>	<b>G</b>
64/3-33	AAATAGGCTT	TAAGGATAG	GAAATGATGA	AAGATTTT <b>AT</b>	<b>G</b>

**8.1.2 Insertionsstelle von Tn916 im Gen für die Threonyl-tRNA Synthetase**

Dargestellt sind jeweils 11 bp „upstream“ und „downstream“ der Insertionsstelle des Transposons im Gen für die putative Threonyl-tRNA Synthetase.

**8.1.3 „Alignment“ von 4078 bp (4,1 kb) des Stammpaares *E. faecium* ATCC 6569, FPL<sup>r</sup> (110)/FPL<sup>s</sup> (111)**

Dargestellt ist das „Alignment“ eines 4,1 kb umfassenden Sequenzbereiches des Stammpaares 110 und 111. Die Sequenzen beginnen 330 bp „upstream“ vom putativen Stopcodon des Gens für die putative Threonyl-tRNA Synthetase und enden 115 bp „downstream“ vom putativen Stopcodons des Gens für das putative Penicillin-Bindeprotein.

110 CATCGTCCAG TAGTTATCCA CCGCGGAATC GTTTCTACGA TGGAACGTTT  
111 CATCGTCCAG TAGTTATCCA CCGCGGAATC GTTTCTACGA TGGAACGTTT

---

110 TGTGCGCTAT TTGACAGAAG TATACAAAGG CGCTTTTCCA ACATGGCTAG  
111 TGTGCGCTAT TTGACAGAAG TATACAAAGG CGCTTTTCCA ACATGGCTAG

110 CACCAATACA AGCGACAATC ATCCCTGTTT CTGTTGATGC ACATGGCGAT  
111 CACCAATACA AGCGACAATC ATCCCTGTTT CTGTTGATGC ACATGGCGAT

110 TATGCTTATG AAATCAAAGA ACGCTTGCAA ATGAAAGGTT TACGTGTAGA  
111 TATGCTTATG AAATCAAAGA ACGCTTGCAA ATGAAAGGTT TACGTGTAGA

110 AGTCGATGAC CGCAATGAAA AAATGGGCTA TAAGATTCGT GCCTCTCAAA  
111 AGTCGATGAC CGCAATGAAA AAATGGGCTA TAAGATTCGT GCCTCTCAAA

110 CACAAAAAAT TCCTTACCAA TTAGTTGTCG GTGATAAAGA ATTGGAAGAT  
111 CACAAAAAAT TCCTTACCAA TTAGTTGTCG GTGATAAAGA ATTGGAAGAT

110 GCAACAGTGA ATGTACGTCG TTACGGAAGC AAAGAAACAG CTGTAGAAGA  
111 GCAACAGTGA ATGTACGTCG TTACGGAAGC AAAGAAACAG CTGTAGAAGA

110 TTTGAATATC TTTATTGATG CTATGGAAGC AGAAGTCAAA AATTACAGCA  
111 TTTGAATATC TTTATTGATG CTATGGAAGC AGAAGTCAAA AATTACAGCA

110 GAGAAAACAA ATAGATAAGT TGCCTATAAA AAAAGCACTA AATAAAAAAC  
111 GAGAAAACAA ATAGATAAGT TGCCTATAAA AAAAGCACTA AATAAAAAAC

110 AATCCAAAACA ATTGAGAACA GATATTCCAC AATCCCACAG ATGGTCAATA  
111 AATCCAAAACA ATTGAGAACA GATATTCCAC AATCCCACAG ATGGTCAATA

