

Aus dem
Department für Diagnostische Labormedizin
der Universität Tübingen
Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene

**Optimierung und Validierung der Large Scale-Expression
und nativen Aufreinigung eines Virulenz-assoziierten
bakteriellen Chaperons**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen**

**vorgelegt von
Zens, Johannes**

2024

Dekan: Professor Dr. B. Pichler

1. Berichterstatter: Privatdozentin Dr. M. Schütz

2. Berichterstatter: Privatdozentin Dr. T. Ganzenmüller

Tag der Disputation: 06.05.2024

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	V
Tabellenverzeichnis	VII
Abkürzungsverzeichnis	VIII
1 Einleitung	1
1.1 Allgemein.....	1
1.1.1 ‚Emerging pathogens‘	1
1.2 Erreger	1
1.2.1 <i>Acinetobacter baumannii</i>	1
1.2.2 <i>Klebsiella pneumoniae</i>	3
1.2.3 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	3
1.2.4 Resistenzmechanismen	4
1.2.5 Virulenz und Virulenzfaktoren/Pathogenitätsfaktoren.....	8
1.3 Biogenese von äußeren Membranproteinen	11
1.3.1 Das periplasmatische Chaperon SurA	13
1.4 Zielsetzung	18
2 Methoden und Materialien	19
2.1 Mikrobiologische Methoden und Materialien	19
2.1.1 Bakterienstämme	19
2.1.2 Bakterienkultivierung	20
2.2 Molekularbiologische Methoden und Materialien.....	23
2.2.1 Plasmide	23
2.2.2 gDNA-Präparation	29
2.2.3 PCR.....	30
2.2.4 Klonierung	36
2.2.5 Sequenzierungen	38
2.3 Proteinbiochemische-Methoden und Materialien.....	39
2.3.1 Überexpression von Proteinen	39
2.3.2 Proteinreinigung	42
2.3.3 BCA-Protein-Bestimmung	46
2.3.4 Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	46
2.3.5 Western-Blot	50
2.3.6 Luciferase-Assay.....	53

3	Ergebnisse	58
3.1	Klonierung von Vektoren zur Überexpression von SurA aus <i>A. baumannii</i> , <i>P. aeruginosa</i> und <i>K. pneumoniae</i>	58
3.1.1	Amplifikation der kodierenden Sequenzen von <i>A.b.</i> , <i>P.a.</i> und <i>K.p.</i> SurA aus genomischer DNA	58
3.1.2	Identifizierung und Verifizierung erfolgreich assemblierter Plasmide über Kolonie-PCR.....	59
3.2	Optimierung der Expressionsbedingungen.....	61
3.2.1	Testexpression mit den generierten Plasmiden	61
3.2.2	Testexpression mit Plasmiden mit kodon-optimierten SurA coding sequences	64
3.3	Batch-Aufreinigungen unter optimierten Expressionsbedingungen	67
3.3.1	Batch-Aufreinigung von <i>P.a.</i> SurA.....	67
3.3.2	Batch-Aufreinigung von <i>A.b.</i> SurA.....	70
3.4	Aktivitätsassays mit <i>E.c.</i> und <i>A.b.</i> SurA.....	73
3.4.1	Luciferase Aktivitäts-Assays mit SurA _{EC}	73
3.4.2	Luciferase Aktivitäts-Assays mit SurA _{AB}	76
3.5	Testung eines SurA-Inhibitors mit <i>A.b.</i> SurA	79
4	Diskussion.....	82
4.1	Die Rolle von SurA für die Außenmembranbiogenese in <i>A.b.</i> und anderen Gram-negativen Spezies	82
4.2	Struktur von SurA und Konformationsänderungen	84
5	Zusammenfassung	89
6	Literaturverzeichnis.....	91
7	Erklärung und Eigenanteil	103
	Danksagung.....	104
8	Anhang	105
8.1	FASTA und Chromatogramme	105
8.1.1	Ad 3.1.2.1 <i>A.b.</i>	105
8.1.2	Ad 3.1.2.2 <i>P.a.</i>	113
8.1.3	Ad 3.1.2.3 <i>K.p.</i>	120

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Transportweg von OMPs.....	12
Abb. 2: Primärstruktur von <i>E.c.</i> SurA und schematische Darstellung der Organisation der SurA-Domänen	14
Abb. 3: Proteinsequenz-Alignment von <i>E.c.</i> , <i>K.p.</i> , <i>P.a.</i> und <i>A.b.</i> SurA	15
Abb. 4: Plasmidkarte surA_Ab5075_pET-28a(+).....	24
Abb. 5: Plasmidkarte surA_Kp_pET-28a(+).....	24
Abb. 6: Plasmidkarte surA_PA14_pET-28a(+)	25
Abb. 7: Der Luciferase-Assay	54
Abb. 8: Beispielhaftes Pipettierschema einer 384-Well-F-Bodenplatte für den Luciferase-Aktivitätsassay.....	56
Abb. 9: Agarose-Gel der Amplifikation der kodierenden Sequenzen von <i>A.b.</i> , <i>P.a.</i> und <i>K.p.</i>	58
Abb. 10: Kolonie-PCR der Transformation von <i>E.c.</i> DH5 α pET28a SurA AB ..	59
Abb. 11: Kolonie-PCR von <i>E.c.</i> DH5 α pET28a_SurA-PA14.....	60
Abb. 12: Kolonie-PCR von <i>E.c.</i> DH5 α pET28a SurA KP	61
Abb. 13: Testexpression mit den Konstrukten pET28a_SurA- <i>A.b.</i> , <i>K.p.</i> und <i>P.a.</i> in <i>E.c.</i> BL21(D3)	62
Abb. 14: Testexpression von <i>A.b.</i> , <i>K.p.</i> und <i>P.a.</i> SurA mit <i>E.c.</i> BL21(D3).....	63
Abb. 15: Expression von <i>A.b.</i> , <i>K.p.</i> und <i>P.a.</i> SurA in <i>E.c.</i> Stamm 'Rosetta'	64
Abb. 16: Testexpression von SurA von kodon-optimierten Konstrukten des Dienstleisters GenScript – bisherige Bedingungen	65
Abb. 17: Testexpression der kodon-optimierten Konstrukte des Dienstleisters GenScript – Temperatur- und Expressionszeitanpassung.....	65
Abb. 18: Westernblot zum Vergleich der Expression von SurA bei unterschiedlichen Inkubationstemperaturen während der Expression und verlängerten.....	66
Abb. 19: Testexpression mit Autoinduktionsmedium	67
Abb. 20: Grafische Darstellung des ÄKTA-Programms der Nickel-Affinitätschromatographie von SurA _{PA}	68
Abb. 21: Proteinfractionen der Nickel-Affinitätschromatographie von SurA _{PA} ..	69
Abb. 22: Darstellung des ÄKTA-Programms für die Nickel-Affinitätschromatographie von SurA _{AB}	70
Abb. 23: Proteinfractionen der Nickel-Affinitätschromatographie von SurA _{AB} ..	71
Abb. 24: Grafische Darstellung der Größenausschluss-Chromatographie von SurA _{AB}	71

Abb. 25: Proteinfractionen der Größenausschluss-Chromatographie von SurA _{AB}	72
Abb. 26: Box-Plot des SurA _{EC} Luciferase Aktivitäts-Assays	74
Abb. 27: Box-Plot des SurA _{AB} -Peak 2 Luciferase Aktivitäts-Assays	76
Abb. 28: Box-Plot des SurA _{AB} -Peak 3 Luciferase Aktivitäts-Assays	78
Abb. 29: Box-Plot des SurA _{EC} Luciferase Aktivitäts-Assays unterschiedlicher Medozin-Konzentrationen ohne vorherige Hitzeaktivierung von SurA	79
Abb. 30: Box-Plot des SurA _{AB} -Peak 2 Luciferase Aktivitäts-Assays mit unterschiedlichen Medozin-Konzentrationen.....	81
Abb. 31: Alignment von SurA Gram-negativer Erreger und Darstellung der Salzbrücken	86

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Bakterienstämme	20
Tabelle 2: Flüssigmedien	21
Tabelle 3: Festmedien	22
Tabelle 4: Antibiotika	22
Tabelle 5: Puffer zur Herstellung chemisch kompetenter Bakterien	22
Tabelle 6: Expressionsvektoren (Plasmidnamen)	25
Tabelle 7: Geräte, Konzentrationsmessung dsDNA	30
Tabelle 8: Material, PCR	31
Tabelle 9: Primer	32
Tabelle 10: PCR-Komponenten Amplifikation	33
Tabelle 11: PCR-Protokoll Amplifikation	34
Tabelle 12: Materialien, Agarosegel-Elektrophorese	34
Tabelle 13: Geräte, Agarosegel-Elektrophorese	34
Tabelle 14: Material, Klonierung	36
Tabelle 15: PCR-Komponenten Kolonie-PCR	37
Tabelle 16: PCR-Protokoll Kolonie-PCR	38
Tabelle 17: In die Stammsammlung eingebrachte neue Stämme	38
Tabelle 18: Materialien und Puffer für die Proteinreinigung	42
Tabelle 19: Zusammensetzung Sammel- und Trenngel für SDS-PAGE	47
Tabelle 20: Materialien Probenvorbereitung für SDS-PAGE	47
Tabelle 21: Materialien zur Durchführung der SDS-PAGE	48
Tabelle 22: Materialien zur Coomassie-Färbung der SDS-PAGE	49
Tabelle 23: Geräte, Materialien und Puffer für Western-Blot	50
Tabelle 24: Materialien Ponceau-Rouge Färbung	51
Tabelle 25: Materialien und Puffer für Western-Blot	52
Tabelle 26: Materialien und Geräte Luciferase-Assay	53
Tabelle 27: Final erzielte Volumen und Konzentrationen von SurA _{AB}	72

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ACB-Komplex	<i>A. -calcoaceticus-A. -baumannii</i> -Komplex
AS	Aminosäuren
ATCC	American Type Culture Collection
CDC	Centers for Disease Control and Prevention
CF	zystische Fibrose
<i>E.c.</i>	<i>Escherichia coli</i>
ESBL	Extended Spectrum β -Lactamase
GZL	Ganzzelllysate
IM	Innere Membran
<i>K.p.</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
LB	Lysogeny Broth
LPS	Lipopolysaccharide
MWCO	Molecular weight cut-off
OM	Außenmembran (outer membrane)
OMP	Außenmembranproteine
<i>P.a.</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
PG	Peptidoglykanschicht
PPIase	Peptidyl-Prolyl-cis-trans-Isomerasen
RKI	Robert-Koch-Institut
RT	Raumtemperatur
SP	Signalpeptid
TB	Terrific Broth
ÜNK	Übernachtkultur
WHO	World Health Organization

1 Einleitung

1.1 Allgemein

1.1.1 ‚Emerging pathogens‘

Weltweit ist ein Anstieg der Antibiotika-Resistenzraten zu beobachten. Die *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC) geht davon aus, dass in den kommenden Jahrzehnten viele Menschen an den Folgen von nicht therapierbaren bakteriellen Infektionen aufgrund von Antibiotikaresistenz sterben werden. Diese Herausforderungen im Gesundheitswesen sind aktuell weltweit unterschiedlich verteilt. Während diese Resistenz-Problematik in Deutschland und anderen europäischen Staaten vorrangig Reiserückkehrende betrifft, die durch Kontakt mit dem Gesundheitswesen in Risikoländern mit multiresistenten Erregern kolonisiert sind [1, 2], stellt sie für Low-Income-Countries ein alltägliches Problem dar [3].

Die *World Health Organization* (WHO) *Pathogens Priority List Working Group* veröffentlichte 2017 eine Liste global relevanter Erreger, die eine hohe Rate von Antibiotika-Resistenzen aufweisen. Eine Priorisierung der Pathogene sollte die Notwendigkeit um dessen jeweiliger Erforschung adressieren und die Entwicklung von neuen Antibiotika fördern. In der höchsten Priorität (kritisch) sind Carbapenem-resistente *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* und *Enterobacteriaceae*, wie z. B. *Klebsiella pneumoniae*, gelistet. Letztere umfasst auch Extended Spectrum β -Lactamase (ESBL)-produzierende *Enterobacterales* [4].

1.2 Erreger

1.2.1 *Acinetobacter baumannii*

Acinetobacter baumannii (*A.b.*) ist ein Gram-negativer, teilweise auch gram-variabler, Erreger. Morphologisch ist *A.b.* ein kokkoides Stäbchenbakterium, das eine positive Katalase- und negative Oxidase-Reaktion zeigt. Wachstum auf Blutagar zeigt glatte, opake, grau-weiße bis überwiegend farblose Kolonien. Das

Bakterium zählt zu den nicht-fermentierenden Bakterien. Ubiquitär zu finden in Böden und Wasser, benötigt *A.b.* aerobe Bedingungen zum Wachstum [5].

Beschrieben wurde *A.b.* erst 1986 von Bouvet und Grimont [6]. Jene erweiterten den Genus *Acinetobacter*, ursprünglich nur mit *A. calcoaceticus* und *A. Iwoffii* beschrieben, mit Neubeschreibungen von *Acinetobacter baumannii*, *A. haemolyticus*, *A. johnsonii* und *A. junii*. Da die Differenzierung durch phänotypische und biochemische Methoden innerhalb des Genus *Acinetobacter* schwierig ist, wird im medizinischen Kontext die Identifizierung teilweise auf den *A.-calcoaceticus-A.-baumannii*-Komplex (ACB-Komplex) beschränkt [7]. Wird hingegen als Identifizierungs-Methode die Massenspektrometrie angewandt, ist eine Ausdifferenzierung möglich [8]. Zum ACB-Komplex zählen heute *A.b.*, *A. calcoaceticus*, *A. lactucae*, *A. nosocomialis*, *A. pittii* und *A. seifertii* [9].

