

Aus dem Fachbereich Medizin
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
Frankfurt am Main

betreut am
Zentrum der Hygiene
Institut für Medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene
Direktor: Prof. Dr. Volkhard A. J. Kempf

**Untersuchungen zur Virulenz und Interaktion der Metallo- β -
Laktamase NDM mit dem humanen Komplementsystem**

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
des Fachbereichs Medizin
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
Frankfurt am Main

vorgelegt von
Larissa Neidert

aus Fulda

Frankfurt am Main, 2021

| | |
|-----------------------------|--------------------------|
| Dekan: | Prof. Dr. Stefan Zeuzem |
| Referent: | Prof. Dr. Peter Kraiczky |
| Korreferent/in: | Prof. Dr. Heiko Mühl |
| Tag der mündlichen Prüfung: | 04.05.2022 |

I. Inhalt

| | | |
|----------|--|-----------|
| 1 | Einleitung | 12 |
| 1.1 | Antibiotikaresistenzen als globale Bedrohung | 12 |
| 1.1.1 | Epidemiologie multiresistenter Erreger in Europa | 14 |
| 1.2 | Das Immunsystem und Komplement | 16 |
| 1.2.1 | Aktivierung des klassischen und des Lektinwegs | 18 |
| 1.2.2 | Aktivierung des alternativen Weges | 20 |
| 1.2.3 | Der terminale Weg | 22 |
| 1.2.4 | Regulation des Komplementweges | 22 |
| 1.3 | Beta-Laktamantibiotika und Resistenzen | 24 |
| 1.3.1 | Resistenzmechanismen von bakteriellen Erregern | 25 |
| 1.3.2 | Einteilung und Aufbau von Metallo- β -Laktamasen | 27 |
| 1.4 | Epidemiologie von NDM – der aktuelle Stand | 28 |
| 1.4.1 | NDM-Varianten und die Evolution der katalytischen Aktivität | 29 |
| 1.4.2 | Therapie von multiresistenten Bakterien mit NDM-Carbapenemasen | 32 |
| 1.5 | Fragestellungen und Ziele der Arbeit | 34 |
| 2 | Material | 35 |
| 2.1 | Verwendete Bakterienstämme und Larven | 35 |
| 2.2 | Nähr- und Kulturmedien | 35 |
| 2.3 | Chemikalien | 36 |
| 2.4 | Größenstandards | 38 |
| 2.5 | Test- und Reagenziensysteme | 38 |
| 2.6 | Geräte | 39 |
| 2.7 | Verbrauchsmaterialien | 41 |
| 2.8 | Antibiotika | 43 |
| 2.9 | Enzyme und Reagenzien zur Klonierung | 44 |
| 2.10 | Antikörper und Komplementkomponenten | 45 |
| 2.11 | Vektoren | 46 |
| 2.11.1 | TOPO-Vektor | 46 |
| 3 | Methoden | 47 |
| 3.1 | Patientendaten | 47 |
| 3.2 | Statistische Auswertung | 47 |
| 3.3 | Anzucht und Lagerung von Bakterien | 47 |
| 3.4 | Epsilonometer-Test und Agardiffusionstest | 47 |
| 3.5 | Mikrodilutionstest | 48 |
| 3.6 | Transformation von elektrokompetenten Bakterien | 48 |
| 3.7 | Transformation von chemisch kompetenten Bakterien | 49 |
| 3.8 | Isolierung von Plasmid-DNA | 49 |
| 3.9 | Sequenzierung von Plasmid-DNA | 50 |

| | | |
|----------|---|-----------|
| 3.10 | Polymerase-Kettenreaktion | 50 |
| 3.11 | Agarose-Gelelektrophorese..... | 50 |
| 3.12 | FX Cloning..... | 51 |
| 3.13 | Proteinproduktion in <i>E. coli</i> -Zellen und affinitätschromato-graphische Reinigung | 53 |
| 3.14 | Entfernen des CPD-Tags von Proteinen aus FX-klonierten Stämmen durch Proteolyse..... | 55 |
| 3.15 | Konzentrationsbestimmung gereinigter Proteine | 55 |
| 3.16 | Denaturierende Tris/Tricin–SDS–Polyacrylamid-Gelelektropho- rese | 55 |
| 3.17 | Nachweis separierter Proteine mittels Silbernitrat | 57 |
| 3.18 | Natürliches Humanserum | 58 |
| 3.19 | Komplementinhibitions-Test (WiELISA)..... | 59 |
| 3.20 | ELISA-basierter Protein-Protein Interaktionstest | 59 |
| 3.21 | Far Westernblot..... | 61 |
| 3.22 | Hämolytische Assays | 62 |
| 3.22.1 | Zellzahlbestimmung von Erythrozyten..... | 63 |
| 3.22.2 | Klassischer Weg..... | 63 |
| 3.22.3 | Terminaler Komplementweg..... | 64 |
| 3.23 | Enzym- und Aktivitätsmessungen..... | 65 |
| 3.24 | Virulenz und Therapie-Versuche mit dem <i>Galleria mellonella</i> - Infektionsmodell..... | 65 |
| 3.25 | Wachstumsversuche | 67 |
| 3.26 | Protein-Protein-Interaktion mittels Thermal Shift Assay | 68 |
| 3.27 | Protein-Protein Interaktion mittels Microscale-Thermophoresis- Verfahren..... | 68 |
| 4 | Ergebnisse..... | 70 |
| 4.1 | Epidemiologie <i>bla</i> _{NDM} -tragender Patientenisolat..... | 70 |
| 4.1.1 | Antibiotikaresistenzen von NDM-positiven Isolaten | 75 |
| 4.2 | Detektion der neuen Variante NDM-16b in klinischen Isolaten..... | 76 |
| 4.3 | Therapieversuche im <i>G. mellonella</i> -Modell | 78 |
| 4.3.1 | Pathogenität von klinischen Isolaten mit NDM-16b..... | 79 |
| 4.3.2 | <i>In vivo</i> Nachweis der Resistenz NDM-positiver Transformanten .. | 80 |
| 4.4 | Affinitätschromatographische Isolierung von NDM-Varianten und Reinheitsprüfung | 86 |
| 4.5 | Interaktion von NDM-Varianten mit dem humanen Komplementsystem | 88 |
| 4.5.1 | Vergleichende Untersuchung zur inhibitorischen Wirkung der NDM- Varianten auf das Komplementsystem | 88 |
| 4.5.2 | Untersuchungen zur Interaktion der NDM-Varianten mit dem Komplementsystem im hämolytischen Test..... | 91 |
| 4.5.3 | Untersuchung zur Bindung der Komplementkomponenten C3b, C3c, C4 und C4b an NDM-Varianten..... | 94 |

| | | |
|-----------|--|------------|
| 4.5.4 | Far Westernblot-Analyse zum Nachweis der Interaktion von NDM-1 Δ 28 mit Komplementfaktoren | 96 |
| 4.5.5 | Thermal Shift Assay zum Nachweis von Protein-Protein Interaktion | 97 |
| 4.5.6 | Nachweis von Protein-Protein Interaktionen mittels Thermophorese | 98 |
| 5 | Diskussion | 101 |
| 5.1 | NDM-Varianten und Erregerspezies in epidemiologischen Erhebungen | 101 |
| 5.1.1 | Bedeutung der Daten für nosokomiale Infektionen | 102 |
| 5.1.2 | Kritische Resistenzlage unter den untersuchten Isolaten | 103 |
| 5.2 | Resistenzvermittlung durch NDM im <i>G. mellonella</i> -Modell | 104 |
| 5.2.1 | Effektivität von Antibiotikatherapien im <i>G. mellonella</i> -Modell..... | 105 |
| 5.3 | Interaktion von NDM-1 mit dem humanen Komplementsystem | 106 |
| 5.3.1 | Nachweis der Komplementinhibierung durch NDM und weitere Einordnung der Immunevasionsstrategie | 108 |
| 5.3.2 | Thermal Shift Assay und Microscale Thermophorese als Verfahren zur Bestätigung einer Protein-Protein-Interaktion | 110 |
| 5.3.3 | Ausblick auf weiterführende Forschungsansätze..... | 111 |
| 6 | Zusammenfassung..... | 113 |
| 7 | Summary..... | 115 |
| 8 | Literaturverzeichnis | 117 |
| 9 | Schriftliche Erklärung | 130 |
| 10 | Lebenslauf | 131 |

II. Abbildungsverzeichnis

| | |
|---|----|
| Abbildung 1: Evolution der Antibiotikaentwicklung und der Resistenzen..... | 13 |
| Abbildung 2: Verteilung der DALYs in Europa..... | 15 |
| Abbildung 3: Ablauf der Komplementkaskade..... | 18 |
| Abbildung 4: Gleichgewicht zwischen Bildung und Degradierung von C3b.... | 21 |
| Abbildung 5: Verschiedene bakterielle Resistenzmechanismen | 26 |
| Abbildung 6: Sequenzvergleich der NDM-Varianten 1-16..... | 30 |
| Abbildung 7: NDM-Varianten und deren Mutationen | 32 |
| Abbildung 8: Schematische Darstellung ELISA..... | 60 |
| Abbildung 9: Injektion von <i>G. mellonella</i> -Larven | 67 |
| Abbildung 10: Prinzip der Microscale Thermophoresis-Methode | 69 |
| Abbildung 11: Verteilung der NDM-Varianten am Universitätsklinikum Frankfurt von 2007-2017..... | 71 |
| Abbildung 12: Verteilung der Nachweislokalisationen für Erreger mit NDM ... | 72 |
| Abbildung 13: Unterscheidung in Kolonisation und Infektion..... | 73 |
| Abbildung 14: Speziesverteilung der NDM-positiven Erreger..... | 74 |
| Abbildung 15: Resistenzprofil der getesteten Enterobacterales-Isolate | 76 |
| Abbildung 16: Gelelektrophoretische Auftrennung der Plasmide der Isolate.. | 77 |
| Abbildung 17: Flussdiagramm für die Durchführung von Therapieversuche mit <i>G. mellonella</i> | 79 |
| Abbildung 18: Logarithmierte LD ₅₀ -Werte für die klinischen Isolate..... | 80 |
| Abbildung 19: Logarithmierte LD ₅₀ -Werte für <i>G. mellonella</i> Versuche mit Transformanten | 83 |
| Abbildung 20: Einfluss von NDM auf die Therapieeffizienz im <i>G. mellonella</i> Infektionsmodell..... | 85 |
| Abbildung 21: Therapie mit Imipenem über einen Zeitverlauf von 48 Stunden. | 86 |
| Abbildung 22: Überprüfung der Reinheit von His-getaggten NDM-Proteinen. | 87 |
| Abbildung 23: Inhibitorischer Einfluss der drei NDM-Varianten auf die Komplementwege..... | 90 |
| Abbildung 24: Konzentrationsabhängige Inhibition des klassischen Weges durch NDM-1Δ28..... | 91 |

| | |
|---|-----|
| Abbildung 25: Inaktivierung des klassischen Weges durch NDM-Varianten (hämolytischer Test) | 92 |
| Abbildung 26: Untersuchung zur Interaktion der NDM-Varianten mit dem terminalen Weg | 93 |
| Abbildung 27: Untersuchung zur Bindung von C4 und C4b an NDM-Varianten. | 95 |
| Abbildung 28: Untersuchung der Bindung von unterschiedlichen NDM-Varianten an C3b und C3c | 96 |
| Abbildung 29: Nachweis der Bindung von NDM-1 Δ 28 an verschiedene Komplementkomponenten..... | 97 |
| Abbildung 30: Nachweis der Interaktion mittels Thermal Shift Assay | 98 |
| Abbildung 31: Nachweis der Markierungseffizienz von NDM-1 Δ 28 mittels Thermophorese | 99 |
| Abbildung 32: Thermophorese mit NDM-1 Δ 28 und C4b | 100 |
| Abbildung 33: Beispiele bakterieller Komplement-Evasionsstrategien | 108 |

III. Tabellenverzeichnis

| | |
|---|----|
| Tabelle 1: Regulation der Komplementkaskade ⁴² | 24 |
| Tabelle 2: Klassifikation von Beta-Laktamasen ^{56,59} | 27 |
| Tabelle 3: In dieser Arbeit verwendete Bakterienstämme | 35 |
| Tabelle 4: Verwendete Nähr- und Kulturmedien..... | 35 |
| Tabelle 5: Verwendete Chemikalien | 36 |
| Tabelle 6: Verwendete Größenstandards..... | 38 |
| Tabelle 7: Verwendete Test- und Reagenziensysteme | 38 |
| Tabelle 8: Verwendete Geräte..... | 39 |
| Tabelle 9: Verwendete Verbrauchsmaterialien..... | 41 |
| Tabelle 10: Verwendete Epsilometer-Teststreifen..... | 43 |
| Tabelle 11: Verwendete Antibiotika für die Mikrodilution und Selektion von Bakterien | 44 |
| Tabelle 12: Verwendete Enzyme und Puffer zur Klonierung | 44 |
| Tabelle 13: Verwendete Antikörper | 45 |
| Tabelle 14: Verwendete Komplementkomponenten..... | 45 |
| Tabelle 15: Verwendete Oligonukleotide in dieser Arbeit | 50 |
| Tabelle 16: Zusammensetzung des TAE-Puffers für die Agarose- Gelelektrophorese | 51 |
| Tabelle 17: Reaktionsansatz für die Klonierung in den Vektor pNITcat..... | 51 |
| Tabelle 18: Reaktionsansatz für Klonierung in den Expressionsvektor pBXK-CPD | 52 |
| Tabelle 19: Zusammenfassung der durch FX-Klonierung erhaltenen <i>E. coli</i> Stämme | 53 |
| Tabelle 20: Bakterienstämme für die Proteinproduktion | 53 |
| Tabelle 21: Zusammensetzung des Lysepuffers | 54 |
| Tabelle 22: Zusammensetzung der Lösungen für ein Tris/Tricin SDS- Polyacrylamid-Gel | 56 |
| Tabelle 23: Verwendete Puffer für die denaturierende TT-SDS-Polyacrylamid- Gelelektrophorese | 57 |
| Tabelle 24: Zusammensetzung der Lösungen für die Färbung von Proteinen mit Silbernitrat | 58 |
| Tabelle 25: Zusammensetzung der Puffer für den ELISA | 61 |

| | |
|---|-----|
| Tabelle 26: Zusammensetzung der Puffer für die Far Westernblot-Analyse | 62 |
| Tabelle 27: Vergleich der Isolate EC3424, EC3425 und EC3426 | 78 |
| Tabelle 28: Für Virulenzversuche in <i>G. mellonella</i> verwendete Transformanten | 81 |
| Tabelle 29: Mikrodilutions-MHKs von NDM-transformierten <i>K. pneumoniae</i> PRZ-Isolaten..... | 82 |
| Tabelle 30: NDM-Varianten zur Primärspezies nach Khan et al. ¹²⁵ | 102 |

IV. Abkürzungen

| | |
|-------------------|---|
| Abb. | Abbildung |
| ABS | <i>Antibiotic Stewardship</i> Programm |
| AmpC | AmpC-Beta-Laktamase |
| APS | Ammoniumperoxidisulfat |
| AWMF | Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften e.V. |
| Azi ^R | Natriumazid-Resistenz |
| BCA | Bicinchoninsäure |
| BHI | Hirn-Herz-Bouillon |
| <i>bla</i> | Beta-Laktamase |
| Bp | Basenpaar |
| BSA | Bovines Serumalbumin |
| C4BP | C4b-bindendes Protein |
| CLSI | Clinical and Laboratory Standards Institute |
| DALY | Behinderungsbereinigte Lebensjahre (<i>“Disability- adjusted life years”</i>) |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| EARS-Net | “European Antimicrobial Resistance Surveillance Network” |
| EDTA | Ethylendiamintetraessigsäure |
| ESBL | Beta-Laktamasen mit erweitertem Spektrum |
| EUCAST | „European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing“ |
| F | Faktor (B, D oder I) |
| FCS | fetales Kälberserum (<i>„fetal calf serum“</i>) |
| GVB ⁺⁺ | Gelatine-Veronal-Puffer mit Mg ²⁺ und Ca ²⁺ |
| HRP | Meerrettichperoxidase |
| Ig | Immunglobulin |
| IMP | Imipenemase |
| Kan | Kanamycin |
| Kan ^R | Kanamycin-Resistenz |
| KBE | Kolonie bildende Einheiten |
| K _M | Michaelis-Menten-Konstante |
| KPC | <i>Klebsiella pneumoniae</i> Carbapenemase |
| LB | LB-Medium (<i>„Lysogeny broth“</i>) |

| | |
|-------------------|--|
| LDH | Laktatdehydrogenase |
| LPS | Lipopolysaccharid |
| MAK | Membran-Angriffs-Komplex |
| MASP | MBL-assoziierte Serinprotease |
| MBL | Mannose-bindendes Lektin |
| MDR | multiresistent („ <i>Multi drug resistance</i> “) |
| MHK | Minimale Hemmkonzentration |
| min | Minute |
| MRGN | Multiresistente Gram-negative Bakterien |
| MRSA | Methicillin-resistenter <i>Staphylococcus aureus</i> |
| MST | Microscale thermophoresis |
| NDM | New Delhi Metallo- β -Laktamase |
| OD ₆₀₀ | optische Dichte bei 600 nm |
| Oxa | Oxacillinase |
| PBS | Phosphat-gepufferte Saline |
| RT | Raumtemperatur |
| SARS-CoV-2 | Schweres akutes Atemwegssyndrom-Coronavirus-2 |
| SDS | Natriumdodecylsulfat („sodium dodecyl-sulphate“) |
| Tab. | Tabelle |
| TBS | Tris-gepufferte Saline |
| TEMED | N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin |
| TMB | 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin |
| TT | Tris/Tricin |
| Upm | Umdrehungen pro Minute |
| VIM | Verona integron-encoded Metallo- β -Laktamase |
| VRE | Vancomycin-resistente Enterokokken |
| WGS | Gesamtgenomsequenzierung („whole genome sequencing“) |
| WHO | World Health Organization |
| XDR | extrem resistant („extensively drug-resistant“) |
| Zeo | Zeocin |
| Zeo ^R | Zeocin-Resistenz |

1 Einleitung

Durch die SARS-CoV-2-Pandemie wurden Infektionskrankheiten im Jahr 2020 schlagartig auf die Agenda von Industriestaaten mit hohem Technologie- und Gesundheitsstandard gesetzt. Ohne eine gezielte medikamentöse Behandlungsmethode verblieben die Symptomkontrolle und verstärkte Hygienemaßnahmen als wichtigste Pfeiler in der Therapie, sodass auch hochentwickelte Gesundheitssysteme dem Virus ausgeliefert sind. Auch bei bakteriellen Infektionen reduzieren sich die Therapiealternativen durch beschleunigte Entwicklung der antimikrobiellen Resistenzen. Dabei konzentrieren sich die Gefahren für die öffentliche Gesundheit neben Methicillin-resistentem *Staphylococcus aureus* (MRSA) und multiresistenten Stämmen des Tuberkulose-Erregers *Mycobacterium tuberculosis* besonders auf multiresistente Gram-negative Erreger (MRGN)¹. Hierbei handelt es sich um Gram-negative Stäbchenbakterien, die gegen vier etablierte Antibiotikaklassen Resistenzen entwickelt haben: Penicilline, Cephalosporine, Fluorchinolone und Carbapeneme. Die Resistenz gegen Carbapeneme wie z. B. Imipenem und Meropenem, aktuell die Antibiotika mit dem breitesten bekannten Wirkspektrum, unterscheidet sie von 3MRGN-Erregern. Daher sind besonders die Resistenzen gegenüber Carbapenemen so gefährlich und Bestandteil aktueller Forschungsaktivitäten.

Mit der Entdeckung einer neuen Variante von New Delhi Metallo- β -Laktamase (NDM) am Universitätsklinikum Frankfurt im Jahr 2016 ergab sich die Möglichkeit, diese Resistenzdeterminante im Rahmen dieser Arbeit genauer zu untersuchen.

1.1 Antibiotikaresistenzen als globale Bedrohung

Auf der Liste der zehn größten Gefahren für die globale Gesundheit der WHO stehen Antibiotikaresistenzen im Jahr 2019 an fünfter Stelle², insgesamt sind fünf Gefahren unterschiedlichen Infektionskrankheiten gewidmet. Ebenfalls gelistet sind chronische Erkrankungen wie Bluthochdruck, Diabetes oder Krebs. Zusätzlich ist im aktuellen Aktionsplan zum Umgang und der Verhinderung von

Resistenzen neben Primärprävention und gewissenhaftem Umgang mit Antibiotika auch die Förderung von Forschungsprojekten ein zentraler Aspekt³. Beunruhigend ist der Rückgang in der Entwicklung neuer, wirksamer Antibiotika und die Dynamik der Resistenzsituation seit den 1960er und 70er Jahren⁴ (Abbildung 1). Nach der „Goldenen Ära“, der Erforschung neuer Antibiotikaklassen in den 50er Jahren, folgte eine lange Phase der Stagnation, währenddessen die Substanzen in ihrer Molekülstruktur angepasst wurden und die Bioverfügbarkeit und Pharmakokinetik genauer erforscht wurden. Innerhalb der letzten 20 Jahre wurden zwar bestehende Antibiotikaklassen weiterentwickelt, doch nur wenige Substanzen haben tatsächlich einen neuen Wirkmechanismus, so zum Beispiel Daptomycin⁵, Linezolid⁶ oder Dalbavancin/Quinupristin, das nur gegen Gram-positive Erreger wirkt⁷.

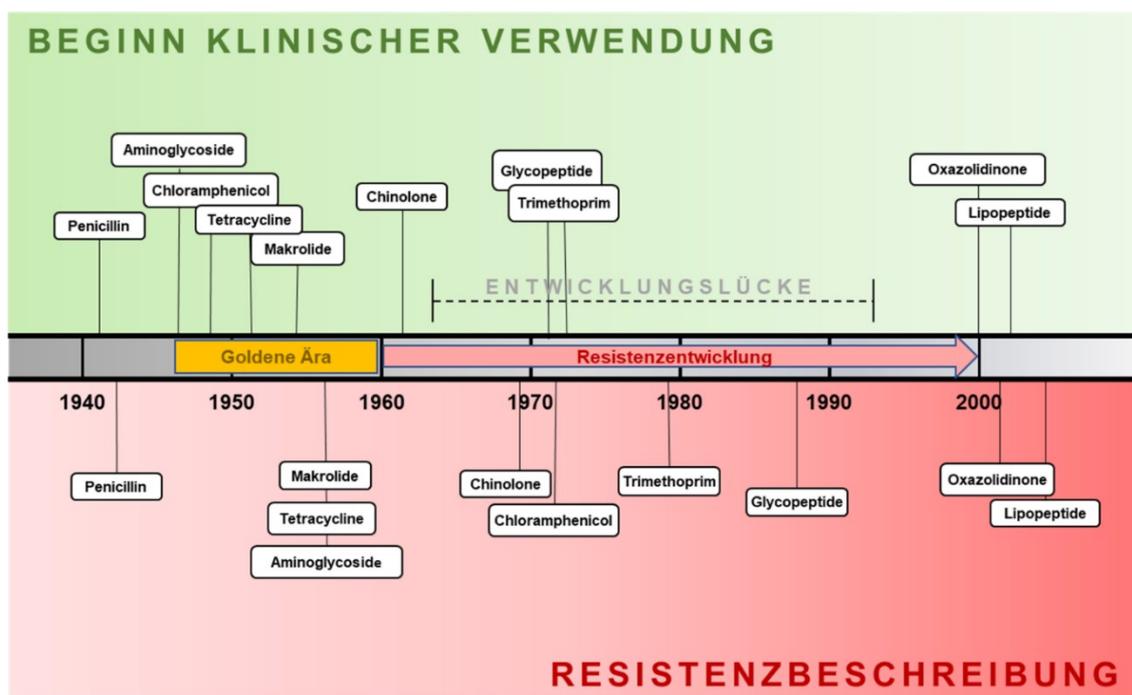


Abbildung 1: Evolution der Antibiotikaentwicklung und der Resistenzsituation. Gleichzeitig beschleunigt sich die Entwicklung von bakteriellen Resistenzen, zum Beispiel durch den unbedachten Einsatz von und der Verschmutzung der Umwelt durch Antibiotika⁸. Der Einsatz von Antibiotika im Agrarwesen und in der Massentierhaltung fördert die Resistenzentwicklung^{9,10}.

Überdies zählt zu den angesprochenen Herausforderungen laut dem Aktionsplan der WHO auch die dürftige Informationslage flächendeckender, epidemiologischer Daten zu Resistenzen.

1.1.1 Epidemiologie multiresistenter Erreger in Europa

Der Nachweis von nosokomialen Infektionen sowie das Screening auf multiresistente Erreger variiert in Europa von Staat zu Staat und auch innerhalb einzelner Krankenhäuser¹¹. Das European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net) sammelt solche Informationen europaweit. Erschwerend kommt hinzu, dass keine einheitliche, Länder-übergreifende Definition in Bezug auf Multiresistenz und nosokomiale Infektion besteht¹². In einer Studie von Cassini *et al.* wurde erstmals ausgewertet, wie sich nosokomiale Infektionen auf die Lebensqualität auswirken und die DALYs („*disability adjusted life years*“) bestimmt¹³. Dabei hat sich gezeigt, dass Infektionen mit multiresistenten Erregern in der europäischen Union und dem gleichnamigen Wirtschaftsraum zu 170 DALYs pro 100.000 Einwohnern führen (Abbildung 2) und damit einen vergleichbaren Einfluss auf die Lebensqualität haben wie zusammengenommen Tuberkulose, HIV und Influenza, die drei weltweit schwerwiegendsten Infektionskrankheiten.

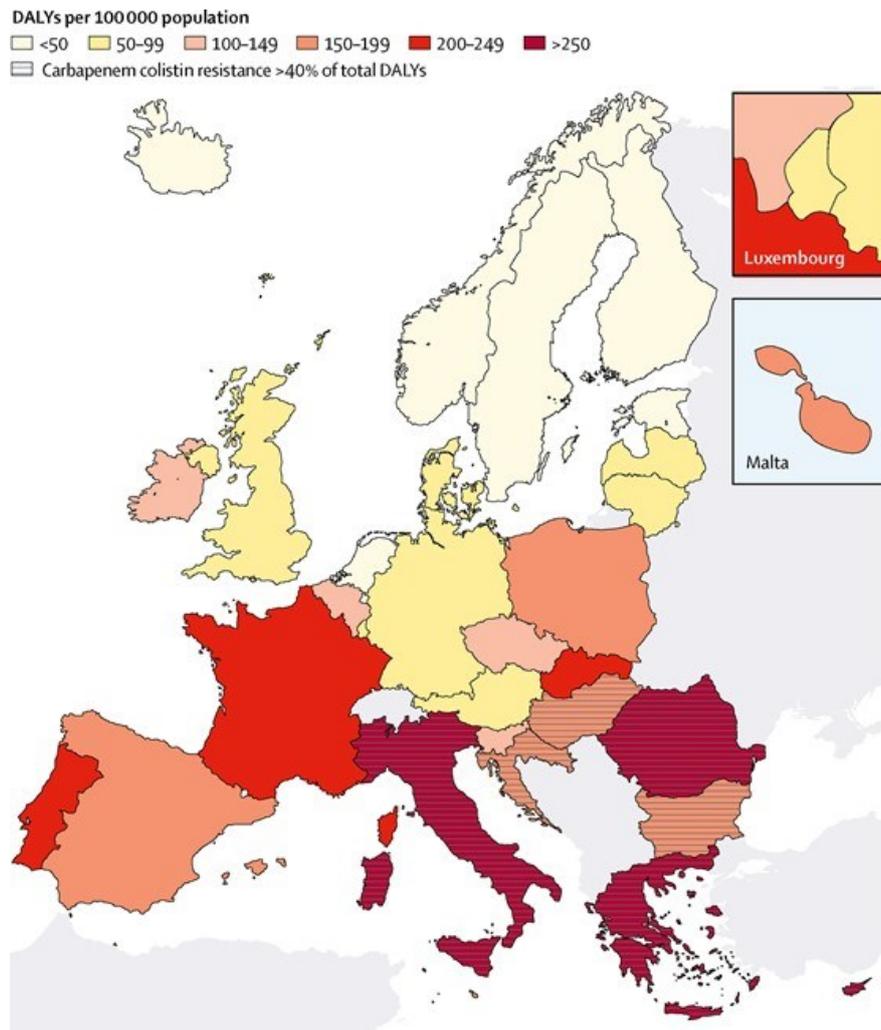


Abbildung 2: Verteilung der DALYs aufgrund von Infektionen mit multiresistenten Erregern pro 100.000 Einwohner in Europa. Der schraffierte Bereich zeigt die Länder, in denen der Anteil der Carbapenem- und Colistin-resistenten Erreger mehr als 40% beträgt mit einem deutlichen Nord-Süd-Gefälle (modifiziert nach Cassini *et al.*, 2015).

Jährlich lassen sich etwa 33.000 Todesfälle einer vorangegangenen Infektion mit multiresistenten Erregern zuordnen, wobei die Zahl der gesamten Infektionen insgesamt bei 670.000 Fällen liegt. Besonders viele Infektionen sind in den südöstlichen Ländern Europas zu verzeichnen, die Spitzenpositionen werden von Italien und Griechenland eingenommen (Abbildung 2).

Nicht zuletzt stellt eine Behandlung von multiresistenten Erregern auch eine ökonomische Belastung des Gesundheitssystems dar. Für Deutschland werden die zusätzlichen Kosten auf bis zu 17.000 € pro Patient und Jahr geschätzt¹⁴. Zwar existieren heutzutage im Bereich der Krebstherapie oder der Autoimmunerkrankungen wesentlich teurere Therapien, Multiresistenzen

könnten allerdings durch strikte Einhaltung bestehender Hygienekonzepte drastisch reduziert werden.

Gerade im Bereich der epidemiologischen Fragestellungen ist durch die Weiterentwicklung der Gensequenzierung großer Fortschritt geleistet worden. Konnten durch die Sanger-Sequenzierung nur etwa 1000 Basen fortlaufend bestimmt werden, ergab sich innerhalb der letzten 15 Jahre mithilfe der Gesamtgenomsequenzierung (Whole Genome Sequencing) die Möglichkeit, dass die gesamte genetische Information eines Erregers ermittelt werden kann. Bei dieser Methode wird eine Vielzahl von kurzen, genetischen Abschnitten amplifiziert und die ermittelten Sequenzen miteinander verglichen, um Überlappungen zu ermitteln. Diese werden mit speziellen Computerprogrammen miteinander verbunden („assembly“) und die erhaltenen Sequenzen mit den in Datenbanken hinterlegten Sequenzen abgeglichen („mapping“). Die Relevanz solch umfassender Studien wird besonders unter epidemiologischen Gesichtspunkten deutlich, da bei Kenntnis der lokalen Resistenzlage eine optimale, kalkulierte, antibiotische Therapie erfolgen kann.

1.2 Das Immunsystem und Komplement

Das humane Immunsystem verfügt über wirkungsvolle Verteidigungsmechanismen, um pathogene Krankheitserreger wie Viren und Bakterien zu erkennen und abzutöten. Es lässt sich in die angeborene und die adaptive Immunabwehr unterscheiden. Bei der adaptiven Immunabwehr wird durch den Kontakt von B-Zellen mit bisher unbekanntem Antigenen die Bildung von spezifischen Antikörpern angeregt, die teilweise lebenslang im Blut zirkulieren und zu späteren Zeitpunkten, die in den Körper eindringenden Krankheitserreger sofort erkennen und eliminieren. Für die angeborene Immunabwehr des menschlichen Körpers ist, neben den physikalischen Barrieren, wie z.B. der Haut und den dort befindlichen Langerhans-Zellen¹⁵, das Komplementsystem die schnellste und effektivste Antwort des Immunsystems auf eindringende Mikroorganismen. Dieses Abwehrsystem wird innerhalb von Sekunden durch unterschiedliche mikrobielle Bestandteile aktiviert, sodass die

Erreger erkannt, markiert und direkt eliminiert werden¹⁶. Die Faktoren des humanen Komplementsystem sind nicht nur im Blut vorhanden, sondern stehen einer Abwehr auch in verschiedenen menschlichen Geweben und Flüssigkeiten zur Verfügung¹⁷. Das Komplementsystem kann durch drei unterschiedliche Wege aktiviert werden: den klassischen Weg, den Lektinweg und den alternativen Weg. Trotz dieser Einteilung zeigt sich bei der Komplementaktivierung eine Interaktion zwischen den einzelnen Aktivierungswegen¹⁸. Insbesondere auf der Aktivierungsstufe der zentralen Komplementkomponente C3b vereinen sich der klassische, alternative und der Lektinweg¹⁹ (Abbildung 3).

Der klassische Weg wird vor allem durch körpereigene Immunkomplexe getriggert, dazu gehören IgG und IgM, wodurch die Verzahnung zum adaptiven Immunsystem deutlich wird. Durch die Bildung der Antikörper wird gleichzeitig das Komplementsystem aktiviert. Der Lektinweg zielt auf die Erkennung bakterieller Strukturen. Im Gegensatz zu diesen spezifischen Aktivatoren, ist die Aktivierung des alternativen Weges unspezifischer und unterliegt vielmehr der Bildung und Degradierung von C3b.

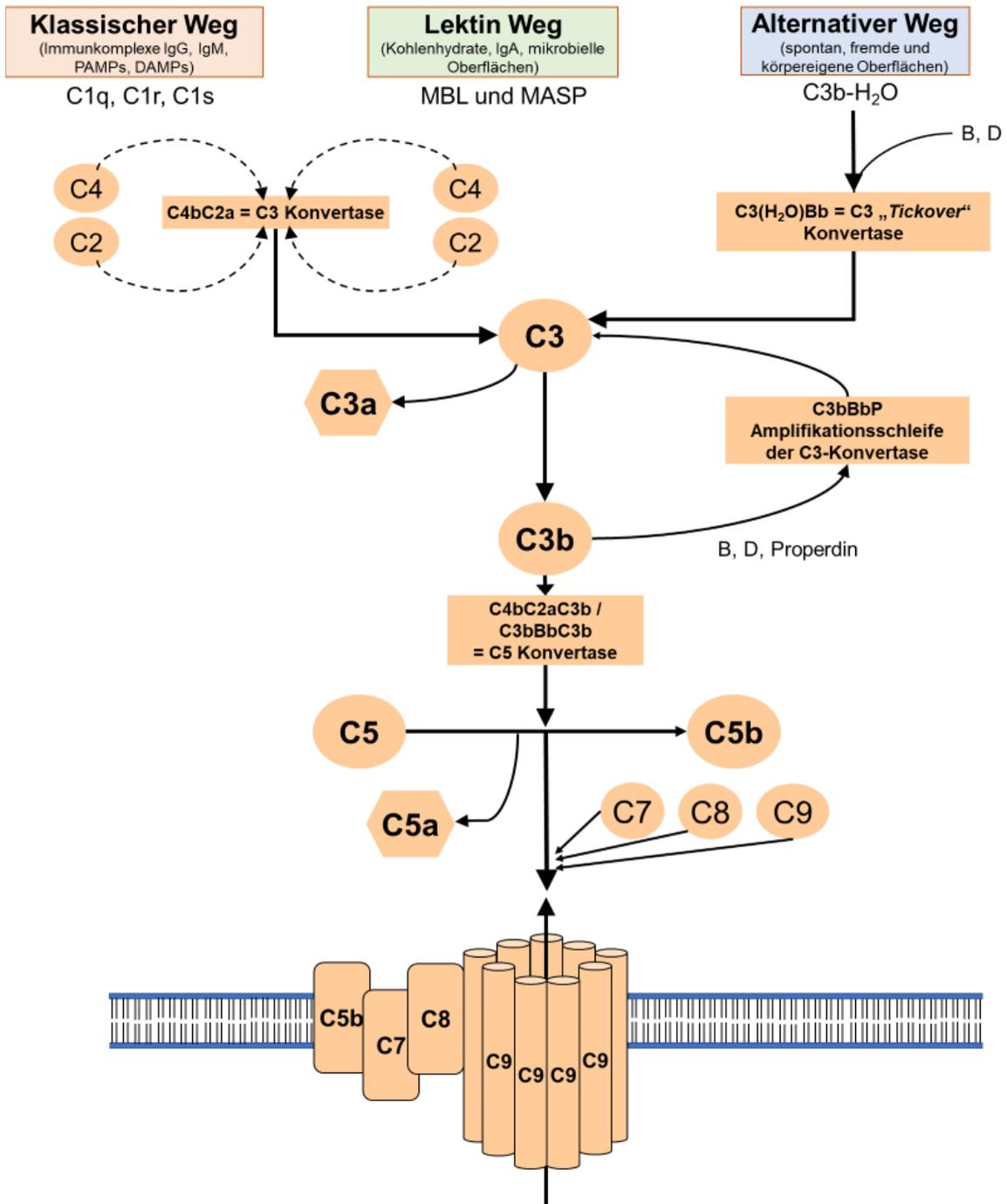


Abbildung 3: Ablauf der Komplementkaskade

1.2.1 Aktivierung des klassischen und des Lektinwegs

Der klassische Weg und der Lektinweg unterscheiden sich hauptsächlich in der initialen Aktivierung und der daran beteiligten Komponenten bzw. Faktoren. Die bei der Aktivierung des klassischen Weges maßgeblich beteiligte Komponente

ist C1q, das durch seine Tulpenstrauß-ähnliche Struktur multiple Bindungsstellen aufweist²⁰. Neben den bekannten Interaktionspartnern IgM und IgG, die direkt an Zelloberflächen und mikrobiellen Antigenen binden, wurden etwa 100 weitere Bindungspartner beschrieben²⁰. So kann C1q unter anderem Moleküle auf der Zelloberfläche von apoptotischen Zellen erkennen, wie beispielsweise Phosphatidylserine²¹, DNA²² und Annexine²³. Bei einer Bindung von C1q kommt es anschließend zur Aktivierung der Serinproteasen C1s und C1r²⁴. Aktiviertes C1s kann C2 in C2a und C2b sowie C4 in C4a und C4b spalten, wodurch nach Bindung von C4b an die betreffende Oberfläche und Anlagerung von C2a, die C3-Konvertase, C4bC2a entsteht.

Die entscheidenden Moleküle für die Initiation des Lektinwegs sind das Mannose-bindende Lektin (MBL), Ficoline und Kollektine, die eine strukturelle Ähnlichkeit mit C1q aufweisen^{25,26}. Kollektine wie auch MBL sind in der Lage Kohlenhydrate zu erkennen, MBL und Ficoline können zusätzlich spezifisch N-Acetylglucosamin, ein Bestandteil der bakteriellen Zellwand, binden. Damit können Strukturen, die auf der mikrobiellen Oberfläche präsentiert werden, erkannt werden²⁵. Für die Bildung der C3-Konvertase erfolgt initial eine Bindung der MBL-assoziierte Serinproteasen MASP-1, -2 und -3 an die gebildeten MBL-Komplexe. Während der Komplex aus C1q, C1r und C1s essentiell für die Bildung der C3-Konvertase ist, binden im Lektinweg etwa 70% der Komplexe entweder an MASP-1 oder MASP-2²⁷. MASP-1 ist in der Lage, C2 zu spalten und MASP-2 zu aktivieren, das wiederum C2 in C2a und C2b sowie C4 in C4a und C4b spalten kann. Daher erfordert die Bildung der C3-Konvertase die Aktivierung beider Serinproteasen, also sowohl MASP-1 als auch MASP-2. An dieser Stelle „vereinigen“ sich beide Aktivierungswege, um die Spaltung von C3 in C3a und C3b zu initiieren und die C5-Konvertase (C4bC2aC3b) zu generieren. Durch die verschiedenen Initiatorproteine des klassischen und Lektinwegs ist das angeborene Immunsystem in der Lage, zwischen fremd und eigen zu unterscheiden und eindringende Mikroorganismen zu eliminieren.

1.2.2 Aktivierung des alternativen Weges

Lachmann *et al.*²⁸ beschreibt das Prinzip der Aktivierung des alternativen Weges als ein chemisches Gleichgewicht zweier Zyklen. Auf der einen Seite steht der Abbau von aktiviertem C3b und auf der anderen Seite der Vorkopplungsmechanismus (Abbildung 4), das heißt die gesteigerte Amplifikation von aktivierten C3b-Molekülen. Ob C3b nun vorrangig abgebaut oder generiert wird, hängt von verschiedenen Faktoren ab. Durch den sogenannten „tick-over“-Mechanismus wird die Komplementkomponente C3 aktiviert, indem durch spontane Hydrolyse in der Flüssigphase C3 zu C3(H₂O) gebildet wird. An das aktivierte C3(H₂O) kann nun Faktor B (FB) binden und wird daraufhin durch Faktor D (FD) in Bb und Ba gespalten²⁹. Es bildet sich eine instabile C3-Konvertase C3(H₂O)Bb in der Flüssigphase, die eine gesteigerte Spaltung von C3 in C3b und C3a katalysiert¹⁶. C3a als Spaltprodukt dieser Reaktion wirkt als wichtiges Anaphylatoxin aktivierend auf Makrophagen und hat zudem auch eine direkte antimikrobielle Wirkung durch Bindung an Lipopolysaccharide³⁰. Die Aktivierung des alternativen Weges erfolgt initial durch die Bindung von C3b über einen reaktiven Thioester an die mikrobielle Oberfläche. Durch die Anlagerung von FB bildet sich die C3-Prokonvertase C3bB²⁹. FB wird erneut durch FD aktiviert, sodass das Fragment Ba von Bb abgespalten wird und die Bildung der membrangebundenen C3-Konvertase C3bBb entsteht. Durch eine Amplifikationsschleife wird die Bildung von weiteren C3b-Molekülen verstärkt. Die C3-Konvertase kann durch den „positiven“ Regulator des Komplementsystems, Properdin, stabilisiert und damit eine kontinuierliche Amplifikation unterstützt werden³¹.

