

Aus dem Department für Diagnostische Labormedizin der
Universität Tübingen

Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene

**Die Bedeutung der Proteine BamC, HlpA, DsbB, DsbH
und DsbA1 für die Integrität der Außenmembran von
*Pseudomonas aeruginosa***

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen

vorgelegt von

Frank, Lisa Lucie

2020

Dekan:	Professor Dr. B. Pichler
1. Berichterstatter:	Privatdozent Dr. E. Bohn
2. Berichterstatter:	Professor Dr. F. Stubenrauch
Tag der Disputation:	03.05.2019

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis.....	I
Tabellenverzeichnis.....	III
Abkürzungsverzeichnis	V
1 Einleitung.....	1
1.1 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1
1.1.1 <i>Pa</i> im klinischen Kontext.....	2
1.1.2 Pathomechanismen und Virulenzfaktoren	4
1.1.3 Antibiotikaresistenzen	7
1.2 Außenmembranbiogenese gramnegativer Bakterien.....	11
1.2.1 BamC als Teil des BAM-Komplexes	12
1.2.2 Periplasmatische Chaperone.....	14
1.2.3 Bildung von Disulfidbrückenbindungen	16
1.3 Zielsetzung.....	18
2 Material und Methoden.....	20
2.1 Material	20
2.1.1 Geräte.....	20
2.1.2 Verbrauchsmaterialien	21
2.1.3 Chemikalien	22
2.1.4 Puffer	23
2.1.5 Enzyme und Reagenzien.....	23
2.1.6 Antibiotika	24
2.1.7 Nährmedien	24
2.1.8 Bakterienstämme.....	25
2.1.9 Plasmide	26
2.1.10 Oligonukleotide	28

2.1.11 Kommerzielle Kits	31
2.1.12 Software.....	31
2.2 Mikrobiologische Methoden	31
2.2.1. Anzucht der Bakterien.....	31
2.2.2 Kryokulturen für die Bakterienstammsammlung	32
2.2.3 Photometrische Bestimmung der Bakterienzahl	32
2.2.4 Testung auf Antibiotikasensitivität.....	32
2.2.5 Bile Salt Assay	33
2.2.6 Serum Killing Assay	34
2.2.7 Herstellung chemisch kompetenter <i>E. coli</i> SM10 λ pir	35
2.3 Molekularbiologische Methoden.....	36
2.3.1 Plasmid-Isolation.....	36
2.3.2 Isolation genomischer DNA (gDNA).....	36
2.3.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	36
2.3.3.1 PCR mit KOD Polymerase.....	37
2.3.3.2 PCR mit Taq-Polymerase	38
2.3.4 Kolonie-PCR	38
2.3.5 Agarose-Gelelektrophorese	39
2.3.6 Aufreinigung der PCR-Produkte	39
2.3.7 Transformation in chemisch kompetente Zellen	39
2.3.8 Gibson-Klonierung	40
2.3.9 Allel-Austausch	42
3 Ergebnisse	45
3.1 Mutagenese	45
3.1.1 Fragmentsynthese für die Gibson-Klonierung.....	45
3.1.2 Zusammenbau nach Gibson und Transformation.....	51

3.1.3 Allel-Austausch	56
3.1.4 Erneute Überprüfung mittels PCR.....	61
3.2 Prüfung der Auswirkungen der Knock-outs auf die Integrität der AM.....	66
3.2.1 Antibiotika-Sensitivität.....	66
3.2.2 Widerstandsfähigkeit gegenüber Gallensalzen	69
3.2.3 Testung mit Humanserum.....	72
4 Diskussion	75
4.1 Einfluss der K.O.-Mutationen auf die AB-Sensitivität	76
4.2 BamC als potentiell Target	77
4.3 HlpA als potentiell Target	82
4.4 DsbB, DsbH und DsbA1 als potentielle Targets.....	85
4.5 Weitere Ansätze und Ausblick.....	86
5 Zusammenfassung.....	89
6 Literaturverzeichnis	91
7 Anhang.....	104
7.1 Plasmidkarten	104
7.2 Rohdaten der AB-Sensitivitätstestung.....	110
7.3 Wachstumskurven und Rohdaten der Experimente mit BS	113
7.4 Rohdaten des Serum Killing Assays	119
8 Erklärungen zum Eigenanteil.....	121
9 Danksagung	122

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Aufbau einer RND-Pumpe in <i>Pa</i>	9
Abbildung 2: AMP-Biogenese in <i>Pa</i>	12
Abbildung 3: Disulfidbrückenbildung durch Oxidation im Periplasma von <i>E. coli</i>	17
Abbildung 4: Schematischer Versuchsaufbau des Bile Salt Assays auf 24-Well-Platten.	34
Abbildung 5: Grundprinzip der Gibson-Reaktion.	41
Abbildung 6: Schematische Übersicht zum Allel-Austausch.....	44
Abbildung 7: Primer-Bindungsstellen und grundlegendes Prinzip der Synthese der Gibson-Fragmente zur Erstellung von K.O.-Vektoren.	46
Abbildung 8: Längenanalyse der PCR-Produkte zur Fragmentsynthese für die Gibson-Klonierung.	51
Abbildung 9: Bindungsstellen der Sequenzierprimer bei der Kolonie-PCR zur Überprüfung der Gibson-Reaktion und Transformation in <i>E. coli</i>	52
Abbildung 10: Längenanalyse der PCR-Produkte verschiedener Kolonie-PCRs nach Transformation der Plasmide in <i>E. coli</i> DH5a.	54
Abbildung 11: Längenanalyse der PCR-Produkte aus der Kolonie-PCR nach Transformation der Plasmide in <i>E. coli</i> SM10 λ pir.....	56
Abbildung 12: Prinzip des Allel-Austauschs.	58
Abbildung 13: Bindungsstellen der genspezifischen Sequenzierprimer bei der Kolonie-PCR zur Überprüfung des Allel-Austauschs.....	59
Abbildung 14: Längenanalyse der Kolonie-PCR zur Sichtung von Mutanten nach dem Allel-Austausch.	61
Abbildung 15: Bindungsstellen der Primer bei der Verifizierung der Mutanten durch PCR.....	63
Abbildung 16: Längenanalyse der Proof-PCR zur Überprüfung der Mutanten.....	65
Abbildung 17: Agar-Diffusionstest.....	68
Abbildung 18: Statistische Auswertung der Wachstumshemmung in Anwesenheit von Gallensalzen.	71

Abbildung 19: Überleben in Humanserum – Versuch 1.....	73
Abbildung 20: Plasmidkarte des pEXG2-Vektors	104
Abbildung 21: Plasmidkarte des pEXG2-Vektors mit <i>bamC</i> -K.O.-Kassette	105
Abbildung 22: Plasmidkarte des pEXG2-Vektors mit <i>hlpA</i> -K.O.-Kassette	106
Abbildung 23: Plasmidkarte des pEXG2-Vektors mit <i>dsbB</i> -K.O.-Kassette	107
Abbildung 24: Plasmidkarte des pEXG2-Vektors mit <i>dsbH</i> -K.O.-Kassette	108
Abbildung 25: Plasmidkarte des pEXG2-Vektors mit <i>dsbA1</i> -K.O.-Kassette	109
Abbildung 26: Wachstumskurve der K.O.-Stämme in LB und LB + 0,3 % Gallensalze.	113
Abbildung 27: Wachstumskurve der Tn-Stämme in LB und LB + 0,3 % Gallensalze.	114
Abbildung 28: Überleben in Humanserum – Versuch 2.....	119

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Geräte	20
Tabelle 2: Verwendete Verbrauchsmaterialien	21
Tabelle 3: Verwendete Chemikalien.....	22
Tabelle 4: Verwendete Puffer.....	23
Tabelle 5: Verwendete Enzyme und Reagenzien.....	23
Tabelle 6: Für Flüssigkulturen und Nährbodenplatten verwendete Antibiotika	24
Tabelle 7: Verwendete Antibiotikaplättchen zur Testung auf Antibiotika-Sensitivität ...	24
Tabelle 8: Verwendete Nährmedien.....	24
Tabelle 9: Verwendete Bakterienstämme.....	25
Tabelle 10: Verwendete Plasmide.....	26
Tabelle 11: Primer zur Konstruktion der Knock-out-Vektoren.....	28
Tabelle 12: Primer zur Überprüfung der Deletionen	29
Tabelle 13: Verwendete Kits von kommerziellen Unternehmen	31
Tabelle 14: Verwendete Software	31
Tabelle 15: Antibiotikakonzentration im Nährmedium.....	32
Tabelle 16: Zusammensetzung der Reaktionsansätze bei der PCR mit KOD Polymerase.....	37
Tabelle 17: PCR-Programm bei der PCR mit KOD Polymerase.....	37
Tabelle 18: Zusammensetzung der Reaktionsansätze bei der PCR mit Taq- Polymerase.....	38
Tabelle 19: PCR-Programm bei der PCR mit Taq-Polymerase	38
Tabelle 20: Größe, DNA- und Aminosäuresequenzen der verkürzten Gene	46
Tabelle 21: Primerpaare zur Fragmentsynthese für den K.O.-Vektor und Größe der Gibson-Fragmente	47
Tabelle 22: Verwendete Sequenzen zur Erstellung der K.O.-Vektoren und Primer	49
Tabelle 23: Größe der PCR-Fragmente nach der Transformation in <i>E. coli</i>	52

Tabelle 24: Primerpaare und Größe der Fragmente zur Überprüfung des Allel- Austauschs mittels Kolonie-PCR.....	59
Tabelle 25: Verwendete Primerpaare und Größe der Fragmente bei der Proof-PCR..	62
Tabelle 26: Durchschnittlicher Hemmhofdurchmesser und errechnete Standard- abweichungen des AB-Sensitivitäts-Tests.	68
Tabelle 27: Rohdaten der AB-Sensitivitätstestung.	110
Tabelle 28: OD ₆₀₀ nach 8 h Wachstum in LB bzw. LB + 0,3 % BS	115
Tabelle 29: Mittlere OD ₆₀₀ und Wachstumshemmung nach 8 h.....	118
Tabelle 30: Bakterienzahl und prozentuales Überleben – Versuch 1	119
Tabelle 31: Bakterienzahl und prozentuales Überleben – Versuch 2	119

Abkürzungsverzeichnis

AB	Antibiotika
AM	Außenmembran
AMP	Außenmembranprotein
Aqua dest.	Destilliertes Wasser
BAM	β-Barrel Assembly Machinery
BHI	Brain Heart Infusion broth
bp	Basenpaare
BS	Bile Salts (Gallensalze)
GIT	Gastrointestinaltrakt
dNTPs	Desoxyribonukleosidtriphosphate
gDNA	Genomische DNA
HIS	Hitzeinaktiviertes Serum
IM	Innenmembran
K.O.	Knock-out
LB	Lysogeny Broth
LPS	Lipopolysaccharide
NHS	Normales Human-Serum
OD	Optische Dichte
<i>Pa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
POTRA	Polypeptidtransport-assoziiert
PPIase	Peptidyl-Prolyl-Isomerase
QS	Quorum Sensing
RND	Resistance-Nodulation-Division
SD	Standardabweichung
SOC	Super optimal broth with catabolite repression
T3SS	Typ-III-Sekretionssystem
TBE	TRIS-Borat-EDTA
Tn	Transposon

ÜN

Über Nacht

WT

Wildtyp PA14

ΔΔ

Δ*dsbB*Δ*dsbH*-Doppel-K.O.-Mutante

1 Einleitung

1.1 *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa (*Pa*) ist ein gramnegatives Bakterium. Das fakultativ anaerobe Stäbchen gehört zu der Gruppe der Nonfermenter und ist durch eine polare Geißel zu Bewegung befähigt. Der Name verweist auf die grünspanartige Verfärbung der Wundverbände bei einer Infektion mit *Pa*. Ebenso bildet der Erreger in Flüssigkultur das blaugrüne Phenacinderivat Pyocyanin, welches spezifisch für seine Spezies ist (Frank und Demoss 1959).

Pa ist ein typischer Nass- und Pfützenkeim, findet sich aber dank seiner großen Umweltpersistenz auch in jedem anderen Milieu wieder. Der opportunistische Krankheitserreger ist in der Lage, nahezu jedes Gewebe zu infizieren und spielt vor allem in Form von nosokomialen Infektionen eine Rolle. Hiervon sind besonders Patienten mit supprimiertem Immunsystem betroffen (Lyczak et al. 2000).

Das Bakterium kann auf ein großes Repertoire an Virulenzfaktoren zurückgreifen. Dies ermöglicht *Pa* verschiedenste Nischen effizient zu kolonisieren, diverse Nährstoffe als Energiequellen zu nutzen und sich erfolgreich gegen das Immunsystem des Wirts zu verteidigen (Gellatly und Hancock 2013). Die Pathogenese einer Infektion hängt von der jeweiligen Lokalisation und dem Dispositionsrisiko ab und ist äußerst komplex. Die unterschiedlichen Pathomechanismen werden in Kapitel 1.1.2 erläutert.

Pa kann den Gastrointestinaltrakt (GIT) des Menschen kolonisieren. Im Vergleich zur normalen Bevölkerung konnte dies bei Krankenhauspatienten häufiger beobachtet werden, was die Rolle des Keims als nosokomialer Erreger unterstreicht (Stoodley und Thom 1970). Die Patienten werden meist antibiotisch behandelt, beispielsweise als Standardmaßnahme nach Operationen. Durch die Antibiotika (AB) wird das natürliche Mikrobiom des Menschen reduziert und verändert, was wiederum die Kolonisierung und das Wachstum von *Pa* im GIT ermöglicht und fördert (von Klitzing et al. 2017a). Von dort aus kann sich das Bakterium verbreiten und lebensbedrohliche Sepsen auslösen (Markou und Apidianakis 2014). Besonders prädisponiert sind Personen mit

geschädigter Barrierefunktion der Darmmukosa (Wang et al. 2007, Kerckhoffs et al. 2011, von Klitzing et al. 2017b).

Mit etwa 6,3 Millionen Basenpaaren (bp) besitzt *Pa* ein außergewöhnlich großes Genom (Stover et al. 2000). Das Genom des ebenfalls gramnegativen Bakteriums *Escherichia coli* besteht dagegen nur aus ca. 4,6 Millionen bp (Blattner et al. 1997). Dieser Umstand macht *Pa* zu einem sehr anpassungsfähigen Keim, der dem Selektionsdruck durch AB standhalten kann, indem er in kurzer Zeit Resistenzen entwickelt (Drusano et al. 2015a, Drusano et al. 2015b). Neben den adaptiven Resistenzmechanismen besitzt *Pa* intrinsische Resistenzen, die sich gegen viele verschiedene AB-Klassen richten (Lister et al. 2009). Zusätzlich kann fehlende AB-Suszeptibilität auch durch Mutationen oder durch Übertragungen von anderen Bakterien erworben werden. Eine detaillierte Betrachtung der Resistenzen ist im Abschnitt 1.1.3 zu finden.

1.1.1 *Pa* im klinischen Kontext

Da *Pa* häufig über multiple Resistenzen verfügt und zudem in der Lage ist, auf beinahe allen Oberflächen zu wachsen (Lambert 2002), ist der Keim vor allem in Krankenhäusern ein Problem. Obwohl er auch in Natur und Gesellschaft weit verbreitet ist, sind es überwiegend nosokomial erworbene Infektionen, die zu ernsthaften Erkrankungen führen. Am häufigsten finden sich die *Pa*-Reservoirs an feuchten Stellen im Krankenhaus, wie in Waschbecken, Pools der Physiotherapie, Beatmungsgeräten und sogar in Desinfektionsmittel und Seife (Lister et al. 2009).

Beinahe alle Patienten, die von Infektionen mit *Pa* betroffen sind, leiden an einer Immunschwäche. Die Ursache dafür reicht von AIDS/HIV über Tumorpatienten mit Neutropenie nach Chemotherapie bis hin zu Patienten nach Organtransplantation, deren Immunsystem medikamentös supprimiert wird (Bendig et al. 1987, Franzetti et al. 1992, Lyczak et al. 2000). Meist sind bestehende Verletzungen der natürlichen Hautbarriere Eintrittspforte für den Erreger: Operationswunden, Urindauerkatheter, künstliche Beatmung (Lister et al. 2009) oder schwerer Verbrennungen (Lyczak et al. 2000). Neben lokalen

Entzündungen kann *Pa* auch in die Blutbahn gelangen und zu einer lebensbedrohlichen Sepsis führen.

Pa zählt zu den häufigsten Erregern nosokomialer respiratorischer Infektionen (Sadikot et al. 2005). Man kann hierbei zwischen akut und chronisch differenzieren. Akute Infektionen entstehen häufig in Folge eines direkten Traumas, zum Beispiel bei der Intubation. Der Endotrachealtubus führt nicht nur beim Einführen zu einer Schädigung des Epithels, sondern dient bei maschinell beatmeten Patienten auch selbst als Reservoir für *Pa* (Williams et al. 2010). Chronische Infektionen der Atemwege entstehen, wenn keine effektive Immunantwort möglich ist und betreffen deshalb, neben oben genannten Patienten mit Immunschwäche, vor allem alte Menschen und Patienten mit zystischer Fibrose. Wird der Erreger in der akuten Phase nicht komplett eradiziert, passt er sich an seine Umgebung in der Lunge an, zeigt phänotypische Veränderung und wächst als Biofilm (siehe 1.1.2). Die Folge ist eine Chronifizierung der Infektion (Gellatly und Hancock 2013). Am besten wurde dieser Sachverhalt an Patienten mit zystischer Fibrose erforscht. Bei der hereditären Erkrankung, welche auch als Mukoviszidose bekannt ist, besteht eine Mutation im Chlorid-Kanal CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator). Dadurch enthält unter anderem das Sekret in der Lunge weniger Wasser, wird muköser und behindert die mukoziliäre Clearance. Folglich ist ein effektiver Abtransport von Fremdmaterial und Keimen aus der Lunge nicht mehr gewährleistet. Mukoviszidosepatienten entwickeln oft schon im Kindes- und Jugendalter eine Infektion mit *Pa* und leben viele Jahre damit (Sadikot et al. 2005). Die chronische Infektion der Lunge mit *Pa* führt zu einer überschießenden inflammatorischen Reaktion, die durch bakterielle Toxine möglicherweise noch weiter verstärkt wird. Daraus resultiert die Zerstörung der Lunge und die Lungenfunktion nimmt progressiv ab (Gellatly und Hancock 2013).

Neben den nosokomialen Infektionen löst *Pa* auch einige Erkrankungen außerhalb von Krankenhäusern aus. *Pa* bevorzugt feuchte Umgebungen und ist deshalb unter anderem in Pools und Schwimmbädern zu finden. So kann eine Infektion zum Beispiel zu papulösen Exanthenen der Haut führen, die typischerweise die Badebekleidung nachzeichnen. Verbleibt Wasser im Ohr

kann es zu einer Otitis externa kommen, die auch als „Swimmer’s ear“ bekannt ist. Des Weiteren kann *Pa* eine Entzündung der Cornea auslösen, beispielsweise durch Kontamination der Kontaktlinsenflüssigkeit (Lister et al. 2009) oder das Tragen von speziellen Monatslinsen, die auch nachts nicht abgelegt werden müssen (Lyczak et al. 2000).

Bereits 2013 wurde *Pa* von den „Centers for Disease Control and Prevention“ (CDC) in ihrem Bericht als ernsthafte Bedrohung eingeschätzt und in diesem Zusammenhang die Notwendigkeit für umgehendes und anhaltendes Handeln betont. Weiter wird in diesem Bericht von etwa 6700 Infektionen mit multi-resistenten *Pa* pro Jahr in den USA ausgegangen, von denen 440 tödlich verlaufen (CDC 2013). Nicht nur in den USA stellen multiresistente *Pa*-Stämme ein ernstzunehmendes Problem dar, dies gilt ebenfalls für Deutschland und Europa (van der Bij et al. 2012, Gilarranz et al. 2013).

1.1.2 Pathomechanismen und Virulenzfaktoren

Die Pathogenität von *Pa* basiert nicht nur auf einem einzelnen Virulenzfaktor. Vielmehr ist es ein komplexes Zusammenspiel unterschiedlicher Faktoren, die dem Erreger die Infektion der Wirtszelle ermöglichen. Die wichtigsten dieser Faktoren werden im Folgenden näher beschrieben.

Das Bakterium besitzt ein einzelnes polares Flagellum und mehrere kürzere Pili, die sich ebenfalls am Zellpol befinden. Das Flagellum rotiert korkenzieherartig und ermöglicht damit das Schwimmen in nasser Umgebung. Außerdem lösen die Flagellen und Pili eine inflammatorische Immunantwort aus (Gellatly und Hancock 2013). Das Flagellum bindet dazu an Glykolipide der Epithelzelle des Wirts und führt zu einer starken Entzündungsreaktion, die durch NFκB vermittelt wird (Miao et al. 2007). Die Pili spielen bei der Adhäsion von *Pa* an der Wirtszelle die Hauptrolle und sind an der Biofilmformation beteiligt (Craig et al. 2004, Sriramulu et al. 2005). Außerdem sind die Pili in der Lage, durch Ein- und Ausfahren wie herumtastende Greifer, das Bakterium auf festen Oberflächen zu bewegen. Diese Zuck-Bewegungen werden auch als Twitching motility bezeichnet (Kipnis et al. 2006). Zusammen mit dem Flagellum ist auch

eine Bewegung auf halbfesten Oberflächen möglich, der so genannten Swarming motility (Kohler et al. 2000, Yeung et al. 2009).

Quorum Sensing (QS) beschreibt die Möglichkeit vieler Bakterien, ihre Population koordiniert an Veränderungen ihrer Umgebung anzupassen. Die Kommunikation erfolgt chemisch über Autoinduktoren, kleine, membrangängige Signalmoleküle, deren Konzentration den Bakterien sowohl Auskunft über die Zelldichte der Population liefert, als auch die Adaptation vermittelt. Sie agieren als Cofaktor spezifischer Transkriptionsregulatoren. Die Konzentration der Autoinduktoren verhält sich proportional zur Bakterienkonzentration. Erreicht die Populationsdichte einen kritischen Wert, werden bestimmte Gene aktiviert oder unterdrückt. Das führt zur Anpassung der Bakterien an die veränderten Bedingungen (Deep et al. 2011). *Pa* produziert drei Autoinduktoren, die das Überleben der Zelle, Biofilmbildung und Virulenz und damit auch die Pathogenität steuern können (Gellatly und Hancock 2013).

Die Biofilmbildung hängt eng mit QS zusammen. Als Biofilm bezeichnet man eine strukturierte Gemeinschaft von Bakterien, die sowohl aneinander, als auch an einer Oberfläche haften (Bjarnsholt et al. 2010). Die Zellen sind in einer Substanz aus extrazellulären Polymeren (Polysaccharide, Nukleinsäuren, Lipide und Proteine) eingekapselt, die den Hauptanteil des Biofilms ausmacht. Die Polymer-Matrix schützt *Pa* vor physikalischen und chemischen Einwirkungen der Umwelt. Sie ist robuster gegenüber mechanischer Belastung (z.B. fließendes Wasser) und verhindert das Eindringen von toxischen Substanzen, wie AB oder Moleküle der Immunabwehr (Hall-Stoodley und Stoodley 2009, Lieleg et al. 2011). Der Schutz vor AB und Desinfektionsmittel durch den Biofilm wirft in Krankenhäusern große medizinische Probleme auf. Zudem haben Studien gezeigt, dass sich *Pa* innerhalb des Biofilms hinsichtlich des Transkriptionsprofils deutlich von freischwimmenden *Pa* unterscheidet (Waite et al. 2006), eine Tatsache, die ihrerseits ebenfalls zu vermehrten AB-Resistenzen führen könnte (Mah und O'Toole 2001).

Die Sekretion von Proteinen und Toxinen ist ein weit verbreiteter Virulenzmechanismus gramnegativer Bakterien. Bisher sind sechs verschiedene Sekretionssystem-Typen beschrieben (Economou et al. 2006). Sie alle dienen

auf unterschiedliche Weise dem Transport von Substraten vom Zytoplasma, dem Ort ihrer Synthese, aus der Zelle heraus. Dabei müssen die innere Membran, das Periplasma und die äußere Membran überwunden werden. Fünf dieser in gramnegativen Bakterien beschriebenen Sekretionssysteme (Typ I, II, III, V und VI) finden sich auch in *Pa* wieder und ermöglichen die Sekretion eines breiten Spektrums an Exoproteinen (Bleves et al. 2010). Bei *Pa* stellt das Typ-III-Sekretionssystem (T3SS) den Hauptfaktor der Virulenz dar. Mit einem nadelähnlichen Fortsatz injiziert das Bakterium Toxine durch Poren in der Membran direkt in die Wirtszelle. Die Expression des T3SS steht mit akuten, invasiven Infektionen, sowie einer erhöhten Mortalität der betroffenen Patienten im Zusammenhang (Sadikot et al. 2005, Hauser 2009). Durch die Produktion und Übertragung von Exotoxinen können ausgeprägte lokale Entzündungen bis hin zur Sepsis hervorrufen werden, die systemische Folgen für den gesamten menschlichen Körper hat (Hauser 2009). Exotoxin A, welches vom Typ-II-Sekretionssystem sezerniert wird, hemmt den Elongationsfaktor 2 und damit die Proteinbiosynthese der Wirtszelle. Die dadurch hervorgerufene Apoptose der Zelle hemmt die Immunantwort des Wirts (Schultz et al. 2000, Cianciotto 2005). Des Weiteren sezerniert *Pa* verschiedene Proteasen (Alkaliproteasen Elastasen, Serinproteasen), die unter anderem bei Augeninfektionen und Sepsen maßgeblich an der Pathogenese beteiligt sind. Sie können die Wirkung der Immunglobuline schwächen, Fibrin lysieren und die Tight Junctions der Epithelzellen zerstören. In der Lunge bewirken sie eine Zersetzung des Surfactant (Kipnis et al. 2006).

Die äußere Schicht der Außenmembran (AM) gramnegativer Bakterien wird von Lipopolysacchariden (LPS), komplexen Glykolipiden, gebildet. Das LPS wirkt als Endotoxin, funktioniert als Antigen und löst beim Wirt eine Entzündungsreaktion aus. Diese Komponente ist vor allem bei langanhaltender Exposition, zum Beispiel in der Mukosa der Lunge bei Mukoviszidose-Patienten, maßgeblich an der Inflammation beteiligt. Zusätzlich bietet die Schicht *Pa* Schutz vor schädlichen Molekülen aus der Umgebung und limitiert die Aufnahme von AB (King et al. 2009). LPS besteht aus drei Domänen: Lipid A, einer Polysaccharid-Kernregion und einem O-spezifischen Polysaccharid. Lipid

A ist fest in der AM verankert und aktiviert beim Wirt den TLR4- und NFκB-Signalweg. Daraus resultiert eine gesteigerte Produktion proinflammatorischer Zytokine, was zur Entzündung bis hin zum endotoxischen Schock führen kann (Gellatly und Hancock 2013). Die O-spezifische Polysaccharidkette wird als O-Antigen bezeichnet. Ein *Pa*-Bakterium kann bis zu zwei O-Antigen-Typen gleichzeitig besitzen. Die Polysaccharidkette der verschiedenen Typen ist variabel in ihrer Länge, schützt die Bakterien nach der Penetration ins Gewebe vor Opsonierung durch das Komplementsystem und löst eine Antikörpervermittelte Immunantwort aus, deren Ausmaß vom Typ des O-Antigens abhängt (King et al. 2009).

Ein weiterer Faktor, der eine Rolle in für die Pathogenität von *Pa* spielt ist Pyocyanin, welches in Flüssigkulturen zu der charakteristischen Farbe führt. Die vom Bakterium produzierte Substanz führt in der Wirtszelle zu oxidativem Stress, stört so die Katalase und unterbricht den Elektronentransport im Mitochondrium (Lau et al. 2004).

Ein anderer Pathomechanismus steht eng mit der Eisenaufnahme des Erregers in Verbindung. Eisen ist ein wichtiger Nährstoff für *Pa*. Es ist nicht nur essentiell für das Überleben und die Proliferation der Bakterien, sondern spielt auch bei der Infektion des Wirts, sowie der Chronifizierung einer Infektion eine Rolle. *Pa* produziert das Siderophor Pyoverdin, eine Verbindung, die mit Eisen Chelatkomplexe bildet. Das Pyoverdin kann Eisen aus den Vorräten des Wirts sequestrieren, das dort ebenfalls an Komplexbildner gebunden ist, und es dann zu eigenen Zwecken nutzen. Zusätzlich agiert Pyoverdin als Signalmolekül, das als Chelatkomplex mit Eisen für die Hochregulation u.A. von Exotoxin A sorgt (Cornelis et al. 2009, Jimenez et al. 2012).

1.1.3 Antibiotikaresistenzen

Die Prävention und Behandlung von *Pa*-Infektionen stellt Ärzte immer wieder vor Probleme: Der Erreger ist mit Desinfektionsmitteln und AB nur schwer zu kontrollieren und zu bekämpfen (Hancock 1998). Die Widerstandsfähigkeit der Bakterien beruht auf einer Kombination aus intrinsischen, adaptiven und erworbenen Resistenzmechanismen.

Intrinsische Resistenzen sind Resistenzmechanismen, die auf dem Chromosom der Bakterien kodiert sind. Dazu zählen die geringe Durchlässigkeit der AM, Effluxpumpen und die induzierbare β -Laktamase (Strateva und Yordanov 2009). Die AM gramnegativer Bakterien bildet eine semipermeable Barriere. Dadurch ist die Aufnahme kleiner, hydrophiler Substanzen, z.B. β -Laktam-AB und Chinolone, aber auch Nährstoffe, auf Porin-Kanäle in der Membran beschränkt. Jedoch ist die Membran von *Pa* deutlich weniger permeabel als beispielsweise die von *E. coli*. Sie besitzt weniger große Porine und stattdessen viele kleine Porin-Kanäle. Große Moleküle können die Membran bei *Pa* also schlechter passieren, als bei anderen Bakterien (Breidenstein et al. 2011). Der Verlust weiterer Porine führt zusätzlich zu verstärkter Resistenz gegen AB (Yoshimura und Nikaido 1985, Nikaido 1989).

Effluxpumpen können eine große Bandbreite an AB wieder aus der Zelle hinaus befördern. Sie sind ebenfalls auf dem Chromosom kodiert. Bisher wurden fünf verschiedene Familien der Effluxpumpen identifiziert, die sich in ihren Transportmechanismen, Strukturen und Substraten unterscheiden und gleichzeitig im selben Bakterium vorkommen können (Schweizer 2003). Die meisten Effluxpumpen in *Pa* gehören zur Familie der Resistance-Nodulation-Division-Pumpen (RND-Pumpen). Sie transportieren ihre Substrate sekundär aktiv aus dem Bakterium heraus und bestehen typischerweise aus einem dreiteiligen System, das die innere und äußere Membran umspannt (Lister et al. 2009). Abbildung 1 zeigt schematisch den Aufbau einer RND-Pumpe in *Pa*.

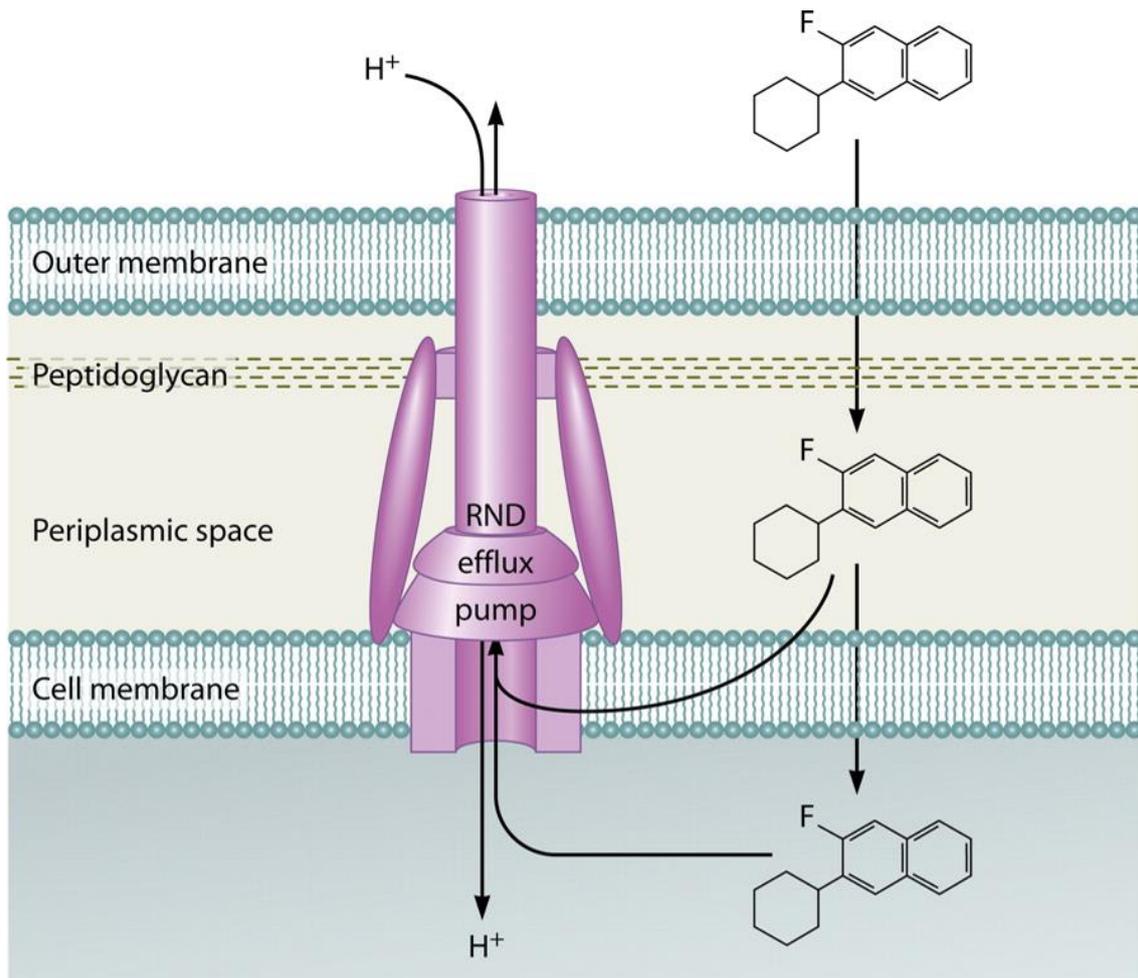


Abbildung 1: Aufbau einer RND-Pumpe in *Pa*. RND-Pumpen bestehen aus drei Teilen: dem AM-Protein, dem periplasmatischen Verbindungsprotein und dem Innenmembran-Transporter. Das System umspannt so die gesamte Membran und bildet einen Kanal, durch den sekundär aktiv Stoffe aus Zytoplasma und Periplasma aus der Zelle hinaus transportiert werden. Aus: Lister et al. (2009)

Als dritten intrinsischen Resistenzmechanismus ist die β -Laktamase AmpC zu nennen. Sie befindet sich im Periplasma und wird normalerweise nur gering exprimiert, sodass *Pa* empfindlich gegenüber einigen Penicillinen, Penicillinen in Kombination mit Laktamaseinhibitoren, Cephalosporinen und Carbapenemen ist (Sanders und Sanders 1986). Durch geringe AB-Konzentrationen, also therapeutisch nicht wirksame Dosen bestimmter β -Laktame, kann sie jedoch induziert werden. Mit einem höheren Aktivitätslevel hydrolysiert die Laktamase β -Laktam-AB wie Cephalosporine und Penicilline und macht sie damit unwirksam (Gellatly und Hancock 2013).

Adaptive Resistenzen beruhen auf Veränderungen der Membran infolge einer Anpassungsreaktion der Bakterien auf ihre Umgebung. Nicht-inhibitorisch

wirksame AB-Konzentrationen, besondere Wachstumszustände wie Biofilm, Swarming motility oder die Verbindung zu epithelialen Oberflächen können eine solche Reaktion auslösen. Dabei verändert sich die Genexpression des Bakteriums, Gene werden hochreguliert und die Zelle passt sich entsprechend der neuen Umstände an (Gellatly und Hancock 2013).

Pa kann Resistenzen auch neu erwerben. Zum einen können spontane Mutationen das Target eines ABs im Bakterium oder regulatorische Gene verändern. So führt beispielsweise eine Mutation der Gyrase zur Reduktion der Bindungsaffinität von Fluorchinolonen an das Enzym und folglich zu einer Resistenz gegen diese AB-Gruppe (Schweizer 2003, Breidenstein et al. 2011). Ein weiteres Beispiel für Resistenzbildung durch Mutation ist *mexZ*, ein Gen mit regulatorischer Funktion, welches die Expression einer Effluxpumpe unterdrückt. Durch die Fehlregulation kommt es zur Überexpression dieser Effluxpumpe und damit zum vermehrten Ausschleusen von Aminoglykosiden und anderen AB aus der Zelle, deren Angriffspunkt die Ribosomen im Zytoplasma sind und die extrazellulär keine Wirkung auf das Bakterium haben (Matsuo et al. 2004).

Zum anderen kann *Pa* auch durch horizontalen Gentransfer DNA-Elemente wie Plasmide oder Transposons von anderen Bakterien aufnehmen. Diese können Resistenzkassetten für ein oder mehrere AB enthalten welche nach Aufnahme von *Pa* exprimiert werden oder bestehende intrinsische Resistenzmechanismen verstärken (Breidenstein et al. 2011, Gellatly und Hancock 2013).

Infektionen mit multiresistenten *Pa*-Stämmen stellen im klinischen Alltag eine große Herausforderung dar. Die Behandlungsmöglichkeiten sind äußerst eingeschränkt und nicht selten versterben Patienten an einer Sepsis, die mit den bekannten AB nicht behandelt werden kann. Aus diesem Grund hat die Suche nach neuen Therapeutika, die alternative Angriffspunkte ins Auge fassen, hohe Priorität.

1.2 Außenmembranbiogenese gramnegativer Bakterien

Bakterien lassen sich abhängig von ihrem Wandaufbau mittels Gram-Färbung in zwei Gruppen aufteilen: grampositive und gramnegative Bakterien. Grundlage dieser Einteilung ist der Wandaufbau der Zellen. Prinzipiell wird das Zellinnere eines Bakteriums von einer Zytoplasmamembran umgeben. Dem darauffolgenden periplasmatischen Spalt liegt eine Hülle aus Peptidoglykan (Murein) auf. Bei grampositiven Bakterien ist diese Mureinschicht dick, im Gegensatz dazu besitzen gramnegative Bakterien zusätzlich zu einer dünnen Schicht aus Peptidoglykan eine äußere Membran. Sie besteht aus Phospholipiden und LPS (Nikaido 2003).

Die AM ist ein essentieller Bestandteil gramnegativer Bakterien. Sie bildet eine physikalische Barriere und schützt die Zellen vor ihrer Umwelt. Gleichzeitig ermöglicht sie den Import essentieller Nährstoffe, den Export von Proteinen, die Passage von Signalmolekülen und beinhaltet Proteine, die mit der Virulenz assoziiert sind (siehe 1.1.2). Um diese vielfältigen Funktionen erfüllen zu können, befinden sich in der AM verschiedenste Außenmembranproteine (AMP). Abbildung 2 gibt einen Überblick über ihre Biogenese. Die meisten AMPs bestehen aus 8 bis 26 antiparallelen β -Faltblättern die einen Zylinder formen, ein so genanntes β -Barrel oder β -Fass (Noinaj et al. 2015, Rollauer et al. 2015). Die Proteine werden im Zytoplasma an den Ribosomen synthetisiert und müssen die innere Membran (IM) überwinden, um zur AM zu gelangen. Wenn sie das Periplasma erreicht haben, sind sie noch nicht gefaltet. Um die AMPs vor einer frühzeitigen (Fehl-)Faltung oder Aggregation zu schützen, interagieren sie im Periplasma mit Chaperonen wie SurA, Skp oder DegP (siehe 1.2.2; Sklar et al. (2007b)). Diese eskortieren die Proteine zum β -Barrel Assembly Machinery (BAM)-Komplex in der AM (Hagan et al. 2011). Der BAM-Komplex besteht aus fünf Komponenten (BamA, BamB, BamC, BamD und BamE) und katalysiert den Zusammenbau der unfertigen AMPs und ihren Einbau in die AM (siehe 1.2.1).

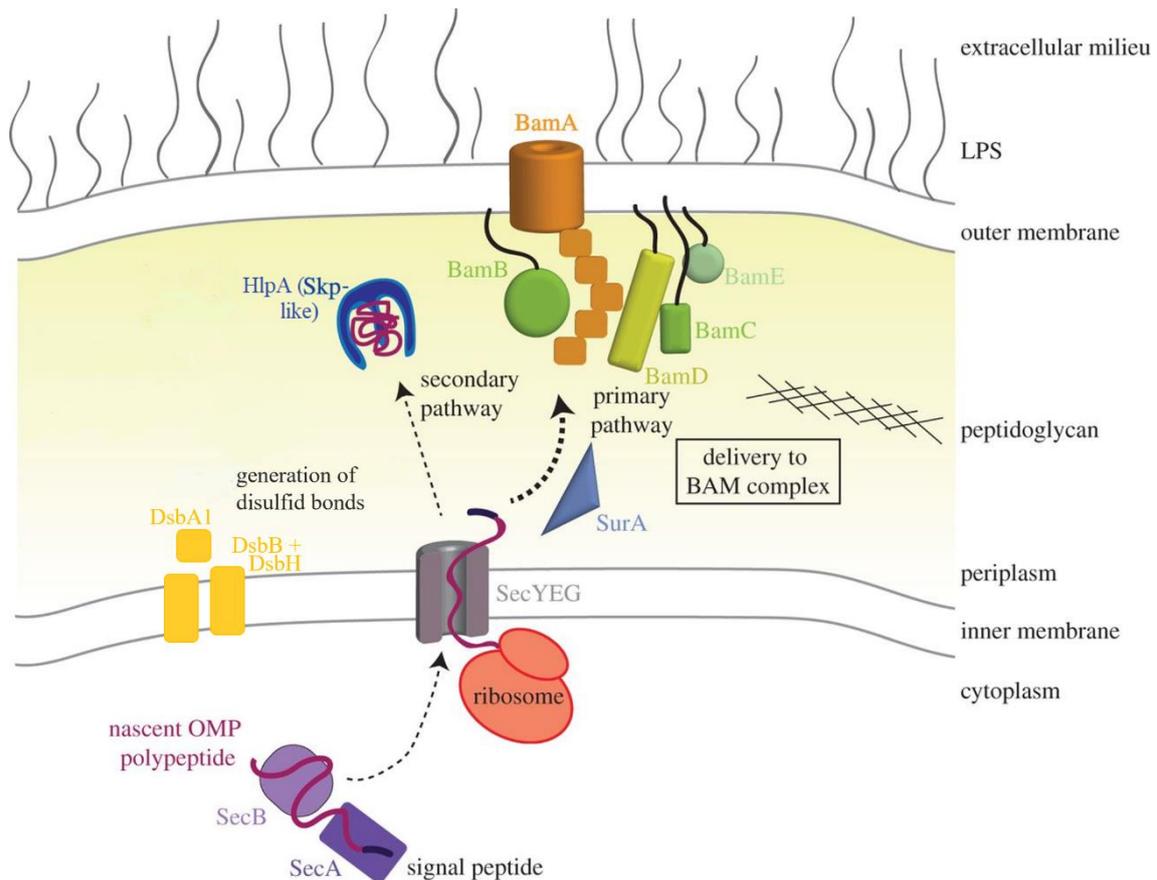


Abbildung 2: AMP-Biogenese in *Pa.* Die neuen AMPs (dargestellt in violett) werden im Zytoplasma gebildet. Sie werden von SecA/B (lila) zu dem Transporter SecYEG (grau) befördert und passieren dort die IM. Im Periplasma transportieren Chaperone wie SurA (hellblau) und HlpA (dunkelblau) die neu synthetisierten Proteine zum BAM-Komplex. Dort werden sie gefaltet und in die AM eingebaut. Modifiziert nach: Rollauer et al. (2015)

1.2.1 BamC als Teil des BAM-Komplexes

Der β -Barrel Assembly Machinery-Komplex (BAM-Komplex) befindet sich in bzw. an der AM (siehe Abbildung 2). Er besteht aus dem integralen Membranprotein BamA und vier Lipoproteinen (BamB, BamC, BamD, BamE). BamA und BamD sind in *E. coli* essentiell für diesen Komplex (Wu et al. 2005, Kim et al. 2007) und bilden das Kernmodul, die zusätzlichen Lipoproteine interagieren direkt oder indirekt mit ihnen und haben eine regulatorische Funktion oder steigern die Effizienz des Komplexes (Wu et al. 2005). Die Maschinerie katalysiert die Faltung der unfertigen AMPs und anschließend deren Einbau in die AM. Obwohl die Strukturen und Interaktionen der Komponenten bereits identifiziert wurden, ist der exakte Funktionsmechanismus noch nicht komplett entschlüsselt (Rollauer et al. 2015).