Von klinischer Relevanz sind die Krankenhaus-assoziierten Infektionen des ACB-Komplexes. Im Wesentlichen ist die nosokomial erworbene, beatmungs-assoziierten Pneumonie die häufigste Infektion durch *A.b.* [10]. Auch Bakteriämien bei liegenden intravaskulären Kathetern, postoperative Wundinfektionen und Blasenkatheter-Infektionen gehören zu häufigen Erkrankungen. Risikofaktoren für eine Infektion mit *A.b.* können eine schwere Erkrankung mit langer künstlicher Beatmungsdauer, Immunsuppression oder maligne Erkrankungen sein [11], [12]. In den Patienten mit Immunsuppression können auch *Acinetobacter* sp. für eine Infektion verantwortlich sein, die nicht zum ACB-Komplex gehören [13], [14].

Gefürchtet sind Ausbrüche mit *A.b.* in Gesundheitszentren. In Deutschland wurden 2020 dem Robert-Koch-Institut (RKI) mit 43 Fällen 6 Ausbrüche durch *A.b.* mit verminderter Empfindlichkeit gegenüber Carbapenemen berichtet [15]. In Deutschland sind die häufigsten Carbapenemasen bei *A.b.*-Isolaten (Stand 2020) OXA-23, OXA-72 und NDM [16]. Insgesamt ist der Anteil der Carbapenem-resistenten klinischen Isolate des ACB-Komplexes im weltweiten Vergleich gering [17].

Die genannten Carbapenemase-bildenden *A.b.* sind äußerst schwer zu therapieren. Nahezu alle kommerziell erhältlichen Antibiotika sind in einem solchen Fall unwirksam. Zur Therapieoption stehen gegebenenfalls ältere Reserve-Antibiotika wie Colistin, die mit schwereren Nebenwirkungen wie Nephrotoxizität [18] assoziiert sind.

1.2.2 *Klebsiella pneumoniae*

Klebsiella pneumoniae (*K.p.*) ist ein Gram-negatives Stäbchenbakterium, das sich im Vergleich zu *Escherichia coli* (*E.c.*) etwas länger und teilweise mit bipolarer Färbung darstellen kann. Auf Blutagar wächst *K.p.* als 2-4 mm messende, graue, nicht pigmentierte Kolonien und ist fakultativ anaerob. Manche Klone besitzen eine große Polysaccharid-Kapsel und bilden deutlich mukoide Formen. Als Lactose-Fermenter findet man *K.p.* auf MacConkey-Agar als eher dunkel-pinke Kolonien wieder. Sie weisen sowohl eine negative Oxidase- als auch negative Indol-Reaktion auf. *K.p.* kann als natürliches Enterobakterium der menschlichen Darmflora medizinisch relevant werden, wenn es zu endogenen Infektionen kommt. Der Name verrät das häufige Krankheitsbild der Pneumonie, die durch diesen Erreger vorrangig nosokomial erworben wird [5].

Unter den *Enterobacterales* zählt *K.p.* zu den häufigsten Einsendungen zur Abklärung des Vorhandenseins einer Carbapenemase an das Nationale Referenzzentrum für Gram-negative Krankenhauserreger in Bochum und hat auch absolut den höchsten Anteil an Carbapenemase-produzierenden Isolaten. Vorrangig in *K.p.* nachgewiesene Carbapenemasen im Jahr 2020 in Deutschland sind OXA-48, KPC-2 und -3 sowie NDM-1 [16].

1.2.3 *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa (*P.a.*) ist ein weiteres Gram-negatives Stäbchenbakterium, das in der Umwelt vor allem in feuchten Gebieten weit verbreitet ist und dort stabile Biofilme bildet. Das strikt aerobe Bakterium wächst gut auf bluthaltigen Nährböden, aber auch auf MacConkey-Agar. Es zeigt sowohl eine positive Oxidase- als auch eine positive Katalase-Reaktion. *P.a.* gehört zur Gruppe der fluoreszierenden Pseudomonaden (*P.a.*, *P. fluorescens*, *P. monteilii*, *P. mosselii*, *P. putida* und *P. veronii*). Allen gemeinsam ist die Produktion von

fluoreszierendem Pyoverdin, das die Kolonien makroskopisch gelbgrün erscheinen lässt. Zusätzlich können Stämme von *P.a.* Farbpigmente wie Pyocyanin (blaugrün), Pyomelanin (braunschwarz) und Pyorubin (rot) bilden. Eine zuverlässige Identifizierung ist mittels MALDI-TOF MS möglich [5].

Das Resistenzprofil von *P.a.* ist vielfältig. Verschiedene Mechanismen wie chromosomal kodierte AmpC-Cephalosporinasen, Effluxpumpen und eine reduzierte Permeabilität der äußeren Membran durch Regulation des Porin-Gens *oprD* führen zu einer intrinsischen Resistenz z. B. gegen viele β -Lactam-Antibiotika. Auch die Fähigkeit zum Erwerb neuer Resistenzen unter laufender Therapie wird beobachtet [19], was u.a. auf die Hochregulation intrinsischer Resistenzmechanismen zurückzuführen ist. Der Neuerwerb von Resistenzen wie z. B. unterschiedliche β -Lactamasen, Mutationen, die zu Änderung der Porin- oder Membranzusammensetzung führen, und die Modifikation von Zielenzymen, wie z. B. der DNA-Gyrase, ist vielfältig [20].

Klinisch bedeutend ist *P.a.* bei Personen mit zystischer Fibrose (CF). Es kommt bei über 60 % der CF-Patient*innen zu chronischen Infektionen der Lunge [21]. *P.a.* bildet einen robusten Biofilm, der sowohl für Antibiotika als auch für das Immunsystem schwer zugänglich ist [22]. Diese Eigenschaft bietet ebenso die Möglichkeit chronische Wundinfektionen aufrechtzuerhalten. Im Klinikalltag kann der wasserliebende Keim vor allem bei beatmeten Patient*innen nosokomiale Pneumonien verursachen [10]. Auch andere nosokomiale Infektionen wie Harnwegsinfektionen bei liegenden Kathetern und anderen Kunststoffmaterialien sind hier ganz ähnlich, wie schon bei *A.b.* erwähnt.

1.2.4 Resistenzmechanismen

Acinetobacter ist bekannt für seine Vielzahl an antimikrobiellen Resistenzmechanismen, die mit einer Zunahme in der Genomgröße assoziiert ist [23]. In Genomanalysen zeigen sich in pathogenen Stämmen von *A.b.* Cluster von Resistenzgenen in Resistenz-Inseln. Es wird postuliert, dass *Acinetobacter* die Fähigkeit besitzt, Resistenzgene von anderen Bakterien aufzunehmen [24], [25]. Der Mechanismus von natürlicher Transformation in *A.b.* ist bis heute nicht erklärt [26]. Außerdem weisen die vielen *Acinetobacter* Spezies aus der Umwelt

ein großes Repertoire an Resistenzgenen auf, die auch klinisch relevante Spezies akquirieren können [20].

1.2.4.1 β -Lactamasen

Einen Großteil der natürlichen Antibiotikaresistenz übt *Acinetobacter* durch die Expression von β -Lactamasen aus. Chromosomal weist *Acinetobacter* AmpC- β -Lactamasen auf, die als Cephalosporinasen zur Hydrolyse von Penicillinen und erst- bis dritt-Generations Cephalosporine führt. Wichtige Antibiotika wie Ceftazidim, Cefotaxim und Ceftriaxon entfallen für eine geeignete Therapie. Lediglich die viert-Generations-Cephalosporine wie Cefepim werden nur wenig durch AmpC hydrolysiert [27]. Die Promotor-Sequenz ISAb₁ verursacht die hohe Expressionsrate von AmpC [28].

Plasmid-kodierte β -Lactamasen wie Extended Spectrum β -Lactamasen (ESBLs) kommen in den verbreiteten klinischen Isolaten hinzu [29]. Die vielen existierenden Varianten von ESBLs hydrolysieren die o.g. Penicilline und alle 1.-4.-Generations Cephalosporine. Eine solche Situation zwingt zum Einsatz von Carbapenemen oder geeigneten β -Lactamase-Inhibitoren als Therapieoption bzw. -optimierung.

Doch auch hier ist eine Limitation in der Therapie durch das Vorkommen von Oxacillinasen gegeben. Die Oxacillinasen wie z. B. *bla*_{OXA-23} können Plasmid-kodiert [30], aber auch chromosomal vorkommen [31]. Wie bereits oben erwähnt, findet man in Deutschland vor allem *bla*_{OXA-23} und *bla*_{OXA-72} in deren Genomen [16]. Diese Gene kodieren für Carbapenemasen und führen zu einer minder- oder nicht-Empfindlichkeit gegenüber Carbapenemen.

Als weitere Gruppe der Carbapenemasen sind die metallo- β -Lactamasen aufzuführen. Diese Proteine haben die Fähigkeit, Metallionen reversibel zu binden und dienen als aktives Zentrum um Carbapeneme hydrolytisch zu spalten. Gleichzeitig stellt dies eine Herausforderung an die Diagnostik durch notwendige Substitution von Metallionen in den Test-Assays dar [32]. Als Beispiel kann die New Delhi metallo- β -Lactamase (NDM-1) erwähnt werden. Diese wurde 2009 von Yong et al. [33] plasmidkodiert (*bla*_{NDM-1}) in einem Isolat von *K.p.* eines

schwedischen Patienten, der in Indien reisen war, erstbeschrieben und zeigt eine schnelle weltweite Verbreitung [34]. Metallo- β -Lactamasen haben gemeinsam, dass sie zu einer vollständigen Resistenz gegenüber allen β -Lactam-Antibiotika führen [34]. Während in Deutschland NDM-1 die häufigste nachgewiesene metallo- β -Lactamase in *A.b.* ist [16], finden sich international zahlreiche weitere, wie z. B. Nikibakhsh et al. (2021) in klinischen Isolaten von Verbrennungspatienten in Teheran vorwiegend *bla*_{VIM} und *bla*_{IMP} nachwies [35].

Die rasche Verbreitung von Resistenzen bei *A.b.* ist möglicherweise auf einen intensiven horizontalen Gentransfer zurückzuführen. Es konnte gezeigt werden, dass *A.b.* Resistenzgene durch Transkonjugation ganzer Plasmide transferiert oder in Integrons mit konsekutiver Rekombination integriert. Leungtongkam et al. (2018) zeigte hier die Übertragung des β -Lactamase-Gen *bla*_{OXA-23} mittels Integron durch horizontalen Gentransfer [36].

1.2.4.2 Efflux-Pumpen

Ein sehr wichtiger und effektiver Resistenzmechanismus ist die Anwesenheit von Efflux-Pumpen, die in *A.b.* zu einer Resistenz gegenüber β -Lactam-Antibiotika, Fluorchinolonen, Makroliden, Tetracyclinen, Tigecyclin, Aminoglykosiden, Colistin und auch Antiseptika wie Chlorhexidin führt [37]–[39]. Die Efflux-Pumpen AdeABC der *Resistance-nodulation-division* (RND) Familie können ein breites Spektrum an Substraten über die innere und äußere Membran transportieren. RND Efflux-Pumpen bestehen aus einer dreiteiligen Struktur und setzen sich aus einem Außenmembran Tunnel Protein (AdeC, AdeK), einem Membran-Fusions-Protein (AdeA, AdeI) sowie dem hauptsächlichen Transporter (AdeB, AdeJ) zusammen [40], [41]. Eine Überexpression von AdeB und AdeJ, die durch Tigecyclin induziert werden kann, führt zu einem vermehrten Einbau von Efflux-Pumpen in der OM und spiegelt sich in erhöhter Antibiotika-Resistenz wider [42].

1.2.4.3 Natürliche Resistenz durch Outer-membrane β -barrel Proteine

Neben dem aktiven Abtransport von Substraten ist die hohe intrinsische Resistenz von *A.b.* durch eine sehr geringe Permeabilität der Außenmembran bedingt [43]. Die Permeabilität der bakteriellen Außenmembran wird u.a. durch Membran-integrale Porine bestimmt. Viele Antibiotika gelangen darüber in das

Bakterium. *A.b.* weist im Gegensatz zu Enterobacterales wie *Escherichia coli* [44] generell kleinere und weniger aktive Porine auf.

Es wurde durch Limansky et. al (2002) gezeigt, dass es allein durch den Verlust des 29-kDa Outer-membrane Proteins CarO in *A.b.* zu einer Imipenem-Minderempfindlichkeit kommt [45].

1.2.4.4 Umweltresistenz

Die Glykokalyx ist bei *A.b.*, *K.p.* und *P.a.* unterschiedlich ausgeprägt. Allen gemein ist, dass die Exopolymerschichten zum Überleben in der Umwelt dienlich sind. Diese führen zu einer ausgesprochenen Umweltresistenz, die durch eine hohe Trockenheitstoleranz, Anheften an Oberflächen und Biofilm-Bildung gekennzeichnet sind. Hieraus lässt sich der Stellenwert bei nosokomialen Infektionen ableiten. Da die Bakterien auf vielen Oberflächen lange überdauern können und gute Widerstandskraft gegenüber Flächendesinfektionsmittel aufweisen, kann eine Transmission auf *medical devices* oder Wundflächen durch die Hände des medizinischen Personals gelingen.

A.b. ist im Gesundheitswesen förmlich ein Rebell. Desinfektionsmittel mit Chloramin oder freiem Chlor führen bei *Acinetobacter baylyi* ADP1 zu zellulärem Stress, der mit einer 10-fach erhöhten Transformation durch freie Plasmide einhergeht [46]. Die Trockenheitstoleranz, d.h. die Überlebensfähigkeit unter trockenen Umständen, variiert zwischen klinischen Isolaten allerdings beträchtlich. Ein Überleben von einzelnen Isolaten ist mit bis zu 100 Tagen beschrieben worden [47], [48]. Noch ist der multifaktorielle Mechanismus der Trockenheitstoleranz nicht gut verstanden. Es wird aber angenommen, dass die Kapsel aus Polysacchariden, deren Syntheseweg sich apathogene Stämme wie *A. baylyi* und *A.b.* teilen [49], daran beteiligt ist.