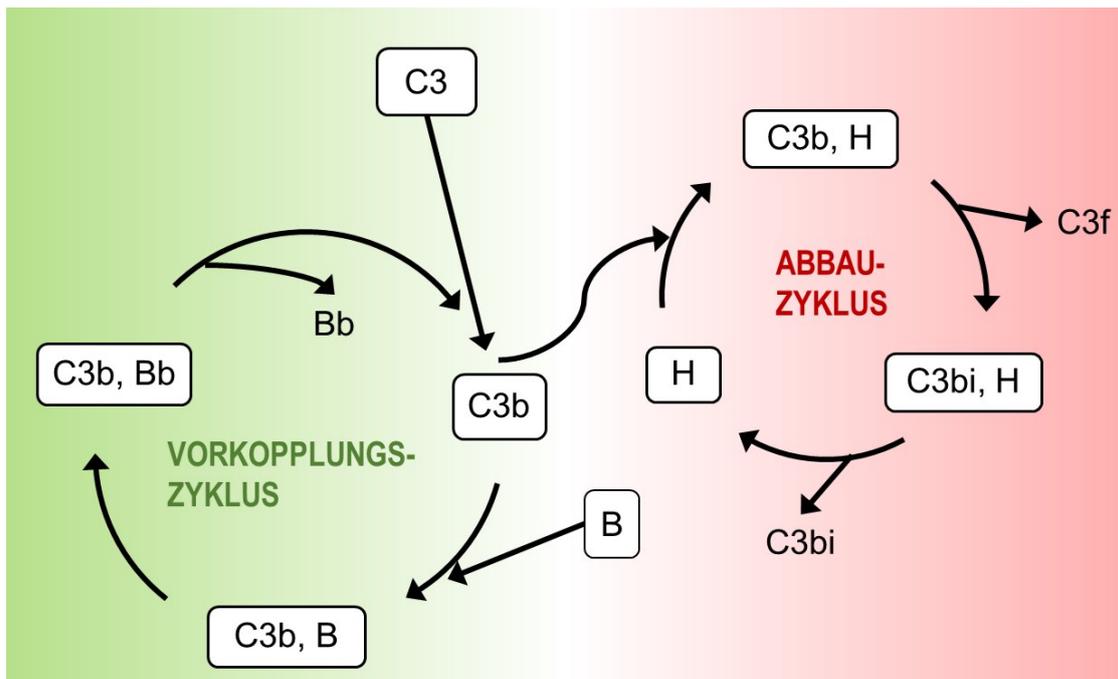


Abbildung 4: Gleichgewicht zwischen Bildung und Degradierung von C3b. Auf den Vorkopplungsmechanismus zum vermehrten Aufbau von C3b hat unter anderem Faktor B einen positiven Einfluss. Über Faktor H hingegen wird die Degradierung von C3b beschleunigt. Ebenfalls dargestellt ist die Verstärkung der Amplifikationsschleife durch C3b selbst. Bei vermehrtem Vorliegen von C3b wird auch die Aktivierung des alternativen Weges massiv verstärkt (modifiziert nach Lachmann et al.).

Dieses Gleichgewichtsprinzip unterscheidet den alternativen Weg vom klassischen und dem Lektinweg. Der klassische Weg wird vor allem durch körpereigene Immunkomplexe getriggert, dazu gehören IgG und IgM, wodurch die Verzahnung zum adaptiven Immunsystem deutlich wird. Durch die Bildung der Antikörper wird gleichzeitig das Komplementsystem aktiviert. Der Lektinweg zielt auf die Erkennung bakterieller Strukturen. Im Gegensatz zu diesen spezifischen Aktivatoren, ist die Aktivierung des alternativen Weges unspezifischer und von der Bildung und Degradierung von C3b abhängig. Dadurch unterliegt der alternative Weg einem wesentlich engmaschigeren Kontrollsystem. Alle drei beschriebenen Wege münden in die terminale Aktivierungssequenz des Komplementsystems und damit zur Lyse von eingedrungenen Mikroorganismen.

1.2.3 Der terminale Weg

Durch die Bindung von C3b an die C3-Konvertase des klassischen oder Lektinwegs (C2aC4b) oder des alternativen Weges (C3bBb) entsteht die sogenannte C5-Konvertase²⁹. Die C5-Konvertase katalysiert die Spaltung von C5 in C5a und C5b, wovon C5a ebenfalls als Anaphylatoxin wirkt. Ähnlich zu C3a spielt es eine Rolle bei der Rekrutierung von Makrophagen sowie der Inflammation³². Im nächsten Schritt bildet sich ein Komplex aus C5b und den Komponenten C6 und C7 (C5b-7), der sich an die äußere Membran von Erregern anlagert. Durch die Rekrutierung der Komplementkomponente C8 und zahlreicher C9-Komponenten (Autopolymerisierung) entsteht der Membran-Angriffs-Komplex (MAK), der durch seine Porenform die Stabilität der mikrobiellen Zellmembran zerstört³³. Zellen können durch die perforierte Zellwand ihren Elektrolythaushalt nicht aufrechterhalten und werden lysiert.

Unreguliert bzw. inhibiert führt der terminale Weg immer in eine Zellzerstörung. Deshalb gehen viele Komplementdefekte mit fatalen Folgen einher. So beruht beispielsweise die allergische Reaktion vom Typ III auf einer Hochregulierung des Komplementsystems mit Freisetzung von anaphylaktischen Molekülen wie z.B. C3a. Durch eine lokale Entzündungsreaktion an der Gefäßwand kann eine sogenannte Vaskulitis entstehen. Um unkontrollierte, überschießende Reaktionen des Komplementsystems zu verhindern und zu unterdrücken, gibt es ein komplexes Regulationssystem, das aus verschiedenen Proteinen besteht.

1.2.4 Regulation des Komplementweges

Aufgrund der zytotoxischen Effekte, die das aktivierte Komplementsystem auf eigene Zellen und Gewebe ausübt, ist eine Regulation der Kaskade unerlässlich. Die Aktivierung der Kaskade muss daher auf körperfremde Zellen begrenzt werden, wobei körpereigene Zellen geschützt werden sollten¹⁹.

Der klassische Weg wird über den C1-Esterase Inhibitor (C1-INH) reguliert. Dieses Protein bindet kovalent an C1r und C1s und verhindert die Komplexbildung mit C1q und alle nachfolgenden Aktivierungsprozesse^{34,35}. Dennoch kann die inhibitorische Wirkung von C1-INH durch aktivierende

Immunkomplexe überwunden werden. Der klassische und der Lektinweg werden auch auf der Aktivierungsstufe von C4 durch das C4b-bindende Protein (C4BP) reguliert, welches gemeinsam mit Faktor I (FI) C4b zu iC4b inaktiviert³⁶. C4BP ist auch in der Lage, den Zerfall der gebildeten C3-Konvertase zu beschleunigen³⁷. Da das C3-Molekül das Schlüsselprotein der Komplementkaskade ist, ist eine Kontrolle der Amplifikationsschleife besonders entscheidend. Eine unkontrollierte Vervielfältigung von C3b hat einen hochgradig toxischen Einfluss auf körpereigene Zellen. Aktiviertes, membrangebundenes C3b kann durch Faktor H und das Faktor H-like Protein 1 (FHL-1) in Gegenwart der Serinprotease FI inaktiviert werden, indem die α' -Kette von C3b gespalten wird^{38,39}. Weitere Regulatorproteine, die als Kofaktoren für Faktor I fungieren können, sind unter anderem Komplementrezeptor Typ 1 (CR1) und das Membran-Kofaktor-Protein („*membrane cofactor protein*“, MCP), die beide an der Oberfläche verschiedener humaner Zellen lokalisiert sind⁴⁰. Eine Regulierung der gebildeten C3- oder C5-Konvertasen erfolgt über das membrangebundene Protein DAF („*decay-accelerating factor*“), das den Zerfall der beiden Konvertasen beschleunigt⁴¹. Eine Regulation des terminalen Weges erfolgt vor allem über Vitronektin (S-Protein), aber auch Clusterin. Diese Komplementregulatoren interagieren mit C5b-7 und verhindern dadurch eine Anlagerung von C8 und C9 und somit die Formation des Membran-Angriffs-Komplex⁴². Die Vielzahl von regulatorischen Faktoren stellt auf verschiedenen Aktivierungsebenen der Komplementkaskade sicher, dass eine ausbalancierte Regulation stattfindet (Tabelle 1).

Tabelle 1: Regulation der Komplementkaskade⁴¹

| Regulator | Funktion | Lokalisation |
|------------------|---|---------------------|
| C1-INH | Inaktiviert C1r, C1s, MASP-1 und MASP-2 | Plasma |
| MCP | Kofaktor zur Spaltung von C3b und C4b | Membran |
| DAF | Destabilisierung der C3/C5-Konvertase | Membran |
| CR1 | Kofaktor zur Spaltung von C3b und C4b | Membran |
| C4BP | Bindung an C4b, beschleunigt Zerfall der C3-Konvertase | Plasma |
| Faktor I | Inaktivierung von C3b und C4b, Kofaktor für C4BP, Faktor H, FHL-1 | Plasma |
| Faktor H | Bindung an C3b, beschleunigt Zerfall der C3/C5-Konvertase | Plasma |
| FHL-1 | Bindung an C3b, beschleunigt Zerfall der C3/C5-Konvertase | |
| Vitronektin | Bindung an C5b-7, Inhibition der Polymerisation und Formation des MAC | C9- Plasma |
| Clusterin | Bindung an C5b-7, Inhibition des MAC | Plasma |

1.3 Beta-Laktamantibiotika und Resistenzen

Antibiotika können bakteriostatisch oder bakterizid wirken, also bakterielles Wachstum verlangsamen beziehungsweise Bakterien abtöten. Die meisten therapeutisch eingesetzten Antibiotika sind natürlichen Ursprungs und werden von Mikroorganismen zur Abwehr von anderen Mikroorganismen, Pilzen oder Parasiten produziert.

Die heute im klinischen Alltag verwendeten Antibiotika beruhen im Wesentlichen auf drei Wirkmechanismen: indem sie entweder die Zellwandsynthese, die Proteinsynthese oder DNA-Replikation der Bakterien hemmen. Spezielle Mechanismen neuerer Substanzklassen werden an dieser Stelle nicht weiter erläutert.

Beta-Laktame wie Imipenem und Glykopeptide hemmen die Zellwandsynthese. Der Beta-Laktamring in der Struktur des Antibiotikums kann die D-Alanin-Transpeptidase irreversibel hemmen. So wird verhindert, dass sich die Peptidgruppen der Peptidoglykanschicht in der Zellwand miteinander vernetzen können. Dies hebt die Integrität der bakteriellen Zellwand auf und macht den

Erreger empfindlich gegenüber osmotischem Druck⁴³. Durch diese spezifisch bakterielle Zielstruktur sind Beta-Laktame außergewöhnlich gut verträglich. Die meisten Beta-Laktame, also Penicilline, Cephalosporine und Carbapeneme, bestehen aus der bicyclischen Form. Lediglich Monobactame enthalten nur einen Laktamring.

Vancomycin hingegen bindet an Peptidbestandteile der Zellwand und verhindert somit den Einbau weiterer essenzieller Bestandteile wie N-Acetylglucosamin⁴⁴, wodurch der Aufbau der Zellwand verhindert wird. Da sich die bakterielle Proteinsynthese von der eukaryotischen sehr unterscheidet, sind die Möglichkeiten für antibiotische Wirkmechanismen vielfältig. Makrolide⁴⁵, Tetracycline und Aminoglykoside⁴⁶ wirken an unterschiedlichen Schritten der Proteinsynthese: Aminoglykoside binden an der 30S-Untereinheit des Ribosoms, Makrolide hingegen an der 50S-Untereinheit. Die bakterizide Wirkung der Fluorchinolone wird durch die Hemmung der DNA-Gyrase erreicht⁴⁷. Mittels der Gyrase werden die DNA-Helices entspiralisiert, was zu DNA-Strangbrüchen führt.

Die Auswahl des passenden Therapeutikums erfolgt unter bestimmten Gesichtspunkten, so spielen unter anderem das Nebenwirkungsprofil, die Gewebegängigkeit und das Antibiogramm eine Rolle. Beispielsweise werden Fluorchinolone aufgrund ausgeprägter kardialer und neurogener Nebenwirkungen trotz guter Wirkung mittlerweile vorsichtiger eingesetzt. „Neuere“ Antibiotika wie Linezolid oder Daptomycin werden ebenfalls zurückhaltend verwendet, um einer Resistenzbildung vorzubeugen. Für einen rationalen Einsatz von Antibiotika sorgen Programme wie das *Antibiotic Stewardship*.

1.3.1 Resistenzmechanismen von bakteriellen Erregern

Um der bakteriostatischen oder bakteriziden Wirkung von Antibiotika zu entgehen, haben Bakterien unterschiedliche Resistenzmechanismen erworben (Abbildung 5). Dazu gehören die Expression von Effluxpumpen, die Antibiotika wie Tetracycline gezielt ausschleusen, damit sie nicht in ausreichender

Konzentration im Erreger akkumulieren können⁴⁸. Bakterien sind in der Lage, die Permeabilität ihrer Zellmembran durch eine geringere Expression von Porinen zu verringern, um Antibiotika am Eindringen zu hindern⁴⁹. Eine zweite Strategie der Resistenzbildung besteht in einer Inaktivierung des Antibiotikums durch bakterielle Enzyme. So wird beispielsweise der Beta-Laktamring von Penicillinen und Cephalosporinen hydrolysiert und damit das Wirkzentrum eliminiert⁵⁰. Es sind mittlerweile einige bakterielle Enzyme mit unterschiedlichen Wirkmechanismen bekannt, die den Beta-Laktamring spalten können (s. 1.3.2). Für Aminoglykoside ist ein ähnlicher Wirkmechanismus beschrieben, statt einer Spaltung erfolgt hier eine Bindung von chemischen Molekülen an das Antibiotikum, welches dadurch wirkungslos wird⁵¹. Ein weiterer Mechanismus ist die Veränderung der Zielstruktur, an der das Antibiotikum wirkt, beispielsweise die Vancomycin-Resistenz. Die D-Alanyl:D-Alanin-Ligase, die normalerweise als Zielmolekül für Vancomycin dient, wird durch Austausch eines Zuckers so verändert, dass das Antibiotikum nicht mehr binden kann, und so auch nicht mehr in die bakterielle Zellwandsynthese eingreift⁵².

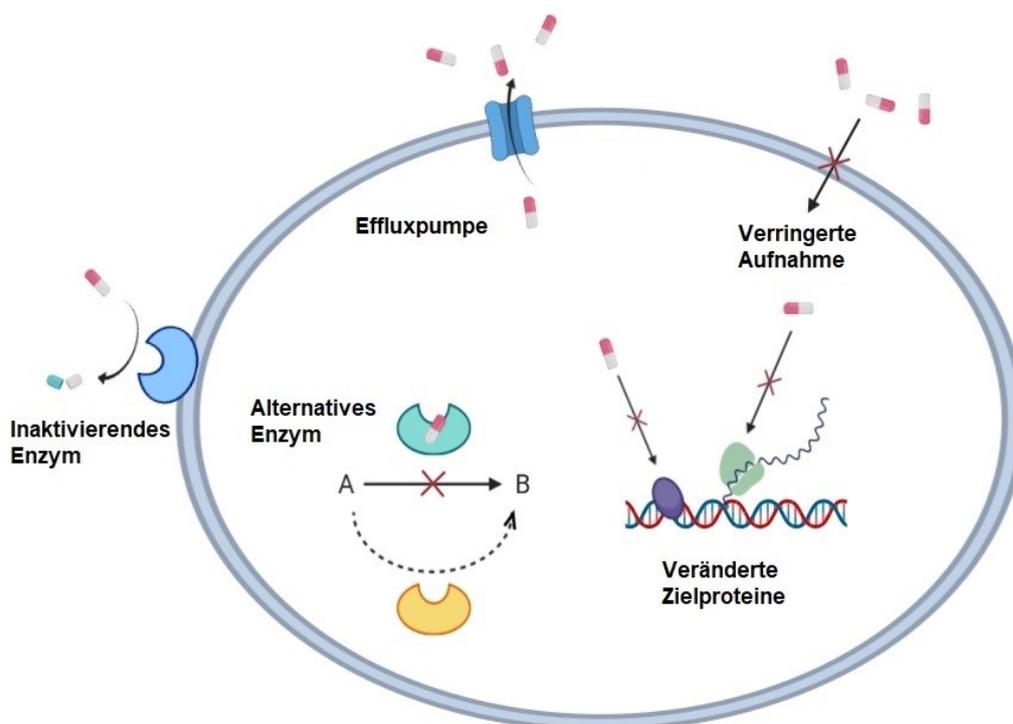


Abbildung 5: Verschiedene bakterielle Resistenzmechanismen gegen Antibiotika. Der Resistenzmechanismus der NDM besteht aus der Inaktivierung des Antibiotikums durch die Spaltung des Beta-Laktamrings. Abbildung wurde erstellt mit Biorender und ist angelehnt an⁵³.

1.3.2 Einteilung und Aufbau von Metallo- β -Laktamasen

Zu den effektivsten Resistenzmaßnahmen von Bakterien gehören, wie in 1.3.1 beschrieben, die Bildung von Beta-Laktamasen, die den Beta-Laktamring hydrolysieren können. Es sind mittlerweile multiple Beta-Laktamasen bekannt, die sich unter anderem in ihrem Wirkspektrum bzw. ihrer Struktur unterscheiden. Beta-Laktamasen, die Carbapenemen spalten können, werden als Carbapenemase bezeichnet. Von ihnen geht eine besondere Gefahr aus, weil Carbapeneme zu den Reserveantibiotika zählen und ein breites Wirkspektrum haben.

Die Einteilung von Beta-Laktamasen erfolgt nach der älteren Ambler-Klassifikation⁵⁴ oder nach Bush-Jacoby-Medeiros^{55,56}, wobei der Wirkmechanismus zugrunde gelegt wird (Tabelle 2).

Es werden Metallo- β -Laktamasen mit einem Zink-Ion im aktiven Zentrum von den restlichen Beta-Laktamasen unterschieden. Letztere hydrolysieren ihr Produkt mittels eines Serins im aktiven Zentrum und können meist durch Beta-Laktamaseinhibitoren wie Sulbactam oder Tazobactam inhibiert werden. Dazu zählen unter anderem die Oxacillinase der Gruppe D nach Ambler. Deren Vertreter OXA-48 ist die häufigste Carbapenemase Deutschlands und auch in weiten Teilen Europas, des Nahen Ostens und Nordafrika verbreitet⁵⁷.

Tabelle 2: Klassifikation von Beta-Laktamasen^{55,58}

| Bush | Ambler | Charakteristika | Beispiele |
|------|--------|---|----------------|
| 1 | C | Induzierbare, meist chromosomal codierte Enzyme, die nicht durch Clavulansäure gehemmt werden | AmpC, CMY-2 |
| 2a | A | Penicillinase aus Staphylokokken und Enterokokken | PC1 |
| 2b | A | Beta-Laktamasen mit breitem Spektrum aus gramnegativen Erregern | TEM-1, SHV-1 |
| 2be | A | ESBL | TEM-3, SHV-2 |
| 2br | A | Beta-Laktamasen, die resistent gegen TEM-Inhibitoren sind (IRT), keine Hemmung durch Clavulansäure | TEM-30, SHV-10 |
| 2c | A | Carbencillin-hydrolysierende Enzyme | PSE-1, CARB-3 |
| 2d | D | Oxacillin-hydrolysierende Enzyme | OXA-1, OXA-10 |
| 2e | A | Cephalosporinase, die durch Clavulansäure gehemmt werden | CepA |
| 2f | A | Carbapenemase, die durch Clavulansäure gehemmt werden | KPC-2, IMI-1 |
| 3 | B | Metalloenzyme, die alle Beta-Laktame außer Monobaktamen spalten können, nicht durch Clavulansäure hemmbar | NDM, VIM, IMP |
| 4 | D | Verschiedene Enzyme, die nicht in die anderen Gruppen passen | CphA, Sfh-1 |

Die Metallo- β -Laktamasen repräsentieren Gruppe B nach Ambler und vermitteln ein sehr breites Resistenzspektrum gegenüber sämtlichen Beta-Laktamen außer Monobaktamen wie Aztreonam. Da die Gruppe B sehr heterogene Metallo- β -Laktamasen umfasst, die untereinander teilweise nur etwa 10% Proteinsequenzhomologie aufweisen⁵⁹, wurde eine Unterteilung in B1-3 vorgenommen. Zur Gruppe B1 gehören die klinisch relevanten Beta-Laktamasen VIM („*Verona integrin-encoded metallo- β -lactamase*“), IMP („*imipenase*“) und NDM („*New Delhi metallo- β -lactamase*“)⁶⁰, die zwei Zink-Ionen im aktiven Zentrum tragen. Die Zinkionen übernehmen die Stabilisierung des gespaltenen Zwischenprodukts, die Aminosäureseitenketten sind an der Stabilisierung nicht beteiligt⁶¹. Innerhalb dieser Gruppe ergeben sich Sequenzähnlichkeiten von etwa 23%⁶². Besondere Ähnlichkeiten finden sich in der $\alpha\beta/\beta\alpha$ -Proteinfaltung und dem Spaltungsmechanismus. Der zinkbindende Anteil ist genetisch determiniert und wird von His120, His122 und His189 für das erste Zinkion sowie von Asp124, Cys208, His250 für das zweite Zinkion gebildet⁶³⁻⁶⁵. Da das aktive Zentrum im Vergleich zu den Serin- β -Laktamasen relativ flach ist und somit nah an der Proteinstruktur bindet, ist das Spektrum an potenziellen Liganden breit gefächert⁶⁶. Aufgrund der aktuell rasanten Verbreitung von Resistenzgenen sind Metallo- β -Laktamasen mittlerweile eine ernstzunehmende Bedrohung.

1.4 Epidemiologie von NDM – der aktuelle Stand

Mit der Entdeckung der *bla*_{NDM-1}-Gensequenz im Jahr 2008 bei einem aus Indien zurückgekehrten schwedischen Patienten⁶⁷ zeigte sich, dass aufgrund der Lokalisation der Gene auf Plasmiden bereits eine große Verbreitung erfolgt war⁶⁸. Die Verbreitung der Resistenzgene über horizontalen Gentransfer von Plasmiden innerhalb von Enterobacteriales-Spezies schien sehr effizient und so wurden kurz nach Erstbeschreibung *bla*_{NDM}-positive Stämme in Indien, Bangladesch, Pakistan und in Großbritannien nachgewiesen. Im Anschluss verbreitete sich die *bla*_{NDM}-Gensequenz nahezu weltweit. In der SMART-Studie wurden Enterobacteriales in 55 Ländern von 2008 bis 2014 untersucht und dabei große Unterschiede in der Verbreitung der NDM festgestellt⁶⁹. Besonders hoch war die Prävalenz in den Vereinigten Arabischen Emiraten (5%), in Ägypten, in Serbien

und in Indien (jeweils etwa 6%). Demnach gelten Südasien, Mittlerer Osten, Balkan und auch Nordafrika als Endemiegebiete für NDM. In Indien und Pakistan wurde die Carbapenemase sogar vermehrt im Grundwasser und in Bodenproben nachgewiesen⁷⁰. Dieses Problem führt unter anderem dazu, dass die Übertragung nicht nur über den nosokomialen Weg erfolgt, sondern auch bei alltäglichen sozialen Interaktionen⁷¹. Dabei scheint insbesondere der Tourismussektor sowie der geschäftliche Aufenthalt im Raum Indien und im Mittleren Osten nachweislich zu einer Verbreitung von multiresistenten 4MRGN-Erregern zu führen⁶⁸.

Gram-negative Bakterien mit *bla*_{NDM}-Gensequenz enthalten oft noch weitere chromosomal- oder plasmidkodierte Resistenzgene gegen sämtliche Antibiotikaklassen. Zu diesen Resistenzgenen gehören AmpC Cephalosporinasen, Beta-Laktamasen mit erweitertem Spektrum (ESBL), andere Carbapenemasen wie KPC oder Oxacillinasen, zudem Resistenzdeterminanten gegen Aminoglykoside, Fluorchinolone, Makrolide, Rifampicin oder Chloramphenicol^{72–77}.

1.4.1 NDM-Varianten und die Evolution der katalytischen Aktivität

Nach der rasanten, weltweiten Verbreitung des *bla*_{NDM-1}-Resistenzgens innerhalb weniger Jahre^{68,78} wurde im Jahr 2011 bereits von einer neu aufgetretenen Variante mit P28A Mutation in der Signalsequenz berichtet: NDM-2^{79,80}. Diese wurde in einem *Acinetobacter baumannii*-Isolat von einer Patientin des Universitätsklinikums Frankfurt im Jahr 2010 identifiziert. Seitdem wurden immer häufiger Punktmutationen gefunden (Abbildung 6).

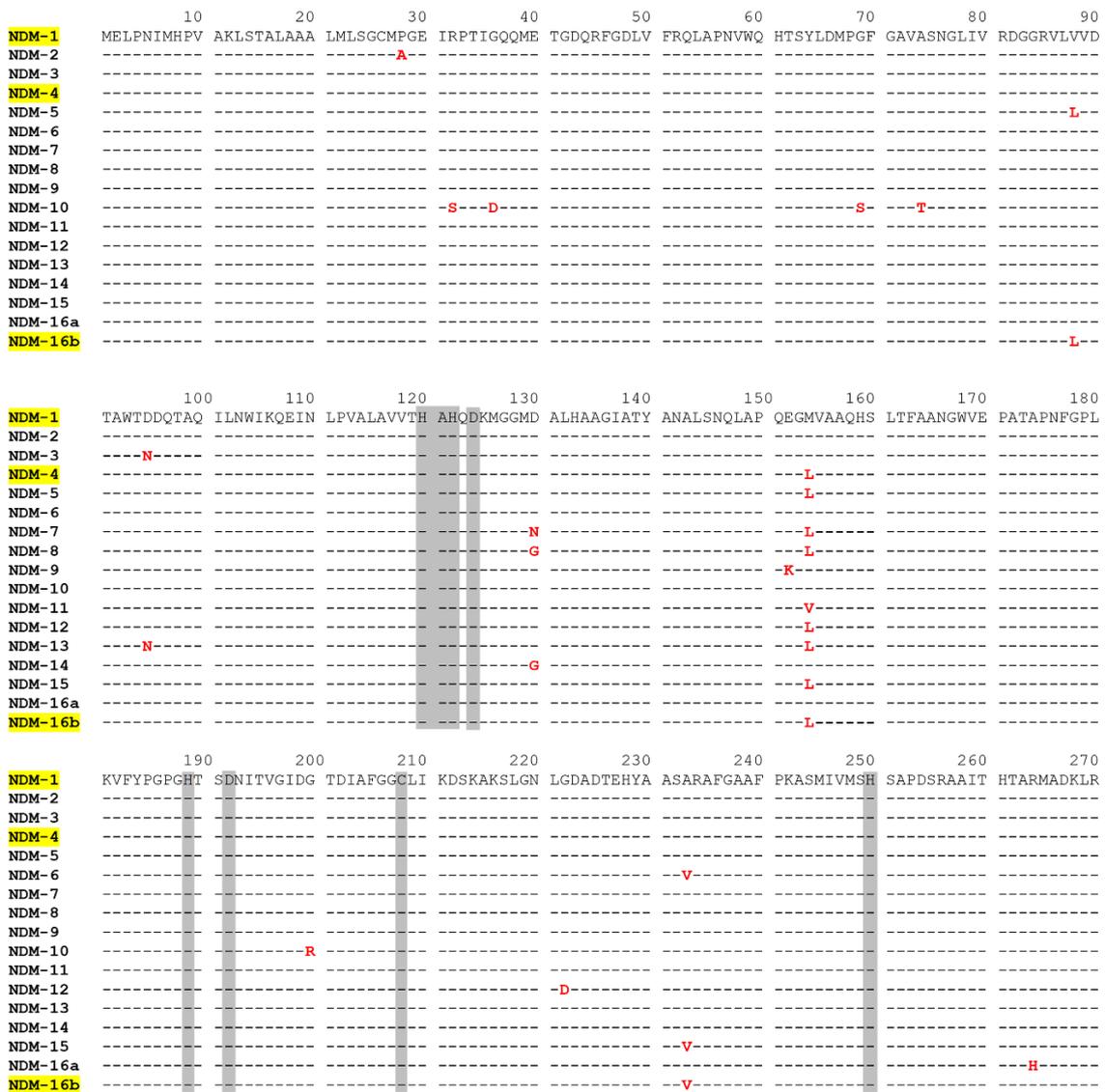


Abbildung 6: Sequenzvergleich der NDM-Varianten 1-16. Die Stellen, die für Metallo-β-Laktamasen determiniert sind, sind grau unterlegt. Für die ausgetauschten Aminosäuren der Varianten wurde rot verwendet. Die relevanten Varianten für diese Arbeit sind gelb markiert. Die Aminosäuresequenzen sind der Datenbank „Pubmed“ (Juni 2021) entnommen worden.

Die wichtigste und häufigste Mutation ist die M154L-Substitution. Anfang 2012 wurde mit NDM-4 erstmals eine Variante beschrieben, die durch eine Punktmutation statt Methionin an der Stelle 154 ein Leucin trug und dadurch eine erhöhte Hydrolaseaktivität erlangte⁸¹. Am Beispiel NDM-7 wurde beschrieben, dass diese Mutation zu einem Abflachen der Bindetasche führt, was die Substratbindung begünstigt und letztlich zu höheren minimalen Hemmkonzentrationen (MHK) führt⁸². Zudem begünstigt vor allem die Zinkmangelsituation im menschlichen Körper M154L-Varianten, da die Mutation unter kritischen Zinkspiegeln zu einer erhöhten Stabilität führt (Abbildung 7)⁸³.

Die beschriebene Stabilität unter Zinkmangel hängt aber umso deutlicher noch von einer A233V-Mutation ab (Abbildung 7). Diese Mutation wurde erstmals bei NDM-6 nachgewiesen⁸⁴. Eine ähnlich proteinstabilisierende Wirkung wird über die Mutation E152K vermittelt. Diese Mutationen erlauben nicht nur eine bessere Toleranz von Zinkmangelsituationen, sondern verzögern zudem den Proteinzerfall⁸³.

Für die NDM-Varianten mit V88L-Mutation (NDM-5, -16b, -17) wurde in mehreren Untersuchungen eine erhöhte Carbapenemaseaktivität beschrieben⁸⁵⁻⁸⁷. Im Vergleich zu NDM-1 wurden unter anderem vier- bis achtfach erhöhte MHK für Ertapenem beschrieben^{85,88}. Die Mutation ist nicht im aktiven Zentrum lokalisiert, wonach bisher unklar bleibt, welcher Mechanismus der erhöhten Aktivität zugrunde liegt.

Die Variante NDM-10 fällt mit insgesamt fünf Punktmutationen besonders auf. Sie weist im Vergleich zu den restlichen NDM-Varianten eine verminderte Resistenz gegenüber Ampicillin, Meropenem und Imipenem auf⁶⁰. Bei NDM-10 und NDM-12 liegen Punktmutationen im aktiven Zentrum, was die Substratbindung eher verschlechtern könnte und somit zu niedrigeren MHKs führt.

Eine von Makena *et al.* durchgeführte Studie lässt zudem vermuten, dass aufgrund der M154L-Mutation eine erhöhte thermische Stabilität besteht⁸⁹. Diese thermische Stabilität wird von Cheng *et al.*⁶⁰ einerseits bestätigt und zudem auch für die Mutationen A233V und V88L beschrieben, die alle in der NDM-16b nachweisbar sind. Die in dieser Arbeit beschriebene Variante NDM-16b scheint demnach eine hohe Resistenz und Stabilität zu vermitteln, es sei jedoch angemerkt, dass die erwähnten Unterschiede einer weiteren experimentellen Abklärung bedürfen.

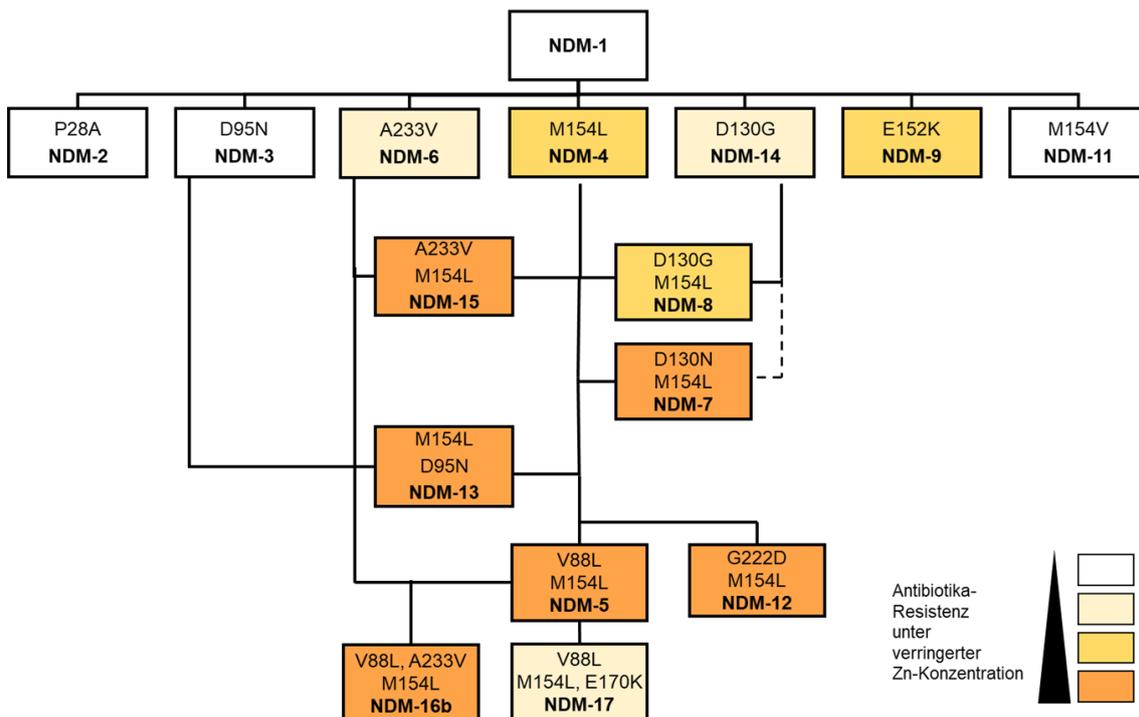


Abbildung 7: NDM-Varianten und deren Mutationen. Die Effektivität der Antibiotikaresistenz der einzelnen NDM-Varianten ist durch die Intensität der Farben dargestellt. Auffallend ist, dass bestimmte Mutationen wie M154L und V88L unter Zinkmangel eine erhöhte Stabilität vermitteln. Abbildung modifiziert nach Cheng *et al.*, 2018⁶⁰.

1.4.2 Therapie von multiresistenten Bakterien mit NDM-Carbapenemasen

Für die Behandlung von Infektionen mit 4MRGN-Erregern, die gegen Penicilline, Cephalosporine und Carbapeneme resistent sind, stehen nicht viele Möglichkeiten zur Verfügung. Die therapeutischen Möglichkeiten werden weiterhin durch diverse Ko-Resistenzen weiter eingeschränkt, was den Einsatz von Reserveantibiotika erforderlich macht. Die wichtigste Antibiotikaklasse sind die Polymyxine, denen das Reserveantibiotikum Colistin zugeordnet wird. Eine Einzeltherapie mit Colistin zeigte jedoch trotz nachgewiesener Empfindlichkeit von *E. coli* und *K. pneumoniae* keine Behandlungserfolge im Mausmodell⁹⁰, was eine Kombinationstherapie erforderlich macht. Limitierende Faktoren bei Polymyxintherapie sind die Nierentoxizität und mögliche neurologische Schäden, weswegen hohe Konzentrationen vermieden werden sollten⁹¹.

Für *bla*_{NDM}-positive Erreger zählen unter anderem Kombinationen aus Monobaktamen wie Aztreonam mit Beta-Laktamase-Inhibitoren wie Avibactam

zu den therapeutischen Möglichkeiten. Eine weitere Therapiemöglichkeit scheint interessanterweise eine Kombination aus mindestens zwei unterschiedlichen Carbapenemen darzustellen⁹². Auch Dreifachkombinationen mit zusätzlich Fosfomycin haben eine Wirkung *in vivo* gezeigt⁹³. Darüber hinaus zählt Tigecyclin zu möglichen Therapiealternativen⁹⁴, das jedoch nur bakteriostatisch wirkt. Insgesamt beruhen die Therapieempfehlungen jedoch auf Fallberichten, und eine individuelle Lösung bleibt, besonders in Anbetracht fehlender prospektiver randomisierter klinischer Studien die Realität im klinischen Alltag. Zusammenfassend ist eine effektive Standardtherapie für *bla*_{NDM}-positive Erreger noch nicht absehbar; es bleibt abzuwarten, ob neue Antibiotikaklassen entdeckt werden oder Inhibitoren im klinischen Alltag angewendet werden können. Bis dahin ist die Erhebung epidemiologischer Daten und das Verständnis über die Wirkmechanismen von Metallo- β -Laktamasen immens wichtig, um neue innovative Therapiekonzepte zu entwickeln.

1.5 Fragestellungen und Ziele der Arbeit

Während weltweit Resistenzen gegen sämtliche Antibiotikaklassen durch Akquirierung von Resistenzdeterminanten zunehmen, nimmt gleichzeitig die Entwicklung neuer Antibiotika rapide ab. Daher sollte in dieser Arbeit die Carbapenemase New Delhi Metallo- β -Laktamase und ihre Ausbreitung untersucht werden. Zusätzlich sollte die immunmodulierende Wirkung und die Interaktion der NDM mit dem angeborenen Komplementsystem sowie die bakterielle Pathogenität untersucht werden. Hierfür wurden die Varianten NDM-1, NDM-4 (M154L) und NDM-16b (M154L, V88L, A233V) ausgewählt.

Im ersten Teil der Arbeit sollte die lokale Verbreitung *bla*_{NDM}-positiver Erreger am Universitätsklinikum weiterführend untersucht werden. Die angelegten Auswahlkriterien waren unter anderem NDM-Varianten, Erregerspezies und patientenspezifische Parameter wie Nachweisort, Alter und Geschlecht. Zudem sollten die Isolate auf ihr Antibiotika-Empfindlichkeit getestet werden, um beurteilen zu können, wie wirksam die derzeit klinisch eingesetzten Antibiotika gegen *bla*_{NDM}-positive Erreger sind.

Im zweiten Teil dieser Arbeit sollte die Virulenz *bla*_{NDM}-positiver Erreger sowie die Möglichkeit einer Therapieoption mit Imipenem im *Galleria mellonella*-Infektionsmodell untersucht werden. Zunächst sollte die Letalität der Larven, verursacht durch die Infektion mit Gram-negativen Bakterien, in Abhängigkeit der vorliegenden NDM-Variante evaluiert werden. Nachfolgend sollten unterschiedliche Therapieansätze getestet werden, um zu beurteilen, wie gut die Antibiotikaresistenz über NDM-produzierende Erreger übermittelt wird.

Im letzten und Hauptteil der Arbeit sollte die Interaktion verschiedener NDM-Varianten (NDM-1 Δ 28, NDM-4 Δ 28 und NDM-16b Δ 28) mit dem humanen Komplementsystem funktionell charakterisiert sowie neue Erkenntnisse zum molekularen Mechanismus der Komplementinhibition gewonnen werden.