Das AMP BamA ist in allen gramnegativen Bakterien zu finden (Knowles et al. 2009). Es besitzt neben seiner β -Barrel-Struktur in der Membran einen großen periplasmatischen Anteil, der sich aus fünf polypeptidtransport-assoziierten (POTRA) Domänen zusammensetzt. Damit interagiert das Protein direkt mit BamB und BamD, den Substraten sowie mit dem Chaperon SurA. BamC und BamE beeinflussen BamD, wechselwirken also nur indirekt mit BamA (Malinverni et al. 2006, Kim et al. 2007, Sklar et al. 2007a). Darum lässt sich der Komplex in zwei Module gliedern: BamA/B und BamC/D/E (Hagan et al. 2010). Die Lipoproteine sind mit dem inneren Blatt der AM über N-terminale Lipidmodifikationen verankert (Hagan et al. 2011, Ricci und Silhavy 2012). Der Mechanismus des Faltens und Einsetzens der AMPs durch den BAM-Komplex ist noch nicht komplett verstanden. Derzeit existieren zwei Modelle zur Funktionsweise: das „BamA-assisted“-Modell und das „BamA-budded“-Modell (Kim et al. 2012, Noinaj et al. 2014, Rollauer et al. 2015). Das „BamA-assisted“-Modell beschreibt die Destabilisierung der AM durch BamA, indem es die Phospholipide in seiner Umgebung ausdünnert. Man nimmt an, dass dadurch lokal die kinetische Energie, die zum Einbau der AMPs benötigt wird, reduziert wird, und die neuen Proteine spontan in die AM eingefügt werden (Noinaj et al. 2013, Noinaj et al. 2014). Das „BamA-budding“-Modell nimmt an, dass β -Stränge von BamA als Vorlage für den β -Strang der neu gebildeten AMPs dienen. Es entsteht ein Zwischenprodukt aus BamA und dem AMP, von dem aus das Protein „auskeimt“ (engl.: to bud), bis es die AM erreicht hat. Anschließend soll ein Austausch der β -Stränge zwischen BamA und dem neuen AMP stattfinden. Durch die Interaktion seines ersten und letzten β -Strangs schließt sich das Barrel. Dadurch wird das β -Barrel vervollständigt und letztlich voll gefaltet in die AM freigegeben (Noinaj et al. 2014, Rollauer et al. 2015, Bakelar et al. 2016).

Das Lipoprotein BamC, nach alter Nomenklatur NlpB (Knowles et al. 2009), kann in drei Domänen differenziert werden: eine unstrukturierte Region am fernen N-Terminus, die N-terminale und die C-terminale Domäne. Die unstrukturierte Region ist hoch konserviert und bildet eine lasso-artige Struktur. Damit

bindet BamC an die N-terminale Hälfte von BamD und es bildet sich ein stabiler Komplex. Die Interaktion der beiden Lipoproteine basiert vorwiegend auf diesem direkten Kontakt (Kim et al. 2011). Dem BamCDE-Modul wird eine stabilisierende Funktion im Rahmen des gesamten BAM-Komplexes zugeschrieben. BamD spielt hierbei die wichtigste Rolle, gefolgt von BamE und schließlich BamC (Onufryk et al. 2005, Malinverni et al. 2006, Sklar et al. 2007a). Neue Daten lassen außerdem vermuten, dass die Funktion des BAM-Komplexes vom CDE-Subkomplex moduliert wird. Das Modul soll Konformationsänderungen und die Drehung des β -Barrels von BamA beeinflussen und so den Öffnungsvorgang des Kernproteins des BAM-Komplexes ermöglichen (Noinaj et al. 2014, Bakelar et al. 2016).

Während die Deletion anderer Lipoproteine im BAM-Komplex, beispielsweise BamB, im Modellorganismus *E. coli* unter anderem zu einer signifikanten Reduktion mehrerer AMPs führt, zeigen die Bakterien ohne BamC nur kleine Veränderungen der AM-Integrität und der AMP-Level (Onufryk et al. 2005).

1.2.2 Periplasmatische Chaperone

Damit die im Zytoplasma gebildeten AMPs zum BAM-Komplex gelangen, ohne fehlerhaft gefaltet zu werden oder zu aggregieren, werden sie von Chaperonen durch das Periplasma transportiert (Sklar et al. 2007b). Neben dem Schutz der AMPs können Chaperone mit Proteaseaktivität wie DegP auch falsch gefaltete Proteine abbauen und damit deren Akkumulation verhindern beziehungsweise beseitigen (Ge et al. 2014).

Das Chaperon SurA (Survival Protein A) spielt die größte Rolle in der Biogenese der AMPs. Neben seiner erst später entdeckten Chaperonfunktion ist SurA eine Peptidyl-Prolyl-Isomerase (PPIase). PPIasen ermöglichen die *cis-trans*-Isomerisierung von Prolyl-Resten und sind dadurch auch an der Faltung der AMPs beteiligt. Die beiden Funktionen von SurA werden unabhängig durch zwei unterschiedliche Domänen des Proteins vermittelt (Lazar und Kolter 1996, Behrens et al. 2001). Studien mit *E. coli* haben gezeigt, dass die Deletion von SurA in den Bakterien zu niedrigeren Außenmembranprotein- und mRNA-Spiegeln führt (Vertommen et al. 2009). Bei einigen Bakterienspezies ließ sich

eine Reduktion der Virulenz beobachten (Sydenham et al. 2000, Justice et al. 2006, Purdy et al. 2007, Obi und Francis 2013, Southern et al. 2016).

Neben SurA existiert ein alternativer Weg mit den Chaperonen Skp und DegP. Dieser spielt vermutlich vor allem dann eine Rolle, wenn Stress auf die Zelle ausgeübt wird. Man geht davon aus, dass die beiden möglichen Wege parallel zueinander arbeiten und sich zumindest teilweise gegenseitig kompensieren können (Rizzitello et al. 2001, Sklar et al. 2007b, Denoncin et al. 2012). Dass die Deletion von SurA einen viel stärkeren Phänotyp zeigt als die Skp- oder DegP-Knock-out-Mutanten, spricht jedoch dafür, dass vor allem SurA eine essentielle Rolle in der AMP-Biogenese einnimmt (Sklar et al. 2007b, Weirich et al. 2017).

HlpA (Histone-like-Protein A), auch bekannt unter den Namen OmpH in *Salmonella typhimurium* oder Skp (17-Kilodalton-Protein) in *E. coli* (Hirvas et al. 1990, Thome und Muller 1991), gehört entgegen der ursprünglichen Annahme und seines Namens (Lathe et al. 1980) zur Skp-Familie und ist ein periplasmatisches Chaperon. Es interagiert mit ungefalteten AMPs (z.B. OmpA) und transportiert sie durch das Periplasma zur AM (Jarchow et al. 2008, Denoncin et al. 2012). Dabei spielt die Struktur des Homotrimers, die an eine Qualle erinnert, eine wichtige Rolle: Ein β -Barrel bildet den Körper, von dem α -Helices wie Tentakeln abgehen. Diese Tentakel formen in ihrer Mitte eine Höhle, in welcher die neu synthetisierten Proteine vor Fehlfaltung und Aggregation geschützt werden (Korndorfer et al. 2004, Schlapschy et al. 2004, Walton und Sousa 2004, Walton et al. 2009). Bei *in-vitro*-Experimenten konnte gezeigt werden, dass HlpA an LPS binden kann. Darum wird vermutet, dass diese Bindung notwendig ist, um die ungefalteten AMPs an der AM freizusetzen (De Cock et al. 1999, Bulieris et al. 2003, Walton und Sousa 2004).

Die Deletion von HlpA in *E. coli* führt zur Veränderung der Zusammensetzung der AMPs. Im Vergleich zum Verlust von SurA sind die Veränderungen jedoch deutlich schwächer ausgeprägt (Chen und Henning 1996, Rhodius et al. 2006, Sklar et al. 2007b). Ebenso konnte gezeigt werden, dass keines der bisher genauer untersuchten AMPs HlpA als Chaperon bevorzugt. Der Transport durch das Periplasma erfolgt primär durch SurA. Ist dieser Weg nicht verfügbar,

kann HlpA das andere Chaperon dennoch effektiv ersetzen, sodass das Überleben der Zelle gewährleistet ist (Denoncin et al. 2012), während die Deletion beider Proteine zusammen letal für *E. coli* ist (Weski und Ehrmann 2012).

1.2.3 Bildung von Disulfidbrückenbindungen

Bei der Faltung und Stabilisierung vieler AM- und von *Pa* sekretierter Proteine spielen Disulfidbrücken eine wichtige Rolle. Wie bei allen gramnegativen Bakterien findet die Bildung dieser Disulfidbrücken im Periplasma statt (Messens und Collet 2006, Depuydt et al. 2011).

Im Modellorganismus *E. coli* wurde dieser Prozess bisher am besten untersucht: Man fand die Oxidoreduktase DsbA und das IM-Protein DsbB, die als Enzyme bei der Bildung der Disulfidbrücken eine maßgebliche Rolle spielen. EcDsbA ist ein lösliches, monomeres Protein aus der Familie der Thioredoxine, das mit einem CxxC-Motiv die Bildung von Disulfidbrücken katalysiert. Das Protein ist der primäre Donor bei der Disulfidbrückenbildung. Die Cystein-Reste des katalytischen Motivs liegen *in vivo* im oxidierten Zustand vor. Dadurch kann DsbA mit den Proteinen interagieren und sie oxidieren – eine schnelle unidirektionale Reaktion, die das Zusammenfallen der Proteine katalysiert. Nachdem die Disulfidbrücke auf das Target-Protein übertragen wurde, befindet sich DsbA im reduzierten Zustand und ist damit nicht mehr in der Lage, weitere Reaktionen zu katalysieren. An dieser Stelle kommt DsbB ins Spiel: Das IM-Protein reoxidiert die Oxidoreduktase und stellt so den Ausgangszustand und damit die Funktion von DsbA wieder her (Bardwell et al. 1991, Bardwell et al. 1993). EcDsbB besteht aus vier transmembranen Segmenten und zwei kleinen hydrophilen Regionen, die jeweils zwei ins Periplasma ragende Cysteinreste besitzen. Die Cysteinreste als Reaktionpartner sind verantwortlich für die Aktivität des Proteins: Sie transportieren die Elektronen von DsbA weg und liefern sie Ubichinon, das die Elektronen dann der Atmungskette zuführt (Bader et al. 1999). Steht nicht genug Sauerstoff zur Verfügung, werden die Elektronen von DsbB zu Menachinon und dann weiter zu terminalen Elektronenakzeptoren wie Fumaraten und Nitraten transportiert (Bader et al. 1999, Takahashi et al.

2004, Tapley et al. 2007). Abbildung 3 stellt die Interaktion der beiden Dsb-Proteine in *E. coli* schematisch dar.

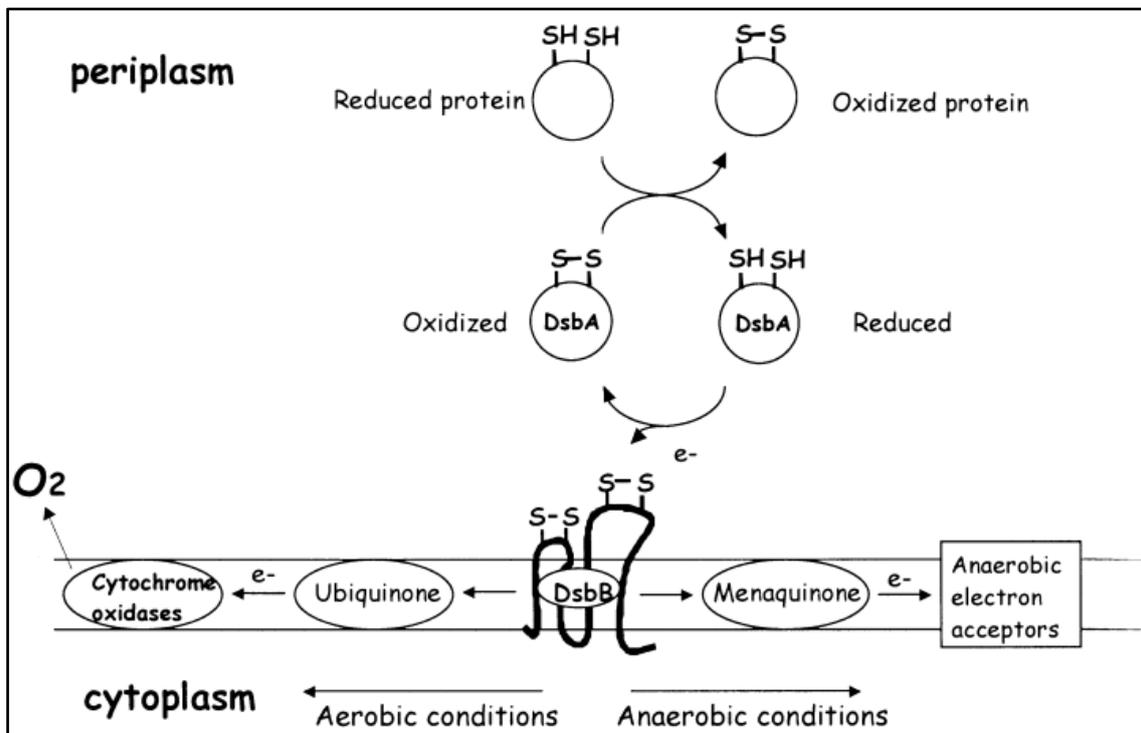


Abbildung 3: Disulfidbrückenbildung durch Oxidation im Periplasma von *E. coli*. DsbA oxidiert die Proteine und katalysiert damit ihr Zusammenfallen. DsbA liegt anschließend reduziert vor und wird vom IM-Protein DsbB reoxidiert. Steht genug Sauerstoff zur Verfügung, werden die Elektronen über Ubichinon der Atmungskette zugeführt. Unter anaeroben Bedingungen gelangen die Elektronen durch Menachinon zu alternativen Elektronenakzeptoren transportiert. Aus: Collet und Bardwell (2002)

In *E. coli* wurden bereits über 30 Substrate identifiziert, deren Faltung von den Dsb-Proteinen abhängig ist. Man nimmt jedoch an, dass die Zahl der abhängigen Proteine deutlich größer ist (Kadokura et al. 2004, Leichert und Jakob 2004, Vertommen et al. 2008).

Pa kodiert mehrere Dsb-Proteine, darunter zwei DsbA (DsbA1 und DsbA2) und zwei DsbB (DsbB1=DsbB und DsbB2=DsbH). Die Arbeitsweise der Protein-Maschinerie unterscheidet sich ebenfalls etwas vom System in *E. coli*. DsbA1 ist primärer Donor der Disulfidbrücken und kann sowohl von DsbB als auch von DsbH recycelt werden. DsbA2 ist ebenfalls eine Oxidoreduktase, gehört jedoch zu einer anderen Untergruppe als EcDsbA und PaDsbA1 und wird vermutlich nur unter speziellen Bedingungen exprimiert (Arts et al. 2013).

Wie DsbA in *E. coli* ist auch PaDsbA1 ein Thioredoxin, das *in vivo* überwiegend im oxidierten Zustand vorliegt. Die Substrate sind vielfältig, darunter Virulenzfaktoren wie die Elastase LasB, eine extrazelluläre Protease, die vor ihrer Sekretion eine oxidative Faltung durchläuft. Auch der Zusammenbau von Typ-IV-Pili und Flagellum ist abhängig von der katalytischen Wirkung von DsbA1 (Braun et al. 2001, Urban et al. 2001, Ha et al. 2003). Neben den Genannten gibt es noch einige weitere Hüll- und Exoproteine (Arts et al. 2013).

DsbB und DsbH sind beide in der Lage DsbA1 zu reoxidieren und haben eine ähnliche Affinität zu diesem Protein. Sie scheinen den Ausfall des jeweils anderen kompensieren zu können. Dies lässt vermuten, dass ihre Funktion redundant ist (Arts et al. 2013).

1.3 Zielsetzung

Auf Grund der Vielfalt an Antibiotikaresistenzen die *Pa* erwerben kann oder natürlicherweise besitzt (siehe 1.1.3), spielt die Entwicklung neuer Medikamente zur Behandlung von Infektionen eine zunehmend wichtigere Rolle. Die Pathogenität von *Pa* basiert, im Gegensatz zu anderen Krankheitserregern, auf einem komplexen Zusammenspiel von mehreren Virulenzfaktoren (siehe 1.1.2). Daher ist im Kampf gegen diesen Erreger das gängige Prinzip, einzelne Virulenzfaktoren als Angriffspunkte für AB ins Visier zu nehmen, wirkungslos. In dieser Arbeit sollte deshalb der Fokus auf die Außenmembranbiogenese gesetzt werden. Der Ansatz zeigte bereits am Modellorganismus *Yersinia enterocolitica* vielversprechende Ergebnisse (Weirich et al. 2017): Deletionsmutanten, die nicht mehr in der Lage waren die Proteine BamB (siehe 1.2.1) bzw. SurA (siehe 1.2.2) zu synthetisieren, präsentierten sich signifikant weniger virulent, sensitiver gegenüber AB und zeigten insgesamt eine verminderte Integrität der AM.

Wie in 1.2 beschrieben dient die AM nicht nur dem Schutz gramnegativer Bakterien. Zu ihren vielfältigen Aufgaben gehören außerdem die Sekretion von Proteinen und Toxinen, die Aufnahme von Nährstoffen in die Zelle und weitere Prozesse, die unter anderem im Zusammenhang mit Beweglichkeit und Virulenz der Bakterien stehen. Greift man in den Prozess der Synthese von

AMPs ein oder stört deren korrekten Einbau, schwächt man die Zelle aus mindestens zwei Gründen: Erstens können daraus generelle Defekte der AM resultieren, die das Eindringen schädlicher Substanzen in das Bakterium ermöglichen. Zweitens kann der Einbau mehrerer entscheidender Virulenzfaktoren in die AM verhindert werden. Beides spricht dafür, dass Proteine, die an der Biogenese einer Vielzahl von AMP beteiligt sind, ein gutes Ziel für neue Therapeutika darstellen, zumal es hierzu keine Korrelate im menschlichen Körper gibt.

Um zu untersuchen, welche Proteine sich als Angriffspunkt zur Behandlung von *Pa*-Infektionen eignen, sollten in dieser Arbeit Knock-out-(K.O.-)Stämme generiert werden. Ausgehend vom *Pa*-Laborstamm PA14 sollten Deletionsmutanten der Gene *bamC* [PA14_51260], *hlpA* [PA14_17170], *dsbB* [PA14_07000], *dsbH* [PA14_69400] und *dsbA1* [PA14_72450] entstehen. Da bei den *Pa*-Stämmen, denen *dsbB* oder *dsbH* fehlen, aufgrund der funktionellen Redundanz dieser Proteine keine phänotypische Veränderung zu erwarten ist (Arts et al. 2013), sollte im Rahmen der vorliegenden Arbeit außerdem eine entsprechende Doppel-K.O.-Mutante generiert werden.

Alle Gene, die in dieser Arbeit ausgeschaltet werden sollten, sind nicht essentiell für *Pa*. Das macht sie zu reizvollen potentiellen Angriffszielen für AB, da kein Selektionsdruck auf die Bakterien ausgeübt wird und deshalb die Entstehung neuer Resistenzen vermindert werden kann.

Die mutierten Stämme sollten anschließend in drei verschiedenen Experimenten hinsichtlich der Integrität ihrer AM getestet werden: AB-Resistenz-Testung (2.2.4), Sensitivität gegenüber Gallensalzen (2.2.5) und Humanserum (2.2.6).

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Tabelle 1: Verwendete Geräte

Bezeichnung	Hersteller
Brutschrank Function Line B20	Heraeus INSTRUMENTS, Hanau
DensiChek plus	BioMérieux, Nürtingen
Eismaschine Scotsman AF 156	Scotsman ice systems, Mailand (IT)
Gefrierschrank Premium NoFrost	Liebherr, Biberach a. d. Riß
Gefriertruhe HFC 586 Basic	Heraeus INSTRUMENTS, Hanau
Gel-Dokumentationssystem FAS-V	NIPPON Genetics, Düren
Gelelektrophoresekammern Mini-Sub Cell GT, WIDE Mini-Sub Cell GT	Bio-Rad, München
Heizblock Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg
Inkubationsrollrad	NeoLab, Heidelberg
Laborwaage	Sartorius, Göttingen
Laminar-Flow Sicherheitswerkbank (BDK-S 1800)	BDK Luft- und Raumfahrttechnik, Sonnenbühl-Genkingen
Magnetrührer mit Heizplatte MR 3001 K	Heidolph, Schwabach
Mikrowelle MW 7825	Severin, Sundern
Multikanalpipette (5-50 µl, 50-300 µl)	Thermo Fisher Scientific, Schwerte
Multipipette plus	Eppendorf, Hamburg
NanoDrop ONE	Thermo Fisher Scientific, Schwerte
Netzgerät Power Pac 200	Bio-Rad, München
pH-Meter 535 MultiCal Microprocessor	WTW, Weilheim i. OB
Photometer BioPhotometer	Eppendorf, Hamburg
Pipetten (10 µl, 20 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl)	Eppendorf, Hamburg
Pipettierhilfe Easypet	Eppendorf, Hamburg
Schüttelinkubator HAT	Infors AG, Bottmingen
Tecan-Reader infinite M200 PRO	Tecan, Crailsheim
Thermo-Cycler C1000 Touch	Bio-Rad, München
Vakuum-Pumpe CVC 2000	Vacuubrand, Wertheim

Bezeichnung	Hersteller
Varisdispenser plus	Eppendorf, Hamburg
Vortex Genie 2	Bender & Hobein AG, Zürich (CH)
Wasserbad	Memmert, Schwabach
Zentrifuge Centrifuge 5417R	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge mini Spin plus	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge Multifuge 3 S-R	Heraeus INSTRUMENTS, Hanau

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 2: Verwendete Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Hersteller
24-well-Platte	Greiner Bio-One, Frickenhausen
96-well-Platte	Nunc, Langenselbold
Combitip plus 1,0 ml, 5 ml	Eppendorf, Hamburg
Erlenmeyer-Kolben	Schott Duran, Mainz
Handschuhe nitril, puderfrei	Abena, Oberderdingen
Impfeschlinge 10 µl blau	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Kryo-Tubes, 1,5 ml	Thermo Fisher Scientific, Schwerte
Küvette 1,5 ml halbmikro	Sarstedt, Nümbrecht
Messzylinder	Schott Duran, Mainz
Parafilm	Bemis, Oshkosh (USA)
PCR-Reaktionsgefäße single cap 8er soft stripes 0,2 ml	Biozym Scientific, Hessisch Oldendorf
Petri-Schalen	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Pipettenspitzen 1000 µl	Ratiolab, Dreieich
Pipettenspitzen 200 µl	Sarstedt, Nümbrecht
Pipettenspitzen 10 µl	Brand, Wertheim
Reaktionsgefäße 1,5 ml, 2ml safe lock	Eppendorf, Hamburg
Falcon-Reaktionsgefäße 15 ml, 50 ml	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Reaktionsglas 14 ml	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Röhre 5 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Stripetten 5 ml, 10 ml, 25 ml, 50 ml	Corning, Wiesbaden

2.1.3 Chemikalien

Tabelle 3: Verwendete Chemikalien

Bezeichnung	Hersteller
Agar agar	Carl Roth, Karlsruhe
Agarose-Pulver SeaKem LE	Lonza, Basel (CH)
Aqua ad injectabilia	B. Braun, Melsungen
Bactoagar	BD Biosciences, Freiburg
Borsäure	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Brain Heart Infusion broth (BHI)	BS Biosciences, Freiburg
EDTA	AppliChem, Darmstadt
Essigsäure	Carl Roth, Karlsruhe
Ethanol	VWR, Darmstadt
Gallensalze/Bile salts (Cholsäure und Desoxycholsäure 1:1)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Glucose	Carl Roth, Karlsruhe
Glycerin Emsure	Merck Millipore, Darmstadt
Hefeextrakt	Carl Roth, Karlsruhe
Kaliumchlorid (KCl)	VWR, Darmstadt
Kalziumchlorid (CaCl ₂)	Carl Roth, Karlsruhe
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	Merck Millipore, Darmstadt
Magnesiumsulfat (MgSO ₄)	Merck Millipore, Darmstadt
Natriumchlorid (NaCl)	VWR, Darmstadt
Natriumhydroxid (NaOH)	VWR, Darmstadt
Orange G	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Rinderextrakt	BD Biosciences, Freiburg
Saures Casein-Hydrolysat	BD Biosciences, Freiburg
Stärke (löslich)	BD Biosciences, Freiburg
Sucrose BioXtra	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Tris(hydroxymethyl)aminomethan (TRIS)	Appllichem, Darmstadt
Trypton	Appllichem, Darmstadt

2.1.4 Puffer

Tabelle 4: Verwendete Puffer

Bezeichnung	Hersteller/Zusammensetzung
5x TRIS-Borat-EDTA-Puffer (TBE-Puffer)	54 g TRIS 27,5 g Borsäure 20 ml 0.5M EDTA pH 8.3 mit Essigsäure einstellen Aqua dest. ad 1000 ml
10x Buffer for KOD Hot Start	Merck Millipore, Darmstadt
Orange G Ladungspuffer	43,5 ml 87,5 % Glycerin 200 mg Orange G Aqua dest. ad 100ml
Phosphate buffered saline (PBS) pH 7,2 (ohne Mg und Ca)	Gibco Life Technologies, Carlsbad (USA)
Taq-Puffer	New England Biolabs, Ipswich (UK)

2.1.5 Enzyme und Reagenzien

Tabelle 5: Verwendete Enzyme und Reagenzien

Bezeichnung	Hersteller
Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTPs) (10 mM)	Roche Diagnostics, Rotkreuz (CH)
DpnI Restriktionsenzym	Thermo Fisher Scientific, Schwerte
Gene Ruler DNA Ladder Mix	Thermo Fischer Scientific, Schwerte
Gene Ruler 1 kb Plus DNA Ladder	Thermo Fischer Scientific, Schwerte
KOD Hot Start DNA Polymerase	Merck Millipore, Darmstadt
Phusion Polymerase (2 U/μl)	New England Biolabs, Ipswich (UK)
SYBR safe DNA gel stain (0.01 %)	Thermo Fischer Scientific, Schwerte
T5 Exonuclease (10 U/μl)	Epicentre, Madison (USA)
Taq DNA Ligase (40 U/μl)	New England Biolabs, Ipswich (UK)
Taq Polymerase	New England Biolabs, Ipswich (UK)

2.1.6 Antibiotika

Tabelle 6: Für Flüssigkulturen und Nährbodenplatten verwendete Antibiotika

Bezeichnung	Hersteller
Gentamicinsulfat	Appli Chem, Darmstadt
Irgasan	Sigma-Aldrich, Taufkirchen

Tabelle 7: Verwendete Antibiotikaplättchen zur Testung auf Antibiotika-Sensitivität

Bezeichnung	Zusammensetzung	Hersteller
B 10	Bacitracin 10 µg	Becton Dickinson, Sparks (USA)
CTX 5	Cefotaxim 5 µg	Becton Dickinson, Sparks (USA)
E 15	Erythromycin 15 µg	Becton Dickinson, Sparks (USA)
RA 5	Rifampicin 5 µg	Becton Dickinson, Sparks (USA)
SAM 20	Ampicillin 10 µg + Sulbactam 10 µg	Mast Diagnostics, Merseyside (USA)
VA 30	Vancomycin 30 µg	Becton Dickinson, Sparks (USA)

2.1.7 Nährmedien

Tabelle 8: Verwendete Nährmedien

Bezeichnung	Zusammensetzung
Lysogeny Broth (LB) agar	15 g Bactoagar LB-Medium ad 1000 ml
LB-Medium pH 7,5	10 g Trypton 5 g Hefeextrakt 10 g NaCl pH 7.5 mit NaOH einstellen destilliertes Wasser (Aqua dest.) ad 1000 ml
Müller-Hinton-Agar	2 g Rinderextrakt 17,5 g saures Casein-Hydrolysat 1,5 g Stärke 17 g Agar agar Aqua dest. ad 1000 ml

Bezeichnung	Zusammensetzung
No-salt lysogeny broth (NSLB)	10 g Trypton 5 g Hefeextrakt 15 g Bactoagar Aqua dest. ad 700 ml 300 ml Sucrose (50 % w/v)
Super optimal broth with catabolite repression (SOC)	20 g Trypton 5 g Hefeextrakt 10 ml 1M MgSO ₄ 10 ml 1M MgCl ₂ 10 ml 1M KCl 2 ml 5M NaCl 20 ml 1M Glucose Aqua dest. ad 1000 ml

2.1.8 Bakterienstämme

Tabelle 9: Verwendete Bakterienstämme

Bezeichnung	Eigenschaften	Resistenz	Herkunft
PA14	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> Wildtyp-Stamm	-	DSMZ (Nr. 19882)
<i>E. coli</i> DH5α	Chemisch kompetenter <i>Escherichia coli</i> -Stamm, transformiert mit hoher Effizienz	-	New England Biolabs, Ipswich (UK)
<i>E. coli</i> SM10 λpir	Chemisch kompetenter <i>Escherichia coli</i> -Stamm	-	(Hmelo et al. 2015)
PA14 Tn_ <i>surA</i>	PA14-Stamm mit Transposon- Mutation in <i>surA</i>	Gentamicin	(Liberati et al. 2006), in Kooperation mit AG Mayer (IMIT)
PA14 Tn_ <i>bamC</i>	PA14-Stamm mit Transposon- Mutation in <i>bamC</i>	Gentamicin	(Liberati et al. 2006), in Kooperation mit AG Mayer (IMIT)
PA14 Tn_ <i>hlpA</i>	PA14-Stamm mit Transposon- Mutation in <i>hlpA</i>	Gentamicin	(Liberati et al. 2006), in Kooperation mit AG Mayer (IMIT)

Bezeichnung	Eigenschaften	Resistenz	Herkunft
PA14 Tn_ <i>dsbB</i>	PA14-Stamm mit Transposon-Mutation in <i>dsbB</i>	Gentamicin	(Liberati et al. 2006), in Kooperation mit AG Mayer (IMIT)
PA14 Tn_ <i>dsbH</i>	PA14-Stamm mit Transposon-Mutation in <i>dsbH</i>	Gentamicin	(Liberati et al. 2006), in Kooperation mit AG Mayer (IMIT)
PA14 Δ <i>bamB</i>	PA14-Mutant mit Deletion von <i>bamB</i>	-	Michael Sonnabend, AG Bohn
PA14 Δ <i>bamC</i>	PA14-Mutant mit Deletion von <i>bamC</i>	-	diese Arbeit
PA14 Δ <i>hlpA</i>	PA14-Mutant mit Deletion von <i>hlpA</i>	-	diese Arbeit
PA14 Δ <i>dsbB</i>	PA14-Mutant mit Deletion von <i>dsbB</i>	-	diese Arbeit
PA14 Δ <i>dsbH</i>	PA14-Mutant mit Deletion von <i>dsbH</i>	-	diese Arbeit
PA14 Δ <i>dsbB</i> Δ <i>dsbH</i>	PA14-Mutant mit Deletion von <i>dsbB</i> und <i>dsbH</i>	-	diese Arbeit
PA14 Δ <i>dsbA1</i>	PA14-Mutant mit Deletion von <i>dsbA1</i>	-	diese Arbeit

2.1.9 Plasmide

Tabelle 10: Verwendete Plasmide

Bezeichnung	Eigenschaften	Resistenz	Herkunft
pEXG2	Cloning-Vektor mit selektivem <i>sacB</i> -Gen	Gentamicin	(Hmelo et al. 2015)
pEXG2 <i>bamC</i> -K.O.-Vektor	pEXG2 mit <i>bamC</i> -K.O.-Kassette	Gentamicin	diese Arbeit
pEXG2 <i>hlpA</i> -K.O.-Vektor	pEXG2 mit <i>hlpA</i> -K.O.-Kassette	Gentamicin	diese Arbeit
pEXG2 <i>dsbB</i> -K.O.-Vektor	pEXG2 mit <i>dsbB</i> -K.O.-Kassette	Gentamicin	diese Arbeit
pEXG2 <i>dsbH</i> -K.O.-Vektor	pEXG2 mit <i>dsbH</i> -K.O.-Kassette	Gentamicin	diese Arbeit

Bezeichnung	Eigenschaften	Resistenz	Herkunft
pEXG2 <i>dsbA1</i> -K.O.-Vektor	pEXG2 mit <i>dsbA1</i> -K.O.-Kassette	Gentamicin	diese Arbeit (hergestellt durch GenScript, Piscataway (USA))

2.1.10 Oligonukleotide

Tabelle 11: Primer zur Konstruktion der Knock-out-Vektoren

Name	Sequenz (5' → 3')	Annealing-Temperatur [°C]	Verwendung
<i>gib_uni_pEXG2_f</i>	AGGTCGACTCTAGAGGATCC	58	Linearisierung des pEXG2-Cloning-Vektors
<i>gib_uni_pEXG2_r</i>	TTCCGGCTCGTATAATGTGT	58	
<i>gib_pEXG2_BamC_up_f</i>	agctaattccacacattatacagagccggaaGACTTCCACTTGCAGGAAGG	53	Amplifikation der Upstream-Region von <i>bamC</i>
<i>gib_pEXG2_BamC_up_r</i>	gtatccgggtgtcagaactgctcaccaaggAGCCAGTCGCTTCATTGC	53	
<i>gib_pEXG2_BamC_dn_f</i>	gcaatgaagcgactggctggactgaccgccCAGTTCTGACACCCGGATAC	61,3	Amplifikation der Downstream-Region von <i>bamC</i>
<i>gib_pEXG2_BamC_dn_r</i>	tcgagcccgggatcctctagagtcgacctGACCCGGATCATGTGCGAG	61,3	
<i>gib_pEXG2_HlpA up_f neu</i>	agctaattccacacattatacagagccggaaTGCCGTTCTACGAACTACTACG	58	Amplifikation der Upstream-Region von <i>hlpA</i>
<i>gib_HlpA dn_HlpA up_r neu</i>	ggcgccacgctcgatgaccatgtcgtagccGGTGAAGTTACGCACGATGC	58	
<i>gib_HlpA up_HlpA dn_f neu</i>	gtgcaggagtgcacgtgcgtaagtcaccGGCTACGACATGGTCATCG	58	Amplifikation der Downstream-Region von <i>hlpA</i>
<i>gib_pEXG2_HlpA dn_r neu</i>	tcgagcccgggatcctctagagtcgacctTTACGCATCAGATGAAGCGTCAC	58	
<i>gib_pEXG2_DsbB_up_f</i>	agctaattccacacattatacagagccggaaGAACGGCTCGTTGAGGAAG	53	Amplifikation der Upstream-Region von <i>dsbB</i>
<i>gib_pEXG2_DsbB_up_r</i>	tcaggcgggtgcccggccgaacccagctCTTGAGGAGAGCGCTCAA	53	
<i>gib_pEXG2_DsbB_dn_f</i>	ggaatccctgccttgagcgtcctcctcaagAAGCTGGCGTTTCGGCC	57,3	Amplifikation der Downstream-Region von <i>dsbB</i>
<i>gib_pEXG2_DsbB_dn_r</i>	tcgagcccgggatcctctagagtcgacctCAGCTTCCATTTCTCGAAGG	57,3	
<i>gib_pEXG2_DsbH begin_f</i>	agctaattccacacattatacagagccggaaTGATGCAGCAGCTGTACGTC	58	Amplifikation der Upstream-Region von <i>dsbH</i>
<i>gib_DsbH end_DsbH begin_r</i>	acgggacagcccgcgtcaggcacgtcgagGCTGGCCAGGGGCATGG	58	
<i>gib_DsbH begin_DsbH end_f</i>	acctgtggatccgcatgccctgcccagcCTCCGACGTGCCTGACG	58	Amplifikation der Downstream-Region von <i>dsbH</i>
<i>gib_pEXG2_DsbH end_r</i>	tcgagcccgggatcctctagagtcgacctGTGAATCAGACCGGTAAGTGC	58	

Tabelle 12: Primer zur Überprüfung der Deletionen

Name	Sequenz (5' → 3')	Annealing-Temperatur [°C]	Verwendung
pEXG2_seq_f	TACTGTGTTAGCGGTCTG	58	Analyse der Fragmentlänge und Sequenzierung des pEXG2-Cloning-Vectors
pEXG2_seq_r	GATCCGGAACATAATGGTG	58	
BamC_seq_f	GAGATGGGTCTGATCCC	58	Analyse der Fragmentlänge und Sequenzierung des Genoms der PA14 <i>ΔbamC</i> -Mutante
BamC_seq_r	AGGATCGCGTCCAGCT	58	
BamC_seq_f neu	TCGAGCTGATGCTGCTG	58	
BamC_seq_r neu	CTGATGGTTGTTCAAGTGC	58	
DbamC_proof inside_r	AGCGATTGCCAGTCGGAAC	58	Bestätigung der Deletion von <i>bamC</i>
HlpA_seq_f	AGAAGCCGGACAACGC	58	Analyse der Fragmentlänge und Sequenzierung des Genoms der PA14 <i>ΔhlpA</i> -Mutante
HlpA_seq_r neu	TCACACCGTTGCCGATC	58	
DhlpA_seq_f2	TGTACGTAGTACCGAGTAACG	58	Bestätigung der Deletion von <i>hlpA</i>
DhlpA_proof inside_r2	TTGAGCTTCTTCAGCATGTCCG	58	
DsbB_seq_f	TGCAGCAGACATCGTTACG	58	Analyse der Fragmentlänge und Sequenzierung des Genoms der PA14 <i>ΔdsbB</i> -Mutante
DsbB_seq_r	GAATCGAGGCATGGTGGTA	58	

Name	Sequenz (5' → 3')	Annealing-Temperatur [°C]	Verwendung
DdsbB_proof inside_r	GTGCTGGAGGTAGAGTACG	58	Bestätigung der Deletion von <i>dsbB</i>
DsbH_seq_f	TGAAGGATTCCGAACTGC	58	Analyse der Fragmentlänge und Sequenzierung des Genoms der PA14 Δ <i>dsbH</i> -Mutante
DsbH_seq_r	GCCTGAATACCGCTCAG	58	
DdsbH_proof inside_r	TCAGGCCGATCAGGATGAAG	58	Bestätigung der Deletion von <i>dsbH</i>

2.1.11 Kommerzielle Kits

Tabelle 13: Verwendete Kits von kommerziellen Unternehmen

Bezeichnung	Hersteller
peqGOLD Plasmid Miniprep Kit II	VWR, Darmstadt
QIAamp DNA Mini Kit	Qiagen, Hilden
Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System	Promega, Mannheim

2.1.12 Software

Tabelle 14: Verwendete Software

Bezeichnung	Hersteller
Adobe Photoshop CS5	Adobe Systems, Mountain View (USA)
Adobe Reader XI	Adobe Systems, Mountain View (USA)
Clone Manager 7.0	Sci-Ed Software, Denver (USA)
EndNote	Thomson Reuters, New York City (USA)
i-control 1.11 (for Tecan infinite reader)	Tecan, Crailsheim
Microsoft Office 2010 + 2016	Microsoft, Redmond (USA)
Prism 4.0	Graph Pad Software, San Diego (USA)
Snap Gene	GSL Biotech LLC, Chicago (USA)

2.2 Mikrobiologische Methoden

2.2.1. Anzucht der Bakterien

Die in dieser Arbeit verwendeten Stämme von *Pseudomonas aeruginosa* und *Escherichia coli* (siehe Tabelle 9: Verwendete Bakterienstämme) wurden einheitlich angezüchtet. In der Regel wurden die Bakterienstämme aus Kryokulturen angeimpft. Dazu wurde mit einer Impföse etwas Material von der gefrorenen Kultur abgenommen und in 5 ml LB-Medium in einem Reagenzglas gelöst. Besaß der Stamm Resistenzen, wurden dementsprechende AB beigefügt. Tabelle 15 zeigt die verwendeten Konzentrationen. Die Kultur wurde über Nacht (ÜN) bei 37°C und 200 rpm im Schüttelinkubator inkubiert.

Zur Anzucht von Bakterien auf LB-Agar-Platten, wurde das Material aus einer Kryokultur mit der Impföse auf eine Platte ausgestrichen. Wenn nötig, wurden vor dem Gießen der Platten AB in das Medium gegeben (siehe Tabelle 15:

Antibiotikakonzentration im Nährmedium). Die Platten wurden ÜN bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

Tabelle 15: Antibiotikakonzentration im Nährmedium

Antibiotikum	Konzentration im Flüssigmedium	Konzentration auf Agarplatten
Gentamicin	15 µg/ml	<i>E. coli</i> 15 µg/ml <i>Pa</i> 75 µg/ml
Irgasan	-	25 µg/ml

2.2.2 Kryokulturen für die Bakterienstammsammlung

Die Lagerung der Bakterienstämme erfolgte bei -80°C in LB-Medium mit 20 % Glycerin. Das Glycerin verhinderte, dass sich Kristalle im Zytoplasma bilden und die Zellen absterben. 5 ml ÜN-Kultur wurden bei 5000*g 10 Minuten zentrifugiert, der Überstand abgenommen und das Pellet in 3 ml LB, welches 20 % Glycerin enthielt, resuspendiert. 1 ml der Zellsuspension wurde in 1,5 ml Kryo-Tubes überführt und bei -80°C eingefroren.

2.2.3 Photometrische Bestimmung der Bakterienzahl

Zur Bestimmung von Wachstumskurven wurden die Bakterien in flüssigen ÜN-Kulturen angezüchtet. Am folgenden Tag wurde die optische Dichte (OD) der Kultur im Photometer bei einer Wellenlänge von 600 nm bestimmt. Dafür wurde ein Teil der ÜN-Kultur in einer Küvette im Verhältnis 1:20 mit LB verdünnt (50 µl Kultur + 950 µl LB). Aus der OD ließ sich die Anzahl der Bakterien in der Kultur berechnen. Eine OD₆₀₀ von 1 entspricht bei *Pa* 10⁹ Bakterien.

2.2.4 Testung auf Antibiotikasensitivität

Die Bakterienstämme wurden ÜN auf LB-Platten angezogen. Am nächsten Tag wurde eine Bakterienkolonie in 2ml 0,9 % NaCl-Lösung resuspendiert und auf einen McFarland-Standard von 0,5 eingestellt. Mit einem sterilen Wattestäbchen wurde die Bakterienlösung anschließend gleichmäßig auf Müller-Hinton-Agarplatten ausgestrichen. Darauf wurden mit Hilfe eines Stempels und einer Pinzette AB-Plättchen mit einem Durchmesser von 6 mm

platziert. Die verwendeten AB und ihre Konzentrationen können aus Tabelle 7 entnommen werden. Dann wurden die Platten ÜN bei 37°C inkubiert. Der Deckel der Petrischale zeigte während der Inkubation nach oben, um zu verhindern, dass sich die Plättchen vom Nährboden lösen. Am folgenden Tag wurde der Hemmhof vermessen. Dazu bestimmte man den gesamten Durchmesser der Zone um die AB-Plättchen, in der keine Bakterien gewachsen waren.

Der Wildtyp-Stamm PA14 (WT) und die PA14 Δ bamB-Mutante dienen als Kontrolle. Bei der Δ bamB-Mutante zeigte sich in vorausgegangenen Experimenten eine erhöhte Suszeptibilität gegenüber einer Reihe von AB, weshalb der Stamm als Positivkontrolle gut geeignet war.

2.2.5 Bile Salt Assay

Die Bakterien wurden als ÜN-Kulturen angezogen. Für den Versuch wurde eine 0,3 %-Lösung mit Gallensalzen (Bile Salts, BS) benötigt. Dazu wurden 15 g BS in 5 l LB gegeben und mit Hilfe eines Magnetrührers gelöst. Die Lösung wurde anschließend autoklaviert.

Am nächsten Tag wurde die Bakterienzahl bestimmt (siehe 2.2.3) und eine 24-Well-Platte mit 10^7 Bakterien in 1 ml LB bzw. 1 ml 0,3 % BS pro Well beimpft. Abbildung 4 zeigt schematisch die 24-Well-Platte mit diesem Versuchsaufbau. Die Platten wurden mit Deckel im Schüttelinkubator bei 37°C und 120 rpm für insgesamt 8 h inkubiert. Stündlich fand eine OD-Messung mit dem Tecan Reader statt (Wellenlänge 600 nm, 3x3 Messwerte pro Well). Für den Messvorgang wurde der Deckel der Platte entfernt, um Messfehlern durch Kondenswasser vorzubeugen.