Auch die Beschaffenheit der Außenmembran scheint einen Einfluss zu haben. Boll et al. (2015) zeigten, dass eine reduzierte Acylierung von Lipid A bei *A.b.* mit einer reduzierten Überlebensfähigkeit unter trockenen Bedingungen assoziiert ist. Die Autoren vermuteten, dass die veränderte Lipid-Komposition der Außenmembran zu einem Austreten von Wasser führt [50].

Durch die Biofilmbildung auf medizinischen Kathetern, wie zum Beispiel intravasalen zentralvenösen Kathetern, kann es konsekutiv zu einer Bakteriämie kommen. Dies kann zu einer Blutstrominfektion führen und gilt als eine gefürchtete nosokomiale Infektion und damit Komplikation [51]. Aber auch eine Infektion wie Osteomyelitis wird durch diese Fähigkeit zu einer schwer zu therapierende Erkrankung [52]. Oberflächenanhangsel und schützende Strukturen sowie Adhäsine tragen erheblich zur Bildung und Aufrechterhaltung von Biofilmen bei. Große, nach außen gelagerte Oberflächenstrukturen, wie das Protein Bap_{AB}, welches durch ein Typ I Sekretionssystem (T1SS) sekretiert wird, vermitteln die Bildung reifer *A.b.*-Biofilme [53]–[55]. Bap_{AB} trägt zur Zell-Zell Adhäsion sowie zur Bildung übergeordneter Strukturen bei. Auch die Produktion von poly-beta-(1–6)-N-acetylglucosamine (PNAG) [56] und Kapselpolysaccharid sind für die Biofilmbildung relevant [57].

1.2.5 Virulenz und Virulenzfaktoren/Pathogenitätsfaktoren

Entgegen der Übersetzung von ‚*Acinetobacter*‘, als ‚nicht-bewegender Erreger‘, zeigt sich unter anderem in klinischen Isolaten von *A.b.* und *A. nosocomialis* eine erhöhte Beweglichkeit, die suggestiv für erhöhte Virulenz stehen, was aber bisher nicht belegt wurde [58]. Durch Typ IV Pili können *Acinetobacter* sich durch wiederholte Extension und Retraktion der Pili über glatte Oberflächen sogar fortbewegen [59]. Diese Fähigkeit (‚twitching motility‘), findet sich auch in vielen anderen Bakterien [60]. Die Beweglichkeit auf Oberflächen wird jedoch nicht allein durch das Vorhandensein von Typ IV Pili bestimmt. Auch eine Anhangsel-unabhängige Beweglichkeit auf Oberflächen ist möglich (‚surface-associated motility‘/‚swarming motility‘). Diese Form der Beweglichkeit ist bisher wenig verstanden. Das Augenmerk darauf richteten Clemmer et. al 2011 mit *A.b.* Mutanten, die im *pilT* Gen ein null-allel erhielten und dadurch eine signifikant geringere Motilität aufwiesen [61]. Das *pilT* Gen codiert für eine ATPase, die zur Retraktion des Pilus notwendig ist [62].

Neben der Interaktion mit statischen Oberflächen ist die Adhäsion an Geweboberflächen, wie Epithelzellen zu erwähnen. Hier nehmen die Außenmembranproteine OmpA und Omp 33- bis 36-kDa Protein (Omp33-36)

einen besonderen Stellenwert ein. OmpA ist mengenmäßig reichlich an der Außenmembran vorhanden und besteht sowohl aus einer achtsträngigen beta-barrel Domäne, als auch einer C-terminalen periplasmatischen Domäne, die mit der Zellwand interagiert [63]. Es erfüllt unterschiedliche Funktionen. Die außen gelagerte beta-barrel Domäne ist beteiligt an Antibiotikaresistenz [44], wie schon in 1.2.4.3 beschrieben. Durch die Interaktion mit Fibronectin, als Bestandteil der extrazelluläre Matrix, entsteht eine Adhäsion an menschliche Zellen [64]. Eine OmpA-vermittelte Invasion in Epithelzellen ist gekennzeichnet von Mikrofilament und -tubuli abhängigen Aufnahmemechanismen [65]. Zudem zeigten Choi et al. (2005), dass OmpA eine Apoptose von laryngealen Epithelzellen auslöst. Dies erfolgt einerseits durch Interaktion mit Todesrezeptoren an der Zelloberfläche, andererseits durch mitochondrialen Abbau, welches zur Freigabe von Apoptose-Faktoren wie z. B. Cytochrom C führt. Eine aktivierte Caspase degradiert die Zell-DNA [66].

Omp33-36 zeigt eine sehr ähnliche Eigenschaft wie OmpA auf. Antibiotika-Resistenz, Zelladhäsion und Zytotoxizität sind beschrieben [67]. Rumbo et al. (2014) zeigte neben der Aktivierung von den Caspasen 3 und 9, die zur Apoptose führen, eine Modulation der Autophagie. Dies ermöglicht ein intrazelluläres Überleben und trägt wesentlich zur Zytotoxizität bei [68]. Eine entscheidende Rolle in der Virulenz von Omp33 zeigte Smani et al. (2013) mit Deletionsmutanten von *omp33*, die zu einer reduzierten Adhäsion und Invasion in Lungenepithelzellen (A549 Zellkultur) führten [69].

Das Außenmembranprotein in *A.b.* mit einem Molekulargewicht von 22 kDa (Omp22) scheint ebenfalls wichtig für die Virulenz zu sein. Huang et al. (2016) konnten zeigen, dass sowohl eine aktive als auch passive Immunisierung gegen Omp22 ein besseres Überleben in einem Sepsis-Mausmodell brachte. Auch die Bakterienkonzentrationen in Lunge, Milz, Leber und Nieren waren geringer [70].

Um in einem Wirt zu überleben, in dem freies Eisen durch strikte Bindungen an wirtseigenen Proteinen rar ist, besitzt *A.b.* aktive Mechanismen Eisen aufzunehmen, damit wichtige physiologische Prozesse aufrechterhalten bleiben. Hierzu zählen zwei körpereigene Siderophore, ein Häm-Akquisitions- und ein

Eisen-Aufnahmesystem [71]–[73]. Sekretionssystem werden nicht nur zur Reifung von Biofilmen benötigt, wie zuvor in 1.2.4.4 beschrieben, sondern auch als Pathogenitätsfaktor zur Sekretion von RTX Serralysin-ähnlichen Toxinen, die zu den hämolytischen Exotoxinen gehören [74].

Ein weiterer wichtiger Pathogenitätsfaktor ist ein trimerer Autotransporter. Das von Bentancor et al. (2012) beschriebene Oberflächenprotein Ata (*Acinetobacter trimeric autotransporter*) erfüllt unterschiedliche Funktionen in der Virulenz, wie Biofilmbildung und Bindung an verschiedene Komponenten der extrazellulären Matrix [75]. Adhäsion an und Invasion in menschliche Endothel- und Epithelzellen hängen u.a. von Ata ab, wie Weidensdorfer et al. (2015) beschrieben. Die Autoren zeigten dies unter statischen und Scherstress-Bedingungen *in vitro* und in einem Ex-vivo-Modell für menschliche Organinfektionen [76].

CarO (25/29 kDa), ein weiteres Außenmembranprotein mit achtsträngiger beta-barrel-Form [77], das neben Carbapenem-Resistenz (siehe 1.2.4.3) auch für die Aufnahme von den Aminosäuren Glycin und Ornithin verantwortlich ist [78]. Mussi et al. (2005) zeigt neben der Strukturanalyse auch die mögliche Aufnahme von Imipenem. Wobei die Tatsache von der Forschungsgruppe selbst angezweifelt wurde, da es sich um eine nicht durchgängige Tunnelstruktur handelt und im Verhältnis klein ist zur Größe von Carbapenemen [78]. 2011 zeigte dann Catel-Ferreira et al., dass zwei mögliche Subtypen von CarO existieren und konnten hier für den Typ CarOb eine Bindungsstelle für Imipenem identifizieren [79].

Zusammenfassend kann an dieser Stelle gesagt werden, dass eine Vielzahl von Außenmembranproteinen, die Virulenz, die Resistenz und immunologische Phänomene beeinflussen. Entscheidend für diese Arbeit ist nun der Fokus auf das Chaperon SurA, wie es die Zusammensetzung der Außenmembran wesentlich beeinflussen kann und damit ein entscheidendes Target für die Suche und Entwicklung von Pathoblockern ist.

1.3 Biogenese von äußeren Membranproteinen

Die Zellhülle Gram-negativer Bakterien besteht aus einer inneren Membran (IM), einer Peptidoglykanschicht (PG) und einer Außenmembran (OM, englisch: *outer membrane*) [80]. Die IM enthält in ihrer Phospholipid-Doppelschicht Proteine, welche unter anderem für die Translokation von Proteinen oder die Lipidbiosynthese zuständig sind [81]. Zwischen IM und OM liegt das Periplasma, durch welches Proteine von der inneren zur äußeren Membran transportiert werden und in welchem eine dünne PG-Schicht liegt [82], [83]. Die Außenmembran Gram-negativer Bakterien ist asymmetrisch: die äußere Schicht der Doppelmembran besteht nicht wie die innere aus Phospholipiden, sondern hauptsächlich aus Lipopolysaccharid (LPS), welches eine Barriere gegen äußere Umwelteinflüsse und toxische Substanzen sowie Komponenten der angeborenen Immunantwort darstellt [84], [85]. Während in vielen Bakterien eine Inhibition der LPS-Biosynthese zur Akkumulation toxischer Zwischenprodukte führt, kann *Acinetobacter baumannii* diese tolerieren [86]–[88]. Die zugrunde liegenden Mechanismen sind allerdings noch nicht völlig verstanden.

Ein weiterer wichtiger Bestandteil der Außenmembran sind sogenannte OMPs (englisch: *outer membrane protein*), wobei es sich in der Regel um β -barrel-förmige Proteine handelt [89]. Sie dienen u.a. dem Stoffaustausch kleiner Moleküle zwischen Außenmilieu und Periplasma, aber auch zur Adhäsion oder Invasion wie in 1.2.5 beschrieben. Größere β -barrel-Proteine können enzymatische Funktionen besitzen und als aktive Eisen-Transporter fungieren [80], [90].

Die meisten OMPs werden nach ihrer ribosomalen Translation im Cytoplasma über den Sec-Pathway ins Periplasma gebracht. Das Prä-Protein enthält eine Signalsequenz und wird entweder vom Chaperon SecB oder dem Signal-Recognition-Particle zur inneren Membran dirigiert, welche das SecYEG-Translokon und den ATPase-Motor SecA, sowie weitere Komponenten wie SecDF-YajC und YidC enthält [91]–[93]. Nach der aktiven Translokation ins Periplasma wird die Signalsequenz von einer Signalpeptidase entfernt und das OMP-Vorläuferprotein wird von periplasmatischen Chaperonen (z. B. SurA, Skp)

zur β -barrel assembly machinery (BAM) an der äußeren Membran gebracht, welche für die Faltung und Insertion des Proteins in die äußere Membran verantwortlich ist (siehe Abb. 1) [94], [95].

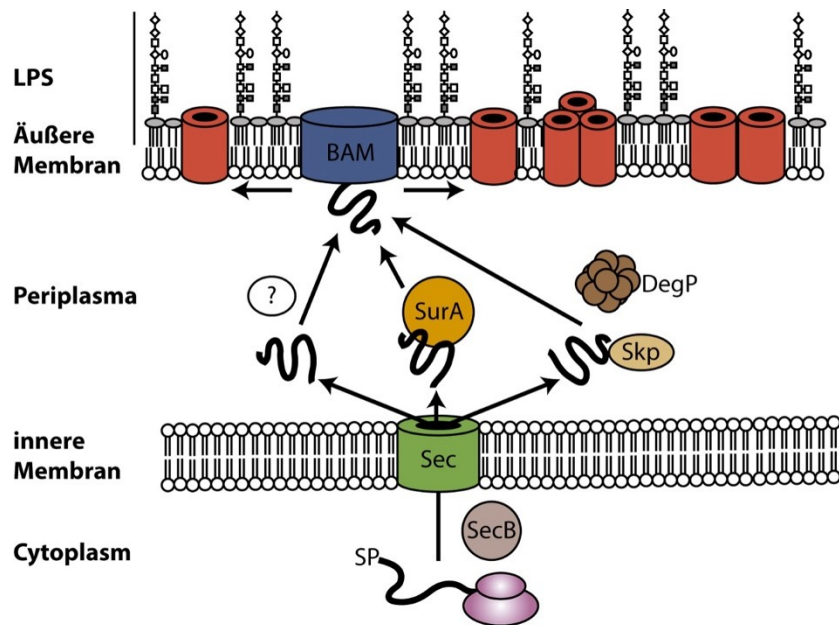


Abb. 1: Transportweg von OMPs. OMPs werden mit Signalpeptid (SP) aus dem Cytoplasma mittels SecB zum Sec-Translokator begleitet. Im Periplasma wird das SP abgetrennt. Dann gibt es mehrere mögliche Chaperone (Skp, SurA oder weitere, ?), die die OMP-Vorläuferproteine zur Außenmembran transportieren und auch bestimmte Faltungsschritte unterstützen. DegP kann als Chaperon agieren, aber auch fehlgefaltete Proteine abbauen. Der BAM-Komplex faltet und integriert die OMPs in die OM. Grafik von Fabian Renschler, modifiziert nach und basierend auf Behrens-Kneip (2010) [96]

Die Chaperone, welche in *E.c.* und anderen Gram-negativen Bakterien primär für den Transport von OMPs durch das Periplasma an den BAM-Komplex zuständig sind, sind SurA (*survival protein A*) [97]–[99] und Skp (*seventeen kilodalton protein*) [100], [101]. Neben der Funktion als Chaperon zeigten sich durch Deletion von *skp* auch Faltungsdefekte von LptD, das als Teil des Lpt-Komplexes für den Transport und den Einbau von LPS in die äußere Membran wichtig ist [102]. Des Weiteren fungiert Skp in Abwesenheit von SurA in *E.c.* als Bestandteil eines Alternativ-Transportweges für manche OMPs [103]. Das periplasmatische Protein DegP besitzt sowohl die Eigenschaften eines Chaperons (bei niedrigen Temperaturen) als auch die einer Protease, welche fehlgefaltete OMPs abbaut [104]–[107]. Die Protease-Aktivität wurde als essenziell für das Überleben bzw. dem Standhalten von zellulären Stressbedingungen bei höheren Temperaturen

für *E.c.* beschrieben. Unter diesen Bedingungen erkennt DegP denaturierte Proteine erkennt und baut diese ab [108].