2 Material

2.1 Verwendete Bakterienstämme und Larven

Tabelle 3: In dieser Arbeit verwendete Bakterienstämme

| Stamm | Referenz |
|----------------------------------|---|
| <i>Escherichia coli</i> J53 | Dr. Dr. Stephan Göttig, Institut für Medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene, Frankfurt ⁹⁵ |
| <i>Escherichia coli</i> TOP10 | Invitrogen |
| <i>Escherichia coli</i> DH5α | Invitrogen |
| <i>Escherichia coli</i> BL21 | Thermo Fisher, Scientific |
| <i>Escherichia coli</i> JM109 | Promega |
| <i>Escherichia coli</i> MC1061 | Prof. Dr. Klaas Martinus Pos, Institut für Biochemie, Uni Frankfurt |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i> PRZ | Dr. Dr. Stephan Göttig ⁹⁶ |
| <i>Galleria mellonella</i> | UK waxworms, Sheffield |

2.2 Nähr- und Kulturmedien

Tabelle 4: Verwendete Nähr- und Kulturmedien

| Nähr- und Kulturmedium | Hersteller | Referenz-Nr. |
|---|------------|--------------|
| CAMHB (Cation adjusted Müller-Hinton broth) | BD | 212322 |
| Herz-Hirn-Glukose-Bouillon (BHI) | Carl Roth | X916.1 |
| Lysogeny Broth Medium (LB) | Carl Roth | X968.1 |
| Lysogeny Broth (LB) Agar | Carl Roth | X969.1 |
| Mueller-Hinton Agar Platten | Oxoid | PO5007A |
| Columbia-Agarplatten mit Schafblut | Oxoid | PB5039A |

2.3 Chemikalien

Tabelle 5: Verwendete Chemikalien

| Substanz | Hersteller | Bestell-Nr. |
|--|------------------------|--------------|
| Acrylamid | AppliChem | A1089 |
| Agarose | Roth | 9012-36-6 |
| Ambozeptor | Siemens GmbH | ORLC25 |
| Ammoniumperoxidisulfat (APS) | Roth | 92592.2 |
| Bisacrylamid | AppliChem | A1096 |
| Blockierungspuffer („Blocking Buffer III BSA“) | AppliChem | A7252 |
| Bovines Serum Albumin (BSA) | Sigma-Aldrich | A7030-100G |
| Bromphenolblau | Sigma-Life Science | 34725-61-6 |
| Chloroform | Roth | 6340 |
| Dimethylsulfoxid (DMSO) | MP Biomedicals | 194819 |
| Dinatriumhydrogenphosphat | AppliChem | A1046 |
| EDTA, Dinatriumsalz | Sigma-Aldrich | 34549-1KG |
| Essigsäure, (min. 99,8 %) | Honeywell | 33209-1L |
| Ethanol absolut | Honeywell | 24102-2.5L-R |
| Ethidiumbromid-Lösung, (1 %) | AppliChem | A1152 |
| Formaldehyd, (36,5 % Lösung) | Riedel-de Haën | 33220 |
| 3-Formylchromon 97% | Sigma-Aldrich | 383449 |
| Gel-Lade-Puffer (6x) | New England Biolabs | B7024S |
| Gelatine, gepulvert | AppliChem | A1693 |
| Glycerin (78% Lösung) | Sigma-Aldrich | G5516 |
| Glycerin (99,5% Lösung) | VWR | 24388.295 |
| Glycin | Sigma-Aldrich | G7126 |
| Glutaraldehyde (25% Lösung) | Sigma-Aldrich | G6257 |
| HCl (2 mol/l) | AppliChem | 182108.1211 |
| HCl ($\geq 37\%$) | Sigma-Aldrich | 30721 |
| HEPES | Sigma-Aldrich | H3375 |
| HisPur™ Ni-NTA Resin | Thermo Scientific | 88221 |

| | | |
|---|-----------------|-------------|
| IgM aus Humanserum | Sigma-Aldrich | I8260-1MG |
| Imidazol | Sigma-Aldrich | 56749 |
| Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid | Roth | CN08.1 |
| Kaliumhydrogenphosphat | AppliChem | A3095 |
| L-Methionin | Sigma-Aldrich | 64319-25G-F |
| Lysozym | Sigma-Aldrich | L6876 |
| LPS von <i>S. enteritidis</i> S-Form | Hycult Biotech | HC4059 |
| Magermilchpulver | Frema | - |
| β -Mercaptoethanol | AppliChem | A1108 |
| Natriumacetat | Roth | 6773.1 |
| Natriumazid | Sigma-Aldrich | S8032 |
| Natriumcarbonat | Roth | 8563.1 |
| Natriumchlorid | Sigma-Aldrich | 31434 |
| Natriumhydrogencarbonat | AppliChem | A3590 |
| Natriumhydroxid | Riedel de Haën | 30620 |
| Natriumthiosulfat-Pentahydrat | AppliChem | A1883 |
| Natronlauge | J.T. Baker | 7097 |
| Ni-NTA-Agarose | Expedon | ANN0025 |
| Nitrocefin | Merck Millipore | 484400-5MG |
| PBS (Phosphat gepufferte Saline) | Gibco | 10010023 |
| PBS ⁺⁺ (Phosphat gepufferte Saline mit Mg ²⁺ und Ca ²⁺) | Gibco | 14040-091 |
| o-Phenylenediamin | Sigma-Aldrich | P5412 |
| Phytinsäurenatriumhydrat | Sigma-Aldrich | P8810 |
| Proteaseinhibitor | Roche | 04693124001 |
| SDS (Sodiumdodecylsulfat) | Roth | CN30.3 |
| Silbernitrat | Sigma-Aldrich | 31630 |
| SYPRO Orange | Thermo Fisher | S6650 |
| TMB | Microgen | 10038 |
| Tricin | Roth | 6977.3 |
| Triton X-100 | AppliChem | A1388 |
| Tris | Sigma-Aldrich | T1503 |

| | | |
|--------------------|---------------|--------|
| Tween 20 | Roth | 9127.1 |
| TEMED | Roth | 2367.3 |
| Wasserstoffperoxid | Roth | 8070.2 |
| Zinkchlorid | Sigma-Aldrich | 208086 |

2.4 Größenstandards

Tabelle 6: Verwendete Größenstandards

| Bezeichnung | Verwendung | Hersteller | Bestell-Nr. |
|---|-------------------------------|-------------|-------------|
| 100 bp DNA Ladder | Agarose- Gelelektrophorese | New England | N3231S |
| 1kb DNA Ladder | | Biolabs | N3232S |
| Precision Plus Protein Unstained Standards | SDS-PAGE | Bio-Rad | 161-0363 |
| Precision Plus Protein™ | | | 161-0374 |
| Dual Color Standards | | | |

2.5 Test- und Reagenziensysteme

Tabelle 7: Verwendete Test- und Reagenziensysteme

| Bezeichnung | Hersteller | Bestell-Nr. |
|---|-------------------|-------------|
| QIAquick PCR Purification | Qiagen | 28106 |
| Large-Construct Kit | Qiagen | 12462 |
| Pure Yield™ Plasmid Miniprep System | Promega | A1222 |
| Pure Yield™ Plasmid Midiprep System | Promega | A2492 |
| Pierce BCA Protein Assay Kit | Pierce | 23227 |
| Protein Labeling Kit RED-NHS | Monolith | L001 |
| Reversible Protein Detection Kit | Sigma-Aldrich | RPROB-1KT |
| WIESLAB® Komplement Test (Classical Pathway) | SVAR Life Science | COMPL CP310 |
| WIESLAB® Komplement Test (MBL Pathway) | SVAR Life Science | COMPL MP320 |
| WIESLAB® Komplement Test (Alternative Pathway) | SVAR Life Science | COMPL A330 |

2.6 Geräte

Tabelle 8: Verwendete Geräte

| Bezeichnung | Hersteller |
|--|----------------------------------|
| Agarosegel-Elektrophorese-Zubehör | |
| Elektrophorese-Kammer Horizon 11.14 | Gibco-BRL |
| Fotoentwickler (UV-Kammer) | Mitsubishi |
| Gel-Kammer Gel Casting System 11.14 | Gibco-BRL |
| Geldokumentationssystem | Peqlab |
| Netzgerät E443 | Consort |
| Netzgerät EV265 | Consort |
| Beheizbare Magnetrührer | |
| IKAMAG RET | IKA |
| MR Hei-Standard | Heidolph |
| MR 2002 | Heidolph |
| KMO 2 basic | IKA |
| Brutschränke | |
| Brutschrank B20 | Heraeus |
| Brutschrank BBD 6220 | Thermo Scientific |
| Brutschrank | Thermo Electron |
| Dichtemessgerät | |
| Densimat | BioMérieux |
| Dispergiergerät | |
| MICCRA D-9 Dispergiergerät | Art Prozess- & Labortechnik GmbH |
| ELISA-Reader/Spektrometer | |
| NanoTemper NT.115 Series | Monolith |
| Nanophotometer Pearl P 300 | Implem |
| PowerWave HT | BioTek |
| Tecan Reader Infinite M200 Pro | |
| Ultrospec 3100 pro | Amersham Biosciences |
| Großgeräte | |
| Autoklav VX-95 | Systemec |
| Eismaschine AF 80 | Scotsman |
| Mikrowelle | Bomann |
| Wasseraufreinigung RX20 | Merck Millipore |

Ultraschallgerät mit Kühlung

| | |
|----------------------------------|-------------------|
| Sonifier B12 mit Becherresonator | Branson/Heinemann |
| Kühlungsgerät Multistar | Fryka |

Waagen

| | |
|-------------------|-----------|
| Analysenwaage 572 | Kern |
| Feinwaage BP110S | Sartorius |

Zentrifugen

| | |
|-------------------------|-----------|
| Zentrifuge Microstar 17 | VWR |
| Zentrifuge 5702 RH | Eppendorf |
| Zentrifuge Mikro 20 | Hettich |

2.7 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 9: Verwendete Verbrauchsmaterialien

| Name | Hersteller | Referenz-Nr. |
|--|----------------------|--------------|
| Diverse Plastik-Röhrchen | Greiner Bio-one | Diverse |
| Spritzenfilter (0,2 µm) | Thermo Scientific | 725-2520 |
| Spritzenfilter (0,45 µm) | Sarstedt | 831826 |
| Plastikröhrchen (15 ml) | Greiner Bio-one | 188271 |
| Plastikröhrchen (50 ml) | Greiner Bio-one | 227261 |
| Gene Pulser® Cuvettes | Bio-Rad Laboratories | 1652086 |
| HiTrap Säule | General Electrics | 29-0513-24 |
| Impfösen (5 µl) | Greiner Bio-one | 731175 |
| Kanülen Sterican® | Braun | 4657500 |
| Kolbenhubpipettenspitzen | Eppendorf | Diverse |
| KOVA-Glasstic Slide 10 with grids | Hycor | 87144E |
| Kryoröhrchen Cryobank™ | Mast Diagnostica | 291709 |
| Küvetten | Sarstedt | 67.742 |
| Mikrotiterplatten Nunc Maxisorp™ (Flachboden) | Thermo Fisher | 44-2404-21 |

| | | |
|--|----------------------|------------|
| Mini-PROTEAN® TGX™ Precast Protein Gels, 4- 20%, Bio-rad | Bio-Rad | 4561094S |
| S-Monovetten für Serumgewinnung | Sarstedt | 125309 |
| Spritzen (20 ml) Inject® | Braun | 4606205V |
| PCR SingleCap 8er- SoftStrips 0,2 ml, blau | Biozym Scientific | 710982 |
| Petrischalen | Greiner Bio-one | 633181 |
| PolyPrep Chromatographiesäulen | Bio-Rad | 731-1550 |
| Premium Kapillaren | Monolith | K025 |
| Proteingel nativ mit Gradient | Bio-Rad | 4561096 |
| Reagenzgefäß 1,5ml | Sarstedt | 72.690.001 |
| Wattestäbchen | Süsse | 10018 |
| Mikrotiterplatten costar® | Corning Incorporated | 3598 |

2.8 Antibiotika

Alle Epsilon-Meter-Teststreifen wurden von der Firma Liofilchem (Roseto degli Abruzzi, Italien) bezogen.

Tabelle 10: Verwendete Epsilon-Meter-Teststreifen

| Antibiotikum | Referenz-Nr. |
|---------------------------|---------------------|
| Amoxicillin/Clavulansäure | 92024 |
| Ampicillin | 92003 |
| Ampicillin Sulbactam | 92027 |
| Aztreonam | 92033 |
| Cefepim | 92126 |
| Cefotaxim | 92006 |
| Ceftazidim | 92138 |
| Ceftazidim/Avibactam | 92139 |
| Ceftolozan/Tazobactam | 92146 |
| Cefuroxim | 92129 |
| Ciprofloxacin | 92045 |
| Doripenem | 92040 |
| Ertapenem | 92157 |
| Imipenem | 92054 |
| Meropenem | 92084 |
| Piperacillin/Tazobactam | 92108 |
| Imipenem/Imipenem+EDTA | 92162 |
| Meropenem/Meropenem+EDTA | 92165 |

Tabelle 11: Verwendete Antibiotika für die Mikrodilution und Selektion von Bakterien

| Antibiotikum | Hersteller | Referenz-Nr. |
|----------------------------|-------------------|---------------------|
| Ampicillin | Roth | K029.1 |
| Chloramphenicol | Sigma-Aldrich | C0378 |
| Cefotaxim Natrium Salz | Sigma-Aldrich | C7912 |
| Ceftazidim Hydrat | Sigma-Aldrich | C3809 |
| Cefepim Hydrochlorid | Sigma-Aldrich | A3737 |
| Imipenem Monohydrat (≥98%) | Sigma-Aldrich | I0160 |
| Meropenem Trihydrat (≥98%) | Sigma-Aldrich | M2574 |
| Ertapenem | Sigma-Aldrich | CDS022172 |
| Doripenem Hydrat (≥98%) | Sigma-Aldrich | SML1220 |
| Kanamycin-Monosulfat | MP Biomedicals | 11476412 |

2.9 Enzyme und Reagenzien zur Klonierung

Tabelle 12: Verwendete Enzyme und Puffer zur Klonierung

| Name | Hersteller | Referenz-Nr. |
|-------------------------------|---------------------|---------------------|
| Taq DNA Polymerase | Invitrogen | 10342-020 |
| PCRBIO HiFi Polymerase | PCR Biosystems Ltd. | PB10.41-02 |
| CutSmart Puffer (10x) | New England BioLabs | B7204S |
| Restriktionsenzym <i>SapI</i> | New England BioLabs | R0569S |
| T4 DNA Ligase | New England BioLabs | M0202S |
| Adenosine-5'-Triphosphat | New England BioLabs | P0756S |

2.10 Antikörper und Komplementkomponenten

Tabelle 13: Verwendete Antikörper

| Antikörper | Referenz-Nr. |
|---|-------------------------|
| Anti-Komplement Antikörper (human) | |
| anti-C2 | Quidel, Nr. A303 |
| anti-C3 | Calbiochem, Nr.204869 |
| anti-C4 | Quidel, Nr. A305 |
| anti-C5b-9 | Quidel, Nr. A239 |
| anti-FH | Calbiochem, Nr. 341276 |
| Sekundäre Antikörper | |
| anti-Maus-IgG-HRP | Dako, Nr. P0260 |
| anti-Ziege-IgG-HRP | Dako, Nr. P0449 |
| Antikörper gegen den Histidin-tag | |
| anti-His ₆ | Novagen, Nr. 7076 |
| anti-His ₄ Tetra | Qiagen, Nr. 34698 |
| anti-His ₅ Penta | Qiagen, Nr. 34698 |
| anti-His ₆ HRP-konjugiert | R&D Systems, Nr. MAB050 |

Tabelle 14: Verwendete Komplementkomponenten

| Komplementfaktor | Hersteller | Referenz-Nr. | Molare Masse |
|------------------|-----------------------|--------------|--------------|
| C2 | Complement Technology | A112 | 93 kDa |
| C3 | Complement Technology | A113 | 185 kDa |
| C3b | Complement Technology | A114 | 176 kDa |
| C3c | Complement Technology | A116 | 139 kDa |
| C4 | Complement Technology | A105 | 205 kDa |
| C4b | Complement Technology | A108 | 195 kDa |
| C4BP | Complement Technology | A109 | 540 kDa |
| C5 | Complement Technology | A120 | 190 kDa |
| C5b,6 | Complement Technology | A122 | 285 kDa |
| C7 | Complement Technology | A124 | 92 kDa |
| C8 | Complement Technology | A125 | 151 kDa |
| C9 | Complement Technology | A126 | 71 kDa |
| Faktor H | Complement Technology | A137 | 155 kDa |
| Faktor I | Complement Technology | A138 | 88 kDa |
| Vitronektin | Sigma-Aldrich | V8379 | 140 kDa |

2.11 Vektoren

2.11.1 *TOPO-Vektor*

Der TOPO-Vektor (3519 Bp) enthält die Promotorregionen T7 und SP6 sowie Bindungsstellen für den Vorwärts- und Rückwärtsprimer M13 und das Restriktionsenzym *EcoR*-I. Außerdem Gene für die Resistenz gegen die Antibiotika Zeocin und Kanamycin. Der Vektor wird mit dem Klonierungskit (TOPO™ TA Cloning™ Kit for Sequencing) von Thermo Fisher vertrieben.

3 Methoden

3.1 Patientendaten

Die Patientendaten wurden dem Swisslab Network (Roche Diagnostics, Rotkreuz, Schweiz) pseudonomysiert entnommen und ausgewertet. Die Vorgaben zum Datenschutz wurden dabei konsequent beachtet.

3.2 Statistische Auswertung

Statistische Analysen und das Erstellen von Abbildungen wurden mithilfe von GraphPad Prism 7 und Microsoft Excel Office 365 durchgeführt.

3.3 Anzucht und Lagerung von Bakterien

Die Kultivierung der klinischen Bakterienisolate erfolgte auf Schafblutagar und die der Transformanten auf Lysogeny Broth (LB) Agar, dem 30 µg/mL Kanamycin zugesetzt wurde. Die Kulturen wurden mittels Dreiösenaustrich vereinzelt und dann zur Bebrütung über Nacht bei 37 °C inkubiert. Zur Anzucht im Flüssigmedium wurde Herz-Hirn-Glukose Bouillon-Medium (BHI-Medium) für klinische Isolate verwendet und LB-Medium für Transkonjuganten. Das LB-Medium wurde mit Kanamycin in der Endkonzentration 30 µg/mL supplementiert. Zur Kryokonservierung der Bakterienisolate wurden 25% [v/v] Glycerin einer Flüssigkultur beigesetzt und in speziellen Kryoröhrchen bei -80 °C gelagert.

3.4 Epsilometer-Test und Agardiffusionstest

Für die Charakterisierung der Antibiotika-Resistenz klinischer Isolate und die phänotypische Überprüfung der Transformanten wurden minimale Hemmkonzentrationen (MHK) bestimmt. Zudem wurde für epidemiologische Untersuchungen die MHK von Patientenisolaten verglichen. Die Bestimmung erfolgte größtenteils über Epsilometer-Teststreifen (E-Test). Dazu wurde eine

Bakteriensuspension in 0,9%iger NaCl-Lösung hergestellt, deren Trübung einem McFarland-Standard von 0,5 entsprach. Die Trübung wurde mit einem Densitometer bestimmt. Ein McFarland-Wert von 0,5 entspricht bei *E. coli* beispielsweise $1,5 \times 10^8$ Kolonie-bildenden Einheiten (KBE) pro Milliliter. Mit einem Wattestäbchen wurde die Suspension gleichmäßig auf einer Müller-Hinton Agarplatte ausgestrichen. Anschließend wurde ein E-Teststreifen aufgelegt und die Agarplatte über Nacht bei 37 °C inkubiert. Mithilfe des Konzentrationsgradienten konnte am nächsten Tag die MHK bestimmt werden. Anstatt eines Teststreifens wurden auch Antibiotikaplättchen auf die ausgestrichene Agarplatte aufgebracht (so genannter Agardiffusionstest) und am Folgetag wurde der entstandene Hemmhof ausgemessen. Die Interpretation der Ergebnisse erfolgte gemäß aktueller EUCAST-Richtlinien (Version 8.0)⁹⁷, lediglich im Fall von *Acinetobacter* spp. wurde vollständig auf die veröffentlichten Werte der CLSI (27. Edition)⁹⁸ zurückgegriffen.

3.5 Mikrodilutionstest

Neben dem E-Test wurde die MHK mit dem Mikrodilutionsverfahren ermittelt. Nach dem Ansetzen von Stammlösungen der in Tabelle 11 gelisteten Antibiotika erfolgte eine 1:2 Verdünnung in CAMHB Medium in mehreren Verdünnungsstufen. Davon wurden in aufsteigender Konzentration jeweils 95 µL pro Kavität in eine Mikrotiterplatte mit u-Boden gegeben. Die zu testenden Isolate wurden in 0,9% NaCl-Lösung auf einen McFarland 0,5 eingestellt und um den Faktor 10 verdünnt. Von der Bakteriensuspension wurden jeweils 5 µL den verdünnten Antibiotikalösungen hinzugefügt. Die Mikrotiterplatten wurden über Nacht bei 37 °C inkubiert und am folgenden Tag ausgewertet.

3.6 Transformation von elektrokompetenten Bakterien

Die Transformation von Bakterien mit gereinigten Plasmiden erfolgte mittels Elektroporation⁹⁹ oder Hitzeschockmethode (siehe Kapitel 3.7). Aus einer Übernachtskultur wurden 5-20 mL frisches BHI-Medium inokuliert und die OD₆₀₀

auf 0,05 eingestellt und bei einer optischen Dichte von 0,4 bei 6000 Upm für 15 min zentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen dreimal in 2 mL 300 mM Saccharose-Lösung gewaschen. Das erhaltene Zellsediment wurde in 2 mL 300 mM Saccharose-Lösung resuspendiert, wovon je 100 µL in eine Elektroporationsküvette mit einem Elektrodenabstand von 2 mm überführt wurden. Der Suspension wurden mindestens 500 ng aufgereinigte Plasmid-DNA hinzugefügt und schließlich erfolgte die Elektroporation bei 2,5 kV, 25 µF und 200 Ω. Unmittelbar nach der Elektroporation wurde 1 mL LB-Medium in die Küvette gegeben und die Zellen für mindestens eine Stunde in einem 14 mL Röhrchen bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien zentrifugiert und auf Selektionsplatten mit entsprechenden Antibiotika ausplattiert.

3.7 Transformation von chemisch kompetenten Bakterien

Für die Transformation wurden chemisch kompetente Zellen verwendet, die nach der Calciumchloridmethode hergestellt wurden^{100,101}. Die Zellen wurden auf Eis aufgetaut und 0,5-2 µg gereinigte Plasmid-DNA hinzugefügt. Der Ansatz wurde 15 min auf Eis inkubiert, und dann erfolgte ein Hitzeschock bei 42 °C für 2 min in einem Thermomixer. Nach einer erneuten Inkubation auf Eis für 10 min wurde der Ansatz mit 1 mL LB-Medium versetzt und für eine Stunde bei 37 °C und 300 Upm inkubiert. Anschließend wurde die Suspension zentrifugiert, das Zellsediment in 100 µL LB-Medium resuspendiert und auf Selektionsagarplatten ausplattiert.

3.8 Isolierung von Plasmid-DNA

Je nach benötigter Menge Plasmid-DNA wurde das PureYield™ Miniprep oder Midiprep System (Promega) verwendet. Die Durchführung erfolgte nach Angaben des Herstellers. Im Anschluss wurde die DNA-Konzentration durch Messung bei 260 nm im Vergleich zu einer Reinheitskontrolle bestimmt.

Die Isolierung der Plasmide aus dem klinischen Isolat *E. coli* 3426 erfolgte durch das „Large-Construct Kit“ von Qiagen nach Angaben des Herstellers.

3.9 Sequenzierung von Plasmid-DNA

Die Sequenzierung von gereinigten Plasmiden erfolgte durch die Firma Eurofins Genomics. Dafür wurden 500 ng Plasmid-DNA mit 5 µM eines entsprechenden Oligonukleotids an den kommerziellen Anbieter gesendet. Die Sequenzen wurden mit Clone Manager Professional Suite 8 und Chromas Lite, Version 2.1, ausgewertet.

3.10 Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) diente zur Amplifikation bakterieller Genabschnitte. Dafür wurden entsprechende Oligonukleotide (Tabelle 15) verwendet. Dem Reaktionsansatz wurden neben der Matrizen-DNA, dNTPs und eine hitzestabile, DNA-abhängige-Polymerase hinzugefügt.

Tabelle 15: Verwendete Oligonukleotide in dieser Arbeit

| Oligonukleotid | Sequenz | Referenz |
|----------------|--|--------------------------------------|
| M13(-20)_F | GTAAAACGACGGCCAGT | Thermo Fisher |
| M13(48)_R | AGCGGATAACAATTTACACAGGA | |
| T7-Prom | TAATACGACTCACTATAGGG | Thermo Fisher |
| T7-Term | TAGTTATTGCTCAGCGGTGG | |
| NDM-2F | ATGGAATTGCCCAATATTATGC | Dr. Dr. Stephan Göttig ⁸² |
| NDM-2R | TCAGCGCAGCTTGTCGGCCA | |
| f_NDM-1_D28 | ATATATGCTCTTCTAGTGGTCAAATCC GTCCGACGATTGGCCAG | Diese Arbeit |
| r_NDM-1_D28 | TATATAGCTCTTCATGCGCGAAGCTTG TCGGCCATGCGAGC | |

3.11 Agarose-Gelelektrophorese

Zur Visualisierung von DNA-Fragmenten wurde eine Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt. Dabei wurden Agarosegele mit einem Anteil von 0,8-1,5% [w/v] Agarose hergestellt, indem die Agarose in TAE-Puffer (Tabelle 16) aufgekocht wurde und anschließend in einem Gelträger aushärtete. Die zu untersuchenden Proben wurden zusammen mit einem DNA-Standard in die Kammern des Gels

pipettiert und anschließend gelelektrophoretisch aufgetrennt. Dabei wurden PCR Fragmente von ~ 500 - 800 Bp für ca. 45 min bei 220 mA und 140 V separiert. Für die Auftrennung von Plasmiden wurden Gele mit 0,8% [w/v] Agarose verwendet und die Laufzeit betrug etwa 5 Stunden. Hierfür wurde eine Spannung von 90 V angelegt und die Gelelektrophorese-Kammer gekühlt (4 °C). Anschließend wurde die separierte DNA in einem 0,01%igen Ethidiumbromidbad für 20 min gefärbt, mittels UV-Licht sichtbar gemacht und digitalisiert.

Tabelle 16: Zusammensetzung des TAE-Puffers für die Agarose-Gelelektrophorese

| 50× TAE-Puffer | |
|-----------------------|-------------------------------|
| | 2 M Tris |
| | 1 M Essigsäure |
| | 100 mM EDTA |
| | Ad 1 L Aqua dest. |
| | Einstellen auf pH 8,1 mit HCl |

3.12 FX Cloning

Um Proteine ohne das Hexahistidinpeptid zu produzieren, wurde das FX Cloning¹⁰² Verfahren verwendet. Das Ziel war, die Proteine NDM-1Δ28, NDM-4Δ28 und NDM-16bΔ28 ohne Hexahistidinpeptid zu reinigen, um Interaktionen durch das Hexahistidinpeptid mit anderen Proteinen auszuschließen. Dazu wurden die amplifizierten Genfragmente mittels PCR und der Oligonukleotide f_NDM-1_D28 und r_NDM-1_D28 aus Tabelle 15 hergestellt und die PCR-Amplifikate gereinigt.

Tabelle 17: Reaktionsansatz für die Klonierung in den Vektor pINITcat

| Material | Menge |
|--|--------------------------|
| Klonierungsvektor pINITcat | 2 µL |
| 10× CutSmart® Puffer (New England BioLabs) | 1 µL |
| Restriktionsenzym <i>SapI</i> (New England BioLabs) | 2,5 µL (1:10 Verdünnung) |
| Gereinigtes PCR-Fragment | 1,5 µL |
| Aqua dest. | 3,5 µL |

Für die Klonierung in den Vektor pINITcat wurde der Reaktionsansatz gemäß Tabelle 17 pipettiert und bei 37 °C für eine Stunde inkubiert, danach wurde das Restriktionsenzym für 15 min bei 65 °C inaktiviert. Anschließend folgte die

Zugabe von je 2 μL T4 DNA-Ligase zu den einzelnen Reaktionsansätzen und eine Inkubation bei Raumtemperatur für 2 Stunden. Die T4 DNA-Ligase wurde dann für 15 min bei 65 °C hitzeinaktiviert. Der Ansatz wurde zentrifugiert und für die Transformation von chemisch kompetenten *E. coli* DH5 α -Zellen (vgl. 3.7) verwendet. Zur Selektion der Plasmid-tragenden Zellen wurden die Transformanten auf LB-Platten ausplattiert, die 50 mg/ μL Chloramphenicol enthielten. Da eine Produktion der Proteine nicht mit diesem Vektor realisiert werden konnte, wurde das inserierte DNA-Fragment in den Expressionsvektor pBXK-CPD kloniert (s. Tabelle 18).

Tabelle 18: Reaktionsansatz für Klonierung in den Expressionsvektor pBXK-CPD

| Material | Menge |
|--|---|
| Expressionsvektor pBXK-CPD | 2 μL |
| 10 \times CutSmart [®] Puffer (New England BioLabs) | 1 μL |
| Restriktionsenzym SapI (New England BioLabs) | 2,5 μL einer 1:10 Verdünnung |
| pNITcat mit dem entsprechenden Genfragment | 1,5 μL |
| Aqua dest. | 3,5 μL |

Die Klonierungsschritte wurden analog zur Klonierung in den Basisvektor pNITcat durchgeführt. Für die Transformation mit den generierten Plasmiden wurden chemisch kompetente Zellen des *E. coli* Stammes MC1061 verwendet. Das Ausplattieren erfolgte auf LB-Agarplatten, die mit 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Kanamycin und 7% [w/v] Saccharose supplementiert wurden. Die Kanamycinresistenz ist auf dem pBXK-CPD Vektor kodiert, während Sucrose die Transkription des pNITcat-Vektors verhindert. Die isolierten Plasmide wurden mittels Sanger-Sequenzierung überprüft und die erworbene Carbapenem-Resistenz der isolierten Klone mittels Agardiffusionstest (siehe 3.9, respektive 3.4) nachgewiesen. Die verwendeten Vektoren und der *E. coli*-Stamm MC1061 wurden von Prof. Dr. Klaas Martinus Pos (Institut für Biochemie, Frankfurt) freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

Tabelle 19: Zusammenfassung der durch FX-Klonierung erhaltenen *E. coli* Stämme

| Stamm | Resistenzen | Referenz |
|---|--------------------|-----------------|
| DH5 α pINITcat NDM-1 Δ 28 | Chloramphenicol, | Diese Arbeit |
| DH5 α pINITcat NDM-4 Δ 28 | Carbapeneme (NDM) | Diese Arbeit |
| DH5 α pINITcat NDM-16b Δ 28 | | Diese Arbeit |
| MC1061 pBXKCPD NDM-1 Δ 28 | Kanamycin, | Diese Arbeit |
| MC1061 pBXKCPD NDM-4 Δ 28 | Carbapeneme (NDM) | Diese Arbeit |
| MC1061 pBXKCPD NDM-16b Δ 28 | | Diese Arbeit |

Für die Produktion der Proteine wurde, wie in Kapitel 3.13 beschrieben vorgegangen, anstatt IPTG wurde 0,1 mg/mL [w/v] Arabinose für die Induktion der Genexpression verwendet.

3.13 Proteinproduktion in *E. coli*-Zellen und affinitätschromatographische Reinigung

Zur Produktion der in Tabelle 20 erwähnten Stämme wurde aus einer Übernachtskultur des entsprechenden Bakterienstammes 1 L LB-Medium mit 30 μ g/mL Kanamycin mit einer optischen Dichte von 0,05 angeimpft. Nach dem Erreichen der OD₆₀₀ 0,8 – 1 wurde die Proteinproduktion mit 0,5 mM IPTG (Endkonzentration) induziert. Durch die Zugabe von 0,1 mM ZnCl₂ wurde außerdem sichergestellt, dass bei Proteinproduktion genug Zinkionen vorliegen, da im aktiven Zentrum der NDM-Proteine jeweils zwei Zinkionen an der Hydrolyse beteiligt sind. Die Zellen wurden über Nacht und bei 20 °C und unter leichtem Schütteln inkubiert. Am folgenden Tag wurden die Kulturen bei 5000 \times g und 4 °C für 20 min zentrifugiert, vereinigt und die Sedimente bis zur Weiterverarbeitung bei -80 °C gelagert.

Tabelle 20: Bakterienstämme für die Proteinproduktion

| Stamm | Protein | Referenz |
|--|---------------------|---------------------|
| BL21(DE3) Star/ pET24a NDM-1 Δ 28 | NDM-1 Δ 28 | Dr. Manuela Tietgen |
| BL21(DE3) Star/ pET24a NDM-4 Δ 28 | NDM-4 Δ 28 | |
| BL21(DE3) Star/ pET24a NDM-16b Δ 28 | NDM-16b Δ 28 | |

Zu Beginn wurden die Sedimente aufgetaut und in je 15 mL Lysepuffer (Tabelle 21) resuspendiert. Auf 200 mL Lysepuffer wurde eine Spatelspitze Lysozym und

10 µL DNase zugesetzt. Nun wurden die Bakterienstämme für 45 min bei 37 °C unter Schütteln inkubiert, um die Zellwände aufzuschließen. Für den weiteren Verlauf wurden die Kulturen stets bei 4 °C gelagert, um eine Degradation des zu reinigenden Proteins zu verhindern. Im Anschluss erfolgte die Zellyse mithilfe eines Dispergierstabes. Für einen optimalen Zellaufschluss wurden die Kulturen danach in je 5 mL aliquotiert und je sechsmal für je 30 sec sonifiziert. Die so aufgeschlossenen Zellen wurden bei 6000 Upm für 20 min bei 4 °C zentrifugiert. Währenddessen wurden die Ni-NTA-Partikel HisPur für die Entfernung von Ethanolresten mit Wasser gewaschen und mit Lysepuffer (Tabelle 21) äquilibriert. Der gewonnene Zellüberstand wurde filtriert und zusammen mit dem Säulenmaterial bei 4 °C für 30 min inkubiert. Anschließend wurde die gesamte Suspension auf eine PolyPrep-Chromatographiesäule aufgetragen. Der Durchfluss wurde aufbewahrt, um später auf das SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetragen zu werden. Es erfolgte ein Waschschrift mit 50 mM Imidazolpuffer und ein Elutionsschritt mit 400 mM Imidazolpuffer. Die Pufferzusammensetzungen entsprachen der des Lysepuffers mit jeweils höherer Imidazolkonzentration. Das so gewonnene Protein wurde mittels einer HiTrap-Säule nach Herstellerangaben in 50 mM Tris/HCl (pH 8,0), 150 mM NaCl, 30 µM ZnCl₂, 5% [v/v] Glycerin umgepuffert, um eine Degradation des Proteins durch die hohe Imidazolkonzentration des Elutionspuffers zu verhindern.

Tabelle 21: Zusammensetzung des Lysepuffers

| Lysepuffer |
|--|
| 50 mM Tris/HCl (pH 8.0) |
| 150 mM NaCl |
| 20 mM Imidazol |
| 30 µM ZnCl ₂ |
| 5% [v/v] Glycerin |
| 1 Tbl. Protease-Inhibitor (Roche) auf 1 L Puffer |

3.14 Entfernen des CPD-Tags von Proteinen aus FX-klonierten Stämmen durch Proteolyse

Die Reinigung der Proteine aus den FX-klonierten Stämmen (s. Tabelle 19) wurde analog zu dem oben beschriebenen Verfahren durchgeführt. Statt des Hexahistidinrests konnten die Proteine über den CPD-Tag an die Ni-NTA Partikel binden. Nach der Reinigung des Proteins erfolgte die proteolytische Abspaltung des CPD-Tags durch Zugabe von 150 μ M Phytinsäurenatriumhydrat-Lösung über Nacht bei 4 °C.

Danach wurde die Reinheit und die Qualität des Proteins mittels denaturierender Polyacrylamid-Gelelektrophorese (siehe 3.16) überprüft.

3.15 Konzentrationsbestimmung gereinigter Proteine

Um die Konzentration der gereinigten Proteine zu bestimmen, wurde das Micro BCA™ Protein Assay Kit entsprechend den Herstellerangaben verwendet. Als Standard diente eine Verdünnungsreihe mit steigenden Konzentrationen an bovinem Serumalbumin (BSA). Eine Kontrolle der Konzentrationsbestimmung erfolgte mittels Absorptionmessung, der Leerwert entsprach dem Proteinpuffer (siehe 3.13).

3.16 Denaturierende Tris/Tricin–SDS–Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Ein Polyacrylamid-Gel wurde wie in Tabelle 22 angegeben angesetzt, wobei APS (10%) und TEMED erst kurz vor dem Gießen des Trenn- und Sammelgels zwischen die vorbereiteten Glasplatten hinzugegeben wurden, um eine vorzeitige Polymerisation zu verhindern. Zuerst wurde das Trenngel gegossen und dieses mit 70% [v/v] Ethanol überschichtet. Nach dem Auspolymerisieren wurde das überschüssige Ethanol entfernt und das Sammelgel darüber geschichtet. Der Kamm wurde eingesteckt und das Polyacrylamid-Gel konnte für maximal 7 Tage bei 4 °C gelagert werden.

Tabelle 22: Zusammensetzung der Lösungen für ein Tris/Tricin SDS-Polyacrylamid-Gel

| Substanzen | Sammelgel (4%) | Trenngel (10%) |
|---------------------|----------------|----------------|
| TT-Acrylamid-Lösung | 1 mL | 6 mL |
| TT-Gelpuffer (3x) | 3 mL | 10 mL |
| Glycerin | - | 3 g |
| Aqua dest. | ad 12 mL | ad 30 mL |
| APS (10%) | 180 µL | 300 µL |
| TEMED | 18 µL | 30 µL |

TT-Acrylamid-Lösung

48% [w/v] Acrylamid
 1,5% [w/v] Bisacrylamid
 ad 500 mL mit Aqua ad iniectabilia

Der Puffer wurde steril filtriert (0,22 µm Porengröße)

TT-Gelpuffer (3x)

3 M Tris (pH 8,45)
 0,3% [w/v] SDS
 ad 1 L Aqua dest.

Der Puffer wurde steril filtriert (0,22 µm Porengröße)

Die zu analysierenden Proben wurden je nach Bedarf mit PBS⁺⁺ auf ein Volumen von 20 µL verdünnt und danach mit jeweils 5,8 µL TT-Inkubationspuffer (4x) (Tabelle 23) versetzt. Als Marker wurde 1 µL des Precision Plus ProteinTM Unstained Standards verwendet, analog zu den Proben verdünnt und mit 5,8 µL TT-Inkubationspuffer versetzt. Alle Proben wurden vor dem Auftragen für 5 min bei 95 °C erhitzt.

Die einzelnen Proteinproben wurden in die Kammern des Polyacrylamid-Gels aufgetragen und bei 40 V für 2 Stunden im Sammelgel und anschließend bei 60 - 75 V im Trenngel über Nacht separiert.

Tabelle 23: Verwendete Puffer für die denaturierende TT-SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

| Puffer | Zusammensetzung |
|----------------------|---|
| TT-Anodenpuffer | 100 mM Tris (pH 8,9) ad 2 L Aqua dest. |
| TT-Kathodenpuffer | 100 mM Tris (pH 8,25) 100 mM Tricin 0,1% [w/v] SDS ad 2 L Aqua dest. |
| TT-Inkubationspuffer | 150 M Tris/HCl (pH 7) 30% [v/v] Glycerin 12% [w/v] SDS 0,008 g Bromphenolblau 600 µL Mercaptoethanol ad 10 mL Aqua dest. |

3.17 Nachweis separierter Proteine mittels Silbernitrat

Zum Nachweis der separierten Proteine wurde das Polyacrylamid-Gel zunächst für 30 min in Fixierlösung (Tabelle 24) inkubiert und die Lösung anschließend abgegossen. Im nächsten Schritt erfolgte wieder eine 30-minütige Inkubation mit Inkubationslösung (Tabelle 24) unter leichtem Schwenken. Nach dem Abgießen wurde das Polyacrylamid-Gel dreimal mit Aqua dest. für je 5 min gewaschen. Es folgte eine Inkubation für 20 min in Silbernitrat-Lösung (Tabelle 24) unter leichtem Schwenken und danach erneut drei Waschschrte mit Aqua dest.. Nach Zugabe der Entwicklerlösung (Tabelle 24) wurde das Polyacrylamid-Gel so lange geschwenkt, bis die Proteine gut zu erkennen waren. Die Entwicklerlösung wurde verworfen und die Reaktion mit der Stopplösung (Tabelle 24) beendet.