Die Werte wurden tabellarisch und grafisch als Wachstumskurve dargestellt. Der WT diente als Negativkontrolle, da er sich in diesem Versuch resistent gegenüber Gallensalzen präsentierte, und die PA14 Δ bamB-Mutante als Positivkontrolle, welche sensibel mit vermindertem Wachstum reagierte.

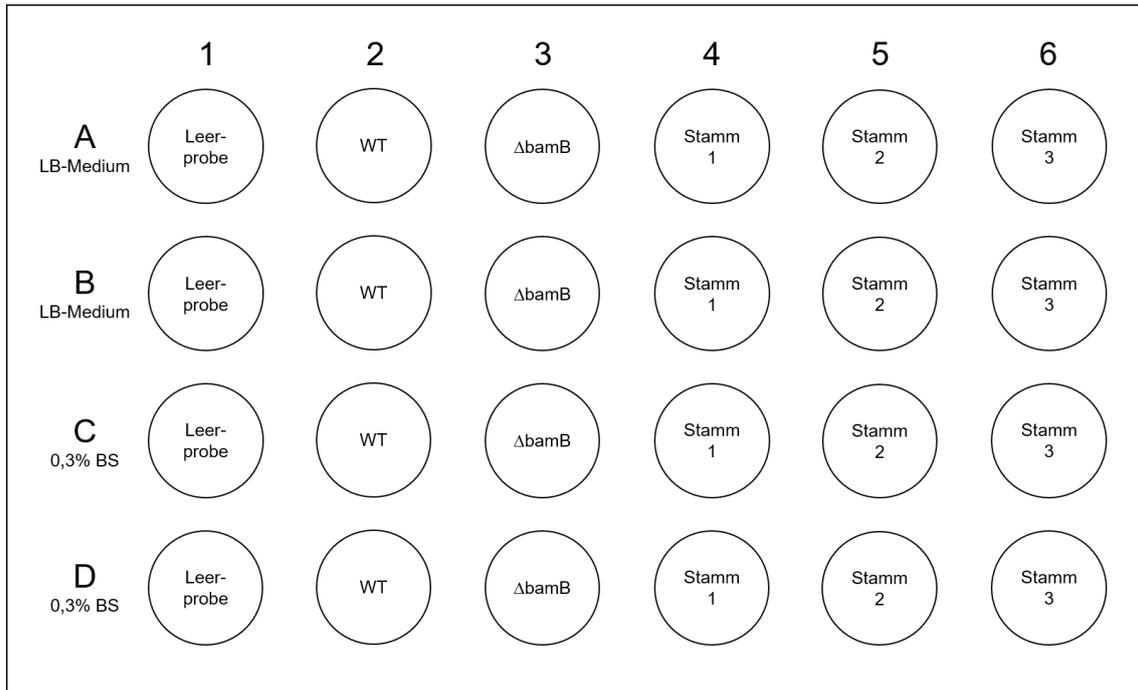


Abbildung 4: Schematischer Versuchsaufbau des Bile Salt Assays auf 24-Well-Platten. Reihe A und B wurden mit 1 ml LB-Medium gefüllt, Reihe C und D mit 1 ml 0,3 % BS. Spalte 1 blieb ohne Bakterien, um den Leerwert zu bestimmen. Spalte 2 und 3 wurden mit dem WT als Negativkontrolle bzw. der Δ bamB-Mutante als Positivkontrolle beimpft. In die verbleibenden Spalten 4-6 wurden die zu testenden Stämme gegeben. Jedes Well wurde initial mit 10^7 Bakterien beimpft.

2.2.6 Serum Killing Assay

Die Bakterien wurden in flüssigen ÜN-Kulturen angezogen. Am folgenden Tag wurden Subkulturen in 1:20-Verdünnung angesetzt (250 μ l ÜN-Kultur + 5 ml LB) und für zwei bis drei Stunden bei 37°C im Schüttelinkubator inkubiert. Anschließend wurde die Bakterienzahl bestimmt und aus den Subkulturen 5×10^7 Bakterien entnommen und in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Die Bakterien wurden mit 500 μ l PBS gewaschen und eine Minute bei 15300*g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet in 900 μ l PBS resuspendiert. Davon wurden je 5×10^6 Bakterien in zwei neue Eppendorf-Gefäße überführt und mit 10 % aktivem oder hitzeinaktiviertem Humanserum 30 min bei 37 °C auf einem Rollrad inkubiert. Das menschliche Serum wurde von gesunden Probanden gewonnen. Dazu wurde den Probanden Blut in Serum-Monovetten abgenommen und nach der Gerinnung für 10 min bei 4 °C und 2500*g zentrifugiert, sodass das Serum von den festen Bestandteilen des Blutes (Pellet) getrennt wurde. Der Überstand wurde als Aliquots (200 μ l) bei

einer Temperatur von -80 °C gelagert. Die Titer für IgG- und IgM-Antikörper gegen *Pa* wurden mittels ELISA getestet. Das Serum der Probanden, deren Antikörper-Titer negativ war, wurde gepoolt und für dieses Experiment verwendet. Um hitzeinaktiviertes Serum herzustellen, wurde es für 30 min bei 56 °C im Heizblock erhitzt.

Nach der Inkubation auf dem Rollrad wurden die Proben mit 100 µl BHI vermischt und 5 min auf Eis inkubiert, um die weitere Aktivität des Komplementsystems zu unterbinden. Aus diesen Ansätzen wurde schließlich eine Verdünnungsreihe (10^{-1} bis 10^{-5}) mit PBS hergestellt. Aus den Verdünnungsstufen 10^{-2} bis 10^{-5} wurden jeweils 100 µl auf einer LB-Platte ohne AB ausplattiert und ÜN bei 37 °C inkubiert.

Zur Auswertung des Versuchs wurden am nächsten Tag die Kolonien auf den Platten gezählt. Aus den Werten der technischen Replikate eines Stamms wurde für jede Verdünnungsstufe die mittlere Kolonienzahl berechnet. Diese Durchschnittswerte wurden anschließend entsprechend ihrer Verdünnungsstufe auf die Zahl der Kolonien einer unverdünnten Probe standardisiert. Aus den Werten wurde pro Stamm erneut ein Mittelwert (\bar{z}) bestimmt. Alle Berechnungen wurden für die Versuchsansätze mit hitzeinaktiviertem Serum (HIS) bzw. normalem Human-Serum (NHS) separat durchgeführt. Um das Wachstum der Bakterien in NHS und HIS zu vergleichen, wurde mit folgender Formel ein Prozentwert berechnet:

$$p = \frac{\bar{z}_{\text{NHS}} \times 100}{\bar{z}_{\text{HIS}}}$$

Der Wert p gibt an, wie viel Prozent der Bakterien in NHS überleben. Die Anzahl der Kolonien nach Inkubation in HIS wurde dazu als Referenz verwendet.

2.2.7 Herstellung chemisch kompetenter *E. coli* SM10 λpir

In 5 ml LB wurde eine ÜN-Kultur mit *E. coli* SM10 λpir angesetzt. Der Stamm wurde eingesetzt um den K.O.-Vektor per Konjugation auf *Pa* zu übertragen. Da er Sex-Pili bildet, war er dazu besonders geeignet.

Am nächsten Tag wurden 400 ml LB in einem 2 l umfassenden Erlenmeyer-Kolben vorbereitet und 4 ml aus der ÜN-Kultur hinzugegeben. Die Bakterien wuchsen bei 37 °C unter Schütteln bis zu einer OD₆₀₀ von 0,4-0,6. Zu diesem Zeitpunkt erreichte ihr Wachstum die logarithmische Phase. Die Kultur wurde dann auf acht 50 ml Falcon-Reaktionsgefäße aufgeteilt und für 20 min auf Eis gestellt. Danach wurden die Bakterien für 10 min bei 3000*g und 4 °C zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die Zellen wurden in 24 ml kaltem 0,1 M CaCl₂ resuspendiert, 30 min auf Eis inkubiert und anschließend erneut bei 3000*g und 4 °C für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 6,4 ml kaltem 0,1 M CaCl₂ mit 15 % Glycerin resuspendiert. Aliquots von 100 µl wurden in gekühlte 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäße abgefüllt, in flüssigem Stickstoff schockgefrostet und sofort bei -80 °C gelagert.

2.3 Molekularbiologische Methoden

2.3.1 Plasmid-Isolation

Die Bakterien wuchsen ÜN in 5 ml LB mit Gentamicin (siehe Tabelle 15). Am Tag darauf wurde das Plasmid mit dem peqGOLD Plasmid Miniprep Kit II nach dem Protokoll des Herstellers isoliert. Das Produkt wurde zweimal mit je 40 µl Braun H₂O eluiert, die Elutionen vereinigt und bei -20 °C aufbewahrt.

2.3.2 Isolation genomischer DNA (gDNA)

Die Anzucht der Bakterien erfolgte auf LB-Platten ÜN. Am nächsten Tag wurde mit dem QIAamp DNA Mini Kit die gDNA isoliert. Dabei wurde nach dem Protokoll des Herstellers verfahren und die gewonnene genomische DNA bei -20 °C gelagert.

2.3.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die PCR dient der Vervielfältigung von DNA-Sequenzen. Dies kann zu verschiedenen Zwecken eingesetzt werden. In dieser Arbeit wurde die PCR genutzt, um DNA-Fragmente für die Bakterien-Mutagenese herzustellen, die Länge von Fragmenten zu bestimmen und Bakterienkolonien zu screenen.

Abhängig vom Ziel des Experiments wurden unterschiedliche Polymerasen verwendet.

2.3.3.1 PCR mit KOD Polymerase

Um DNA-Fragmente für die Mutagenese der Bakterien zu generieren, wurde die KOD Hot Start DNA Polymerase eingesetzt. Sie besitzt eine zusätzliche 3'→5'-Korrekturlesefunktion, wodurch die Entstehung von Mutationen innerhalb der DNA-Sequenzen im Vergleich zur Taq-Polymerase stark reduziert ist. Als Matrize wurde genomische DNA der Bakterien oder Plamid-DNA verwendet. Tabelle 16 zeigt die Zusammensetzung der Reaktionsansätze.

Tabelle 16: Zusammensetzung der Reaktionsansätze bei der PCR mit KOD Polymerase

Bestandteil	Menge
10x Buffer for KOD Hot Start	5 µl
dNTPs (2 mM)	5 µl
MgSO ₄ (25mM)	4 µl
Forward-Primer [10 pmol]	0,5 µl
Reverse-Primer [10 pmol]	0,5 µl
Matrize	~ 100 ng (gDNA)
KOD Hot Start DNA Polymerase (1 U/µl)	0,5 µl
H ₂ O	33,5 µl
Gesamt	50 µl

Die PCR-Reaktionsgefäße wurden im Thermo-Cycler platziert und durchliefen folgendes Programm:

Tabelle 17: PCR-Programm bei der PCR mit KOD Polymerase

Reaktionsabschnitt	Temperatur	Dauer
Initiale Denaturierung	95 °C	3:00 min
Denaturierung	95 °C	20 s
Annealing	Siehe Tabelle 11	30 s
Elongation	70 °C	25 s/kb
Abschließende Elongation	70 °C	5:00 min
Pause	4 °C	∞

2.3.3.2 PCR mit Taq-Polymerase

Zur Fragmentlängenbestimmung und um Bakterienkolonien zu überprüfen, wurde die robustere und günstigere Taq-Polymerase verwendet. Als Matrizen dienten Plasmid-DNA, genomische DNA oder Zelllysate. Die folgende Tabelle zeigt die Zusammensetzung der Reaktionsansätze:

Tabelle 18: Zusammensetzung der Reaktionsansätze bei der PCR mit Taq-Polymerase

Bestandteil	Menge
Taq-Puffer mit 15 mM MgCl ₂	1 µl
dNTPs (10 mM)	0,2 µl
Forward-Primer [10 pmol]	0,5 µl
Reverse-Primer [10 pmol]	0,5 µl
Matrize	~ 100 ng (Plasmid-DNA) oder ~ 200 ng (gDNA)
Taq-Polymerase (5000 U/ml)	0,32 µl
H ₂ O	2,48 µl
Gesamt	10 µl

Die Ansätze durchliefen anschließend folgendes Programm im Thermo-Cycler:

Tabelle 19: PCR-Programm bei der PCR mit Taq-Polymerase

Reaktionsabschnitt	Temperatur	Dauer
Initiale Denaturierung	95 °C	5:00 min
Denaturierung	95 °C	30 s
Annealing	Siehe Tabelle 12	30 s
Elongation	70 °C	1:00 min/kb
Abschließende Elongation	70 °C	5:00 min
Pause	4 °C	∞

} 30 Wiederholungen

2.3.4 Kolonie-PCR

Um eine größere Anzahl von Klonen zu screenen, wurde die Kolonie-PCR eingesetzt. Teile der Kolonien wurden jeweils einzeln von der Agar-Platte entnommen, in 50 µl sterilem Wasser resuspendiert und für 5 min bei 95 °C erhitzt, um die Zellen zu lysieren. Um Zellreste von den löslichen DNA-Bestandteilen zu trennen, wurden die Lysate 5 min bei 1000*g zentrifugiert.

Vom resultierenden Überstand wurden 5 µl als Matrize für die PCR eingesetzt. Zusammensetzung und Ablauf der PCR entsprachen denen der PCR mit Taq-Polymerase (siehe Tabelle 18 und Tabelle 19).

2.3.5 Agarose-Gelelektrophorese

Das Ergebnis der PCR wurde mittels Gelelektrophorese im Agarose-Gel sichtbar gemacht. Dabei wurden die PCR-Produkte nach ihrer Größe getrennt. Für das 1%ige Agarose-Gel wurde Agarose in 0,5 % TBE-Puffer durch Aufkochen in der Mikrowelle vollständig gelöst und nach kurzem Abkühlen SYBR safe DNA gel stain im Verhältnis 1:10000 als Färbemittel hinzugegeben. Für ein kleines Gel waren 40 ml ausreichend. Das Agarosegel wurde in einen Schlitten mit entsprechendem Kamm gegossen und für mindestens 30 min abgekühlt. Die Geltaschen wurden jeweils mit 3 µl des PCR-Produkts und 2 µl Orange G Ladungspuffer beladen. Als Marker wurde Gene Ruler 1 kb Plus DNA Ladder (75-20.000 bp) oder Gene Ruler DNA Ladder Mix (100-10.000 bp) verwendet. Von diesen Markern wurden jeweils 5 µl in eine Tasche geladen. Die Gelelektrophorese wurde über 60 min bei 100 V mit 0,5 % TBE-Buffer als Laufpuffer durchgeführt und das Ergebnis anschließend mit dem Gel-Dokumentationssystem FAS-V dokumentiert.

2.3.6 Aufreinigung der PCR-Produkte

Die Produkte der PCR wurden mit dem Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System aufgereinigt. Dabei wurde nach dem Protokoll des Herstellers verfahren. Die DNA-Fragmente wurden am Ende mit 50 µl H₂O eluiert und schließlich bei -20 °C gelagert.

2.3.7 Transformation in chemisch kompetente Zellen

Als Transformation wird die Übertragung freier DNA in kompetente Bakterien bezeichnet. Die Möglichkeit *in vitro* DNA auf Zellen zu übertragen, spielt eine wichtige Rolle in der Gentechnologie. Meist werden Plasmide als Vektor verwendet.

In dieser Arbeit wurde das Plasmid pEXG2 verwendet, welches mit einer entsprechenden K.O.-Kassette versehen wurde (siehe Tabelle 10). Kapitel 2.2.7 erläutert die Herstellung chemisch kompetenter Bakterien. Um das Plasmid in chemisch kompetente *E. coli* zu transformieren, wurde ein Aliquot mit 100 µl der kompetenten Bakterien (*E. coli* DH5α oder *E. coli* SM10 λpir) auf Eis aufgetaut, 40-100 ng der Plasmid-DNA in das Reaktionsgefäß gegeben und durch Umrühren vorsichtig vermischt. Die Zellen wurden anschließend 30 min auf Eis inkubiert und dann für 30 s bei 42 °C im Heizblock hitzegeschockt. Nach einer weiteren Minute auf Eis wurde 1 ml vorgewärmtes SOC-Medium hinzugegeben und für 1 h bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Danach wurden 100 µl der Kultur auf einer Agar-Platte mit Gentamicin ausplattiert (Konzentration siehe Tabelle 15). Der Rest wurde 5 min bei 1000 g pelletiert, der Überstand verworfen, die Bakterien in 100 µl LB resuspendiert und ebenfalls auf einer Agar-Platte mit Gentamicin ausplattiert. Beide Platten wurden ÜN bei 37 °C bebrütet. Am nächsten Tag wurde mit Hilfe einer Kolonie-PCR (siehe 2.3.4) mit geeigneten Primern getestet, ob die Kolonien den zur Transformation eingesetzten Vektor aufgenommen haben.

2.3.8 Gibson-Klonierung

Die Methode der Gibson-Klonierung wurde in dieser Arbeit dazu verwendet, die durch PCR erzeugten und amplifizierten 1 kb Fragmente, die das zu deletierende Gen flankieren, sowie das durch eine PCR linearisierte Zielplasmid zu dem für die Mutagenese benötigten K.O.-Vektor zu verbinden. Die Plasmidkarten sind der beigefügten CD und in gedruckter Form dem Anhang zu entnehmen.

Die Gibson-Reaktion ist eine moderne Arbeitsweise zur Klonierung, die die Rekombination neuer DNA-Fragmente auf einen Schritt vereinfacht. Die Enzyme können gleichzeitig arbeiten, wodurch der Prozess um ein Vielfaches beschleunigt wird. Das grundsätzliche Verfahren der klassischen Rekombination mit überhängenden Enden („sticky ends“) und Ligation bleibt jedoch bestehen. Die Überhänge der Oligonukleotide sind in Tabelle 11 als kleingeschriebene Abschnitte gekennzeichnet. Sie sind 30 bp lang und

komplementär zu den Enden der Fragmente, mit denen sie verbunden werden sollen. Nach der Synthese der Fragmente mittels PCR (siehe 2.3.3.1) wurden alle Fragmente in einem Reaktionsgefäß zusammengebracht. Hinzu kam ein Mastermix, der eine 5'-3'-DNA-Exonuklease, eine 5'-3'-DNA-Polymerase und eine DNA-Ligase enthielt. Im ersten Teil der Reaktion wurden die 5'-Enden der doppelsträngigen Fragmente durch die Exonuklease abgespalten. Dadurch entstanden einsträngige Überhänge am 3'-Ende. Diese Überhänge legten sich an die komplementären Basen des DNA-Fragments an, an das sie gebunden werden sollten. Die DNA-Polymerase verlängerte die Stränge, um durch die Exonuklease entstandene Lücken zu verschließen. Schließlich verband die Ligase die beiden Fragmente. Abbildung 5 zeigt einen Überblick über die Reaktionsschritte:

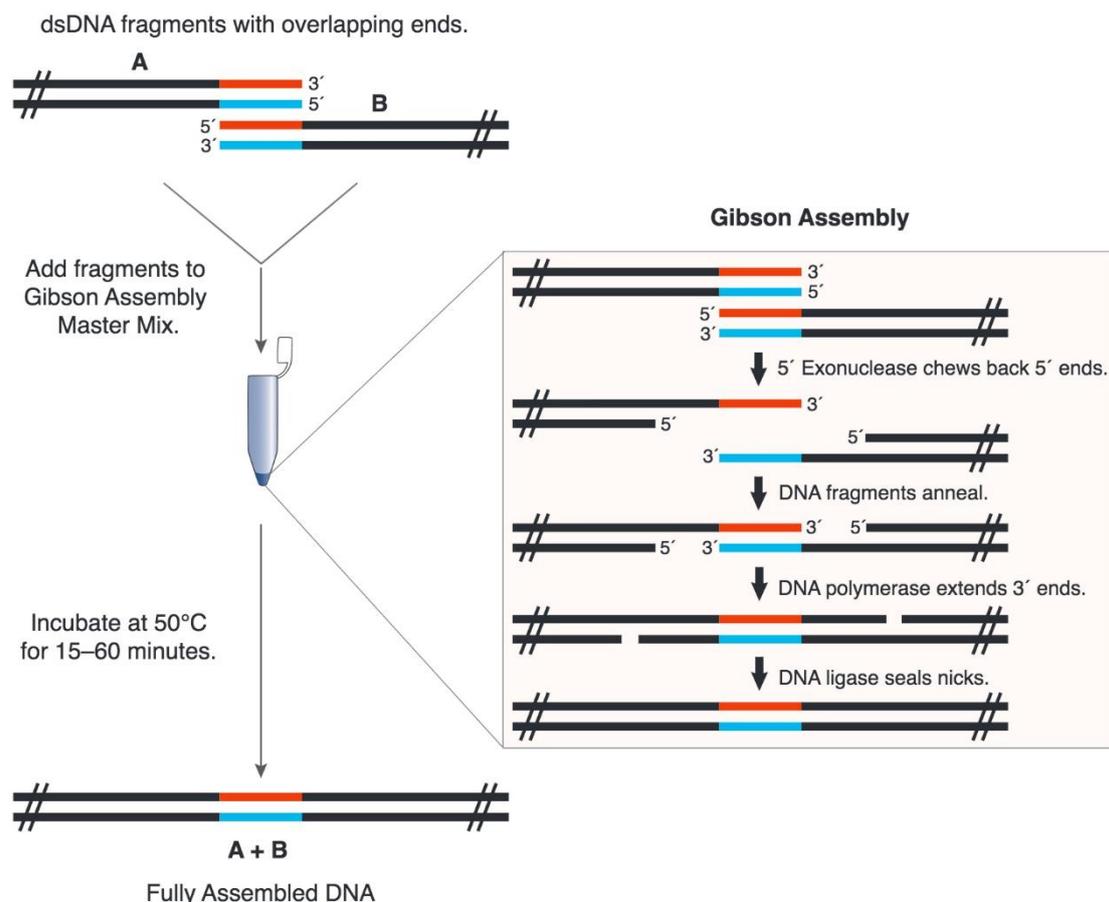


Abbildung 5: Grundprinzip der Gibson-Reaktion. Die zuvor synthetisierten doppelsträngigen DNA-Fragmente werden mit dem Gibson-Mastermix zusammengebracht. Die Reaktion wird bei 50°C durchgeführt. Zuerst werden die 5'-Enden durch die Exonuklease verdaut, die übrigbleibenden Einzelstrang-DNA-Fragmente lagern sich aneinander an und werden von der

Polymerase verlängert und schließlich durch die Ligase verbunden. Es entsteht ein neu kombiniertes DNA-Produkt. Aus: New England Biolabs Gibson Assembly Master Mix Instruction Manual; Produktnr. E2611. Mit freundlicher Genehmigung von New England Biolabs.

Die Fragmente aus der PCR mit KOD-Polymerase wurden zunächst aufgereinigt (wie in 2.3.6 beschrieben) und dann jeweils durch Zugabe von 1 µl des Restriktionsenzym DpnI verdaut (1 h bei 37 °C), um von der PCR verbliebene Matrizen-DNA zu entfernen. Anschließend wurde je 1 µl der beiden Fragmente (50-100 ng/µl), sowie dem linearisierten Plasmid (0,5 ng/µl) zu 15 µl Gibson-Mastermix hinzugegeben und 15-60 min bei 50 °C inkubiert. Der Gibson-Mix wurde selbst hergestellt und setzte sich aus Polymerase (2 U/µl), T5 Exonuclease (10 U/µl,) und Taq DNA-Ligase (40 U/µl) zusammen (Gibson et al. 2009).

2.3.9 Allel-Austausch

Ziel des Allel-Austauschs in dieser Arbeit war der Verlust eines bestimmten Gens im Laborstamm PA14. Dazu wurde der Allel-Austausch in zwei Schritten nach (Hmelo et al. 2015) durchgeführt: Das Target-Gen wurde durch die K.O.-Kassette auf dem pEXG2-K.O.-Vektor ausgetauscht. Nachdem der K.O.-Vektor sequenziert und bestätigt war, könnte der horizontale Gentransfer von *E. coli* SM10 λpir auf *Pseudomonas* PA14 induziert werden. Abbildung 6 zeigt das Prinzip dieses Austauschs.

Zunächst wurden ÜN-Kulturen des PA14-Wildtyps und *E. coli* SM10 λpir mit dem entsprechenden pEXG2-K.O.-Vektor angesetzt. Dem LB-Medium der *E. coli*-Kultur wurde entsprechend Tabelle 15 Gentamicin hinzugefügt. Am nächsten Tag wurde die PA14-WT-Kultur für 2 h im Wasserbad bei 42 °C inkubiert. Dieser Schritt war nicht zwingend notwendig, wirkte sich aber positiv auf die Konjugation aus. Danach wurden 300 µl der Bakterien mit ebenfalls 300 µl der *E. coli*-Kultur vermischt und anschließend 3 min bei 5000*g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 100 µl LB resuspendiert. Die Suspension wurde auf eine LB-Platte geben und ÜN bei 37 °C bebrütet.

Am folgenden Tag wurde das gesamte Bakterienmaterial mit einer Impföse von der Platte abgenommen und in 2 ml LB resuspendiert. Davon wurden 100 µl auf

einer LB/Irgasan/Gentamicin-Platte (Konzentrationen siehe Tabelle 15) ausplattiert, weitere 20 µl mit 80 µl LB verdünnt und ebenfalls ausplattiert. Die Platten wurden bei 37 °C bis zum nächsten Tag inkubiert.

Durch die verschiedenen AB auf der Agar-Platte war es nur für merodiploide *Pseudomonas*, welche das Plasmid durch Crossover in einem der beiden homologen Bereiche in ihr Genom integriert haben, möglich zu wachsen. *E. coli* wurden durch Irgasan abgetötet, *Pa* ohne Resistenzkassette (Plasmid) waren sensitiv für Gentamicin. Von den Kolonien wurden 12 gepickt, mittels Drei-Ösen-Ausstrich auf LB-Platten aufgetragen und ÜN bei 37 °C inkubiert. Die non-selektiven Platten erlaubten die Anhäufung von Bakterien, die bereits ein zweites Crossover vollzogen haben.

Von jedem der 12 Bakterien-Ausstriche wurden zwei Klone gepickt und als Drei-Ösen-Ausstrich auf NSLB-Platten mit 15 % Sucrose (siehe Tabelle 8) übertragen. Die Platten wurden bei 37 °C bis zum nächsten Tag bebrütet. Durch das Selektionsmedium sollten merodiploide *Pa* aussortiert werden. Das als Vektor eingesetzte Plasmid pEXG2 besitzt als selektives Gen *sacB*, welches für das Enzym Levansucrase kodiert. Dieses Enzym spielt eine wichtige Rolle bei der Metabolisierung von Sucrose und produziert dabei Levan. Der zytotoxische Metabolit führte folglich bei allen Bakterien, die das Plasmid noch besaßen, zum Tod. Auf diese Weise hatten *Pseudomonas*, die durch ein zweites Crossover das Plasmid wieder ausgestoßen haben, einen Selektionsvorteil.

Dennoch wuchsen einige *Pa* mit Plasmid auch auf diesen Selektionsplatten. Deshalb folgte ein weiterer Schritt zur Selektion. Am folgenden Morgen wurden jeweils vier Kolonien pro Ausstrich mit einer Pipettenspitze gepickt und auf LB/Gentamicin- und LB-Platten aufgetragen (AB-Konzentration siehe Tabelle 15). Nach einer Inkubation ÜN bei 37 °C ließ sich feststellen, welche Bakterien trotz einer Sucrose-Resistenz noch immer ein Plasmid besaßen, also resistent gegen Gentamicin waren, und bei welchen das doppelte Crossover erfolgreich ablief. Dieses Crossover fand jedoch, wie schon das erste, zufällig an einem der beiden homologen Abschnitte statt. Betraf es die gleiche Region wie beim ersten Crossover, veränderte sich das Genom des Bakteriums nicht, es blieb

WT. Fand die Überkreuzung in der anderen homologen Region statt, wurde das Gen durch die K.O.-Kassette des Plasmids ersetzt und es entstand die gewünschte Mutante.

Die Gentamicin-sensitiven Klone wurden mit Colony-PCR auf das Fehlen oder Vorhandensein des Gens überprüft.

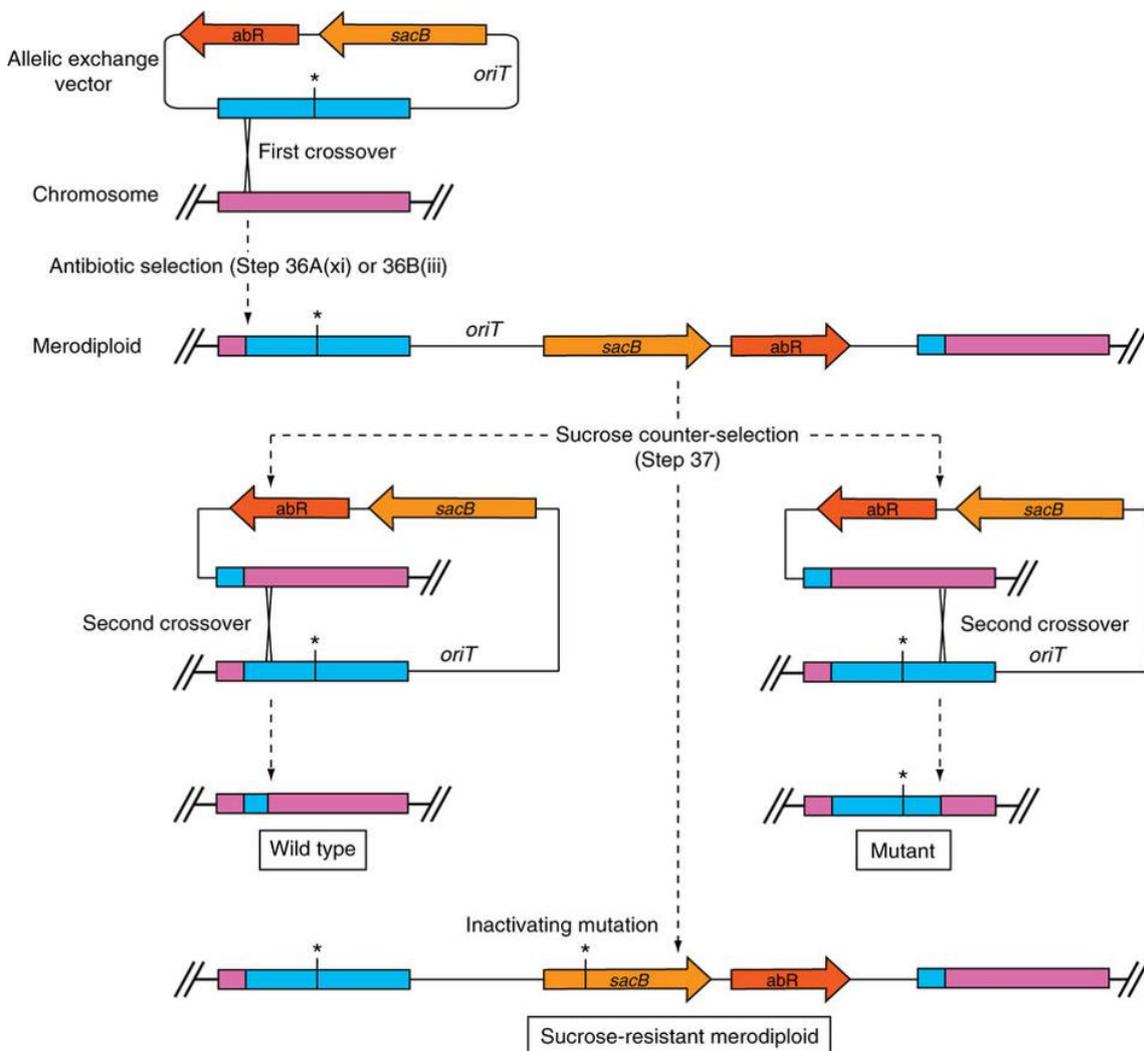


Abbildung 6: Schematische Übersicht zum Allel-Austausch. Der K.O.-Vektor, ganz oben zu sehen, trägt neben dem *sacB*-Gen auch eine Antibiotikaresistenzkassette (*abR*). Durch horizontalen Gentransfer wird er von *E. coli* SM10 λ pir auf *Pseudomonas* übertragen. Das erste Crossover geschieht kurz nach der Konjugation zufällig an einem der beiden homologen Abschnitte. Nun ist das Plasmid in das Genom integriert, das Bakterium ist merodiploid. Agarplatten mit Sucrose führen zu Selektionsdruck zugunsten eines zweiten Crossovers und somit zum Verlust des Plasmids aus den Bakterien. Daraus resultieren entweder WT- oder mutierte *Pseudomonas*. In einigen Fällen kann es jedoch zu Sucrose-resistenten Merodiploiden kommen. Um diese zu detektieren, wird die Sensitivität der Bakterien gegenüber Gentamicin getestet. Kolonien, die trotz des Antibiotikums wachsen, besitzen noch immer das Plasmid. Aus: Hmelo et al. (2015)

3 Ergebnisse

3.1 Mutagenese

Die Grundlage für die Experimente dieser Arbeit bildeten Deletions-Mutanten. An diesen wurde der Einfluss der Proteine BamC, HlpA, DsbB, DsbH und DsbA1 auf die AM-Biogenese und somit auf die Integrität der AM untersucht. Das Genom des *Pseudomonas*-Stamms PA14 wurde jeweils so verändert, dass die kodierende Sequenz, bis auf die ersten und letzten 15-30 bp, für je eines der Proteine fehlte. Dies führte dazu, dass die Bakterien nur noch ein kurzes, funktionsloses Peptid bildeten. Die Auswirkungen auf den Phänotyp der Bakterien, die aus dem Fehlen des jeweiligen Proteins resultierten, konnten anschließend mit ausgewählten Tests erfasst und mit dem WT verglichen werden.

Um die Mutanten zu generieren, wurden zunächst K.O.-Vektoren mithilfe der Gibson-Reaktion (siehe 2.3.8) synthetisiert und in *E. coli* transformiert (Kapitel 2.3.7). Anschließend fand ein Transfer des K.O.-Vektors mithilfe von Konjugation und der Allel-Austausch (siehe 2.3.9) in PA14 WT statt. Im Folgenden sind die Ergebnisse der einzelnen Schritte der Mutagenese genauer dargestellt.

3.1.1 Fragmentsynthese für die Gibson-Klonierung

Die K.O.-Vektoren wurden mithilfe der Gibson-Reaktion aus drei Elementen re-kombiniert: dem linearisierten pEXG2-Vektor und zwei Fragmenten, welche die flankierende Region am 5'- bzw. 3'-Ende des Gens, sowie dessen erste bzw. letzte Aminosäuren beinhalteten (siehe Tabelle 20). Die Fragmente wurden, wie in Kapitel 2.3.3.1 beschrieben, mittels PCR synthetisiert. Abbildung 7 veranschaulicht die Entstehung der Fragmente und ihre Verknüpfung im K.O.-Vektor. Der Forward-Primer zur Synthese des Upstream-Fragments band 800-1100 bp vor dem 5'-Ende des ausgewählten Gens im Genom des PA14 WT. Der Reverse-Primer saß 5-10 Basentriplets nach Beginn des Gens. Für die Synthese des Downstream-Fragments befand sich der Forward-Primer ebenfalls 5-10 Aminosäuren vor dem 3'-Ende des Gens und der Reverse-Primer

800-1100 bp dahinter. Details zur Länge der Up- und Downstream-Fragmente sind Tabelle 21 zu entnehmen. Beim Zusammenbau dieser beiden Fragmente im K.O.-Vektor entstand statt des gesamten Gens ein verkürztes Stück aus den ersten und letzten Aminosäuren, wie in Tabelle 20 aufgeführt. Dieses verkürzte Stück, auch Scar (Narbe) genannt, wird weiterhin transkribiert und translatiert. Es ist zu kurz, um die ursprüngliche Funktion des Proteins auszuüben, durch seinen Verbleib im Genom wird aber die Wahrscheinlichkeit unerwünschter regulatorischer Effekte auf die anliegenden Gene verringert.

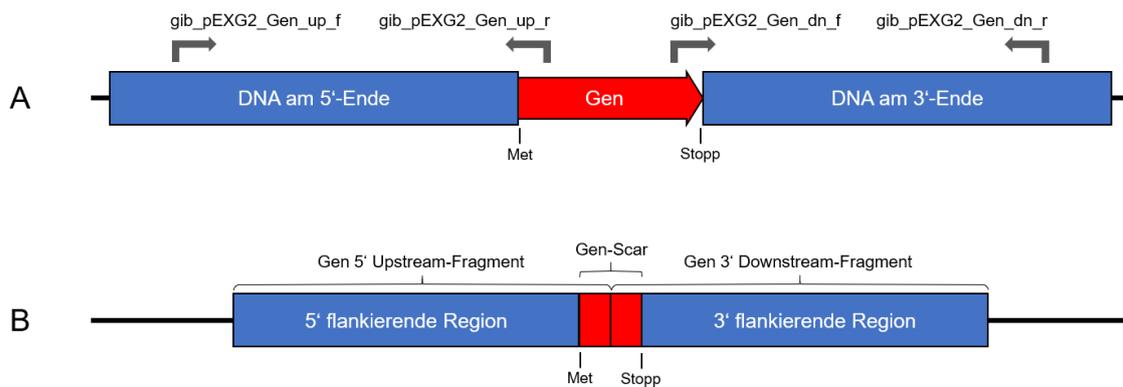


Abbildung 7: Primer-Bindungsstellen und grundlegendes Prinzip der Synthese der Gibson-Fragmente zur Erstellung von K.O.-Vektoren. (A) zeigt die Bindungsstellen der PCR-Primer zur Synthese der Gibson-Fragmente aus genomischer DNA im PA14 WT. Es entstehen zwei DNA-Fragmente, welche die flankierende Region am 5'- bzw. 3'-Ende des Gens, sowie dessen erste bzw. letzte Aminosäuren beinhalten. (B) Die beiden Fragmente werden mittels Gibson-Klonierung in ein Plasmid integriert. Dadurch entsteht ein verkürztes Stück des ursprünglichen Gens, das nur aus wenigen Basentriplets besteht. Flankiert wird der Scar (Narbe) von je 800-1100 bp Up- und Downstream-Sequenz für die spätere homologe Rekombination.

Tabelle 20: Größe, DNA- und Aminosäuresequenzen der verkürzten Gene

Verkürztes Gen	Größe	DNA-Sequenz	Aminosäure-Sequenz
<i>bamC</i>	36 bp	ATGAAGCGACTGGCTG GACTGACCGCCCAGTT CTGA	Met-Lys-Arg-Leu-Ala-Gly- Leu-Thr-Ala-Gln-Phe- Stopp

Verkürztes Gen	Größe	DNA-Sequenz	Aminosäure-Sequenz
<i>hlpA</i>	114 bp	GTGCGTAAGTTCACCG GCTACGACATGGTCATC GAGCGTGGCGCCGTGG TCGACGTCAAGCCGCA ATACGACATCACCCGCC AGGTGATCGAGCGGAT GAACCAGCTGCGTTGA	Val-Arg-Lys-Phe-Thr-Gly- Tyr-Asp-Met-Val-Ile-Glu- Arg-Gly-Ala-Val-Val-Asp- Val-Lys-Pro-Gln-Tyr-Asp- Ile-Thr-Arg-Gln-Val-Ile-Glu- Arg-Met-Asn-Gln-Leu-Arg- Stopp
<i>dsbB</i>	48 bp	TTGAGCGCTCTCCTCAA GAAGCTGGCGTTCGGC CGCCGCACCGCCTGA	Leu-Ser-Ala-Leu-Leu-Lys- Lys-Leu-Ala-Phe-Gly-Arg- Arg-Thr-Ala-Stopp
<i>dsbH</i>	30 bp	ATGCCCTGGCCAGCC TCCGACGTGCCTGA	Met-Pro-Leu-Ala-Ser-Leu- Arg-Arg-Ala-Stopp
<i>dsbA1</i>	60 bp	ATGCGTAACCTGATTCT CACCGCCATGCTGGAG AAAGAGCGCGCAGCGG CCAAGAAGTAG	Met-Arg-Asn-Leu-Ile-Leu- Thr-Ala-Met-Leu-Glu-Lys- Glu-Arg-Ala-Ala-Ala-Lys- Lys-Stopp

In Tabelle 21 sind die Größen der durch die PCR entstandenen Fragmente, sowie die verwendeten Primer aufgeführt. Details zu den Gen-spezifischen Primer-Paaren für die Synthese der Gibson-Fragmente sind Tabelle 11 zu entnehmen.

Tabelle 21: Primerpaare zur Fragmentsynthese für den K.O.-Vektor und Größe der Gibson-Fragmente

Fragmentname	Primer	Fragmentlänge
Linearisierter pEXG2-Vektor	<i>gib_uni_pEXG2_f</i>	5059 bp
	<i>gib_uni_pEXG2_r</i>	
<i>bamC</i> 5' Upstream-Fragment	<i>gib_pEXG2_BamC_up_f</i>	857 bp
	<i>gib_pEXG2_BamC_up_r</i>	
<i>bamC</i> 3' Downstream-Fragment	<i>gib_pEXG2_BamC_dn_f</i>	1061 bp
	<i>gib_pEXG2_BamC_dn_r</i>	
<i>hlpA</i> 5' Upstream- Fragment	<i>gib_pEXG2_HlpA up_f neu</i>	604 bp
	<i>gib_HlpA dn_HlpA up_r neu</i>	

Fragmentname	Primer	Fragmentlänge
<i>hlpA</i> 3' Downstream-Fragment	gib_HlpA up_HlpA dn_f neu	1220 bp
	gib_pEXG2_HlpA dn_r neu	
<i>dsbB</i> 5' Upstream-Fragment	gib_pEXG2_DsbB_up_f	1074 bp
	gib_pEXG2_DsbB_up_r	
<i>dsbB</i> 3' Downstream-Fragment	gib_pEXG2_DsbB_dn_f	1050 bp
	gib_pEXG2_DsbB_dn_r	
<i>dsbH</i> 5' Upstream-Fragment	gib_pEXG2_DsbH begin_f	915 bp
	gib_DsbH end_DsbH begin_r	
<i>dsbH</i> 3' Downstream-Fragment	gib_DsbH begin_DsbH end_f	842 bp
	gib_pEXG2_DsbH end_r	

Da das Gen für HlpA von den Genen, die für die essentiellen Proteine BamA (siehe 1.2.1) und LpxD (beteiligt an der LPS-Biosynthese (Badger et al. 2011)) kodieren, flankiert wird, kam es bei der Mutagenese zu Problemen. Deshalb musste der *hlpA*-K.O.-Vektor angepasst werden, indem Länge und Lokalisation der durch PCR synthetisierten Gibson-Fragmente im Vergleich zu den anderen K.O.-Vektoren modifiziert wurden. Aus diesem Grund enthielt das Downstream-Fragment das gesamte Nachbar-Gen *lpxD*, weil dessen Startcodon sich mit den Basen des Stopp-Codons von *hlpA* überschneidet. So ließ sich der Funktionsverlust des essentiellen Proteins beim Crossover im späteren Allel-Austausch verhindern, welcher letale Auswirkungen auf die Mutanten gehabt hätte.