Die Akkumulation von ungefalteten Proteinkomplexen im periplasmatischen Raum ist für ein Bakterium ein kritischer Stressor, weshalb Systemen zum Abbau von periplasmatischen Stress eine essenzielle Funktion zukommt [109]. Chaperone sind hier einerseits für die Aufrechterhaltung des regulären Ablaufs und gegebenenfalls für Eingriffe wie proteolytische Abbauprozesse durch DegP (s.o.) zuständig, viel wichtiger ist aber natürlich der Einbau der Zielproteine (und damit der Abtransport aus dem periplasmatischen Raum) in die äußere Membran [110]. Dazu werden die Proteine, wie bereits beschrieben, an den BAM-Komplex überführt, dessen Kerneinheit BamA von Wu et al. (2005) beschrieben wurde. Die Arbeitsgruppe konnte erstmals zeigen, dass eine Depletion von BamA den Einbau von OmpA drastisch reduziert [111].

Wie SurA und der BAM-Komplex miteinander interagieren und den Transfer von Proteinen zum Einbau in die OM steuern, wird im folgenden Abschnitt erörtert.

1.3.1 Das periplasmatische Chaperon SurA

Das Chaperon SurA kommt in allen Gram-negativen Bakterien vor. SurA von β - und γ -Proteobakterien besitzt zwei PPLase-Domänen, während SurA von α -Proteobakterien nur eine oder gar keine PPLase-Domäne besitzt [112], [113]. Auf die verschiedenen Domänen und deren Struktur werde ich im nächsten Abschnitt eingehen.

Erstmalig wurde das Gen *surA* und das Protein SurA als essenziell für das Überleben von *E.c.* in der stationären Phase beschrieben [98], [114]. Erst später konnte die zentrale Funktion in der Biogenese der integralen β -Barrel-OMPs als Chaperon gezeigt werden [97], [115].

SurA gehört zur Familie der Peptidyl-Prolyl-cis-trans-Isomerasen (kurz: PPLase) und sind zusätzlich zu ihrer Chaperonaktivität an der Faltung von Proteinen der OM beteiligt [100]. Die Primärstruktur von SurA (Abb. 2 A) besteht aus einem N-terminalen Signalpeptid (20 AS) sowie einer N-terminalen Domäne (150 AS),

gefolgt von den Domänen P1 und P2, den Parvulin-ähnlichen PPlase-Domänen mit jeweils etwa 100 AS und einem kurzen C-terminalen Teil (40 AS).

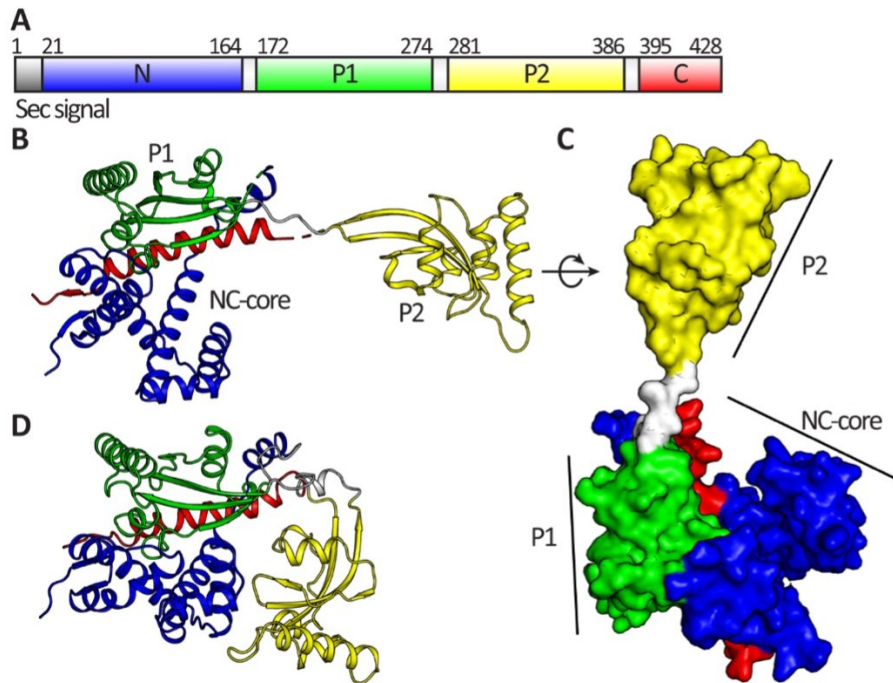


Abb. 2: Primärstruktur von *E.c.* SurA und schematische Darstellung der Organisation der SurA-Domänen. (A) Die Anzahl der Aminosäuren zeigt die Domänengrenzen an. Farbcode: Sec-Signal (grau), N-terminale Subdomäne (blau), P1 (grün), P2 (gelb), C-terminale Subdomäne (rot). Erstellt von Fabian Renschler. (B) SurA (pdb ID: 1m5y) in Cartoon- und (C) in Oberflächendarstellung, Farbcode wie in A. (D) Exemplarische geschlossene Konformation von SurA, in der die P2-Domäne in engem Kontakt mit dem P1:NC-Kernmodul steht (MD-Simulationsframe, T. Kronenberger & A. Poso).

In ihrer Tertiärstruktur bilden die N- und C-terminalen Domänen zusammen mit der P1-Domäne das sog. Kernmodul, während die flexible P2-Domäne mit dem Kernmodul weniger starr assoziiert ist [116] (Abb. 2 B, C und D).

SurA ist nur in dem Sinne hochkonserviert, dass es, wie eingangs beschrieben, in allen Gram-negativen Bakterien vorkommt. Alignments verschiedener Bakterienspezies zeigen jedoch deutliche Unterschiede in ihrer Aminosäuresequenz (Abb. 3) mit möglichen Konsequenzen für die Sekundärstruktur. Die Funktion von SurA wurde bisher hauptsächlich in *E.c.* untersucht, und es gibt nur wenige Erkenntnisse über andere Spezies.

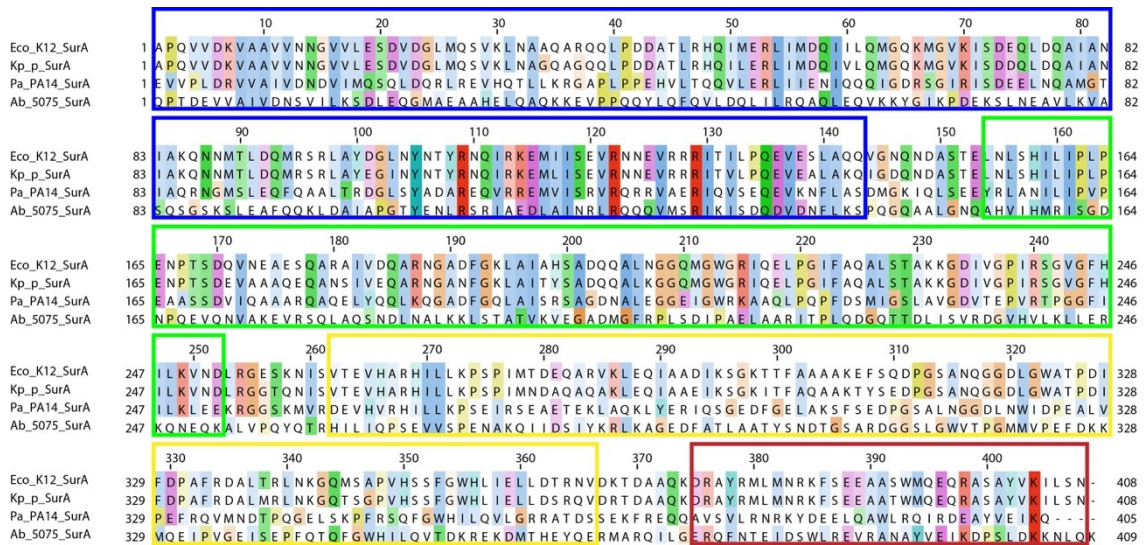


Abb. 3: Proteinsequenz-Alignment von *E.c.*, *K.p.*, *P.a.* und *A.b.* SurA (ohne Signalsequenz). Farbliche Hervorhebung der Regionen wie in Abb. 2. Erstellt mit Jalview [117] und Adobe® Illustrator® CS6 (Version 16.0.3).

Die N-terminale zusammen mit der C-terminalen Domäne besitzt eine wichtige Rolle in der Funktion der Chaperon-Aktivität beim Begleiten der OMPs zur Außenmembran [115] und scheinen spezifische Charakteristika von OMPs selektiv zu erkennen. Letzteres zeigt sich wohl vor allem durch Muster aromatischer Reste, die in integralen OMPs häufiger zu finden sind [118].

Die PPIase-Aktivität zeigt sich ausschließlich in der P2-Domäne und die spezifische Peptidbindungsaktivität ist in der P1-Domäne angesiedelt [115], [119]. Humes et al. (2019) zeigten, dass SurA möglicherweise verschiedene Bindungsdomänen für verschiedene OMPs nutzt, wobei die Domänen P1 und P2 notwendig sind, um die Aggregation von Faltungsintermediaten zu verhindern [113]. Bei Deletion von P2 in *E.c.* SurA zeigte sich eine reduzierte Aktivität von SurA, die Soltes et al. (2016) aber auf eine dadurch verursachte unzugängliche Konformation der P1- und Kerndomäne zurückführen und nicht *per se* auf das Fehlen von P2 [120].

Auch in Bezug auf die Substrate von SurA hat sich die Wissenschaft bisher sehr auf *E.c.* konzentriert. Proteomstudien mit Knock-out Mutanten von *surA* in *E.c.* zeigten, dass nur wenige OMPs notwendigerweise auf die Anwesenheit von SurA angewiesen sind. Wichtige Substrate von SurA sind die äußeren Membranproteine LptD und FhuA [121].

LptD, früher auch Imp (increased membrane permeability) [122] oder OstA (organic solvent tolerance) [123] genannt, spielt eine wichtige Rolle in der Membranbiogenese, wie bereits erwähnt, und wird von einem Gen direkt *upstream* von SurA kodiert. LptD ist ein essenzielles, 87 kDa großes OMP und enthält eine β -barrel-Domäne [124]. Dort interagiert LptD mit LptE und bildet einen Komplex, der für den Einbau von LPS in die äußere Membran notwendig ist. Eine Depletion des Komplexes führt zunächst zu erhöhten zellulären Konzentrationen von LPS und zu morphologischen Veränderungen, wie der Anreicherung von Membranmaterial im Periplasma [125]. LPS wird im Periplasma von zwei weiteren Proteinen, LptA und LptB, von der inneren Membran zur äußeren Membran transportiert. Gemeinsam mit LptD ist ihnen die Regulation durch σ^E [126].

Der alternative Sigmafaktor σ^E wird von *rpoE* kodiert und wurde erstmals 1989 als 24 kDa großer Sigmafaktor identifiziert, der für die Transkription von *rpoH* über dessen Promotor P3 sowie von *degP* verantwortlich ist [127], [128]. Für das Wachstum und Überleben von *E.c.* bei Temperaturen über 40 °C ist dieses Protein unentbehrlich [129]. Die Aktivität von σ^E wird insbesondere durch eine Überproduktion von OMPs im Periplasma und durch solche Genmutationen induziert, die die korrekte Prozessierung der OMPs in der äußeren Membran beeinträchtigen. Die Anhäufung von fehlgefalteten periplasmatischen Proteinen oder OMPs im Periplasma induziert ebenfalls σ^E -Aktivität [130]. Sowohl eine hohe σ^E -Aktivität als auch die Deletion des *surA*-Gens führen zu einer reduzierten OMP-Dichte und damit ähnlichen Phänotypen [131].

Bei anderen Erregern wie *Neisseria meningitidis* spielt SurA eine untergeordnete Rolle. Das Fehlen von SurA hat hier keinen Einfluss auf die Biogenese von

OMPs. Im Gegensatz dazu führte das Fehlen von Skp zu signifikant niedrigeren Konzentrationen der Porine PorA und PorB, nicht aber der anderen OMPs [132].

Klein und Sonnabend et al. (2019) zeigten eine stark veränderte OMP-Zusammensetzung in *P.a.* bei Depletion von SurA. Phänotypisch kam es zu einer Störung der OM-Integrität, die sich in reduzierter Resistenz gegenüber Gallensalzen, und erhöhter Sensibilität gegenüber Serumkomplement und Antibiotika äußerte. In einem Infektionsmodell mit *Galleria mellonella* führt die Depletion von SurA zu einer abgeschwächten Virulenz [133].

Es wurde gezeigt, dass SurA direkt mit BamA, kodiert durch *yaeT*, interagiert [131]. SurA interagiert mit dem BAM-Komplex an verschiedenen Stellen: über seinen NC-Kern mit BamA und BamB oder über seine P2-Domäne mit BamE. Keine der PPI-Domänen scheint für die Bindung an den BAM-Komplex essenziell zu sein, obwohl P2 die Insertion von OMP-Substraten in die Membran erleichtert. Die Bindung von SurA an den BAM-Komplex löst dort Konformationsänderungen aus, wie z. B. die Öffnung einer Tasche innerhalb des BAM-Komplexes, die zur lateralen Insertion von OMPs in die Membran beiträgt, oder die Öffnung der P1-NC-Interaktionsstelle von SurA [116].