Tabelle 24: Zusammensetzung der Lösungen für die Färbung von Proteinen mit Silbernitrat

| Lösung | Zusammensetzung |
|---------------------|---|
| Fixierlösung | 40% [v/v] Ethanol 4% [v/v] Essigsäure ad 250 mL Aqua dest. |
| Inkubationslösung | 0,8 mM Natriumthiosulfat 50 mM Natriumacetat 0,5% [v/v] Glutaraldehyd-Lösung (mit 25% [w/v]) 30% [v/v] Ethanol ad 250 mL Aqua dest. |
| Silbernitrat-Lösung | 0,9 mM Silbernitrat 0,15% [v/v] Formaldehyd-Lösung (mit 37% [w/v]) ad 250 mL Aqua dest. |
| Entwicklerlösung | 15 mM Natriumcarbonat 0,07% [v/v] Formaldehyd-Lösung (mit 37% [w/v]) ad 250 mL Aqua dest. |
| Stopplösung | 200 mM EDTA ad 2 L Aqua dest. |

3.18 Natürliches Humanserum

Humanserum wurde von freiwilligen Blutspendern gewonnen. Alle Spender wurden über mögliche Risiken einer Blutentnahme sowie über das Studienprotokoll aufgeklärt und bekundeten schriftlich ihr Einverständnis. Nach der Blutentnahme wurden die S-Monovetten auf Eis gelagert und anschließend bei 4 °C für 20 min bei 2000 × g zentrifugiert. Danach wurden die Einzelseren zu einem Serumpool zusammengefasst, aliquotiert und bei -80 °C aufbewahrt.

Eine Prüfung sämtlicher Dokumente erfolgte durch die Ethikkommission des Universitätsklinikums Frankfurt, wobei keinerlei Bedenken bezüglich der Studie und der Blutentnahme geäußert wurden (Geschäftsnummer 492/13).

3.19 Komplementinhibitions-Test (WiELISA)

Um eine Inhibition bakterieller Proteine auf die Komplementkaskade zu testen, wurden ELISA-basierte Komplementtests (WiELISA, WIESLAB AB, SVAR Life Science, Schweden) durchgeführt, die die Aktivierungsstufen des klassischen Weges, des Lektinweges und des alternativen Weges *in vitro* abbilden. Dafür wurden kommerzielle WIESLAB® Komplement Test von SVAR Life Science (Schweden) verwendet. Die Anwendung erfolgte nach der Anleitung des Herstellers, allerdings wurde gepooltes Humanserum verwendet sowie eigene Positivkontrollen. Als Kontrollen dienten ein Fragment des BBK32-Protein von *Borrelia burgdorferi*¹⁰³ für den klassischen und das CipA-Protein von *Acinetobacter baumannii*¹⁰³ für den Lektin- und den alternativen Weg. Zudem wurden immer eine Negativkontrolle mit Proteinpuffer und eine Kontrolle mit BSA mitgeführt. Die photometrische Messung erfolgte bei einer Absorption von 405 nm. Die gemessenen Daten wurden mit GraphPad Prism 7 ausgewertet.

3.20 ELISA-basierter Protein-Protein Interaktionstest

Mithilfe eines ELISA wurde die Bindung von Komplementfaktoren an verschiedene NDM-Varianten untersucht. Dazu wurden in einer Mikrotiterplatte mit Flachboden 500 ng Protein pro Kavität in 100 µL Immobilisierungspuffer (Tabelle 25) pipettiert. Es folgte eine Inkubation über Nacht bei 4 °C unter leichtem Schwenken. Nach der Inkubation wurden am nächsten Tag die einzelnen Kavitäten dreimal mit je 100 µL Waschpuffer (Tabelle 25) gespült. Im Anschluss erfolgte das Blockieren unspezifischer Bindungsstellen mit Blocking Buffer III BSA. Dazu wurden je Kavität für eine Stunde 100 µL des Puffers bei RT unter leichtem Schwenken inkubiert und danach die Kavitäten dreimal mit je 100 µL Waschpuffer gewaschen. Anschließend erfolgte eine Inkubation für 1 Stunde bei RT mit Komplementkomponenten, wovon 1 µg auf 100 µL pro Kavität mit PBS⁺⁺ verdünnt wurde. Nach dreimaligem Waschen der Mikrotiterplatte mit je 100 µL Waschpuffer erfolgte die Zugabe des primären Antikörpers (1:1000 Verdünnung in PBS⁺⁺). Wieder wurden davon 100 µL je Vertiefung pipettiert und die Mikrotiterplatte für eine Stunde bei RT unter leichtem Schütteln inkubiert und

die Kavitäten dann erneut mit je 100 μL Waschpuffer dreimal gewaschen. Der sekundäre Antikörper wurde ebenfalls 1:1000 mit PBS⁺⁺ verdünnt und davon je 100 μL in die einzelnen Vertiefungen gegeben. Die Inkubation erfolgte für eine Stunde unter leichtem Schütteln bei RT. Anschließend wurde die Mikrotiterplatte dreimal mit je 100 μL Waschpuffer gewaschen. Danach erfolgte die Zugabe von 100 μL Substratpuffer. Der Substratpuffer wurde jeweils frisch angesetzt, indem eine Tablette *ortho*-Phenylendiamin in 20 mL Substratpuffer aufgelöst wurde und anschließend direkt vor dem Pipettieren 20 μL Wasserstoffperoxid hinzugefügt wurden. Die Reaktion wurde nach etwa 5 - 8 min mit je 50 μL Stopplösung beendet und die Absorption bei 490 nm photometrisch gemessen.

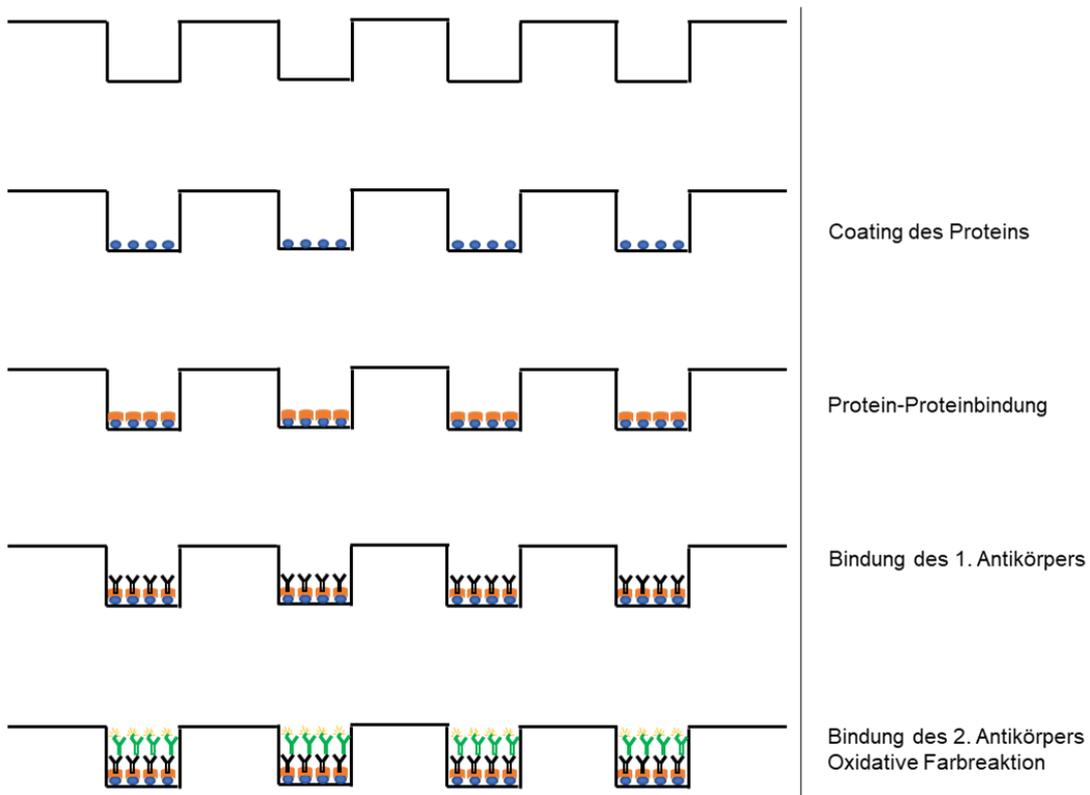


Abbildung 8: Schematische Darstellung ELISA

Tabelle 25: Zusammensetzung der Puffer für den ELISA

| Puffer | Zusammensetzung |
|------------------------|--|
| Immobilisierungspuffer | 50 mM Na ₂ CO ₃ 0,02 [w/v] Natriumazid pH 9,6 die Lösung wurde sterilfiltriert (0,22 µm Porengröße) |
| Waschpuffer | 0,05% [v/v] Tween20 ad 1 L 1x PBS |
| Substratpuffer | 100 mM Kaliumhydrogenphosphat ad 1 L Aqua dest. pH 6,0 (mit KOH eingestellt) |
| Stopplösung | 2,6 M Schwefelsäure ad 500 mL Aqua dest. |

3.21 Far Westernblot

Der Far Westernblot¹⁰⁴ wurde angewandt, um die Bindung von NDM-1Δ28 mit verschiedenen Komplementkomponenten nachzuweisen. Dafür wurde ein natives Gel mit einem Acrylamidgradienten von 4-20% verwendet und auf das Polyacrylamid-Gel die entsprechenden Komplementkomponenten aufgetragen. Pro Tasche wurden 1,5 µg Komplementprotein, 5 µL Probenpuffer (62,5 mM Tris/HCl, 40% [v/v] Glycerin, 0,01% [w/v] Bromphenolblau, pH 6,8) und 3,5 µL PBS verwendet. Das Acrylamid-Gel wurde mit Laufpuffer (25 mM Tris, 192 mM Glycin, pH 8.3) überschichtet und die Proteine für eine Stunde bei 200 V separiert. Anschließend wurden die Proteine auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Dazu wurde die Anode der Blotapparatur mit Anodenpuffer (Tabelle 26) angefeuchtet und vier ebenfalls angefeuchtete Chromatographiepapiere positioniert. Auf die Chromatographiepapiere wurde wieder eine in Anodenpuffer getränkte Nitrozellulosemembran gelegt. Nach Entfernen des Trenngels wurde das Sammelgel auf die Nitrozellulosemembran positioniert und in Kathodenpuffer getränkte Chromatographiepapiere luftblasenfrei aufgelegt. Die Kathode wurde ebenfalls mit Kathodenpuffer befeuchtet und die Apparatur fest verschraubt. Der Transfer erfolgte bei 1 mA/cm² und 30 V für 2 Stunden. Die transferierten

Proteine wurden daraufhin mit dem „*Protein Reversible Detection*“-Kit überprüft, indem die Membran für ca. 5 min inkubiert wurde. Nach dem Entfärben der Membran wurden alle freien Bindungsstellen mithilfe eines Blockierungspuffers (TBS mit 5% Magermilchpulver, Tabelle 26) für 1 Stunde bei RT unter leichtem Schütteln geblockt. Danach wurde viermal jeweils 5 min mit Blockierungspuffer gewaschen. Nun folgte eine zweistündige Inkubation mit NDM-1Δ28, das in Waschpuffer (Tabelle 26) verdünnt wurde. Die Membran wurde viermal mit Waschpuffer gewaschen. Nun folgte die Inkubation mit dem HRP-konjugierten Anti-His₆-Antikörper (1:1000 in Waschpuffer) für 1 Stunde bei Raumtemperatur und ein weiterer Waschvorgang mit Waschpuffer. Die Antigen-Antikörper-Komplexe wurden durch Zugabe von TMB detektiert.

Tabelle 26: Zusammensetzung der Puffer für die Far Westernblot-Analyse

| Puffer | Zusammensetzung |
|----------------|--|
| Anodenpuffer | 300 mM Tris/HCl, pH 8,7 100 mM Tricin ad 1 l Aqua dest. |
| Kathodenpuffer | 30 mM Tris/HCl, pH 8,6 300 mM ε-Aminocapronsäure ad 1 l Aqua dest. |
| TBS-T | TBS Tween 20, 0,01% [v/v] |
| Waschpuffer | TBS Tween 20, 0,02% [v/v] |

3.22 Hämolytische Assays

Bei diesem Versuch wurde die inhibitorische Eigenschaft der NDM-Varianten auf Schafserythrozyten als natürliche Komplementaktivatoren untersucht. Im Normalfall führt eine Aktivierung nach Zugabe von Humanserum zur Bildung des Membran-Angriffs-Komplexes (MAK) auf der Zellmembran der Erythrozyten, welcher Poren ausbildet, die zu einem Austritt von Hämoglobin führen. Die Lyse der Erythrozyten und der Austritt des Hämoglobins lässt sich mit einem Photometer bei Messung der Absorption bei 414 nm detektieren. Mit diesem Test

konnten der Einfluss der NDM-Varianten auf den klassischen Weg sowie den terminalen Weg untersucht werden.

3.22.1 Zellzahlbestimmung von Erythrozyten

Um die benötigte Erythrozytenmenge für die hämolytischen Assays zu bestimmen, wurden in GVB⁺⁺ je drei Verdünnungsstufen hergestellt: 1:1000, 1:2000 und 1:4000. 10 µL jeder Verdünnung wurden entnommen und in die Zellkammern einer KOVA[®] Glasstic[®] Slide 10 (mit Gitter) pipettiert. Unter dem Dunkelfeldmikroskop wurden 9 Quadranten mit Erythrozyten ausgezählt und die Zellzahl mittels untenstehender Formel bestimmt.

$$\text{Durchschnitt} * \text{Kammerfaktor (90)} * \text{Verdünnungsfaktor} = \frac{\text{Zellen}}{\mu\text{L}}$$

3.22.2 Klassischer Weg

Zunächst mussten die Schafserythrozyten mit GVB⁺⁺ gewaschen werden, um geschädigte Zellen zu entfernen. Dafür wurden 4 mL Erythrozytensuspension bei 2000 × g für 5 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Anschließend wurde das Zellsediment in etwa 10 mL GVB⁺⁺ gewaschen und erneut sedimentiert. Dieser Vorgang wurde ein weiteres Mal wiederholt und das Sediment anschließend in 9 mL GVB⁺⁺ resuspendiert und mit 3 µL Ambozeptor versetzt. Zur Sensibilisierung der Erythrozyten für Komplementkomponenten wurden die Zellen für 20 min bei 37 °C mit Ambozeptor inkubiert und regelmäßig invertiert. Nun folgte ein letzter Zentrifugationsschritt und die Zellen wurden in 5 mL GVB⁺⁺ resuspendiert. Die Zellzahl der Erythrozyten wurde, wie unter Kapitel 3.22.1 beschrieben, bestimmt und 10 mL einer Suspension mit 2 × 10⁸ Erythrozyten /mL hergestellt. In Vorversuchen wurde ermittelt, bei welcher Menge an Humanserum eine OD von ca. 1,0 erreicht wird. Dazu wurden je 30 µL Erythrozyten mit unterschiedlichen Serummengen für 30 min bei 37 °C inkubiert. Dabei wurden die Erythrozyten immer auf ein Gesamtvolumen von 150 µL mit GVB⁺⁺ eingestellt. Nach erfolgter Inkubation wurden die restlichen

Erythrozyten bei $2000 \times g$ für 5 min sedimentiert und der Überstand in eine Mikrotiterplatte mit Flachboden überführt. Die Absorption bei 414 nm wurde im Spektralphotometer gemessen und das Serumvolumen, bei dem ein Absorptionswert von ca. 1 erzielt wurde, als Standard für die weiteren Versuche gesetzt.

Für die Komplementinhibitions-Versuche wurden unterschiedliche Mengen an zu untersuchendem Protein (3 μg , 6 μg und 18 μg) mit GVB⁺⁺ und 26% NHS auf ein Volumen von insgesamt 120 μL aufgefüllt und für 30 min bei 37 °C und 300 Upm inkubiert. Als Positivkontrolle diente der Komplementregulator C4b-bindendes Protein und Faktor I, die in Kombination den klassischen Weg inhibieren. Zudem wurde Puffer (siehe Proteinpuffer aus 3.13) als Negativkontrolle eingesetzt. Im nächsten Schritt wurden den einzelnen Reaktionsansätzen jeweils 30 μL präparierte Erythrozyten beigefügt und es erfolgte ein erneuter Inkubationsschritt für 30 min bei 37 °C. Danach wurden die Erythrozyten bei $2000 \times g$ für 5 min zentrifugiert und die Lyse bei 414 nm ermittelt.

3.22.3 *Terminaler Komplementweg*

Für diesen Test wurde wie oben beschrieben, eine Erythrozytensuspension mit 5×10^8 Erythrozyten /mL hergestellt. Von den untersuchenden Proteinen wurden je 1 μg , 2,5 μg und 3,5 μg in 10 μL mit GVB⁺⁺ vorbereitet und die Reaktionsansätze auf Eis gelagert. Als Positivkontrolle diente Vitronectin und als Negativkontrolle Proteinpuffer. Es wurde anschließend ein Reaktionsansatz hergestellt, der jeweils 2 $\mu g/mL$ der Komplementkomponenten C7 und C9 und 0,4 $\mu g/mL$ des Faktors C8 enthielt. Je nach Anzahl der 30 μL Reaktionsansätze wurden die vorbereiteten Erythrozyten mit 0,2 $\mu g/mL$ C5b-6-Komplex versetzt und bei Raumtemperatur für 20 min unter regelmäßigem Invertieren inkubiert. Währenddessen wurden jeweils 20 μL des Reaktionsansatzes mit den Komplementkomponenten C7-C9 zu den verdünnten Proteinproben pipettiert. Nach einer Inkubationszeit von 5 min bei RT wurden die mit C5b-6 vorinkubierten Erythrozyten dazugegeben. Nach 30 min bei 37 °C wurden die Erythrozyten bei $2000 \times g$ für 5 min sedimentiert und der Überstand in eine Mikrotiterplatte überführt. Anschließend wurde die Absorption bei 414 nm gemessen.

3.23 Enzym- und Aktivitätsmessungen

Die gereinigten Proteine wurden auch zur Messung von Enzymkinetiken verwendet. Die Proteine wurden im Messpuffer (100 mM Natriumphosphat, pH 7,0; 50 mM Natriumhydrogencarbonat; 0,2 mg/mL BSA)¹⁰⁵ auf eine Endkonzentration von 1 nM verdünnt und Nitrocefin in unterschiedlichen Konzentrationen (1 µM bis 50 µM) hinzugegeben. Die Absorption wurde bei 482 nm Wellenlänge und 30 °C spektralphotometrisch mittels Plattenphotometer bestimmt. Die Auswertung der gemessenen Daten erfolgte mit GraphPad Prism 7.

Um eine Hemmung des Enzyms zu erreichen, wurden Aktivitätsmessungen mit 3-Formylchromon durchgeführt, die einen anderen Puffer erforderten (100 mM HEPES, 150 mM NaCl, 100 µM ZnCl₂, 0,005% [v/v] Tween20, 20 mg/mL BSA). 3-Formylchromon wurde in einer Konzentration von 250 µM dem Reaktionsansatz beigesetzt und mit DMSO vorverdünnt¹⁰⁶. Für diese Versuche wurde mit 50 µM Nitrocefin gearbeitet.

3.24 Virulenz und Therapie-Versuche mit dem *Galleria mellonella*-Infektionsmodell

Zur Untersuchung der Virulenz von Bakterien sowie zur Evaluation von Antibiotika-Therapien *in vivo* wurden Larven der Großen Wachsmotte (*Galleria mellonella*, UK waxworms) verwendet. Dabei wurden ausschließlich makroskopisch gesunde Larven mit einem Gewicht von 200 - 350 mg verwendet. Aus jeder gelieferten Verpackung wurde je eine Larve in PBS homogenisiert und auf Schafblutagar ausplattiert, um nach einer Inkubation über Nacht bei 37 °C eine Kolonisation mit Gram-negativen Bakterien oder eine übermäßige Bakterienkontamination auszuschließen.

Für die Infektionsversuche wurden 30 mL LB-Medium aus einer Übernachtskultur beimpft (OD₆₀₀ = 0,05) und in der exponentiellen Wachstumsphase bei einer OD₆₀₀ = 0,4 durch Zentrifugation sedimentiert, gewaschen und auf eine OD₆₀₀ von 0,15 eingestellt. Je nach Experiment wurden logarithmische

Verdünnungsreihen erstellt, um die Auswirkungen unterschiedlich hoher Konzentrationen zu untersuchen. Von den Bakteriensuspensionen wurden die Verdünnungsstufen 10^{-5} und 10^{-6} in Triplikaten auf Müller-Hinton Agarplatten ausplattiert, um die injizierte Bakterienanzahl zu bestimmen. Es wurden 10 μ L in je 12 Larven pro Gruppe in den unteren rechten Bauchfuß mit einer Hamilton-Präzisionsspritze injiziert. Bei einem Therapieversuch erfolgte nach einer Stunde eine weitere Injektion mit 0,5 mg/mL Imipenem in den linken unteren Bauchfuß. Hierfür wurden Versuche von Tietgen *et al.*¹⁰⁷ als methodische Vorlage genutzt. Diese Dosis entspricht etwa 170 mg/kg Körpergewicht der Larve und liegt damit über der Dosis, die bei der Therapie von Menschen verwendet wird. Laut der Herstellerangaben liegt die tägliche therapeutische Dosis von Imipenem bei Menschen in etwa bei 30 bis maximal 60 mg/kg Körpergewicht. Zur Kontrolle wurde stets eine Gruppe nur mit PBS injiziert. In regelmäßigen Zeitabständen wurde die Vitalität der Larven bis zu 48 Stunden beobachtet. Eine Larve wurde als „tot“ aussortiert, sobald sie auf wiederholte taktile Reize keine sichtbare Bewegung mehr zeigte. Zudem zeigt sich mit zunehmender Erkrankung eine dunklere Verfärbung der Larven. Die zelluläre Immunantwort von *G. mellonella* wird über Hämocyten vermittelt, die eine Phagozytoseaktivität zeigen¹⁰⁸. Dabei wird Melanin über den Prophenoloxidase-Weg produziert, was zu einer dunkleren Färbung der Larve führt¹⁰⁹.



Abbildung 9: Injektion von *G. mellonella*-Larven. Oben: Die Injektion erfolgt in einen der beiden unteren Bauchfüße der Larve unter vorsichtiger Fixierung. Die kühle Lagerung führt zu einem trägeren Zustand der Larve, was die Injektion erleichtert. Unten: Links die Dorsal- und Ventralansicht zweier gesunder Larven, erkennbar an ihrer hellen Färbung, in der Mitte sind kranke Larven mit dunklerer Färbung und rechts zwei verstorbene Tiere abgebildet. Die Abbildung wurde freundlicherweise von Julia Kutschenreuter zur Verfügung gestellt¹¹⁰.

3.25 Wachstumsversuche

Um die Fitness verschiedener Bakterienstämme vergleichend zu analysieren, wurden Wachstumsversuche durchgeführt. Dafür wurden Übernachtskulturen von den zu untersuchenden Stämmen angesetzt und am nächsten Tag auf eine $OD_{600} = 0,05$ angeimpft. Pro Stamm wurden je drei Kulturen in einem Wachstumsversuch unter denselben Bedingungen untersucht (37 °C, 180 Upm, gleiche Lichtverhältnisse, gleiches Medium). Halbstündig wurde die optische Dichte bestimmt und die Wachstumsrate sowie die Verdopplungszeit mittels Microsoft Excel berechnet.

3.26 Protein-Protein-Interaktion mittels Thermal Shift Assay

Zum Nachweis der Interaktion der NDM-Varianten mit Komplementkomponenten wurde das „Thermal Shift“ Verfahren¹¹¹ verwendet. Mit dem fluoreszierenden Farbstoff „SYPRO Orange“ wurden die hydrophoben Aminosäuren in den beiden zu untersuchenden Proteinen markiert. Durch die kontinuierliche Temperaturerhöhung findet eine Entfaltung der Proteine statt, sodass sich die Angriffsfläche für den Fluoreszenzfarbstoff vergrößert. Sobald die Proteine aggregieren, nimmt die Fluoreszenz wieder ab. Für die Messungen wurden je Triplikate aus 2,22 μM NDM-1 Δ 28 und 2,22 μM C4b pipettiert. SYPRO Orange wurde nach Herstellerangaben 1:5000 verdünnt hinzugefügt. Die Proben wurden im MyiQ Thermal Cycler gemessen und die Temperatur alle 24 s um 0,2 °C erhöht. Die Messung erfolgte bei einer Reizwellenlänge von 490 nm und einer Emissionswellenlänge von 570 nm. Die Daten wurden mittels Microsoft Excel ausgewertet.

3.27 Protein-Protein Interaktion mittels Microscale-Thermophoresis-Verfahren

Mithilfe einer auf Thermophoresis basierenden Methode (Microscale Thermophoresis, MST) kann das Verhalten eines fluoreszenzmarkierten Stoffes in einer Glaskapillare bei Temperaturveränderung untersucht werden. Die Temperaturveränderung von etwa 2 – 6 °C wird im Wesentlichen durch das An- und Abschalten eines Lasers hervorgerufen. Das Anschalten des Lasers führt zu einer lokalen Temperaturerhöhung und die fluoreszenzmarkierten Proteine diffundieren auseinander, bis ein Fließgleichgewicht erreicht ist. Nach dem Abschalten der Laserlampe fällt die Temperatur abrupt ab und die Teilchen bewegen sich in ihren Ausgangszustand zurück.

Um die Interaktion von NDM-1 Δ 28 an die Komplementkomponente C4b zu untersuchen, wurde das gereinigte Protein mit dem Fluoreszenzmolekül NT-647 markiert. Dafür wurde nach den Herstellerangaben des Monolith Protein Labeling Kit RED-NHS verfahren und das Protein auf eine Konzentration von 5 μM eingestellt. Für die Messungen wurde der NanoTemper Monolith NT.115 Series

verwendet und dabei die Premium Kapillaren eingesetzt. Um nachzuweisen, ob das Protein markiert wurde und um eine Interaktion zwischen dem zu untersuchenden Protein und der Glaskapillare auszuschließen, wurde eine 1:2 Verdünnungsreihe beginnend mit der höchsten Konzentration (5,65 μM) hergestellt und das Verhalten des markierten Proteins während der Messung untersucht. Daraufhin wurde mit 50 nM NDM-1 Δ 28 als optimaler Konzentration weitergearbeitet und C4b in unterschiedlichen Konzentrationen hinzugegeben, um eine potenzielle Interaktion nachzuweisen und diese zu quantifizieren.

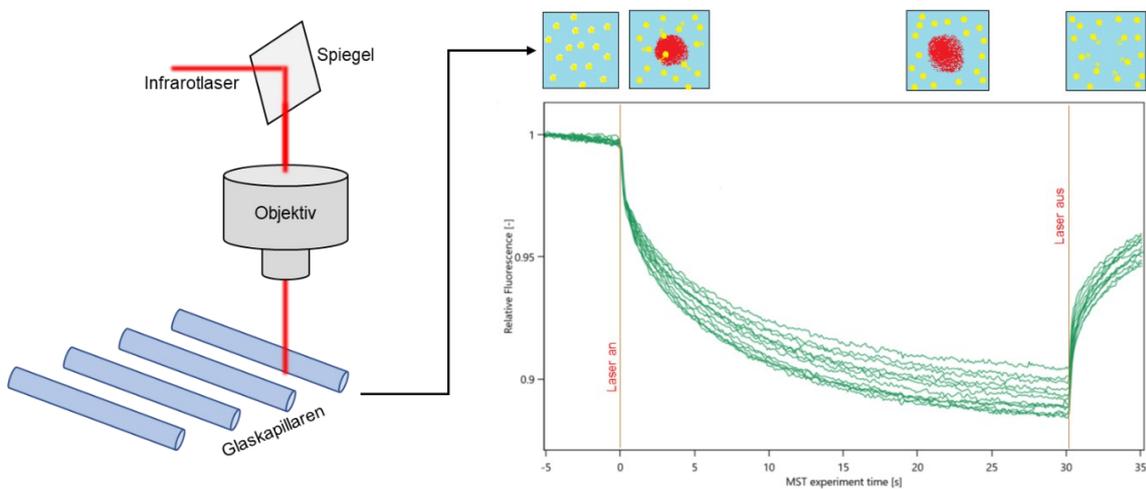


Abbildung 10: Prinzip der Microscale Thermophoresis-Methode: Der fluoreszenzmarkierte Stoff in den Glaskapillaren wird mit einem Laser bestrahlt, wodurch sich die Teilchen von der Lichtquelle fortbewegen und die Detektion der Fluoreszenz abnimmt. Bei Ausschalten des Lasers ist der Prozess rückläufig. Bei miteinander interagierenden Proteinen verhalten sich diese in Lösung träger im Vergleich zu nicht-interagierenden Proteinen und die Fluoreszenz nimmt weniger stark ab. Die Abbildung ist angelehnt an Werbeabbildungen von NanoTemperTech.

4 Ergebnisse

4.1 Epidemiologie *bla*_{NDM}-tragender Patientenisolat

Das vermehrte Auftreten von Antibiotikaresistenzen bei hochpathogenen Erregern und die langwierige Entwicklung neuer Therapieoptionen machen epidemiologische Untersuchungen im Gesundheitssystem unentbehrlich. Nur wenn die Gefahr nosokomialer Infektion durch quantifizierbare Daten objektiviert wird, können Hygienekonzepte entwickelt werden, mit denen langfristig die Ausbreitung von Antibiotikaresistenzen eingedämmt werden kann.

In dieser Arbeit wurden NDM-tragende Patientenisolat aus dem Zeitraum 2007 bis 2017 am Universitätsklinikum Frankfurt im Hinblick auf Patienten- und Erregereigenschaften ausgewertet. Dadurch sollten neue Erkenntnisse bezüglich Speziesverteilung, Mutationsverteilung oder Patientenkollektiv gewonnen werden und bereits erhobene epidemiologische Daten (Wu *et al.*¹¹²) überprüft werden. Dies erfolgte als Ergänzung zur Promotionsarbeit von Frau Belkys Leisten, in der die Patientendaten von 2007 bis 2016 (n=47 Isolate) erhoben werden. Am Institut für Medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene werden Patientenisolat auf ihr Resistenzmuster untersucht, woraus sich erste Erkenntnisse ergeben, ob der Erreger eine Carbapenem-Resistenz besitzt und bei auffälligen Ergebnissen schließt sich eine MALDI-TOF-Untersuchung an.

Im angegebenen Zeitraum wurden 60 Patientenisolat mit einer *bla*_{NDM}-Gensequenz gesichert, dabei kodierten zwei Drittel der Isolate für *bla*_{NDM-1} (Abbildung 11). 47 Patientenisolat waren bereits in der Arbeit von B. Leisten untersucht worden. Ab 2013 zeigte sich eine deutliche Zunahme von Isolat, die eine Mutation tragen, erkennbar an der Zunahme der NDM-Varianten. Hier setzte sich vor allem die M154L-Mutation durch, die für die Varianten NDM-4, NDM-5, NDM-7 und NDM-16b kodiert. 2016 trugen bereits 47% der Patientenisolat eine M154L-Mutation und ein Jahr später waren es 50%. Von den 60 untersuchten Isolat trugen 40 eine *bla*_{NDM-1}-Gensequenz und damit keine Mutation. Unter den NDM-Varianten fand sich besonders häufig die Variante NDM-5 (V88L, M154L) mit einem Anteil von über 50%.

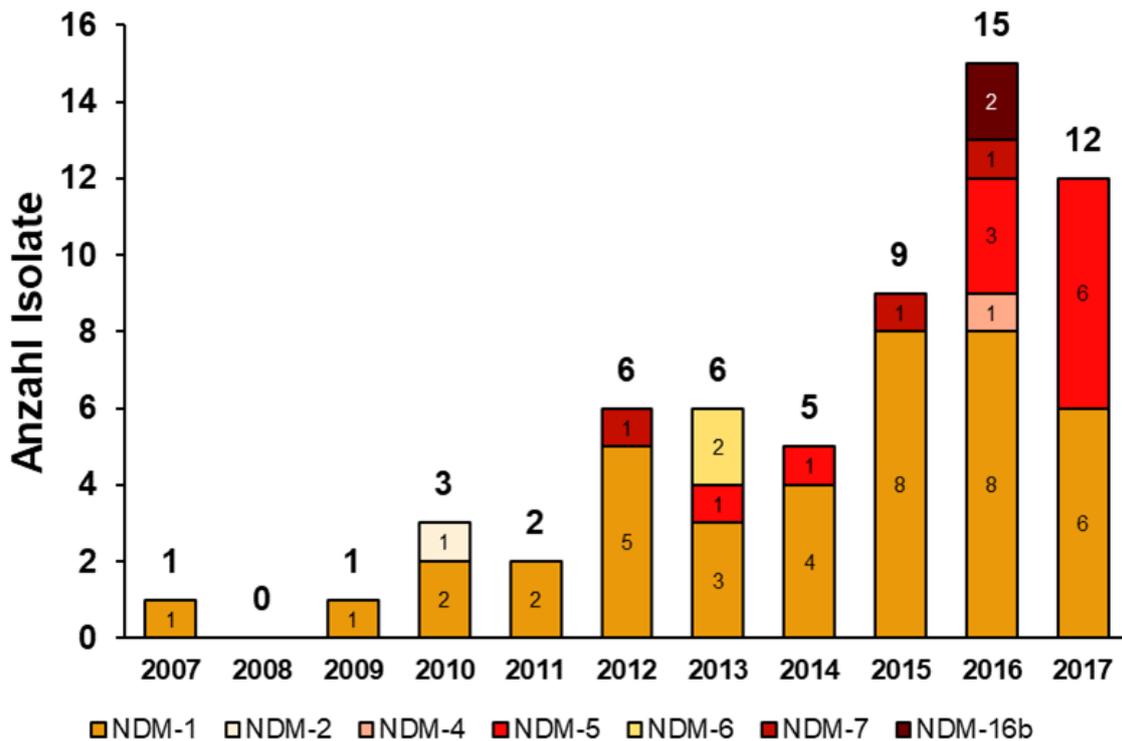


Abbildung 11: Verteilung der NDM-Varianten am Universitätsklinikum Frankfurt von 2007-2017. Man erkennt eine Zunahme an NDM-positiven Isolaten (n=60) im Laufe der Jahre. Zudem zeichnet sich seit 2016 eine Häufung von M154L-Varianten ab. NDM-1, -2 und -6 haben keine M154L-Mutation. Die Daten sind eine Ergänzung zur Arbeit von B. Leisten, in der der Zeitraum 2007-2016 untersucht wurde.

Bei dem Patientenkollektiv waren 69% der Patienten männlich. Zudem waren oft ältere Patienten betroffen, so waren 72% aller Patienten älter als 50 Jahre.

55% aller NDM-positiven Isolate wurden bei einem Abstrich auf Normalstation nachgewiesen und etwa ein Viertel entfielen auf die Intensivstationen. Unter Berücksichtigung der Belegsituation im Krankenhaus, die Intensivbetten entsprechen einem Anteil von etwa 5% an der Gesamtbelegung, ist der Anteil an NDM-positiven Isolaten auf Intensivstation um mehr als das 10-fache höher als auf Normalstation.

Unter den Lokalisationen entfiel der größte Anteil mit 55% auf Rektalabstriche (Abbildung 12). Neben den Rektalabstrichen gehören die Rachenabstriche (6%) zu den getesteten Routinekontrollen für Risikopatienten und nehmen daher einen derart großen Anteil ein. Die restlichen Nachweisorte waren homogen verteilt. Dem tiefen Respirationstrakt sind bronchiale und tracheale Abstriche, bronchoalveoläre Lavage und auch Mundspülungen zugeordnet. Ulcusabstriche

wurden als Wundabstriche zusammengefasst und als Kolonisation gewertet. Davon abgegrenzt wurden die Hautabstriche, auf die ein Anteil von 5% entfiel. Beachtenswert ist auch, dass Urin mit 13% der Nachweise nach den Rektalabstrichen an zweiter Stelle steht.

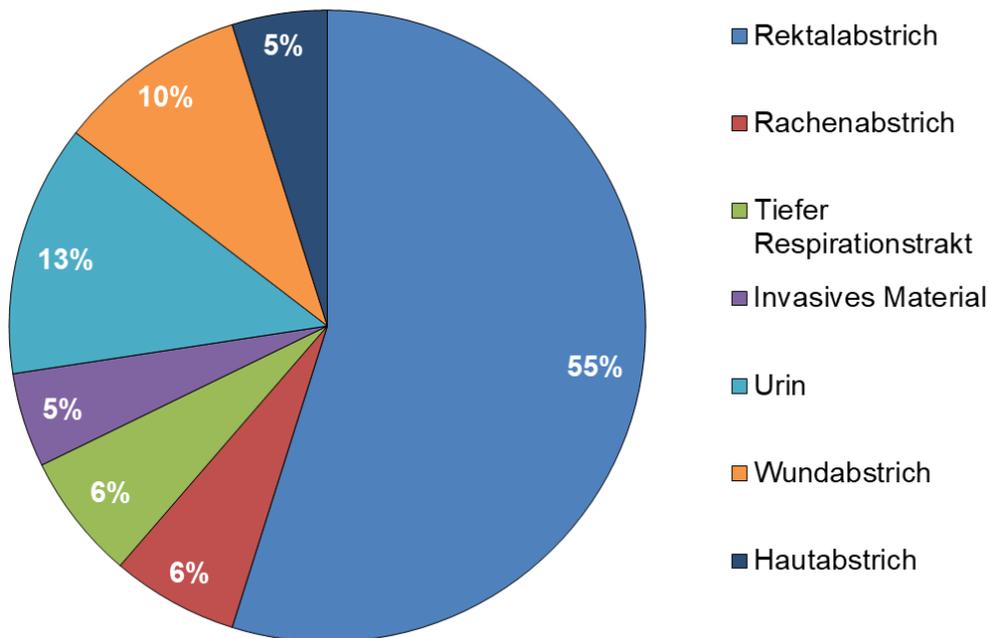


Abbildung 12: Verteilung der Nachweislokalisationen für Erreger mit NDM (n=62). Einige Erreger wurden von je einem Patienten isoliert. Zwei der Erregerlokalisationen stammen bereits aus dem Jahr 2018. Mit invasivem Material waren Blutkulturen und intraoperative Abstriche abgedeckt. Die Daten des Zeitraums 2007-2016 wurden von B. Leisten ausgewertet, die zusätzlichen Isolate aus 2017 hier einbezogen.

Die Unterscheidung in Kolonisation und Infektion erfolgte auf Grundlage von mikrobiologischen Daten. Bei invasiven Abstrichen sowie Proben aus dem tiefen Respirationstrakt und Blutkulturen wurde eine Infektion angenommen. Auch Mittelstrahlurin mit einem Bakteriennachweis von $>10^3$ KBE/mL wurde entsprechend der AWMF-Leitlinie als Infektion angesehen¹¹³. Unter Kolonisation fallen Rektalabstriche, Rachenabstriche, Hautabstriche und Proben aus dem oberen Respirationstrakt wie Mundspülungen. Komplexer war die Unterscheidung, ob der Erreger ambulant oder nosokomial erworben worden war. Bei einem stationären Aufenthalt von >48 Stunden, oder wenn die Patienten innerhalb der letzten 3 Monate bereits stationär versorgt worden waren, wurde

von einer nosokomialen Übertragung ausgegangen (§23 Infektionsschutzgesetz).

Bei der Bewertung der vorliegenden Daten konnte in 43% der Fälle eine nosokomiale Übertragung nicht ausgeschlossen werden. Da Einzelentscheidungen nicht immer eindeutig waren und zwei Patienten mehrere unterschiedliche Isolate trugen, sind hier nur insgesamt 56 von 60 Isolaten aufgeführt (Abbildung 13). In ca. 80% der Fälle wurde eine Kolonisation angenommen.

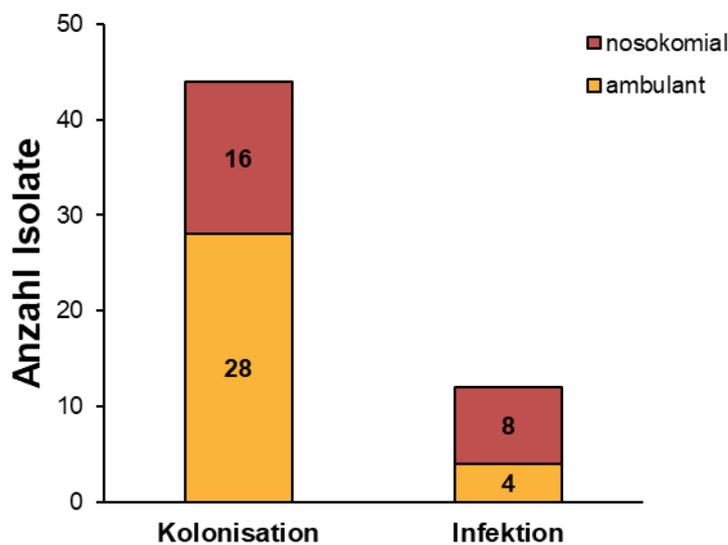


Abbildung 13: Unterscheidung in Kolonisation und Infektion der untersuchten Erreger (n=56). Der Großteil der erfassten Erreger besiedelte lediglich ihren Wirt, ohne zu einer Infektion zu führen. Bei der Unterscheidung, ob der Erreger ambulant oder nosokomial erworben wurde, lagen etwas mehr ambulant erworbene Fälle vor. Da Einzelentscheidungen nicht immer eindeutig waren und zwei Patienten mehrere unterschiedliche Isolate trugen, sind hier nur insgesamt 56 von 60 Isolaten aufgeführt. Hier wurde sich auf Vordaten von B. Leisten (Zeitraum 2007-2016) bezogen.