110 GAATTTGCGG GATTGATGGA ATGAGCTATC CTATTGTGCG GATTGTTTTT  
111 GAATTTGCGG GATTGATGGA ATGAGCTATC CTATTGTGCG GATTGTTTTT

110 TTTGTTTTTT TATCCAGTAC ACGACCGTTA ACAAGGAACT GATATGGTAT  
111 TTTGTTTTTT TATCCAGTAC ACGACCGTTA ACAAGGAACT GATATGGTAT

110 ACTTACATAG ACGATTATTA AAAGGATGGA GGAACCTATG AGCGTAATTA  
111 ACTTACATAG ACGATTATTA AAAGGATGGA GGAACCTATG AGCGTAATTA

110 GTCGTATTGA AAGTATGATG GAAGATTATT CTTCAGCAGA AAAAAAGTTG  
111 GTCGTATTGA AAGTATGATG GAAGATTATT CTTCAGCAGA AAAAAAGTTG

110 GCCAACTACA TTATTGGAAA TATTGAGAAG GTCCCCACAA TGACAGCTAA  
111 GCCAACTACA TTATTGGAAA TATTGAGAAG GTCCCCACAA TGACAGCTAA

---

110 TGAATTAGCG GAAGCTTCAG GTTTGAGTGC GCCGACAGTT GTACGTTTTT  
111 TGAATTAGCG GAAGCTTCAG GTTTGAGTGC GCCGACAGTT GTACGTTTTT

110 CAAAAAAAAAT CGGGTTTCAA AGTTTGACGG ACTTCAAAAT CACGATTTCA  
111 CAAAAAAAAAT CGGGTTTCAA AGTTTGACGG ACTTCAAAAT CACGATTTCA

110 ACAGAACTAC AGACTGGAAT CGATGAAGGA TTTAGCGATA TCGAAGCAAA  
111 ACAGAACTAC AGACTGGAAT CGATGAAGGA TTTAGCGATA TCGAAGCAAA

110 TGAGTCCTTT TACTCTATCA AAAACAAACT TGGGAACAAT GCGCAAGTAG  
111 TGAGTCCTTT TACTCTATCA AAAACAAACT TGGGAACAAT GCGCAAGTAG

110 CGATAAAAAGA AACAGTAGAT ATTCTGGAAG AAGAAACGAT CAAAAAGTC  
111 CGATAAAAAGA AACAGTAGAT ATTCTGGAAG AAGAAACGAT CAAAAAGTC

110 GTAGAATGTT TGGAAATCGGC TGAGTCTGTT TTTTATATG GTGTTGGTGC  
111 GTAGAATGTT TGGAAATCGGC TGAGTCTGTT TTTTATATG GTGTTGGTGC

110 CTCTTCTTTA GTGGTAGAAG ACATTCTGCA AAAATGGTCT CGTGTCGGTA  
111 CTCTTCTTTA GTGGTAGAAG ACATTCTGCA AAAATGGTCT CGTGTCGGTA

110 AGCCAATCAT TTTTGAAAAA GATATCCATG TCTTGCTCCC ACAACTTGTC  
111 AGCCAATCAT TTTTGAAAAA GATATCCATG TCTTGCTCCC ACAACTTGTC

110 AGCAATGAGA AGAAGAAAAGT ACTTTGGCTT GTTTCGAACT CAGGGAGAAG  
111 AGCAATGAGA AGAAGAAAAGT ACTTTGGCTT GTTTCGAACT CAGGGAGAAG

110 CGCAGATGTA GTTGCAATTAG CTGAGCTAGC AAAAAATATG AATATCGAGA  
111 CGCAGATGTA GTTGCAATTAG CTGAGCTAGC AAAAAATATG AATATCGAGA