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass Eingriffe in die OMP-Biogenese und dadurch verursacht eine Veränderung der Zusammensetzung der äußeren Membran bei Gram-negativen Bakterien dramatische Folgen haben kann. Es kann durch die Reduktion der OM-Integrität zu signifikanten Veränderungen der Antibiotikaresistenz bei multi- oder panresistenten Bakterien führen und gleichzeitig eine Reduktion der Virulenz bewirken. Daher ist die Hemmung eines Chaperons wie SurA, das wesentlich an der Biogenese der OM beteiligt ist, ein vielversprechender Ansatz. Dieser Ansatz wurde bereits in der Arbeitsgruppe für *E.c.* verfolgt und hat zur Identifizierung von Molekülen geführt, die in der Lage sind, *E.c.* SurA zu inhibieren.

1.4 Zielsetzung

Zielsetzung dieser Arbeit war es, die Voraussetzungen dafür zu schaffen, die Aktivität eines bereits vorhandenen Inhibitors für *E.c.* SurA an SurA primär aus *A.b.* und falls möglich, auch mit SurA aus *K.p.* und *P.a.* testen, um dadurch ein möglicherweise erweitertes Wirkspektrum des Inhibitors zu definieren. Dazu sollten folgende Arbeitsschritte durchgeführt werden:

1. Design von Generierung von Vektorkonstrukten für eine Überexpression von His-getaggttem SurA von *A.b.*, *K.p.* und *P.a.* in *E. coli*.
2. Etablierung und Optimierung der Überexpression und Aufreinigung von hochreinem His-SurA_{AB} und ggfs. His-SurA_{PA} durch Affinitätschromatographie im mg-Maßstab.
3. Etablierung der Assaybedingungen zur Durchführung von Aktivitätsassays mit den aufgereinigten Proteinen
4. Testung der inhibitorischen Wirkung eines bis dato nur an *E.c.* SurA getesteten SurA-Inhibitors mit SurA_{AB} und SurA_{PA}

2 Methoden und Materialien

2.1 Mikrobiologische Methoden und Materialien

2.1.1 Bakterienstämme

2.1.1.1 *Acinetobacter baumannii* AB5075

Zur Klonierung von SurA_{Ab} benutzten wir den *Acinetobacter baumannii* (*A.b.*) Stamm AB5075. Es handelt sich dabei um ein panresistentes klinisches Isolat, das 2008 von einem Patienten des U.S. militärischen Gesundheitssystems mit Osteomyelitis der Tibia isoliert worden ist. Jacobs et al. publizierte diesen Stamm 2014. Dieser zeichnet sich durch seine hohe Virulenz aus, was u.a. in einem Maus-Model für pulmonale Infektionen durch eine Mortalitätsrate von 70 % innerhalb von 48 bis 72 Stunden und eine 6-Tages Überlebensrate von 25 % gezeigt wurde. Für die Erforschung der Pathogenität von *A.b.* eigne sich dieser Stamm als repräsentativ für ein multiresistentes und hoch virulentes klinisches Isolat besonders gut [134]. Ausgehend von *A.b.* AB5075 als Parent Strain erstellten und charakterisierten Gallagher et al. (2015) eine Transposon Library [135]. Der Stamm *A.b.* AB5075 wurde von der University of Washington (Colin Manoil Lab, <https://www.gs.washington.edu/labs/manoil/baumannii.htm>) käuflich erworben. Im Weiteren wird *A.b.* AB5075 als *A.b.* bezeichnet.

2.1.1.2 *Klebsiella pneumoniae* K6 ATCC 700603

Der Referenzstamm ATCC 700603 diente uns als Quelle zur Klonierung des *Klebsiella pneumoniae* SurA. Dieser Stamm wurde als klinisches Isolat eines stationären Patienten des Medical College of Virginia (Richmond, VA) 1994 auf der Basis eines Harnwegsinfektes gewonnen (DSMZ, DSM Nr.: 26371). Dieser Stamm ist charakterisiert durch die Bildung einer Extended Spectrum β -Lactamase (ESBL). Rasheed et al. konnte eine neue SHV β -Lactamase, SHV-18, in diesem Isolat beschreiben. Zudem weist *K.p.* K6 einen Porin-Verlust von OmpK35 und OmpK37 auf [136]. Im folgenden Text wird dieser Stamm als *K.p.* bezeichnet.

2.1.1.3 *Pseudomonas aeruginosa* PA14

Der Stamm PA14 zur Klonierung von *Pseudomonas aeruginosa* SurA wurde als klinisches Isolat im Massachusetts General Hospital (F. M. Ausubel), Boston, isoliert (DSMZ, DSM Nr.: 19882). Im weiteren Text wird dieses Isolat als *P.a.* abgekürzt.

2.1.1.4 *Escherichia coli* BL21(DE3)/DH5 α

Als Expressionssystem wählten wir *Escherichia coli* BL21(DE3). Ein schnelles Wachstum und wenig Anspruch an das Nährmedium vereinfachen das Handling. Die Bezeichnung DE3 beschreibt die Anwesenheit des λ DE3 Lysogen, ein Prophage, und besitzt damit das Gen für die T7 RNA Polymerase, die für die Expression von T7 Promotoren notwendig ist [137], [138].

Zur Propagation und Plasmidvermehrung benutzten wir den Stamm *E.c.* DH5 α . Beschrieben von Hanahan, D. (1985) in „DNA cloning: a practical approach“ [139].

Tabelle 1: Verwendete Bakterienstämme

Name (Stammsammlungsnr.)	DSMZ/ATCC	Erhalten von
<i>Acinetobacter baumannii</i> AB5075 (Nr. 154)	-	University of Washington
<i>Klebsiella pneumoniae</i> K6 (Nr. 198)	DSM Nr.: 26371 ATCC 700603	DSMZ
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PA14	DSM Nr.: 19882	DSMZ
<i>Escherichia coli</i> BL21(DE3)/DH5 α	NEB-Bestellnummer C2527H	New England Biolabs (NEB)

2.1.2 Bakterienkultivierung

2.1.2.1 Lagerung von Bakterienstämmen

Die Bakterienstämme wurden zur dauerhaften Lagerung in Lysogeny Broth (LB) mit 20 % Glycerin (s. Tabelle 2) in -80 °C Gefrierschränken in der Institutseigenen Bakterienstammsammlung gelagert.

2.1.2.1.1 Herstellung von Glycerin-Stock-Kulturen

Zur Herstellung wurde das entsprechende Bakterium in 15 ml LB für 16-18 Stunden bei 37 °C \pm 1 °C in einem Erlenmeyerkolben auf einem Schüttelinkubator bei 200 rpm inkubiert. Die Bakteriensuspension wurde dann

bei 4.500 x g für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Bakterienpellet in 3 ml LB mit 20 % Glycerin resuspendiert. Die Suspension wurde auf je 1 ml in sterile Einfrierröhrchen aliquotiert und umgehend bei -80 °C gelagert.

2.1.2.2 Anzüchten von Bakterien

Zur Anzuchtung von Bakterien wurden mit einer 10 µl Plastik-Impföse etwas Material aus dem gefrorenen Glycerin-Stock in flüssiges LB (5 ml in Polystyrol Rundboden-Rundröhrchen, > 5 ml in Erlenmeyerkolben) überführt. Dem Medium wurde das entsprechende Antibiotikum (siehe Tabelle 4 und Tabelle 6), gegen das der anzuzüchtende Bakterienstamm resistent ist, in entsprechender Konzentration hinzugefügt. Die Bakterienkultur wurde dann als sogenannte Übernachtskultur (= ÜNK) für 16-18 Stunden bei einer Temperatur von 37 °C und 200 rpm auf einem Schüttelinkubator inkubiert.

2.1.2.3 Nährmedien

Tabelle 2: Flüssigmedien

LB (<u>L</u> ysogeny <u>B</u> roth)	Hefeextrakt 0,5 % (w/v) (5 g/l) Trypton 1 % (w/v) (10 g/l) Natriumchlorid (10 g/l) (nach Miller) VE-H ₂ O pH 7,0 20 Minuten bei 121 °C autoklavieren
LB mit Glycerin 20 %	LB (s.o.) + 20 % (v/v) Glycerin Steril filtriert (0,22 µm) Lagerung bei RT
TB (<u>T</u> errific <u>B</u> roth)	TB-A Hefeextrakt (24 g/l) Tryptone (12 g/l) Glycerin (4 ml/l) Auf 900 ml VE-H ₂ O 20 Minuten bei 121 °C autoklavieren TB-B K ₂ HPO ₄ 0,017 M (2,96 g/l) KH ₂ PO ₄ 0,072 M (9,8 g/l) MgSO ₄ (2 ml/l von Stock 1 M) pH 7,0 (Titration mit HCl und NaOH) Auf 100 ml VE-H ₂ O Steril filtriert (0,22 µm)

	Zur Verwendung TB-A und TB-B: 10:1 mischen
TB _{ai} (T <u>errific</u> B <u>roth</u> A <u>uto</u> i <u>nduction</u>)	TB (s.o.) + Glukose (0,5 g/l) Lactose (2 g/l)
SOC (S <u>uper</u> O <u>ptimal</u> Broth + Glu <u>co</u> se)	Hefeextrakt 0,5 % (w/v) (5 g/l) Trypton 2 % (w/v) (20 g/l) Natriumchlorid 10 mM (0,6 g/l) Kaliumchlorid 2,5 mM (0,2 g/l) Magnesiumchlorid 10 mM Magnesiumsulfat 10 mM Glukose 20 mM 20 Minuten bei 121 °C autoklavieren Lagerung bei -20 °C

Tabelle 3: Festmedien

LB-Agar	LB (siehe Tabelle 2) Agar (15 g/l) Gegebenenfalls: + Kanamycin 50 µg/ml Lagerung 4 °C
---------	---

2.1.2.4 Antibiotika

Tabelle 4: Antibiotika

Kanamycinsulfat	Lösungsmittel: destilliertes Wasser; Stock-Konzentration: 50 mg/ml; eingesetzte Konzentrationen: Übernachtskulturen: 50 µg/ml, Autoinduktionsmedien: 100 µg/ml; Stock gelagert bei -20 °C, Gebrauchsstock bei 4 °C.	AppliChem GmbH, Darmstadt
-----------------	---	------------------------------

2.1.2.5 Herstellung von chemisch kompetenten Bakterien für die Transformation

Tabelle 5: Puffer zur Herstellung chemisch kompetenter Bakterien

Puffer 1	Kaliumacetat 30 mM KCl 100 mM CaCl ₂ 10 mM MnCl ₂ 50 mM pH 5,8 [Titration mit Essigsäure] add VE-H ₂ O steril filtriert (0,22 µm)
----------	--

Puffer 2	MOPS 10 mM CaCl ₂ 15 mM KCl 10 mM 15% Glycerin add VE-H ₂ O autoklaviert
----------	---

Der gewünschte Bakterienstamm, wie z. B. *E.c.* BL21(DE3) bzw. *E.c.* DH5 α , wurde in 20 ml LB-Medium überführt und 16-18 Stunden bei 37 °C und 200 rpm auf einem Schüttelinkubator inkubiert. Von der Übernachtskultur wurden 3 ml für die Inokulation einer 150 ml-Subkultur ml in LB-Medium verwendet. Diese wurde unter o.g. Bedingungen für ca. 2,5 Stunden inkubiert, bis die OD₆₀₀ bei ~ 0,6 lag. Die Kultur wurde dann auf drei 50 ml Falcon-Röhrchen aufgeteilt und für 10 min auf Eis inkubiert. Danach folgte eine Zentrifugation für 10 min bei 4495 x g und 4 °C. Der Überstand wurde verworfen und die entstandenen Pellets wurden in 2,5 ml ‚Puffer 1‘ (siehe Tabelle 5) resuspendiert, in Falcon zusammengeführt und auf 22,5 ml mit ‚Puffer 1‘ aufgefüllt. Gefolgt von einer erneuten Zentrifugation (10 min, 4495 x g, 4 °C) und erneuter Resuspension des Pellets in 9 ml ‚Puffer 2‘ (siehe Tabelle 5). Nach einer Inkubation auf Eis von 15 min wurde die Bakteriensuspension in sterile 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäße aliquotiert (250 μ l), in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C gelagert.

2.2 Molekularbiologische Methoden und Materialien

2.2.1 Plasmide

Als Expressionssystem für die large-scale Protein-Produktion wählten wir *Escherichia coli* BL21 (DE3) (siehe 2.1.1.4). Ein geeigneter Vektor für das genannte Expressionssystem ist das Plasmid pET-28a (Novagen), ein etablierter Expressionsvektor. Die Vorteile liegen in der hohen Plasmidkopienzahl, die Möglichkeit der Autoinduktion [140] und der laborinternen Vorerfahrungen mit dem Vektorsystem im Rahmen von Proteinüberexpression. Zur affinitätschromatographischen Reinigung wurde ein C-terminaler Hexa-Histidin-Tag verwendet.

Folgende Abbildungen (Abb. 4, Abb. 6 und Abb. 5) wurden mit der Software SnapGene® erstellt.

