

## Entfernung von $\beta$ -Lactam- und Makrolid-Antibiotika aus Wässern mit Hilfe von gentechnisch modifizierten *Saccharomyces cerevisiae*-Zellen

Antibiotika sind für die Behandlung von bakteriellen Infektionskrankheiten unerlässlich und daher für die Human- und Veterinärmedizin von außerordentlicher Bedeutung. Vor diesem Hintergrund stellt die Ausbreitung von antibiotikaresistenten Pathogenen eine globale Herausforderung dar. Da die Präsenz der Wirkstoffe in der Umwelt Resistenzentwicklungen begünstigen kann, besteht ein wichtiger Ansatz zur Vermeidung der Ausbreitung solcher Resistenzen in der möglichst weitgehenden Entfernung von Antibiotikarückständen aus dem Wasserkreislauf. Da konventionelle Kläranlagen dieser Anforderung bisher nicht genügen, besteht Bedarf an innovativen Technologien. An diese Zielstellung anknüpfend, sollte im Rahmen eines Verbundprojektes auf der Basis von Hefen, die selbst keinen Selektionsdruck zur Entwicklung von Resistenzen unterliegen, ein biologisches Verfahren zur gezielten Eliminierung von Antibiotika aus kontaminierten Wässern entwickelt werden. Projektpartner am Institut für Genetik der TU Dresden stellten hierfür gentechnisch modifizierte *Saccharomyces cerevisiae*-Zellen zur Verfügung, welche entsprechende Enzyme produzieren und sezernieren sollten. Das Ziel der vorliegenden Arbeit bestand darin, zu untersuchen, inwiefern diese rekombinanten Enzyme zur Transformation von verschiedenen Antibiotika in Wässern eingesetzt werden können und welchen Einfluss ausgewählte Randparameter darauf ausüben.

Zur Verfolgung der Antibiotika-Umsetzung im umweltrelevanten Konzentrationsbereich wurde eine sensitive LC-MS/MS-Methode entwickelt und fortlaufend an veränderte Bedingungen, welche das Antibiotikaspektrum, das Enzymsystem und Matrixeinflüsse umfassen, angepasst.

Um die grundsätzliche Eignung der Enzyme zur Transformation von Antibiotika nachzuweisen, wurde eine Versuchsvorschrift erarbeitet, die eine gezielte Inhibierung der Enzyme nach definierten Zeitintervallen beinhaltet.

Die zur Sekretion der Enzyme eingesetzten Signalsequenzen HSP150 und MF $\alpha$  eignen sich prinzipiell beide zum Transport und zum Ausschleusen der aktiven  $\beta$ -Lactamasen TEM-1 und TEM-8 aus den exprimierenden Zellen, wobei mit der Signalsequenz HSP150 deutlich schnellere Umsätze registriert worden sind. Die gewonnenen enzymhaltigen Kulturüberstände konnten direkt zur Umsetzung von Antibiotika herangezogen werden. Untersuchungen mit verschiedenen  $\beta$ -Lactam-Antibiotika ergaben in Übereinstimmung mit der Literatur, dass die rekombinante TEM-1 in der Lage ist, Penicilline und Cephalosporine der 1. Generation, nicht aber höhere Cephalosporine, umzusetzen.

Da sich das zu entfernende Antibiotikaspektrum in aufzuarbeitendem Abwasser ändern kann, wurde am Beispiel der TEM-8 untersucht, inwiefern das biologische Verfahren durch den Einsatz anderer Lactamase-Varianten auf ein erweitertes Substratspektrum übertragbar ist. Das für die TEM-1 erfolgreich etablierte Expressionssystem führte bei TEM-8-exprimierenden Zellen allerdings zu einer irreversiblen Inaktivierung des Enzyms. Durch einen Wechsel zu einem nährstoffreicheren und gepufferten Kulturmedium konnte die infolge von Stoffwechselaktivitäten im Verlauf der Kultivierung stattfindende pH-Wert-Absenkung des Mediums vermieden und somit aktive TEM-8

gewonnen werden. Die Änderung der Kultivierungsbedingungen führte zu einer deutlichen Steigerung der Zellzahl und damit einhergehend zu einer Erhöhung der Transformationsgeschwindigkeit. Die TEM-8 hydrolysierte neben den mittels TEM-1 umgesetzten  $\beta$ -Lactam-Antibiotika auch höhere Cephalosporine bis zur 4. Generation sowie ein Monobactam, wodurch das erweiterte Wirkspektrum dieses Enzyms demonstriert werden konnte.