110 TCATTGCGTT GACGCAATTT GGAAATAACC CACTTAGCAA GATAGCCGAT  
111 TCATTGCGTT GACGCAATTT GGAAATAACC CACTTAGCAA GATAGCCGAT

110 GTACTCGTAC AAACATCAAG ACCGAAAGAA ATCACCAATC GAAGTGCGGC  
111 GTACTCGTAC AAACATCAAG ACCGAAAGAA ATCACCAATC GAAGTGCGGC

110 AACCAATTCA CTTTTGGCCC AATTCGCTAC GATTGATATC ATTTTTTATT  
111 AACCAATTCA CTTTTGGCCC AATTCGCTAC GATTGATATC ATTTTTTATT

110 TTTATATGGC TAAAAACGAA TCACTTAGTG AAAAAAGTGAA AAAACAAGA  
111 TTTATATGGC TAAAAACGAA TCACTTAGTG AAAAAAGTGAA AAAACAAGA

---

110 GAAGCAATCC AAGACTATTT TATGGATTCA AAATAAAAAA ACTAAATTTA  
111 GAAGCAATCC AAGACTATTT TATGGATTCA AAATAAAAAA ACTAAATTTA

110 CCTTACTATT TTTGATATAA GTTTTTTT TAG AATAACAAC TATAGTTTTTC  
111 CCTTACTATT TTTGATATAA GTTTTTTT TAG AATAACAAC TATAGTTTTTC