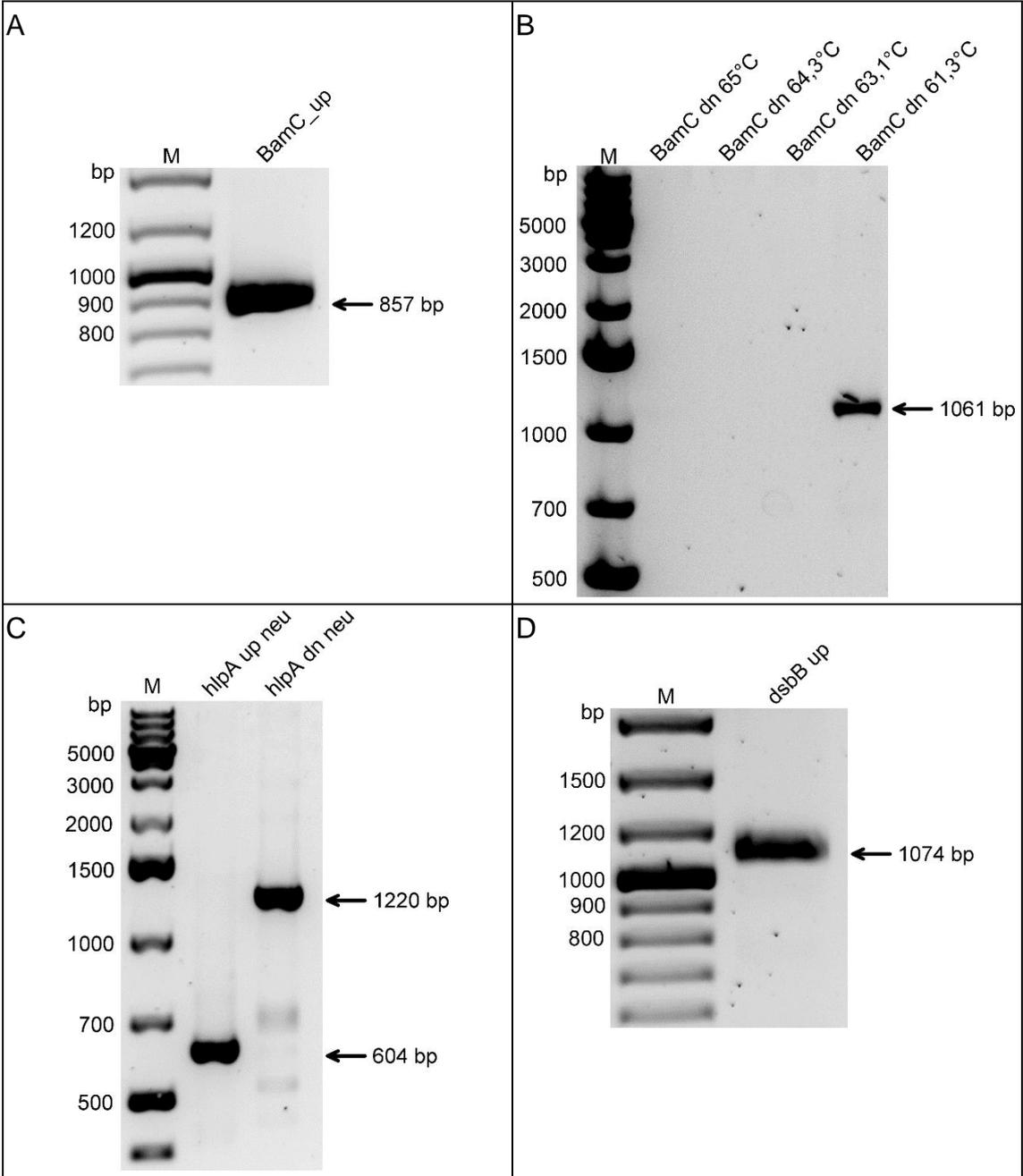
Der K.O.-Vektor für *dsbA1* wurde, im Gegensatz zu den anderen Vektoren im Rahmen dieser Arbeit, zunächst nur als theoretisches Konstrukt erstellt. Die Synthese erfolgte anschließend durch die Firma GenScript (Piscataway, USA) und konnte nach Erhalt direkt in *E. coli* DH5 α beziehungsweise in *E. coli* SM10 λ pir transformiert werden (siehe 2.3.7).

Die Planung der Konstrukte und Primerpaare wurden ausgehend vom PA14-Genom (NCBI Entry NC_008463.1) und den Gen-Lokationen aus Tabelle 22 mit den Programmen Clone Manager 7.0 und Snap Gene (siehe 2.1.12) erstellt. Die kompletten Plasmidkarten sind der beigefügten CD und in gedruckter Form dem Anhang (Abbildung 20 bis Abbildung 25) zu entnehmen.

Tabelle 22: Verwendete Sequenzen zur Erstellung der K.O.-Vektoren und Primer

Sequenz	Lokalisierung im PA14-Genom (bp)	Quelle
Genom PA14	-	NCBI (NC_008463.1)
pEXG2-Vektor	-	GeneBank (KM887143.1)
<i>bamC</i>	4554594 - 4555784	NCBI (PA14_51260)
<i>bamC</i> -flankierende Region 5'-Ende	4555785 - 4556596	
<i>bamC</i> -flankierende Region 3'-Ende	4553602 - 4554593	
<i>hlpA</i>	1472999 - 1473505	NCBI (PA14_17170)
<i>hlpA</i> -flankierende Region 5'-Ende	1472470 - 1472998	
<i>hlpA</i> -flankierende Region 3'-Ende	1473506 - 1474566	
<i>dsbB</i>	606944 - 607453	NCBI (PA14_07000)
<i>dsbB</i> -flankierende Region 5'-Ende	607454 - 608449	
<i>dsbB</i> -flankierende Region 3'-Ende	605984 - 606943	
<i>dsbH</i>	6189893 - 6190384	NCBI (PA14_69400)
<i>dsbH</i> -flankierende Region 5'-Ende	6190385 - 6191225	
<i>dsbH</i> -flankierende Region 3'-Ende	6189126 - 6189892	
<i>dsbA1</i>	6453853 - 6454488	NCBI (PA14_72450)
<i>dsbA1</i> -flankierende Region 5'-Ende	6454489 - 6455289	
<i>dsbA1</i> -flankierende Region 3'-Ende	6453052 - 6453852	

Abbildung 8 zeigt die Ergebnisse nach der Gelelektrophorese (siehe 2.3.5) zur Beurteilung der Größe PCR-Produkte. Die Banden entsprachen den erwarteten Fragmentlängen. Für die Synthese der Downstream-Fragmente von *bamC* und *dsbB* wurde die Annealing-Temperatur entlang eines Gradienten variiert, um die optimale Temperatur zur Anlagerung der Primer zu finden.



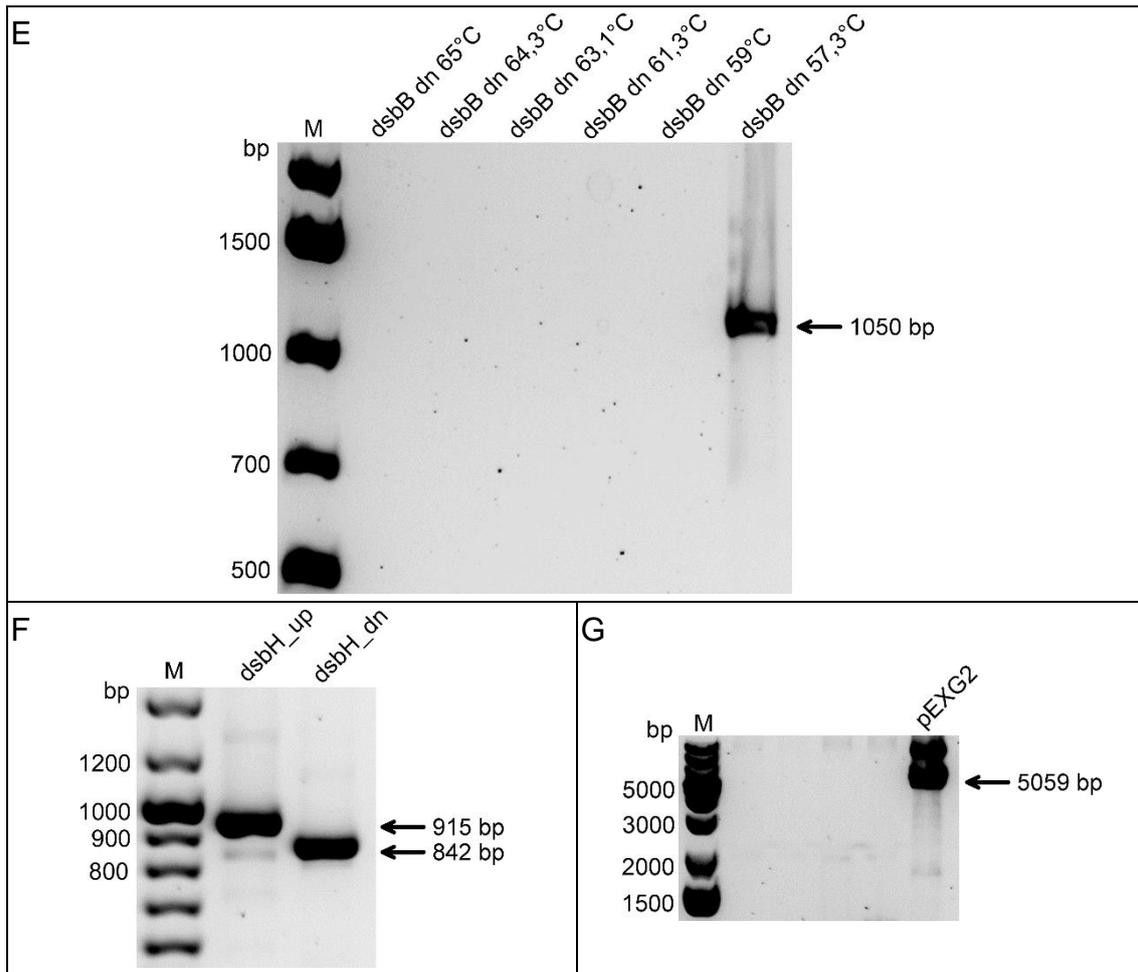


Abbildung 8: Längenanalyse der PCR-Produkte zur Fragmentsynthese für die Gibson-Klonierung. Die Bilder (A)-(G) zeigen Agarosegele der PCR-Produkte für den linearisierten K.O.-Vektor und die verschiedenen Up- und Downstream-Fragmente. (A) *bamC* Upstream-Fragment 857 bp, (B) *bamC* Downstream-Fragment 1061 bp, (C) *hlpA* Upstream-Fragment 604 bp, *hlpA* Downstream-Fragment 1220 bp, (D) *dsbB* Upstream-Fragment 1074 bp, (E) *dsbB* Downstream-Fragment 1050 bp, (F) *dsbH* Upstream-Fragment 915 bp, *dsbH* Downstream-Fragment 842 bp und (G) linearisierter pEXG2-Vektor 5059 bp. Bei der Synthese der Fragmente die auf den Bildern (B) und (E) dargestellt sind, wurden unterschiedliche Annealing-Temperaturen verwendet. Sie sind entsprechend in der Beschriftung angegeben.

3.1.2 Zusammenbau nach Gibson und Transformation

Die Rekombination der neu synthetisierten DNA-Fragmente, sowie des linearisierten Vektors pEXG2 erfolgte durch die Gibson-Reaktion (siehe 2.3.8). Für den effizienten Zusammenbau zu einem Plasmid wurden die PCR-Produkte zunächst, wie in 2.3.6 beschrieben, aufgereinigt und mit dem Restriktionsenzym DpnI verdaut. DpnI schneidet methylierte DNA und entfernt dadurch übrig gebliebene Matrizen-DNA.

Das Produkt der Gibson-Klonierung wurde anschließend in chemisch kompetente *E. coli* DH5 α (Tabelle 9) transformiert. Durch eine Kolonie-PCR (siehe 2.3.4) wurde der Erfolg des Gibson-Zusammenbaus und der Transformation überprüft. Dafür wurden die Sequenzierprimer pEXG2_seq_f und pEXG2_seq_r (Tabelle 12) verwendet. Sie binden, wie Abbildung 9 zeigt, am Vektor außerhalb der mittels Gibson eingebauten K.O.-Kassette und konnten deshalb für alle in dieser Arbeit erstellten K.O.-Vektoren verwendet werden. Für jedes Konstrukt lieferten sie ein PCR-Produkt von charakteristischer Länge, welche in Tabelle 23 aufgeführt sind. Wurden die Fragmente aus Kapitel 3.1.1 bei der Gibson-Reaktion nicht erfolgreich rekombiniert, entstand lediglich das ursprüngliche pEXG2-Plasmid. Dieser Leervektor enthielt keine K.O.-Kassette und lieferte daher ein deutlich kürzeres PCR-Produkt (siehe Tabelle 23).

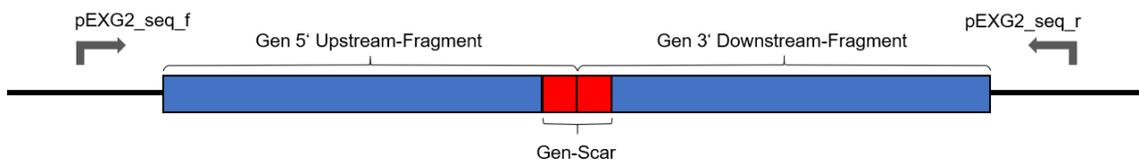


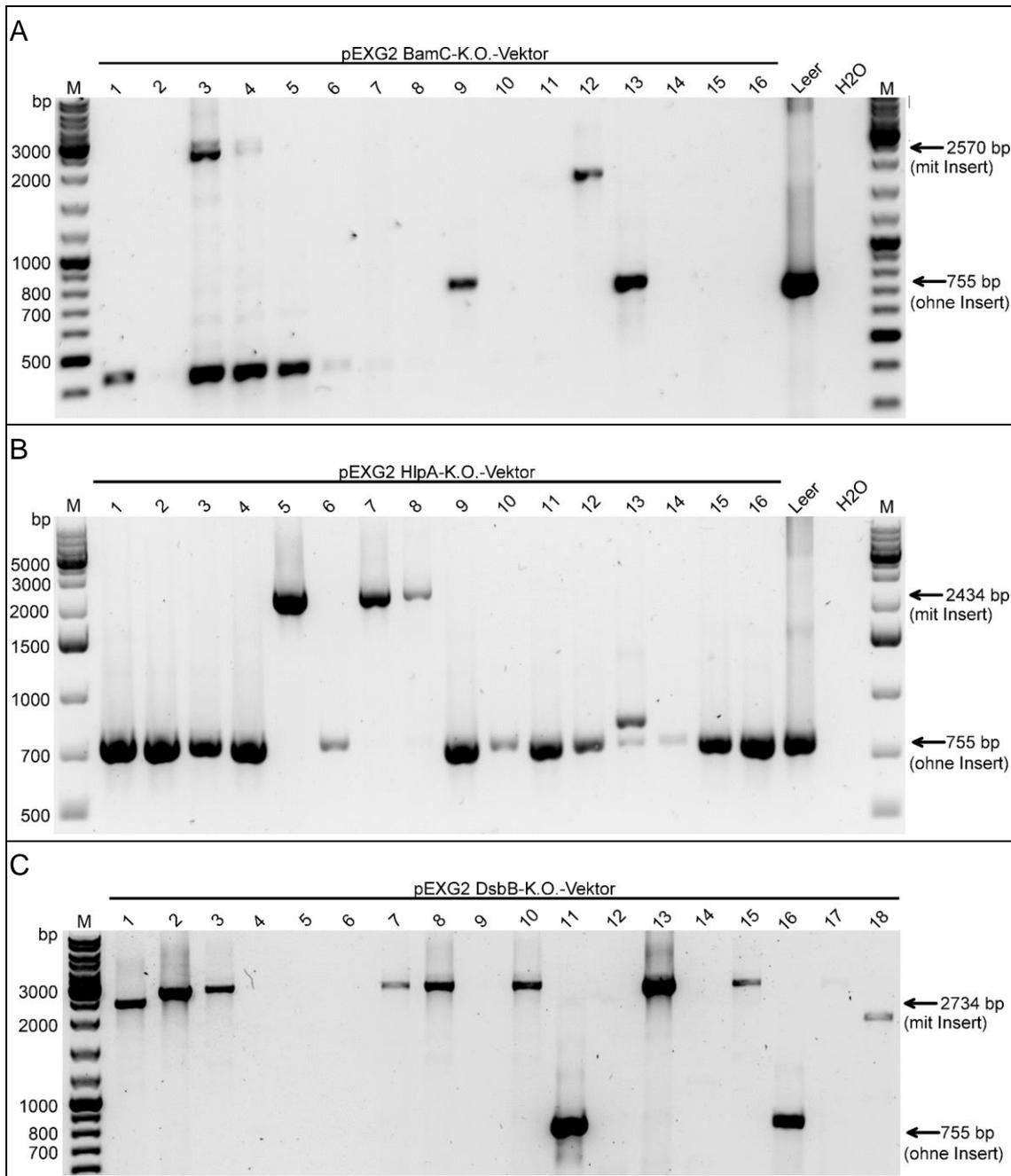
Abbildung 9: Bindungsstellen der Sequenzierprimer bei der Kolonie-PCR zur Überprüfung der Gibson-Reaktion und Transformation in *E. coli*. Die Primer binden einige Basen neben der K.O.-Kassette auf dem Plasmid. So entstehen Fragmente, deren Größe spezifisch für die K.O.-Vektoren der verschiedenen Gene ist. War die Gibson-Reaktion nicht erfolgreich, fehlt diese Kassette und das resultierende PCR-Produkt ist deutlich kürzer.

Tabelle 23: Größe der PCR-Fragmente nach der Transformation in *E. coli*

Vektor	Fragmentlänge
Leervektor	755 bp
pEXG2 <i>bamC</i> -K.O.-Vektor	2570 bp
pEXG2 <i>hlpA</i> -K.O.-Vektor	2434 bp
pEXG2 <i>dsbB</i> -K.O.-Vektor	2734 bp
pEXG2 <i>dsbH</i> -K.O.-Vektor	2368 bp

Die Ergebnisse der Kolonie-PCR nach der Transformation des Plasmids in *E. coli* DH5 α sind in Abbildung 10 zu sehen. Die getesteten Kolonien wurden aus Gründen der Übersichtlichkeit nummeriert. Für jedes genspezifische K.O.-Plasmid zeigten sich nach der Gelelektrophorese mehrere Banden von

korrekter Größe. Von der zugehörigen Bakterienkolonie wurde eine ÜN-Kultur angelegt und die Plasmide entsprechend Kapitel 2.3.1 isoliert.



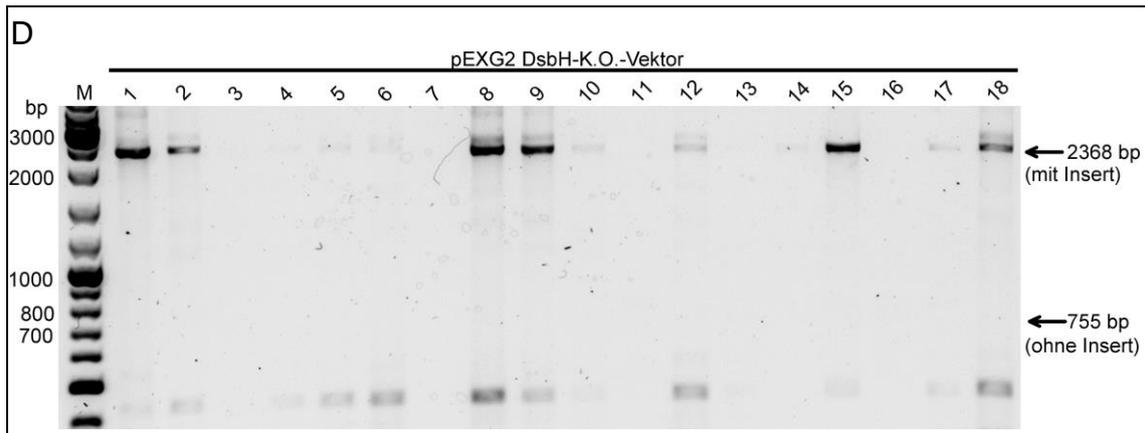
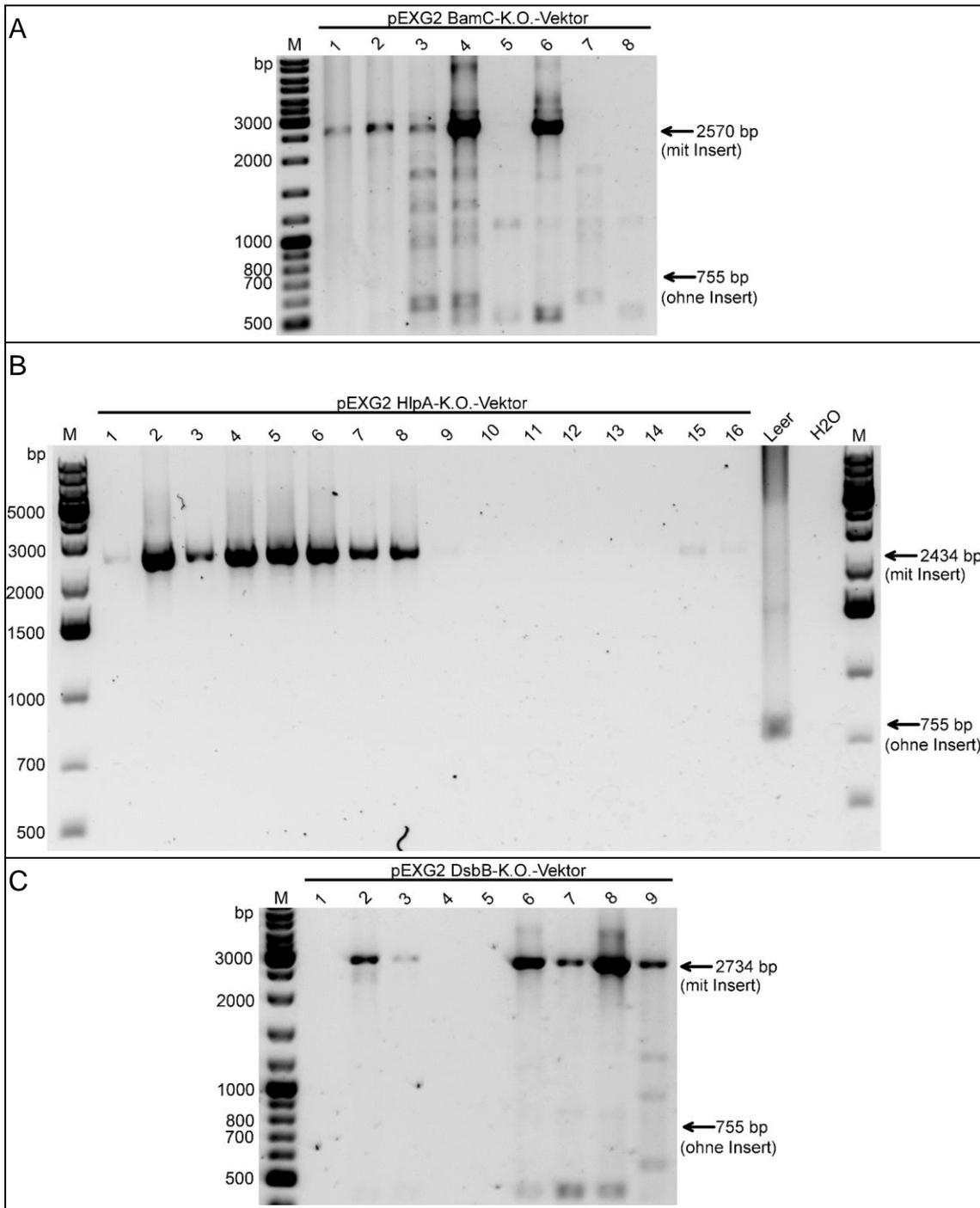


Abbildung 10: Längenanalyse der PCR-Produkte verschiedener Kolonie-PCRs nach Transformation der Plasmide in *E. coli* DH5 α . Die Produkte der Gibson-Reaktion wurden in chemisch kompetente *E. coli* DH5 α transformiert. Um den Erfolg des Zusammenbaus zu überprüfen, wurden einzelne Klone mittels Kolonie-PCR getestet. Die Bilder (A)-(D) zeigen die Gele nach der Elektrophorese. Als Negativkontrolle diente eine PCR mit dem Leervektor pEXG2 als Template (755 bp). Kolonien, deren PCR zu einer Bande auf gleicher Höhe führt, besitzen demnach nicht das gewünschte K.O.-Plasmid. Die einzelnen Klone wurden für eine leichtere Zuordnung nummeriert. Nach korrekter Rekombination der Gibson-Fragmente zeigen sich bei (A) *bamC* Banden von 2570 bp Länge, (B) *hlpA* Banden von 2434 bp Länge, (C) *dsbB* Banden von 3734 bp Länge und (D) *dsbH* Banden von 2368 bp Länge.

Der *E. coli*-Stamm DH5 α wurde für die Propagation und Lagerung der generierten Plasmide verwendet, ist jedoch nicht in der Lage, Sexpili zur Konjugation mit PA14 auszubilden. Er konnte demnach den K.O.-Vektor nicht in *Pseudomonas aeruginosa* übertragen. Also musste eine zweite Transformation des Plasmids in *E. coli* SM10 λ pir (Tabelle 9) stattfinden, die zu dieser Konjugation befähigt waren. Die Transformation des K.O.-Plasmids in die chemisch kompetenten *E. coli*-Stämme DH5 α und SM10 λ pir wurde entsprechend dem Protokoll in Kapitel 2.3.7 durchgeführt.

Um den Erfolg der Transformation zu überprüfen, wurden die Bakterienkolonien wieder mittels Kolonie-PCR getestet. Wie zuvor wurden die Sequenzierprimer pEXG2_seq_f und pEXG2_seq_r (Tabelle 12) verwendet, die Längen der Fragmente entsprechen den in Tabelle 23 aufgeführten Größen. Abbildung 11 zeigt die Ergebnisse der Kolonie-PCR nach der Gelelektrophorese. Für jeden Gen-spezifischen K.O.-Vektor konnten Kolonien nachgewiesen werden, die das gewünschte Plasmid beinhalten.



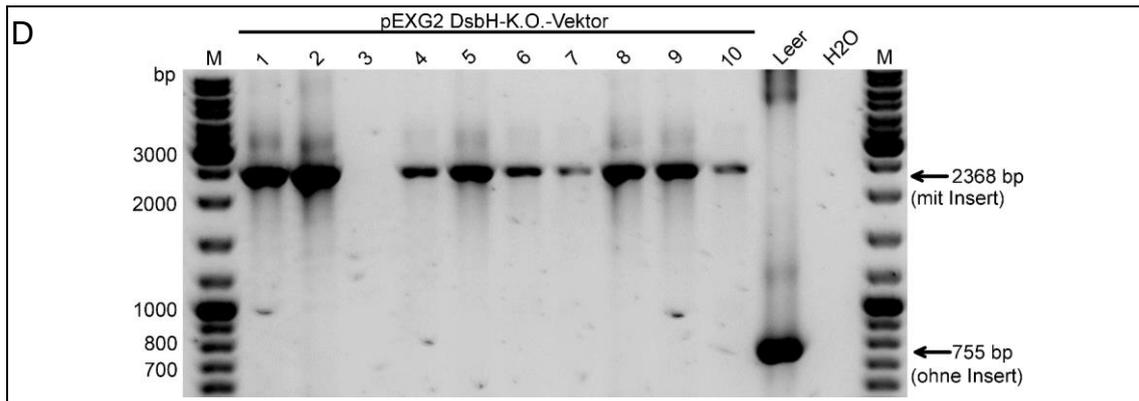


Abbildung 11: Längenanalyse der PCR-Produkte aus der Kolonie-PCR nach Transformation der Plasmide in *E. coli* SM10 λ pir. Die aus *E. coli* DH5 α isolierten Plasmide wurden in chemisch kompetente *E. coli* SM10 λ pir transformiert. Anschließend wurden die Klone mit Hilfe einer Kolonie-PCR überprüft. Die Bilder (A)-(D) zeigen die Gele nach der Elektrophorese. Die Kolonien wurden für einen besseren Überblick mit Nummern versehen. Wurde der Vektor von den Bakterien nicht aufgenommen, ist keine Bande zu sehen. Für das erwartete Plasmid zeigen sich bei (A) *bamC* Banden von 2570 bp Länge, (B) *hlpA* Banden von 2434 bp Länge, (C) *dsbB* Banden von 3734 bp Länge und (D) *dsbH* Banden von 2368 bp Länge.

Um zu gewährleisten, dass die K.O.-Plasmide keine Fehler enthielten, die etwa bei der PCR-Amplifikation entstanden waren, wurden sie sequenziert. Dazu wurden zunächst die Plasmide der Kolonien, die bei der Kolonie-PCR (Abbildung 11) eine Bande auf der richtigen Höhe zeigten, wie in Abschnitt 2.3.1 beschrieben isoliert. Anschließend wurden die Plasmide, den Anforderungen der Firma entsprechend, an GATC Biotech geschickt und dort sequenziert. Mithilfe der zugehörigen Sequenzierprimer (Tabelle 12) entstanden dort Sequenzen, die unter Verwendung des Programms Clone Manager (Tabelle 14) mit den theoretischen Konstrukten verglichen wurden (Alignment). Die *E. coli*-Klone, bei denen die korrekte Sequenz des K.O.-Vektors bestätigt wurde, konnten nun für den Allel-Austausch mit *Pseudomonas aeruginosa* PA14 verwendet werden.

3.1.3 Allel-Austausch

Durch den Allel-Austausch sollte das jeweilige Ziel-Gen (*bamC*, *hlpA*, *dsbB*, *dsbH*, *dsbA1*) im Genom von PA14 bis auf eine kurze Scar-Sequenz entfernt werden. Der Austausch basierte auf homologer Rekombination der 5'- und 3'-flankierenden Regionen auf dem K.O.-Plasmid (siehe Abbildung 7) und dem WT-Genom. Das entsprechende Gen wurde durch die spezifische K.O.-

Kassette des pEXG2-Vektors ersetzt, sodass davon nur ein Gen-Scar bestehen blieb. Die Sequenzen der verkürzten Gene sind in Tabelle 20 aufgeführt. Der Gen-Scar wird weiterhin exprimiert, ist allerdings nicht mehr funktional, da die relevante Proteinregion fehlt.

Durch horizontalen Gentransfer wurde das zuvor synthetisierte K.O.-Plasmid von *E. coli* SM10 λ pir auf PA14 übertragen. Es folgte der Allel-Austausch in zwei Schritten auf Selektionsnährmedien. Die beiden notwendigen homologen Rekombinationen fanden demnach nicht gleichzeitig, sondern nacheinander statt. Die einzelnen Schritte des Allel-Austauschs nach dem Protokoll von Hmelo et al. (2015) sind in Kapitel 2.3.9 beschrieben, Abbildung 6 zeigt den Ablauf der Rekombination schematisch.

Neben den K.O.-Mutanten, denen nur ein einzelnes Gen fehlt, wurde außerdem eine Doppel-K.O.-Mutante $\Delta dsbB\Delta dsbH$ erstellt. Vorausgegangene Studien der belgischen Arbeitsgruppe um Isabelle Arts (Arts et al. 2013) hatten gezeigt, dass von Einzel-K.O.-Mutanten der beiden Gene keine phänotypische Veränderung zu erwarten war. Die ließ sich auf eine funktionelle Redundanz der beiden Proteine zurückführen (siehe 1.2.3). Grundlage der Doppel-K.O.-Mutante bildete die bestätigte $\Delta dsbB$ -Mutante. Diese wurde analog zum oben beschriebenen Allel-Austausch (siehe auch 2.3.9) an Stelle des PA14 WT eingesetzt. Zur Paarung diente der *E. coli* SM10 λ pir-Stamm, der das pEXG2-Plasmid mit der *dsbH*-K.O.-Kassette enthielt.

Nach Abschluss des Matings wurden die Gentamicin-sensitiven Kolonien mit Hilfe einer Kolonie-PCR getestet. Bei den Bakterien, die nicht in der Lage waren, auf Agar-Platten mit Gentamicin zu wachsen, musste die zweite Rekombination erfolgreich abgelaufen sein und das Plasmid mit der Gentamicinresistenz-Kassette befand sich nicht mehr in den Zellen. Aus der zweiten Rekombination ergaben sich zwei mögliche Auswirkungen auf das Bakterium: Entweder das zweite Crossover fand im gleichen flankierenden Abschnitt wie das erste statt, dann entsprach das Genom dem WT. Die zweite Möglichkeit war eine Rekombination der jeweils anderen Region, also das erste Crossover in der 5' flankierenden Region und das zweite Crossover im 3' flankierenden Abschnitt des Ziel-Gens oder vice versa. In diesem Fall wurde

das Gen durch die funktionslose Scar-Sequenz der K.O.-Kassette des Plasmids ersetzt und es entstand die gewünschte K.O.-Mutante. Abbildung 12 präsentiert eine Übersicht zum Ablauf dieses Allel-Austauschs.

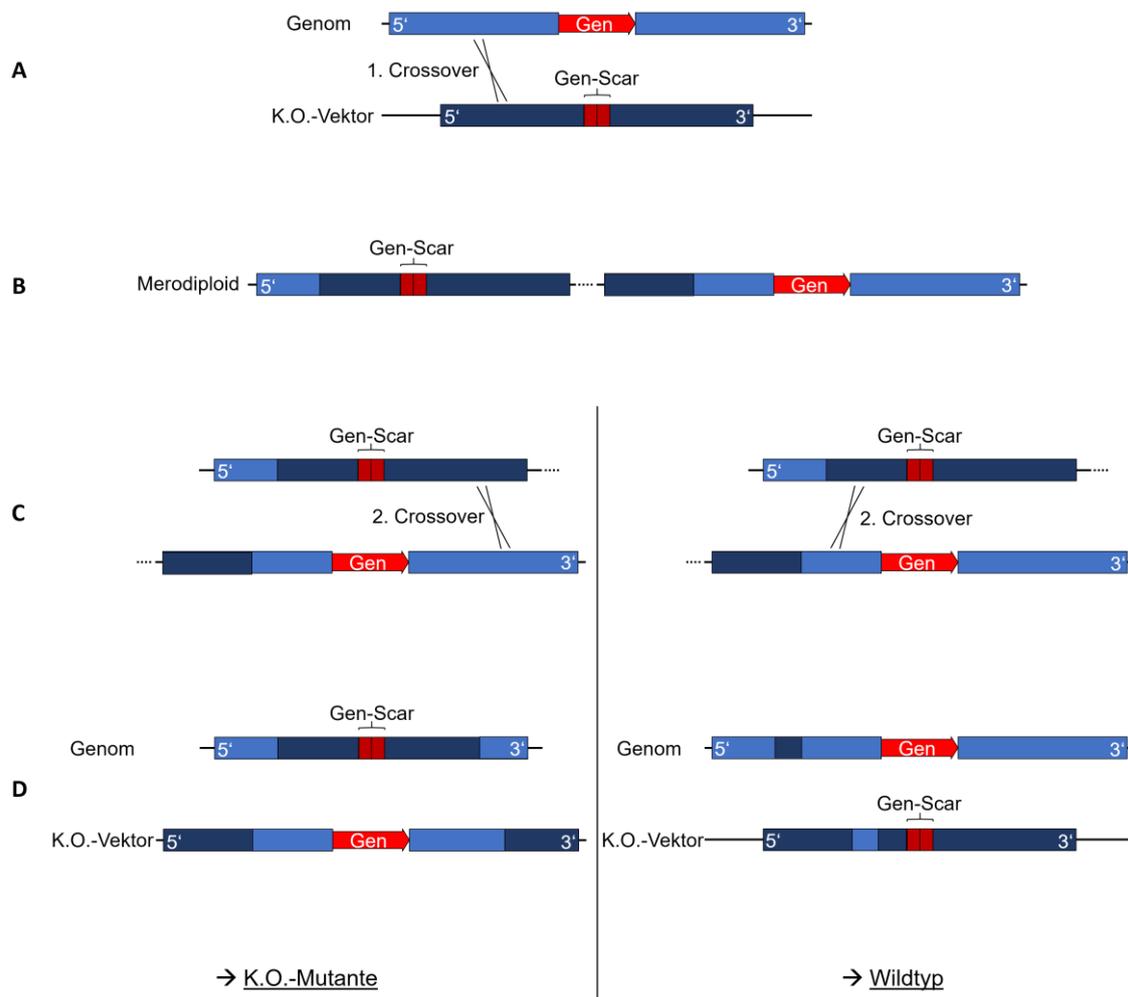


Abbildung 12: Prinzip des Allel-Austauschs. Die Grundlage des Austauschs bildet die homologe Rekombination im Bereich der 5'- und 3'-flankierenden Regionen des Ziel-Gens zwischen dem K.O.-Plasmid und der WT-DNA. Das Gen soll durch die K.O.-Kassette des pEXG2-Vektors ersetzt werden, sodass nur ein Gen-Scar bestehen bleibt. Dieser Scar wird weiterhin exprimiert, ist allerdings nicht mehr funktional. Das K.O.-Plasmid wird durch horizontalen Gentransfer von *E. coli* SM10 λ pir auf PA14 übertragen. Es folgt der Allel-Austausch in zwei Schritten auf Selektionsnährmedien. (A) Das erste Crossover geschieht kurz nach der Konjugation zufällig in einem der beiden homologen Abschnitte. Durch die Integration des Plasmids in das Genom von PA14 ist das Bakterium merodiploid (B). Im nächsten Schritt wird durch das Nährmedium Selektionsdruck auf die Zellen ausgeübt. Dieser wirkt zugunsten eines zweiten Crossovers, das zum Verlust des Plasmids führt. (C) Die zweite Rekombination geschieht, wie die erste, an zufälliger Stelle. Daraus ergeben sich zwei Möglichkeiten: Entweder findet das zweite Crossover im gleichen flankierenden Abschnitt wie das erste statt, dann entspricht das Genom bezüglich des Ziel-Gens dem des WT (D rechts). Die zweite Möglichkeit ist eine Rekombination der jeweils anderen Region, also das erste Crossover in der 5' flankierenden Region und das zweite Crossover im 3' flankierenden Abschnitt des Ziel-Gens oder vice versa. So wird das Gen durch die K.O.-Kassette des Plasmids mit dem Gen-Scar ersetzt und es entsteht die gewünschte Mutante (D rechts).

Durch die Kolonie-PCR konnten WT und Mutanten differenziert werden. Wie Abbildung 13 zeigt, banden die genspezifischen Sequenzierprimer in den flankierenden Regionen. Weitere Informationen zu den hier verwendeten Primerpaaren, sowie die erwarteten Längen der Fragmente für WT und Mutanten, sind in Tabelle 12 und Tabelle 24 zu finden.

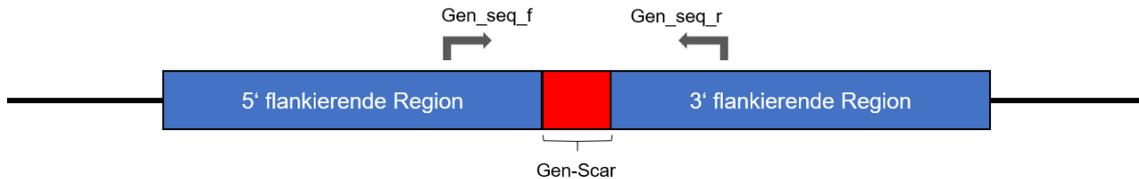


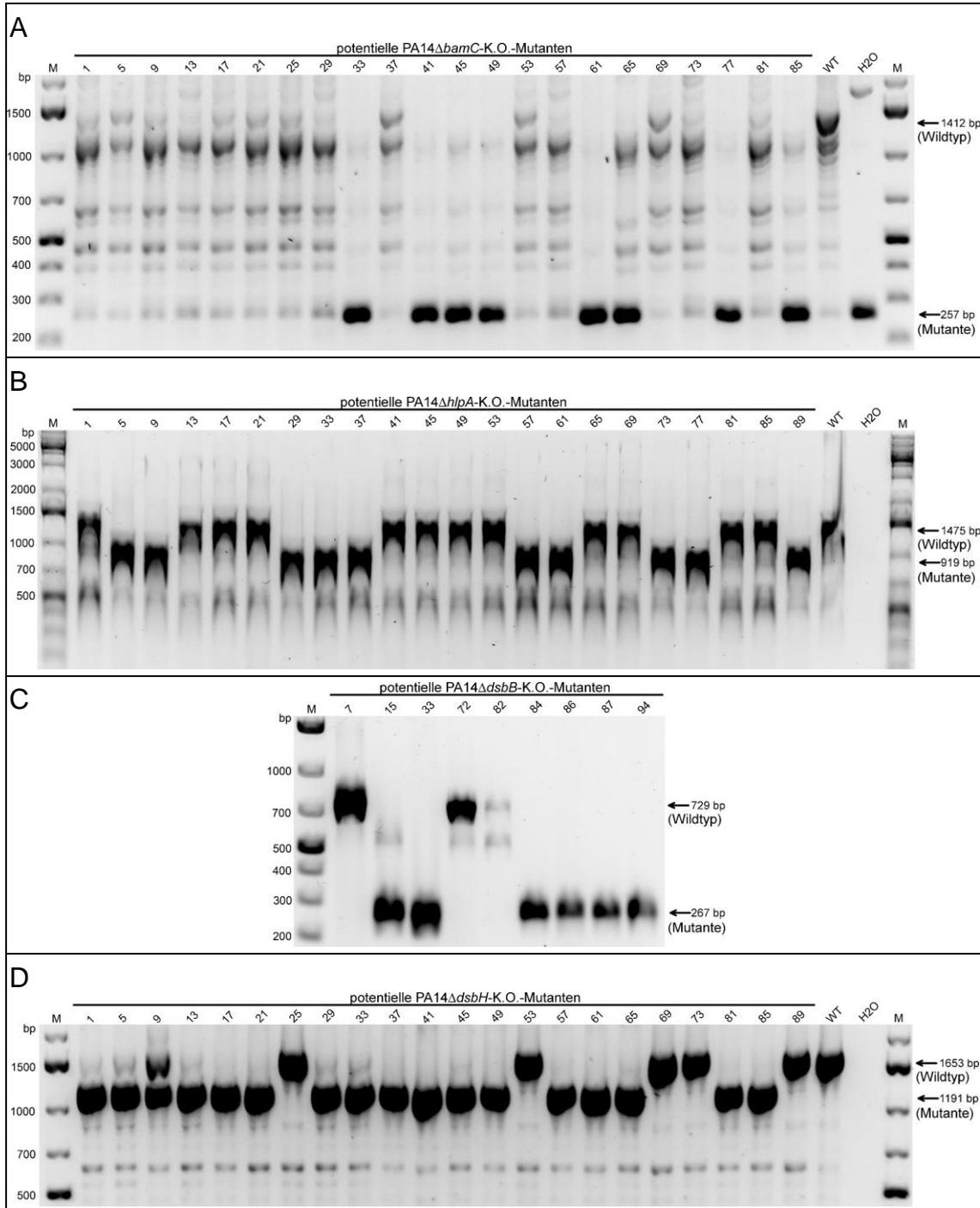
Abbildung 13: Bindungsstellen der genspezifischen Sequenzierprimer bei der Kolonie-PCR zur Überprüfung des Allel-Austauschs. Die Primer binden in der 5'- bzw. 3'-flankierenden Region des Gens. Wurde das Gen im Genom des Bakteriums durch die K.O.-Kassette mit dem Gen-Scar ersetzt, resultiert bei der PCR ein kleineres Fragment als bei der Wildtyp-DNA.

Tabelle 24: Primerpaare und Größe der Fragmente zur Überprüfung des Allel-Austauschs mittels Kolonie-PCR

Beschreibung	Primer	Fragmentlänge	
		WT	Mutante
Kolonie-PCR der potentiellen $\Delta bamC$ -Mutanten	bamC_seq_f	1412 bp	257 bp
	bamC_seq_r		
Kolonie-PCR der potentiellen $\Delta hlpA$ -Mutanten	hlpA_seq_f	1475 bp	919 bp
	hlpA_seq_r_neu		
Kolonie-PCR der potentiellen $\Delta dsbB$ -Mutanten	dsbB_seq_f	729 bp	267 bp
	dsbB_seq_r		
Kolonie-PCR der potentiellen $\Delta dsbH$ -Mutanten	dsbH_seq_f	1653 bp	1191 bp
	dsbH_seq_r		
Kolonie-PCR der potentiellen $\Delta dsbB\Delta dsbH$ -Doppel-K.O.-Mutanten	dsbH_seq_f	1653 bp	1191 bp
	dsbH_seq_r		
Kolonie-PCR der potentiellen $\Delta dsbA1$ -Mutanten	dsbA1_seq_f	811 bp	253 bp
	dsbA1_seq_r		

Die Gele zur Auswertung der Kolonie-PCR sind in Abbildung 14 gezeigt. Als Positivkontrolle diente die gDNA des WT. Da die zweite Rekombination zufällig upstream oder downstream des Gens geschah, betrug die statistische Wahr-

scheinlichkeit für den Austausch des Gens durch die K.O.-Kassette 50 %. Für jedes Ziel-Gen gelang es, mindestens eine Mutante zu erstellen.