Die Spezies der Patientenisolat mit NDM-Nachweis waren hauptsächlich *E. coli* oder *K. pneumoniae* (32%, respektive 31%). Unter den *E. coli* Isolaten war die Anzahl an der mutierten M154L-Variante weitaus höher als in anderen Enterobacterales (Abbildung 13). Bei *K. pneumoniae* lag fast ausschließlich NDM-1 vor, bei *A. baumannii* ebenfalls. Zudem wurde kein *A. baumannii* Isolat mit einer M154L-Variante detektiert. Bei den beiden Isolaten mit der neu aufgetretenen Variante NDM-16b handelte es sich um *E. coli*. Insgesamt waren 32% der Isolate *E. coli*, 31% *K. pneumoniae* und 19% *A. baumannii* (Abbildung

14). Die restlichen 18% verteilen sich auf *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter cloacae*, *Citrobacter freundii* und *Citrobacter koseri* sowie *Serratia marcescens*. Die aufgeführten Erregerspezies zählen hauptsächlich zu den Enterobacterales, Gram-negative Stäbchenbakterien, die in der natürlichen Darmflora angesiedelt sind und als fakultativ pathogen gelten. Gelangen die Erreger beispielsweise in die Lunge, Hautläsionen oder den Urogenitaltrakt, können sie dort schwerwiegende Infektionen auslösen. *A. baumannii* gehört zur Ordnung der Pseudomonales und damit zu den Nonfermentern. Insbesondere das Hauptvorkommen im Darmtrakt begünstigt den Gentransfer unter den Erregerspezies und damit den Austausch von bakteriellen Resistenzgenen, aufgrund der hohen Anzahl von Bakterien im Gastrointestinaltrakt.

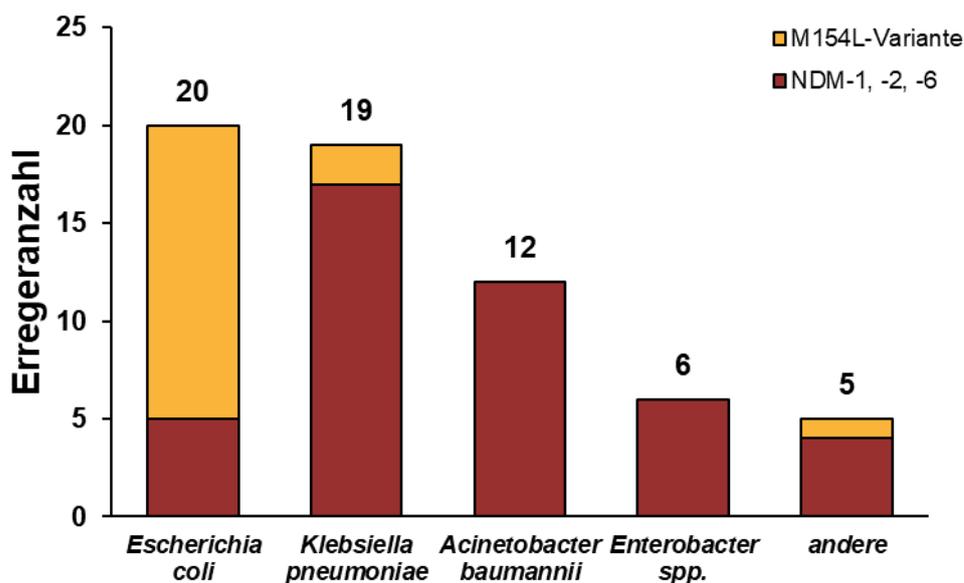


Abbildung 14: Speziesverteilung der NDM-positiven Erreger (n=62) und die Häufigkeit der M154L-Variante. Auffallend ist hier die Häufigkeit der M154L Variante bei *E. coli*. Einbezug der Daten aus 2017 zusätzlich zu dem bereits durch B. Leisten beschriebenen Zeitraum 2007-2016.

Die epidemiologischen Daten zeigen einen Anstieg der NDM-positiven Erreger, vor allem von Erregern mit M154L-Mutation. Des Weiteren überwiegen die Kolonisationen, die mit Routinekontrollen nachgewiesen werden, vor allem bei Rektalabstrichen. Ältere, männliche Patienten sind häufiger betroffen. Im Erregerspektrum finden sich Spezies, die üblicherweise im Gastrointestinaltrakt

angesiedelt sind. Unter diesen Voraussetzungen stellt sich die Frage, welche Therapieoptionen für Infektionen mit multiresistenten Erregern noch verbleiben.

4.1.1 Antibiotikaresistenzen von NDM-positiven Isolaten

NDM-positive Erreger besitzen ein breites Resistenzspektrum, da NDM sämtliche Beta-Laktamantibiotika, Penicilline, Cephalosporine und Carbapeneme, mit der Ausnahme von Aztreonam spalten. Häufig findet man noch zusätzliche Resistenzgene gegen weitere Wirkstoffklassen. Daher wurden die minimalen Hemmkonzentrationen (MHK) für unterschiedliche Antibiotika mittels E-Test bestimmt (Abbildung 15). Anhand dieser MHKs können die Isolate entsprechend der EUCAST Richtlinien (Version 8.0)⁹⁷ als resistent, sensibel oder intermediär eingestuft werden. Im klinischen Alltag wird nach Antibiotogramm behandelt, also Antibiotika zur Therapie verwendet, gegen die der Erreger sensibel ist. Bei multiresistenten Erregern greift man auf kombinierte Therapien oder höhere Dosierungen zurück.

Erwartungsgemäß waren die untersuchten Erreger überwiegend resistent gegen Penicilline, Cephalosporine und Carbapeneme. 90% der Isolate waren sensibel gegenüber dem Reserveantibiotikum Colistin (Polymyxin E). Außerdem waren drei Viertel (76%) der Isolate sensibel gegenüber Fosfomycin. Teilweise bieten sich Aminoglykoside als Therapieoptionen an, dabei schwankten die resistenten Isolate hier zwischen 86% für Tobramycin und 45% für Amikacin. In der Literatur¹¹⁴ findet sich häufig noch Tigecyclin als Therapieoption, auf das 31% der getesteten Isolate sensibel waren. Dabei war auffällig, dass etwa ein Drittel der Isolate (35%) mit einer MHK von 1 mg/L nur knapp als resistent einzustufen waren. Auch gegenüber den Fluorchinolonen (Levofloxacin und Ciprofloxacin) ist die Resistenzlage mit knapp 90% sehr hoch.

| MHK (mg/L) | ≤0,25 | 0,5 | 1 | 2 | 4 | 8 | 12 | 16 | 32 | ≥64 |
|---------------|-------|-----|-----|-----|-----|-----|----|-----|-----|------|
| Pip/Taz | | | | | | | | | | 100% |
| Imipenem | 2% | | | | 4% | 11% | 4% | 4% | 76% | |
| Meropenem | | | | | 9% | 6% | 4% | 13% | 69% | |
| Ertapenem | | | | | 8% | 8% | 2% | | 83% | |
| Doripenem | | | | | | 17% | | | 83% | |
| Colistin | 37% | 8% | 40% | 6% | | 2% | 4% | | | 4% |
| Gentamicin | 6% | 12% | 8% | 4% | | 2% | | | 17% | 52% |
| Amikacin | | | 2% | 19% | 11% | 13% | | | 4% | 51% |
| Tobramycin | | | 12% | 2% | | 6% | 2% | 12% | 13% | 54% |
| Tigecyclin | 21% | 10% | 35% | 21% | 12% | 2% | | | | |
| Fosfomycin | 2% | 8% | 27% | 4% | 10% | 2% | 2% | 6% | 16% | 24% |
| Ciprofloxacin | 6% | | 4% | 2% | 2% | 4% | 4% | 2% | 77% | |
| Levofloxacin | 4% | 2% | 2% | 4% | 4% | 4% | 2% | 6% | 73% | |

Abbildung 15: Resistenzprofil der getesteten Enterobacterales-Isolate. Die MHK-Werte wurden mit E-Teststreifen erhoben und mittels EUCAST-Richtlinien (Version 8.0) ausgewertet. Es wurden pro Antibiotikum jeweils mindestens 50 Patientenisolat der Enterobacterales-Familie getestet. Für Carbapeneme und Fluorchinolone endete der E-Test-Streifen bei 32 mg/L, höhere Resistenzen sind also möglich. Pip/Taz = Piperacillin/Tazobactam, rot: resistent, gelb: intermediär, grün: sensibel. Aufgrund von gerundeten Werten kann die Summe von 100% leicht abweichen.

Anhand der Resistenzsituation wird deutlich, dass die verbleibenden Therapieoptionen für NDM-positive Isolate auf wenige, teilweise sehr nebenwirkungsreiche Antibiotika beschränkt ist. Umso entscheidender wird die Entwicklung neuer Antibiotika oder alternativer Therapieformen für multiresistente Erreger.

4.2 Detektion der neuen Variante NDM-16b in klinischen Isolaten

Die klinischen Isolate, die für diese Arbeit eine besondere Bedeutung haben, sind die Patientenisolat *E. coli* 3424, *E. coli* 3425 und *E. coli* 3426, die alle von einer 60-jährigen Patientin des Universitätsklinikums Frankfurt aus dem Jahr 2016 stammen. Der Erreger wurde im Rahmen einer Urosepsis aus dem Urin und dem Blut isoliert. Die Erreger *E. coli* 3425 und *E. coli* 3426 haben 4MRGN-Resistenzphänotyp mit dem *bla*_{NDM-16b} Gen. *E. coli* 3424 hingegen weist einen 3MRGN-Resistenzphänotyp auf und kodiert nicht für eine Carbapenemase (Tabelle 27). Plasmidkodierte Informationen, in diesem Fall das *bla*_{NDM-16b}-Gen, können über Konjugation an andere Erreger weitergegeben werden. Die ursprüngliche Hypothese war, dass *E. coli* 3425 oder *E. coli* 3426 durch eine

Plasmidaufnahme mit dem *bla*_{NDM-16b}-Gen aus *E. coli* 3424 entstanden sein könnten. In der Agarose-Gelelektrophorese zur Differenzierung der Plasmidgrößen zeigte sich, dass sich bei etwa 90 kBp für *E. coli* 3424, *E. coli* 3426 und für die untersuchte Transkonjugante von 3426 jeweils ein Plasmid als Bande nachweisen ließ (Abbildung 16). In der Gesamtgenomsequenzierung zeigte sich, dass die drei Patientenisolate den gleichen Sequenztyp 617 aufweisen (Tabelle 27). Außerdem enthalten sie ähnliche Resistenzgene, beispielsweise sind die Resistenzgene *tet*(34), *tet*(B), *mdf*(A) im Genom aller drei Patientenisolate kodiert. Auch ähnliche Plasmidreplikons konnten mittels Gesamtgenomsequenzierung nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Insgesamt ist demnach davon auszugehen, dass die 4MRGN-Patientenisolate durch horizontalen Gentransfer aus dem 3MRGN-Isolat entstanden sein könnten. Die Isolate wurden für Pathogenitätsversuche im *G. mellonella*-Infektionsmodell verwendet. Die Klonierungen der Stämme für die Resistenzversuche aus dem Kapitel 4.5 und die *G. mellonella*-Versuche zur Virulenz und Therapie aus dem Kapitel 4.3 wurden mit dem *bla*_{NDM-16b} Gen aus *E. coli* 3426 durchgeführt.

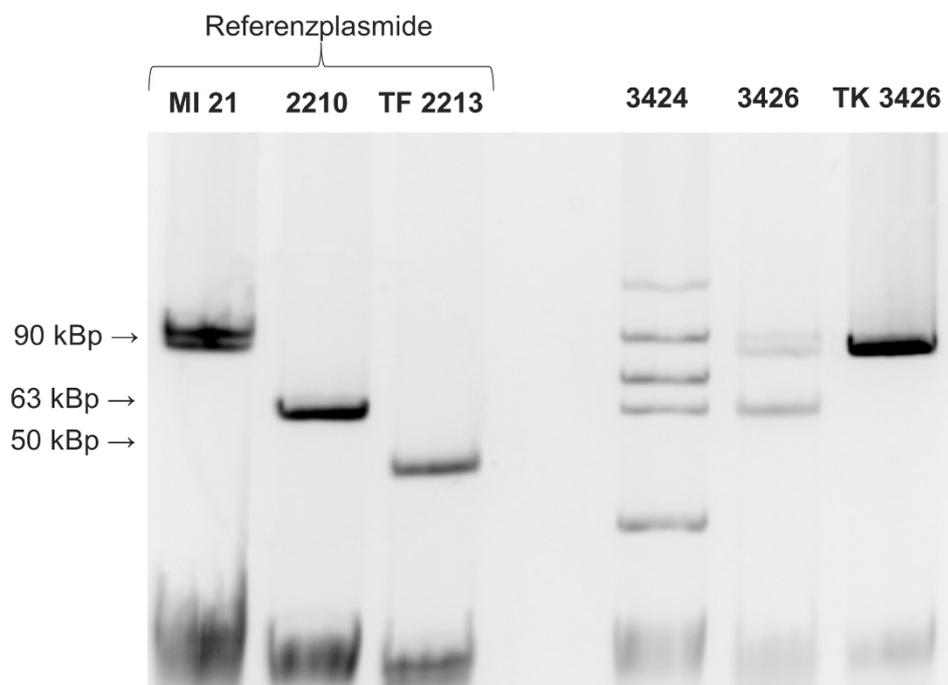


Abbildung 16: Gelelektrophoretische Auftrennung der Plasmide der Isolate *E. coli* 3424 und *E. coli* 3426. Referenzplasmide dienen dem Größenvergleich.

Tabelle 27: Vergleich der Isolate EC3424, EC3425 und EC3426

| Isolat | Sequenz-typ | Resistenz-phänomen | <i>bla</i> -Gene | Weitere Resistenzgene |
|--------|-------------|--------------------|---|---|
| EC3424 | 617 | 3MRGN | <i>bla</i> _{CMY-42} , <i>bla</i> _{EC-15} | <i>tet(34)</i> , <i>tet(B)</i> , <i>mdf(A)</i> |
| EC3425 | 617 | 4MRGN | <i>bla</i> _{NDM-16b} , <i>bla</i> _{TEM-1} , <i>bla</i> _{CMY-42} , <i>bla</i> _{EC-15} | <i>tet(34)</i> , <i>tet(B)</i> , <i>mdf(A)</i> , <i>aadA2</i> , <i>sul1</i> , <i>dfrA12</i> , <i>ble</i> - <i>MBL</i> , <i>erm(B)</i> , <i>rmtB1</i> , <i>mph(A)</i> |
| EC3426 | 617 | 4MRGN | <i>bla</i> _{NDM-16b} , <i>bla</i> _{CMY-42} , <i>bla</i> _{EC-15} | <i>tet(34)</i> , <i>tet(B)</i> , <i>mdf(A)</i> , <i>aadA2</i> , <i>sul1</i> , <i>dfrA12</i> , <i>ble</i> - <i>MBL</i> |

4.3 Therapieversuche im *G. mellonella*-Modell

Mittlerweile gibt es zahlreiche Infektionsversuche mit dem *Galleria mellonella*-Infektionsmodell, deren Ergebnisse mit Infektionsmodellen an Säugetieren vergleichbar oder teilweise sogar besser sind^{115,116}. Auf der humoralen Ebene beispielsweise ist das Komplementsystem mit dem menschlichen vergleichbar, zudem besitzen Insekten eine Hämolymphe und somit die Fähigkeit Krankheitserreger zu phagozytieren und sie sind in der Lage, antibakterielle Peptide zu bilden, die eine inflammatorische Wirkung entfalten¹¹⁷.

Mithilfe des *G. mellonella*-Infektionsmodells erfolgte die Untersuchung von NDM-positiven Erregern *in vivo* (Abbildung 17). Zuerst wurden die klinischen Isolate (aus 4.2) auf ihre Pathogenität hin untersucht, indem aufsteigende Konzentrationen von Erregersuspensionen den Larven injiziert wurden. Dabei wurde die Anzahl an toten Larven protokolliert und damit Werte für die mediane letale Dosis (LD₅₀-Wert) ermittelt. Analoge Versuche wurden mit Referenzstämmen nach Transformation eines Vektors mit der *bla*_{NDM-1}-, *bla*_{NDM-4}- und *bla*_{NDM-16b}-Gensequenz durchgeführt. Im nächsten Schritt wurden Therapieversuche durchgeführt und unterschiedliche Imipenem-Konzentrationen getestet. (Abbildung 21).

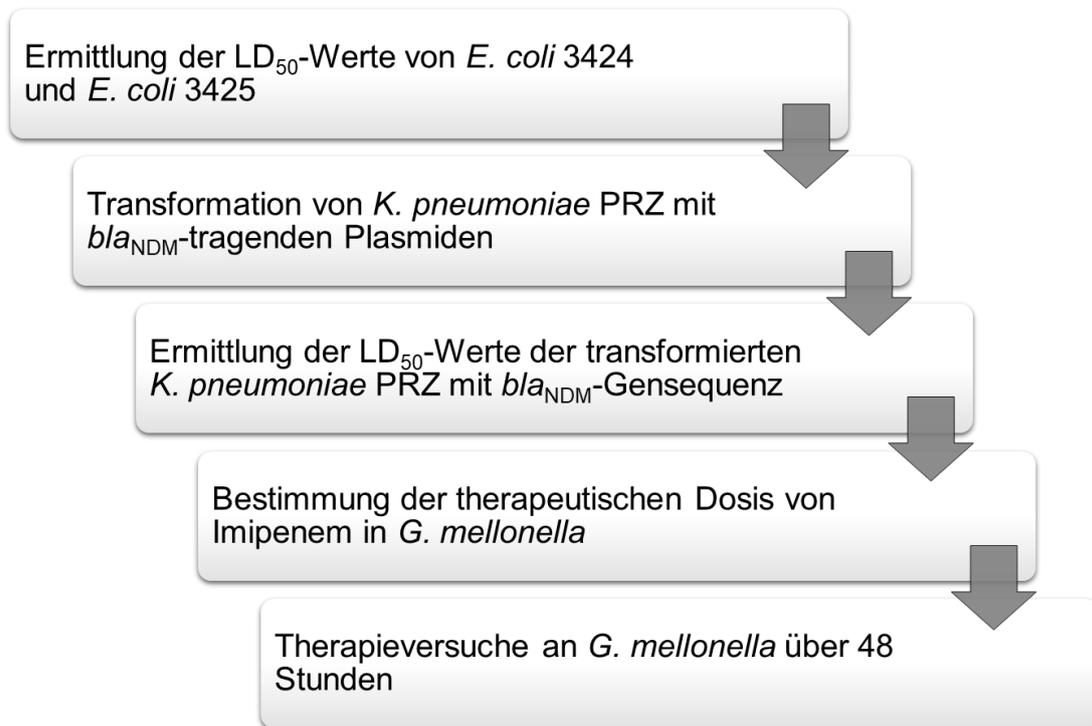


Abbildung 17: Flussdiagramm für die Durchführung von Therapieversuchen mit *G. mellonella*. Es wurde jeweils die letale Dosis für klinische *E. coli*-Isolate und für transformierte *K. pneumoniae* PRZ ermittelt. Danach wurden unterschiedliche Dosierungen von Imipenem-Konzentrationen getestet, um schließlich Therapieversuche an *G. mellonella* durchführen zu können.

4.3.1 Pathogenität von klinischen Isolaten mit NDM-16b

Die Pathogenität, also die Fähigkeit dem kolonisierten Wirt zu schaden, wurde mithilfe des *G. mellonella* Infektionsmodells über den LD₅₀-Wert quantifiziert. Bei Bakterien, die bereits einen Organismus infiziert haben, sind mit höherer Wahrscheinlichkeit Faktoren vorhanden, die die Virulenz steigern.

Die Larven wurden infiziert und in unterschiedlichen Zeitabständen (24, 48 und 72 Stunden) gezählt, wobei die toten Tiere aussortiert wurden. Um einen Langzeittrend zu extrapolieren, erfolgten Beobachtungen bis zu 7 Tage nach Infektion. Innerhalb der letzten Tage ist keine wesentliche Dynamik mehr zu verzeichnen.

Für das klinische Isolat *E. coli* 3424, welches kein *bla*_{NDM}-Gen enthält, lagen die logarithmierten LD₅₀-Werte durchschnittlich bei $2,7 \pm 0,33$ (n=4). Bei dem klinischen Isolat *E. coli* 3425, das ein *bla*_{NDM-16b}-Gen enthält, lagen die Werte nicht-signifikant höher ($3,4 \pm 0,33$, n=3, Abbildung 18).

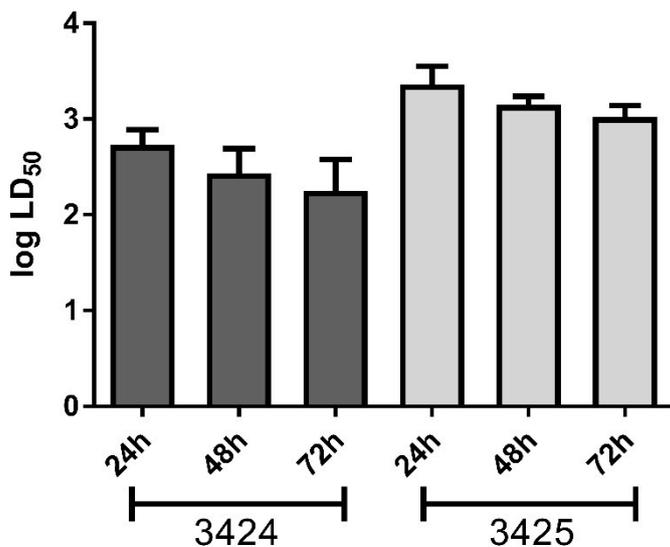


Abbildung 18: Logarithmierte LD₅₀-Werte für die klinischen Isolate *E. coli* 3424 und *E. coli* 3425 zu unterschiedlichen Zeitpunkten (n ≥ 3, Einfachbestimmung). Die Unterschiede in den letalen Dosen sind nicht signifikant, damit ist die Virulenz der beiden klinischen Isolate vergleichbar (p ≤ 0,0524, 24 h, p ≤ 0,0715, 48 h p ≤ 0,1113, 72 h). Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung.

4.3.2 In vivo Nachweis der Resistenz NDM-positiver Transformanten

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war es, die Wirkung von Imipenem auf Erreger mit dem bla_{NDM}-Gen *in vivo* zu untersuchen. Da die Produktion von NDM-Protein zu einer Spaltung von Carbapenemen wie Imipenem führen sollte, wäre eine Therapie mit diesem Antibiotikum nicht möglich. Die Wirkung von NDM-1 sollte mit der von NDM-4 und NDM-16b verglichen werden. NDM-4 ist die erste Variante mit der M154L-Mutation und besitzt gegenüber NDM-1 eine erhöhte Hydrolyseaktivität (siehe 1.4.1). Zusätzlich zu weiteren Mutationen (V88L, A233V) liegt die M154L-Variante auch bei NDM-16b vor. Diese beiden Varianten sollen mit der primären Gensequenz aus NDM-1 verglichen werden. Damit kann überprüft werden, ob sich die Produktion unterschiedlicher NDM-Proteinvarianten auf die Pathogenität auswirkt.

4.3.2.1 *K. pneumoniae* PRZ als geeigneter Erreger für Therapieversuche

Da es sich bei den klinischen Isolaten aus 4.2 mit *bla*_{NDM-16b}-Gen um die Spezies *E. coli* handelte, wurden NDM-Transformanten von *E. coli* TOP10-Referenzstämmen für Infektionsversuche verwendet (Tabelle 28).

Tabelle 28: Für Virulenzversuche in *G. mellonella* verwendete Transformanten

| Stamm + TOPO-Vektor | Spezies | Generierung |
|------------------------|----------------------|---------------------|
| TOP10 pTOPO | <i>E. coli</i> | Dr. Manuela Tietgen |
| TOP10 pTOPO preNDM-1 | | |
| TOP10 pTOPO preNDM-4 | | |
| TOP10 pTOPO preNDM-16b | | |
| DH5α pTOPO | <i>E. coli</i> | Dr. Manuela Tietgen |
| DH5α pTOPO preNDM-1 | | |
| DH5α pTOPO preNDM-4 | | |
| DH5α pTOPO preNDM-16b | | |
| PRZ pTOPO | <i>K. pneumoniae</i> | Larissa Neidert |
| PRZ pTOPO preNDM-1 | | |
| PRZ pTOPO preNDM-4 | | |
| PRZ pTOPO preNDM-16b | | |

Es stellte sich im Verlauf der Experimente heraus, dass die Pathogenität von *E. coli* TOP10 nicht ausreichte, um Therapieversuche durchzuführen. Eine Letalität von etwa 80-90% wurde angestrebt, um einen ausreichenden therapeutischen Effekt des Antibiotikums beurteilen zu können. Selbst bei Injektionen von mehr als 10⁹ KBE/mL war ein Überleben von ≥90% der Larven zu beobachten. Dementsprechend wurde *E. coli* DH5α als Referenzstamm verwendet. Für die Therapieversuche wurden alle drei NDM-Varianten in den Referenzstamm transformiert. Doch auch *E. coli* DH5α erwiesen sich nicht als ausreichend pathogen. Bei beiden Referenzstämmen lag die logarithmierte LD₅₀ bei etwa 10, was bedeutet, dass supraphysiologisch hohe Erregerkonzentrationen notwendig gewesen wären, um die gewünschte Letalität für Therapieversuche zu erzielen.

Im nächsten Versuch wurde *K. pneumoniae* PRZ mit Plasmiden transformiert, die die kodierende Sequenz für die NDM-Varianten enthalten (siehe 3.6). Die so erhaltenen NDM-Transformanten (Tabelle 28) wurden zunächst auf ihre

Beta-Laktamresistenz mit E-Teststreifen untersucht. Weiterhin wurden die relevanten Genabschnitte mittels PCR vervielfältigt und sequenziert, um eine erfolgreiche Transformation mit *bla*_{NDM}-Expressionsplasmiden (ohne Mutationen) zu verifizieren. Die Bestimmung der MHK bestätigte die erfolgreiche Transformation des *bla*_{NDM}-Gens (Tabelle 29). Besonders bei den Carbapenemen zeigten sich hohe MHK-Werte, vor allem bei den beiden M154L-Varianten PRZ pTOPO preNDM-4 und PRZ pTOPO preNDM-16b. Auch die hohen MHK-Werte der Cephalosporine lassen sich durch die Metallo-β-Laktamase erklären. Zudem konnte mithilfe spezieller Teststreifen mit Carbapenemen und EDTA nachgewiesen werden, dass eine Metallo-β-Laktamase vorliegt (Tabelle 29).

Tabelle 29: Mikrodilutions-MHKs von NDM-transformierten *K. pneumoniae* PRZ-Isolaten
 Der MBL-Detektionstest mit EDTA und Carbapenemen ist bei den Transformanten mit *bla*_{NDM}-Gensequenz positiv ausgefallen ($\geq 3 \log_2$ Verdünnungsstufen Unterschied zwischen Carbapenem und Carbapenem mit EDTA).

| Antibiotikum | PRZ | | | |
|--------------|----------|----------------|----------------|------------------|
| | pTOPO | pTOPO preNDM-1 | pTOPO preNDM-4 | pTOPO preNDM-16b |
| Cefotaxim | 0,064 | 256 | 256 | 256 |
| Ceftazidim | 0,032 | >2048 | >2048 | >2048 |
| Cefepim | 0,0625 | 64 | 256 | 64 |
| Imipenem | 0,125 | 128 | 256 | 128 |
| Meropenem | 0,0625 | 128 | 512 | 512 |
| Ertapenem | 0,015625 | 128 | 512 | 512 |
| Doripenem | 0,0625 | 128 | 512 | 256 |

Im nächsten Schritt wurde ermittelt, welche Erregerkonzentration benötigt wird, um die angestrebte Letalität von 80-90% zu erreichen. Für PRZ pTOPO lagen diese Werte bei $5,53 \pm 0,36$, für PRZ pTOPO preNDM-1 bei $4,65 \pm 0,6$, für PRZ pTOPO preNDM-4 bei $5,47 \pm 0,19$ und für PRZ pTOPO preNDM-16b bei $5,25 \pm 0,2$. Damit ergaben sich keine signifikanten Unterschiede innerhalb der Virulenz von PRZ-Transformanten (Abbildung 19).

Den Larven wurde dann für die Therapieversuche je 10 µL einer Suspension mit etwa $3,5 \times 10^6$ KBE/mL gespritzt. Ferner ergab sich, dass die Keimzahlen bei PRZ pTOPO preNDM-1 und PRZ pTOPO preNDM-4 niedriger waren als bei den anderen beiden *K. pneumoniae* PRZ Stämmen, in Wachstumskinetiken zeigten sich bei den Verdopplungszeiten signifikante Unterschiede. Für PRZ pTOPO lag

die Verdopplungszeit bei 25 min, für PRZ pTOPO preNDM-4 bei 45 min und für PRZ pTOPO preNDM-1 bei 51 min.

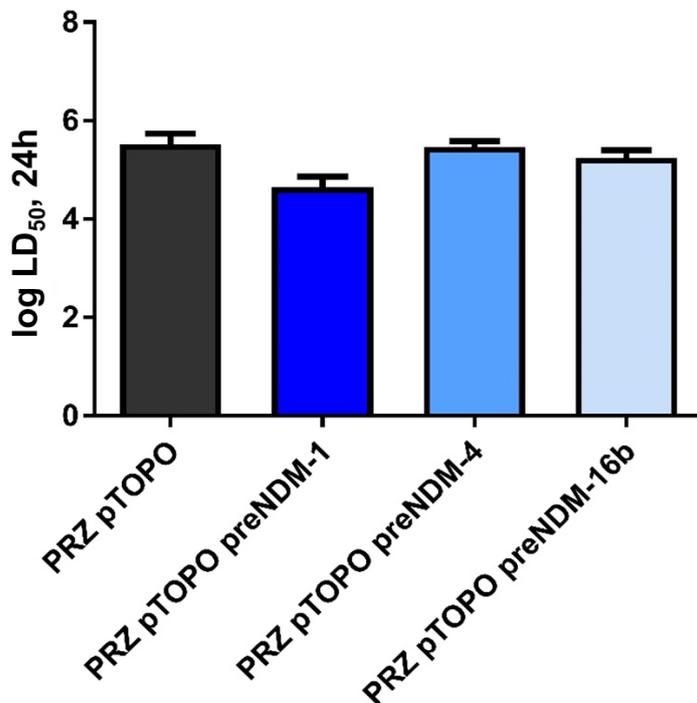


Abbildung 19: Logarithmierte LD₅₀-Werte für *G. mellonella* Versuche mit Transformanten. Die Bestimmung der Werte erfolgte in Einfachbestimmung. Für PRZ pTOPOpreNDM-1 wurden 9 Versuche durchgeführt, restliche Stämme n=3. Alle untersuchten *K. pneumoniae* PRZ unterschieden sich hinsichtlich ihrer Virulenz nicht signifikant voneinander ($p > 0.05$). Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung.

4.3.2.2 Optimierung der Antibiotikadosis und Vektorverlust in Larvenversuchen

Nach der Transformation der *K. pneumoniae* PRZ Stämme und der Quantifizierung der Virulenz für diese Transformanten, sollte im nächsten Schritt eine Therapie der infizierten Larven erfolgen. Da für PRZ pTOPO und PRZ pTOPO preNDM-16b eine gute Vergleichbarkeit durch ähnliche Virulenz (Abbildung 19) gewährleistet war, wurde sich bei den Therapieversuchen auf diese Stämme beschränkt.

Nach der Injektion der Erregersuspension in die Larve musste ein Vektorverlust einkalkuliert werden. Die Larven wurden nach 24 Stunden auf LB-Agar und LB-Agar mit 30 µg/mL Kanamycin ausplattiert und die Kolonienanzahl verglichen,

um diesen zu quantifizieren. Nach etwa 24 Stunden trugen im Schnitt nur noch 20% der Bakterien den Vektor. Infektionsversuche mit der Beobachtung über mehrere Tage wurden dementsprechend als nicht sinnvoll erachtet.

Therapieversuche mit unterschiedlichen Imipenemkonzentrationen zeigten, dass die optimale Imipenem-Dosis für Therapien an *G. mellonella* bei 5 mg/mL lag, wovon den Larven jeweils 10 µL injiziert wurden

Larven, die mit *K. pneumoniae* PRZ ohne *bla*_{NDM}-Gen infiziert wurden, konnten mittels Imipenem therapiert werden (Abbildung 20). In dieser Gruppe überlebten knapp zwei Drittel (66% ± 16%) aller *G. mellonella*. Die Larven, die mit *K. pneumoniae* PRZ mit *bla*_{NDM}-Gen injiziert wurden, zeigten kein Ansprechen auf die Imipenem-Therapie. Hier überlebten nur etwa 19% und es ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zum prozentualen Überleben der injizierten Larven ohne Therapie. Das deutet darauf hin, dass im *G. mellonella*-Infektionsmodell die Hydrolyse von Imipenem durch die Produktion der Carbapenemase NDM erfolgte und damit die antibiotische Therapie wirkungslos ist.

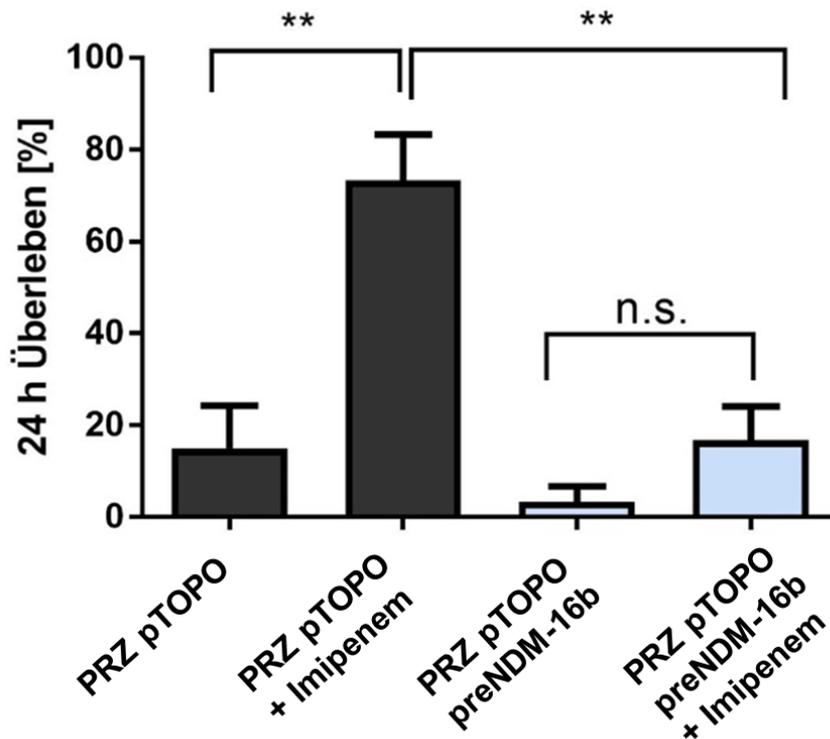


Abbildung 20: Einfluss von NDM auf die Therapieeffizienz im *G. mellonella* Infektionsmodell. Dargestellt ist das Überleben der Larven nach Infektion (n=5, Einfachbestimmung) mit PRZ pTOPO bzw. PRZ pTOPO preNDM-16b mit und ohne Imipenem-Therapie zum Zeitpunkt t=24 h. Mit ** sind signifikante Unterschiede ($p \leq 0,002$) markiert. Keine signifikanten Unterschiede ergeben sich für PRZ pTOPO preNDM-16b mit und ohne Imipenem-Therapie (n.s., $p > 0,05$). Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung.

Zudem wurde untersucht, wie sich die Therapie über einen Zeitraum von 48 Stunden verhält. Der Therapieerfolg war bereits nach 24 Stunden erkennbar und die folgenden Tage unterlagen keiner wesentlichen Dynamik mehr (Abbildung 21).

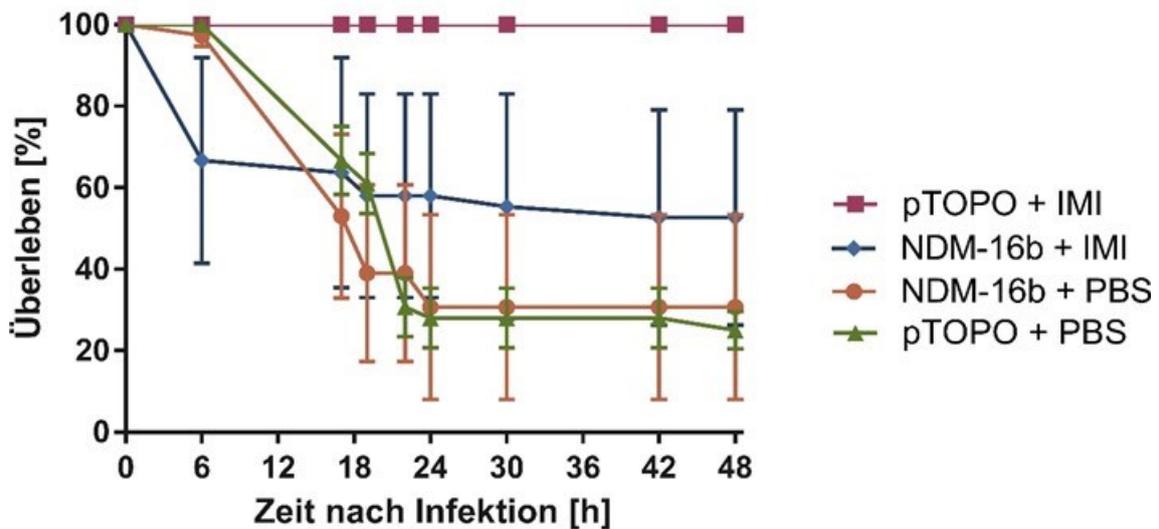


Abbildung 21: Therapie mit Imipenem über einen Zeitverlauf von 48 Stunden. Die Versuche erfolgten in Einfachbestimmung (n = 3). In der Kontrollgruppe mit Injektion von PRZ pTOPO mit Imipenemtherapie konnten in allen Versuchen die Larven gerettet werden. Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler.

Damit konnte in dieser Arbeit mithilfe der Versuche am *G. mellonella*-Infektionsmodell die Vermittlung der Imipenemresistenz durch die bakterielle NDM-Produktion nachgewiesen werden.

4.4 Affinitätschromatographische Isolierung von NDM-Varianten und Reinheitsprüfung

Ein weiterer Aspekt dieser Arbeit bestand in den Untersuchungen zur Interaktion verschiedener NDM-Varianten mit dem humanen Komplementsystem. Hierfür wurden die unterschiedlichen NDM-Varianten in *E. coli* BL21 (DE3) Star-Zellen produziert (siehe Tabelle 20). Hierfür wurden jeweils 2 L-Kulturen hergestellt und die Genexpression durch Zugabe von IPTG über Nacht bei 20 °C induziert (siehe 3.13). Nach dem Zellaufschluss wurde der Zelldetritus verworfen und der Überstand mit dem enthaltenen Protein mit NTA-Agarosepartikel inkubiert. Es folgten ein Waschschrift mit 50 mM Imidazol und ein Elutionsschritt mit 400 mM Imidazol. Das so erhaltene Protein wurde in 50 mM Tris/HCl (pH 8.0), 150 mM NaCl, 5% [v/v] Glycerin, 30 µM ZnCl₂ umgepuffert und anschließend auf ein Polyacrylamid-Gel aufgetragen, um die Reinheit der isolierten Proteine zu

überprüfen. In dieser Kontrolle zeigten sich hohe Reinheitsgrade der verwendeten Proteine (Abbildung 22). Anschließend wurde die Konzentration der Proteine bestimmt (siehe 3.15).

Für NDM-1 Δ 28 konnte eine Konzentration von 5,9 mg/mL (222,14 μ M), für NDM-4 Δ 28 von 4,2 mg/mL (158,24 μ M) und für NDM-16b Δ 28 von 5,75 mg/mL (216,3 μ M) ermittelt werden. Die Proteine wurden aliquotiert und unverzüglich bei -80 °C eingefroren. Für die funktionellen und vergleichenden Untersuchungen wurden stets frische Aliquots verwendet.