110 CACAAAGAAA TGTTC TATTA AAGTGTTC A CGACTTTAG AAGCATAATT  
111 CACAAAGAAA TGTTC TATTA AAGTGTTC A CGACTTTAG AAGCATAATT

110 TTCAAAAATA AGTTTATTTT TTAATGAAAA AAATAGTTGG ATATGCAACT  
111 TTCAAAAATA AGTTTATTTT TTAATGAAAA AAATAGTTGG ATATGCAACT

110 TCAGAGGTTT GCTGTGAAAC AAAAAGTTGA TTTTATCTTG AAATTAGGTA  
111 TCAGAGGTTT GCTGTGAAAC AAAAAGTTGA TTTTATCTTG AAATTAGGTA

110 AAGAATTTCT TGCTCCGCTC ATTTTTTCTT TTTTATTAAG AAGTTTTTGG  
111 AAGAATTTCT TGCTCCGCTC ATTTTTTCTT TTTTATTAAG AAGTTTTTGG

110 GTACAATGAA GCATGAATGT AAATAGGCGG AAGGATAGGA AATGATGAAA  
111 GTACAATGAA GCATGAATGT AAATAGGCGG AAGGATAGGA AATGATGAAA

110 GATTTTATGA AAAAAATAGT AAATACTTCT TGGATAGAAA AAATAAGAAA  
111 GATTTTATGA AAAAAATAGT AAATACTTCT TGGATAGAAA AAATAAGAAA

110 AGGGGCACAA GAGCCTAAAA ACAAACGTT TCGCCGGTCG CATGTTTCCT  
111 AGGGGCACAA GAGCCTAAAA ACAAACGTT TCGCCGGTCG CATGTTTCCT

110 TTCGCTTAAA TTTTCTTTTT TTCATTATAT TTACGTTATT TGTTGCGTTG  
111 TTCGCTTAAA TTTTCTTTTT TTCATTATAT TTACGTTATT TGTTGCGTTG

110 ATTGCTCGAT TGGGCTATTT GCAGATCGTG AATGGTGAAG AGATGGAAGC  
111 ATTGCTCGAT TGGGCTATTT GCAGATCGTG AATGGTGAAG AGATGGAAGC

110 GCGAGTGAAA TCTACTTCTA CGATTACAGT CCAAGAAAGT ACCCCTCGCG  
111 GCGAGTGAAA TCTACTTCTA CGATTACAGT CCAAGAAAGT ACCCCTCGCG

110 GAATGATCTA CGATTCCACA GGAAAAGCGT TAGTCACAAA TAAAGCGAAT  
111 GAATGATCTA CGATTCCACA GGAAAAGCGT TAGTCACAAA TAAAGCGAAT

110 CAGGCAATCA CCTATACGAG GGGCACACAA GTGACGGCTA AAGACCTACT  
111 CAGGCAATCA CCTATACGAG GGGCACACAA GTGACGGCTA AAGACCTACT

---

110 TGAAATCGCA ACGAAGCTGA ACTCTCTGAT TGATGTGCCG GCAGATGAAA  
111 TGAAATCGCA ACGAAGCTGA ACTCTCTGAT TGATGTGCCG GCAGATGAAA

110 ATCTGACAGA TAGAGATAAA AAAGATTTTT GGCTGGCTGA TCCGGAACAT  
111 ATCTGACAGA TAGAGATAAA AAAGATTTTT GGCTGGCTGA TCCGGAACAT

110 TTGAAGGAAG CCACAAAAAG ACTTTCGGCA AAAGAAAAGC AATTAGGAAA  
111 TTGAAGGAAG CCACAAAAAG ACTTTCGGCA AAAGAAAAGC AATTAGGAAA

110 CAGCGAACAA TACAGCGCGA TGGTCAATAA AGTAACAGAT GATGAGATCA  
111 CAGCGAACAA TACAGCGCGA TGGTCAATAA AGTAACAGAT GATGAGATCA

110 ACTTGAACGA GGAACAATTA AAGATCGCTA CCATCTTTAA ACGGATGAAC  
111 ACTTGAACGA GGAACAATTA AAGATCGCTA CCATCTTTAA ACGGATGAAC

110 AGTGCATATG AATTAAACAC GGTCTATATC AAGAACTCTG GTGTTACTGA  
111 AGTGCATATG AATTAAACAC GGTCTATATC AAGAACTCTG GTGTTACTGA

110 CCAAGAATTA GCTGTTGTGG CGGAACGTGC TTCTGAGCTT CCAGGAGTTT  
111 CCAAGAATTA GCTGTTGTGG CGGAACGTGC TTCTGAGCTT CCAGGAGTTT

110 CGACAGGCAC AGACTGGACA CGCGAATATA ACGCAGCAGA TTCACTGAAA  
111 CGACAGGCAC AGACTGGACA CGCGAATATA ACGCAGCAGA TTCACTGAAA

110 AGTATTTT TAG GTAGTGTGAC GACTGAAAAA CAAGGTCTTC CGGCAGATGA  
111 AGTATTTT TAG GTAGTGTGAC GACTGAAAAA CAAGGTCTTC CGGCAGATGA