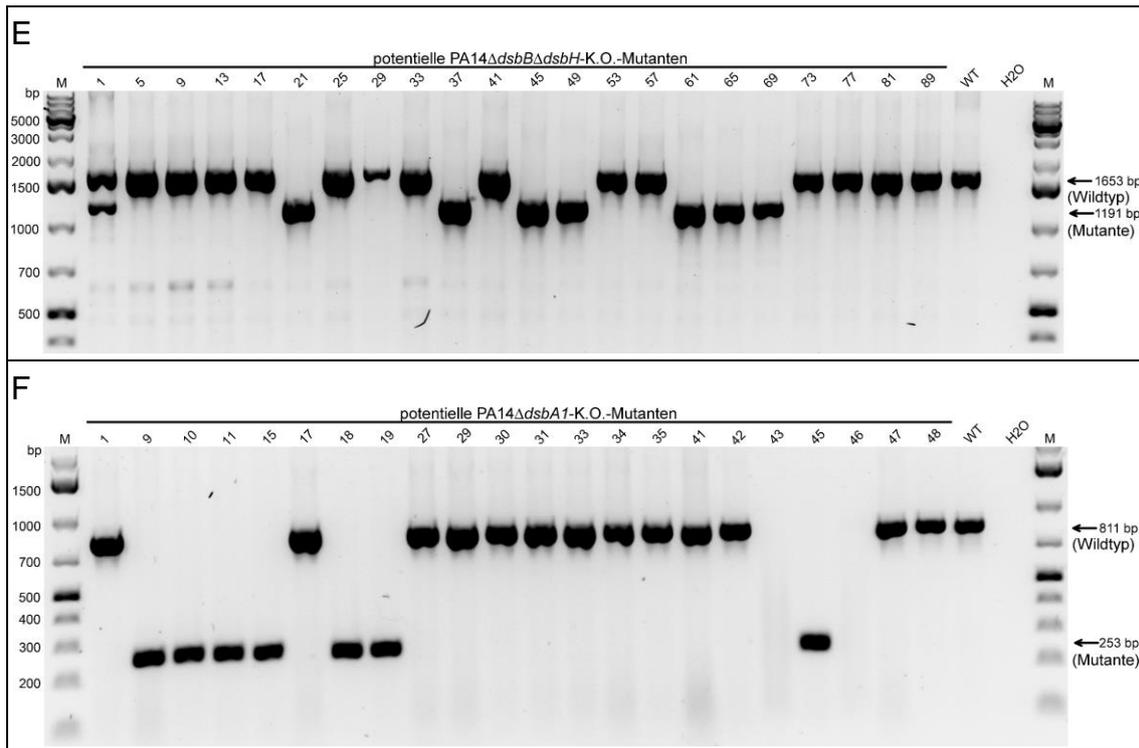


Abbildung 14: Längenanalyse der Kolonie-PCR zur Sichtung von Mutanten nach dem Allel-Austausch. Nach abgeschlossenem Allel-Austausch sollen etwa die Hälfte der Klone an Stelle des Ziel-Gens nur noch einen Gen-Scar besitzen. Dieser stellt sich in der Kolonie-PCR als Fragment dar, welches deutlich kürzer ist als das vom PA14 WT. Die K.O.-Mutanten liefern Banden auf folgender Höhe: (A) $\Delta bamC$ 257 bp, (B) $\Delta hlpA$ 919 bp, (C) $\Delta dsbB$ 267 bp, (D) $\Delta dsbH$ 1191 bp, (E) $\Delta dsbB\Delta dsbH$ 1191 bp, (F) $\Delta dsbA1$ 253 bp.

3.1.4 Erneute Überprüfung mittels PCR

Um sicher zu stellen, dass die zuvor positiv getesteten Klone definitiv das Ziel-Gen verloren hatten, wurden sie ein weiteres Mal überprüft. Vorerst wurde die gDNA isoliert (Kapitel 2.3.2) und die Klone bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ kryokonserviert. Die gDNA diente als Matrize für die Proof-PCR. Als Forward-Primer diente der Sequenzierprimer (siehe Tabelle 25), der einige Basen in 5'-Richtung vor dem Ziel-Gen band. Die Bindungsstelle des Reverse-Primers befand sich mitten im offenen Leseraster des entsprechenden Gens. Demnach lieferte die Proof-PCR nach erfolgreicher Entfernung des Gens kein Produkt. Grund dafür ist, dass der zweite Primer nicht binden kann, weil der homologe Abschnitt nicht mehr Teil des Genoms ist. Die schematische Darstellung der Primerbindungsstellen ist in Abbildung 15 zu sehen.

Im Fall der Doppel-K.O.-Mutante wurde die Proof-PCR nur mit den *dsbH*-Primern durchgeführt. Da statt dem PA14 WT die bereits bestätigte

PA14 Δ *dsbB*-Mutante für den Allel-Austausch verwendet wurde, war eine erneute Überprüfung an dieser Stelle nicht notwendig. Dementsprechend reichte es, das Gen für DsbH, welches zuletzt entfernt wurde, nachzuweisen beziehungsweise auszuschließen.

Tabelle 25: Verwendete Primerpaare und Größe der Fragmente bei der Proof-PCR

Beschreibung	Primer	Fragmentlänge	
		WT	Mutante
Überprüfung der potentiellen Δ <i>bamC</i> -Mutanten	BamC_seq_f	562 bp	-
	DbamC_proof inside_r		
Überprüfung der potentiellen Δ <i>hlpA</i> -Mutanten	DhlpA_seq_f2	413 bp	-
	DhlpA_proof inside_r2		
Überprüfung der potentiellen Δ <i>dsbB</i> -Mutanten	dsbB_seq_f	219 bp	-
	DdsbB_proof inside_r		
Überprüfung der potentiellen Δ <i>dsbH</i> -Mutanten	dsbH_seq_f	914 bp	-
	DdsbH_proof inside_r		
Überprüfung der potentiellen Δ <i>dsbB</i> Δ <i>dsbH</i> -Mutanten	dsbH_seq_f	914 bp	-
	DdsbH_proof inside_r		
Überprüfung der potentiellen Δ <i>dsbA1</i> -Mutanten	dsbA1_seq_f	701 bp	-
	dsbA1_proof inside_r		

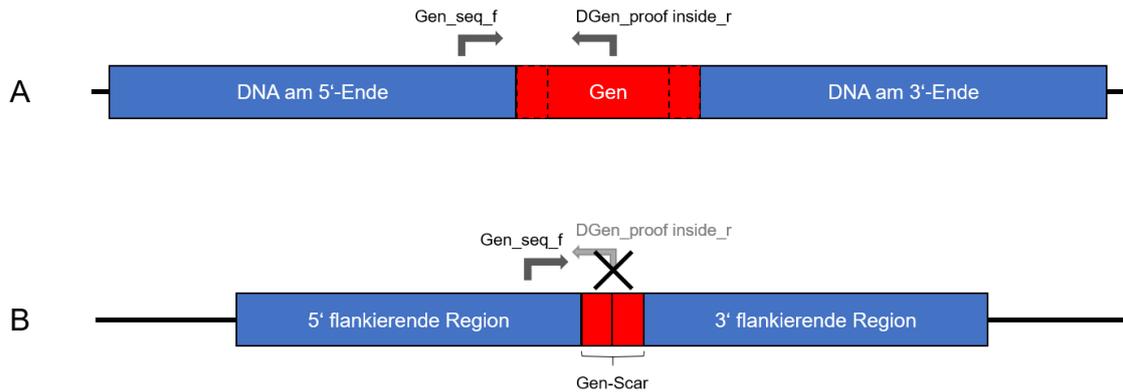
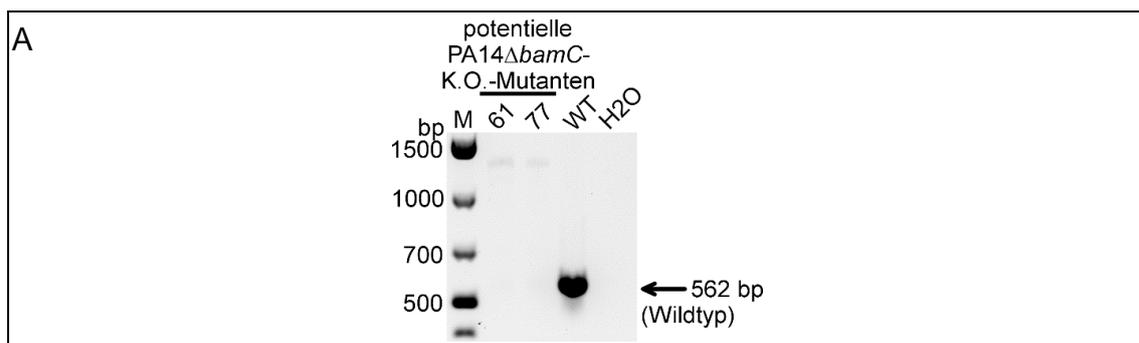
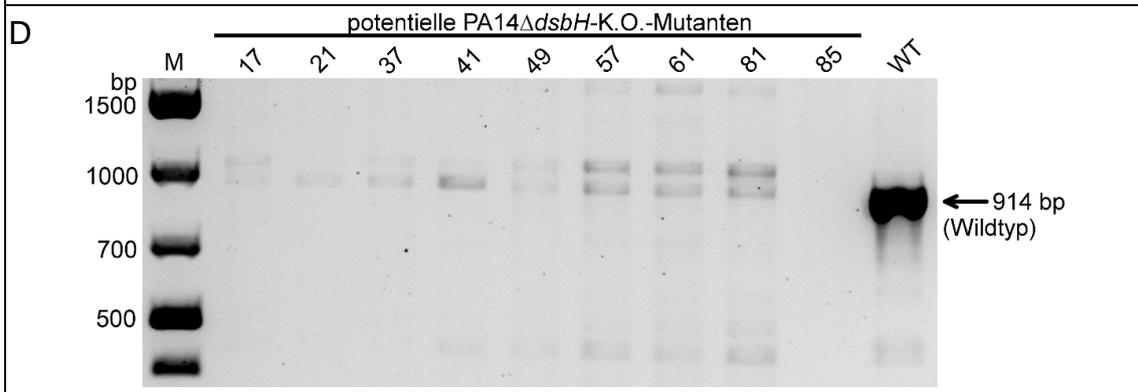
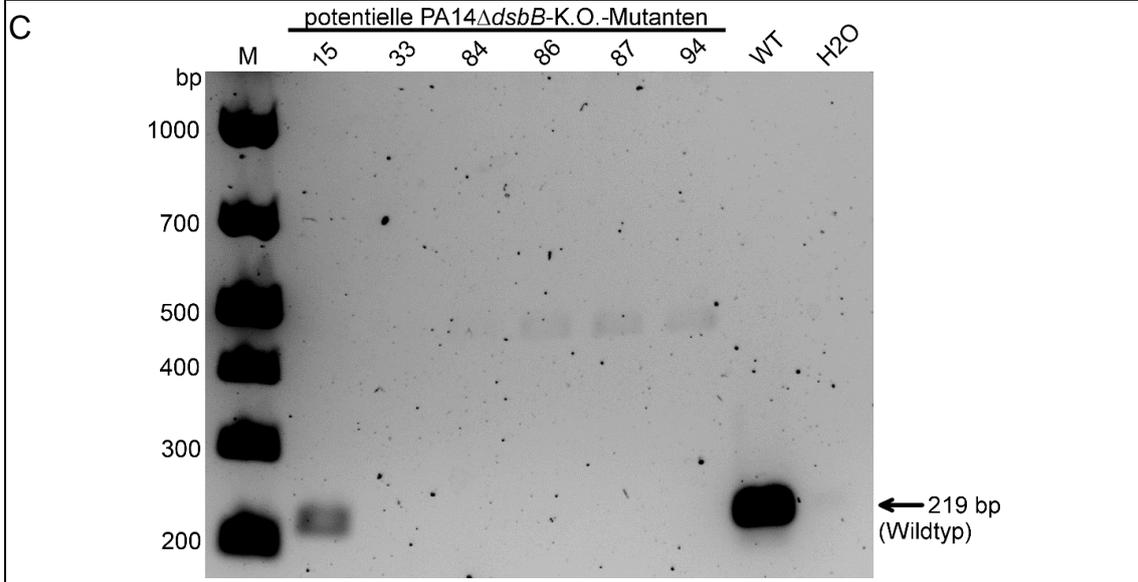
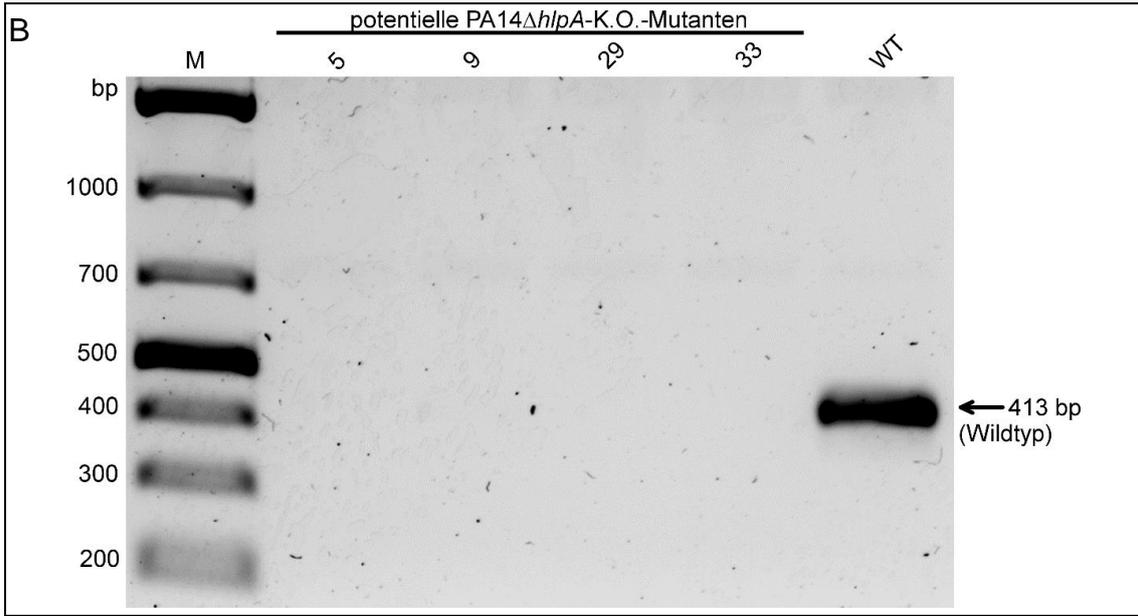


Abbildung 15: Bindungsstellen der Primer bei der Verifizierung der Mutanten durch PCR. (A) zeigt den Abschnitt des Wildtyp-Genoms, der für das Ziel-Gen kodiert. Der Reverse-Primer bindet etwa in der Mitte des offenen Leserasters. Bei der PCR entsteht ein DNA-Fragment von spezifischer Größe. (B) Das Gen wurde erfolgreich entfernt und durch den Gen-Scar ersetzt, welcher nur die ersten und letzten Aminosäuren enthält. Nun fehlt die Bindungsstelle für den Reverse-Primer und die Proof-PCR liefert kein Produkt.

Bei der Auswertung der Bilder der anschließenden Gelelektrophorese (Abbildung 16) wurden nur solche Klone als korrekte Mutanten angesehen, die keinen Ansatz für eine Bande mit WT-spezifischer Größe erkennen ließen. Als Positivkontrolle der Proof-PCR diente der PA14 WT. Für jedes Gen und die Doppel-K.O.-Mutante wurde jeweils ein bestätigter Klon bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ kryokonserviert und im weiteren Verlauf für die Experimente zur Charakterisierung des Phänotyps hinsichtlich der AM-Integrität verwendet.





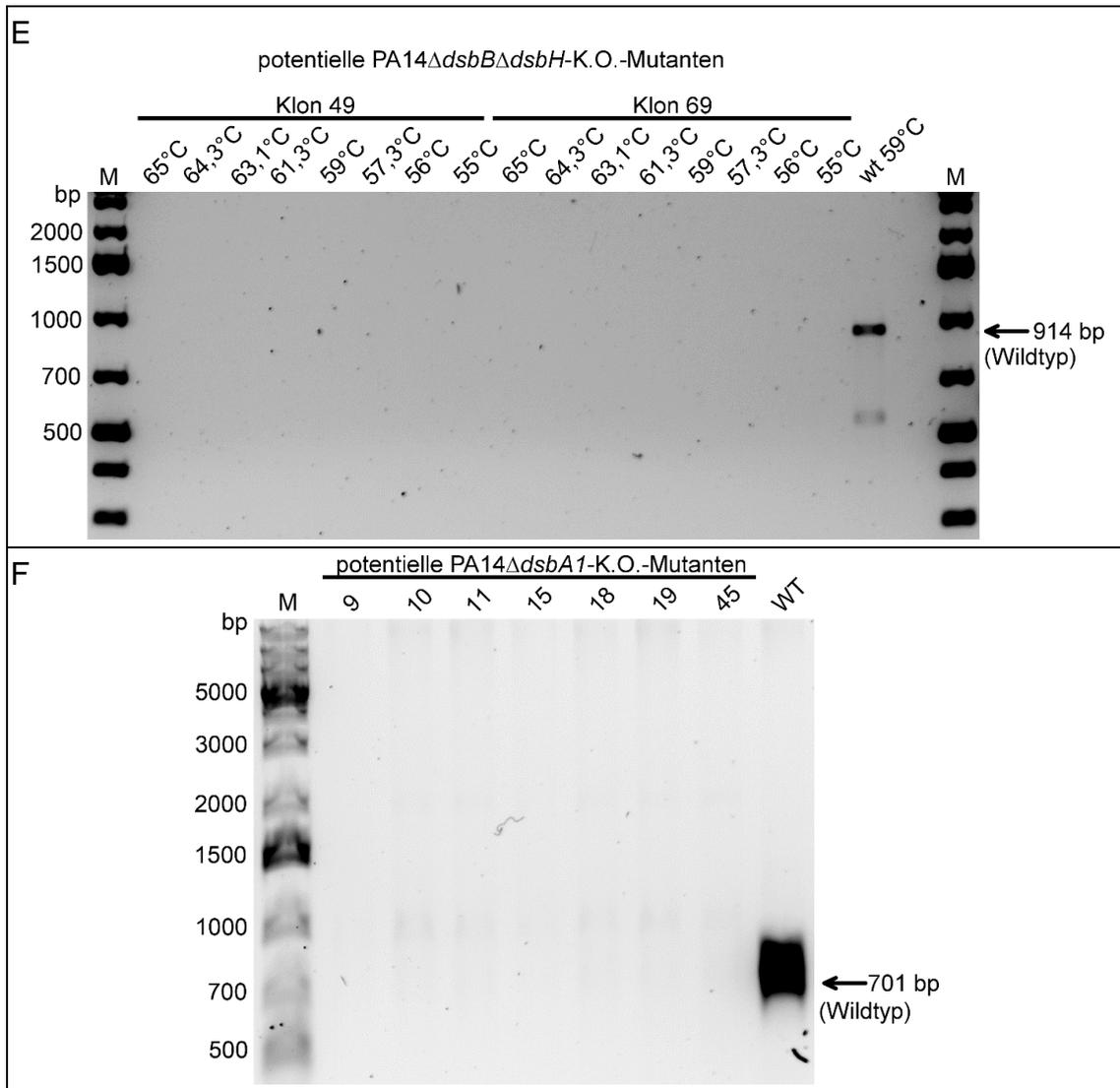


Abbildung 16: Längenanalyse der Proof-PCR zur Überprüfung der Mutanten. Wurde das Ziel-Gen erfolgreich aus dem Genom entfernt, fehlt die Bindungsstelle für den Reverse-Primer. In diesem Fall kann kein PCR-Produkt entstehen. Als Positivkontrolle dient genomische DNA aus PA14 Wildtyp. Die Nummerierung gibt an, welcher Klon an dieser Stelle getestet wurde. (A) Die potentiellen PA14 Δ *bamC*-Mutanten weisen beide keine Bande von WT-spezifischer Höhe auf. (B) Auch bei den potentiellen PA14 Δ *hlpA*-Mutanten finden sich keine Fragmente. (C) Mit Ausnahme des Klons Nr. 15 lassen sich alle PA14 Δ *dsbB*-Mutanten bestätigen. (D) Nur Klon 85 der potentiellen PA14 Δ *dsbH*-Mutanten zeigt keine Bande von gleicher Größe wie der Wildtyp. (E) Keine der Doppel-K.O.-Mutanten weist nach der PCR, bei der die Annealing-Temperatur entlang eines Gradienten verändert wurde, eine Bande auf. (F) Ebenso lassen sich alle PA14 Δ *dsbA1*-Mutanten verifizieren.

3.2 Prüfung der Auswirkungen der Knock-outs auf die Integrität der AM

3.2.1 Antibiotika-Sensitivität

Mit den zuvor generierten K.O.-Mutanten als Grundlage konnten die weiterführenden Tests zur Charakterisierung durchgeführt werden. Normalerweise trägt die AM mit ihrer Barrierefunktion maßgeblich zur Resistenz von *Pa* gegen viele AB bei (siehe Kapitel 1.1.3). In Studien mit anderen gram-negativen Erregern konnte bereits gezeigt werden, dass das Ausschalten von Genen, die für Proteine des BAM-Komplexes oder periplasmatische Chaperone kodieren, in diesen Organismen zu Schäden in der AM führte, die unter anderem mit einer erhöhten Sensitivität gegenüber AB einhergingen (Fardini et al. 2009, Weirich et al. 2017). Deshalb wurden die K.O.-Mutanten in dieser Arbeit ebenfalls auf ihre Empfindlichkeit gegen ausgewählte AB getestet.

Um bereits vor Fertigstellung der K.O.-Mutanten Hinweise auf den Phänotyp der Bakterien zu bekommen, wurden vorab die PA14-Transposon-Mutanten der Gene, die im Fokus dieser Arbeit standen, ebenfalls den Tests unterzogen. Die Transposon(Tn)-Stämme erhielt unsere Arbeitsgruppe durch eine Kooperation mit der AG Mayer des Interfakultären Instituts für Mikrobiologie und Infektionsmedizin Tübingen (IMIT). Das Prinzip der Tn-Mutanten basiert auf dem Einbau einer DNA-Sequenz (Transposon-Kassette) in das Gen, woraufhin dieses nicht mehr korrekt exprimiert werden kann (Kulasekara 2014). Der Einbau geschieht an einer zufälligen Stelle im Gen (Rubin et al. 1999, Lehoux et al. 2002, Garsin et al. 2004). Deshalb ist die Funktionslosigkeit des getroffenen Proteins nicht zwingend gegeben (Hutchison et al. 1999). Aus diesem Grund eignen sich Tn-Mutanten alleine nicht als zuverlässiger Nachweis bei der Bestimmung der Rolle eines Gens in der Zelle. Dies macht die Erstellung von K.O.-Mutanten obligat.

Methode der Wahl zur Testung der AB-Sensitivität war ein Hemmhoftest (beschrieben im Kapitel 2.2.4) unter Verwendung der folgenden AB: Bacitracin 10 µg, Cefotaxim 5 µg, Erythromycin 15 µg, Rifampicin 5 µg, Ampicillin 10 µg + Sulbactam 10 µg, Vancomycin 30 µg (siehe Tabelle 7). Als Positivkontrolle wurde die $\Delta bamB$ -Mutante gewählt, die sich in vorausgegangenen

Experimenten im Vergleich zum WT sensitiver gegenüber der meisten der getesteten AB zeigte. Der durchschnittliche Durchmesser der Hemmhöfe aller Mutanten, sowie die jeweilige Standardabweichung sind in Tabelle 26 angegeben. Die Daten wurden in drei separaten Experimenten mit biologischen Replikaten erhoben. Bei allen Versuchen wurden von jedem biologischen Replikat jeweils zwei technische Replikate verwendet. Mit Rifampicin und Bacitracin ließen sich weder bei der $\Delta bamB$ -Mutante, noch bei den in dieser Arbeit generierten K.O.-Stämmen Effekte verzeichnen. Alle Bakterien zeigten hier, analog zum WT, vollständige Resistenz bei den hier verwendeten Konzentrationen. Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurden die Daten deshalb an dieser Stelle nicht aufgeführt. Sie sind jedoch gemeinsam mit den anderen Rohdaten des Experiments im Anhang in Tabelle 27 zu finden.

Die Auswertung zeigte, dass die $\Delta bamC$ -Mutante gegenüber Ampicillin mit Sulbactam, Cefotaxim und Vancomycin im Vergleich zum WT deutlich sensitiver war, also die entsprechenden Hemmhöfe um mehrere Millimeter größer ausfielen. Exemplarisch ist dies auch in Abbildung 17 zu sehen. Die Fotos zeigen Agar-Platten von jeweils einem Replikat der Stämme WT, $\Delta bamB$ und $\Delta bamC$. Für Vancomycin ließ sich mit der Tn_*bamC*-Mutante ein ähnliches Ergebnis erzielen. Verglichen mit dem WT maß auch die Tn_*hlpA*-Mutante bei Ampicillin mit Sulbactam und Cefotaxim größere Hemmhofdurchmesser. Dieses Ergebnis ließ sich jedoch nicht mit der K.O.-Mutante reproduzieren. Die Bakterien des $\Delta hlpA$ -Stamms zeigten, ebenso wie die K.O.-Mutanten der Dsb-Familie und deren zugehörige Tn-Mutanten, keine Unterschiede zum WT.

Tabelle 26: Durchschnittlicher Hemmhofdurchmesser und errechnete Standardabweichungen des AB-Sensitivitäts-Tests. Die Tabelle zeigt die durchschnittliche Größe der Hemmhöfe und die Standardabweichung in mm. SAM: Sulbactam (10 µg) und Ampicillin (10 µg), CTX: Cefotaxim (5 µg), E: Erythromycin (15 µg), VA: Vancomycin (30 µg). Die Werte der Tabelle errechnen sich aus drei unabhängigen Experimenten, die jeweils mit Duplikaten durchgeführt wurden. Eine veränderte AB-Sensitivität ist durch Fettdruck gekennzeichnet.

Stamm	SAM 20	CTX 5	E 15	VA 30
PA14 Wildtyp	7 ± 1	9 ± 2	7 ± 1	6
PA14 Δ <i>bamB</i>	13 ± 1	15 ± 1	11 ± 1	13 ± 2
PA14 Δ <i>bamC</i>	10 ± 2	13 ± 2	8 ± 1	8
PA14 Tn_ <i>bamC</i>	8	10 ± 1	8 ± 1	9 ± 1
PA14 Δ <i>hlpA</i>	8 ± 2	10 ± 1	8 ± 1	6
PA14 Tn_ <i>hlpA</i>	14 ± 3	13 ± 1	8 ± 1	6
PA14 Δ <i>dsbB</i>	8 ± 2	10 ± 1	7	6
PA14 Tn_ <i>dsbB</i>	8 ± 1	9 ± 1	7 ± 1	6
PA14 Δ <i>dsbH</i>	8 ± 2	10 ± 2	7	6
PA14 Tn_ <i>dsbH</i>	6	9 ± 1	8 ± 1	6
PA14 Δ <i>dsbB</i> Δ <i>dsbH</i>	8 ± 2	10 ± 2	8 ± 1	6
PA14 Δ <i>dsbA1</i>	8 ± 1	10 ± 1	7 ± 1	6

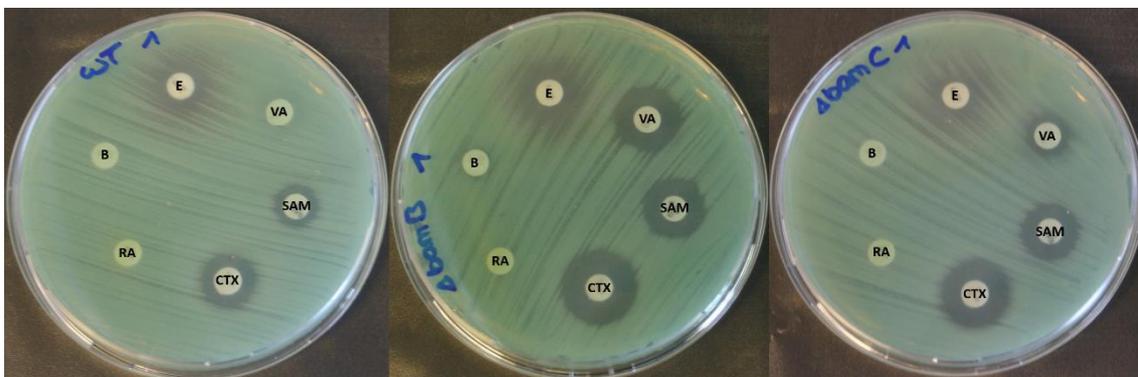


Abbildung 17: Agar-Diffusionstest. Auf den gezeigten Platten wurden PA14 WT, die Δ *bamB*-Mutante und die Δ *bamC*-Mutante ausgestrichen, die AB-Plättchen platziert und alles über Nacht bei 37 °C bebrütet. Am nächsten Tag zeigte sich dieses Bild: Die Bakterien wachsen auf den Platten, gut erkennbar an der *Pa*-spezifischen grünen Farbe. Wirkt das AB auf die Zellen, so bildet sich ein Hemmhof um das entsprechende Plättchen. Dort wachsen keine Bakterien. Je größer der Durchmesser des Hemmhofs, desto geringer ist die Konzentration des entsprechenden ABs, die benötigt wird, um das Wachstum der Bakterien zu verhindern. Sind die Bakterien resistent gegen das AB, ist kein Hemmhof zu erkennen. Wie in der Abbildung auf der linken Seite zu sehen, zeigen sich beim WT kleine Hemmhöfe um die Plättchen mit Erythromycin 15 µg (E), Sulbactam mit Ampicillin je 10 µg (SAM) und Cefotaxim 5 µg (CTX). Die WT-Bakterien sind resistent gegenüber Vancomycin 30 µg (VA), Rifampicin 5 µg (RA) und Bacitracin 10 µg (B). Die Hemmhöfe der Δ *bamB*-Mutante (Mitte) sind deutlich größer, zusätzlich bildet sich ein Hof um das Vancomycin-Plättchen. Gleiches zeigt sich auf der Platte mit der

$\Delta bamC$ -Mutante (rechts im Bild), jedoch bei allen AB in geringerem Ausmaß als bei der $\Delta bamB$ -Mutante. Auf allen Platten präsentiert sich der Hemmhof um das Erythromycin-Plättchen im Gegensatz zu den anderen AB mit unscharfem Rand. Mit den Rifampicin- und Bacitracin-Plättchen ließ sich bei keinem der verwendeten Stämme ein Effekt verzeichnen.

Zusammenfassend ergeben die Ergebnisse der AB-Tests eine veränderte AB-Sensitivität für die Mutanten $\Delta bamB$ und $\Delta bamC$, jedoch nicht für die anderen untersuchten Deletionsmutanten. Die erhöhte Sensitivität deutet auf eine mögliche Veränderung der AM-Integrität hin. Ist diese beeinträchtigt, können die AB leichter in die Zelle eindringen und dort ihre Wirkung entfalten. Im Vergleich zu BamB scheint BamC aber eine untergeordnetere Rolle beim Zusammenbau der AM zu spielen, da die Effekte, die sich in diesen Experimenten mit der $\Delta bamB$ -Mutante erzielen ließen, sichtbar größer waren.

3.2.2 Widerstandsfähigkeit gegenüber Gallensalzen

Bei diesem Experiment wurde dem Nährmedium, in dem die Stämme wuchsen, Gallensalzen (Bile Salts, BS) zugefügt. BS finden sich im Gastrointestinaltrakt des Menschen und spielen bei der Verdauung von Fett eine wichtige Rolle. Geht man von der Annahme aus, dass der Darm als Hauptreservoir für *Pa* im menschlichen Körper dient (siehe auch Kapitel 1.1), spielt die Resistenz der Bakterien gegen dort natürlicherweise vorkommende Substanzen eine wichtige Rolle. Folglich sind die Auswirkungen dieser Stoffe auf die K.O.-Mutanten besonders interessant. Normalerweise bildet die AM eine effiziente Barriere gegenüber einer Vielzahl äußerer Einflüsse (Hancock et al. 1990). So auch gegen BS. Daher sollten diese Experimente weitere Hinweise darauf geben, ob die Membranintegrität bei den untersuchten Mutanten gestört ist. Wie vorausgegangene Versuche zeigten, kann der PA14 WT in einem Gemisch aus primären und sekundären BS (Verhältnis 1:1) Konzentrationen bis zu 0,3 % (w/v) unbeschadet überstehen und ohne Einschränkung wachsen. Bestehen jedoch Störungen der Integrität der AM, können die BS auch bei dieser Konzentration in die Zelle eindringen und wachstumshemmend wirken. Ob dieser Effekt bei den PA14-Mutanten in dieser Arbeit zu beobachten ist, wurde im Folgenden untersucht. Der Versuchsablauf ist in Kapitel 2.2.5 beschrieben. Die Wachstumskurven der K.O.- und Tn-Mutanten in LB sowohl mit, als auch

ohne 0,3 % BS sind im Anhang zu finden (Abbildung 26 und Abbildung 27). Die Werte wurden bei unabhängigen Experimenten an drei Tagen mit biologischen Replikaten erhoben. Auch hier wurden pro Versuch und Stamm zwei technische Replikate verwendet. Zur Auswertung der Ergebnisse wurden die OD₆₀₀-Werte nach 8 h ausgewählt und daraus die Mittelwerte bestimmt. Die Rohdaten befinden sich ebenfalls im Anhang (Tabelle 28). Anschließend wurde mit diesen Werten die prozentuale Wachstumshemmung (p_{Wachstum}) in Bezug auf den WT berechnet. Je größer p_{Wachstum} , desto schlechter wuchsen die Mutanten im Vergleich zum WT. Die Berechnungen erfolgten für beide Nährmedien getrennt. Zur Berechnung der prozentualen Wachstumshemmung kam die folgende Gleichung zur Anwendung:

$$p_{\text{Wachstum}} = 100 - \frac{100}{\text{OD}_{600}(\text{WT})} \times \text{OD}_{600}(\text{Mutante})$$

Im Histogramm Abbildung 18 sind die Ergebnisse paarweise dargestellt. Die statistische Auswertung der Daten erfolgte durch einen One-Way ANOVA-Test des Programms GraphPad (Tabelle 14). Dabei wurden die p_{Wachstum} -Werte aller Mutanten in LB mit 0,3 % BS mit dem Wachstum des gleichen Stamms in LB ohne Zusatz von Gallensalzen, sowie dem Wachstum des WT in 0,3 % BS verglichen. Zusätzlich wurden die Werte der Mutanten in LB denen des WT in LB gegenübergestellt. In Abbildung 18 sind die signifikanten Ergebnisse ($p < 0,001$) mit einem Stern gekennzeichnet. Als Kontrolle wurde der PA14 Δ *bamB*-Stamm eingesetzt, der bereits in vorausgegangenen Experimenten unter gleichen Bedingungen ein eingeschränktes Wachstum zeigte. Die hier zu untersuchenden Stämme präsentierten sich jedoch deutlich schwächer beeinträchtigt als die Positivkontrolle. Deren Wachstum wies eine Hemmung um mehr als 50 % im Vergleich zum WT auf. Bei den Stämmen, die in dieser Arbeit untersucht wurden, zeigte die Auswertung eine signifikante Wachstumshemmung der Δ *bamC*-Mutante (26,7 %), sowie der Tn-Mutante für das Gen *hlpA* (28,65 %) in LB + 0,3 % BS. Auch bei der Tn_*bamC*-, Δ *hlpA*-, Δ *dsbA1*- und der Δ *dsbB* Δ *dsbH*-Doppel-K.O.-Mutante ließ sich eine Wachstumsverminderung erkennen, jedoch ohne signifikanten Unterschied zum WT. Außerdem

schien die $\Delta dsbA1$ -Mutante in LB schlechter zu wachsen, als in der 0,3 % BS-Lösung, doch auch hier war die Wachstumshemmung nicht signifikant. Sowohl die K.O.-, als auch die Tn-Mutanten der Gene *dsbB* und *dsbH* wurden, analog zum WT, in ihrem Wachstum nicht durch die Gallensalze beeinflusst.

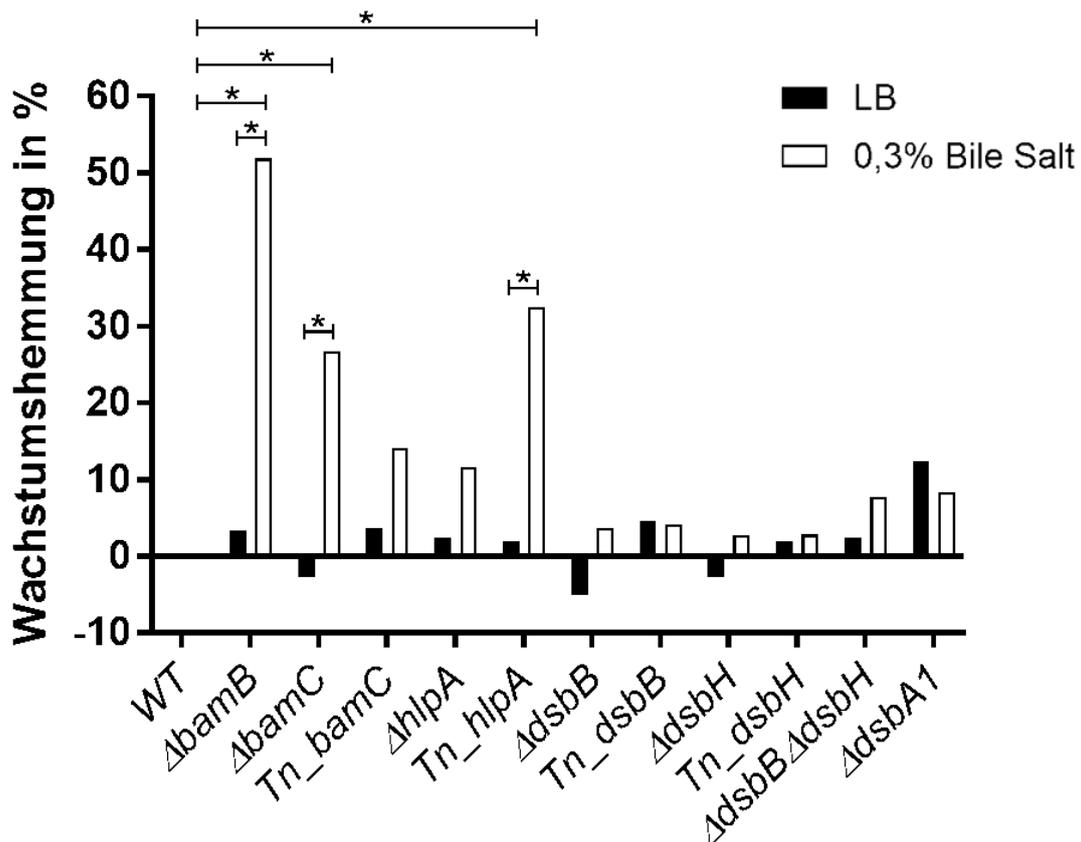


Abbildung 18: Statistische Auswertung der Wachstumshemmung in Anwesenheit von Gallensalzen. Die Balken des Diagramms repräsentieren die prozentuale Wachstumshemmung der verschiedenen PA14-Stämme in LB (schwarz) und LB + 0,3 % BS (weiß) vergleichen mit dem Wachstum des WT nach 8 h im jeweiligen Nährmedium. Mit einer One-Way ANOVA-Analyse wurden die signifikanten Werte bestimmt. Dazu wurden die p_{Wachstum} -Werte aller Mutanten in LB + 0,3 % BS mit dem Wachstum des gleichen Stamms in reinem LB, sowie dem Wachstum des WT in 0,3 % BS verglichen. Zusätzlich wurden die Werte der Mutanten in LB denen des WT in LB gegenübergestellt. Die Sternchen kennzeichnen die signifikanten Ergebnisse ($p < 0,001$).

Die Ergebnisse dieses Experiments bestätigten die Beobachtungen der Versuche mit AB: Neben der $\Delta bamB$ -Mutante sind nur $PA14\Delta bamC$ und Tn_hlpA durch BS in ihrem Wachstum signifikant beeinträchtigt. Auch hier zeigte sich wieder ein deutlich schwächerer Effekt, verglichen mit der Positivkontrolle

ΔbamB. Dennoch lieferten diese Untersuchungen einen weiteren Hinweis für eine Bedeutung von BamC für den Erhalt einer intakten AM.

3.2.3 Testung mit Humanserum

Als abschließenden Test der Integrität und Funktionalität der AM der K.O.-Mutanten, wurden die Bakterien Humanserum ausgesetzt. Dieses enthält das Komplementsystem, das im menschlichen Körper eine wichtige Rolle bei der Immunabwehr spielt. Es wird unter anderem durch Kontakt mit Bakterien aktiviert und führt im Folgenden zur Lyse der Mikroorganismen durch den Membranangriffskomplex (Whaley und Schwaeble 1997). Wie viele andere gramnegative Bakterien besitzt auch *Pa* die Fähigkeit, Plasmaproteine und Regulatoren des Komplementsystems ihres Wirts zu akquirieren und so ihr Überleben zu sichern (Zipfel et al. 2013, Hallstrom et al. 2015). Dass die Zusammensetzung und Integrität der AM bei diesem Aspekt der Virulenz eine wichtige Rolle spielt, wurde bereits für viele gramnegative Spezies gezeigt (Vitkauskiene et al. 2005, Hallstrom und Riesbeck 2010, Miajlovic und Smith 2014, Dudek et al. 2016, Weirich et al. 2017). Deshalb stellte sich die Frage, ob die Stämme, die in den bisherigen Experimenten Hinweise auf Defekte in der AM zeigten, auch eine erhöhte Sensitivität gegenüber Humanserum aufweisen. Dazu wurden zwei unabhängige Experimente mit biologischen Replikaten nach dem Protokoll aus Kapitel 2.2.6 durchgeführt. Pro Versuch wurden jeweils drei technische Replikate des WT, sowie der Stämme *Tn_surA* und *ΔbamC* untersucht. Die *Tn_surA*-Mutante erwies sich in den vorangegangenen Versuchen mit Serum als bessere Positivkontrolle als die *ΔbamB*-K.O.-Mutante und wurde dementsprechend hier eingesetzt. Die *ΔbamC*-Mutante zeigte sich sowohl hinsichtlich der AB-Sensitivität, als auch in ihrer Widerstandsfähigkeit gegen BS deutlich defizient, wohingegen die anderen K.O.-Stämme in diesen Experimenten nicht oder kaum beeinträchtigt waren. Deshalb wurde die Testung mit Humanserum nur mit der *bamC*-K.O.Mutante durchgeführt, da von diesem Stamm die vielversprechendsten Ergebnisse zu erwarten waren. In Abbildung 19 sind die Resultate des ersten Versuchs dargestellt. Die Höhe der Balken gibt an, wie viel Prozent der Bakterien im NHS überleben konnten. Als

Referenzwert diente die Kolonienanzahl des jeweiligen Stamms nach Inkubation in HIS (siehe Kapitel 2.2.6). Zu erkennen war, dass beinahe 90 % der PA14 WT-Bakterien die 30-minütige Inkubation mit NHS unbeschadet überstanden. Die Tn_surA-Mutante zeigte hingegen nur noch knapp 12 % ihres Wachstums im Vergleich zum Versuchsansatz mit HIS. Von den $\Delta bamC$ -Mutanten überlebten 65 %. Die Auswertung dieses Experiments lässt eine geringe Defizienz des K.O.-Stamms bei der Resistenz gegen die Komponenten des Immunsystems im Humanserum vermuten. Der Effekt bei der Positivkontrolle PA14 Tn_surA war jedoch deutlich stärker ausgeprägt.