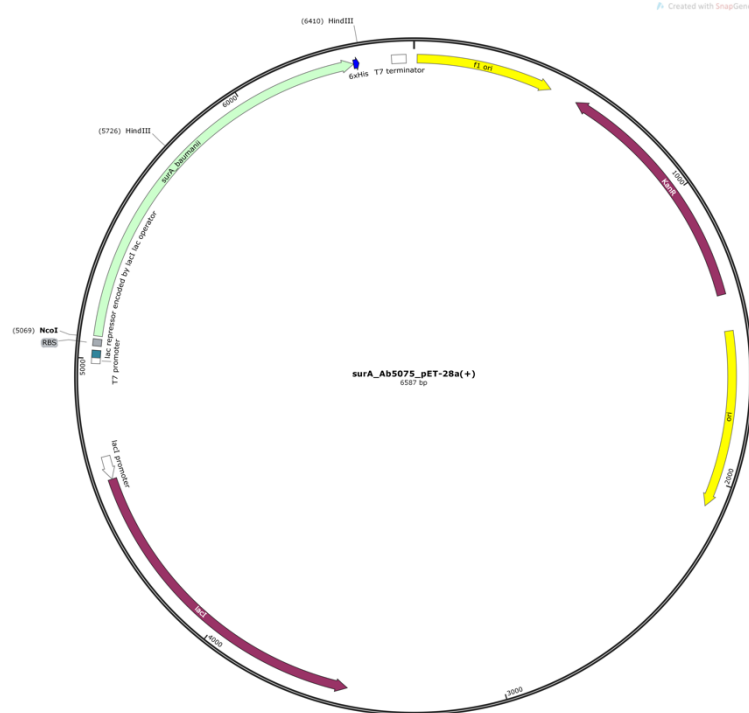


Abb. 4: Plasmidkarte surA_Ab5075_pET-28a(+)

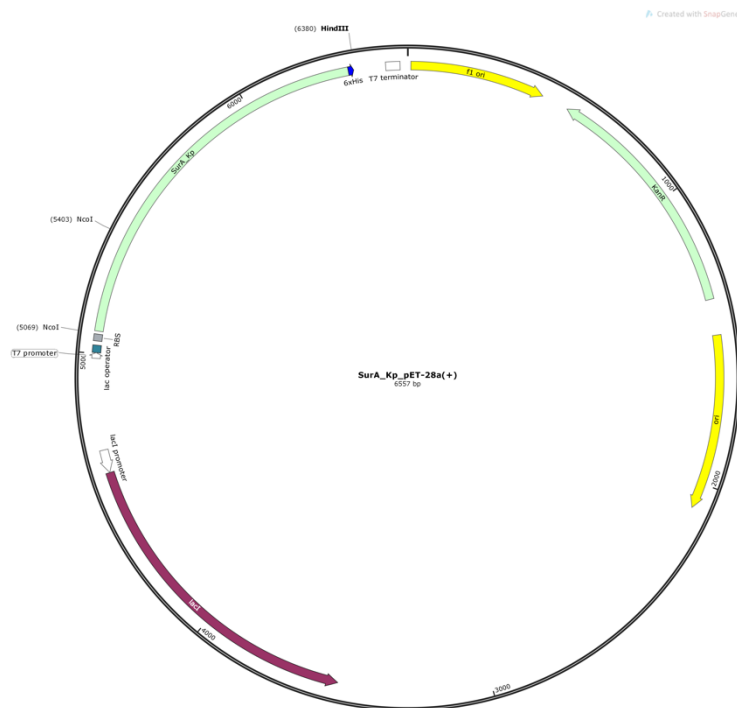


Abb. 5: Plasmidkarte surA_Kp_pET-28a(+)

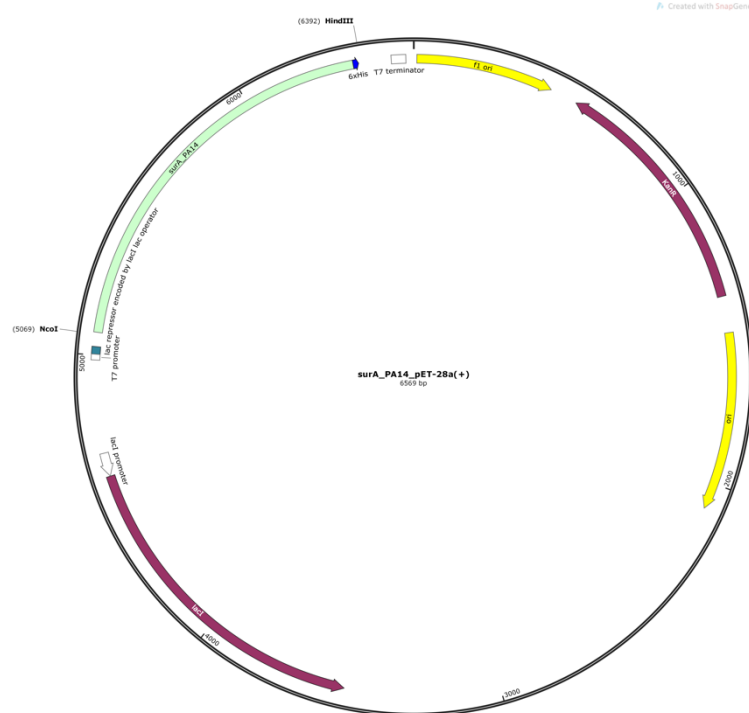


Abb. 6: Plasmidkarte surA_PA14_pET-28a(+)

Tabelle 6: Expressionsvektoren (Plasmidnamen)

Name	Größe	Selektionsmarker	Promotor	Herkunft
pET-28a	5369 bp	Kanamycin	T7-lac	Novagen
pET28a SurA AB	6587 bp	Kanamycin	T7-lac	diese Arbeit
pET28a SurA KP	6557 bp	Kanamycin	T7-lac	diese Arbeit
pET28a_SurA_Pa	6569 bp	Kanamycin	T7-lac	diese Arbeit
surA_Ab5075_pET-28a(+) (siehe Abb. 4)	6587 bp	Kanamycin	T7-lac	GenScript
SurA_Kp_pET-28a(+) (siehe Abb. 5)	6557 bp	Kanamycin	T7-lac	GenScript
SurA_PA14_pET-28a(+) (siehe Abb. 6)	6569 bp	Kanamycin	T7-lac	GenScript

Die eigenständig klonierten Expressions-Plasmide „pET28a SurA AB“, „pET28a SurA KP“ und „pET28a_SurA_Pa“ zeigten zwar eine Expression von SurA, allerdings auf sehr niedrigem Level. Auch in einem anderen Expressionssystem (*E.c. Rosetta*) kam es zu einer ungenügenden Expression des Zielproteins.

Zur Optimierung der Expression entschlossen wir uns aus später erklärten Gründen zur Beauftragung der Synthese einer für *E.c.* codon-optimierten

Gensequenz und deren Insertion in den pET-28a Expressionsvektor. Diese Synthesen und die Insertion in den Vektor wurden von der Firma GenScript durchgeführt. Die optimierten Gensequenzen sind in den folgenden Unterpunkten aufgeführt.

2.2.1.1 *surA*_Ab5075_pET-28a(+)

Durch GenScript optimierte Gensequenz von Ab5075 SurA zur Expression in *E. c.* (Länge 1345, GC-Gehalt 55,38):

```
CCATGGGAAAGACAAAGCACCTAAAGCAATTCTTCAAAGCTACAACCTCTAGCAGTTCTG
ATTAGCAGCAGCATGCACAGCTTTGCGCAGCCGACCGATGAGGTGGTTGCGATCGTGGA
CAACAGCGTTATTCTGAAGAGCGATCTGGAACAGGGTATGGCGGAGGCGGCGCATGAAC
TGCAAGCGCAGAAGAAAGAGGTGCCGCCGAGCAATACCTGCAATTCCAGGTTCTGGAT
CAGCTGATCCTGCGTCAAGCGCAGCTGGAACAAGTGAAGAAATATGGCATTAAAGCCGGA
CGAGAAAAGCCTGAACGAAGCGGTGCTGAAAGTTGCGAGCCAGAGCGGTAGCAAGAGCC
TGGAGGCGTTTCAGCAAAAACCTGGATGCGATCGCGCCGGGCACCTACGAGAACCTGCGT
AGCCGTATCGCGGAAGACCTGGCGATTAACCGTCTGCGTCAGCAACAGGTGATGAGCCG
TATCAAGATTAGCGACCAGGATGTTGACAACCTTCCTGAAAAGCCCGCAAGGTCAAGCGG
CGCTGGGTAACCAAGCGCATGTGATCCACATGCGTATTAGCGGTGATAACCCGCAAGAG
GTGCAGAACGTTGCGAAGGAAGTTCGTAGCCAACCTGGCGCAGAGCAACGACCTGAACGC
GCTGAAGAAACTGAGCACCGCGACCGTGAAAGTTGAGGGTGC GGATATGGGCTTTTCGTC
CGCTGAGCGACATTCGGCGGAACTGGCGGCGCGTATTACCCCGCTGCAAGATGGTCAG
ACCACCGACCTGATCAGCGTGCGTGACGGCGTGACGTTCTGAAGCTGCTGGAGCGTAA
ACAAAACGAACAGAAGGCGCTGGTTCGCAATATCAGACCCGTCACATCCTGATTCAGC
CGAGCGAGGTGGTTAGCCCGGAAAACGCGGAAACAAATCATTGATAGCATTTACAAGCGT
CTGAAAGCGGGTGAAGACTTTGCGACCCTGGCGGCGACCTATAGCAACGATAACGGTAG
CGCGCGTGATGGTGGCAGCCTGGGTGGGTGACCCGGGTATGATGGTTCGGAGTTTG
ATAAGAAAATGCAGGAAATCCCGGTGGGCGAGATTAGCGAACCGTTCCAAACCCAGTTT
GGCTGGCACATCCTGCAGGTTACCGATAAGCGTGAGAAAGACATGACCCACGAGTACCA
AGAACGTATGGCGCGTCAGATCCTGGGCGAGCGTCAATTCAACACCGAAATTGACAGCT
GGCTGCGTGAGGTGCGCGGAACGCGTATGTTGAAATTAAGGACCCGAGCCTGGACAAA
AGAACCCTGCAAAAGAGCGCGCACACCACCATCACCACCATTTGAAGCTT
```

Proteinsequenz:

```
GKTKHLKQFFKATTLAVLISSSMHSFAQPTDEVVAIVDNSVILKSDLEQGMAEA
AHELQAQKKEVPPQQYLQFQVLDQLILRQAQLEQVKKYGIKPDEKSLNEAVLK
VASQSGSKSLEAFQQKLDIAIPGTYENLRSRIAEDLAINRLRQQQVMSRIKISD
QDVDFNLKSPQGQAALGNQAHVIHMRISGDNPQEVQNVAKEVRSQLAQSNL
LNALKKLSTATVKVEGADMGRPLSDIPAELAARITPLQDGQTTDLISVRDGVH
VLKLLERKQNEQKALVPQYQTRHILIQPSEVVSPENAKQIIDSIIYKRLKAGEDFA
TLAATYSNDTGSARDGGSLGWVTPGMMVPEFDKMMQEIPVGEISEPFQTQFG
```

WHILQVTDKREKDMTHEYQERMARQILGERQFNTEIDSWLREVRANAYVEIK
DPSLDKKNLQKSAHHHHHH

2.2.1.2 SurA_Kp_pET-28a(+)

Durch GenScript optimierte Gensequenz von *K.p.* SurA zur Expression in *E.c.*
(Länge 1321, GC-Gehalt 57,07):

```
CCATGGGAAAGAAGACTGGAAGACACTACTACTAGGGATAGCTATGATAGCAAATACCAGC
TTTGCGGCGCCGCAGGTTGTGGATAAGGTTGCGGCGGTGGTTAACAACGGTGTGGTTCT
GGAAAGCGACGTGGATGGCTGATGCAGAGCGTTAAGCTGAACGCGGGTCAAGCGGGTC
AGCAACTGCCGGATGATGCGACCCTGCGTCACCAGATCCTGGAGCGTCTGATCATGGAC
CAAATTGTTCTGCAGATGGGTCAAAGATGGGCGTGAAAGTTAGCGACGATCAGCTGGA
CCAAGCGATCGCGAACATTGCGAAACAGAACAACATGACGATGGACCAAATGCGTAGCC
GTCTGGCGTACGAAGGTATCAACTACAACACCTATCGTAACCAGATCCGTAAGGAGATG
CTGATTAGCGAAGTGCCTAACAACGAGGTTTCGTTCGTATCACCGTGCTGCCGCAAGA
GGTTGAAGCGCTGGCGAAACAGATTGGCGACCAAACGATGCGAGCACCGAACTGAACC
TGAGCCACATCCTGATTCCGCTGCCGGAACCCGACCAGCGACCAGGTTGCGGCGGCG
CAGGAACAAGCGAACGCGATCGTGGAGCAAGCGCGTAACGGTGCGAACTTCGGCAAGCT
GGCGATTACCTATAGCGCGGATCAGCAAGCGCTGAAAGGTGGCCAGATGGGTTGGGGCC
GTATCCAAGAACTGCCGGGTATTTTCGCGCAGGCGCTGAGCACCGCGAAGAAAGGTGAC
ATCGTGGGCCCGATTTCGTAGCGGTGTTGGCTTTCACATCCTGAAGGTGAACGATCTGCG
TGGTGGCACCCAGAACATTAGCGTGACCGAGGTTTCACGCGCGTCACATCCTGCTGAAGC
CGAGCCCGATTATGAACGACGCGCAGGCGCAAGCGAAACTGGAACAGATCGCGGCGGAT
ATTAAGAGCGGTAAAACCACCTTCGCGAAAGCGGCGAAAGCGTACAGCGAGGACCCGGG
TAGCGCGAACCAGGGTGGCGATCTGGGTTGGGCGACCCCGGACATCTTCGATCCGGCGT
TTCGTGACGCGCTGATGCGTCTGAACAAAGGTCAAACCAGCGGTCCGGTTCACAGCAGC
TTCGGTTGGCACCTGATTGAACTGCTGGACAGCCGTCAGGTGGACCGTACCGATGCGGC
GCAAAGGATCGTGCATATCGTATGCTGATGAACCGTAAATTTAGCGAGGAAGCGGCGA
CCTGGATGCAGGAGCAACGTGCGAGCGCGTATGTGAAGATTCTGAGCAATAGCGCGCAT
CATCATCATCATCATTGAAGCTT
```

Proteinsequenz:

```
GKNWKTLLLLGIAMIAN TSFAAPQVVDKVA AVVNNGVVLES DVDGLMQSVKLN
AGQAGQQLPDDATLRHQILERLIMDQIVLQMGQKMGVKVSDDQLDQAIANIAK
QNNMTMDQMRSRLAYEGINYNTYRNQIRKEMLISEVRNNEVRRRITVLPQEVE
ALAKQIGDQNDASTELNLSHILIPENPTSDQVAAAQEQANAIVEQARNGANF
GKLAITYSADQQALKGGQM GWGRIQELPGIFAQALSTAKKGDIVGPIRSGVGF
HILKVNDLRGGTQNISVTEV HARHILLKPSPI MNDAQAQAKLEQIAADIKSGKTT
FAKAAKAYSEDPGSANQGGDLGWATPDIFDPAFRDALMRLNKGQTS GPVHS
SFGWHLIELLDSRQVDRTDAAQKDRAYRMLMNRKFSEEAATW MQEQRASAY
VKILSNSAHHHHHHH
```