110 AGCAGAGAAG TATTTAGCAA AAGGGTATTC TCGAAATGAT CGTGTGGGAC  
111 AGCAGAGAAG TATTTAGCAA AAGGGTATTC TCGAAATGAT CGTGTGGGAC

110 AAAGTTATTT GGAAAAACAA TATGAAGATG TCCTACAAGG AACCAAACC  
111 AAAGTTATTT GGAAAAACAA TATGAAGATG TCCTACAAGG AACCAAACC

110 CAATATGAAG TTTCTCTTGA CAATGAAGGC AATGTTTCGA ATCAAAAAGA  
111 CAATATGAAG TTTCTCTTGA CAATGAAGGC AATGTTTCGA ATCAAAAAGA

110 AATCTTCTCT GGGGAAAAAG GTTCTAATTT AATGTTATCG ATGAATACAG  
111 AATCTTCTCT GGGGAAAAAG GTTCTAATTT AATGTTATCG ATGAATACAG

110 AATTCCAATC GAAAGTAGAA GAAATCTTAA AAAGAAATTA TCAAACATTC  
111 AATTCCAATC GAAAGTAGAA GAAATCTTAA AAAGAAATTA TCAAACATTC

---

110 ATCAATAACG GTAAAGCACA GTACTCGCCT GGTGCTTATG CAGTAGCCAT  
111 ATCAATAACG GTAAAGCACA GTACTCGCCT GGTGCTTATG CAGTAGCCAT

110 GAATCCTCAG ACAGGAGAAG TGTTAGCCAT GACTGGTTTC AGTCATGAGC  
111 GAATCCTCAG ACAGGAGAAG TGTTAGCCAT GACTGGTTTC AGTCATGAGC

110 AAGGTTCCAA GGAAATCACC GAGAATGCTT TGGGCACAAT CACTAGCGCT  
111 AAGGTTCCAA GGAAATCACC GAGAATGCTT TGGGCACAAT CACTAGCGCT

110 TTTGCTCCAG GGTCTGTAGT CAAGGCCGGT ACTTTGACAG CAGGTTGGGC  
111 TTTGCTCCAG GGTCTGTAGT CAAGGCCGGT ACTTTGACAG CAGGTTGGGC

110 AAGTAACGCG ATCAGCGGAA ATCAAGTGTT GATTGATGAA CCGATTCGTC  
111 AAGTAACGCG ATCAGCGGAA ATCAAGTGTT GATTGATGAA CCGATTCGTC

110 TACAAGGTGC TTCAGAAAAA AGCTCTGTCT TTAACCGAAA CGGACAAGTT  
111 TACAAGGTGC TTCAGAAAAA AGCTCTGTCT TTAACCGAAA CGGACAAGTT

110 GCTCTTGATG CAGTCAAAGC ATTGGAATTG TCTTCTAATA CGTATATGAT  
111 GCTCTTGATG CAGTCAAAGC ATTGGAATTG TCTTCTAATA CGTATATGAT

110 CAAAGTGGCA TTAAAGATGC TAGGGCTAGA CTATACTCCT GGAATGGGAC  
111 CAAAGTGGCA TTAAAGATGC TAGGGCTAGA CTATACTCCT GGAATGGGAC

110 TACCTAGTTT AGACGAAGAA GCTAAAGCTT ATCAACAATT GAGAGACTCT  
111 TACCTAGTTT AGACGAAGAA GCTAAAGCTT ATCAACAATT GAGAGACTCT

110 TTCAAAGAGT TTGGTCTTGG TACAACGACT GGGATCGATT TGCCGAATGA  
111 TTCAAAGAGT TTGGTCTTGG TACAACGACT GGGATCGATT TGCCGAATGA

110 ATCTCCTGGG ATTTACGCT CTGTTGAGTA TATGAAGAAG TTCAATGCGG  
111 ATCTCCTGGG ATTTACGCT CTGTTGAGTA TATGAAGAAG TTCAATGCGG

110 ATAATGGCAA AGAATGGTAT ACTCCAGGTA ACTTTACCGA TTTGGCATT  
111 ATAATGGCAA AGAATGGTAT ACTCCAGGTA ACTTTACCGA TTTGGCATT

110 GGACAGTTT ACACATATAC ACCGATCCAA TTAGCTCAAT ATGCTTCAAC  
111 GGACAGTTT ACACATATAC ACCGATCCAA TTAGCTCAAT ATGCTTCAAC

110 AGTCGCTAAT GCGGGAAAC GAGTACAGCC TCACCTAGTC AAAGCAATCT  
111 AGTCGCTAAT GCGGGAAAC GAGTACAGCC TCACCTAGTC AAAGCAATCT

---

110 ATGGCAATGA CGAAAATGGG AATTTGGGTG AAGTGAAAAA AGAAATTGGC  
111 ATGGCAATGA CGAAAATGGG AATTTGGGTG AAGTGAAAAA AGAAATTGGC

110 ACGACAGTAG AAAATACGGT CAATATATCT GCAGAAAATA TGGCAATCCT  
111 ACGACAGTAG AAAATACGGT CAATATATCT GCAGAAAATA TGGCAATCCT

110 CCGTGAAGGA TTCCATCAGG TTGTTCATGG TACCGACCCT TACACAACAG  
111 CCGTGAAGGA TTCCATCAGG TTGTTCATGG TACCGACCCT TACACAACAG

110 CTAAACCATT AGCCAGTGCG AAAATGGACC TTTCTGCAAA AACAGGGACT  
111 CTAAACCATT AGCCAGTGCG AAAATGGACC TTTCTGCAAA AACAGGGACT

110 GCAGAAACGG TTGCGGAAGG TCACCCAGAT ATTACGACAG TCAATAGTAA  
111 GCAGAAACGG TTGCGGAAGG TCACCCAGAT ATTACGACAG TCAATAGTAA

110 TATCGTGGCA TACGGACCAA CAGACAATCC GCAAATCGCA ATCAGTGTG  