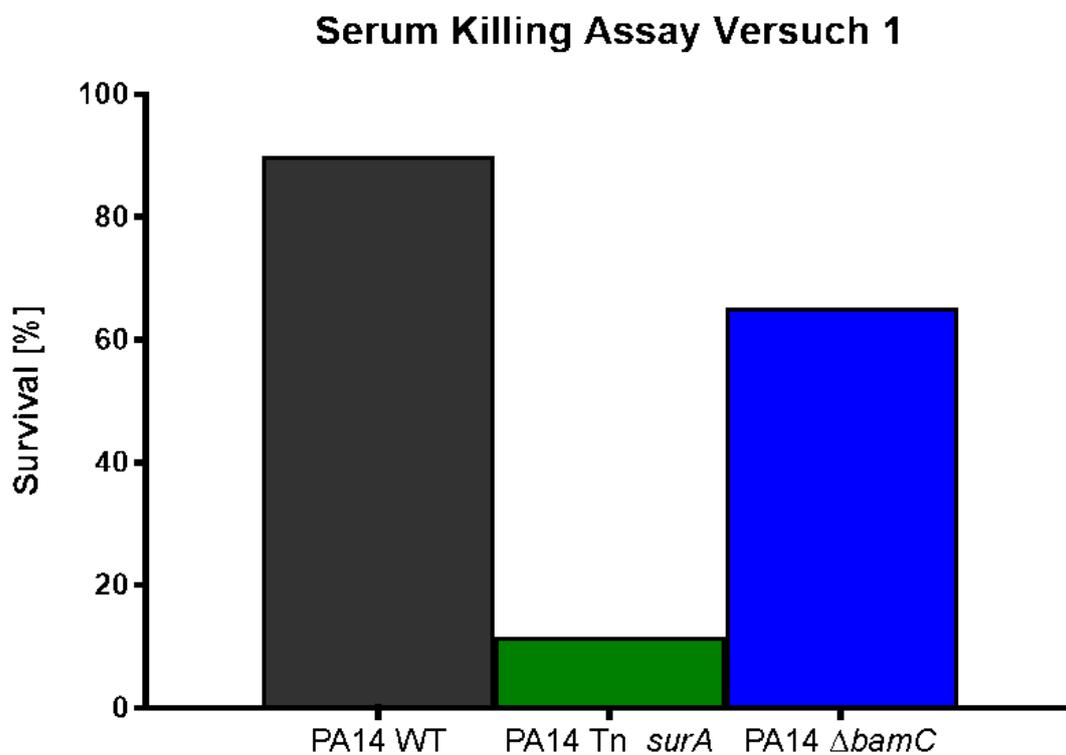


Abbildung 19: Überleben in Humanserum – Versuch 1. Das Balkendiagramm zeigt das prozentuale Überleben des PA14 WT, sowie der Mutanten Tn_surA und $\Delta bamC$ nach 30-minütiger Inkubation in menschlichem Serum. Als Vergleich diente die Bakterienzahl der Stämme des Versuchsansatzes mit hitzeinaktiviertem Serum (siehe Kapitel 2.2.6). Knapp 90 % der WT-Bakterien überlebte die Behandlung mit NHS. Die Tn_surA-Mutante, die als Positivkontrolle eingesetzt wurde, zeigte noch nur etwa 12 % ihres Wachstums. Von den $\Delta bamC$ -Mutanten überstanden 65 % die Inkubation im menschlichen Serum. Gezeigt sind die Ergebnisse eines Einzelexperimentes mit jeweils drei technischen Replikaten pro Stamm.

Im zweiten Versuch ließ sich die gleiche Tendenz erkennen, jedoch weniger ausgeprägt als im ersten. Das zugehörige Diagramm (Abbildung 28) und die

Rohdaten beider Experimente (Tabelle 30 und Tabelle 31) sind im Anhang zu finden.

Die Testung der $\Delta bamC$ -Mutante mit Humanserum scheinen die Ergebnisse der Versuche mit AB und BS zunächst zu bestätigen. Es zeigte sich ebenfalls ein leicht defizienter Phänotyp, der im Vergleich zum WT anfälliger gegenüber äußeren Einflüssen war. Trotzdem konnten die Bakterien den Komplementfaktoren im menschlichen Serum weiterhin ein gewisses Maß an Resistenz entgegensetzen. Im Gegensatz zur Tn_*surA*-Mutante scheinen die Abwehrmechanismen der $\Delta bamC$ -Mutante weniger stark beeinflusst zu sein.

4 Diskussion

Das Ziel dieser Arbeit war, K.O.-Mutanten von *Pseudomonas aeruginosa* PA14 für die Gene *bamC*, *hlpA*, *dsbB*, *dsbH* und *dsbA1* zu generieren und diese hinsichtlich der Integrität ihrer AM zu charakterisieren. Dazu wurden Versuche mit AB, BS und Humanserum durchgeführt. Es zeigte sich, dass die Δ *bamC*-Mutante sensibler auf die getesteten Detergentien reagierte als der PA14 WT, was auf bestehende Defizite in der AM der Mutante schließen lässt. Im Gegensatz dazu ließen sich bei den K.O.-Mutanten der anderen Gene keine signifikanten Unterschiede zum WT feststellen. Diesen Proteinen kommt im Prozess der AM-Biogenese von *Pa* entweder keine entscheidende Aufgabe zuteil oder ihr Verlust kann kompensiert werden, weshalb die AM der K.O.-Stämme den untersuchten Einflüssen eine ähnliche Widerstandsfähigkeit entgegensetzen konnte, wie die des WT.

Die Suche nach neuen Therapiemöglichkeiten für Infektionen mit *Pa* stellt die Wissenschaft immer wieder vor Probleme. Das Screening von Compound-Libraries liefert nur eine geringe Trefferzahl, da die Zellmembranen gramnegativer Bakterien einen solch effektiven Schutz darstellen, dass nur sehr wenige Compounds überhaupt an ihren Wirkort in der bakteriellen Zelle gelangen können (Zgurskaya et al. 2015). Auf der Suche nach einem Weg, wie die Wirkstoffe in die Zelle gelangen können, gilt die AM-Biogenese als vielversprechender Ansatz, mit dem schon einige Durchbrüche erzielt wurden (Silver 2011, Zgurskaya et al. 2015). Die Vorteile, die eine Störung der AM-Integrität von Bakterien wie *Pa* mit sich bringt, sind vielfältig. Zunächst wird der Erreger durch den reduzierten Schutz geschwächt und anfällig für extrazelluläre Einflüsse. Zusätzlich wird gleichzeitig die Biogenese wichtiger AM-Virulenzfaktoren gehemmt (siehe Kapitel 1.1.2). Dadurch können natürliche Abwehrmechanismen des menschlichen Körpers, beispielsweise das Komplementsystem im Serum (siehe Kapitel 3.2.3), die Bakterien effizient lysieren und so die Infektion bekämpfen. Die meisten schweren *Pa*-Infektionen treten jedoch bei Patienten mit supprimiertem Immunsystem auf (Lyczak et al. 2000). Dort ist es nicht ausreichend, die Pathomechanismen der Bakterien zu schwächen oder

auszuschalten und die Bekämpfung der Krankheitserreger den körpereigenen Abwehrsystemen zu überlassen. Die Patienten sind auf eine AB-Behandlung angewiesen, welche aber ebenfalls durch eine Störung der AM-Integrität verbessert oder überhaupt erst ermöglicht werden kann.

4.1 Einfluss der K.O.-Mutationen auf die AB-Sensitivität

Derzeit werden zur Behandlung von *Pa*- Infektionen einige Fluorchinolone, wenige Vertreter der β -Laktame in Kombination mit β -Laktamase-Inhibitoren, und Aminoglykoside eingesetzt (Zgurskaya et al. 2015). Bei nosokomialen Infektionen kommt häufig hinzu, dass die Bakterien multiple Resistenzen gegen die gängigen AB besitzen (vergleiche Kapitel 1.1.3). Dadurch wird die Eradikation erschwert und die Infektion kann bis zum Tod des Patienten führen. Neben der Entwicklung alternativer AB spielt deshalb auch die Suche nach Wirkstoffen eine große Rolle, die die Bakterien für bereits vorhandene AB wieder sensibilisieren. Hintergrund der Auswahl der Proteine BamC, HlpA, DsbB, DsbH und DsbA1 als Fokus dieser Arbeit war die Überlegung, dass diesen Proteinen relevante Aufgaben bei der AM-Biosynthese zukommen. Die Deletion eines der Proteine hätte demnach Konsequenzen für den Aufbau und die Integrität der AM. Diese stellt bei *Pa*, sowie bei anderen gramnegativen Bakterien, einen wichtigen Schutzfaktor vor antibiotischer Wirkung dar. Schwächt man die Barriere, kann das Eindringen des AB in die Zelle nicht mehr effizient verhindert werden. Dadurch könnten geringere Konzentrationen insbesondere von AB mit bekannter Toxizität (z.B. Colistin) eingesetzt werden und zusätzlich die Entstehung neuer Resistenzen vermindert werden. Gegebenenfalls werden dadurch sogar AB wirksam, die die Membran gramnegativer Bakterien bisher nicht durchdringen konnten. Eine kombinierte Therapie aus „alten“ AB und Wirkstoffen mit membranpermeabilisierender Wirkung wäre deshalb erstrebenswert (Zgurskaya et al. 2015, Lamers und Burrows 2016). Die in dieser Arbeit präsentierten Ergebnisse zeigen, dass die AM der $\Delta bamC$ -Mutante durchlässiger zu sein scheint, als die des WT. Im Gegensatz dazu ist die Beeinträchtigung der *bamC*-Tn-Mutante durch AB, verglichen mit der

zugehörigen K.O.-Mutante, geringer ausgeprägt. Dies lässt sich so erklären, dass die Tn-Kassette an einer Stelle im Gen sitzt, die dazu führt, dass zwar ein trunkiertes, aber noch funktionsfähiges Protein entsteht.

Die $\Delta bamC$ -Deletionsmutanten sind weniger resistent gegenüber Erythromycin und Vancomycin. Erythromycin wird hauptsächlich zur Behandlung gram-positiver Erreger eingesetzt und nur wenige Gramnegative, wie Legionellen oder Chlamydien, reagieren sensitiv auf den Wirkstoff. Vancomycin hingegen richtet sich ausschließlich gegen grampositive Bakterien. Die Veränderungen der AM durch den Verlust von BamC machen *Pa* also empfänglich für AB, die vorher nicht zur Therapie geeignet waren. Darunter fallen auch Cefotaxim und die Kombination von Ampicillin mit Sulbactam. Die Resistenzmechanismen, die *Pa* natürlicherweise gegen diese AB besitzt, scheinen bei der $\Delta bamC$ -Mutante jedenfalls nicht so wirksam sein, dass dadurch die mutmaßlich verbesserte Aufnahme der AB über die AM kompensiert werden könnte. Dadurch wird der Stamm sensibel gegenüber den Wirkstoffen.

4.2 BamC als potentielles Target

Die im Voraus untersuchte Tn_*bamC*-Mutante zeigte sich im Agar-Diffusionstest bei Vancomycin weniger resistent als der WT. Dieses Ergebnis bestätigte die K.O.-Mutante PA14 $\Delta bamC$, die zusätzlich auch sensitiver gegenüber Ampicillin mit Sulbactam und Cefotaxim reagierte. Das Wachstum der $\Delta bamC$ -Mutante in LB + 0,3 % BS war in den hier durchgeführten Experimenten signifikant vermindert, wohingegen die Tn-Mutante nur eine leichte Wachstums- hemmung gezeigt hatte. Die Inkubation in menschlichem Serum überlebten etwa 65 % der $\Delta bamC$ -Bakterien.

Die Ergebnisse der Experimente mit BS bekräftigen die Vermutung der AB-Sensitivitätstestung: Die Membran der $\Delta bamC$ -Mutante bietet den Bakterien weniger Schutz als die des WT. Dadurch können AB und BS in die Zelle eindringen und ihre Wirkung gegen die Bakterien entfalten. Die Versuche mit Humanserum scheinen zunächst ebenfalls darauf hinzudeuten, dass die Mutante anfälliger gegenüber den enthaltenen Komponenten des Immunsystems ist als der WT. Jedoch erwies sich die verwendete Methode nicht als

optimal, da die Ergebnisse nicht zuverlässig reproduzierbar waren (Vergleich Abbildung 19 und Abbildung 28) und zudem die Inkubationszeit mit 30 Minuten sehr kurz ausfiel. Deshalb sind die hier erhobenen Daten nicht geeignet, um die Hypothese einer verminderten AM-Integrität der $\Delta bamC$ -K.O.-Mutanten zu stützen. Um fundierte Aussagen über das Überleben der Mutante im menschlichen Serum treffen zu können, sollte das Wachstum der Bakterien im weiteren zeitlichen Verlauf untersucht werden.

Die Eignung von BamC als potentiell Target war bereits Forschungsgegenstand vieler Arbeitsgruppen. In verschiedenen anderen Bakterien-Familien und -Ordnungen wurden die Auswirkungen der entsprechenden Mutante untersucht. Die $\Delta bamC$ -Mutanten von *E. coli* wiesen vermehrte Membranpermeabilität und leichte Defekte im Aufbau der AM auf (Wu et al. 2005, Sklar et al. 2007a). Diese Beobachtungen decken sich weitgehend mit den Ergebnissen dieser Arbeit. Im Gegensatz zu PA14 $\Delta bamC$ zeigte sich die K.O.-Mutante in *E. coli* jedoch sensibel gegenüber Rifamicin (Onufryk et al. 2005). Bei *Yersinia enterocolitica* hingegen konnten Weirich et al. (2017) keinen Unterschied bezüglich der AB-Sensitivität zwischen $\Delta bamC$ und WT feststellen. Auch gegenüber BS und weiteren Detergentien waren die Ergebnisse der Mutante mit denen des WT vergleichbar. Das Ausbleiben einer Veränderung der Membranpermeabilität führte zu der Schlussfolgerung, dass BamC in *Yersinia enterocolitica* nur eine untergeordnete Rolle spielt, oder der Verlust des Proteins anderweitig kompensiert werden kann. Zu einem ähnlichen Schluss führten auch die Untersuchungen der $\Delta bamC$ -Mutante von *Salmonella enteritidis*. Hier ließen sich ebenfalls keine erheblichen Störungen der Membran oder eine Reduktion der AMPs feststellen. Die Sensitivität der Mutante gegenüber Vancomycin, Bacitracin, Rifampicin und Erythromycin war mit der des WT vergleichbar (Fardini et al. 2009). Unabhängig davon konnten alle genannten Arbeitsgruppen zeigen, dass die Deletion von *bamC* zu geringeren phänotypischen Auswirkungen führte, als die Deletion von *bamB*. Deshalb ist davon auszugehen, dass BamC eine untergeordnete, möglicherweise regulierende Funktion für die Biogenese der AMPs besitzt und nicht direkt an deren Faltung mitwirkt (Kim et al. 2012).

In dieser Arbeit ließ sich zeigen, dass die AM-Integrität von *Pa* durch den Verlust von BamC leicht gestört ist. Ausgehend von den hier durchgeführten Experimenten wäre BamC als Target bei *Pa* geeignet. Entsprechend der Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen fiel jedoch auch hier auf, dass die Auswirkungen des K.O.s auf die Bakterien, im Vergleich zur Positivkontrolle, nur leicht ausgeprägt waren. Basierend auf den hier vorliegenden Ergebnissen wäre BamC nicht das Target erster Wahl. Deshalb sollte PA14 Δ *bamC* genauer charakterisiert werden, um das Ausmaß der AM-Störung besser einschätzen zu können. Für die Auswahl eines Proteins als Ansatzpunkt neuer Medikamente ist eine gravierende Schädigung der Bakterien bei Funktionslosigkeit oder Verlust dieses Proteins eine wichtige Voraussetzung. Unter dem Mikroskop sichtbare dysmorphe Veränderungen würden einen weiteren Hinweis zur Instabilität der AM geben können. Sind die Bakterien nicht auf dem Objektträger fixiert, könnte im gleichen Zuge ihre Beweglichkeit beurteilt werden. Einschränkungen der Beweglichkeit wären dann auf eine Funktionsstörung des Flagellums oder der Pili zurückzuführen. Wären in dieser Stelle Veränderungen beobachtbar, könnten sich Versuche zu Swarming motility, Biofilmbildung und Virulenz sinnvoll anschließen, da diese ebenfalls an die Funktionsfähigkeit des Flagellums und der Pili gebunden sind (vergleiche Kapitel 1.1.2). Um ein genaueres Verständnis zur Funktion von BamC in *Pa* und die Auswirkungen des Verlusts auf Protein-Ebene zu bekommen, sollte des Weiteren Veränderungen der AMP-Zusammensetzung und -Expression im Vergleich zum WT analysiert werden.

Führen diese Untersuchungen zu dem Schluss, dass BamC ein geeignetes Target wäre, stellt sich die Frage, wie sich eine solche Mutation auf klinisch relevante Stämme auswirkt. Die klinischen Isolate, meist resistent gegen multiple AB, unterscheiden sich in der Regel genetisch und phänotypisch vom Laborstamm PA14. Doch gerade hier sollen neu entwickelte AB zum Einsatz kommen. Gelingt die Erstellung von K.O.-Mutanten auch hier, stehen neben der oben beschriebenen Charakterisierung auch die direkte Auswirkung des K.O.s auf die natürlichen und erworbenen Resistenzmechanismen im Fokus. Es wäre interessant herauszufinden, warum die natürliche Resistenz von *Pa* gegen

Cefotaxim und Ampicillin mit Sulbactam bei der $\Delta bamC$ -Mutante nicht mehr vorhanden ist. Wie wirkt sich das Fehlen des Proteins auf andere Resistenzmechanismen, beispielsweise den vermehrten Einbau von Effluxpumpen, aus? Verlieren diese ihre Wirkung oder führt der Verlust von BamC womöglich sogar zu neuen Resistenzen, da die Targets von bisher eingesetzten AB fehlen oder Porine zur Aufnahme des AB in die Zelle nicht mehr gebildet werden?

Eine ausführliche Charakterisierung der $\Delta bamC$ -Mutante ist erstrebenswert, da der Ansatz, dieses Protein als Ziel für die Entwicklung neuer AB zu verwenden, neben den bereits genannten Vorteilen weitere Nutzen hat. Homologe der Proteine des BAM-Komplexes sind bei den meisten gramnegativen Bakterien zu finden (Leyton et al. 2015, Bakelar et al. 2017). Vor allem in der Klasse der Gammaproteobacteria besteht eine große Ähnlichkeit dieser Proteine (Webb et al. 2012), wohingegen bisher keine eukaryotische Homologe gefunden wurden (Paschen et al. 2005). Ebenso verhält es sich mit periplasmatischen Chaperonen, wie HlpA, und den Proteinen der Dsb-Familie, insbesondere DsbA (Schafer et al. 1999, Smith et al. 2016). Gelingt es, einen entsprechenden Wirkstoff gegen eines dieser Proteine zu finden, könnte das Medikament nicht nur spezifisch bei *Pa*-Infektionen angewendet werden, sondern auch übergreifend Wirkung auf die ganze Klasse der Gammaproteobacteria zeigen. Im Optimalfall könnten auch Infektionen mit gramnegativen Bakterien aus anderen Klassen damit behandelt werden. Dadurch, dass es zu diesen Targets keine eukaryotischen Korrelate gibt, hätte ein entsprechendes AB keine direkten Auswirkungen auf menschliche Zellen, was die Nebenwirkungen des Medikaments deutlich reduzieren würde. Auf der anderen Seite bedeutet das, dass das AB bei Bakterien ohne ein homologes Protein mit ähnlicher Struktur und Rolle in der AM-Biogenese, keine oder nur unzureichende Wirkung besitzt. Diese natürliche Resistenz kann aber auch als Vorteil genutzt werden:

Die physiologische Standortflora im GIT setzt sich zu 90 % aus Firmicutes und Bacteroidetes zusammen (Ley et al. 2006, Arumugam et al. 2011). Hinzu kommen, in absteigender relativer Häufigkeit, Actinobacteria, Proteobacteria, Verrucomicrobia, Euryarcheota und viele weitere Phyla (Stallmach und

Vehreschild 2016). Die Verwendung von AB verändert die Zusammensetzung des Mikrobioms und verschiebt damit das physiologische Gleichgewicht (Jernberg et al. 2007, Dethlefsen et al. 2008). Da die Darmflora eine wichtige Rolle bei der Abwehr pathogener Keime spielt, begünstigt die entstandene Dysbiose nach AB-Behandlung die Entstehung opportunistischer Infektionen, weil enteropathogene Erreger den Darm leichter kolonisieren können (van der Waaij et al. 1971, Kamada et al. 2013). Auch die Entstehung resistenter Bakterien wird gefördert, da durch horizontalen Gentransfer DNA-Elemente mit Resistenzkassetten übertragen werden können (Stallmach und Vehreschild 2016).

Ein Therapeutikum mit BamC als Target hätte, aufgrund des fehlenden Angriffspunkts, keine Wirkung auf die grampositiven Firmicutes. Auch auf die Klasse der Bacteroidetes hätte der Wirkstoff vermutlich nur einen schwachen oder keinen Einfluss. Es handelt sich hierbei zwar ebenfalls um gramnegative Bakterien, allerdings besteht keine nahe Verwandtschaft zur Klasse der Gammaproteobacteria, zu denen unter anderem Pseudomonaden, Enterobakterien und Legionellen gehören. Damit bliebe der Großteil der Darmflora von diesem AB unbeeinflusst und die Symbiose der Bakterien im GIT wäre so stark gestört. Allerdings sind Enterobakterien ebenfalls Bestandteil der Darmflora. Obwohl sie nur einen kleinen Anteil des Mikrobioms darstellen (Eckburg et al. 2005), wäre es wichtig zu untersuchen, inwiefern Bakterien dieser Familie von entsprechenden ABs betroffen wären und wie sich das auf die Zusammensetzung der Bakterien im Darm auswirken würde.

Auch die Lunge gesunder Menschen beherbergt ihr eigenes Mikrobiom. Es setzt sich vor allem aus Firmicutes, Bacteroidetes und einem geringen Anteil Proteobacteria zusammen (Park et al. 2014, Dickson et al. 2015). In der Lunge von Patienten mit zystischer Fibrose, die besonders häufig von schweren respiratorischen Infektionen mit *Pa* betroffen sind, ist in frühen Stadien der Erkrankung noch ein vielfältiges, ausgewogenes Mikrobiom nachweisbar. Im Verlauf der Krankheit nimmt die Diversität jedoch deutlich ab. Pathogene Keime, darunter vor allem *Pa*, dominieren nun die Mikrobiota der Lunge (Fodor et al. 2012, Stokell et al. 2015). Analog zum Mikrobiom des GIT ist auch hier der Erhalt der physiologischen Besiedelung erstrebenswert, um den Körper vor

weiteren Infektionen zu schützen. Vor allem bei Patienten, deren Immunsystem bereits supprimiert ist, müssen Sekundärinfektionen dringlichst vermieden werden. Wie bereits beschrieben, wären Firmicutes und Bacteroidetes nicht von der antimikrobiellen Behandlung betroffen. Dennoch müsste auch hier die Wirkung des AB auf den kleinen Anteil an Proteobacteria überprüft werden.

Das natürliche Mikrobiom der Haut, das den Körper zusätzlich zur physikalischen Barriere vor dem Eindringen pathogener Keime schützt, wird hauptsächlich von grampositiven Bakterien dominiert: Staphylokokken, Coryne-, Myko-, Propionibakterien und Enterokokken bestimmen das mikrobiologische Bild. Zusätzlich finden sich neben Pilzen viele weitere Bakterien, die ubiquitär in der Umgebung des Menschen vorkommen (Costello et al. 2009, Grice et al. 2009, Findley et al. 2013). Die physiologische Hautflora würde auch bei gegebenenfalls topischer Anwendung des neuen Medikaments, beispielsweise zur Behandlung einer Otitis externa, nicht gravierend gestört werden.

4.3 HlpA als potentielles Target

Das periplasmatische Chaperon HlpA interagiert mit ungefalteten AMPs und transportiert sie durch das Periplasma zur AM (siehe 1.2.2). Der Verlust des Proteins könnte zur Akkumulation der ungefalteten AMPs im Periplasma und damit zu einer gestörten Membranintegrität führen.

Die Tn_*hlpA*-Mutante, welche im Rahmen der Arbeit untersucht wurde, lieferte vielversprechende Ergebnisse: Verglichen mit dem WT zeigte die Transposon-Mutante eine geringere Resistenz gegenüber Ampicillin mit Sulbactam und Cefotaxim. Auch im BS-Assay wiesen die Bakterien eine signifikante Wachstumshemmung von 28,65 % auf. Die anschließende Mutagenese der Δ *hlpA*-K.O.-Mutante verlief jedoch problematisch, der Allel-Austausch zwischen PA14 WT und dem Vektor mit der K.O.-Kassette gelang nicht. Nach Abschluss des Matings waren entweder Bakterien mit WT-Genom oder keine Kolonien vorhanden. Aus diesem Grund wurde der Abschnitt des Genoms, in dem *hlpA* liegt, genauer betrachtet. Dabei fiel auf, dass das Gen des Chaperons von *bamA* und *lpxD* eingerahmt wird. Letzteres überschneidet sich sogar in einigen Basen mit dem Stopp-Codon von *hlpA*. Da LpxD ist ein essentielles Protein für *Pa* ist

(Badger et al. 2011), kam es beim Allel-Austausch im Zuge des Crossovers zum Funktionsverlust des Proteins, mit letalen Folgen für die Mutanten. Um dies zu vermeiden, wurde die K.O.-Kassette angepasst, sodass sie nun das komplette Gen *lpxD* enthielt und dieses nach der homologen Rekombination und der Deletion von *hlpA* weiterhin intakt im Genom verblieb. Unter Verwendung des neuen Konstrukts gelang die Herstellung von PA14 Δ *hlpA*.

Die Versuche mit der K.O.-Mutante konnten die Ergebnisse der Tn-Mutante generell nicht bestätigen. Die hohe Sensitivität der Tn-Mutante gegenüber äußeren Einflüssen lässt sich darauf zurückführen, dass Transposons gegebenenfalls auch die Expression der Gene in näherer Umgebung beeinflussen (Kulasekara 2014). Daher ist es denkbar, dass die Proteine der flankierenden Gene (*bamA*, *lpxD*) in der Tn-Mutante eine eingeschränkte Funktionalität aufweisen. Das würde die Auswirkungen auf den Phänotyp erklären, die sich hier zeigen.

Die Δ *hlpA*-Deletionsmutante zeigte bezüglich der AB-Sensitivität keine Unterschiede zum WT. Das Wachstum in LB + 0,3 % BS war nur leicht vermindert, ohne signifikante Differenz. Diese Ergebnisse decken sich mit den Untersuchungen der K.O.-Mutante des HlpA-Homologs Skp in *E. coli*. Schäfer et al. (1999) beobachteten zwar ein sensibleres Ansprechen der Mutante auf Rifampicin, Vancomycin und Novobiocin. Dennoch wies die Physiologie der AM nur leichte Veränderungen auf. Weitere Analysen der Δ *skp*-Mutante, sowie einer Doppel-K.O.-Mutante Δ *skp* Δ *degP*, führten zu dem Schluss, dass die Funktion des Proteins redundant sei. Sklar et al. (2007b) postulierten, dass Skp vermutlich eher Bestandteil eines Rettung-Pathways ist, der Störungen des primären Wegs mit SurA teilweise kompensieren kann.

Im Gegensatz dazu stehen die Beobachtungen in *Yersinia enterocolitica*. Die K.O.-Mutante zeigte sich sensitiver gegenüber Erythromycin und präsentierte leichte, eventuell subinhibitorische Veränderungen des Bakterienwachstums unter Einfluss von Vancomycin. Im Beisein von BS war das Wachstum der Mutante mit dem des WT vergleichbar. Jedoch war das Überleben des Δ *skp*-Stamms im Rahmen eines Serum Killing Assays signifikant reduziert. Außer-

dem zeigten sich Veränderungen in der AMP-Zusammensetzung, sowie eine verminderte Virulenz im Mausmodell (Weirich et al. 2017). In Anlehnung an diese Ergebnisse mit *Yersinia enterocolitica*, wäre es also interessant, auch PA14 Δ *hlpA* unter dem Einfluss von Humanserum zu untersuchen, sowie sich die Zusammensetzung der AMPs der Mutante anzuschauen. Hier könnten sich, ähnlich wie bei *Yersinia enterocolitica*, Veränderungen zeigen, die durch die Versuche mit AB und BS nicht detektierbar waren. Dennoch ist nach den vorliegenden Ergebnissen davon auszugehen, dass HlpA auch in *Pa* nur eine untergeordnete Rolle bei der Aufrechterhaltung der AM-Integrität spielt. Daraus lässt sich schließen, dass HlpA nicht zu den vielversprechenden potentiellen Targets gehört.

Trotzdem stellt sich die Frage, warum die AM-Integrität der Tn-Mutante im Gegensatz zur K.O.-Mutante so beeinträchtigt war. Grund dafür sind die Effekte der Tn-Kassette auf die Nachbar-Gene von *hlpA*, die deren Expression beeinflussen kann (Kulasekara 2014). Im Genom vom PA14 liegt *lpxD* downstream von *hlpA*. LpxD wirkt als Katalysator in der LPS-Biogenese (Badger et al. 2011), weshalb eine veränderte Expression von *lpxD* eine Störung im Prozess der LPS-Biogenese zur Folge hat. Neben der Schutzfunktion der LPS als äußere Schicht der AM, wirken sie auch als Endotoxin und spielen damit eine wichtige Rolle bezüglich der Virulenz von *Pa* (siehe Kapitel 1.1.2). Demnach ist davon auszugehen, dass die Mutante Tn_*hlpA*, neben der beobachteten Störung der AM-Integrität, auch in ihrer Virulenz vermindert sein könnte. Das weist vor allem auf die Eignung von LpxD als potentielles Target hin, zu dessen Potential zur Entwicklung neuer AB bereits geforscht wird (Zhou und Zhao 2017).

Upstream von *hlpA* befindet sich das Gen *bamA*. Sind die Beeinträchtigungen der Tn-Mutante auf eine gestörte Expression dieses Gens zurückzuführen, würde sich hier ebenfalls ein interessanter Ansatzpunkt für weitere Forschung bieten. Als Kern-Bestandteil des BAM-Komplexes ist BamA für Einbau und Faltung von AMPs zuständig (siehe auch Kapitel 1.2.1). Eine Depletion von BamA in *E. coli* führt zu einer allgemeinen Reduktion von AMP (Werner und Misra 2005, Wu et al. 2005). Generell wird BamA als essentiell erachtet. Man vermutet, dass auch in *Pa* die anderen Komponenten des Komplexes ohne BamA

nicht weiter funktionieren würden (Hoang et al. 2011). Deshalb wären weitere Untersuchungen interessant, um herauszufinden, inwiefern *Pa* eine Reduktion der BamA-Expression kompensieren kann. Da die Wachstumskurve der Tn_ *hlpA*-Mutante in LB der des WT entsprach und die Defizite der Bakterien sich erst unter Ausübung von Stress auf die Zelle, z.B. in Form von BS oder AB, zeigten, müssen Anpassungsreaktionen in der Zelle abgelaufen sein, die einer Reduktion der BamA-Expression entgegen wirken können. Diese reichen offenbar aus, um den sonst letalen Folgen für die Zelle zu entgehen.

4.4 DsbB, DsbH und DsbA1 als potentielle Targets

Die Oxidoreduktase DsbA1 und die IM-Proteine DsbB und DsbH spielen als Enzyme bei der Bildung der Disulfidbrücken eine maßgebliche Rolle. Da die Faltung vieler Virulenzfaktoren davon abhängig ist, stellen diese Proteine attraktive Targets dar (Heras et al. 2009). *Pa* besitzt zwei DsbB-Homologe (DsbB und DsbH). Arts et al. (2013) konnten zeigen, dass die beiden Proteine redundante Funktionen besitzen. Aus diesem Grund wurde auch in dieser Arbeit eine $\Delta dsbB\Delta dsbH$ -Doppel-K.O.-Mutante erstellt. Bei der Agar-Diffusionstestung mit verschiedenen AB ließen sich weder bei den Einzel-K.O.-Mutanten $\Delta dsbB$, $\Delta dsbH$ und $\Delta dsbA1$, noch bei der Doppel-K.O.-Mutante Unterschiede zum WT zeigen. Auch im Rahmen des BS-Assay wurde das Wachstum der Einzel-K.O.- und der Tn-Mutanten der Gene *dsbB* und *dsbH* nicht durch die Gallensalze beeinflusst. Des Weiteren zeigten bei diesen Versuchen sowohl PA14 $\Delta dsbA1$, als auch PA14 $\Delta dsbB\Delta dsbH$ ein vermindertes Wachstum in LB mit 0,3 % BS, jedoch ohne signifikanten Unterschied zum WT. Auffällig war, dass die $\Delta dsbA1$ -Mutante offenbar auch in reinem LB schlechter wuchs. Zwar war dieser Unterschied ebenfalls nicht signifikant, dennoch könnte es ein Hinweis auf eine Beeinträchtigung der Mutante sein.

Die Ergebnisse entsprachen nicht den Erwartungen, die der aktuelle Forschungsstand an die K.O.-Mutanten stellte. Die hier erzielten Resultate weisen nicht auf eine gestörte AM-Integrität der K.O.-Mutanten auf und die Dsb-Proteine scheinen sich daher nicht als Targets zu eignen. Betrachtet man

jedoch andere Aspekte, wie die Auswirkungen der Mutationen auf Virulenzfaktoren, kommt man zu einem anderen Schluss. So konnten bei einer PA14 Δ *dsbB* Δ *dsbH*-Mutante unter anderem signifikante Veränderungen der Biofilmformation und Elastase-Aktivität nachgewiesen werden. Auch die PA14-K.O.-Mutante des Gens *dsbA1* zeigte eine Reduktion mehrerer Hüllproteine (Arts et al. 2013). Beide Mutanten wiesen Defekte in ihrer Beweglichkeit auf und präsentierten sich in unterschiedlichen Modellen signifikant weniger virulent (Rahme et al. 1997, Tan et al. 1999, Ha et al. 2003, Kim et al. 2008, Arts et al. 2013). Aufgrund der vielversprechenden Ergebnisse suchten bereits mehrere Arbeitsgruppen nach chemischen Verbindungen, die DsbA und DsbB in *E. coli* hemmen. Einige dieser DsbB-Inhibitoren wurden auch an den DsbB-Homologen von *Pa* getestet und erwiesen sich als wirksam. Der WT-Stamm zeigte unter Einfluss des Wirkstoffs eine deutliche Einschränkung seiner Beweglichkeit (Landeta et al. 2015, Smith et al. 2016). Daher sollten die oben genannten Mutanten in weiteren *in vitro* Assays und insbesondere in geeigneten Infektionsmodellen (z.B. *Galleria melonella*) noch besser charakterisiert werden.

4.5 Weitere Ansätze und Ausblick

Neben den in dieser Arbeit untersuchten Proteinen gibt es eine Vielzahl weiterer potentieller Targets, die im Zusammenhang mit der AM-Biogenese stehen. Bei den hier durchgeführten Experimenten wurden PA14 Δ *bamB* und PA14-Tn_*surA* als Positivkontrollen verwendet. Verglichen mit den Ergebnissen, die mit diesen beiden Stämmen erzielt werden konnten, waren die Defizite der Δ *bamC*-Mutante nur gering ausgeprägt. Deshalb ist davon auszugehen, dass BamB und SurA als Targets besser geeignet sind als BamC, da sich der Verlust dieser Proteine deutlich stärker auf die Zellen auswirkt. Auch in anderen Arbeiten wurde gezeigt, dass BamB und SurA potentielle Targets sind. Dahingehend wurden die beiden Proteine nicht nur in *E. coli* untersucht (Lazar und Kolter 1996, Ruiz et al. 2005, Wu et al. 2005, Sklar et al. 2007b), sondern auch die Auswirkungen eines K.O.s von BamB und SurA in weiteren gramnegativen Spezies wie *Yersinia enterocolitica* (Weirich et al. 2017) oder *Salmonella*

enteritidis (Fardini et al. 2009) näher beleuchtet. Auch im *Pa*-Stamm PAO1 konnte eine deutliche Störung der AM-Integrität einer $\Delta bamB$ -Mutante nachgewiesen werden (Lee et al. 2017).

In den letzten Jahren wurde intensiv nach neuen potentiellen Targets für die antibiotische Behandlung von *Pa* gesucht. Im Fokus standen dabei weitere Bestandteile der Zellwandbiosynthese (Elamin et al. 2017, Lee et al. 2017), Targets im Zellwandmetabolismus (Lamers und Burrows 2016) und das Porin OmpH (Liu et al. 2018). LPS und die zugehörigen Biosynthesewege gelten ebenfalls als vielversprechende Targets (Silver 2011, Walsh und Wencewicz 2014). Ein großer Durchbruch gelang bereits mit der Synthese von Murepavadin, dem ersten Wirkstoff aus der Gruppe der AMP-Targeting-AB. Sein Target ist das Lipopolysaccharid-Transport-Protein LptD (Srinivas et al. 2010, Urfer et al. 2016). Das AB zeigte vielversprechende Ergebnisse im Einsatz bei klinischen Isolaten sowie in ersten Studien am Menschen (Sader et al. 2018, Wach et al. 2018).

Unabhängig vom Forschungsansatz der Störung der AM-Integrität widmen sich einige Arbeitsgruppen der Suche nach Porinen und Uptake-Mechanismen, die für eine schnellere und leichtere Aufnahme von AB sorgen sollen. Dadurch sollen höhere Wirkstoffkonzentrationen in den Zellen erreicht werden. Um die Aufnahme der AB über diese Mechanismen zu ermöglichen, müssen die AB entsprechend modifiziert werden, damit sie den eigentlichen Uptake-Targets ähneln (Page 2013, Isabella et al. 2015, Cunrath et al. 2016).

Ein weiterer Ansatz ist die Entwicklung von Effluxpumpen-Inhibitoren (Renau et al. 2003, Bohnert und Kern 2005, Opperman und Nguyen 2015). Da Effluxpumpen eine signifikante Rolle bei der Entstehung von multiresistenten Stämmen spielen, stellen diese Inhibitoren nicht nur die Wirksamkeit einiger AB wieder her, sondern können auch das Auftreten von Resistenzen vermindern (Lomovskaya et al. 1999).

Auf der Suche nach neuen Therapiemöglichkeiten für Infektionen mit *Pa* und anderen multiresistenten Keimen machen die aktuellen Fortschritte Hoffnung auf die Entwicklung neuer, gut wirksamer AB-Klassen. Dennoch sind multiresis-

tente Bakterien weiterhin ein großes Problem, weshalb die (Weiter-)Entwicklung neuer Medikamente auch in Zukunft höchste Priorität haben muss.

5 Zusammenfassung

Pseudomonas aeruginosa (*Pa*), ein gramnegatives, stabförmiges Bakterium, ist ein opportunistischer Krankheitserreger, dessen Behandlung die Medizin vor große Herausforderungen stellt. Die meist nosokomial erworbenen Infektionen mit *Pa* betreffen vor allem immunsupprimierte Patienten und führen nicht selten zum Tod. Die Behandlung mit Antibiotika wird durch multiple intrinsische und erworbene Resistenzen der Bakterien zunehmend schwerer. Um *Pa* auch in Zukunft effizient bekämpfen zu können, müssen neue AB entwickelt werden. Dabei spielt die Suche nach potentiellen Angriffszielen für neue Wirkstoffe eine wichtige Rolle. In dieser Arbeit wurden die Proteine BamC, HlpA, DsbB, DsbH und DsbA1 auf ihrer Eignung als mögliche Targets genauer untersucht. Dazu wurden, basierend auf dem Laborstamm PA14, K.O.-Mutanten dieser Proteine generiert. Da die Außenmembran von *Pa* sowohl einen wichtigen Schutzfaktor darstellt, als auch eine große Rolle bei der Virulenz der Bakterien spielt, wurden Proteine ausgewählt, die an der AM-Biogenese beteiligt sind. BamC ist ein Lipoprotein und Bestandteil des BAM-Komplexes, der für Faltung und Einbau von Proteinen in die AM sorgt. Die Außenmembranproteine werden im Cytoplasma gebildet und anschließend zur AM und dem dort lokalisierten BAM-Komplex transportiert. Dazu interagiert das periplasmatische Chaperon HlpA mit den ungefalteten AMPs, transportiert sie durch das Periplasma zur AM und verhindert die Aggregation der Proteine. Bei der Faltung und Stabilisierung vieler AM- und von *Pa* sekretierter Proteine spielen Disulfidbrücken ebenfalls eine wichtige Rolle. Die Oxidoreduktase DsbA1 und die IM-Proteine DsbB und DsbH spielen als Enzyme bei der Bildung von Disulfidbrückenbindungen eine maßgebliche Rolle. DsbA1 katalysiert ihre Bildung, DsbB und DsbH reoxidieren DsbA1 und stellen so den Ausgangszustand und damit die Funktionalität wieder her. Die beiden Proteine sind vermutlich redundant. Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit zusätzlich eine Doppel-K.O.-Mutante erstellt.

Mit Hilfe der in dieser Studie hergestellten Deletionsmutanten wurde untersucht, ob die entsprechenden Gene für die Integrität der AM eine wichtige Rolle spielen. Die Charakterisierung der Mutanten erfolgte durch Versuche mit AB,

Gallensalzen und Humanserum. Dabei zeigten sich nur bei der $\Delta bamC$ -Mutante Hinweise auf eine gestörte Membranintegrität. Die Bakterien waren im Vergleich zum Wildtyp sensitiver gegenüber Vancomycin, Cefotaxim und Ampicillin in Kombination mit Sulbactam. Das Wachstum der Mutante zeigte sich auch in Anwesenheit von Gallensalzen signifikant gehemmt. Die Ergebnisse des Versuchs mit Humanserum deuteten zwar zunächst ebenfalls ein eingeschränktes Überleben der Bakterien an, bildeten allerdings nur einen einzigen Zeitpunkt ab und sind deshalb nur bedingt verwertbar.

In allen Experimenten zeigten sich die Einschränkungen der Mutante im Vergleich zum WT nicht besonders stark ausgeprägt. Das lässt die Schlussfolgerung zu, dass BamC bei der AM-Biogenese von *Pa* eine eher untergeordnete Rolle spielt. Daher scheinen die Bakterien den Ausfall des Proteins weitgehend kompensieren zu können, sodass die AM-Integrität nur in geringem Ausmaß beeinträchtigt wird.

Zusammenfassend empfiehlt sich deshalb weder BamC, noch eines der anderen untersuchten Proteine, als gutes Target für die Entwicklung von Antiinfektiva.

6 Literaturverzeichnis

Arts, I. S., G. Ball, P. Leverrier, S. Garvis, V. Nicolaes, D. Vertommen, B. Ize, V. Tamu Dufe, J. Messens, R. Voulhoux und J. F. Collet (2013). "Dissecting the machinery that introduces disulfide bonds in *Pseudomonas aeruginosa*." MBio **4**(6): e00912-00913.

Arumugam, M., J. Raes, E. Pelletier, D. Le Paslier, T. Yamada, D. R. Mende, G. R. Fernandes, J. Tap, T. Bruls, J. M. Batto, M. Bertalan, N. Borruel, F. Casellas, L. Fernandez, L. Gautier, T. Hansen, M. Hattori, T. Hayashi, M. Kleerebezem, K. Kurokawa, M. Leclerc, F. Levenez, C. Manichanh, H. B. Nielsen, T. Nielsen, N. Pons, J. Poulain, J. Qin, T. Sicheritz-Ponten, S. Tims, D. Torrents, E. Ugarte, E. G. Zoetendal, J. Wang, F. Guarner, O. Pedersen, W. M. de Vos, S. Brunak, J. Dore, H. I. T. C. Meta, M. Antolin, F. Artiguenave, H. M. Blottiere, M. Almeida, C. Brechot, C. Cara, C. Chervaux, A. Cultrone, C. Delorme, G. Denariáz, R. Dervyn, K. U. Foerstner, C. Friss, M. van de Guchte, E. Guedon, F. Haimet, W. Huber, J. van Hylckama-Vlieg, A. Jamet, C. Juste, G. Kaci, J. Knol, O. Lakhdari, S. Layec, K. Le Roux, E. Maguin, A. Merieux, R. Melo Minardi, C. M'Rini, J. Muller, R. Oozeer, J. Parkhill, P. Renault, M. Rescigno, N. Sanchez, S. Sunagawa, A. Torrejon, K. Turner, G. Vandemeulebrouck, E. Varela, Y. Winogradsky, G. Zeller, J. Weissenbach, S. D. Ehrlich und P. Bork (2011). "Enterotypes of the human gut microbiome." Nature **473**(7346): 174-180.

Bader, M., W. Muse, D. P. Ballou, C. Gassner und J. C. Bardwell (1999). "Oxidative protein folding is driven by the electron transport system." Cell **98**(2): 217-227.

Badger, J., B. Chie-Leon, C. Logan, V. Sridhar, B. Sankaran, P. H. Zwart und V. Nienaber (2011). "The structure of LpxD from *Pseudomonas aeruginosa* at 1.3 Å resolution." Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun **67**(Pt 7): 749-752.

Bakelar, J., S. K. Buchanan und N. Noinaj (2016). "The structure of the beta-barrel assembly machinery complex." Science **351**(6269): 180-186.

Bakelar, J., S. K. Buchanan und N. Noinaj (2017). "Structural snapshots of the beta-barrel assembly machinery." FEBS J **284**(12): 1778-1786.

Bardwell, J. C., J. O. Lee, G. Jander, N. Martin, D. Belin und J. Beckwith (1993). "A pathway for disulfide bond formation in vivo." Proc Natl Acad Sci U S A **90**(3): 1038-1042.

Bardwell, J. C., K. McGovern und J. Beckwith (1991). "Identification of a protein required for disulfide bond formation in vivo." Cell **67**(3): 581-589.

Behrens, S., R. Maier, H. de Cock, F. X. Schmid und C. A. Gross (2001). "The SurA periplasmic PPIase lacking its parvulin domains functions in vivo and has chaperone activity." EMBO J **20**(1-2): 285-294.

Bendig, J. W., P. W. Kyle, P. L. Giangrande, D. M. Samson und B. S. Azadian (1987). "Two neutropenic patients with multiple resistant *Pseudomonas aeruginosa* septicemia treated with ciprofloxacin." J R Soc Med **80**(5): 316-317.