2.2.1.3 SurA_PA14_pET-28a(+)

Durch GenScript optimierte Gensequenz von PA14 SurA zur Expression in *E.c.*
(Länge 1327, GC-Gehalt 57,45):

```
CCATGGGAAAGATAAAACTATGTAACAGGCTAAGACCCCTAGCTTTAGGGGCTGCGCTG
CTGTGCAGCTTCGCGCATGCGGAAGTGGTGCCGCTGGACCGTGTGGTTGCGATCGTGGA
CAACGATGTTATTATGCAAAGCCAGCTGGATCAACGTCTGCGTGAAGTGCACCAGACCC
TGCTGAAACGTGGTGCGCCGCTGCCGCCGAGCACGTGCTGACCCAGCAAGTTCTGGAA
CGTCTGATCATTGAGAACATCCAGCAACAGATTGGTGACCGTAGCGGCATCCGTATTAG
CGATGAGGAACTGAACCAAGCGATGGGTACCATCGCGCAGCGTAACGGCATGAGCCTGG
AACAAATTTCAAGCGGCGCTGACCCGTGATGGTCTGAGCTACGCGGATGCGCGTGAACAA
GTGCGTCGTGAGATGGTGTGATCAGCCGTGTTTCGTGACGTCGTGTTGCGGAGCGTATTCA
AGTGAGCGAGCAGGAAGTTAAGAACTTTCTGGCGAGCGACATGGGCAAAATCCAGCTGA
GCGAGGAATACCGTCTGGCGAACATCCTGATTCCGGTGCCGGAAGCGGCGAGCAGCGAT
GTTATTCAAGCGGCGGCGCGTCAAGCGCAGGAGCTGTATCAACAGCTGAAGCAGGGTGC
GGACTTTGGTTCAGCTGGCGATCAGCCGTAGCGCGGGTGATAACGCGCTGGAAGGTGGCG
AGATTGGCTGGCGTAAAGCGGCGCAACTGCCGCAGCCGTTTGACAGCATGATCGGTAGC
CTGGCGGTGGGCGATGTTACCGAACCGGTGCGTACCCCGGGTGGCTTTATCATTCTGAA
GCTGGAGGAAAACGTGGTGGCAGCAAGATGGTTCGTGACGAAGTGCACGTTTCGTACACA
TCCTGCTGAAACCGAGCGAGATTCGTAGCGAGGCGGAAACCGAGAAGCTGGCGCAAAAA
CTGTACGAACGTATCCAGAGCGGTGAAGACTTCGGCGAGCTGGCGAAGAGCTTTAGCGA
GGATCCGGGTAGCGCGCTGAACGGTGGCGACCTGAACTGGATTGATCCGGAAGCGCTGG
TGCCGGAGTTCCGTCAAGTTATGAACGATACCCCGCAGGGCGAGCTGAGCAAACCGTTC
CGTAGCCAATTTGGTGGCACATTCTGCAGGTTCTGGGCCGTGCTGCGACCGACAGCAG
CGAAAAGTTTCGTGAGCAACAGGCTGTGAGCGTTCGCGTAACCGTAAATATGATGAGG
AACTGCAGGCGTGGCTGCGTCAAATCCGTGACGAGGCGTATGTTGAAATTAACAGAGC
GCGCATCATCATCATCATTGAAGCTT
```

Proteinsequenz:

```
GKIKLCNRLRPLALGAALLCSFAHAEVVPLDRVVAIVDNDVIMQSQLDQRLREV
HQTLKRGAPLPPEHVLTTQQVLERLIENIQQQIGDRSGIRISDEELNQAMGTIA
QRNGMSLEQFQAALTRDGLSYADAREQVRREMVISRVRQRRVAERIQVSEQ
EVKNFLASDMGKIQLSEEYRLANILIPVPEAASSDVIQAAARQAQELYQQLKQG
ADFGQLAISRSAGDNALEGGEIGWRKAAQLPQPFD SMIGSLAVGDVTEPVRT
PGGFILKLEEKRGGSKMVRDEVHVRHILLKPSEIRSEAETEKLAQKLYERIQSG
EDFGELAKSFSEDPGSALNGGDLNWIDPEALVPEFRQVMNDTPQGELSKPFR
SQFGWHILQVLGRRATDSSEKFFREQQAVSVLRNRKYDEELQAWLRQIRDEAY
VEIKQSAHHHHHH
```

2.2.1.4 Plasmid-Präparation

Zur Plasmid Präparation und Isolation nutzten wir ein kommerzielles Kit (peqGOLD Plasmid Miniprep Kit II, Fa. VWR Life Science Competence Center [bis 2015 PEQLAB GmbH], Erlangen). Das Kit erzielte eine Ausbeute von 2,5-5 µg Plasmid-DNA pro ml einer Übernachtskultur, abhängig von der Plasmidkopienzahl, der Insertionsgröße, des Kulturstammes und der Kultivierungsbedingungen. Das Verfahren beruht auf einer alkalischen Lyse der Bakterien mit anschließender Filtration durch eine Silikat-Membran.

Die Suspension der lysierten Bakterien wurde auf ein Säulchen geladen, das die Silikat-Membran enthält. Unter Anwesenheit einer hohen Konzentration chaotroper Salze in der Reagenzlösung wurde die DNA an dem Silikat-Material gebunden. In den ersten Waschschrritten wurden die Zellfragmente, RNA und großfragmentige DNA abgetrennt. Weitere Waschschrritte entfernten kleinere DNA-Fragmente und Proteine. Da der letzte Waschschrritt mit einer alkoholhaltigen Lösung durchgeführt wurde, ist eine Trocknung und damit vor allem Verdampfung des Alkohols der Membran essenziell, um im letzten Schritt eine wässrige Lösung zu erhalten. In diesem letzten Schritt wurde mit VE-H₂O bzw. einem gewünschten Puffer eluiert. Anschließend erfolgte eine Konzentrationsbestimmung (siehe Tabelle 7) mittels photometrischer Messung.

Die Plasmid-Präparation erfolgte laut dem Protokoll des Herstellers aus „Arbeitsanleitung – peqGOLD Plasmid Miniprep Kit II, PEQLAB_v0815_D“, Seiten 6-8.

Die kurzfristige Lagerung der Plasmide erfolgte bei -20 °C, die langfristige Lagerung der Plasmide nach Transformation in *E.c.* DH5α bei -80°C.

2.2.2 gDNA-Präparation

Die Präparation der gDNA von *A.b.*, *K.p.* und *P.a.* (siehe 2.1.1, S. 19) erfolgte mit dem kommerziellen QIAamp® DNA Mini Kit (Fa. QIAGEN GmbH – Germany, Hilden). Das Kit ist bestimmt zur Reinigung von DNA mit bis zu 50 kb großen Fragmenten und erzielt durchschnittlich eine Ausbeute von 6 µg Gesamt-DNA. Das Vorgehen besteht aus vier wesentlichen Schritten: Lyse der Bakterien,

Bindung der DNA an eine Silikat-Membran, Waschschritte zur Entfernung von Proteinen, Nukleasen und Inhibitoren u.a., sowie Elution der gereinigten DNA.

Die Durchführung erfolgte nach dem Protokoll des Herstellers „Appendix D: Protocols für Bacteria“ (QIAamp DNA Mini and Blood Mini Handbook, 05/2016).

Da die zuvor genannte gDNA-Präparation mit QIAamp® DNA Mini Kit (s.o.) wiederholt keine erfolgreiche Amplifikation des SurA-Genabschnittes von *A.b.* und *K.p.* erzeugte, kam zur gDNA-Präparation ein weiteres Kit zum Einsatz: UltraClean® Microbial DNA Isolation Kit (Fa. MO BIO Laboratories, Inc., jetzt Fa. QIAGEN GmbH – Germany, Hilden). Im Gegensatz zum QIAamp® DNA Mini Kit wird hier eine kombinierte Lyse, mechanisch durch *Micro Beads*, chemisch u.a. durch SDS und physikalisch durch Erwärmung angewandt. Dies führt zu einer effizienteren Entfernung von Enzymen wie zellulären DNasen, die die erfolglose gDNA-Präparation durch Hydrolyse des Amplifikats erklären könnten. Der Kit wurde gemäß Herstellerangaben verwendet.

2.2.2.1 Konzentrationsbestimmung von dsDNA

Folgende Geräte wurden zur photometrischen Messung der Plasmid- und der gDNA-Konzentrationen verwendet:

Tabelle 7: Geräte, Konzentrationsmessung dsDNA

Name	Hersteller
BioPhotometer® 6131	Eppendorf AG, Hamburg
NanoDrop™ One Mikrovolumen-UV/VIS-Spektralphotometer	Thermo Scientific™

2.2.3 PCR

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) dient zur Amplifikation von definierten DNA-Abschnitten. Die Festlegung welcher Abschnitt amplifiziert werden soll, legt die Primer-Sequenz fest. Der als Matrize für die Amplifikation eingesetzte DNA-Strang wird auch als *Template* bezeichnet.

Das Prinzip der PCR startet mit einer Denaturierung der DNA-Doppelstränge (*Denaturation*) durch Erhitzung auf 95 °C. Die darauffolgende *Annealing*-Phase liegt bei einer Temperatur von etwa 5 °C unterhalb des Schmelzpunktes (T_m) der eingesetzten Primer. In dieser Phase binden die Primer im Idealfall an die

spezifische Sequenz des Templates. Die im PCR-Ansatz hinzugefügte thermostabile DNA-Polymerase führt mittels der im Reaktionsansatz beigefügten Nucleotide (dNTP) die *Elongation* von 5' nach 3' und damit eine Multiplikation des gewünschten DNA-Abschnittes durch. Die Dauer der Elongation ist abhängig von der Geschwindigkeit der DNA-Polymerase und der Länge des Amplikons. Die Reihung von Denaturierung, *Annealing* und Elongation wird i.d.R. 25-30x automatisiert im PCR-Thermocycler (C1000 Touch™ Thermal Cycler, Bio-Rad Laboratories GmbH, München) durchgeführt. Das entsprechende Programm wurde vorher einprogrammiert. Abschließend wird eine verlängerte Elongation durchgeführt, die die DNA-Polymerasen ihren letzten Schritt in voller Länge ausführen lässt. Im letzten Schritt wird das PCR-Produkt abgekühlt auf 12 °C, anschließend gelagert bei -20 °C.

Je nach Anwendung kamen zwei verschiedene DNA-Polymerasen zum Einsatz. Für die Amplifikation von spezifischen DNA-Sequenzen in Klonierungsschritten wurde die KOD Hot Start DNA-Polymerase genutzt. Diese DNA-Polymerase besitzt eine 3'-5'-Exonuclease-Aktivität, die Korrekturen von falsch eingebauten Nucleotiden vornimmt (*proofreading*). Dadurch verringert sich die Wahrscheinlichkeit eines Kopierfehlers und es werden keine TA-Überhänge erzeugt. Um lediglich die Anwesenheit von spezifischen DNA-Sequenzen in Isolaten zu überprüfen (Kolonie-PCR), wurde die Taq-Polymerase angewandt, die keine Korrekturaktivität aufweist.

Tabelle 8: Material, PCR

Name	Hersteller
dNTP	Thermo Fisher Scientific
Taq DNA Polymerase	New England Biolabs® GmbH, Frankfurt am Main
Taq Puffer	New England Biolabs® GmbH, Frankfurt am Main
KOD Hot Start DNA Polymerase	Merck KGaA, Darmstadt

2.2.3.1 Primerdesign

Die eingesetzte Software für das Design der Primer war SnapGene® Viewer Version 3.1.2. Bestellt wurden die Primer bei Sigma-Aldrich Biotechnology, jetzt Merck KGaA, Darmstadt.

Die Klonierung erfolgte mittels Gibson Assembly. Neben den Primern zur Amplifikation des Inserts sowie des Vektors, benötigte es hierzu Primer, die an das Insert Überhänge anfügt, die komplementär zum Vektor sind. Zum Verfahren siehe 2.2.4.1.

Tabelle 9: Primer

Name	Sequenz (5' nach 3' Ende), Überhang	Verwendung	Erwartete Größe des PCR Produkts (bp)	GC-Gehalt [%]	T _m -Wert [°C]
pET28a_fwd	AAGCTTGCGGCG	Öffnen des Vektors		69,2	63
pET28a_rev	CCATGGTATATCTCCTTCTTAAA	Öffnen des Vektors		34,8	58
T7term_seq_rev	TCAAGACCCGT TTAGAGG	Sequenzierung	-	50	57,7
Lacoperon_seq_fwd	AATTGTGAGCG GATAACAAT	Sequenzierung	-	35	58,5
Seq_surA- Ab_fwd2 (Seq für SurA_Ab-pet28a mitte SurA)	CTCAAAGCAAT GATTTAAACGC TCTTAAAAAGCT TTCAAC	Sequenzierung	-	32,5	74,4
New-pET28a_seq_rev	CAGCCGGATCT CAGTG	Sequenzierung	-	62,5	58,9
pET28a_surA_Abaumanii_o ver_fwd	ATTTTGTTTAAC TTTAAGAAGGA GATATACCATG GATGAAGACAA AACATCTTAAAC AG	Amplifikation des AB5075 SurA-Inserts für Gibson Assembly mit pET28a	1402	28,8	70,1
pET28a_surA_Abaumanii_o ver_rev	TGGTGGTGGTG CTCGAGTGCGG CCGCAAGCTTT CAGTGGTGGTG GTGGTGGTGAG CGCTTTTTTGTA AGTTCTTTTTGT CGAG	Amplifikation des AB5075 SurA-Inserts für Gibson Assembly mit pET28a		54,2	83,7
SurA_AB_rev2	AGCGCTTTTTT GTAAGTTCTTTT TGTCGAGG	Amplifikation des AB5075 SurA-Inserts	1314	38,7	72,4

SurA_AB_fwd 2	ATGAAGACAAA ACATCTTAAACA GTTTTTTAAAGC GACGA	Amplifikation des AB5075 SurA-Inserts		30	74,0
pET28a_surA _Kpn_fwd	ATTTTGTTTAAC TTTAAGAAGGA GATATACCATG GATGAAGAAGCT GGAAAACGC	Amplifikation des <i>K.p.</i> SurA- Inserts für Gibson Assembly mit pET28a	1376	33,3	78,3
pET28a_surA _Kpn_rev	GTGGTGGTGGT GGTGCTCGAGT GCGGCCGCAA GCTTTCAGTGG TGGTGGTGGTG GTGGTTGCTCA GAATTTTAACAT ACG	Amplifikation des <i>K.p.</i> SurA- Inserts für Gibson Assembly mit pET28a		56,3	97,3
SurA_Paerugi nosa_over_pE T_fwd	ATTTTGTTTAAC TTTAAGAAGGA GATATACCATG GATGAAGATCA AGCTATGTAAC CG	Amplifikation des <i>P.a.</i> SurA- Inserts für Gibson Assembly mit pET28a	1384	32,8	71,5
SurA_Paerugi nosa_over_pE T_rev	TGGTGGTGGTG CTCGAGTCCGG CCGCAAGCTTT CAGTGGTGGTG GTGGTGGTGAG CGCTCTGCTTG ATTTCCACGTA G	Amplifikation des <i>P.a.</i> SurA- Inserts für Gibson Assembly mit pET28a		60,3	85,7

2.2.3.2 PCR mittels KOD DNA Polymerase

Zur Amplifikation der für SurA kodierenden DNA-Sequenzen aus der extrahierten gDNA von *A.b.*, *P.a.* und *K.p.*, sowie zur Linearisierung des Vektorplasmides pET28a wurde die KOD Hot Start DNA-Polymerase genutzt.