111 TATCGTGGCA TACGGACCAA CAGACAATCC GCAAATCGCA ATCAGTGTG

110 TCTTGCCGAA CTTATTAGAT GAACAAGTCC GAGTGAACCT GACGATTGCT  
111 TCTTGCCGAA CTTATTAGAT GAACAAGTCC GAGTGAACCT GACGATTGCT

110 AAAGAAATAA TGGACGCGTA TTAATGATAT GTTCAAGGCA AAATAAAAAA  
111 AAAGAAATAA TGGACGCGTA TTAATGATAT GTTCAAGGCA AAATAAAAAA

110 AAGGTGCGTG TGAAAAAAAC CGCTTAGTTT CGAGTATGAT GAAAAATTTT  
111 AAGGTGCGTG TGAAAAAAAC CGCTTAGTTT CGAGTATGAT GAAAAATTTT

110 GTGAAAATAG CTTCTCACAT TTTTGCTTAA AATTGACTTC ATACCGAGAA  
111 GTGAAAATAG CTTCTCACAT TTTTGCTTAA AATTGACTTC ATACCGAGAA

110 ACTGGCTTTT CAACACCGTT TAAGGAAG  
111 ACTGGCTTTT CAACACCGTT TAAGGAAG

## 8.2 Densitometrische Auswertung

Die Auswertung der Stärke der Banden aus den Western Blot-Analysen (unter 5.2.2.1) erfolgte durch densitometrische Analyse unter Verwendung der Computerprogramme Biocapt und Bio ID. Nachfolgend sind die ermittelten absoluten Werte für die Stärke der Banden des VanA-Ligase Proteins unter dem Einfluss einiger Zellwandsyntheseinhibitoren und verschiedener weiterer Antibiotika angegeben.

Zellwandsyntheseinhibitoren (Seite 58, 5.2.2.1, Abb. 10):

Spur 1	26 487	Spur 6	13 415
Spur 2	25 487	Spur 7	117 385
Spur 3	36 156	Spur 8	144 145
Spur 4	103 857	Spur 9	188 152
Spur 5	56 729		

verschiedene Antibiotika (Seite 60, 5.2.2.1, Abb. 11):

Spur 1	40 766	Spur 6	62 612
Spur 2	53 129	Spur 7	53 825
Spur 3	64 719	Spur 8	47 869
Spur 4	8 896	Spur 9	218 084
Spur 5	36 096		

### 8.3 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
Ap <sup>r</sup>	Ampicillin-resistent
ca.	circa
CDM	chemisch definiertes Medium
D-Ala	D-Alanin
DNase	Desoxyribonuklease
DNS	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintertraacetat
FPL	Flavophospholipol
FPL <sup>s</sup> / FPL <sup>r</sup>	Flavophospholipol-sensitiv, Flavophospholipol-resistent
g	Gramm
h	Stunde
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid
kb(p)	Kilobasen(paare)
kDa	Kilodalton
l	Liter
LB	Luria-Bertani
LGT-Agarose	„low-melting“-Agarose
M	molar
mM	millimolar
mg	Milligramm
MH	Müller-Hinton
MHK	minimale Hemmkonzentration
min	Minuten
ml	Milliliter
MRSA	Methicillin-resistenter <i>Staphylococcus aureus</i>
$\mu$ g	Microgramm
$\mu$ l	Microliter
ng	Nanogramm
OD <sub>600</sub>	Optische Dichte bei 600 nm Wellenlänge
PBS	„Phosphate Buffered Saline“
PBP	Penicillin-Bindeprotein
PCR	„Polymerase Chain Reaction“

---

PFGE	Pulsfeldgelelektrophorese
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
SDS	„Sodium Dodecyl Sulfate“
s	Sekunde
SSC	„Standard Saline Citrate“
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TE	Tris-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetraethylmethyldiamin
TRIS	Trishydroxymethylaminomethan
U	„Unit“, Angabe von Enzymaktivitäten
U/min	Umdrehungen pro Minute
V	Volt
Van/ Van <sup>r</sup>	Vancomycin/ Vancomycin-resistent
VRE	Vancomycin-resistente Enterokokken
VRSA	Vancomycin-resistenter <i>Staphylococcus aureus</i>

#### **8.4 Erklärungen**

Ich versichere hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel angefertigt habe.