Bjarnsholt, T., T. Tolker-Nielsen, N. Hoiby und M. Givskov (2010). "Interference of *Pseudomonas aeruginosa* signalling and biofilm formation for infection control." Expert Rev Mol Med **12**: e11.

- Blattner, F. R., G. Plunkett, 3rd, C. A. Bloch, N. T. Perna, V. Burland, M. Riley, J. Collado-Vides, J. D. Glasner, C. K. Rode, G. F. Mayhew, J. Gregor, N. W. Davis, H. A. Kirkpatrick, M. A. Goeden, D. J. Rose, B. Mau und Y. Shao (1997). "The complete genome sequence of Escherichia coli K-12." Science **277**(5331): 1453-1462.
- Bleves, S., V. Viarre, R. Salacha, G. P. Michel, A. Filloux und R. Voulhoux (2010). "Protein secretion systems in Pseudomonas aeruginosa: A wealth of pathogenic weapons." Int J Med Microbiol **300**(8): 534-543.
- Bohnert, J. A. und W. V. Kern (2005). "Selected arylpiperazines are capable of reversing multidrug resistance in Escherichia coli overexpressing RND efflux pumps." Antimicrob Agents Chemother **49**(2): 849-852.
- Braun, P., C. Ockhuijsen, E. Eppens, M. Koster, W. Bitter und J. Tommassen (2001). "Maturation of Pseudomonas aeruginosa elastase. Formation of the disulfide bonds." J Biol Chem **276**(28): 26030-26035.
- Breidenstein, E. B., C. de la Fuente-Nunez und R. E. Hancock (2011). "Pseudomonas aeruginosa: all roads lead to resistance." Trends Microbiol **19**(8): 419-426.
- Bulieris, P. V., S. Behrens, O. Holst und J. H. Kleinschmidt (2003). "Folding and insertion of the outer membrane protein OmpA is assisted by the chaperone Skp and by lipopolysaccharide." J Biol Chem **278**(11): 9092-9099.
- CDC (2013). Antibiotic Resistance Threats in the United States, 2013.
- Chen, R. und U. Henning (1996). "A periplasmic protein (Skp) of Escherichia coli selectively binds a class of outer membrane proteins." Mol Microbiol **19**(6): 1287-1294.
- Cianciotto, N. P. (2005). "Type II secretion: a protein secretion system for all seasons." Trends Microbiol **13**(12): 581-588.
- Collet, J. F. und J. C. Bardwell (2002). "Oxidative protein folding in bacteria." Mol Microbiol **44**(1): 1-8.
- Cornelis, P., S. Matthijs und L. Van Oeffelen (2009). "Iron uptake regulation in Pseudomonas aeruginosa." Biometals **22**(1): 15-22.
- Costello, E. K., C. L. Lauber, M. Hamady, N. Fierer, J. I. Gordon und R. Knight (2009). "Bacterial community variation in human body habitats across space and time." Science **326**(5960): 1694-1697.
- Craig, L., M. E. Pique und J. A. Tainer (2004). "Type IV pilus structure and bacterial pathogenicity." Nat Rev Microbiol **2**(5): 363-378.
- Cunrath, O., V. A. Geoffroy und I. J. Schalk (2016). "Metallome of Pseudomonas aeruginosa: a role for siderophores." Environ Microbiol **18**(10): 3258-3267.
- De Cock, H., U. Schafer, M. Potgeter, R. Demel, M. Muller und J. Tommassen (1999). "Affinity of the periplasmic chaperone Skp of Escherichia coli for phospholipids, lipopolysaccharides and non-native outer membrane proteins. Role of Skp in the biogenesis of outer membrane protein." Eur J Biochem **259**(1-2): 96-103.
- Deep, A., U. Chaudhary und V. Gupta (2011). "Quorum sensing and Bacterial Pathogenicity: From Molecules to Disease." J Lab Physicians **3**(1): 4-11.

- Denoncin, K., J. Schwalm, D. Vertommen, T. J. Silhavy und J. F. Collet (2012). "Dissecting the Escherichia coli periplasmic chaperone network using differential proteomics." Proteomics **12**(9): 1391-1401.
- Depuydt, M., J. Messens und J. F. Collet (2011). "How proteins form disulfide bonds." Antioxid Redox Signal **15**(1): 49-66.
- Dethlefsen, L., S. Huse, M. L. Sogin und D. A. Relman (2008). "The pervasive effects of an antibiotic on the human gut microbiota, as revealed by deep 16S rRNA sequencing." PLoS Biol **6**(11): e280.
- Dickson, R. P., J. R. Erb-Downward, C. M. Freeman, L. McCloskey, J. M. Beck, G. B. Huffnagle und J. L. Curtis (2015). "Spatial Variation in the Healthy Human Lung Microbiome and the Adapted Island Model of Lung Biogeography." Ann Am Thorac Soc **12**(6): 821-830.
- Drusano, G. L., W. Hope, A. MacGowan und A. Louie (2015a). "Suppression of Emergence of Resistance in Pathogenic Bacteria: Keeping Our Powder Dry, Part 2." Antimicrob Agents Chemother **60**(3): 1194-1201.
- Drusano, G. L., A. Louie, A. MacGowan und W. Hope (2015b). "Suppression of Emergence of Resistance in Pathogenic Bacteria: Keeping Our Powder Dry, Part 1." Antimicrob Agents Chemother **60**(3): 1183-1193.
- Dudek, B., E. Krzyzewska, K. Kapczynska, J. Rybka, A. Pawlak, K. Korzekwa, E. Klaus and G. Bugla-Ploskonska (2016). "Proteomic Analysis of Outer Membrane Proteins from Salmonella Enteritidis Strains with Different Sensitivity to Human Serum." PLoS One **11**(10): e0164069.
- Eckburg, P. B., E. M. Bik, C. N. Bernstein, E. Purdom, L. Dethlefsen, M. Sargent, S. R. Gill, K. E. Nelson und D. A. Relman (2005). "Diversity of the human intestinal microbial flora." Science **308**(5728): 1635-1638.
- Economou, A., P. J. Christie, R. C. Fernandez, T. Palmer, G. V. Plano und A. P. Pugsley (2006). "Secretion by numbers: Protein traffic in prokaryotes." Mol Microbiol **62**(2): 308-319.
- Elamin, A. A., S. Steinicke, W. Oehlmann, Y. Braun, H. Wanas, E. A. Shuralev, C. Huck, M. Maringer, M. Rohde und M. Singh (2017). "Novel drug targets in cell wall biosynthesis exploited by gene disruption in Pseudomonas aeruginosa." PLoS One **12**(10): e0186801.
- Fardini, Y., J. Trotereau, E. Bottreau, C. Souchard, P. Velge und I. Virlogeux-Payant (2009). "Investigation of the role of the BAM complex and SurA chaperone in outer-membrane protein biogenesis and type III secretion system expression in Salmonella." Microbiology **155**(Pt 5): 1613-1622.
- Findley, K., J. Oh, J. Yang, S. Conlan, C. Deming, J. A. Meyer, D. Schoenfeld, E. Nomicos, M. Park, N. I. H. I. S. C. C. S. Program, H. H. Kong und J. A. Segre (2013). "Topographic diversity of fungal and bacterial communities in human skin." Nature **498**(7454): 367-370.
- Fodor, A. A., E. R. Klem, D. F. Gilpin, J. S. Elborn, R. C. Boucher, M. M. Tunney und M. C. Wolfgang (2012). "The adult cystic fibrosis airway microbiota is stable over time

and infection type, and highly resilient to antibiotic treatment of exacerbations." PLoS One **7**(9): e45001.

Frank, L. H. und R. D. Demoss (1959). "On the biosynthesis of pyocyanine." J Bacteriol **77**(6): 776-782.

Franzetti, F., M. Cernuschi, R. Esposito und M. Moroni (1992). "Pseudomonas infections in patients with AIDS and AIDS-related complex." J Intern Med **231**(4): 437-443.

Garsin, D. A., J. Urbach, J. C. Huguet-Tapia, J. E. Peters und F. M. Ausubel (2004). "Construction of an Enterococcus faecalis Tn917-mediated-gene-disruption library offers insight into Tn917 insertion patterns." J Bacteriol **186**(21): 7280-7289.

Ge, X., R. Wang, J. Ma, Y. Liu, A. N. Ezemaduka, P. R. Chen, X. Fu und Z. Chang (2014). "DegP primarily functions as a protease for the biogenesis of beta-barrel outer membrane proteins in the Gram-negative bacterium Escherichia coli." FEBS J **281**(4): 1226-1240.

Gellatly, S. L. und R. E. Hancock (2013). "Pseudomonas aeruginosa: new insights into pathogenesis and host defenses." Pathog Dis **67**(3): 159-173.

Gilarranz, R., C. Juan, J. Castillo-Vera, F. J. Chamizo, F. Artilles, I. Alamo und A. Oliver (2013). "First detection in Europe of the metallo-beta-lactamase IMP-15 in clinical strains of Pseudomonas putida and Pseudomonas aeruginosa." Clin Microbiol Infect **19**(9): E424-427.

Grice, E. A., H. H. Kong, S. Conlan, C. B. Deming, J. Davis, A. C. Young, N. C. S. Program, G. G. Bouffard, R. W. Blakesley, P. R. Murray, E. D. Green, M. L. Turner und J. A. Segre (2009). "Topographical and temporal diversity of the human skin microbiome." Science **324**(5931): 1190-1192.

Ha, U. H., Y. Wang und S. Jin (2003). "DsbA of Pseudomonas aeruginosa is essential for multiple virulence factors." Infect Immun **71**(3): 1590-1595.

Hagan, C. L., S. Kim und D. Kahne (2010). "Reconstitution of outer membrane protein assembly from purified components." Science **328**(5980): 890-892.

Hagan, C. L., T. J. Silhavy und D. Kahne (2011). "beta-Barrel membrane protein assembly by the Bam complex." Annu Rev Biochem **80**: 189-210.

Hall-Stoodley, L. und P. Stoodley (2009). "Evolving concepts in biofilm infections." Cell Microbiol **11**(7): 1034-1043.

Hallstrom, T. und K. Riesbeck (2010). "Haemophilus influenzae and the complement system." Trends Microbiol **18**(6): 258-265.

Hallstrom, T., M. Uhde, B. Singh, C. Skerka, K. Riesbeck und P. F. Zipfel (2015). "Pseudomonas aeruginosa Uses Dihydroliipoamide Dehydrogenase (Lpd) to Bind to the Human Terminal Pathway Regulators Vitronectin and Clusterin to Inhibit Terminal Pathway Complement Attack." PLoS One **10**(9): e0137630.

Hancock, R. E. (1998). "Resistance mechanisms in Pseudomonas aeruginosa and other nonfermentative gram-negative bacteria." Clin Infect Dis **27 Suppl 1**: S93-99.

Hancock, R. E., R. Siehnel und N. Martin (1990). "Outer membrane proteins of *Pseudomonas*." Mol Microbiol **4**(7): 1069-1075.

Hauser, A. R. (2009). "The type III secretion system of *Pseudomonas aeruginosa*: infection by injection." Nat Rev Microbiol **7**(9): 654-665.

Heras, B., S. R. Shouldice, M. Totsika, M. J. Scanlon, M. A. Schembri und J. L. Martin (2009). "DSB proteins and bacterial pathogenicity." Nat Rev Microbiol **7**(3): 215-225.

Hirvas, L., J. Coleman, P. Koski und M. Vaara (1990). "Bacterial 'histone-like protein I' (HLP-I) is an outer membrane constituent?" FEBS Lett **262**(1): 123-126.

Hmelo, L. R., B. R. Borlee, H. Almblad, M. E. Love, T. E. Randall, B. S. Tseng, C. Lin, Y. Irie, K. M. Storek, J. J. Yang, R. J. Siehnel, P. L. Howell, P. K. Singh, T. Tolker-Nielsen, M. R. Parsek, H. P. Schweizer und J. J. Harrison (2015). "Precision-engineering the *Pseudomonas aeruginosa* genome with two-step allelic exchange." Nat Protoc **10**(11): 1820-1841.

Hoang, H. H., N. N. Nickerson, V. T. Lee, A. Kazimirova, M. Chami, A. P. Pugsley und S. Lory (2011). "Outer membrane targeting of *Pseudomonas aeruginosa* proteins shows variable dependence on the components of Bam and Lol machineries." MBio **2**(6).

Hutchison, C. A., S. N. Peterson, S. R. Gill, R. T. Cline, O. White, C. M. Fraser, H. O. Smith und J. C. Venter (1999). "Global transposon mutagenesis and a minimal *Mycoplasma* genome." Science **286**(5447): 2165-2169.

Isabella, V. M., A. J. Campbell, J. Manchester, M. Sylvester, A. S. Nayar, K. E. Ferguson, R. Tommasi und A. A. Miller (2015). "Toward the rational design of carbapenem uptake in *Pseudomonas aeruginosa*." Chem Biol **22**(4): 535-547.

Jarchow, S., C. Luck, A. Gorg und A. Skerra (2008). "Identification of potential substrate proteins for the periplasmic *Escherichia coli* chaperone Skp." Proteomics **8**(23-24): 4987-4994.

Jernberg, C., S. Lofmark, C. Edlund und J. K. Jansson (2007). "Long-term ecological impacts of antibiotic administration on the human intestinal microbiota." ISME J **1**(1): 56-66.

Jimenez, P. N., G. Koch, J. A. Thompson, K. B. Xavier, R. H. Cool und W. J. Quax (2012). "The multiple signaling systems regulating virulence in *Pseudomonas aeruginosa*." Microbiol Mol Biol Rev **76**(1): 46-65.

Justice, S. S., S. R. Lauer, S. J. Hultgren und D. A. Hunstad (2006). "Maturation of intracellular *Escherichia coli* communities requires SurA." Infect Immun **74**(8): 4793-4800.

Kadokura, H., H. Tian, T. Zander, J. C. Bardwell und J. Beckwith (2004). "Snapshots of DsbA in action: detection of proteins in the process of oxidative folding." Science **303**(5657): 534-537.

Kamada, N., G. Y. Chen, N. Inohara und G. Nunez (2013). "Control of pathogens and pathobionts by the gut microbiota." Nat Immunol **14**(7): 685-690.

Kerckhoffs, A. P., K. Ben-Amor, M. Samsom, M. E. van der Rest, J. de Vogel, J. Knol und L. M. Akkermans (2011). "Molecular analysis of faecal and duodenal samples

reveals significantly higher prevalence and numbers of *Pseudomonas aeruginosa* in irritable bowel syndrome." J Med Microbiol **60**(Pt 2): 236-245.

Kim, K. H., S. Aulakh und M. Paetzel (2011). "Crystal structure of beta-barrel assembly machinery BamCD protein complex." J Biol Chem **286**(45): 39116-39121.

Kim, K. H., S. Aulakh und M. Paetzel (2012). "The bacterial outer membrane beta-barrel assembly machinery." Protein Sci **21**(6): 751-768.

Kim, S., J. C. Malinverni, P. Sliz, T. J. Silhavy, S. C. Harrison und D. Kahne (2007). "Structure and function of an essential component of the outer membrane protein assembly machine." Science **317**(5840): 961-964.

Kim, S. H., S. Y. Park, Y. J. Heo und Y. H. Cho (2008). "Drosophila melanogaster-based screening for multihost virulence factors of *Pseudomonas aeruginosa* PA14 and identification of a virulence-attenuating factor, HudA." Infect Immun **76**(9): 4152-4162.

King, J. D., D. Kocincova, E. L. Westman und J. S. Lam (2009). "Review: Lipopolysaccharide biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa*." Innate Immun **15**(5): 261-312.

Kipnis, E., T. Sawa und J. Wiener-Kronish (2006). "Targeting mechanisms of *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis." Med Mal Infect **36**(2): 78-91.

Knowles, T. J., A. Scott-Tucker, M. Overduin und I. R. Henderson (2009). "Membrane protein architects: the role of the BAM complex in outer membrane protein assembly." Nat Rev Microbiol **7**(3): 206-214.

Kohler, T., L. K. Curty, F. Barja, C. van Delden und J. C. Pechere (2000). "Swarming of *Pseudomonas aeruginosa* is dependent on cell-to-cell signaling and requires flagella and pili." J Bacteriol **182**(21): 5990-5996.

Korndorfer, I. P., M. K. Dommel und A. Skerra (2004). "Structure of the periplasmic chaperone Skp suggests functional similarity with cytosolic chaperones despite differing architecture." Nat Struct Mol Biol **11**(10): 1015-1020.

Kulasekara, H. D. (2014). Transposon Mutagenesis. Pseudomonas Methods and Protocols. A. Filloux and J.-L. Ramos. New York, NY, Springer New York: 501-519.

Lambert, P. A. (2002). "Mechanisms of antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*." J R Soc Med **95 Suppl 41**: 22-26.

Lamers, R. P. und L. L. Burrows (2016). "*Pseudomonas aeruginosa*: targeting cell-wall metabolism for new antibacterial discovery and development." Future Med Chem **8**(9): 975-992.

Landeta, C., J. L. Blazyk, F. Hatahet, B. M. Meehan, M. Eser, A. Myrick, L. Bronstain, S. Minami, H. Arnold, N. Ke, E. J. Rubin, B. C. Furie, B. Furie, J. Beckwith, R. Dutton und D. Boyd (2015). "Compounds targeting disulfide bond forming enzyme DsbB of Gram-negative bacteria." Nat Chem Biol **11**(4): 292-298.

Lathe, R., H. Buc, J. P. Lecocq und E. K. Bautz (1980). "Prokaryotic histone-like protein interacting with RNA polymerase." Proc Natl Acad Sci U S A **77**(6): 3548-3552.

Lau, G. W., D. J. Hassett, H. Ran und F. Kong (2004). "The role of pyocyanin in *Pseudomonas aeruginosa* infection." Trends Mol Med **10**(12): 599-606.

Lazar, S. W. und R. Kolter (1996). "SurA assists the folding of Escherichia coli outer membrane proteins." J Bacteriol **178**(6): 1770-1773.

Lee, K. M., K. Lee, J. Go, I. H. Park, J. S. Shin, J. Y. Choi, H. J. Kim und S. S. Yoon (2017). "A Genetic Screen Reveals Novel Targets to Render Pseudomonas aeruginosa Sensitive to Lysozyme and Cell Wall-Targeting Antibiotics." Front Cell Infect Microbiol **7**: 59.

Lehoux, D. E., F. Sanschagrin und R. C. Levesque (2002). "Identification of in vivo essential genes from Pseudomonas aeruginosa by PCR-based signature-tagged mutagenesis." FEMS Microbiol Lett **210**(1): 73-80.

Leichert, L. I. und U. Jakob (2004). "Protein thiol modifications visualized in vivo." PLoS Biol **2**(11): e333.

Ley, R. E., D. A. Peterson und J. I. Gordon (2006). "Ecological and evolutionary forces shaping microbial diversity in the human intestine." Cell **124**(4): 837-848.

Leyton, D. L., M. J. Belousoff und T. Lithgow (2015). "The beta-Barrel Assembly Machinery Complex." Methods Mol Biol **1329**: 1-16.

Liberati, N. T., J. M. Urbach, S. Miyata, D. G. Lee, E. Drenkard, G. Wu, J. Villanueva, T. Wei und F. M. Ausubel (2006). "An ordered, nonredundant library of Pseudomonas aeruginosa strain PA14 transposon insertion mutants." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(8): 2833-2838.

Lieleg, O., M. Caldara, R. Baumgartel und K. Ribbeck (2011). "Mechanical robustness of Pseudomonas aeruginosa biofilms." Soft Matter **7**(7): 3307-3314.

Lister, P. D., D. J. Wolter und N. D. Hanson (2009). "Antibacterial-resistant Pseudomonas aeruginosa: clinical impact and complex regulation of chromosomally encoded resistance mechanisms." Clin Microbiol Rev **22**(4): 582-610.

Liu, C., X. Pan, B. Xia, F. Chen, Y. Jin, F. Bai, G. Priebe, Z. Cheng, S. Jin und W. Wu (2018). "Construction of a Protective Vaccine Against Lipopolysaccharide-Heterologous Pseudomonas aeruginosa Strains Based on Expression Profiling of Outer Membrane Proteins During Infection." Front Immunol **9**: 1737.

Lomovskaya, O., A. Lee, K. Hoshino, H. Ishida, A. Mistry, M. S. Warren, E. Boyer, S. Chamberland und V. J. Lee (1999). "Use of a genetic approach to evaluate the consequences of inhibition of efflux pumps in Pseudomonas aeruginosa." Antimicrob Agents Chemother **43**(6): 1340-1346.

Lyczak, J. B., C. L. Cannon und G. B. Pier (2000). "Establishment of Pseudomonas aeruginosa infection: lessons from a versatile opportunist." Microbes Infect **2**(9): 1051-1060.

Mah, T. F. und G. A. O'Toole (2001). "Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents." Trends Microbiol **9**(1): 34-39.

Malinverni, J. C., J. Werner, S. Kim, J. G. Sklar, D. Kahne, R. Misra und T. J. Silhavy (2006). "YfiO stabilizes the YaeT complex and is essential for outer membrane protein assembly in Escherichia coli." Mol Microbiol **61**(1): 151-164.

Markou, P. und Y. Apidianakis (2014). "Pathogenesis of intestinal Pseudomonas aeruginosa infection in patients with cancer." Front Cell Infect Microbiol **3**: 115.

- Matsuo, Y., S. Eda, N. Gotoh, E. Yoshihara und T. Nakae (2004). "MexZ-mediated regulation of mexXY multidrug efflux pump expression in *Pseudomonas aeruginosa* by binding on the mexZ-mexX intergenic DNA." FEMS Microbiol Lett **238**(1): 23-28.
- Messens, J. und J. F. Collet (2006). "Pathways of disulfide bond formation in *Escherichia coli*." Int J Biochem Cell Biol **38**(7): 1050-1062.
- Miajlovic, H. und S. G. Smith (2014). "Bacterial self-defence: how *Escherichia coli* evades serum killing." FEMS Microbiol Lett **354**(1): 1-9.
- Miao, E. A., E. Andersen-Nissen, S. E. Warren und A. Aderem (2007). "TLR5 and Ipaf: dual sensors of bacterial flagellin in the innate immune system." Semin Immunopathol **29**(3): 275-288.
- Nikaido, H. (1989). "Outer membrane barrier as a mechanism of antimicrobial resistance." Antimicrob Agents Chemother **33**(11): 1831-1836.
- Nikaido, H. (2003). "Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited." Microbiol Mol Biol Rev **67**(4): 593-656.
- Noinaj, N., A. J. Kuszak, C. Balusek, J. C. Gumbart und S. K. Buchanan (2014). "Lateral opening and exit pore formation are required for BamA function." Structure **22**(7): 1055-1062.
- Noinaj, N., A. J. Kuszak, J. C. Gumbart, P. Lukacik, H. Chang, N. C. Easley, T. Lithgow und S. K. Buchanan (2013). "Structural insight into the biogenesis of beta-barrel membrane proteins." Nature **501**(7467): 385-390.
- Noinaj, N., S. E. Rollauer und S. K. Buchanan (2015). "The beta-barrel membrane protein insertase machinery from Gram-negative bacteria." Curr Opin Struct Biol **31**: 35-42.
- Obi, I. R. und M. S. Francis (2013). "Demarcating SurA activities required for outer membrane targeting of *Yersinia pseudotuberculosis* adhesins." Infect Immun **81**(7): 2296-2308.
- Onufryk, C., M. L. Crouch, F. C. Fang und C. A. Gross (2005). "Characterization of six lipoproteins in the sigmaE regulon." J Bacteriol **187**(13): 4552-4561.
- Opperman, T. J. und S. T. Nguyen (2015). "Recent advances toward a molecular mechanism of efflux pump inhibition." Front Microbiol **6**: 421.
- Page, M. G. (2013). "Siderophore conjugates." Ann N Y Acad Sci **1277**: 115-126.
- Park, H., J. W. Shin, S. G. Park und W. Kim (2014). "Microbial communities in the upper respiratory tract of patients with asthma and chronic obstructive pulmonary disease." PLoS One **9**(10): e109710.
- Paschen, S. A., W. Neupert und D. Rapaport (2005). "Biogenesis of beta-barrel membrane proteins of mitochondria." Trends Biochem Sci **30**(10): 575-582.
- Purdy, G. E., C. R. Fisher und S. M. Payne (2007). "IcsA surface presentation in *Shigella flexneri* requires the periplasmic chaperones DegP, Skp, and SurA." J Bacteriol **189**(15): 5566-5573.

- Rahme, L. G., M. W. Tan, L. Le, S. M. Wong, R. G. Tompkins, S. B. Calderwood und F. M. Ausubel (1997). "Use of model plant hosts to identify *Pseudomonas aeruginosa* virulence factors." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(24): 13245-13250.
- Renau, T. E., R. Leger, L. Filonova, E. M. Flamme, M. Wang, R. Yen, D. Madsen, D. Griffith, S. Chamberland, M. N. Dudley, V. J. Lee, O. Lomovskaya, W. J. Watkins, T. Ohta, K. Nakayama und Y. Ishida (2003). "Conformationally-restricted analogues of efflux pump inhibitors that potentiate the activity of levofloxacin in *Pseudomonas aeruginosa*." Bioorg Med Chem Lett **13**(16): 2755-2758.
- Rhodijs, V. A., W. C. Suh, G. Nonaka, J. West und C. A. Gross (2006). "Conserved and variable functions of the sigmaE stress response in related genomes." PLoS Biol **4**(1): e2.
- Ricci, D. P. und T. J. Silhavy (2012). "The Bam machine: a molecular cooper." Biochim Biophys Acta **1818**(4): 1067-1084.
- Rizzitello, A. E., J. R. Harper und T. J. Silhavy (2001). "Genetic evidence for parallel pathways of chaperone activity in the periplasm of *Escherichia coli*." J Bacteriol **183**(23): 6794-6800.
- Rollauer, S. E., M. A. Soorshjani, N. Noinaj und S. K. Buchanan (2015). "Outer membrane protein biogenesis in Gram-negative bacteria." Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci **370**(1679).
- Rubin, E. J., B. J. Akerley, V. N. Novik, D. J. Lampe, R. N. Husson und J. J. Mekalanos (1999). "In vivo transposition of mariner-based elements in enteric bacteria and mycobacteria." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **96**(4): 1645-1650.
- Ruiz, N., B. Falcone, D. Kahne und T. J. Silhavy (2005). "Chemical conditionality: a genetic strategy to probe organelle assembly." Cell **121**(2): 307-317.
- Sader, H. S., G. E. Dale, P. R. Rhomberg und R. K. Flamm (2018). "Antimicrobial Activity of Murepavadin Tested against Clinical Isolates of *Pseudomonas aeruginosa* from the United States, Europe, and China." Antimicrob Agents Chemother **62**(7).
- Sadikot, R. T., T. S. Blackwell, J. W. Christman und A. S. Prince (2005). "Pathogen-host interactions in *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia." Am J Respir Crit Care Med **171**(11): 1209-1223.
- Sanders, C. C. und W. E. Sanders, Jr. (1986). "Type I beta-lactamases of gram-negative bacteria: interactions with beta-lactam antibiotics." J Infect Dis **154**(5): 792-800.
- Schafer, U., K. Beck und M. Muller (1999). "Skp, a molecular chaperone of gram-negative bacteria, is required for the formation of soluble periplasmic intermediates of outer membrane proteins." J Biol Chem **274**(35): 24567-24574.
- Schäfer, U., K. Beck und M. Muller (1999). "Skp, a molecular chaperone of gram-negative bacteria, is required for the formation of soluble periplasmic intermediates of outer membrane proteins." J Biol Chem **274**(35): 24567-24574.

- Schlapschy, M., M. K. Dommel, K. Hadian, M. Fogarasi, I. P. Korndorfer und A. Skerra (2004). "The periplasmic E. coli chaperone Skp is a trimer in solution: biophysical and preliminary crystallographic characterization." Biol Chem **385**(2): 137-143.
- Schultz, M. J., P. Speelman, S. A. Zaat, C. E. Hack, S. J. van Deventer und T. van der Poll (2000). "The effect of pseudomonas exotoxin A on cytokine production in whole blood exposed to Pseudomonas aeruginosa." FEMS Immunol Med Microbiol **29**(3): 227-232.
- Schweizer, H. P. (2003). "Efflux as a mechanism of resistance to antimicrobials in Pseudomonas aeruginosa and related bacteria: unanswered questions." Genet Mol Res **2**(1): 48-62.
- Silver, L. L. (2011). "Challenges of antibacterial discovery." Clin Microbiol Rev **24**(1): 71-109.
- Sklar, J. G., T. Wu, L. S. Gronenberg, J. C. Malinverni, D. Kahne und T. J. Silhavy (2007a). "Lipoprotein SmpA is a component of the YaeT complex that assembles outer membrane proteins in Escherichia coli." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(15): 6400-6405.
- Sklar, J. G., T. Wu, D. Kahne und T. J. Silhavy (2007b). "Defining the roles of the periplasmic chaperones SurA, Skp, and DegP in Escherichia coli." Genes Dev **21**(19): 2473-2484.
- Smith, R. P., J. J. Paxman, M. J. Scanlon und B. Heras (2016). "Targeting Bacterial Dsb Proteins for the Development of Anti-Virulence Agents." Molecules **21**(7).
- Southern, S. J., A. E. Scott, D. C. Jenner, P. M. Ireland, I. H. Norville und M. Sarkar-Tyson (2016). "Survival protein A is essential for virulence in Yersinia pestis." Microb Pathog **92**: 50-53.
- Srinivas, N., P. Jetter, B. J. Ueberbacher, M. Werneburg, K. Zerbe, J. Steinmann, B. Van der Meijden, F. Bernardini, A. Lederer, R. L. Dias, P. E. Misson, H. Henze, J. Zumbunn, F. O. Gombert, D. Obrecht, P. Hunziker, S. Schauer, U. Ziegler, A. Kach, L. Eberl, K. Riedel, S. J. DeMarco und J. A. Robinson (2010). "Peptidomimetic antibiotics target outer-membrane biogenesis in Pseudomonas aeruginosa." Science **327**(5968): 1010-1013.
- Sriramulu, D. D., H. Lunsdorf, J. S. Lam und U. Romling (2005). "Microcolony formation: a novel biofilm model of Pseudomonas aeruginosa for the cystic fibrosis lung." J Med Microbiol **54**(Pt 7): 667-676.
- Stallmach, A. und M. Vehreschild (2016). Mikrobiom. Berlin ; Boston, Walter de Gruyter, GmbH.
- Stokell, J. R., R. Z. Gharaibeh, T. J. Hamp, M. J. Zapata, A. A. Fodor und T. R. Steck (2015). "Analysis of changes in diversity and abundance of the microbial community in a cystic fibrosis patient over a multiyear period." J Clin Microbiol **53**(1): 237-247.
- Stoodley, B. J. und B. T. Thom (1970). "Observations on the intestinal carriage of Pseudomonas aeruginosa." J Med Microbiol **3**(3): 367-375.
- Stover, C. K., X. Q. Pham, A. L. Erwin, S. D. Mizoguchi, P. Warrenner, M. J. Hickey, F. S. Brinkman, W. O. Hufnagle, D. J. Kowalik, M. Lagrou, R. L. Garber, L. Goltry, E. Tolentino, S. Westbrook-Wadman, Y. Yuan, L. L. Brody, S. N. Coulter, K. R. Folger, A.

- Kas, K. Larbig, R. Lim, K. Smith, D. Spencer, G. K. Wong, Z. Wu, I. T. Paulsen, J. Reizer, M. H. Saier, R. E. Hancock, S. Lory und M. V. Olson (2000). "Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen." Nature **406**(6799): 959-964.
- Strateva, T. und D. Yordanov (2009). "Pseudomonas aeruginosa - a phenomenon of bacterial resistance." J Med Microbiol **58**(Pt 9): 1133-1148.
- Sydenham, M., G. Douce, F. Bowe, S. Ahmed, S. Chatfield und G. Dougan (2000). "Salmonella enterica serovar typhimurium surA mutants are attenuated and effective live oral vaccines." Infect Immun **68**(3): 1109-1115.
- Takahashi, Y. H., K. Inaba und K. Ito (2004). "Characterization of the menaquinone-dependent disulfide bond formation pathway of *Escherichia coli*." J Biol Chem **279**(45): 47057-47065.
- Tan, M. W., L. G. Rahme, J. A. Sternberg, R. G. Tompkins und F. M. Ausubel (1999). "Pseudomonas aeruginosa killing of *Caenorhabditis elegans* used to identify *P. aeruginosa* virulence factors." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(5): 2408-2413.
- Tapley, T. L., T. Eichner, S. Gleiter, D. P. Ballou und J. C. Bardwell (2007). "Kinetic characterization of the disulfide bond-forming enzyme DsbB." J Biol Chem **282**(14): 10263-10271.
- Thome, B. M. und M. Muller (1991). "Skp is a periplasmic *Escherichia coli* protein requiring SecA and SecY for export." Mol Microbiol **5**(11): 2815-2821.
- Urban, A., M. Leipelt, T. Eggert und K. E. Jaeger (2001). "DsbA and DsbC affect extracellular enzyme formation in *Pseudomonas aeruginosa*." J Bacteriol **183**(2): 587-596.
- Urfer, M., J. Bogdanovic, F. Lo Monte, K. Moehle, K. Zerbe, U. Omasits, C. H. Ahrens, G. Pessi, L. Eberl und J. A. Robinson (2016). "A Peptidomimetic Antibiotic Targets Outer Membrane Proteins and Disrupts Selectively the Outer Membrane in *Escherichia coli*." J Biol Chem **291**(4): 1921-1932.
- van der Bij, A. K., K. van Dijk, J. Muilwijk, S. F. Thijsen, D. W. Notermans, S. de Greeff, N. van de Sande-Bruinsma und I.-A. s. group (2012). "Clinical breakpoint changes and their impact on surveillance of antimicrobial resistance in *Escherichia coli* causing bacteraemia." Clin Microbiol Infect **18**(11): E466-472.
- van der Waaij, D., J. M. Berghuis-de Vries und L.-v. Lekkerkerk (1971). "Colonization resistance of the digestive tract in conventional and antibiotic-treated mice." J Hyg (Lond) **69**(3): 405-411.
- Vertommen, D., M. Depuydt, J. Pan, P. Leverrier, L. Knoops, J. P. Szikora, J. Messens, J. C. Bardwell und J. F. Collet (2008). "The disulphide isomerase DsbC cooperates with the oxidase DsbA in a DsbD-independent manner." Mol Microbiol **67**(2): 336-349.
- Vertommen, D., N. Ruiz, P. Leverrier, T. J. Silhavy und J. F. Collet (2009). "Characterization of the role of the *Escherichia coli* periplasmic chaperone SurA using differential proteomics." Proteomics **9**(9): 2432-2443.
- Vitkauskiene, A., S. Scheuss, R. Sakalauskas, V. Dudzevicius und H. Sahly (2005). "Pseudomonas aeruginosa strains from nosocomial pneumonia are more serum

resistant than *P. aeruginosa* strains from noninfectious respiratory colonization processes." Infection **33**(5-6): 356-361.

von Klitzing, E., S. Bereswill und M. M. Heimesaat (2017a). "Multidrug-Resistant *Pseudomonas Aeruginosa* Induce Systemic Pro-Inflammatory Immune Responses in Colonized Mice." Eur J Microbiol Immunol (Bp) **7**(3): 200-209.

von Klitzing, E., I. Ekmekciu, S. Bereswill und M. M. Heimesaat (2017b). "Acute ileitis facilitates infection with multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa* in human microbiota-associated mice." Gut Pathog **9**: 4.

Wach, A., K. Dembowsky und G. E. Dale (2018). "Pharmacokinetics and Safety of Intravenous Murepavadin Infusion in Healthy Adult Subjects Administered Single and Multiple Ascending Doses." Antimicrob Agents Chemother **62**(4).

Waite, R. D., A. Paccanaro, A. Papakonstantinou, J. M. Hurst, M. Saqi, E. Littler und M. A. Curtis (2006). "Clustering of *Pseudomonas aeruginosa* transcriptomes from planktonic cultures, developing and mature biofilms reveals distinct expression profiles." BMC Genomics **7**: 162.

Walsh, C. T. und T. A. Wencewicz (2014). "Prospects for new antibiotics: a molecule-centered perspective." J Antibiot (Tokyo) **67**(1): 7-22.

Walton, T. A., C. M. Sandoval, C. A. Fowler, A. Pardi und M. C. Sousa (2009). "The cavity-chaperone Skp protects its substrate from aggregation but allows independent folding of substrate domains." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(6): 1772-1777.

Walton, T. A. und M. C. Sousa (2004). "Crystal structure of Skp, a prefoldin-like chaperone that protects soluble and membrane proteins from aggregation." Mol Cell **15**(3): 367-374.

Wang, M., G. Molin, S. Ahrne, D. Adawi und B. Jeppsson (2007). "High proportions of proinflammatory bacteria on the colonic mucosa in a young patient with ulcerative colitis as revealed by cloning and sequencing of 16S rRNA genes." Dig Dis Sci **52**(3): 620-627.

Webb, C. T., E. Heinz und T. Lithgow (2012). "Evolution of the beta-barrel assembly machinery." Trends Microbiol **20**(12): 612-620.

Weirich, J., C. Brautigam, M. Muhlenkamp, M. Franz-Wachtel, B. Macek, I. Meuskens, M. Skurnik, K. Leskinen, E. Bohn, I. Autenrieth und M. Schutz (2017). "Identifying components required for OMP biogenesis as novel targets for antiinfective drugs." Virulence: 1-20.

Werner, J. und R. Misra (2005). "YaeT (Omp85) affects the assembly of lipid-dependent and lipid-independent outer membrane proteins of *Escherichia coli*." Mol Microbiol **57**(5): 1450-1459.

Weski, J. und M. Ehrmann (2012). "Genetic analysis of 15 protein folding factors and proteases of the *Escherichia coli* cell envelope." J Bacteriol **194**(12): 3225-3233.

Whaley, K. und W. Schwaeble (1997). "Complement and complement deficiencies." Semin Liver Dis **17**(4): 297-310.

Williams, B. J., J. Dehnhostel und T. S. Blackwell (2010). "*Pseudomonas aeruginosa*: host defence in lung diseases." Respirology **15**(7): 1037-1056.

Wu, T., J. Malinverni, N. Ruiz, S. Kim, T. J. Silhavy und D. Kahne (2005). "Identification of a multicomponent complex required for outer membrane biogenesis in *Escherichia coli*." Cell **121**(2): 235-245.

Yeung, A. T., E. C. Torfs, F. Jamshidi, M. Bains, I. Wiegand, R. E. Hancock und J. Overhage (2009). "Swarming of *Pseudomonas aeruginosa* is controlled by a broad spectrum of transcriptional regulators, including MetR." J Bacteriol **191**(18): 5592-5602.

Yoshimura, F. und H. Nikaido (1985). "Diffusion of beta-lactam antibiotics through the porin channels of *Escherichia coli* K-12." Antimicrob Agents Chemother **27**(1): 84-92.

Zgurskaya, H. I., C. A. Lopez und S. Gnanakaran (2015). "Permeability Barrier of Gram-Negative Cell Envelopes and Approaches To Bypass It." ACS Infect Dis **1**(11): 512-522.

Zhou, P. und J. Zhao (2017). "Structure, inhibition, and regulation of essential lipid A enzymes." Biochim Biophys Acta **1862**(11): 1424-1438.

Zipfel, P. F., T. Hallstrom und K. Riesbeck (2013). "Human complement control and complement evasion by pathogenic microbes--tipping the balance." Mol Immunol **56**(3): 152-160.