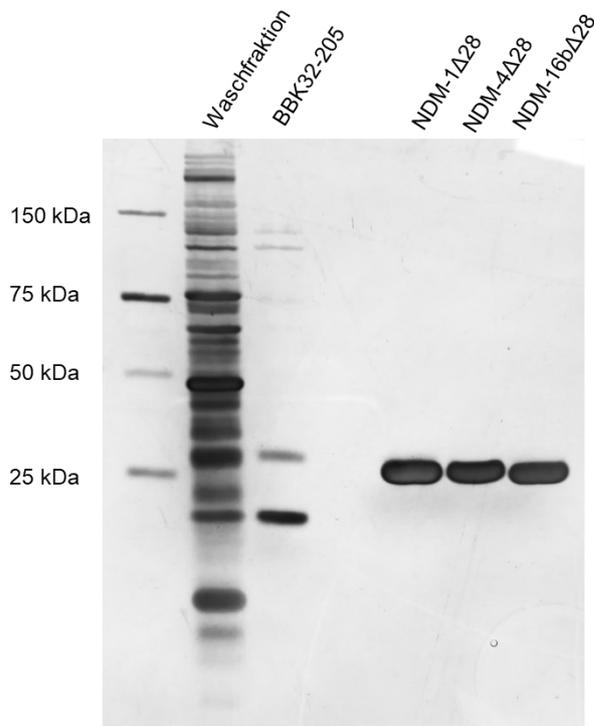


Abbildung 22: Überprüfung der Reinheit von His-getaggten NDM-Proteinen. Es wurden 5-6 μ g an gereinigten NDM-Proteinen auf ein 10% Tris/Tricin-SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese appliziert und die separierten Proteine durch Färbung mit Silbernitrat visualisiert. Außerdem wurde exemplarisch eine Waschfraktion (50 mM Imidazol) und das als Kontrolle verwendete BBK32-205 Protein mit aufgetragen. Alle NDM-Proteine (26 kDa) weisen einen hohen Reinheitsgrad auf.

4.5 Interaktion von NDM-Varianten mit dem humanen Komplementsystem

In früheren Versuchen konnte festgestellt werden, dass die Carbapenemase NDM noch über weitere Funktionen als die Hydrolyse von Beta-Laktamantibiotika verfügt. In Serumbakterizidie-Tests zeigten NDM-produzierende *E. coli*-Stämme eine höhere Serumresistenz als isogene Kontrollisolate ohne NDM (Referenz: Belkys Leisten, Institut für Medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene, Frankfurt). Dies lässt vermuten, dass das NDM-Protein mit dem humanen Komplementsystem interagiert und einen inhibierenden Einfluss auf die Komplementaktivierung besitzt. Um nachzuweisen, ob die NDM-Varianten ebenfalls einen inhibitorischen Effekt aufweisen, wurde zuerst der Einfluss auf die drei unterschiedlichen Aktivierungswege des Komplementsystems untersucht. Wie bei den Infektionsversuchen mit *G. mellonella* wurde für die Untersuchungen NDM-1 mit den Varianten NDM-4 (M154L) und NDM-16b (M154L, V88L, A233V) verglichen. Alle verwendeten Varianten enthielten eine Deletion von 28 Aminosäuren am N-Terminus, um deren Löslichkeit zu verbessern¹¹⁸. Eine Deletion des Signalpeptids hat keinen Einfluss auf die Carbapenemaseaktivität.

4.5.1 Vergleichende Untersuchung zur inhibitorischen Wirkung der NDM-Varianten auf das Komplementsystem

Um die inhibitorische Wirkung der NDM-Varianten zu untersuchen, wurden funktionelle Komplementanalysen mit einem kommerziellen Testsystem (WiELISA, SVAR Life, Malmö, Schweden) mit einem modifizierten Protokoll durchgeführt (s. Kapitel 3.19). Das Prinzip des ELISA-basierten Testsystems beruht darauf, dass durch Zugabe von humanem Serum die einzelnen Wege der Komplementkaskade aktiviert werden und sich der Membran-Angriffs-Komplex (MAK) ausbildet. Dieser Komplex wird durch Neoepitop-spezifische Antikörper detektiert. In Folge einer Inhibition wird der MAK nicht gebildet und kann demnach auch nicht durch den Antikörper nachgewiesen werden.

Um diesen möglichen inhibierenden Einfluss der gereinigten NDM-Proteine auf Komplement nachzuweisen, wurde humanes Serum zunächst mit 10 µg der entsprechenden Proteine vorinkubiert und die Reaktionsansätze anschließend in die jeweilige Mikrotiterplatte pipettiert. Für die initiale Komplementaktivierung dienten Mikrotiterplatten, die mit IgM (Klassischer Weg), Mannan (Lektinweg) oder LPS (Alternativer Weg) vorbeschichtet waren. Um eine Inhibition des Proteinpuffers auf humanes Serum auszuschließen, wurden die Proteine in hoher Konzentration gereinigt und für jeden Versuch ein Reaktionsansatz des Proteinpuffers im gleichen Verhältnis mitgeführt. Diese Probe wurde auf ihre signifikanten Unterschiede zum Einfluss der NDM-Proteine untersucht. Der verwendete Proteinpuffer zeigte keine Interaktionen mit dem Komplementsystem (Daten nicht gezeigt). Zusätzlich wurde bei jedem Versuch ein Reaktionsansatz mit einem Vergleichsprotein, für das eine Interaktion auf den entsprechenden Komplementweg nachgewiesen worden war, als Positivkontrolle mitgeführt.

Wie in Abbildung 23 dargestellt, konnte eine signifikante Inhibition des klassischen Komplementweges für alle drei NDM-Varianten, NDM-1Δ28, NDM-4Δ28 und NDM-16bΔ, nachgewiesen werden. Dabei wurde als Vergleichsprotein BBK32-205 aus *B. burgdorferi* verwendet, das den klassischen Weg nachweislich über eine Interaktion mit der Komplementkomponente C1s aus dem C1-Komplex hemmt¹⁰³. Besonders interessant sind die signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Varianten. NDM-1Δ28 zeigte eine signifikant stärkere Inhibition als NDM-4Δ28 und NDM-16bΔ28. Für NDM-1Δ28 und NDM-4Δ28 ließ sich außerdem eine signifikante Hemmung des Lektinwegs detektieren. Sowohl im klassischen als auch im Lektinweg ist der Trend ersichtlich, dass NDM-1Δ28 die stärkste Inhibition zeigt, gefolgt von NDM-4Δ28 und schließlich NDM-16bΔ28 mit dem geringsten Inhibitionspotential. Im Gegensatz dazu zeigten alle drei NDM-Varianten im alternativen Weg keine Inhibition. Für den alternativen Weg und den Lektinweg wurde CipA aus *A. baumannii* als Vergleichsprotein verwendet. Für CipA ist eine Inhibierung des alternativen Wegs beschrieben¹⁰³. Weiterführende Untersuchungen ergaben, dass CipA auch den Lektinweg terminiert (persönliche Mitteilung Prof. P. Kraiczy). Da an den einzelnen Komplementwegen unterschiedliche Komplementkomponenten beteiligt sind, wurde eine mögliche Interaktion mit C4

und C4b Komponenten angenommen, die sowohl im klassischen als auch im Lektinweg vorkommen (s. Kapitel 1.2.1).

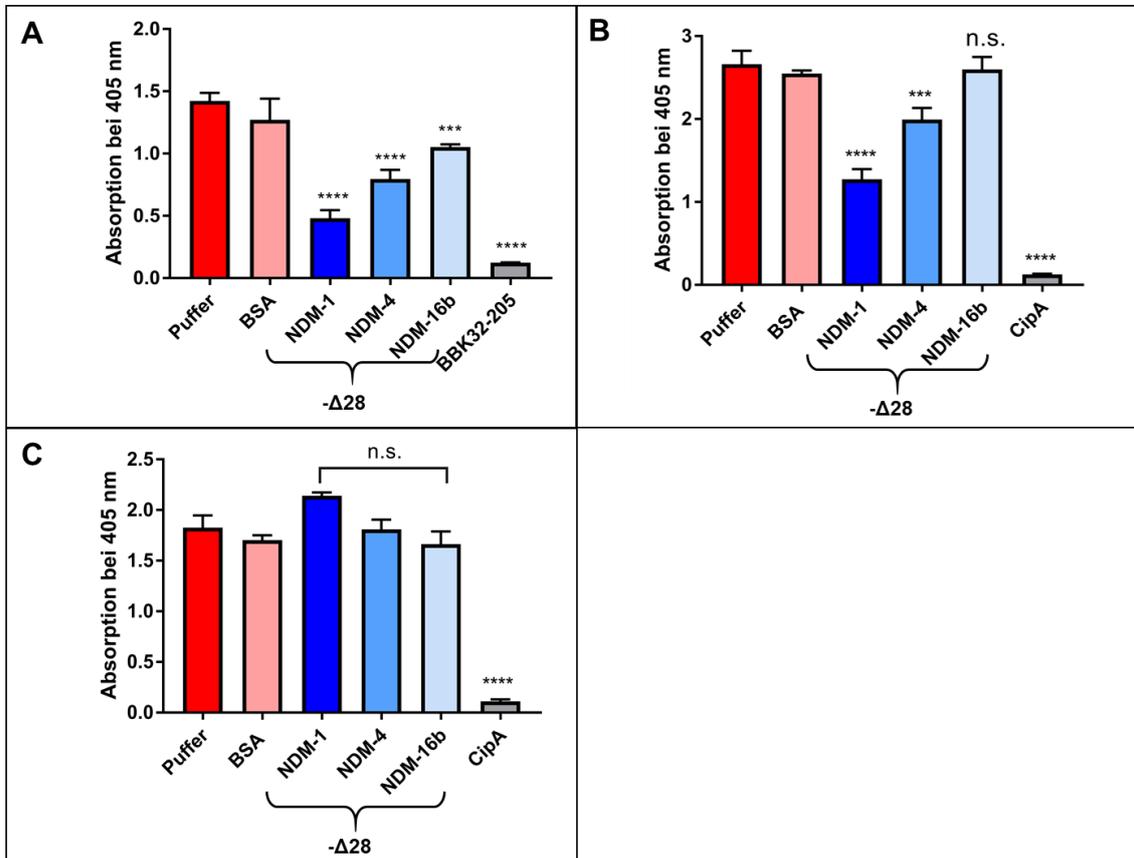


Abbildung 23: Inhibitorischer Einfluss der drei NDM-Varianten auf die Komplementwege. (A) zeigt den klassischen Weg, (B) den Lektinweg und (C) den alternativen Weg. Es wurden jeweils 0,1 µg/µL (entspricht etwa 3,76 µM) an NDM-Proteinen mit Humanserum vorinkubiert. Für die Kontrollen wurden identische Konzentrationen verwendet. Signifikante Unterschiede zur Negativkontrolle (Puffer) sind durch Asterisken gekennzeichnet (***, $p \leq 0,001$; ****, $p \leq 0,0001$, n.s., nicht signifikant). Die statistische Auswertung wurde mithilfe eines einfaktoriellen ANOVA-Tests mit multiplem Vergleichstest nach Bonferroni und einem Konfidenzintervall von $\geq 95\%$ durchgeführt. Es wurden jeweils drei unabhängige Datenerhebungen durchgeführt.

Im Weiteren wurde das Ausmaß der Inhibition von NDM-1 Δ 28 auf den klassischen Weg quantifiziert (Abbildung 24). Dabei wurde Humanserum mit steigenden Konzentrationen von NDM-1 Δ 28 vorinkubiert, um zu beurteilen, ab welcher Konzentration die Hemmung signifikant wird. Ab 7,5 µM stellte sich ein Plateau ein und es konnte keine stärkere Hemmung bei höheren Konzentrationen erzielt werden. Ein K_M -Wert konnte nicht bestimmt werden, da es nicht möglich war, eine Maximalabsorption festzulegen.

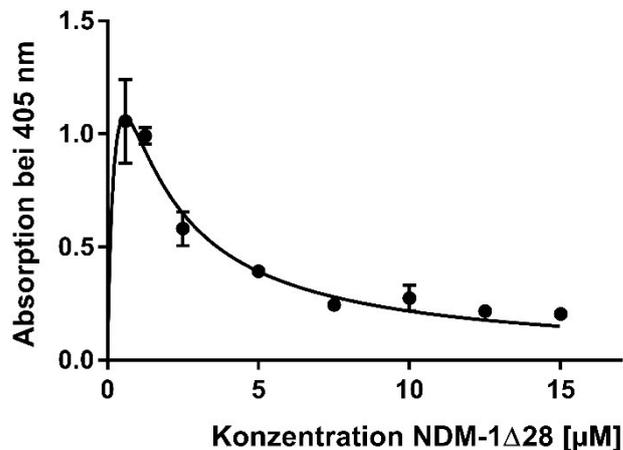


Abbildung 24: Konzentrationsabhängige Inhibition des klassischen Weges durch NDM-1Δ28. Mithilfe des WIESLAB-Testsystems wurden unterschiedliche Konzentrationen an NDM-1Δ28 untersucht und der Grad der Inhibition spektralphotometrisch bestimmt. Die Versuche wurden an unterschiedlichen Tagen vier Mal wiederholt. Die Balken zeigen die Standardabweichung.

Die Ergebnisse aus den funktionellen Analysen zeigen, dass alle drei NDM-Varianten und insbesondere NDM-1Δ28 einen inhibierenden Einfluss auf das humane Komplementsystem haben. Die Inhibition betrifft vor allem den klassischen Weg und auch den Lektinweg. Eine Aktivierung des alternativen Weges konnte nicht festgestellt werden.

4.5.2 Untersuchungen zur Interaktion der NDM-Varianten mit dem Komplementsystem im hämolytischen Test

Anschließend sollte der inhibitorische Einfluss der NDM-Varianten auf den klassischen Weg zusätzlich in einem hämolytischen Test mit Schafserythrozyten, die einen weiteren physiologischen Stimulus auf das Komplementsystem haben, bestätigt werden. Das Prinzip dieses Tests beruht auf der Fähigkeit von Schafserythrozyten, als „natürliche“ Aktivatoren für den klassischen Weg zu fungieren. Nach Inkubation mit humanem Serum bildet sich der MAK auf der Erythrozytenoberfläche und die Zellen werden lysiert, wodurch Hämoglobin freigesetzt wird. Das sich in Lösung befindende Hämoglobin kann bei 414 nm photometrisch detektiert werden. Kommt es zu einer Inhibition der

Komplementkaskade, werden weniger Erythrozyten lysiert und die Hämoglobinfreisetzung ist vermindert. Um die inhibitorische Wirkung der NDM-Varianten zu bestätigen, wurde humanes Serum mit unterschiedlichen Mengen an NDM-Varianten (3 µg, 6 µg und 18 µg) vorinkubiert und diese Reaktionsansätze mit sensibilisierten Schafserthrozyten versetzt. Als weiteres Kontrollprotein zu BSA wurde CipA verwendet, das im WiELISA keinen Einfluss auf den klassischen Weg hat¹⁰³. Nach einer Inkubation von 30 min wurde die Hämolyse spektralphotometrisch gemessen. Auch bei diesen Versuchen zeigte sich eine Inhibition durch alle drei NDM-Varianten (Abbildung 25). Ein signifikanter Effekt stellte sich erst bei einer eingesetzten Menge von 18 µg (entspricht etwa 4,5 µM) der NDM-Varianten ein. Dies bestätigt die Ergebnisse, die mittels WiELISA gewonnen wurden. Als Kontrollen wurden der Komplementregulator C4BP und Faktor I (FI) verwendet, da die Hemmung des klassischen Weges über die Inaktivierung von C4b erfolgt³⁶ (s. Kapitel 1.2.4).

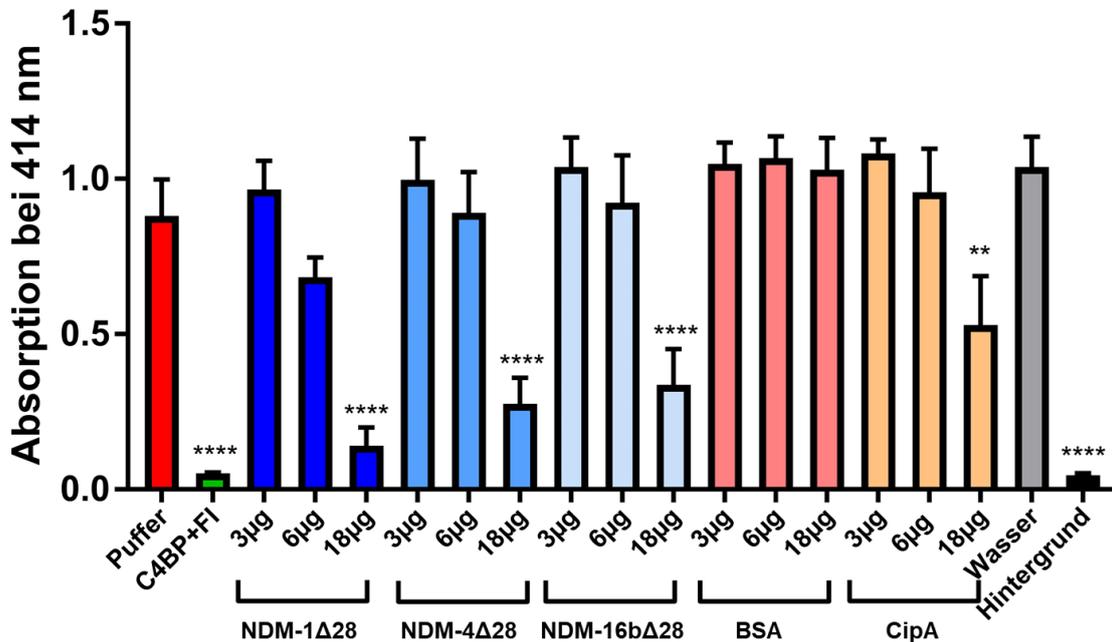


Abbildung 25: Inaktivierung des klassischen Weges durch NDM-Varianten (hämolytischer Test). Humanserum wurde mit drei Konzentrationen an gereinigten NDM-Varianten vorinkubiert und anschließend zu sensibilisierten Erythrozyten hinzugegeben. Die Lyse der Zellen und das freigesetzte Hämoglobin wurde photometrisch bei 414 nm detektiert. Als Positivkontrolle diente ein Reaktionsansatz mit C4BP und Faktor I (FI). Als Negativkontrolle wurde Proteinpuffer verwendet. Als Hintergrundmessung wurde NHS mit GVB⁺⁺ ohne Erythrozyten untersucht. Es wurden drei unabhängige Versuche durchgeführt. **, $p \leq 0,01$, ****, $p \leq 0,0001$. Die statistische Auswertung wurde mithilfe eines einfaktoriellen ANOVA-Tests mit multiplem Vergleichstest nach Bonferroni und einem Konfidenzintervall von $\geq 95\%$ durchgeführt.

Da der hämolytische Test geeignet ist, um selektiv die inhibitorische Wirkung von Proteinen auf den terminalen Weg zu untersuchen^{119,120}, wurde auch dieser Weg des Komplementsystems analysiert. Für den Nachweis einer potenziellen Inhibition wurden die Komplementkomponenten C7, C8, und C9 mit dem C5b-6-Komplex inkubiert. Eine Entstehung des MAK kann indirekt über die lysierten Erythrozyten und dabei austretendes Hämoglobin detektiert werden. Bleibt der Nachweis von Hämoglobin aus, so liegt eine Interaktion mit Faktoren des terminalen Wegs vor (Abbildung 26). Die Ergebnisse zeigen deutlich, dass keine der getesteten NDM-Varianten in der Lage war, die Formation des MAK zu inhibieren und bestätigen gleichzeitig die Untersuchungen zur selektiven Inhibition des klassischen Komplementweges (siehe 4.5.1).

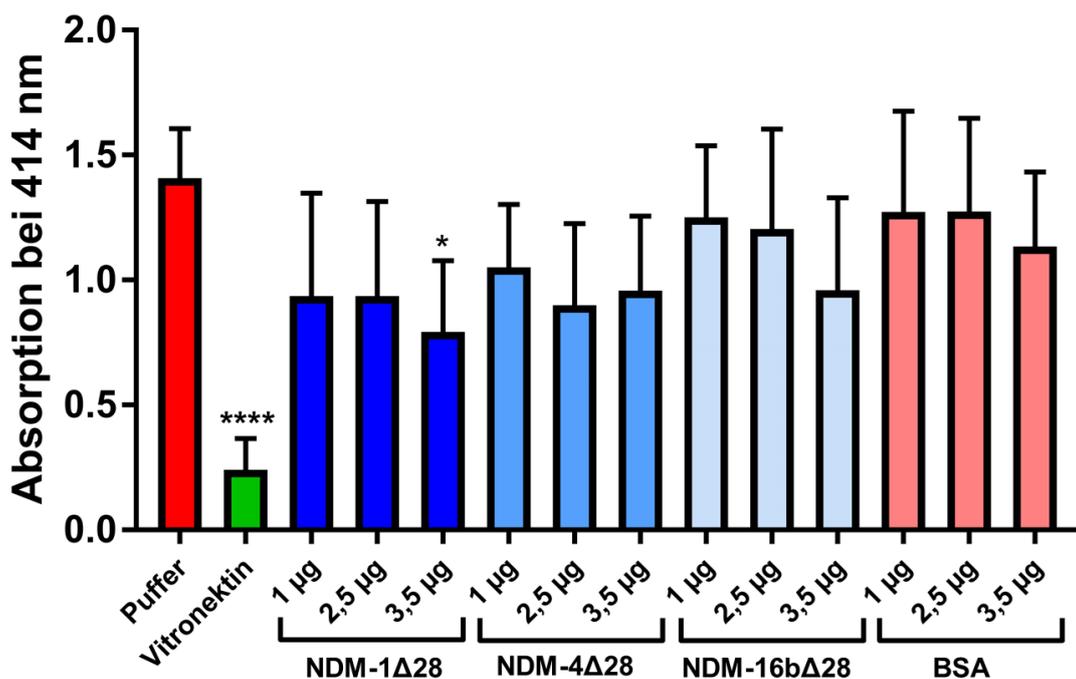


Abbildung 26: Untersuchung zur Interaktion der NDM-Varianten mit dem terminalen Weg. Als Positivkontrolle diente Vitronektin und als Negativkontrolle Proteinpuffer. Es wurden insgesamt 5 unabhängige Versuche durchgeführt. Die statistische Auswertung wurde mithilfe eines einfaktoriellen ANOVA-Tests mit multiplem Vergleichstest nach Bonferroni und einem Konfidenzintervall von $\geq 95\%$ durchgeführt (*, $p \leq 0,05$, ****, $p \leq 0,0001$)

Weiterführende Untersuchungen sollten klären, welche Komplementkomponenten des klassischen Weges als Liganden einer möglichen Protein-Protein-Interaktion mit NDM-1 Δ 28 in Frage kommen.

4.5.3 Untersuchung zur Bindung der Komplementkomponenten C3b, C3c, C4 und C4b an NDM-Varianten

Bei der Betrachtung der Komplementkaskade unter Einbeziehung der zuvor beschriebenen Ergebnisse wurden gezielt Komplementkomponenten ausgewählt, die auf ihre Interaktion mit den drei NDM-Varianten untersucht wurden. Dazu gehörten C4 und C2, die beide sowohl am klassischen Weg als auch am Lektinweg beteiligt sind sowie die Komplementfaktoren C1q, C1r und C1s. Die Bindung von C4 und auch vom Spaltprodukt C4b an NDM-Varianten erfolgte mittels ELISA. Dazu wurden die NDM-Varianten über Nacht auf eine Mikrotiterplatte immobilisiert und die Bindung von C4 und C4b durch einen polyklonalen Anti-C4 Antikörper untersucht (Abbildung 27). Für beide Komplementkomponenten wurde eine signifikante Bindung an alle untersuchten NDM-Varianten nachgewiesen. Als Positivkontrolle diente CbiA und als Negativkontrolle CipA. Eine Interaktion von CbiA mit C4b wurde zuvor in der Literatur beschrieben¹¹⁹. CipA zeigte, wie erwartet, keine Interaktion mit den untersuchten Komplementkomponenten.

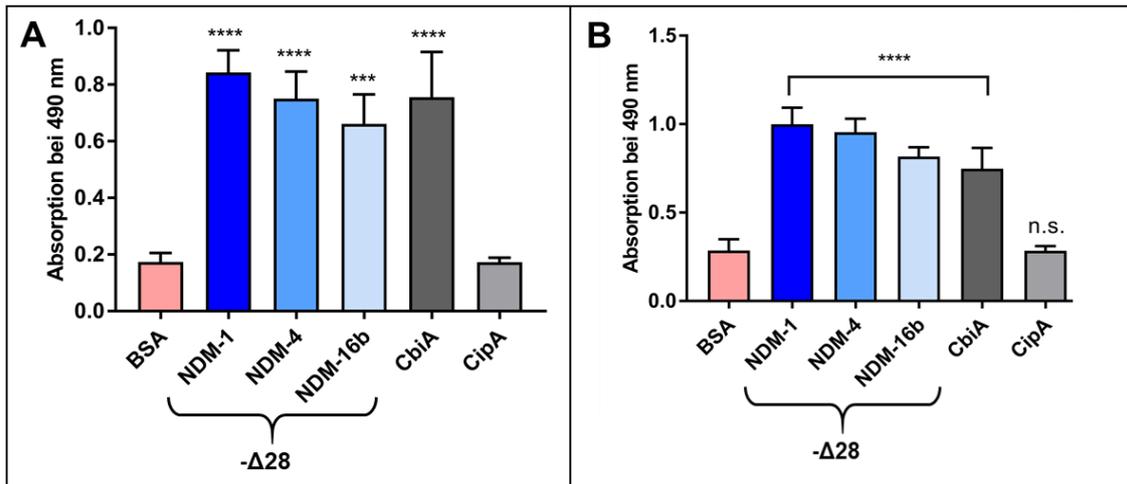


Abbildung 27: Untersuchung zur Bindung von C4 und C4b an NDM-Varianten. Es wurden 500 ng an NDM-Varianten immobilisiert und die Bindung von C4 (A) und C4b (B) mittels polyklonalen Anti-C4-Antikörpern (1:1000) nachgewiesen. Als Positivkontrollen wurde CbiA und als Negativkontrolle CipA verwendet. ***, $p \leq 0,001$ und ****, $p \leq 0,0001$. Die statistische Auswertung wurde mithilfe eines einfaktoriellen ANOVA-Tests mit multiplem Vergleichstest nach Bonferroni und einem Konfidenzintervall von $\geq 95\%$ durchgeführt. Die Messung der Absorption erfolgte 4:45 min nach Substratzugabe.

Eine Bindung von C2 an NDM-Varianten war aufgrund der hohen Absorptionswerte der Antikörperkontrolle (hoher Hintergrund) des Anti-C2 Antikörper nicht möglich. Die wenigen erfolgten Untersuchungen zeigten jedoch keinen Hinweis auf eine Bindung von NDM-Varianten an C2 (Daten nicht gezeigt).

Die Komplementkomponente C3 ist ein zentraler Bestandteil der Komplementkaskade und wurde deshalb ebenfalls analysiert, auch wenn eine Inhibition des alternativen Weges durch die NDM-Varianten nicht gezeigt wurde. Von den 12 Domänen, aus denen C3b besteht, sind noch 10 Domänen im Spaltprodukt C3c vorhanden¹²¹. Für die Untersuchung wurden die gereinigten NDM-Varianten über Nacht immobilisiert und am nächsten Tag mit den Komplementkomponenten C3b und C3c inkubiert und die Bindung durch einen Anti-C3 Antikörper nachgewiesen. In diesen Versuchen zeigte sich eine Interaktion von C3b mit allen untersuchten NDM-Varianten (Abbildung 28). Für C3c war ebenfalls eine Interaktion nachzuweisen, allerdings nur signifikant für NDM-1 Δ 28 und NDM-4 Δ 28 (Abbildung 28).

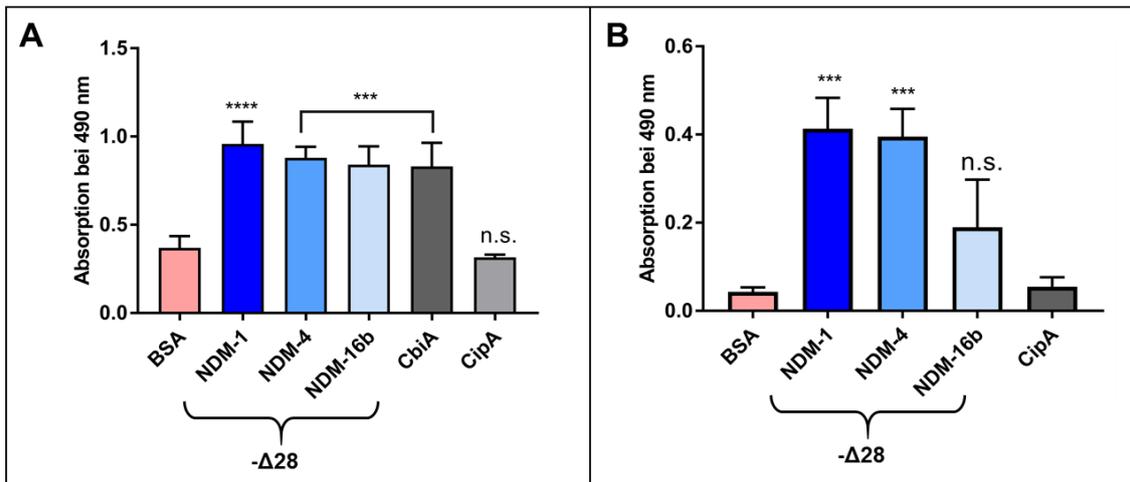


Abbildung 28: Untersuchung der Bindung von unterschiedlichen NDM-Varianten an C3b und C3c. Es wurden 500 ng an NDM-Varianten immobilisiert und die Bindung von C3b (A) und C3c (B) mittels polyklonalen Anti-C3-Antikörpern (1:1000) nachgewiesen. Als Positivkontrollen wurde CbiA und als Negativkontrolle CipA verwendet. *** entspricht einer Signifikanz von $p \leq 0,001$ und **** einer Signifikanz von $p \leq 0,0001$. Die statistische Auswertung wurde mithilfe eines einfaktoriellen ANOVA-Tests mit multiplem Vergleichstest nach Bonferroni und einem Konfidenzintervall von $\geq 95\%$ durchgeführt.

4.5.4 Far Westernblot-Analyse zum Nachweis der Interaktion von NDM-1Δ28 mit Komplementfaktoren

Um die Bindung der NDM-Varianten an C3b, C3c und C4b mit einer weiteren Methode zu bestätigen, wurde eine Far Westernblot-Analyse durchgeführt. Hierzu wurden die Komplementkomponenten C3b, C3c und C4b in einem nativen Polyacrylamidgel (Mini-PROTEAN® TGX™ Precast Protein Gels, 4-20%, Bio-rad) separiert und auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Die transferierten Proteine wurden zunächst mittels Protein Detection Kit visualisiert und im nächsten Schritt wurde eine weitere Membran mit gereinigtem NDM-1Δ28 ($c = 6 \text{ mg/mL}$) inkubiert. Anschließend wurde mit einem Anti-His₆-Antikörper detektiert. Es konnte jedoch unter diesen Bedingungen keine Bindung an die Komplementkomponenten nachgewiesen werden (Abbildung 29).

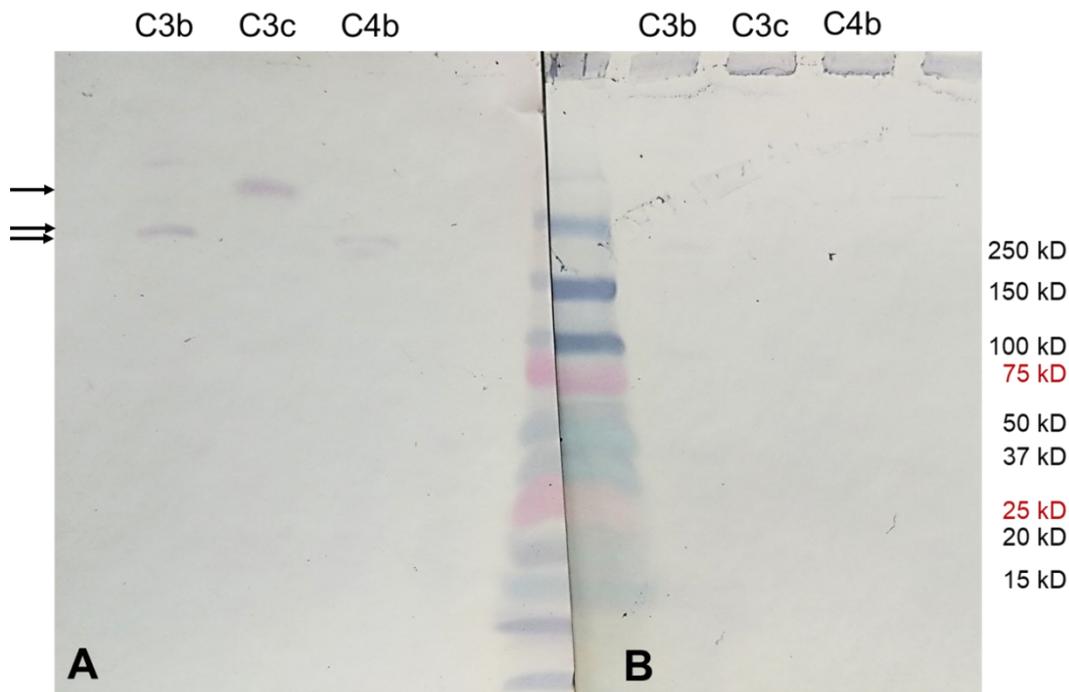


Abbildung 29: Nachweis der Bindung von NDM-1Δ28 an verschiedene Komplementkomponenten. C3b, C3c und C4b (jeweils 1,5 μg) wurden in einem nativen Polyacrylamidgel separiert und anschließend transferiert. Visualisierung der transferierten Proteine mittels Protein Detection Kit (A) und Far Westernblot-Analyse mit NDM-1Δ28 und Anti-His₆-Antikörper (B). C3b hat eine Masse von 176 kDa und C4b hat eine Masse von 195 kDa, C3c hat eine Masse von 139 kDa.

4.5.5 Thermal Shift Assay zum Nachweis von Protein-Protein Interaktion

Zur Bestätigung der Ergebnisse aus den Kapiteln 4.5.1 und 4.5.2 wurde zusätzlich ein Thermal Shift Assay durchgeführt. Dabei wurde das Verhalten der NDM-Variante NDM-1Δ28 und C4b unter kontinuierlicher Temperaturerhöhung beobachtet und der Schmelzpunkt für beide Proteine bestimmt. Anschließend wurden Reaktionsansätze mit NDM-1Δ28 und C4b untersucht. C4b ist mit einer Größe von 195 kDa wesentlich größer als NDM-1Δ28 (26 kDa), weshalb unterschiedliche Schmelzpunkte erwartet wurden. C4b besteht aus drei Ketten, einer α-Kette (87 kDa), einer β-Kette (75 kDa) und einer γ-Kette (33 kDa), die jeweils ebenfalls unterschiedliche Schmelzpunkte besitzen. Für NDM-1Δ28 wurde ein Schmelzpunkt von 62 °C gemessen. Bei C4b lagen die Schmelzpunkte bei 62 °C, 69 °C und 77 °C. Wie in Abbildung 30 zu erkennen, zeigten die Kurvenverläufe von C4b im Vergleich zu den Ansätzen mit C4b und NDM-1Δ28 nur einen geringfügigen Unterschied. Aus diesem Grund konnte nicht festgestellt

werden, ob sich ein Komplex aus NDM-1 Δ 28 und C4b bildet; zumal NDM-1 Δ 28 einen Schmelzpunkt aufweist, der auch dem Schmelzpunkt der α -Kette (87 kDa) entspricht (Abbildung 30). Für eine Komplexbildung würden zusätzliche Schmelzpunktkurven sprechen, die jedoch nicht nachgewiesen wurden. Das bedeutet, dass mittels Thermal Shift Assay keine Protein-Protein-Interaktion nachgewiesen werden konnte, weshalb ein weiteres Thermophorese-Verfahren durchgeführt wurde.

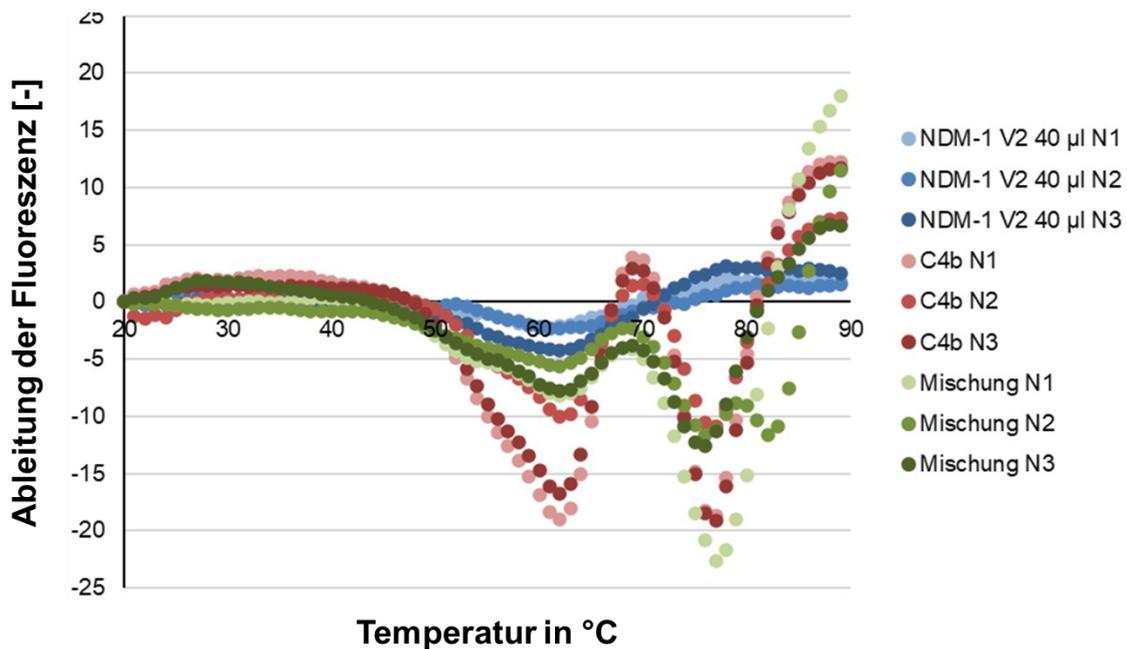


Abbildung 30: Nachweis der Interaktion mittels Thermal Shift Assay. An den Extrema können die Schmelzpunkte abgelesen werden. Die Kurvenverläufe von C4b sind in Rot gekennzeichnet, die von NDM-1 Δ 28 in blau und die Kurvenverläufe der Reaktionsansätze mit beiden Molekülen in grün. Der Versuch wurde einmal in Triplets durchgeführt.

4.5.6 Nachweis von Protein-Protein Interaktionen mittels Thermophorese

Um die Ergebnisse aus den ELISA Versuchen (s. Kapitel 4.5.1) zur Bindung von NDM-Varianten an C4b zu bestätigen, wurde eine Thermophorese durchgeführt. Dabei wurde das Verhalten des fluoreszenzmarkierten NDM-1 Δ 28 Proteins in Gegenwart von unterschiedlichen Konzentrationen an C4b unter kontinuierlicher Temperaturerhöhung untersucht. Zur Kontrolle wurde die Markierung von NDM-1 Δ 28 mit dem im Kit mitgelieferten Fluoreszenzfarbstoff untersucht, wobei ein stabiles Signal auch nach 60 min detektiert werden konnte (Abbildung 31).

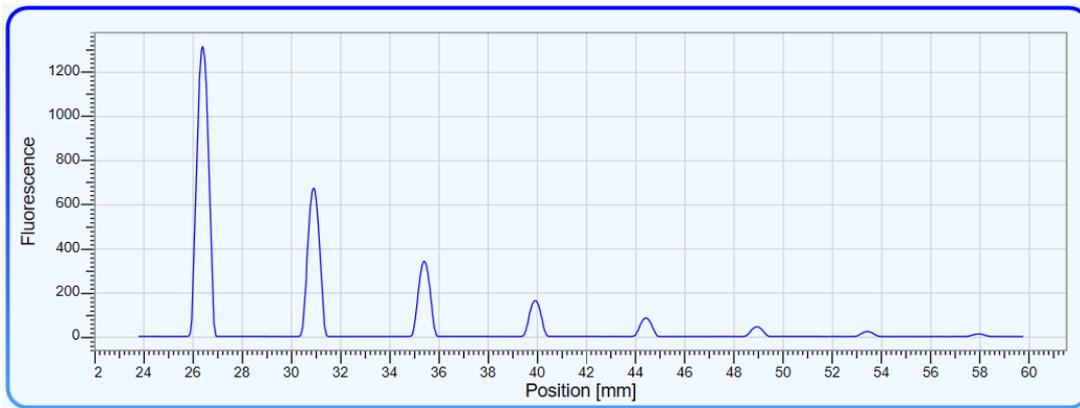


Abbildung 31: Nachweis der Markierungseffizienz von NDM-1 Δ 28 mittels Thermophorese. Die Stärke des Fluoreszenzsignals ist zur Position der Probe im Gerät aufgetragen. Die exponentielle Abnahme des Signals zeigt eine 1:2-Verdünnung. Das Fluoreszenzsignal blieb nach 60 min stabil. Die LED Laser Intensität lag bei 20%.