Voraussetzung für eine praktische Anwendung des Systems sind genaue Kenntnisse zur enzymatischen Aktivität, die auf der Basis umfangreicher Versuchsreihen durch systematische Variation von Einflussfaktoren gewonnen werden konnten. In diesem Zusammenhang ist allerdings der Einsatz von enzymhaltigen Kulturüberständen problematisch, da, bedingt durch unvermeidbare Unterschiede in den Zell- und Plasmidzahlen, die Enzymmenge und damit die Umsatzgeschwindigkeit variiert. Zudem begrenzte die Menge an zur Verfügung stehendem, enzymhaltigem Kulturüberstand den Umfang der möglichen Versuchsreihen. Daher wurde eine mittels Histidin-*tag* gereinigte TEM-1  $\beta$ -Lactamase eingesetzt, um unter vergleichbaren Bedingungen und unbeeinflusst von der Matrix des Kulturüberstandes systematisch den Einfluss verschiedener Faktoren auf die enzymatische Aktivität untersuchen zu können.

Die  $\beta$ -Lactamase TEM-1-His war hierbei in einem weiten pH-Bereich von pH 4 bis pH 9 aktiv. Die systematische Variation verschiedener Puffer, der Pufferkonzentration und der Temperatur ergaben einen vergleichsweise geringen Einfluss auf die enzymatische Aktivität. Größere Aktivitätsunterschiede waren in Abhängigkeit von dem eingesetzten  $\beta$ -Lactam-Antibiotikum festzustellen. Während die Penicilline Ampicillin, Amoxicillin, Penicillin G und Piperacillin zügig umgesetzt wurden, verlief die Reaktion des Isoxazolympenicillins Oxacillin deutlich langsamer. Das zur gleichen Gruppe zählende Cloxacillin und das Cephalosporin Cephalothin (1. Generation) wurden hingegen praktisch nicht transformiert. Die Änderung der Substrataffinität gegenüber Cloxacillin und Cephalothin im Vergleich zu den Versuchen mit enzymhaltigem Kulturüberstand (TEM-1, ohne His-*tag*) ist wahrscheinlich auf den angefügten Histidin-*tag* zurückzuführen. Für einen praktischen Einsatz wird die Anwendung von gereinigtem Enzym daher nicht forciert.

Unter Einsatz von noch sensitiverer LC-MS/MS-Technik mit einer Ampicillin-Nachweisgrenze von 3 pM, wurde die  $\beta$ -Lactam-Antibiotika-Konzentration im Bereich von 1 nM bis 100  $\mu$ M variiert. Mit diesen Versuchsreihen konnte die Eignung des Enzyms zur Entfernung von Antibiotika im umweltrelevanten Konzentrationsbereich erfolgreich demonstriert werden, da bei allen Experimenten nach einem Zeitraum von 24 h kein AMP mehr nachweisbar war.

Die Übertragung der Versuche von Modellwässern auf Realwässer ergab, dass die TEM-1-His, zumindest temporär, auch in Kläranlagenzu- und -ablauf aktiv ist, wobei die Aktivität mit zunehmender Expositionsdauer und Komplexität der Wassermatrix abnahm.

Aus den im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Einflussfaktoren lassen sich die optimalen Reaktionsbedingungen ableiten. Die höchste Reaktionsgeschwindigkeit ist demnach bei der Umsetzung in 0,1 M Kaliumphosphatpuffer im pH-Bereich zwischen pH 6 bis pH 7, bei einer Temperatur von 21 bis 30 °C und möglichst hohen Antibiotikakonzentrationen zu erwarten. Letzteres folgt aus der ermittelten Michaelis-Menten-Konstante von 224  $\mu$ M (für die AMP-

Umsetzung mittels TEM-1-His), welche zeigt, dass die in der Umwelt zu erwartenden Konzentrationen stets deutlich unter  $K_m$  liegen werden und daher die enzymatische Aktivität von höheren Antibiotika-Konzentrationen profitieren wird. Die nachgewiesene Aktivität (ca. 50 % im Vergleich zum Kaliumphosphatpuffer) der TEM-1 auch in Kläranlagenzulauf als besonders anspruchsvoller Matrix unterstreicht die Stabilität des Enzyms für den praktischen Einsatz.