7 Anhang

7.1 Plasmidkarten

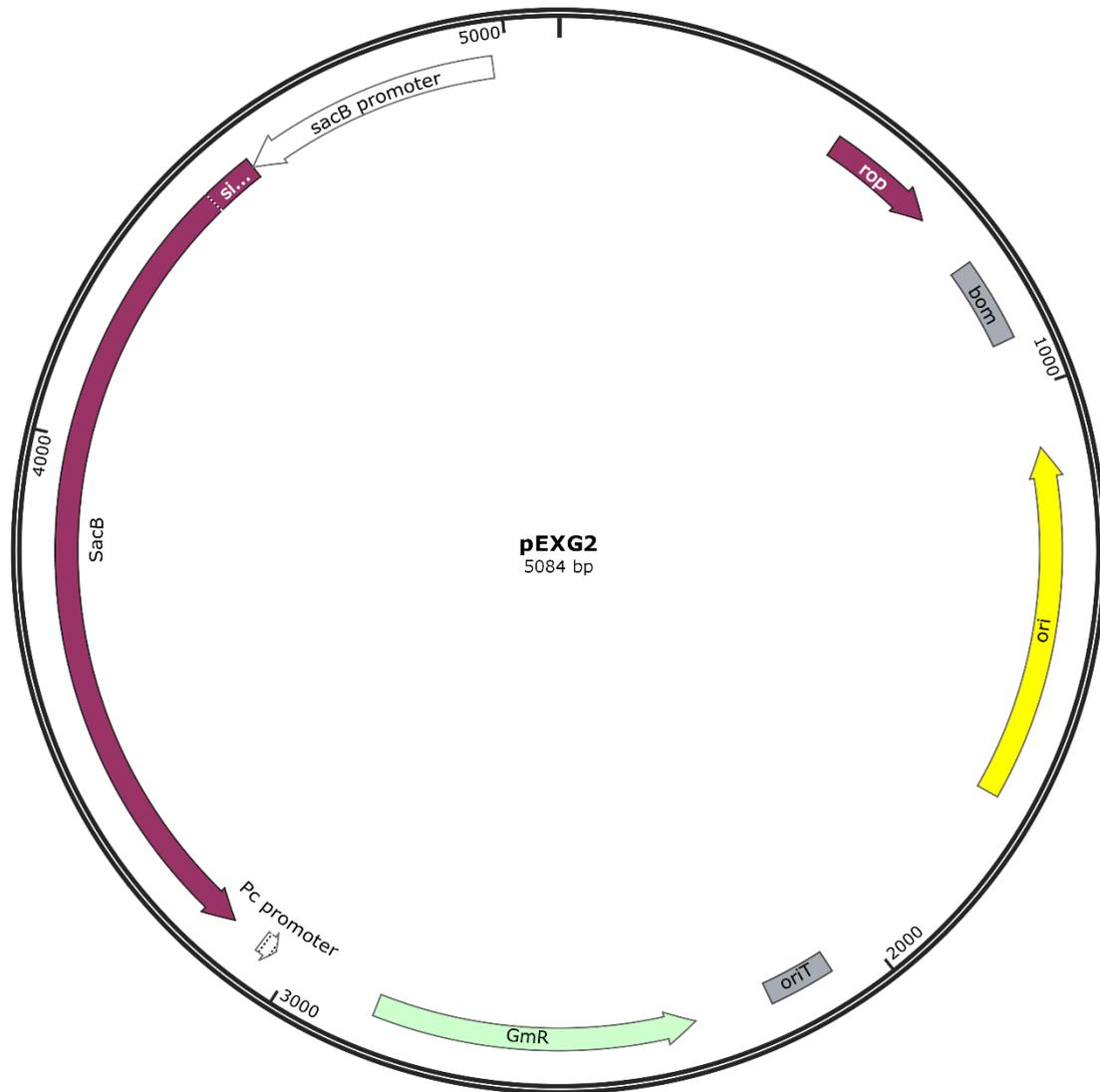


Abbildung 20: Plasmidkarte des pEXG2-Vektors

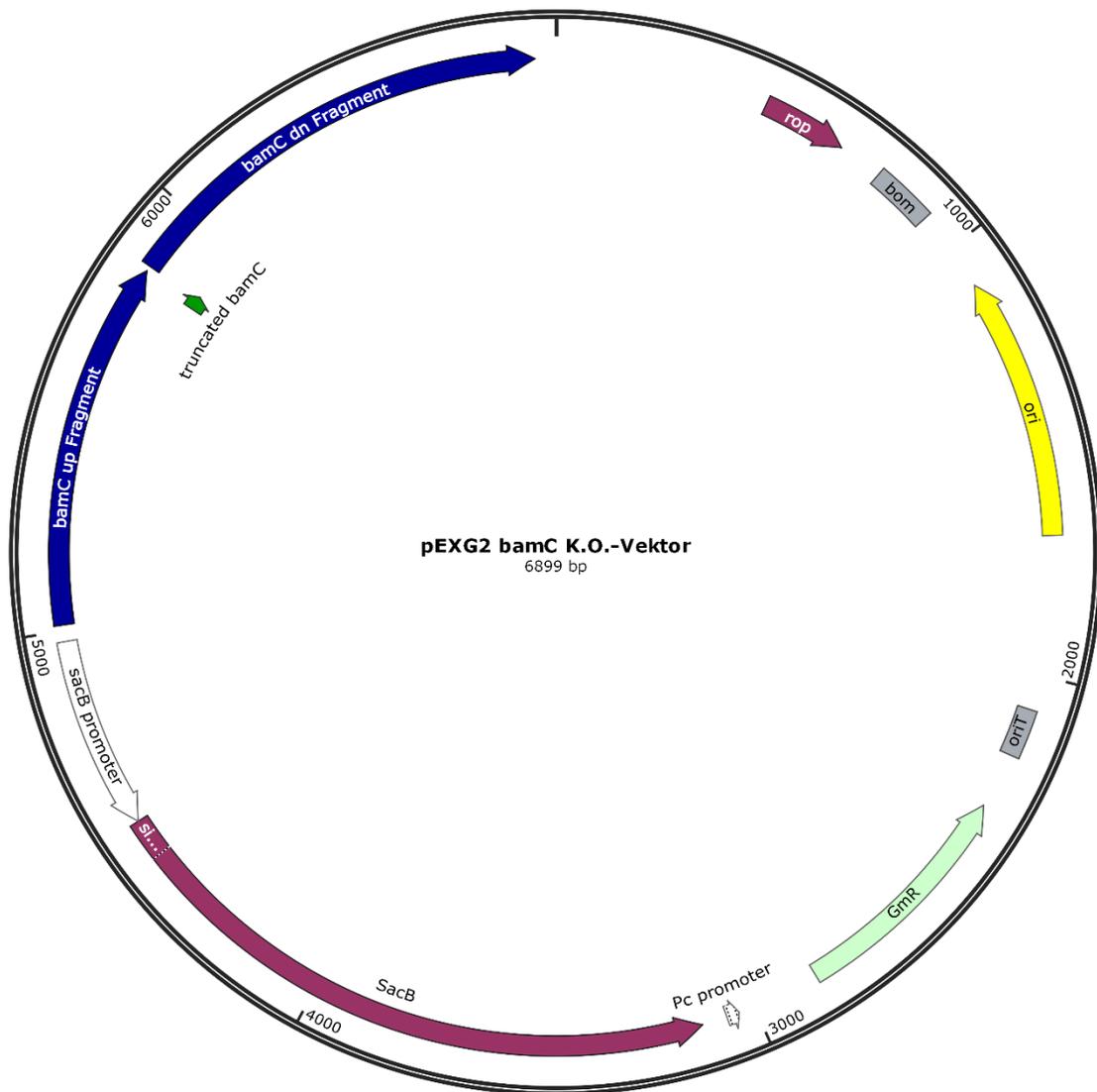


Abbildung 21: Plasmidkarte des pEXG2-Vektors mit *bamC*-K.O.-Kassette

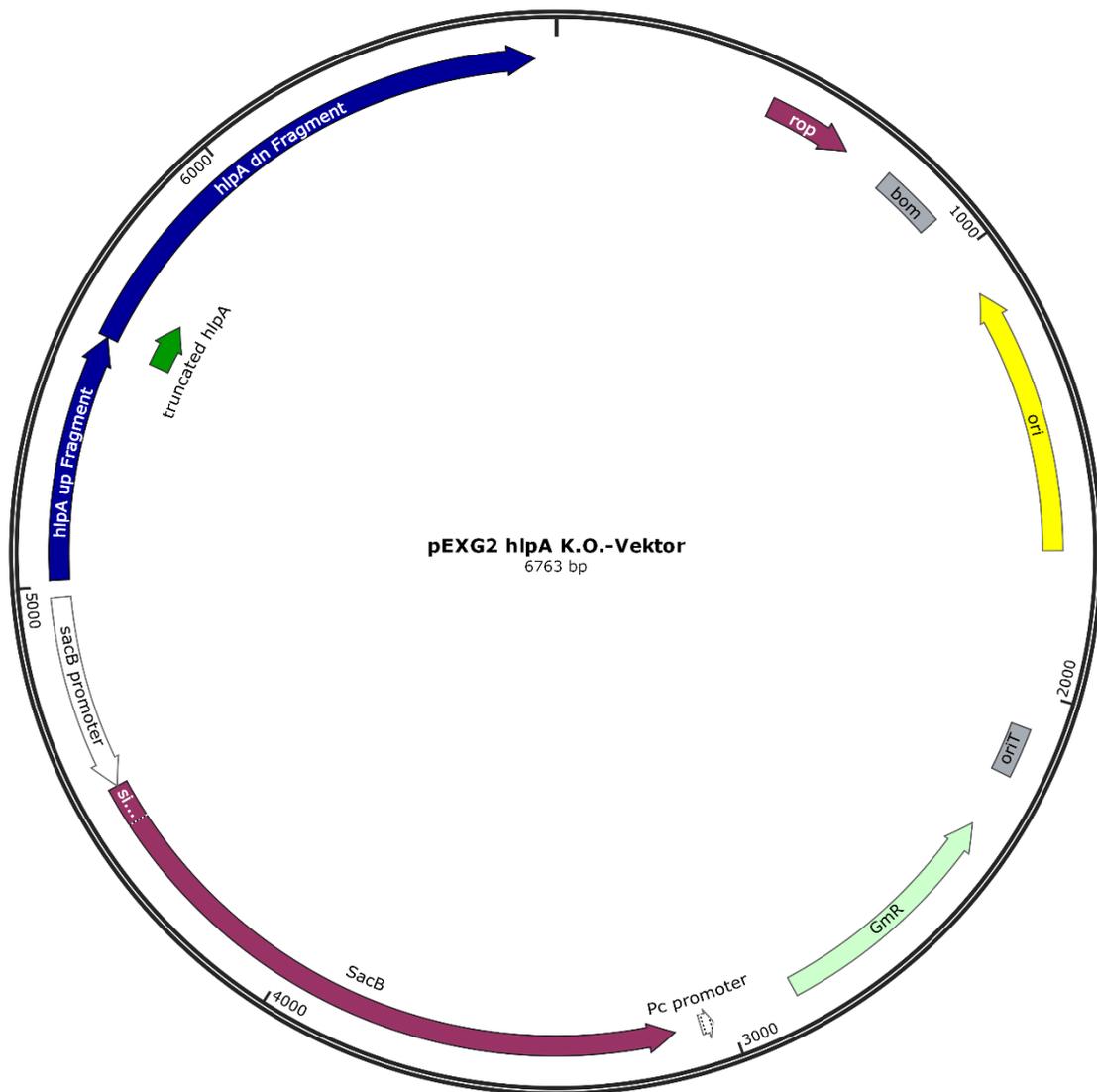


Abbildung 22: Plasmidkarte des pEXG2-Vektors mit *hlpA*-K.O.-Kassette

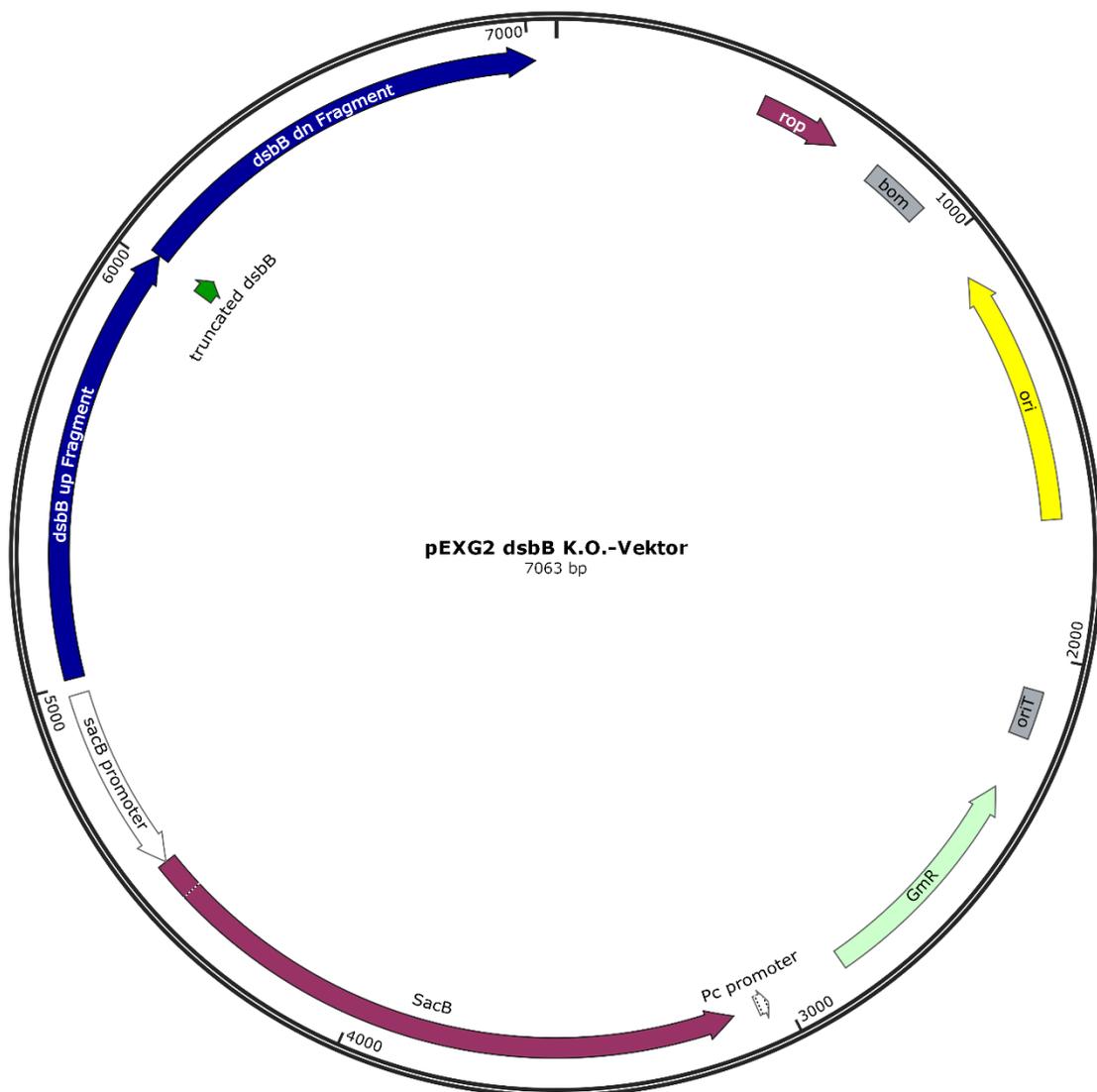


Abbildung 23: Plasmidkarte des pEXG2-Vektors mit *dsbB*-K.O.-Kassette

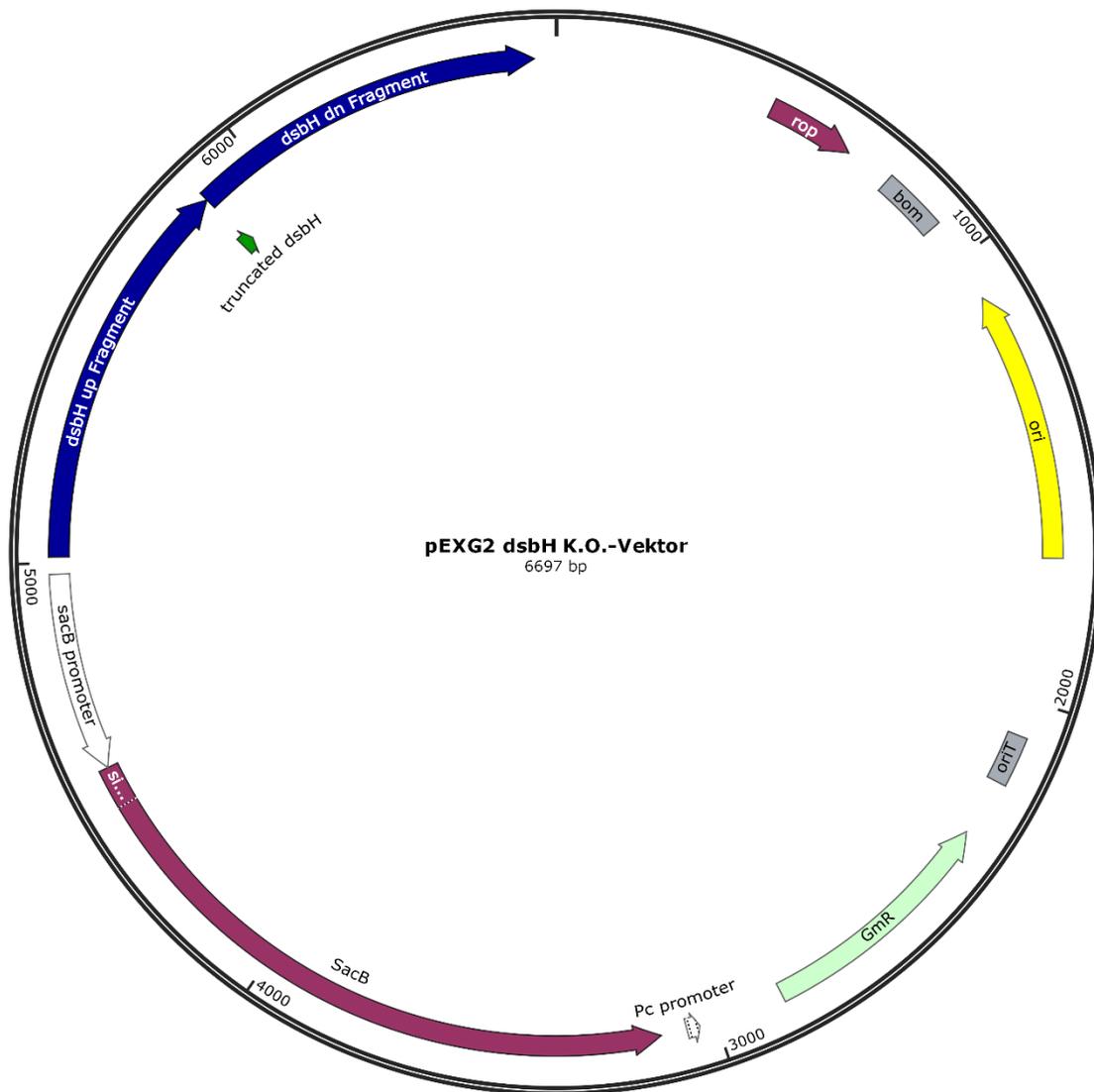


Abbildung 24: Plasmidkarte des pEXG2-Vektors mit *dsbH*-K.O.-Kassette

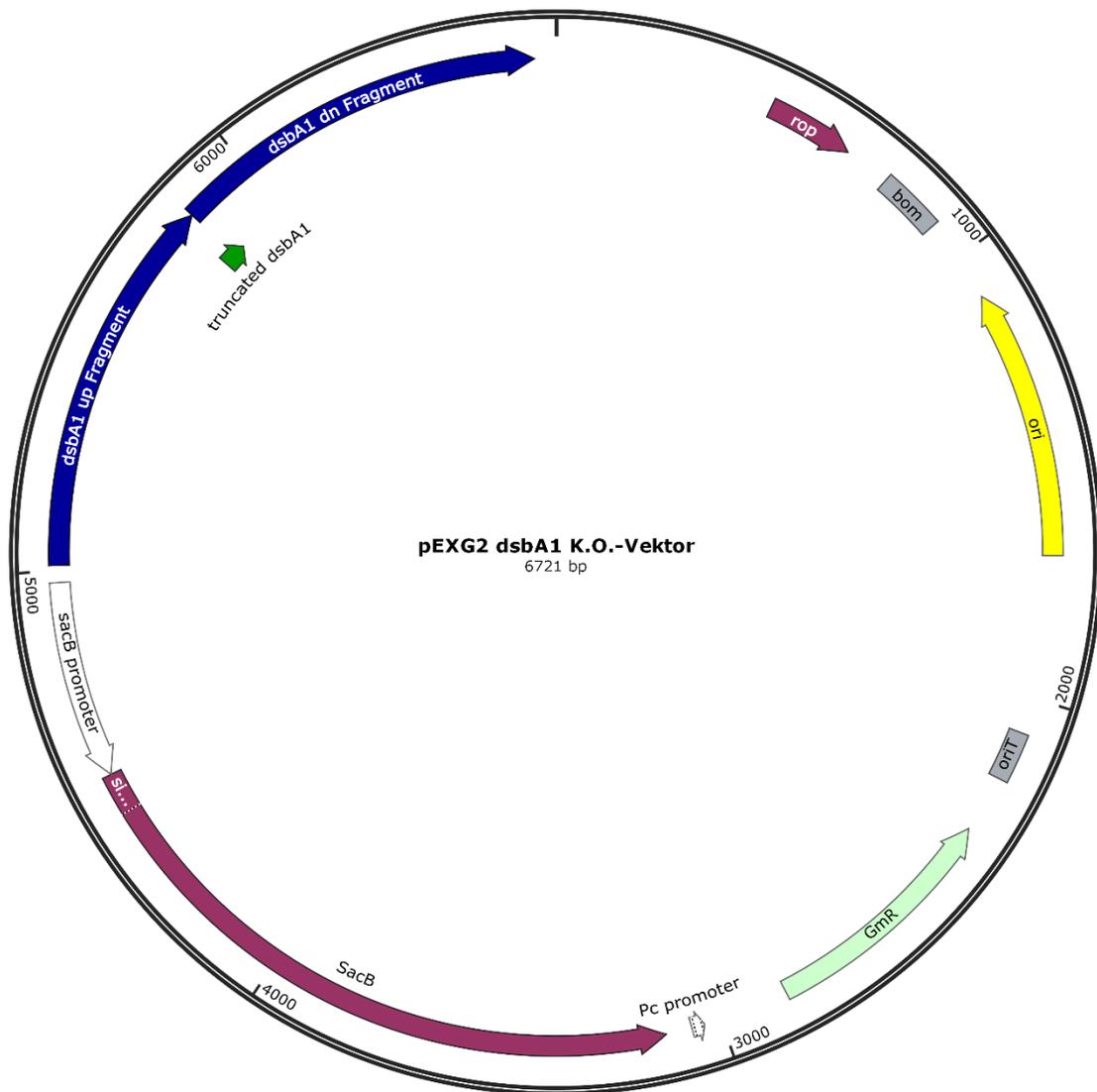


Abbildung 25: Plasmidkarte des pEXG2-Vektors mit *dsbA1*-K.O.-Kassette

7.2 Rohdaten der AB-Sensitivitätstestung

Tabelle 27: Rohdaten der AB-Sensitivitätstestung. Die Tabelle zeigt die Größe der Hemmhöfe in mm. Aus den Werten wurden pro Stamm und Antibiotikum der Mittelwert (Mittel) und die zugehörige Standardabweichung (SD) berechnet und hier ebenfalls in mm angegeben. Verwendete Antibiotika: Ampicillin 10 µg + Sulbactam 10 µg (SAM 20), Cefotaxim 5 µg (CTX 5), Erythromycin 15 µg (E 15), Vancomycin 30 µg (VA 30), Bacitracin 10 µg (B 10), Rifampicin 5 µg (RA 5).

	WT		$\Delta bamB$		$\Delta bamC$		Tn_bamC		$\Delta hlpA$		Tn_hlpA		$\Delta dsbB$		Tn_dsbB		$\Delta dsbH$		Tn_dsbH		$\Delta \Delta$		$\Delta dsbA1$	
SAM 20	8	7	12	12	10	9	7	8	8	7	10	12	6	6	7	8	7	7	7	6	7	6	7	7
SAM 20	6	6	11	11	13	12	8	8	6	6	16	16	10	10	8	8	9	10	6	6	10	11	7	6
SAM 20	8	7	14	14	10	8	8	8	10	8	16	16	7	7	7	7	7	6	6	6	7	9	8	10
SAM 20	8	8	14	14																				
SAM 20	6	6	11	12																				
SAM 20	9	9	14	14																				
Mittel	7,33		12,75		10,33		7,83		7,50		14,33		7,67		7,50		7,67		6,17		8,33		7,50	
SD	1,15		1,36		1,86		0,41		1,52		2,66		1,86		0,55		1,51		0,41		1,97		1,38	
CTX 5	7	8	15	13	12	12	10	10	9	8	11	12	10	9	8	9	10	8	10	8	9	10	9	10
CTX 5	8	9	16	14	16	15	11	9	10	10	14	12	11	12	8	9	11	12	8	9	13	12	10	10
CTX 5	10	7	15	15	10	11	10	11	10	10	13	14	9	8	10	9	8	8	9	7	9	9	10	11
CTX 5	9	10	15	14																				
CTX 5	8	8	15	15																				
CTX 5	12	12	17	18																				
Mittel	9,00		15,17		12,67		10,17		9,50		12,67		9,83		8,83		9,50		8,50		10,33		10,00	
SD	1,71		1,34		2,34		0,75		0,84		1,21		1,47		0,75		1,76		1,05		1,75		0,63	
E 15	7	8	10	12	8	8	7	8	8	7	8	8	8	7	7	7	7	7	8	7	8	7	7	7
E 15	7	7	11	12	7	7	9	8	8	9	10	8	7	7	7	8	7	7	7	8	7	7	8	7
E 15	7	7	12	12	9	9	9	8	8	8	8	7	7	7	8	7	8	7	7	8	7	9	6	8
E 15	8	7	10	10																				

	WT		$\Delta bamB$		$\Delta bamC$		Tn_bamC		$\Delta hlpA$		Tn_hlpA		$\Delta dsbB$		Tn_dsbB		$\Delta dsbH$		Tn_dsbH		$\Delta\Delta$		$\Delta dsbA1$	
E 15	6	7	12	13																				
E 15	7	7	10	10																				
Mittel	7,08		11,17		8,00		8,17		8,00		8,17		7,17		7,33		7,17		7,50		7,50		7,17	
SD	0,51		1,11		0,89		0,75		0,63		0,98		0,41		0,52		0,41		0,55		0,84		0,75	
VA 30	6	6	14	12	8	8	7	9	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	
VA 30	6	6	14	12	9	8	9	8	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	
VA 30	6	6	16	13	8	8	9	10	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	
VA 30	6	6	14	11																				
VA 30	6	6	13	13																				
VA 30	6	6	16	13																				
Mittel	6,00		13,42		8,17		8,67		6,00		6,00		6,00		6,00		6,00		6,00		6,00		6,00	
SD	0,00		1,51		0,41		1,03		0,00		0,00		0,00		0,00		0,00		0,00		0,00		0,00	
B 10	6	6	7	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	
B 10	6	6	6	7	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	
B 10	6	6	8	8	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	
B 10	6	6	6	6																				
B 10	6	6	7	7																				
B 10	6	6	6	6																				
Mittel	6,00		6,67		6,00		6,00		6,00		6,00		6,00		6,00		6,00		6,00		6,00		6,00	
SD	0,00		0,78		0,00		0,00		0,00		0,00		0,00		0,00		0,00		0,00		0,00		0,00	
RA 5	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	
RA 5	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	
RA 5	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	
RA 5	6	6	6	6																				
RA 5	6	6	6	6																				

	WT		$\Delta bamB$		$\Delta bamC$		Tn_bamC		$\Delta hlpA$		Tn_hlpA		$\Delta dsbB$		Tn_dsbB		$\Delta dsbH$		Tn_dsbH		$\Delta\Delta$		$\Delta dsbA1$		
RA 5	6	6	6	6																					
Mittel	6,00		6,00		6,00		6,00		6,00		6,00		6,00		6,00		6,00		6,00		6,00		6,00		
SD	0,00		0,00		0,00		0,00		0,00		0,00		0,00		0,00		0,00		0,00		0,00		0,00		

7.3 Wachstumskurven und Rohdaten der Experimente mit BS

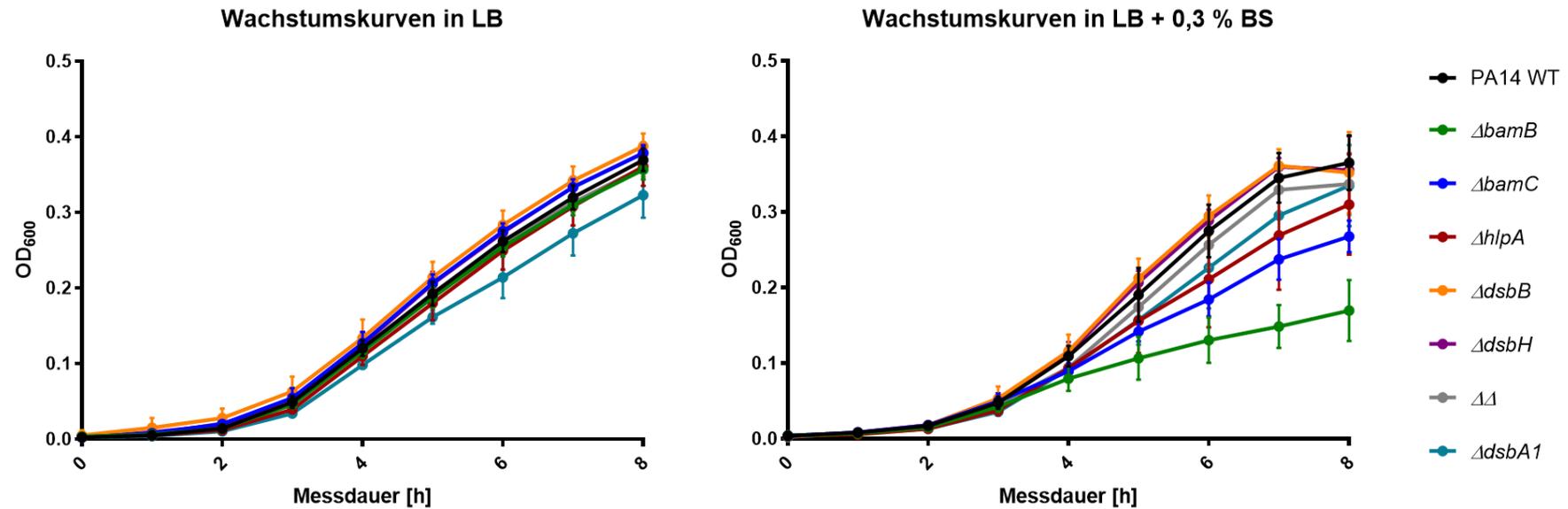


Abbildung 26: Wachstumskurve der K.O.-Stämme in LB und LB + 0,3 % Gallensalze. Die Stämme PA14 $\Delta bamC$ (blau), $-\Delta hlpA$ (rot), $-\Delta dsbB$ (orange), $-\Delta dsbH$ (violett), $-\Delta dsbA1$ (türkis) und die $\Delta dsbB\Delta dsbH$ -Doppel-K.O.-Mutante (grau) wuchsen 8 h in LB ohne (links) bzw. mit Zusatz von 0,3 % BS (rechts) in einer 24-Well-Platte. Stündlich wurde die OD bei einer Wellenlänge von 600 nm als Korrelat zum Wachstum der Bakterien bestimmt. Die Werte aus drei unabhängigen Experimenten, mit jeweils zwei technischen Replikaten pro Versuch, wurden gemittelt und in dieser Abbildung aufgetragen. Die Fehlerbalken kennzeichnen die Standardabweichung. Als Kontrolle diente der PA14 WT und die $\Delta bamB$ -Mutante. Alle Stämme zeigten ein einheitliches Wachstum im LB. Im Nährmedium mit 0,3 % BS wuchs die $\Delta bamC$ -Mutante sichtbar schlechter, jedoch zeigte sie eine geringere Wachstumshemmung als der Kontrollstamm PA14 $\Delta bamB$. Die Wachstumskurven der K.O.-Mutanten $\Delta hlpA$, $\Delta dsbB\Delta dsbH$ und $\Delta dsbA1$ wichen leicht von der Kurve des WT ab. Die Stämme PA14 $\Delta dsbB$ und PA14 $\Delta dsbH$ waren in ihrem Wachstumsverhalten mit dem WT vergleichbar.

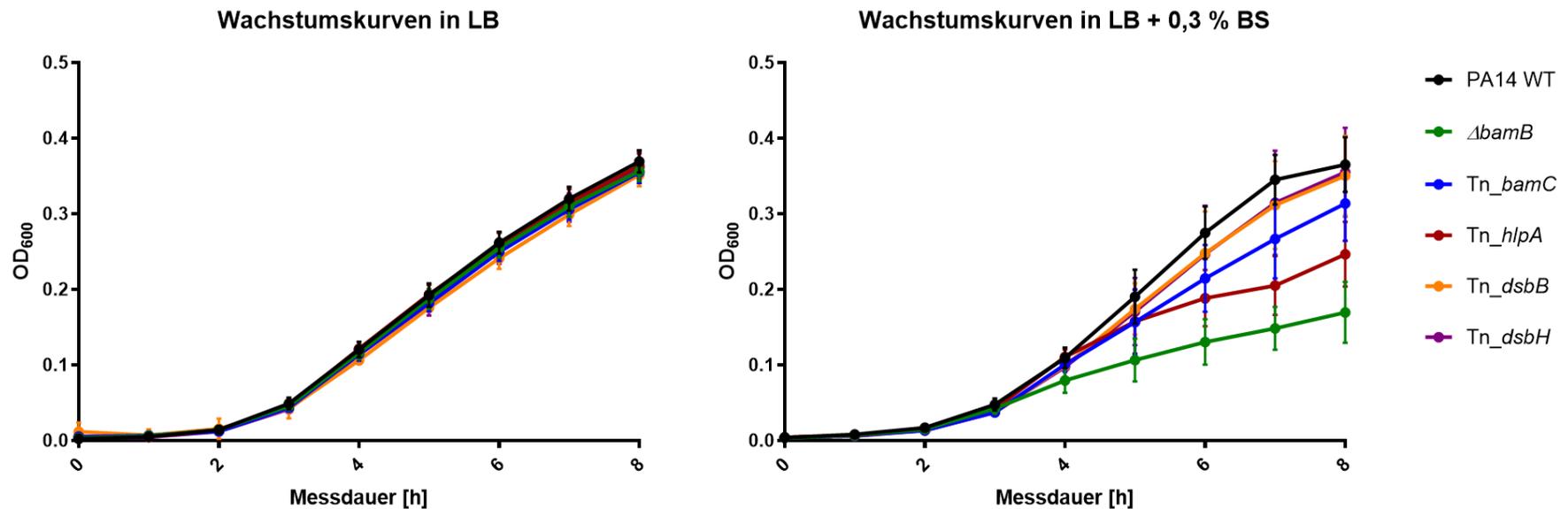


Abbildung 27: Wachstumskurve der Tn-Stämme in LB und LB + 0,3 % Gallensalze. Die Stämme PA14-Tn_{bamC} (blau), -Tn_{hlpA} (rot), -Tn_{dsbB} (orange) und -Tn_{dsbH} (violett) wuchsen 8 h in LB ohne (links) bzw. mit Zusatz von 0,3 % BS (rechts) in einer 24-Well-Platte. Stündlich wurde die OD bei einer Wellenlänge von 600 nm als Korrelat zum Wachstum der Bakterien bestimmt. Die Werte aus drei unabhängigen Experimenten, mit jeweils zwei technischen Replikaten pro Versuch, wurden gemittelt und in dieser Abbildung aufgetragen. Die Fehlerbalken kennzeichnen die Standardabweichung. Als Kontrolle diente der PA14 WT und die $\Delta bamB$ -Mutante. Alle Stämme zeigten ein einheitliches Wachstum im LB. Im Nährmedium mit 0,3 % BS wuchs die Tn_{hlpA}-Mutante sichtbar schlechter, jedoch zeigte sie eine geringere Wachstumshemmung als der Kontrollstamm PA14 $\Delta bamB$. Die Wachstumskurve der Tn-Mutanten für *bamC* wich ebenfalls leicht von der Kurve des WT ab. Die Stämme Tn_{dsbB} und Tn_{dsbH} waren in ihrem Wachstumsverhalten mit dem WT vergleichbar.

Tabelle 28: OD₆₀₀ nach 8 h Wachstum in LB bzw. LB + 0,3 % BS

	WT	ΔbamB	ΔbamC	Tn_bamC	ΔhlpA	Tn_hlpA	ΔdsbB	Tn_dsbB	ΔdsbH	Tn_dsbH	ΔΔ	ΔdsbA1
LB	0,368	0,363	0,380	0,350	0,332	0,354	0,407	0,345	0,386	0,338	0,372	0,275
	0,363	0,352	0,360	0,369	0,375	0,381	0,357	0,365	0,357	0,382	0,363	0,343
	0,384	0,363	0,376	0,342	0,347	0,354	0,387	0,344	0,372	0,353	0,346	0,330
	0,382	0,377	0,378	0,344	0,337	0,342	0,397	0,331	0,386	0,351	0,378	0,297
	0,374	0,357	0,391	0,377	0,389	0,390	0,391	0,373	0,398	0,385	0,350	0,349
	0,395	0,367	0,387	0,350	0,387	0,363	0,387	0,353	0,375	0,360	0,353	0,345
	0,367	0,361			0,351	0,350						
	0,363	0,349			0,363	0,361						
	0,377	0,357										
	0,374	0,373										
	0,369	0,361										
	0,388	0,366										
	0,347	0,337										
	0,375	0,366										
	0,357	0,346										
	0,353	0,339										
	0,386	0,374										
	0,364	0,350										
	0,336	0,326										
	0,383	0,363										
	0,364	0,354										

	WT	ΔbamB	ΔbamC	Tn_bamC	ΔhlpA	Tn_hlpA	ΔdsbB	Tn_dsbB	ΔdsbH	Tn_dsbH	$\Delta\Delta$	ΔdsbA1
	0,347	0,333										
	0,387	0,371										
	0,369	0,356										
	0,354	0,348										
	0,362	0,353										
BS	0,272	0,159	0,276	0,270	0,211	0,214	0,275	0,307	0,293	0,292	0,280	0,284
	0,402	0,141	0,291	0,361	0,350	0,229	0,373	0,380	0,383	0,416	0,351	0,382
	0,388	0,136	0,277	0,331	0,347	0,287	0,404	0,383	0,382	0,380	0,360	0,359
	0,289	0,172	0,229	0,237	0,240	0,196	0,294	0,264	0,307	0,273	0,300	0,252
	0,405	0,156	0,264	0,352	0,358	0,248	0,386	0,396	0,402	0,397	0,341	0,378
	0,373	0,155	0,270	0,334	0,356	0,306	0,381	0,375	0,368	0,374	0,392	0,355
	0,307	0,120			0,354	0,310						
	0,356	0,116			0,370	0,296						
	0,356	0,144										
	0,329	0,132										
	0,372	0,118										
	0,378	0,124										
	0,357	0,219										
	0,403	0,212										
	0,384	0,238										
	0,341	0,182										
	0,401	0,237										

	WT	ΔbamB	ΔbamC	Tn_bamC	ΔhlpA	Tn_hlpA	ΔdsbB	Tn_dsbB	ΔdsbH	Tn_dsbH	$\Delta\Delta$	ΔdsbA1
	0,389	0,252										
	0,362	0,194										
	0,402	0,167										
	0,383	0,179										
	0,347	0,150										
	0,383	0,167										
	0,388	0,207										
	0,364	0,250										
	0,373	0,249										

Tabelle 29: Mittlere OD₆₀₀ und Wachstumshemmung nach 8 h. Aus den Werten der OD₆₀₀ nach 8 h wurden die Mittelwerte und ihre Standardabweichung bestimmt und in dieser Tabelle aufgeführt. Dabei wurde mit den Werten der Bakterienansätze in LB bzw. LB mit 0,3 % BS separat verfahren. Außerdem wurde die prozentuale Wachstumshemmung in Bezug auf den WT berechnet, die verwendete Formel ist auf Seite 70 zu finden.

	WT	<i>ΔbamB</i>	<i>ΔbamC</i>	Tn_bamC	<i>ΔhlpA</i>	Tn_hlpA	<i>ΔdsbB</i>	Tn_dsbB	<i>ΔdsbH</i>	Tn_dsbH	ΔΔ	<i>ΔdsbA1</i>
LB												
OD ₆₀₀	0,37	0,36	0,38	0,36	0,36	0,36	0,39	0,35	0,38	0,36	0,36	0,32
SD	0,01	0,01	0,01	0,01	0,02	0,02	0,02	0,02	0,01	0,02	0,01	0,03
Wachstumshemmung	0,00 %	3,39 %	-2,66 %	3,69 %	2,35 %	1,89 %	-5,15 %	4,61 %	-2,77 %	2,00 %	2,37 %	12,37 %
LB + 0,3 % BS												
OD ₆₀₀	0,37	0,18	0,27	0,31	0,32	0,26	0,35	0,35	0,36	0,36	0,34	0,34
SD	0,03	0,04	0,02	0,05	0,06	0,04	0,05	0,05	0,04	0,06	0,04	0,05
Wachstumshemmung	0,00 %	51,87 %	26,70 %	14,11 %	11,63 %	28,65 %	3,65 %	4,06 %	2,68 %	2,82 %	7,70 %	8,36 %

7.4 Rohdaten des Serum Killing Assays

Tabelle 30: Bakterienzahl und prozentuales Überleben – Versuch 1

Stamm	Bakterienzahl HIS	Bakterienzahl NHS	Überleben in NHS
WT	$5,51 \cdot 10^5$	$4,96 \cdot 10^5$	89,87 %
Tn_surA	$4,75 \cdot 10^5$	$5,49 \cdot 10^4$	11,56 %
$\Delta bamC$	$5,19 \cdot 10^5$	$3,39 \cdot 10^5$	65,19 %

Tabelle 31: Bakterienzahl und prozentuales Überleben – Versuch 2

Stamm	Bakterienzahl HIS	Bakterienzahl NHS	Überleben in NHS
WT	$6,32 \cdot 10^5$	$3,36 \cdot 10^5$	53,12 %
Tn_surA	$2,85 \cdot 10^5$	$5,97 \cdot 10^4$	20,91 %
$\Delta bamC$	$4,06 \cdot 10^5$	$1,59 \cdot 10^5$	39,18 %

Serum Killing Assay Versuch 2

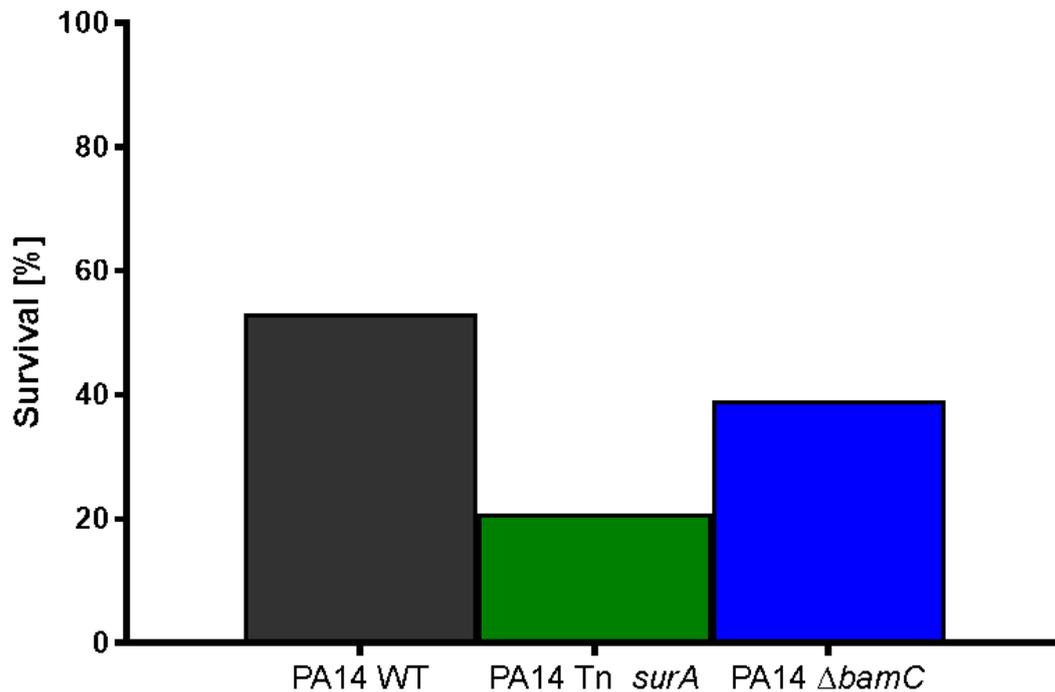


Abbildung 28: Überleben in Humanserum – Versuch 2. Das Balkendiagramm zeigt das prozentuale Überleben des PA14 WT, sowie der Mutanten Tn_surA und $\Delta bamC$ in menschlichem Serum. Als Vergleich diente die Bakterienzahl der Stämme des Versuchsansatzes mit hitzeinaktiviertem Serum. Etwas mehr als die Hälfte der WT-Bakterien überlebte die Behandlung mit NHS. Die Tn_surA-Mutante, die als Positivkontrolle eingesetzt wurde, zeigte noch nur etwa 20 % ihres Wachstums. Von den $\Delta bamC$ -Mutanten überstanden

39 % die Inkubation im menschlichen Serum. Gezeigt sind die Ergebnisse eines Einzelexperiments mit jeweils drei technischen Replikaten pro Stamm.

8 Erklärungen zum Eigenanteil

Die Arbeit wurde am Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene des Universitätsklinikums Tübingen unter Betreuung von Herrn PD Dr. Erwin Bohn und Frau Dr. Monika Schütz durchgeführt.

Die Konzeption des Projekts erfolgte durch Dr. Monika Schütz.

Die untersuchten PA14-Transposon-Mutanten wurden im Rahmen einer Kooperation mit der AG Mayer des Interfakultären Instituts für Mikrobiologie und Infektionsmedizin Tübingen (IMIT) zur Verfügung gestellt.

Sämtliche Versuche wurden nach Einarbeitung durch Kristina Klein, Jonas Malte Schweers, Michael Sonnabend, Tanja Späth und Johanna Weirich von mir eigenständig durchgeführt.

Die stündlichen OD-Messungen des Bile Salt Assays erfolgten zusammen mit Paul Schmitt. Beim Ausplattieren der Bakterienkulturen in verschiedenen Verdünnungsstufen im Rahmen des Serum Killing Assays wurde ich durch Janina Geißert und Michael Sonnabend unterstützt.

Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte eigenständig nach Anleitung durch Dr. Monika Schütz.

Ich versichere, das Manuskript selbständig verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Tübingen, den 03.12.2018

9 Danksagung

Ich möchte allen, die zum Gelingen meine Doktorarbeit beigetragen haben, von Herzen danken.

Mein größter Dank gilt Frau Dr. Monika Schütz, die mir ermöglichte an diesem spannenden Thema zu arbeiten und mir jederzeit bei Fragen zur Verfügung stand. In jeder Phase dieser Arbeit profitierte ich sehr von den vielen Ratschlägen, gemeinsamen Überlegungen und der konstruktiven Kritik. Die warmherzige, stets ermutigende und kompetente Betreuung hat mich, über die Doktorarbeit hinaus, sowohl wissenschaftlich als auch persönlich beeinflusst und vorangebracht.

Ich danke auch meinem Doktorvater Herrn PD Dr. Erwin Bohn herzlichst für die Betreuung meiner Doktorarbeit, die vielen ausführlichen Erklärungen und das Teilen seines Erfahrungsschatzes, aus dem zahlreiche Überlegungen und Vorschläge meine Arbeit bereichert haben.

Ebenfalls großer Dank gilt Kristina Klein und Michael Sonnabend, die mich geduldig in die Laborarbeit eingeführt haben, jede noch so kleine Frage beantworteten und auf deren Unterstützung ich immer zählen konnte. Die vielen interessante Gespräche, das Teilhaben an allen Forschungsergebnissen und die freundschaftliche Zusammenarbeit haben mir viel Spaß gemacht und mich auf meinem Weg einen großen Schritt weitergebracht.

Außerdem möchte ich mich bei Paul Schmitt bedanken, der mich sowohl im Labor als auch im Büro durch seine hilfsbereite und humorvolle Art unterstützt hat.

Ich danke allen Mitgliedern der AG Schütz/Bohn für die herzliche Aufnahme in die Arbeitsgruppe, in der ich mich sehr wohl gefühlt habe. Vielen Dank auch für

die Hilfe bei meinen Experimenten, an dieser Stelle besonders an Jonas Malte Schweers für die Einweisung am Tecan Reader.

Weiterer Dank gilt meinen Freunden, insbesondere der Gäng, auf die ich in allen Lebenslagen zählen kann.

Ich möchte mich zudem ganz herzlich bei David Hundertmark bedanken: Für sein großes Interesse am Thema meiner Arbeit, die vielen Ideen und Ratschläge, die emotionale Unterstützung und natürlich für die kulinarische Versorgung.

Zuletzt will ich meinen Eltern danken, die mir so viel ermöglicht haben und mich auf meinem Weg stets unterstützen.