Auch mit diesem Verfahren konnte keine Konformations- oder Größenänderung von NDM-1 Δ 28 in Anwesenheit von C4b nachgewiesen werden. Im Falle einer Bindung ist ein deutlicher Unterschied zwischen nicht gebundenem und gebundenem Zustand im Fluoreszenzsignal zu erkennen (Abbildung 31). Die Fluoreszenz sollte bei einer Interaktion zweier Proteine höher liegen, da die Teilchen im Vergleich zu den einzelnen Proteinen schwerer und größer werden und dem Laser langsamer und „schwerfälliger“ ausweichen. Im Reaktionsansatz mit NDM-1 Δ 28 und C4b zeigte sich nur eine geringfügige Abweichung, die keine Abhängigkeit von der Konzentration der Komplementkomponente erkennen ließ (Abbildung 31).

Bei Analyse der einzelnen Kurvenverläufe lässt sich kein Unterschied zwischen den unterschiedlichen Konzentrationen an C4b, z.B. beim sprunghaften Temperaturanstieg („T jump“) bei 30 s, erkennen. Auch bei $c = 0 \mu\text{M}$ ist kein Unterschied zu den anderen Werten zu sehen (Abbildung 32). Entweder müssen noch höhere Konzentrationen für den Komplementfaktor gewählt werden, um eine Interaktion nachzuweisen, oder es findet tatsächlich keine Bindung statt.

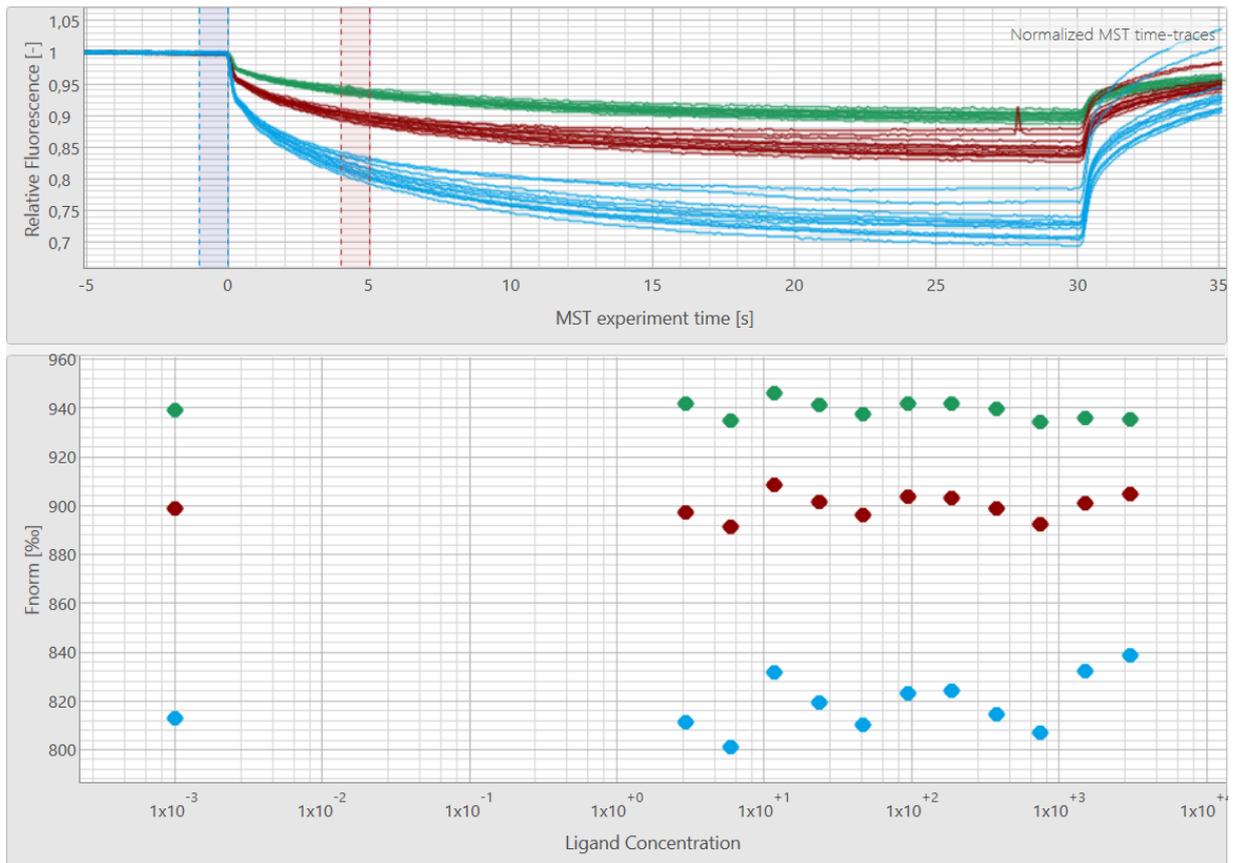


Abbildung 32: Thermophorese mit NDM-1 Δ 28 und unterschiedlichen Konzentrationen von C4b. Grün steht für 20% Infrarot-Laser, rot für 40% Infrarot-Laser und blau für 80% Infrarot-Laser. Obere Abbildung: Einzelne Kurvenverläufe, LED Laser 35%. Untere Abbildung: einzelne Konzentrationen beim „T jump“ aufgetragen, um die Kinetik beurteilen zu können. In Abhängigkeit von der auf der x-Achse aufgetragenen Konzentration an C4b ist keine Veränderung des Fluoreszenzsignals festzustellen.

5 Diskussion

Nach Ansicht der WHO sind Antibiotikaresistenzen eine Bedrohung für die internationale Gesundheit. Die Entwicklung von Therapieoptionen ist zur Bekämpfung längst nicht mehr genug, es braucht umso mehr eine politische und gesellschaftliche Auseinandersetzung. Dazu gehört auch die Erfassung von epidemiologischen Daten, um die Wirksamkeit der Maßnahmen zu überprüfen und sich an lokale Besonderheiten anzupassen.

5.1 NDM-Varianten und Erregerspezies in epidemiologischen Erhebungen

Durch die Erfassung von 4MRGN-Erregern am Universitätsklinikum Frankfurt und die Langzeit-Kryokonservierung der Isolate können Daten im Hinblick auf unterschiedliche epidemiologische Fragestellungen ausgewertet werden. Insgesamt wurden 60 Isolate im Zeitraum 2007 bis 2017 erfasst und dabei ein Anstieg an *bla*_{NDM}-positiven Isolaten verzeichnet, die vor allem durch rektale Routineabstriche nachgewiesen wurden. Das Erregerspektrum umfasste überwiegend Enterobacterales, darunter am häufigsten *E. coli* und *K. pneumoniae*. Es zeigte sich, dass die verbreitete M154L-Mutation vor allem bei *E. coli* nachgewiesen wurde. Vergleichbare Erhebungen von Rahman *et al.*¹²² aus dem Jahr 2012 haben eine ähnlich große Studienpopulation (n = 57 Infektionen mit NDM-positiven Erregern) an einem Krankenhaus in Indien mit 800 Betten untersucht. Die Daten wurden jedoch nur über ein halbes Jahr erfasst, damit ist die zeitliche Dimension zu vernachlässigen. Durch die in dieser Arbeit erhobenen Daten wurde dagegen ein Anstieg *bla*_{NDM}-positiver Isolate über einen Zeitraum von 9 Jahren gezeigt. Daraus lässt sich bereits schließen, dass die Punktprävalenz für den Nachweis *bla*_{NDM}-positiver Isolate am Universitätsklinikum Frankfurt wesentlich geringer ist als in oben genanntem indischem Krankenhaus. Diese Beobachtung deckt sich mit epidemiologischen Untersuchungen, wonach eine endemische Verbreitung von NDM für den indischen Subkontinent beschrieben wird^{68,69}.

Die untersuchten Isolate waren vor allem Enterobacterales, parallel zu dieser Beobachtung konnte bei Wu *et al.*¹¹² bestätigt werden, dass *bla*_{NDM-1} vor allem

durch Erreger wie *K. pneumoniae* und *A. baumannii* exprimiert wird. Die *bla*_{NDM}-Gensequenz anderer NDM-Varianten ist am häufigsten für die Spezies *E. coli* beschrieben. Ähnliche Ergebnisse zeigen sich bei Khan *et al.*¹²³. Besonders die M154L-Varianten wurden primär ausschließlich in *E. coli* entdeckt (Abbildung 14). Dies scheint vor allem mit den Plasmiden zusammenzuhängen, auf denen das jeweilige *bla*_{NDM}-Gen kodiert ist. Hier gibt es spezielle mobile Genelemente, sogenannte Transposons, die häufig in *E. coli* vertreten sind. Auch in den Untersuchungen von Rahman *et al.*¹²² wurden 70% der untersuchten NDM-Varianten aus *E. coli*-Erregern isoliert vorwiegend NDM-5, -6 und -7. Diese Beobachtung deckt sich mit der Variantenverteilung der in dieser Arbeit untersuchten Isolate, bei der häufig die Variante NDM-5 nachgewiesen wurde. Insgesamt stellt diese Arbeit eine Fortführung der wenigen epidemiologischen Studien mit dem Fokus auf NDM-Varianten dar.

Tabelle 30: NDM-Varianten zur Primärspezies nach Khan *et al.*¹²³

| NDM-Varianten | Aminosäure-Substitution | Primärspezies |
|---------------|-------------------------------|----------------------|
| NDM-2 | P28A | <i>A. baumannii</i> |
| NDM-3 | D95N | <i>E. coli</i> |
| NDM-4 | M154L | <i>E. coli</i> |
| NDM-5 | M154L, V88L | <i>E. coli</i> |
| NDM-6 | A233V | <i>E. coli</i> |
| NDM-7 | M154L, D130N | <i>E. coli</i> |
| NDM-8 | M154L, D130G | <i>E. coli</i> |
| NDM-9 | E152K | <i>K. pneumoniae</i> |
| NDM-10 | R32S, G36D, G69S, A74T, G200R | <i>K. pneumoniae</i> |
| NDM-11 | M154V | <i>E. coli</i> |
| NDM-12 | M154L, G222D | <i>E. coli</i> |
| NDM-13 | M154L, D95N | <i>E. coli</i> |
| NDM-14 | D130G | <i>A. lwoffii</i> |
| NDM-15 | M154L, A233V | <i>E. coli</i> |
| NDM-16b | M154L, V88L, A233V | <i>E. coli</i> |

5.1.1 Bedeutung der Daten für nosokomiale Infektionen

In der letzten nationalen Punktprävalenzerhebung des Robert-Koch-Instituts von 2016 zu nosokomialen Infektionen wurde deutschlandweit im Vergleich zu 2011

ein Rückgang festgestellt¹²⁴. In diesem Bericht wird auch die Verteilung nosokomialer Infektionen auf Normalstationen und Intensivstationen verglichen, wobei auf Intensivstationen signifikant häufiger multiresistente Erreger an Infektionen beteiligt sind. Diese Beobachtung konnte in dieser Arbeit eindeutig bestätigt werden. Zudem stammten die Isolate hauptsächlich von älteren Patienten. Eine Korrelation zu Krankenhausaufenthalten oder Pflegeheimen ist anzunehmen, da ältere Patienten vermehrt in Kontakt mit dem Gesundheitssystem stehen.

Bei der Frage, ob eine Infektion oder Kolonisation vorlag, geht die Tendenz in Richtung der Kolonisation, was insofern nachvollziehbar ist, da die Resistenzgene meist auf gastrointestinale Erreger übergehen, die den Magen-Darm-Trakt zwar besiedeln, aber nicht primär pathogen sind. Da die schwerwiegenden Resistenzen auf andere Pathogene oder Bakterien der Normalflora übertragen werden können, sollten Kolonisationen in ihrer Gefahr für Krankenhauspatienten nicht unterschätzt werden.

5.1.2 Kritische Resistenzlage unter den untersuchten Isolaten

Die klinischen Isolate wurden auf ihre Antibiotikaresistenzen hin untersucht, um mögliche Therapiekonzepte daraus abzuleiten. Tatsächlich wurden hohe Resistenzanteile erwartet, allerdings sind die verbleibenden Therapieoptionen weitaus begrenzter als initial vermutet.

Wie zu erwarten, waren die getesteten klinischen Isolate aufgrund der Beta-Laktamase zu 98% resistent gegen Penicilline, Cephalosporine und Carbapeneme. Zudem waren mehr als 90% der Isolate resistent gegen Fluorchinolone (siehe 1). Dagegen wurden bei nur 10% der getesteten Isolate Resistenzen gegen das Reserveantibiotikum Colistin nachgewiesen. Wie jedoch bereits in 1.4.2 erläutert, wird Colistin ob seiner zahlreichen Nebenwirkungen wie Neurotoxizität zurückhaltend eingesetzt⁹¹. Gegen Fosfomycin waren 24% der untersuchten Isolate resistent, auch hier ist die Therapie durch teils starke Nephrotoxizität limitiert. Zudem ist die Wirksamkeit von Fosfomycin durch schnelle renale Eliminierung begrenzt. Als weiterer limitierender Faktor kommt

hinzu, dass es sich oft nur für Kombinationstherapien eignet. Dass für die Therapie immer häufiger kritische Medikamentenspiegel und starke Nebenwirkungen in Kauf genommen werden, zeigt bereits, dass die Therapieoptionen sehr beschränkt sind. Gegen Aminoglycoside lagen die Resistenzen bei über 50% der getesteten Isolate vor. Damit eignet sich diese Antibiotikaklasse nicht für eine kalkulierte Therapie nach dem *Antibiotic Stewardship*. Eine oft angeführte Therapieoption ist die Verwendung von Tigecyclin, hier fanden sich in 70% der Isolate Resistenzen gegen dieses Antibiotikum. Damit kann Tigecyclin nicht als sinnvolle Therapie eingestuft werden, insbesondere da dessen Wirkung lediglich bakteriostatisch ist. Die meisten Studien zeigen, dass eine Monotherapie für *bla_{NDM}*-positive Erreger nicht ausreichend ist und konzentrieren sich die Behandlungsoptionen auf Zweifach- oder Dreifachkombinationen aus unterschiedlichen Antibiotikaklassen^{92,93,125}. Dass der Antibiotikagebrauch insgesamt trotz des vermehrt rationalen Einsatzes von Antibiotika zunimmt, ist in einer Punktprävalenzstudie des Robert-Koch-Instituts nachgewiesen worden¹²⁴. Diese Entwicklung kann kritisch gesehen werden und ist besonders im Zuge der Richtlinien des *Antibiotic Stewardship* überprüfungswürdig. Immer wieder wird die Reduktion bei perioperativen Antibiotikaprophylaxen genannt, die in vielen Fällen länger als nötig gegeben werden.

In dieser Arbeit wurden die klinischen Isolate nicht auf Kombinationstherapien mit unterschiedlichen Antibiotika untersucht. Für weiterführende Untersuchungen bieten sich daher *in vitro* Versuche mit Kombinationstherapien an. Ein neuer Ansatz ist dabei auch die Kombination von Carbapenemen mit der antiretroviralen Substanz Zidovudin, die in *Checkerboard-Assays* eine erhöhte Wirksamkeit gegen *bla_{NDM}*-positive *K. pneumoniae* zeigte¹²⁶. Im nächsten Schritt könnten die vielversprechendsten Kombinationen im *G. mellonella*-Infektionsmodell auf ihre *in vivo* Wirksamkeit untersucht werden.

5.2 Resistenzvermittlung durch NDM im *G. mellonella*-Modell

Als zweiter Teil dieser Arbeit wurden *bla_{NDM}*-positive Erreger im *G. mellonella* Infektionsmodell untersucht. Mithilfe des Modells konnte gezeigt werden, dass

durch Imipenem nach Infektion mit Erregern, die NDM produzieren können, signifikant weniger Larven therapiert werden können als nach Infektion mit Erregern ohne NDM, was die Carbapenemaseaktivität *in vivo* demonstriert.

Durch die in den Larven enthaltene Hämolymphe ergibt sich analog zum menschlichen Immunsystem eine, dem Menschen ähnliche, angeborene Immunabwehr¹¹⁷ und verschiedene Daten zeigen, dass die Virulenz von Erregern im *G. mellonella* Modell ähnlich oder sogar besser abgebildet wird als im Mausmodell¹¹⁵.

Zur Klonierung der *bla*_{NDM}-Gensequenz in *K. pneumoniae* PRZ wurde der TOPO-Vektor verwendet, der zwar Anwendung als Klonierungsvektor, jedoch nicht als Produktionsvektor für Proteine verwendet werden kann. Darüber hinaus ist der Vektor auf die Verwendung in *E. coli* TOP10 zugeschnitten. Dies könnte erklären, weshalb bei der Vermehrung innerhalb der Larve ein Vektorverlust von etwa 80% toleriert werden musste. Es gibt Hinweise, dass der Vektor pTOPO preNDM-1⁹⁶ sowie Plasmide mit *bla*_{NDM-5}¹²⁷ zu einem Fitnessverlust führen. Aus diesem Grund wird in der Wachstumsphase ein Selektionsdruck durch Antibiotika auf die Erreger ausgeübt, durch den die Weitergabe des Plasmids zu einem Überlebensvorteil führt.

In Anbetracht des Vektorverlusts und der damit geringeren Proteinproduktion wurde dennoch ein deutliches Ergebnis im Therapieversuch erreicht. Nach einem Beobachtungszeitraum von 24 Stunden konnte gezeigt werden, dass Larven, die eine Injektion mit NDM-positiven Erregern erhielten, durch die Therapie mit Imipenem signifikant ($p \leq 0,002$) weniger profitierten als die Kontrollgruppe ohne NDM-Produktion. Damit wurde *in vivo* der Nachweis über die Vermittlung der Carbapenemresistenz durch NDM-Produktion erbracht.

5.2.1 Effektivität von Antibiotikatherapien im *G. mellonella*-Modell

In der Literatur ist die Infektion von Larven mit *bla*_{NDM}-positiven Erregern bereits untersucht^{96,128}, die Imipenemtherapie steht in dieser Arbeit jedoch erstmals im Fokus. In einer Studie von Proschak *et al.*¹²⁸ konnte ebenfalls gezeigt werden, dass trotz einer Imipenemtherapie nach Infektion mit *bla*_{NDM}-positiven Erregern kaum Larven gerettet werden konnten, dabei gab es jedoch keine Kontrollgruppe

ohne Therapie und es wurde eine niedrige Antibiotikadosis gewählt. Der Fokus lag auf der Kombinationstherapie aus Imipenem und einem Chelator, um die enzymatische Aktivität der NDM abzuschwächen¹²⁸. In dieser Arbeit gab es mit PRZ pTOPO eine Kontrollgruppe, in der signifikant mehr Larven durch die Imipenemtherapie behandelt werden konnten. Damit ist mit dieser Arbeit erstmals der *in vivo* Nachweis der NDM-Aktivität am Infektionsmodell erbracht. Vergleichbare Versuche wurden bisher für Oxa-Varianten am *G. mellonella*-Infektionsmodell durchgeführt^{107,129}.

Mit der Verwendung eines geeigneteren Vektors könnten an diesem Modell mehrere Varianten der NDM *in vivo* untersucht werden. Zudem könnten unterschiedliche Carbapeneme getestet werden, um deren Effektivität besser beurteilen zu können. Schließlich sind auch Versuche mit Kombinationen aus zwei oder drei unterschiedlichen Antibiotika denkbar, die somit am Lebendmodell erprobt werden können. Besonders synergistische und antis synergistische Effekte der Antibiotika untereinander bieten interessante Forschungsfelder. Da es keine Standards für die Therapie multiresistenter Erreger gibt, sind interindividuelle Unterschiede zwischen den einzelnen Carbapenemase-Typen von großer Bedeutung. Die Attraktivität des *G. mellonella*-Infektionsmodells liegt nicht zuletzt darin, dass zunehmend Versuche an Wirbeltieren reduziert werden können. Einerseits können Vorversuche an den Larven erfolgen, um eventuell erste Effekte zu beobachten und andererseits ist für Fragestellungen, wie sie in dieser Arbeit behandelt wurden, dieses Infektionsmodell gut geeignet.

5.3 Interaktion von NDM-1 mit dem humanen Komplementsystem

Dem Immunsystem zu entgehen, gehört zu den Schlüsselkompetenzen vieler humanpathogener Mikroorganismen, um Infektionen auszulösen oder den menschlichen Wirt zu kolonisieren^{16,130}. Einer der Immunevasions-Strategien, die Mikroorganismen entwickelt haben, richtet sich gegen das Komplementsystem, das als zentraler Bestandteil des angeborenen Immunsystems gilt und die primäre Verteidigung gegen pathogene Erreger repräsentiert. Dabei kann die Interaktion mit dem Komplementsystem auf unterschiedlichen Aktivierungsstufen

erfolgen. Bei *B. burgdorferi* konnte ein Protein identifiziert werden, BBK32, das den klassischen Weg bereits auf der initialen Aktivierungsstufe inhibiert, indem es an C1r bindet (Abbildung 33, A)¹³¹. Sowohl für *P. aeruginosa* als auch für *S. pyogenes* wurden Proteasen detektiert, die in der Lage sind, die Komplementkomponente C3 zu spalten (Abbildung 33, B)¹³². Für *S. aureus* ist nachgewiesen, dass sogenannte Evasionsmoleküle gebildet werden können, die die Bildung der C3- und C5-Konvertasen inhibieren (Abbildung 33, D). Dazu gehören Efb, Ecb („*extracellular complement binding*“) und SCIN („*Staphylococcal complement inhibitor*“). Über die Inhibition der Bildung der C5-Konvertase ist die Aktivierung des terminalen Weges und somit die Bildung des MAK nicht möglich¹³³. Weitere lösliche Proteine wie „*Staphylococcal protein A*“ (SpA) oder „*Staphylococcal binder of immunoglobulins*“ (Sbi) können an Immunglobuline wie IgG auf der Bakterienoberfläche binden^{134,135}. Das hat direkte Auswirkungen auf eine verminderte Aktivierung des klassischen Weges und führt zu einer Inhibition des Komplementsystems auf sehr früher Ebene. Ein weit verbreiteter Immunevasionsmechanismus ist die Bindung von Regulatorproteinen wie C4BP, C1-INH, Faktor H, FHL-1 oder Vitronectin (Abbildung 33, C). Als ein Beispiel kann hier das Gram-negative Bakterium *Neisseria meningitidis* genannt werden, das schwere Hirnhautentzündungen verursachen kann. Mithilfe der an der Bakterienoberfläche exprimierten Proteine PorA und fHbp wird nachweislich C4BP gebunden¹³⁶. Eine Inhibition durch NDM-Varianten wäre auf ähnliche Weise möglich, daher wurde die Bindung an Komplementkomponenten untersucht.

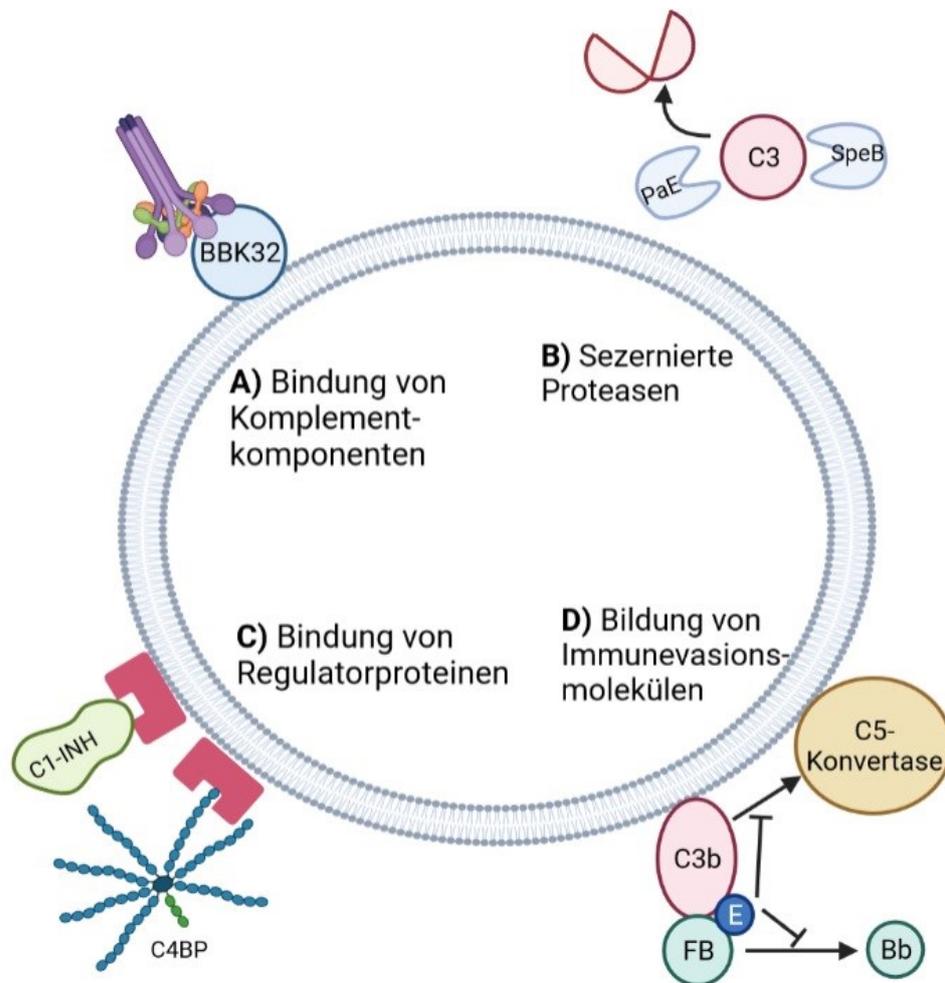


Abbildung 33: Beispiele bakterieller Komplement-Evasionsstrategien, modifiziert nach Hovingh et al.¹³⁷

5.3.1 Nachweis der Komplementinhibierung durch NDM

Um eine potenzielle Interaktion von NDM-Proteinen mit dem Komplementsystem zu untersuchen, wurden drei NDM-Varianten ausgewählt, die sich in ihrer Aminosäurestruktur unterscheiden. Die Variante NDM-4 Δ 28 trägt eine Mutation an Position 154 (M154L), wie auch die Variante NDM-16b Δ 28. Diese neue Variante zeichnet sich allerdings durch die zusätzlichen Substitutionen an den Positionen 88 (V88L) und 233 (A233V) aus. Insgesamt vermitteln diese Aminosäuresubstitutionen dem NDM-Protein eine höhere Stabilität und hydrolytische Aktivität (siehe 1.4.1). Die funktionellen Vergleichsanalysen wiesen für NDM-1 Δ 28, NDM-4 Δ 28 und NDM-16b Δ 28 einen inhibierenden Effekt auf den klassischen und für NDM-1 Δ 28 und NDM-4 Δ 28 auf den Lektinweg nach (Abbildung 23). Für den alternativen Weg konnte kein inhibitorischer Effekt durch

die NDM-Varianten gezeigt werden. Im Lektinweg war die Inhibition weniger stark ausgeprägt als im Vergleich zum klassischen Weg. Die Ergebnisse für den klassischen Weg zeigten zudem signifikante Unterschiede zwischen den drei Varianten NDM-1 Δ 28, NDM-4 Δ 28 und NDM-16b Δ 28, die auch im hämolytischen Test bestätigt werden konnten (Abbildung 25). Mit diesem Test lässt sich die Komplementaktivierung auf natürlichen, Komplement-aktivierenden Zelloberflächen untersuchen und imitiert die physiologischen Gegebenheiten besser als das ELISA-basierte Testsystem. Zusätzlich erlaubte der hämolytische Test die Untersuchung des terminalen Weges, also die Bildung des MAK. Für den terminalen Weg zeigte sich keine Interaktion, so dass eine Interaktion der NDM-Varianten mit den Komplementkomponenten C5b, C6, C7, C8 und C9 ausgeschlossen werden kann. Für den klassischen Weg bestätigte sich dagegen deutlich die Inhibition durch die drei untersuchten NDM-Varianten.

Alles in allem wurde ein signifikanter inhibierender Effekt der NDM-Varianten auf den Lektinweg und besonders den klassischen Weg nachgewiesen. Interessanterweise ist bereits für IMP-7 als weitere Metallo- β -Laktamase eine Inhibition des Komplementsystems beschrieben¹³⁸, genauere Untersuchungen sind dazu bisher nicht erfolgt. Da die Aminosäurestrukturen der Typ B1 Metallo- β -Laktamasen untereinander inhomogen sind (siehe 1.3.2), könnten weitere Vertreter, beispielsweise VIM untersucht werden, um den Interaktionsort mit Komplement genauer zu bestimmen.

In Relation zu den oben besprochenen Strategien der Immunevasion stellt sich nun die Frage, auf welcher Aktivierungsstufe des Komplementsystems eine Hemmung erfolgen könnte. Zu den Komplementkomponenten, die vorwiegend den klassischen und den Lektinweg betreffen, gehören C2 und C4. Auch die C3-Konvertase, bestehend aus C4b und C2a, wäre noch ein möglicher Anhaltspunkt. Der wahrscheinlichste Mechanismus einer Inhibition ist die Bindung einer Komplementkomponente oder eines -regulators (Abbildung 33, A und C), daher wurde sich in dieser Arbeit darauf konzentriert.

In Untersuchungen mit dem Protein CbiA („*complement binding and inhibitory protein A*“) aus *B. miyamotoi*¹¹⁹ konnte nachgewiesen werden, dass dieses Protein eine inhibitorische Wirkung auf den klassischen und den terminalen Weg besitzt und zudem viele Komplementkomponenten (FH, C3, C3b, C4, C4b, C5, C9) binden kann. In dieser Studie konnte außerdem gezeigt werden, dass CbiA

Resistenzen gegenüber Komplement verleiht. Daher eignet sich dieses Protein für vergleichende Analysen mit den in dieser Arbeit untersuchten NDM-Proteinen.

Im weiteren Verlauf wurde die Inhibition des Komplementsystems durch NDM genauer untersucht. Dabei wurde unter anderem im konzentrationsabhängigen WiELISA ab einer Schwelle von etwa 7,5 μM NDM-1 Δ 28 die maximale Ausprägung der Hemmung erreicht. Vergleichbare Untersuchungen von Jongerius *et al.* konnten bereits signifikante Inhibitionen mit etwa hundertfach niedrigeren Konzentrationen von SCIN und Efb von *S. aureus* zeigen¹³³. Im Gegensatz zur NDM, deren Hauptfunktion in der Spaltung von Carbapenemen liegt, dienen die Proteine aus *S. aureus* ausschließlich der Inhibierung des Komplementsystems. NDM erfüllt damit eine doppelte Funktion, die sich bereits mit geringen Mengen nachweisen lässt.

5.3.2 Thermal Shift Assay und Microscale Thermophoresis als Verfahren zur Bestätigung einer Protein-Protein-Interaktion

Da die stärksten Auswirkungen im klassischen Weg und im Lektinweg nachgewiesen wurden, wurden die Komplementkomponenten C2 und C4 als potenzielle Liganden untersucht, weil diese beiden Proteine Bestandteile des Lektinwegs und des klassischen Wegs darstellen (siehe 1.2.1).

Für die NDM-Varianten konnte mittels ELISA tatsächlich eine Interaktion mit C4 und C4b nachgewiesen werden, die mit der von CbiA vergleichbar ist. Ein weiteres Beispiel ist die Protein-Protein-Interaktion von NS1 aus dem Flavivirus und C4¹³⁹. Um die Ergebnisse aus den ELISA-Versuchen zu einem molekularen Mechanismus der Interaktion von NDM-1 und C4b zu bestätigen, wurden weitere Verfahren verwendet.

Mittels Thermal Shift Assay wurden die Schmelzpunkte von NDM-1 und C4b separat und in einem Reaktionsansatz bestimmt. Durch die Bindung von NDM-1 an C4b wäre bei einer Komplexbildung ein neuer Schmelzpunkt zu erwarten gewesen. Der bestimmte Schmelzpunkt für NDM-1 (62 °C) war vergleichbar mit Ergebnissen von Makena *et al.*, die einen Schmelzpunkt von 59,5 °C ermittelt haben⁸⁹. Die Komplementkomponente C4b besteht aus drei Ketten, die zu

unterschiedlichen Schmelzpunkten des Proteins führen. Die Ergebnisse aus dem Thermal Shift Assay ergaben keinen Anhalt auf einen neu-formierten Komplex aus C4b und NDM-1, da kein neuer Schmelzpunkt gemessen werden konnte.

Die mittels Thermophorese erhobenen Daten lassen ebenfalls erkennen, dass kein Proteinkomplex bestehend aus C4b und NDM-1 gebildet wurde.

Mittlerweile konnte nachgewiesen werden, dass die NDM im Gegensatz zu anderen Metallo- β -Laktamasen an der äußeren Bakterienmembran gebunden ist und in Vesikeln sezerniert werden kann¹⁴⁰. Das erklärt unter anderem die erhöhte Stabilität der Carbapenemase. Die Bindung an die Membran lässt an viele der beschriebenen Immunevasionsstrategien denken. Auch wenn sich der Mechanismus der Komplementinhibition durch NDM in dieser Arbeit nicht abschließend aufklären ließ, eröffnen sich viele Möglichkeiten für weitere Untersuchungen. Inwieweit beispielsweise weitere Komplementkomponenten, wie z.B. C1q, C1r, C1s oder auch der Komplementregulator C1-INH bei der Interaktion mit NDM-1 beteiligt sind, müssen weiterführende Untersuchungen klären. Es ist außerdem nicht ausgeschlossen, dass NDM-1 die Aktivität der C3-Konvertase durch Bindung an C4b inhibiert.

5.3.3 Ausblick auf weiterführende Forschungsansätze

Um den Einfluss der NDM-Proteine auf Komplement weiter zu untersuchen, könnte beispielsweise C4-depletiertes Serum verwendet werden. Mit diesem Versuchsansatz kann nachgewiesen werden, ob weiterhin ein inhibitorischer Effekt auf den klassischen Weg nachweisbar ist. Ebenfalls interessant wären Versuche mit bekannten NDM-Inhibitoren. Eine Kombination aus NDM-Protein und Inhibitor (z.B. 3-Formylchromon oder Captopril) könnte dazu beitragen, den inhibitorischen Einfluss von NDM-Proteinen weiter zu charakterisieren und zu sehen, ob der Effekt aufgehoben wird oder unspezifisch ist. Besonders kovalente Inhibitoren wie 3-Formylchromon¹⁰⁶ würden sich für solche Versuche eignen, da direkt das aktive Zentrum betroffen ist. Der Vergleich von unterschiedlichen NDM-Varianten bietet sich auch bei diesen Versuchen an. Grundsätzlich kann

mit einem solchen Versuch auch die Beteiligung des aktiven Zentrums ausgeschlossen werden.

Die genaue Charakterisierung der mit Komplementkomponenten interagierenden Bindungsstelle könnte für die Entwicklung von neutralisierenden Antikörpern entscheidend sein. Ein vielversprechendes Modell sind beispielsweise Antikörper gegen Oberflächenproteine wie PNAG auf Gram-negativen Erregern¹⁴¹, problematisch ist die fehlende Spezifität des Verfahrens. Dabei werden auch nützliche Bakterien, zum Beispiel Kommensale der gastrointestinalen Kolonisation, mitvernichtet und somit das Mikrobiom verändert. Da auch bei intensiverer Forschung neue Antibiotika-Wirkstoffklassen auf sich warten lassen, braucht es zukünftig derartige Innovationen. Besonders interessant dafür sind solche Proteine wie NDM, die einerseits die Spaltung von Carbapenemen bewirken und damit eine eindeutige Funktion erfüllen, andererseits auch mit dem Komplementsystem interagieren und eine immunmodulierende Wirkung haben.

6 Zusammenfassung

Durch die weltweite Verbreitung von bakteriellen Resistenzgenen wie der Carbapenemase New-Delhi-Metallo- β -Laktamase (NDM), die nahezu alle Beta-Laktamantibiotika spalten kann, und die langwierige Entwicklung neuer Antibiotika, hat die Erforschung von Resistenzdeterminanten eine hohe Priorität. In der vorliegenden Arbeit wurde die neu entdeckte Variante NDM-16b unter epidemiologischen Gesichtspunkten, mit einem *in vivo* Infektionsmodell sowie die Interaktion von NDM-Varianten mit dem menschlichen Komplementsystem untersucht.

Im ersten Teil der Arbeit erfolgte eine epidemiologische Datenerhebung für 60 *bla*_{NDM}-tragende Patientenisolat des Zeitraums 2007 - 2017 auf Basis klinikinterner Datenbanken zu multiresistenten Erregern und zudem eine quantitative Empfindlichkeitstestung für 13 (Reserve-)Antibiotika. Es fiel eine kontinuierliche Zunahme an NDM-Isolaten und insbesondere von NDM-Varianten mit der Punktmutation M154L auf, da diese Mutation eine erhöhte Hydrolaseaktivität vermittelt. Deutlich erkennbar war eine Korrelation der M154L-Varianten und *E. coli*. Im Resistenzprofil der *bla*_{NDM}-positiven Isolate zeigten sich hohe Resistenzraten (> 94%) gegen alle Beta-Laktam-Antibiotika und Fluorchinolone. Fosfomycin und Colistin waren in über 75% der Fälle noch wirksam.

Im zweiten Teil wurden Infektionsversuche mit dem Modellorganismus *Galleria mellonella* (Larve der großen Wachsmotte) durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass die NDM-Produktion der injizierten Erreger keinen Einfluss auf die Pathogenität hatte. Zudem konnte in Therapieversuchen mit Imipenem im lebenden Organismus gezeigt werden, dass über die bakterielle NDM-Produktion die Resistenz gegen Imipenem vermittelt wird.

Im dritten Teil der Arbeit wurden die NDM-Varianten NDM-1 Δ 28, NDM-4 Δ 28 und NDM-16b Δ 28 hinsichtlich ihres inhibitorischen Potentials auf Komplement untersucht. Mit den erzielten Ergebnissen der funktionellen Tests konnte für den klassischen und den Lektinweg eine signifikante Hemmung durch alle drei NDM-Varianten nachgewiesen werden. Ein direkter Vergleich der einzelnen NDM-Varianten ergab, dass NDM-1 Δ 28 die stärkste und NDM-16b Δ 28 die

schwächste Inhibition auf den klassischen Komplementweg ausübte. Bindungsanalysen mit einzelnen Komplementkomponenten (C3, C3b, C3c, C4 und C4b) ließen auf eine Interaktion von NDM-1Δ28 mit C4b schließen.

Zusammenfassend leistet diese Arbeit einen Beitrag zur Fortführung epidemiologischer Untersuchungen von NDM-Varianten und erbringt den *in vivo* Nachweis für Resistenzvermittlung durch NDM. Weiterhin wurde gezeigt, dass NDM neben der Carbapenemasefunktion auch eine immunmodulierende Wirkung erfüllt, indem der klassische und Lektinweg des Komplementsystems gehemmt wird. Damit liegt die Vermutung nahe, dass die globale Ausbreitung von NDM-produzierenden Erregern nicht nur durch die Vermittlung der Antibiotikaresistenz, sondern auch durch eine Immunevasion bedingt ist. Zukünftig könnte somit die Erforschung des Mechanismus der Immunevasion ebenso interessant sein wie die Suche nach wirksamen Inhibitoren der NDM.

7 Summary

Due to worldwide emergence of New-Delhi Metallo- β -Lactamase (NDM), a carbapenemase able to hydrolyze nearly all Beta-Lactam antibiotics, and the lack of promising new antibiotics or inhibitors, research of resistance genes should be a high priority. In this thesis, the new variant NDM-16b was analyzed in an epidemiological context and by using an *in vivo* infection model. In addition, the interaction between NDM and human complement system was examined.

At first, patient data from 2007 - 2017 were collected based on internal hospital databases for multi-resistant pathogens and more than 50 patient isolates harboring *bla*_{NDM} were tested on their susceptibility to 13 (reserve) antibiotics. We found a continuous increase in the number of NDM-positive isolates, especially of NDM-variants containing the M154L-substitution, which leads to an increased hydrolytic activity. Moreover, a high number of M154L-substitutions in *E. coli* was noted. Susceptibility testing revealed high resistances (> 94%) against Beta-Lactam antibiotics and fluoroquinolones, however, the tested isolates were mainly susceptible to Colistin and Fosfomycin (75%).

In the second part, the new variant NDM-16b was analyzed using the *G. mellonella* (larvae of the greater wax moth) infection model, aiming to define lethal doses of pathogens producing NDM, as well as assessing therapy success with imipenem *in vivo*. We showed that resistance against carbapenems is mediated by NDM-production. Lastly, we were able to demonstrate that NDM-production does not influence pathogenicity.

The third part of this work focused on the interaction of variant NDM-1 Δ 28, NDM-4 Δ 28, and NDM-16b Δ 28, respectively, with proteins of the complement system. By using functional tests, a significant inhibition of the classical pathway and the lectin pathway of the complement system was shown. By comparison, NDM-1 Δ 28 displayed the highest inhibitory capacity on the classical pathway while NDM-16b Δ 28 showed a weak inhibition. Furthermore, binding analyses with different complement components (C3, C3c, C3b, C4 and C4b) clearly indicated an interaction of NDM-1 Δ 28 interacts with C4b.