Weiterhin versichere ich, dass die Dissertation bisher nicht in gleicher oder ähnlicher Form in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat und ich bisher keine akademischen Grade erworben oder zu erwerben versucht habe.

Würzburg, Dezember 2002

Sabine Riedl

## 8.5 Publikationen, Präsentationen und Berichte

- **Publikationen:**

**Schlör S., S. Riedl, J. Blaß, and A. Reidl.** 2000. Genetic rearrangements of the regions adjacent to genes encoding heat-labile enterotoxins (*eltAB*) of enterotoxigenic *Escherichia coli* strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 66:352-358

**Riedl S., K. Ohlsen, G. Werner, W. Witte, and J. Hacker.** 2000. Impact of flavophospholipol and vancomycin on conjugational transfer of vancomycin resistance plasmids. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44:3189-3192

- **Präsentationen:**

**Riedl, S., K. Ohlsen, and J. Hacker.** The effect of antibiotics on *vanA* plasmid transfer and on the induction of the VanA ligase in *Enterococcus faecium*. First international ASM conference on enterococci: pathogenesis, biology, and antibiotic resistance. February 27-march 2, 2000, Banff, Alberta, Canada.

- **Berichte:**

**Riedl, S., K. Ohlsen, and J. Hacker.** 1999. Investigations concerning the effect of flavophospholipol (FPL) and vancomycin on the gene transfer of plasmids carrying vancomycin resistance determinants. Report on the study, Intervet Innovation GmbH

**Riedl, S., K. Ohlsen, and J. Hacker.** 1999. Characterization of the induction of VanA ligase in vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* by antibiotics and stress. Report on the study, Intervet Innovation GmbH

**Riedl, S., K. Ohlsen, and J. Hacker.** 2000. Investigations concerning the transferability of flavophospholipol (FPL) resistance between FPL resistant and FPL sensitive *Enterococcus faecium* strains. Report on the study, Intervet Innovation GmbH

## 8.6 Lebenslauf

### Persönliche Daten

Name	Sabine Riedl
Geburtsdatum	02.09.1967
Geburtsort	Uffenheim, Landkreis Neustadt an der Aisch / Bad Windsheim

### Schulbildung

1974-1978	Grundschule in Uffenheim
1978-1987	Christian-von-Bomhard-Gymnasium in Uffenheim
Mai 1987	Abitur

### Berufsausbildung

1987-1989	Staatliche Berufsfachschule für technische Assistenten in der Medizin, Ingolstadt
-----------	---

### Studium

1991-1996	Studium der Biologie (Diplom) an der Julius-Maximilians-Universität Würzburg
1996-1997	Diplomarbeit mit dem Thema: „Charakterisierung von Bacteriophagen und Enterotoxin (LT) kodierenden Plasmiden aus <i>Escherichia coli</i> “
Oktober 1997	Abschluss: Diplom Biologin
Seit Oktober 1998	Anfertigung der Dissertation am Institut für molekulare Infektionsbiologie der Universität Würzburg unter der Anleitung von Herrn Prof. Dr. Dr. h. c. J. Hacker

---

**Berufstätigkeit**

1989-1991	Medizinisch technische Assistentin in der laborärztlichen Gemeinschaftspraxis Dr. Hermann/ Dr. Holzer in Würzburg
April bis September 1998	Diplom Biologin in der medizinischen Labor-gemeinschaft (MEDLAB) in Würzburg

Würzburg, Dezember 2002