Die prinzipielle Übertragbarkeit dieses Verfahrens auf andere Enzyme zur Eliminierung weiterer Antibiotikaklassen wurde am Beispiel der Makrolid-Antibiotika gezeigt, indem Esterase Ere-A-produzierende Zellen zur Hydrolyse von Erythromycin und Clarithromycin eingesetzt wurden. Im Unterschied zu den  $\beta$ -Lactamasen konnten für dieses Enzym eine Sezernierung bisher nicht erreicht werden, sodass zunächst ein Zellaufschluss zur Gewinnung des enzymhaltigen Rohextraktes nötig war. Ein angefügter His-tag verringerte auch in diesem Fall die Geschwindigkeit der enzymatischen Reaktion. Die Variation der Puffersysteme beeinflusste die Reaktionsgeschwindigkeit, wobei die höchste Aktivität in Gegenwart von 2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure-Puffer erzielt wurde.

Zur näheren Charakterisierung der Umsetzung erfolgte eine Analyse der gebildeten Transformationsprodukte. Bei beiden betrachteten enzymatischen Transformationen geht die antibakterielle Wirkung jeweils durch die hydrolytische Spaltung des  $\beta$ -Lactam- bzw. des Makrolid-Ringes irreversibel verloren. Bei Makroliden führt die Spaltung der Esterbindung zur Inaktivierung und Linearisierung des Moleküls, woran sich weitere Dehydratations- und Umlagerungsreaktionen anschließen. Die Reaktion mit  $\beta$ -Lactamasen führt unabhängig von dem verwendeten Enzym, TEM-1 oder TEM-8, zu identischen Produkten, welche gleichsam den Hauptprodukten der abiotischen Hydrolyse in der aquatischen Umwelt entsprechen.

Die Ergebnisse zeigen, dass dieses biologische Verfahren auf der Basis von gentechnisch veränderten Hefen prinzipiell zur Inaktivierung von Antibiotika herangezogen werden kann. Dabei kann durch die Wahl des Enzyms das umsetzbare Antibiotikaspektrum gezielt variiert und auch um andere Antibiotikaklassen erweitert werden.

Als biologisches Verfahren zeichnet sich der untersuchte enzymatische Ansatz durch einen geringen Energie- und Chemikalienbedarf aus, und ist somit potentiell umweltfreundlich, kostengünstig und nachhaltig. Prinzipiell ist festzustellen, dass die eingesetzte biologische Methode im Labormaßstab vielversprechende Ergebnisse zur Eliminierung von ausgewählten Antibiotika lieferte. Die erhebliche Beschleunigung der natürlicherweise ablaufenden Umsetzungsprozesse der Antibiotika zu biologisch nicht oder wesentlich weniger aktiven Verbindungen stellt den größten Vorteil der enzymatischen Umsetzung dar. Somit wird der Zeitraum, in dem die Antibiotika potentiell eine unerwünschte Wirkung auf Mikroorganismen ausüben und in diesem Zusammenhang die Beibehaltung und Verbreitung von Resistenzgenen fördern können, drastisch verkürzt. Im Vergleich zu anderen Verfahren werden nur wenige, definierte Transformationsprodukte gebildet.

*Entfernung von  $\beta$ -Lactam- und Makrolid-Antibiotika aus Wässern mit Hilfe von gentechnisch modifizierten *Saccharomyces cerevisiae*-Zellen, Dissertation von Linda Schuster,*

*Betreuer: Prof. Dr. Eckhard Worch, Institut für Wasserchemie, Technische Universität Dresden,  
kostenloser Download: <https://nbn-resolving.org/urn:nbn:de:bsz:14-qucosa2-730964>*