In summary, this work contributes to epidemiological studies concerning antibiotic resistance genes and NDM-variants, demonstrates the mediation of imipenem

resistance through NDM-production *in vivo*. Furthermore, we showed that NDM fulfils two tasks: the carbapenemase activity and an immune-modulating effect. Certainly, both functions lead to the worldwide spread of multi-resistant isolates harboring *bla*_{NDM}. In the future, it could be of high interest to describe the immune-escaping mechanisms as well as to search for potent NDM-inhibitors.

8 Literaturverzeichnis

1. Fischbach MA, Walsh CT. Antibiotics for emerging pathogens. *Science* (80-). 2009;325(5944):1089-1093. doi:10.1126/science.1176667
2. World Health Organization. Ten threats to global health in 2019. Published 2019. Accessed September 6, 2020. <https://www.who.int/news-room/spotlight/ten-threats-to-global-health-in-2019>
3. WHO. Global action plan on antimicrobial resistance. *Who*. Published online 2017:1-28.
4. Spellberg B, Powers JH, Brass EP, Miller LG, Edwards JE. Trends in Antimicrobial Drug Development: Implications for the Future. *Clin Infect Dis*. 2004;38(9):1279-1286. doi:10.1086/420937
5. Tally FP, DeBruin MF. Development of daptomycin for Gram-positive infections. *J Antimicrob Chemother*. 2000;46(4):523-526. doi:10.1093/jac/46.4.523
6. Meka VG, Gold HS. Antimicrobial resistance to linezolid. *Clin Infect Dis*. 2004;39(7):1010-1015. doi:10.1086/423841
7. Jones RN, Ballow CH, Biedenbach DJ, Deinhart JA, Schentag JJ. Antimicrobial Activity of Quinupristin-Dalfopristin (RP 59500, Synercid®) Tested against Over 28,000 Recent Clinical Isolates from 200 Medical Centers in the United States and Canada. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 1998;31(3):437-451. doi:10.1016/S0732-8893(98)80002-3
8. Palumbi SR. Humans as the World's Greatest Evolutionary Force. *Science* (80-). 2001;293(5536):1786 LP - 1790. doi:10.1126/science.293.5536.1786
9. Singer RS, Finch R, Wegener HC, Bywater R, Walters J, Lipsitch M. Antibiotic resistance—the interplay between antibiotic use in animals and human beings. *Lancet Infect Dis*. 2003;3(1):47-51. doi:10.1016/S1473-3099(03)00490-0
10. Bailar III JC, Travers K. Review of Assessments of the Human Health Risk Associated with the Use of Antimicrobial Agents in Agriculture. *Clin Infect Dis*. 2002;34(s3):S135-S143. doi:10.1086/340252
11. Mattner F, Bange F, Meyer E, Seifert H, Wichelhaus TA, Chaberny IF. Preventing the Spread of Multidrug- Resistant Gram-Negative Pathogens. 2012;109(3):39-45. doi:10.3238/arzte
12. Falagas ME, Koletsi PK, Bliziotis IA. The diversity of definitions of multidrug-resistant (MDR) and pandrug-resistant (PDR) *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa*. *J Med Microbiol*. 2006;55(12):1619-1629. doi:10.1099/jmm.0.46747-0
13. Cassini A, Högberg LD, Plachouras D, et al. Attributable deaths and disability-

- adjusted life-years caused by infections with antibiotic-resistant bacteria in the EU and the European Economic Area in 2015: a population-level modelling analysis. *Lancet Infect Dis*. 2019;19(1):56-66. doi:10.1016/S1473-3099(18)30605-4
14. Oberdörfer H, Hübner C, Linder R, Flea S. Mehrkosten bei der Versorgung von Patienten mit multiresistenten Erregern - Eine Analyse aus Sicht einer gesetzlichen Krankenversicherung. *Gesundheitswesen*. 2015;77(11):854-860. doi:10.1055/s-0034-1387709
 15. Doebel T, Voisin B, Nagao K. Langerhans Cells – The Macrophage in Dendritic Cell Clothing. *Trends Immunol*. 2017;38(11):817-828. doi:10.1016/j.it.2017.06.008
 16. Ricklin D, Hajishengallis G, Yang K, Lambris JD. Complement: a key system for immune surveillance and homeostasis. *Nat Immunol*. 2010;11(9):785-797. doi:10.1038/ni.1923
 17. Kolev M, Fric G Le, Kemper C. Complement — tapping into new sites and effector systems. *Nat Rev Immunol*. 2014;14:811. <https://doi.org/10.1038/nri3761>
 18. Ricklin D, Reis ES, Lambris JD. Complement in disease: a defence system turning offensive. *Nat Rev Nephrol*. 2016;12(7):383-401. doi:10.1038/nrneph.2016.70
 19. Merle NS, Church SE, Fremeaux-Bacchi V, Roumenina LT. Complement System Part I - Molecular Mechanisms of Activation and Regulation. *Front Immunol*. 2015;6:262. doi:10.3389/fimmu.2015.00262
 20. Roumenina LT, Kantardjiev AA, Atanasov BP, et al. Role of Ca²⁺ in the electrostatic stability and the functional activity of the globular domain of human C1q. *Biochemistry*. 2005;44(43):14097-14109. doi:10.1021/bi051186n
 21. Païdassi H, Tacnet-Delorme P, Verneret M, et al. Investigations on the C1q–Calreticulin–Phosphatidylserine Interactions Yield New Insights into Apoptotic Cell Recognition. *J Mol Biol*. 2011;408(2):277-290. doi:10.1016/J.JMB.2011.02.029
 22. Frchet P, Tacnet-Delorme P, Arlaud GJ, Païdassi H, Lunardi T, Thielens NM. The lectin-like activity of human C1q and its implication in DNA and apoptotic cell recognition. *FEBS Lett*. 2008;582(20):3111-3116. doi:10.1016/j.febslet.2008.08.001
 23. Martin M, Leffler J, Blom AM. Annexin A2 and A5 serve as new ligands for C1q on apoptotic cells. *J Biol Chem*. 2012;287(40):33733-33744. doi:10.1074/jbc.M112.341339
 24. Gaboriaud C, Thielens NM, Gregory LA, Rossi V, Fontecilla-Camps JC, Arlaud GJ. Structure and activation of the C1 complex of complement: unraveling the puzzle. *Trends Immunol*. 2004;25(7):368-373. doi:10.1016/j.it.2004.04.008

25. Kjaer TR, Thiel S, Andersen GR. Toward a structure-based comprehension of the lectin pathway of complement. *Mol Immunol.* 2013;56(3):222-231. doi:10.1016/j.molimm.2013.05.220
26. Matsushita M, Endo Y, Fujita T. Structural and functional overview of the lectin complement pathway: Its molecular basis and physiological implication. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz).* 2013;61(4):273-283. doi:10.1007/s00005-013-0229-y
27. Gal P, Kocsis A, Zavodszky P, et al. Revised mechanism of complement lectin-pathway activation revealing the role of serine protease MASP-1 as the exclusive activator of MASP-2. *Proc Natl Acad Sci.* 2012;109(26):10498-10503. doi:10.1073/pnas.1202588109
28. Lachmann PJ. The Amplification Loop of the Complement Pathways. In: *Advances in Immunology.* Vol 104. First edit. Elsevier; 2009:115-149. doi:10.1016/S0065-2776(08)04004-2
29. Ricklin D, Reis ES, Mastellos DC, Gros P, Lambris JD. Complement component C3 – The “Swiss Army Knife” of innate immunity and host defense. *Immunol Rev.* 2016;274(1):33-58. doi:10.1111/imr.12500
30. Nordahl EA, Rydengård V, Nyberg P, et al. Activation of the complement system generates antibacterial peptides. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;101(48):16879 LP - 16884. doi:10.1073/pnas.0406678101
31. Fearon DT, Austen KF. Properdin: binding to C3b and stabilization of the C3b-dependent C3 convertase. *J Exp Med.* 1975;142(4):856 LP - 863. doi:10.1084/jem.142.4.856
32. Bénard M, Raoult E, Vaudry D, et al. Role of complement anaphylatoxin receptors (C3aR, C5aR) in the development of the rat cerebellum. *Mol Immunol.* 2008;45(14):3767-3774. doi:10.1016/j.molimm.2008.05.027
33. Müller-Eberhard HJ. The killer molecule of complement. *J Invest Dermatol.* 1985;85(1 Suppl):47s-52s. doi:10.1111/1523-1747.ep12275445
34. Arlaud GJ, Reboul A, Sim RB, Colomb MG. Interaction of C-inhibitor with the Cr and Cs subcomponents in human C. *Biochim Biophys Acta - Protein Struct.* 1979;576(1):151-162. doi:10.1016/0005-2795(79)90494-X
35. Fujii S, Hitomi Y. New synthetic inhibitors of C1r, C1 esterase, thrombin, plasmin, kallikrein and trypsin. *Biochim Biophys Acta.* 1981;661(2):342-345. doi:10.1016/0005-2744(81)90023-1
36. Fujita T, Nussenzweig V. The role of C4-binding protein and beta-1H in proteolysis of C4b and C3b. *J Exp Med.* 1979;150(2):267-276. doi:10.1084/jem.150.2.267
37. Gigli I, Fujita T, Nussenzweig V. Modulation of the classical pathway C3

- convertase by plasma proteins C4 binding protein and C3b inactivator. *Proc Natl Acad Sci.* 1979;76(12):6596-6600. doi:10.1073/pnas.76.12.6596
38. Fujita T, Gigli I, Nussenzweig V. Human C4-binding protein. II. Role in proteolysis of C4b by C3b-inactivator. *J Exp Med.* 1978;148(4):1044-1051. doi:10.1084/jem.148.4.1044
 39. Scharfstein J, Ferreira A, Gigli I, Nussenzweig V. Human C4-binding protein. I. Isolation and characterization. *J Exp Med.* 1978;148(1):207-222. doi:10.1084/jem.148.1.207
 40. Law SK. C3 receptors on macrophages. *J Cell Sci Suppl.* 1988;9:67-97. doi:10.1242/jcs.1988.supplement_9.4
 41. Noris M, Remuzzi G. Overview of complement activation and regulation. *Semin Nephrol.* 2013;33(6):479-492. doi:10.1016/j.semnephrol.2013.08.001
 42. Singh B, Su Y-C, Riesbeck K. Vitronectin in bacterial pathogenesis: a host protein used in complement escape and cellular invasion. *Mol Microbiol.* 2010;78(3):545-560. doi:10.1111/j.1365-2958.2010.07373.x
 43. C. W. Molecular mechanisms that confer antibacterial drug resistance. *Nature.* 2000;406(775-781):775-781.
 44. Williams DH. The glycopeptide story – how to kill the deadly ‘superbugs.’ *Nat Prod Rep.* 1996;13(6):469-477. doi:10.1039/NP9961300469
 45. Brisson-Noël A, Trieu-Cuot P, Courvalin P. Mechanism of action of spiramycin and other macrolides. *J Antimicrob Chemother.* 1988;22 Suppl B(Supplement_B):13-23. doi:10.1093/jac/22.supplement_b.13
 46. Fourmy D, Recht MI, Blanchard SC, Puglisi JD. Structure of the A Site of *Escherichia coli* 16S Ribosomal RNA Complexed with an Aminoglycoside Antibiotic. *Science* (80-). 1996;274(5291):1367-1371. doi:10.1126/science.274.5291.1367
 47. Maxwell A. DNA gyrase as a drug target. *Trends Microbiol.* 1997;5(3):102-109. doi:10.1016/S0966-842X(96)10085-8
 48. Levy SB. Active efflux mechanisms for antimicrobial resistance. *Antimicrob Agents Chemother.* 1992;36(4):695-703. doi:10.1128/AAC.36.4.695
 49. Martínez-Martínez L, Pascual A, Hernández-Allés S, et al. Roles of β -lactamases and porins in activities of carbapenems and cephalosporins against *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 1999;43(7):1669-1673. doi:10.1128/aac.43.7.1669
 50. Philippon A, Labia R, Jacoby G. Extended-spectrum beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother.* 1989;33(8):1131-1136. doi:10.1128/AAC.33.8.1131
 51. Shaw KJ, Rather PN, Hare RS, Miller GH. Molecular genetics of aminoglycoside

- resistance genes and familial relationships of the aminoglycoside-modifying enzymes. *Microbiol Rev.* 1993;57(1):138-163. doi:10.1128/membr.57.1.138-163.1993
52. Walsh CT, Fisher SL, Park I-S, Prahallad M, Wu Z. Bacterial resistance to vancomycin: five genes and one missing hydrogen bond tell the story. *Chem Biol.* 1996;3(1):21-28. doi:10.1016/S1074-5521(96)90079-4
 53. Resistance mechanisms. Accessed May 17, 2020. <https://www.reactgroup.org/toolbox/understand/antibiotic-resistance/resistance-mechanisms-in-bacteria/>
 54. Ambler RP. The structure of beta-lactamases. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 1980;289(1036):321-331. doi:10.1098/rstb.1980.0049
 55. Bush K, Jacoby GA. Updated functional classification of β -lactamases. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010;54(3):969-976. doi:10.1128/AAC.01009-09
 56. Queenan AM, Bush K. Carbapenemases: The versatile β -lactamases. *Clin Microbiol Rev.* 2007;20(3):440-458. doi:10.1128/CMR.00001-07
 57. Poirel L, Potron A, Nordmann P. OXA-48-like carbapenemases: The phantom menace. *J Antimicrob Chemother.* 2012;67(7):1597-1606. doi:10.1093/jac/dks121
 58. Ghafourian S, Sadeghifard N, Soheili S, Sekawi Z. Extended spectrum beta-lactamases: Definition, classification and epidemiology. *Curr Issues Mol Biol.* 2014;17(1):11-22.
 59. Meini MR, Llarrull LI, Vila AJ. Overcoming differences: The catalytic mechanism of metallo- β -lactamases. *FEBS Lett.* 2015;589(22):3419-3432. doi:10.1016/j.febslet.2015.08.015
 60. Cheng Z, Thomas PW, Ju L, et al. Evolution of New Delhi metallo- β -lactamase (NDM) in the clinic: Effects of NDM mutations on stability, zinc affinity, and mono-zinc activity. *J Biol Chem.* 2018;293(32):12606-12618. doi:10.1074/jbc.RA118.003835
 61. Crowder MW, Spencer J, Vila AJ. Metallo- β -lactamases: Novel weaponry for antibiotic resistance in bacteria. *Acc Chem Res.* 2006;39(10):721-728. doi:10.1021/ar0400241
 62. Bebrone C. Metallo- β -lactamases (classification, activity, genetic organization, structure, zinc coordination) and their superfamily. *Biochem Pharmacol.* 2007;74(12):1686-1701. doi:10.1016/j.bcp.2007.05.021
 63. Zhang H, Hao Q. Crystal structure of NDM-1 reveals a common β -lactam hydrolysis mechanism. *FASEB J.* 2011;25(8):2574-2582. doi:10.1096/fj.11-184036

64. King D, Strynadka N. Crystal structure of New Delhi metallo- β -lactamase reveals molecular basis for antibiotic resistance. *Protein Sci.* 2011;20(9):1484-1491. doi:10.1002/pro.697
65. Kim Y, Tesar C, Mire J, et al. Structure of Apo- and Monometalated Forms of NDM-1—A Highly Potent Carbapenem-Hydrolyzing Metallo- β -Lactamase. Driks A, ed. *PLoS One.* 2011;6(9):e24621. doi:10.1371/journal.pone.0024621
66. Rotondo CM, Wright GD. Inhibitors of metallo- β -lactamases. *Curr Opin Microbiol.* 2017;39(November):96-105. doi:10.1016/j.mib.2017.10.026
67. Yong D, Toleman MA, Giske CG, et al. Characterization of a new metallo- β -lactamase gene, *bla*_{NDM-1}, and a novel erythromycin esterase gene carried on a unique genetic structure in *Klebsiella pneumoniae* sequence type 14 from India. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009;53(12):5046-5054. doi:10.1128/AAC.00774-09
68. Kumarasamy KK, Toleman MA, Walsh TR, et al. Emergence of a new antibiotic resistance mechanism in India, Pakistan, and the UK: A molecular, biological, and epidemiological study. *Lancet Infect Dis.* 2010;10(9):597-602. doi:10.1016/S1473-3099(10)70143-2
69. Karlowsky JA, Lob SH, Kazmierczak KM, et al. In vitro activity of imipenem against carbapenemase-positive Enterobacteriaceae isolates collected by the SMART global surveillance program from 2008 to 2014. *J Clin Microbiol.* 2017;55(6):1638-1649. doi:10.1128/JCM.02316-16
70. Walsh TR, Weeks J, Livermore DM, Toleman MA. Dissemination of NDM-1 positive bacteria in the New Delhi environment and its implications for human health: an environmental point prevalence study. *Lancet Infect Dis.* 2011;11(5):355-362. doi:10.1016/S1473-3099(11)70059-7
71. Borah V V, Saikia KK, Chandra P, Hazarika NK, Chakravarty R. New Delhi metallo- β -lactamase and extended spectrum β -lactamases co-producing isolates are high in community-acquired urinary infections in Assam as detected by a novel multiplex polymerase chain reaction assay. *Indian J Med Microbiol.* 34(2):173-182. doi:10.4103/0255-0857.176853
72. Barguigua A, El Otmani F, Lakbakbi El Yaagoubi F, Talmi M, Zerouali K, Timinouni M. First report of a *Klebsiella pneumoniae* strain coproducing NDM-1, VIM-1 and OXA-48 carbapenemases isolated in Morocco. *APMIS.* 2013;121(7):675-677. doi:10.1111/apm.12034
73. Castanheira M, Deshpande LM, Mathai D, Bell JM, Jones RN, Mendes RE. Early dissemination of NDM-1- and OXA-181-producing Enterobacteriaceae in Indian hospitals: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 2006-

2007. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011;55(3):1274-1278. doi:10.1128/AAC.01497-10
74. Dolejska M, Villa L, Poirel L, Nordmann P, Carattoli A. Complete sequencing of an IncHI1 plasmid encoding the carbapenemase NDM-1, the ArmA 16S RNA methylase and a resistance-nodulation-cell division/multidrug efflux pump. *J Antimicrob Chemother.* 2013;68(1):34-39. doi:10.1093/jac/dks357
75. Poirel L, Ros A, Carricajo A, et al. Extremely drug-resistant *Citrobacter freundii* isolate producing NDM-1 and other carbapenemases identified in a patient returning from India. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011;55(1):447-448. doi:10.1128/AAC.01305-10
76. Samuelsen Ø, Naseer U, Karah N, et al. Identification of Enterobacteriaceae isolates with OXA-48 and coproduction of OXA-181 and NDM-1 in Norway. *J Antimicrob Chemother.* 2013;68(7):1682-1685. doi:10.1093/jac/dkt058
77. Poirel L, Dortet L, Bernabeu S, Nordmann P. Genetic features of *bla*_{NDM-1}-positive Enterobacteriaceae. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011;55(11):5403-5407. doi:10.1128/AAC.00585-11
78. Göttig S, Pfeifer Y, Wichelhaus TA, et al. Global spread of New Delhi metallo- β -lactamase 1. *Lancet Infect Dis.* 2010;10(12):828-829. doi:10.1016/S1473-3099(10)70275-9
79. Kaase M, Nordmann P, Wichelhaus TA, Gatermann SG, Bonnin RA, Poirel L. NDM-2 carbapenemase in *Acinetobacter baumannii* from Egypt. *J Antimicrob Chemother.* 2011;66(6):1260-1262. doi:10.1093/jac/dkr135
80. Espinal P, Fugazza G, López Y, et al. Dissemination of an NDM-2-producing *Acinetobacter baumannii* clone in an Israeli Rehabilitation Center. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011;55(11):5396-5398. doi:10.1128/AAC.00679-11
81. Nordmann P, Boulanger AE, Poirel L. NDM-4 metallo- β -lactamase with increased carbapenemase activity from *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012;56(4):2184-2186. doi:10.1128/AAC.05961-11
82. Göttig S, Hamprecht AG, Christ S, Kempf VAJ, Wichelhaus TA. Detection of NDM-7 in Germany, a new variant of the New Delhi metallo- β -lactamase with increased carbapenemase activity. *J Antimicrob Chemother.* 2013;68(8):1737-1740. doi:10.1093/jac/dkt088
83. Bahr G, Vitor-Horen L, Bethel CR, Bonomo RA, Gonzalez LJ, Vila AJ. Clinical Evolution of New Delhi Metallo- β -Lactamase (NDM) optimizes resistance under Zn(II) Deprivation. *Antimicrob Agents Chemother.* 2018;62(1):1-10. doi:10.1128/AAC.01849-17
84. Williamson DA, Sidjabat HE, Freeman JT, et al. Identification and molecular

- characterisation of New Delhi metallo- β -lactamase-1 (NDM-1)- and NDM-6-producing Enterobacteriaceae from New Zealand hospitals. *Int J Antimicrob Agents*. 2012;39(6):529-533. doi:10.1016/j.ijantimicag.2012.02.017
85. Hornsey M, Phee L, Wareham DW. A novel variant, NDM-5, of the New Delhi metallo- β -lactamase in a multidrug-resistant *Escherichia coli* ST648 isolate recovered from a patient in the United Kingdom. *Antimicrob Agents Chemother*. 2011;55(12):5952-5954. doi:10.1128/AAC.05108-11
 86. Liu Z, Wang Y, Walsh TR, et al. Plasmid-Mediated Novel *bla*_{NDM-17} Gene Encoding a Carbapenemase with Enhanced Activity in a Sequence Type 48 *Escherichia coli* Strain. *Antimicrob Agents Chemother*. 2017;61(5):1-9. doi:10.1128/AAC.02233-16
 87. Liu L, Feng Y, McNally A, Zong Z. *Bla*_{NDM-21}, a new variant of *bla*_{NDM} in an *Escherichia coli* clinical isolate carrying *bla*_{CTX-M-55} and *rmtB*. *J Antimicrob Chemother*. 2018;73(9):2336-2339. doi:10.1093/jac/dky226
 88. Liu Z, Wang Y, Walsh TR, et al. Plasmid-Mediated Novel *bla*_{NDM-17} Gene Encoding a Carbapenemase with Enhanced Activity in a Sequence Type 48 *Escherichia coli* Strain. *Antimicrob Agents Chemother*. 2017;61(5):1-9. doi:10.1128/AAC.02233-16
 89. Makena A, Brem J, Pfeffer I, et al. Biochemical characterization of New Delhi metallo- β -lactamase variants reveals differences in protein stability. *J Antimicrob Chemother*. 2015;70(2):463-469. doi:10.1093/jac/dku403
 90. Docobo-Pérez F, Nordmann P, Domínguez-Herrera J, et al. Efficacies of colistin and tigecycline in mice with experimental pneumonia due to NDM-1-producing strains of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli*. *Int J Antimicrob Agents*. 2012;39(3):251-254. doi:10.1016/j.ijantimicag.2011.10.012
 91. Li J, Nation RL, Turnidge JD, et al. Colistin: the re-emerging antibiotic for multidrug-resistant Gram-negative bacterial infections. *Lancet Infect Dis*. 2006;6(9):589-601. doi:10.1016/S1473-3099(06)70580-1
 92. Wiskirchen DE, Nordmann P, Crandon JL, Nicolau DP. In Vivo Efficacy of Human Simulated Regimens of Carbapenems and Comparator Agents against NDM-1-Producing Enterobacteriaceae. *Antimicrob Agents Chemother*. 2014;58(3):1671-1677. doi:10.1128/AAC.01946-13
 93. Rosa R, Rudin SD, Rojas LJ, et al. "Double carbapenem" and oral fosfomycin for the treatment of complicated urinary tract infections caused by *bla*_{NDM} -harboring Enterobacteriaceae in kidney transplantation. *Transpl Infect Dis*. 2018;20(1):e12795. doi:10.1111/tid.12795
 94. Rogers BA, Sidjabat HE, Silvey A, et al. Treatment options for New Delhi metallo-

- beta-lactamase-harboring enterobacteriaceae. *Microb Drug Resist.* 2013;19(2):100-103. doi:10.1089/mdr.2012.0063
95. Göttig S, Gruber TM, Stecher B, Wichelhaus TA, Kempf VAJ. In vivo horizontal gene transfer of the carbapenemase OXA-48 during a nosocomial outbreak. *Clin Infect Dis.* 2015;60(12):1808-1815. doi:10.1093/cid/civ191
 96. Göttig S, Riedel-Christ S, Saleh A, Kempf VAJ, Hamprecht A. Impact of *bla*_{NDM-1} on fitness and pathogenicity of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. *Int J Antimicrob Agents.* 2016;47(6):430-435. doi:10.1016/j.ijantimicag.2016.02.019
 97. EUCAST. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. *Eur Comm Antimicrob Susceptibility Testing Break tables Interpret MICs Zo diameters Version 80, 2018* <http://www.eucast.org>. Published online 2015:0-77. http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Breakpoint_tables/v_8.0_Breakpoint_Tables.pdf
 98. CLSI. *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 27th Ed. CLSI Supplement M100.* Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute.; 2017.
 99. Choi KH, Kumar A, Schweizer HP. A 10-min method for preparation of highly electrocompetent *Pseudomonas aeruginosa* cells: Application for DNA fragment transfer between chromosomes and plasmid transformation. *J Microbiol Methods.* Published online 2006. doi:10.1016/j.mimet.2005.06.001
 100. Cohen SN, Chang AC, Hsu L. Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1972;69(8):2110-2114. doi:10.1073/pnas.69.8.2110
 101. Hanahan D. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol.* 1983;166(4):557-580. doi:10.1016/s0022-2836(83)80284-8
 102. Geertsma ER, Dutzler R. A versatile and efficient high-throughput cloning tool for structural biology. *Biochemistry.* 2011;50(15):3272-3278. doi:10.1021/bi200178z
 103. Koenigs A, Stahl J, Aeverhoff B, et al. CipA of *Acinetobacter baumannii* Is a Novel Plasminogen Binding and Complement Inhibitory Protein. *J Infect Dis.* 2016;213(9):1388-1399. doi:10.1093/infdis/jiv601
 104. Edmondson DG, Dent SY. Identification of protein interactions by far western analysis. *Curr Protoc protein Sci.* 2001;Chapter 19:Unit 19.7. doi:10.1002/0471140864.ps1907s25
 105. Antunes NT, Lamoureaux TL, Toth M, Stewart NK, Frase H, Vakulenko SB. Class

- D β -lactamases: Are they all carbapenemases? *Antimicrob Agents Chemother.* 2014;58(4):2119-2125. doi:10.1128/AAC.02522-13
106. Christopheit T, Albert A, Leiros H-KS. Discovery of a novel covalent non- β -lactam inhibitor of the metallo- β -lactamase NDM-1. *Bioorg Med Chem.* 2016;24(13):2947-2953. doi:10.1016/j.bmc.2016.04.064
 107. Tietgen M, Kramer JS, Brunst S, et al. Identification of the novel class D β -lactamase OXA-679 involved in carbapenem resistance in *Acinetobacter calcoaceticus*. *J Antimicrob Chemother.* 2019;74(6):1494-1502. doi:10.1093/jac/dkz080
 108. Tojo, Naganuma, Arakawa¹, Yokoo¹. Involvement of both granular cells and plasmatocytes in phagocytic reactions in the greater wax moth, *Galleria mellonella*. *J Insect Physiol.* 2000;46(7):1129-1135. doi:10.1016/s0022-1910(99)00223-1
 109. Söderhäll K, Cerenius L. Role of the prophenoloxidase-activating system in invertebrate immunity. *Curr Opin Immunol.* 1998;10(1):23-28. doi:10.1016/s0952-7915(98)80026-5
 110. Kutschenreuter J. Antibiotikaresistenz und Virulenz von OXA 48 produzierenden Gram negativen Bakterien. Published online 2018.
 111. Kramer JS, Woltersdorf S, Duflot T, et al. Discovery of the First in Vivo Active Inhibitors of the Soluble Epoxide Hydrolase Phosphatase Domain. *J Med Chem.* 2019;62(18):8443-8460. doi:10.1021/acs.jmedchem.9b00445
 112. Wu W, Feng Y, Tang G, Qiao F, McNally A, Zong Z. NDM Metallo- β -Lactamases and Their Bacterial Producers in Health Care Settings. *Clin Microbiol Rev.* 2019;32(2):e00115-18. doi:10.1128/CMR.00115-18
 113. Leitlinienprogramm DGU: Interdisziplinäre S3 Leitlinie: Epidemiologie, Diagnostik, Therapie, Prävention und Management unkomplizierter, bakterieller, ambulant erworbener Harnwegsinfektionen bei erwachsenen Patienten. Langversion 1.1-2, 2017 AWMF Registern.
 114. Nordmann P, Poirel L, Walsh TR, Livermore DM. The emerging NDM carbapenemases. *Trends Microbiol.* 2011;19(12):588-595. doi:10.1016/j.tim.2011.09.005
 115. Jander G, Rahme LG, Ausubel FM. Positive correlation between virulence of *Pseudomonas aeruginosa* mutants in mice and insects. *J Bacteriol.* 2000;182(13):3843-3845. doi:10.1128/jb.182.13.3843-3845.2000
 116. Hendrickson EL, Plotnikova J, Mahajan-Miklos S, Rahme LG, Ausubel FM. Differential roles of the *Pseudomonas aeruginosa* PA14 rpoN gene in pathogenicity in plants, nematodes, insects, and mice. *J Bacteriol.*

- 2001;183(24):7126-7134. doi:10.1128/JB.183.24.7126-7134.2001
117. Hoffmann JA. Innate immunity of insects. *Curr Opin Immunol.* 1995;7(1):4-10. doi:10.1016/0952-7915(95)80022-0
 118. Zalucki YM, Jen FE-C, Pegg CL, Nouwens AS, Schulz BL, Jennings MP. Evolution for improved secretion and fitness may be the selective pressures leading to the emergence of two NDM alleles. *Biochem Biophys Res Commun.* 2020;524(3):555-560. doi:10.1016/j.bbrc.2020.01.135
 119. Röttgerding F, Wagemakers A, Koetsveld J, et al. Immune evasion of *Borrelia miyamotoi*: CbiA, a novel outer surface protein exhibiting complement binding and inactivating properties. *Sci Rep.* 2017;7(1):303. doi:10.1038/s41598-017-00412-4
 120. Hammerschmidt C, Klevenhaus Y, Koenigs A, et al. BGA66 and BGA71 facilitate complement resistance of *Borrelia bavariensis* by inhibiting assembly of the membrane attack complex. *Mol Microbiol.* 2016;99(2):407-424. doi:10.1111/mmi.13239
 121. Janssen BJC, Huizinga EG, Raaijmakers HCA, et al. Structures of complement component C3 provide insights into the function and evolution of immunity. *Nature.* 2005;437(7058):505-511. doi:10.1038/nature04005
 122. Rahman M, Shukla SK, Prasad KN, et al. Prevalence and molecular characterisation of New Delhi metallo- β -lactamases NDM-1, NDM-5, NDM-6 and NDM-7 in multidrug-resistant Enterobacteriaceae from India. *Int J Antimicrob Agents.* 2014;44(1):30-37. doi:10.1016/j.ijantimicag.2014.03.003
 123. Khan AU, Maryam L, Zarrilli R. Structure, Genetics and Worldwide Spread of New Delhi Metallo- β -lactamase (NDM): a threat to public health. *BMC Microbiol.* 2017;17(1):1-12. doi:10.1186/s12866-017-1012-8
 124. NRZ-Nationales Referenzzentrum für Surveillance von nosokomialen Infektionen. *Deutsche Nationale Punkt-Prävalenzerhebung Zu Nosokomialen Infektionen Und Antibiotika-Anwendung* 2016.; 2016. http://www.nrz-hygiene.de/fileadmin/nrz/download/pps2016/PPS_2016_Abschlussbericht_20.07.2017.pdf
 125. Marshall S, Hujer AM, Rojas LJ, et al. Can Ceftazidime-Avibactam and Aztreonam Overcome β -Lactam Resistance Conferred by Metallo- β -Lactamases in Enterobacteriaceae? *Antimicrob Agents Chemother.* 2017;61(4). doi:10.1128/AAC.02243-16
 126. Hu Y, Coates A. Zidovudine enhances activity of carbapenems against NDM-1-producing Enterobacteriaceae. *J Antimicrob Chemother.* 2021;76(9):2302-2305. doi:10.1093/jac/dkab184
 127. Ma T, Fu J, Xie N, et al. Fitness Cost of *bla*_{NDM-5}-Carrying p3R-IncX3 Plasmids in

- Wild-Type NDM-Free Enterobacteriaceae. *Microorganisms*. 2020;8(3):377. doi:10.3390/microorganisms8030377
128. Proschak A, Kramer J, Proschak E, Wichelhaus TA. Bacterial zincophore [S,S]-ethylenediamine-N,N'-disuccinic acid is an effective inhibitor of MBLs. *J Antimicrob Chemother*. 2018;73(2):425-430. doi:10.1093/jac/dkx403
 129. Tietgen M, Leukert L, Sommer J, et al. Characterization of the novel OXA-213-like β -lactamase OXA-822 from *Acinetobacter calcoaceticus*. *J Antimicrob Chemother*. 2021;76(3):626-634. doi:10.1093/jac/dkaa488
 130. Lambris JD, Ricklin D, Geisbrecht B V. Complement evasion by human pathogens. *Nat Rev Microbiol*. 2008;6(2):132-142. doi:10.1038/nrmicro1824
 131. Skare JT, Garcia BL. Complement Evasion by Lyme Disease Spirochetes. *Trends Microbiol*. 2020;28(11):889-899. doi:10.1016/j.tim.2020.05.004
 132. Rooijackers SHM, van Strijp JAG. Bacterial complement evasion. *Mol Immunol*. 2007;44(1-3):23-32. doi:10.1016/j.molimm.2006.06.011
 133. Jongerius I, Köhl J, Pandey MK, et al. Staphylococcal complement evasion by various convertase-blocking molecules. *J Exp Med*. 2007;204(10):2461-2471. doi:10.1084/jem.20070818
 134. Rooijackers SHM, van Kessel KPM, van Strijp JAG. Staphylococcal innate immune evasion. *Trends Microbiol*. 2005;13(12):596-601. doi:10.1016/j.tim.2005.10.002
 135. Burman JD, Leung E, Atkins KL, et al. Interaction of human complement with Sbi, a staphylococcal immunoglobulin-binding protein: indications of a novel mechanism of complement evasion by *Staphylococcus aureus*. *J Biol Chem*. 2008;283(25):17579-17593. doi:10.1074/jbc.M800265200
 136. Jarva H, Ram S, Vogel U, Blom AM, Meri S. Binding of the complement inhibitor C4bp to serogroup B *Neisseria meningitidis*. *J Immunol*. 2005;174(10):6299-6307. doi:10.4049/jimmunol.174.10.6299
 137. Hovingh ES, van den Broek B, Jongerius I. Hijacking complement regulatory proteins for bacterial immune evasion. *Front Microbiol*. 2016;7(DEC):1-20. doi:10.3389/fmicb.2016.02004
 138. Daume T. Analyse der Bindung von Komplementregulatoren an Biofilm von *Acinetobacter baumannii* und Komplement-inaktivierende Aktivität verschiedener Carbapenemasen. Published online 2016.
 139. Avirutnan P, Fuchs A, Hauhart RE, et al. Antagonism of the complement component C4 by flavivirus nonstructural protein NS1. *J Exp Med*. 2010;207(4):793-806. doi:10.1084/jem.20092545
 140. González LJ, Bahr G, Nakashige TG, Nolan EM, Bonomo RA, Vila AJ. Membrane

- anchoring stabilizes and favors secretion of New Delhi metallo- β -lactamase. *Nat Chem Biol.* 2016;12(7):516-522. doi:10.1038/nchembio.2083
141. Skurnik D, Roux D, Pons S, et al. Extended-spectrum antibodies protective against carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *J Antimicrob Chemother.* 2016;71(4):927-935. doi:10.1093/jac/dkv448

9 Schriftliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Medizin der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main zur Promotionsprüfung eingereichte Dissertation mit dem Titel

Untersuchungen zur Virulenz und Interaktion der Metallo- β -Laktamase NDM mit dem humanen Komplementsystem

in dem Institut für Medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene unter Betreuung und Anleitung von Prof. Dr. phil. nat. Peter Kraiczy mit Unterstützung durch Dr. rer. physiol. Dr. med. Stephan Göttig ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe. Darüber hinaus versichere ich, nicht die Hilfe einer kommerziellen Promotionsvermittlung in Anspruch genommen zu haben.

Vorliegende Ergebnisse der Arbeit wurden (oder werden) in folgendem Publikationsorgan veröffentlicht:

[Auflistung aller Autoren der Reihenfolge nach, Titel, Zeitschrift, Band, Seite, Veröffentlichungsjahr]

Fulda, 13.10.2021

(Ort, Datum)

(Unterschrift)

*) im Falle des Nichtzutreffens entfernen

10 Lebenslauf

*14.02.1994 in Fulda
Von-Schildeck-Straße 19
36043 Fulda
Tel.: 015750983002
neidert.larissa@gmail.com



- Studium**
- 10/2014-05/2021
Johann-Wolfgang von Goethe Universität Frankfurt
Studium der Humanmedizin
1. Staatsexamen 08/2016, Note 1,5
2. Staatsexamen 04/2020, Note 3
3. Staatsexamen 05/2021, Note 2
- Promotion**
- Seit 04/2018
„Untersuchungen zur Virulenz und Interaktion der Metallo- β -Laktamase NDM mit dem humanen Komplementsystem“
Institut für Medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene, Frankfurt
Doktorvater: Prof. Dr. phil. nat. Peter Kraiczy
Betreuer: Dr. rer. physiol. Dr. med. Stephan Göttig
- Stipendien**
- Seit 2016
2018
Stipendium der Gesundheitswirtschaft Osthessen
Promotionsstipendium der Universität Frankfurt
- Klinische Erfahrung**
- 01-04/2021
PJ Chirurgie GZO Spital Wetzikon, Schweiz
09-12/2020
PJ Infektiologie (Innere Medizin) Universitätsklinikum Frankfurt
05-09/2020
PJ Neurologie Universitätsklinikum Frankfurt
10/2019
Famulatur Praxis Dr. Schivelbusch, Niederdorfelden
01/2019
Famulatur Anästhesie, MK-Kliniken, Gelnhausen
02/2018
Famulatur Infektiologie Klinikum St. Georg, Leipzig
10/2017
Famulatur Pädiatrie, Praxis Dr. Wahl, Frankfurt-Höchst

Sprachkenntnisse

Muttersprache: Deutsch

Englisch (fließend)

Französisch (fließend, B1 Unicert 2020)

Praktika und Nebenerwerbstätigkeiten

2016-2020

Werksstudentin Radiologie der Asklepios Klinik Langen

2017

Tutor für Kurse der Neuroanatomie bei Prof. Maronde

2013-2014

Freiwilliges Soziales Jahr, Klinikum Fulda

Schulbildung

2004-2013

Domgymnasium, Fulda

Abitur 2013

Fulda, 13.10.2021

Danksagung

Zum Schluss möchte ich mich nochmal bei den großartigen Menschen bedanken, die mir stets mit Rat und Tat zur Seite standen.

Mein erster Dank gilt Prof. Dr. Volkhard Kempf, an dessen Institut ich die wissenschaftliche Tätigkeit ausüben durfte. Außerdem meinen wunderbaren Betreuern Prof. Dr. Peter Kraiczy und Dr. Dr. Stephan Göttig, die mich in unzähligen Gesprächen und Korrekturlesungen in meinem Eifer unterstützten und immer ein offenes Ohr hatten. Obwohl unglaublich viel zu tun war, konnte ich mich immer an euch wenden.

Natürlich danke ich auch der unglaublichen Dr. Manuela Tietgen. Du bist für mich ein wahres Vorbild geworden, und hast in mir die Liebe zur Forschung geweckt. Ich kann mit Worten nicht ausdrücken, welch großen Anteil du an dieser Arbeit hast!

Dann möchte ich meinen Lieblingskollegen aus dem Labor danken, Julia Kutschenreuter und Felix Krause für die heitere und schöne Stimmung im Labor, auch wenn sonst alles schief lief. Julia, ich danke dir auch für das Lesen meiner kompletten Arbeit, einfach so nebenbei und die großartigen Anmerkungen. Ebenso möchte ich Steffen Brunst und Jan Kramer danken sowie Prof. Dr. Proschak für die liebevolle Umsetzung meiner verrückten Projekte und all eure Mühen.

Danke auch an Florian Röttgerding, Denia Frank, Marko Weidensdorfer, Kristina Gerbracht, Marie Hess und Tim Berg, die alle meine Zeit im Labor zu etwas ganz Besonderem gemacht haben. Ich habe so viel von euch lernen dürfen.

Außerdem möchte ich mich bei Kirsten bedanken für die Unterstützung und die sorgfältige Prüfung auf Rechtschreibung.

Außerdem geht ein großer Dank an Korbinian Dege, der ständig meine Launen aushalten musste und immer für mich da ist, genau wie meine Freundin Sabrina Lautner und meine Schwester Paulina. Zu guter Letzt an meine lieben Eltern, die mich bei allem, was ich tue, bedingungslos unterstützen.