Tabelle 10: PCR-Komponenten Amplifikation

Komponente	eingesetztes Volumen (für einen 25 µl-Ansatz)
Template-DNA (40-90 ng/µl)	0,5-1,0 µl
Fwd-Primer (10 µM)	0,5 µl
Rev-Primer (10 µM)	0,5 µl
dNTP-Mix (10 mM)	0,5 µl
KOD Hot Start DNA Polymerase (1,0 U/µl)	0,25 µl

10× KOD Buffer	2,5 µl
MgSO ₄ (25 mM)	2,0 µl
H ₂ O	17,25-17,75 µl

Tabelle 11: PCR-Protokoll Amplifikation

Temperatur	Dauer	Wiederholungen	Erklärung
95 °C	5 min	1x	Initiale Denaturierung
95 °C	30 s	25-30x	Denaturierung
T _m [Primer] - 5-10 °C	45 s		Annealing
70°C	120 s		Elongation
70°C	10 min	1x	Finale Elongation
12 °C	∞		Kühlen

2.2.3.3 Agarosegel-Elektrophorese

Tabelle 12: Materialien, Agarosegel-Elektrophorese

Name	Zusammensetzung/Hersteller
Orange G Ladepuffer	Glycerin 43,5 ml Orange G 200 mg (Fa. Merck KGaA, Darmstadt) Add 100 ml Milipore-H ₂ O Lagerung Verbrauchslösung: 4 °C
5xTBE-Puffer (Tris-Borat-EDTA-Puffer)	Tris-Base 54 g/l Borsäure 27,5 g/l EDTA 10 mM pH 8,3 (Titration mit Essigsäure) VE-H ₂ O Zur Verwendung auf 0,5xTBE-Puffer verdünnt. Lagerung: RT
Agarosegel	Agarose-Pulver 1 % (w/v) Add 0,5 % TBE-Puffer
SYBR™ Safe DNA Gel Stain (in DMSO)	Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific Inc.
GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder	Thermo Fisher Scientific Inc.

Tabelle 13: Geräte, Agarosegel-Elektrophorese

Name	Hersteller
(Wide) Mini-Sub Cell GT Systems	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
PowerPac 200	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
FastGene® FAS V Geldokumentationssystem	NIPPON Genetics Europe, Düren

Die Agarosegel-Elektrophorese stellt eine einfach anzuwendende Methode zur Auftrennung und Detektion von DNA-Fragmenten dar. Das Agarosegel wurde durch Kochen von 1 % Agarose (w/v) in 0,5 % TBE-Puffer in der Mikrowelle hergestellt und anschließend in einen Gelschlitten gegossen. Durch Einfügen eines Kammes wurde ein Gel mit Taschen hergestellt, in die man nach Erstarren des Gels, die DNA-Proben pipettieren kann. Zur Detektion der DNA wurde der Nukleinsäure-Farbstoff SYBR™ Safe DNA Gel Stain in einer Verdünnung von 1:10000 in die noch flüssige Agaroselösung gerührt, die nach Bindung an die DNA unter Blaulicht-Anregung fluoresziert. Das Agarosegel im Gelschlitten wurde in eine Elektrophorese-Kammer eingesetzt, und die Kammer mit 0,5 % TBE-Puffer aufgefüllt, bis das Gel gerade leicht bedeckt war. Die DNA-Proben, die mit Orange G Ladepuffer zur Erhöhung der Dichte vermischt wurden, wurden in die Taschen pipettiert und die Gelelektrophorese wurde bei einer konstanten Spannung von 100 Volt je nach Gelgröße für ca. 30-60 min durchgeführt.

2.2.3.4 Detektion und Dokumentation

Die Dokumentation der Gele erfolgte mit dem FAS V Geldokumentationssystem, das durch Anregung mit blauem und grünem Licht der Wellenlängen im Bereich von 470 nm bis 520 nm den Nukleinsäure-Farbstoff zum Fluoreszieren bringt. Die aufgenommenen Fotos wurden verlustfrei im TIFF-Format abgelegt. Ggf. wurden Kontrastveränderungen und Bildbeschneidungen zur verbesserten Darstellung mittels Adobe® Photoshop® CS6 Version 13.0.1 vorgenommen.

2.2.3.5 DNA-Extraktion aus Agarose-Gel

Das Wizard® SV Gel und PCR Clean-Up System Kit wurde zur Extraktion und Reinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen auf TBE-Basis benutzt. Das Kit ist für Fragmentgrößen von 100 bp bis 10 kb ausgelegt. Eine Säule hat eine Kapazität von bis zu 40 µg DNA. Nach dem Schmelzen des gewünschten Agarosegel-Stückes wird die Lösung in die Minisäule mit Silikat-Membran geladen. Die Reinigung wurde nach dem Herstellerprotokoll durchgeführt und die gereinigten DNA-Fragmente schließlich mit sterilem Aqua-dest. eluiert.

2.2.4 Klonierung

Tabelle 14: Material, Klonierung

Name	Hersteller
Gibson Assembly® Master Mix	New England Biolabs® GmbH, Frankfurt am Main
DpnI	Thermo Fisher

2.2.4.1 Gibson Assembly und DpnI-Verdau

Die Methode des Gibson Assembly verbindet mehrere überlappende doppelstrangige DNA-Fragmente in einer isothermalen Reaktion [141]. Das Prinzip beruht auf dem Design der gewünschten DNA-Fragmente mit einer überlappenden Sequenz. Die im Gibson Assembly Master Mix enthaltene 5'-Exonuclease baut das 5'-Ende ab und legt damit die Überhänge frei. Die DNA-Fragmente mit den freien 3'-Enden können sich nun komplementär aneinander anlegen (Annealing). Eine DNA-Polymerase verlängert nun vom 3'-Ende den komplementären Strang und die DNA-Ligase verknüpft schließlich die DNA-Stränge.

Um sicherzustellen, dass keine methylierte Wildtyp-DNA im Ansatz enthalten ist (was insbesondere bei der für die Linearisierung des Vektor-Backbones verwendeten Plasmid-DNA wichtig ist), wurde ein DpnI-Verdau durchgeführt. DpnI ist ein Restriktionsenzym, das nur methylierte DNA spaltet und damit eine Unterscheidung zwischen dem nicht-methylierten PCR-Produkt und der methylierten Template-DNA ermöglicht. Durch den DpnI-Verdau wird verhindert, dass nach der Transformation ein großer Anteil falsch-positiver Kolonien (also Klone, die leere Plasmide ohne das erwünschte Insert tragen) auf den Platten wächst. Für den Verdau wurde 1 µl DpnI in die Gibson Assembly Probe hinzugegeben und für eine Stunde in einem Heizblock bei 37 °C inkubiert.

Für das Assemblieren von Vektor (hier linearisiertes pET-28a) und Insert (SurA von *A.b.*, *K.p.* und *P.a.*) wurden in 10 µl des Gibson Assembly Master Mixes Insert und Vektor im Verhältnis 3:1 in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt (nach Herstellerangaben). Das Reaktionsvolumen wurde mit Braun-H₂O auf 20 µl aufgefüllt. Der Ansatz wurde daraufhin für 15 Minuten bei 50 °C im

Thermoblock inkubiert. Anschließend erfolgte die Transformation wie in 2.2.4.2 beschrieben.

2.2.4.2 Transformation

Die Transformation führten wir mit chemisch kompetenten *E.c.* Stämmen BL21(DE3) bzw. DH5 α durch. Die Herstellung der genannten chemisch kompetenten *E.c.* Stämme ist in 2.1.2.5 beschrieben.

Die Transformation des Plasmids in kompetente *E.c.* Stämme erfolgte mittels Hitzeschock. Eine etablierte Methode, deren genaue Funktionsweise noch nicht geklärt ist. 5 μ l des Gibson Assembly Ansatzes (siehe 2.2.4.1) wurden mit der Bakteriensuspension (50 μ l) zusammengefügt. Nach kurzem Mischen durch Umrühren mit Hilfe einer Pipette wurde der Ansatz für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte der Hitzeschock in einem auf 42 °C temperiertem Wasserbad für ca. 45 Sekunden. Die Bakteriensuspension wurde mit 500 μ l SOC aufgefüllt und 1 Stunde bei 37 °C inkubiert. Zuletzt wurden die Bakterien auf ein entsprechendes Selektivmedium ausplattiert und über Nacht im Inkubator bei 37 °C bebrütet. Es folgte die Kontrolle der Transformation mit einer Colony-PCR (2.2.4.3, Seite 37), um Klone zu identifizieren, die ein erfolgreich assembliertes Plasmid mit dem gewünschten Insert tragen.

2.2.4.3 Kolonie-PCR, Taq-DNA-Polymerase

Die gewählten Kolonien wurden in 20 μ l H₂O gelöst. Um die Zellen zu lysieren, wurde die Suspension für 5 Minuten bei 95 °C inkubiert und Zellfragmente für eine Minute bei 5000 rpm (Eppendorf Rotor FA-45-30-11) abzentrifugiert. Der Überstand mit der freien DNA wurde als Template eingesetzt.

Tabelle 15: PCR-Komponenten Kolonie-PCR

Komponente	Menge
Template-DNA (40-90 ng/ μ l)	1,0 μ l
Fwd-Primer (10 μ M)	1,0 μ l
Rev-Primer (10 μ M)	1,0 μ l
dNTP-Mix (10 mM)	0,5 μ l
Taq DNA Polymerase (5000 U/ml)	0,25 μ l
Taq Puffer (15 mM; inkl. MgCl ₂)	2,5 μ l
H ₂ O	13,75 μ l

Tabelle 16: PCR-Protokoll Kolonie-PCR

95 °C	5 min		Initiales Denaturieren
95 °C	30 s	25-30x wiederholt	Denaturation
T_m° [Primer] - 5-10 °C	45 s		Annealing
72 °C	120 s		Elongation
72 °C	10 min		Finale Elongation
12 °C	∞		Kühlen

2.2.5 Sequenzierungen

Zur Überprüfung von DNA-Sequenzen verwendeten wir den Sequenzierservice von GATC, jetzt Eurofins Genomics GmbH, Ebersberg bzw. dessen Sequenzierlabor Eurofins GATC in Köln.

Die Voraussetzungen für eine Sanger-Sequenzierung sind das Vorliegen von 5 μ l eines DNA-Templates mit einer Konzentration von 80 – 100 ng/ μ l für Plasmide und 20 – 80 ng/ μ l für PCR-Produkte. Die entsprechenden Primer, die eine T_m° zwischen 52 und 58 °C und eine Länge zwischen 17 – 19 bp haben sollten, wurden im Volumen von 5 μ l mit einer Konzentration von 5 μ M hinzugefügt und die Primer-Template-Mischung an Eurofins Genomics versandt.

Die eingesetzte Software zum Alignment der Sequenz war DNASTAR® Lasergene 12 MegAlign Pro (DNASTAR Inc., Madison, USA).

Tabelle 17: In die Stammsammlung eingebrachte neue Stämme

Name (Stammsammlungsnr.)	Plasmid	Resistenz	Datum
<i>E.c.</i> BL21 (DE3) pET28a SurA (Nr. 951)	pET28a SurA (ecSurA)	Kanamycin	(M. Buhl)
<i>E.c.</i> BL21(DE3) pET28a SurA PA14 (Nr. 1446)	pET28a SurA Pa	Kanamycin	02.01.2017
<i>E.c.</i> DH5 α pET28a SurA Pa (Nr. 1578)	pET28a SurA Pa	Kanamycin	17.08.2017
<i>E.c.</i> BL21(DE3) pET28a SurA Kp (Nr. 1554)	pET28a SurA Kp	Kanamycin	09.06.2017
<i>E.c.</i> DH5 α pET28a SurA Kp (Nr. 1555)	pET28a SurA Kp	Kanamycin	09.06.2017
<i>E.c.</i> BL21(DE3) pET28a SurA Ab (Nr. 1556)	pET28a SurA Ab	Kanamycin	09.06.2017
<i>E.c.</i> DH5 α pET28a SurA Ab (Nr. 1557)	pET28a SurA Ab	Kanamycin	09.06.2017

<i>E.c.</i> BL21(DE3) pET28a SurA Ab (Nr. 1596)	pET28a SurA aus Ab (GenScript)	Kanamycin	05.10.2017
<i>E.c.</i> BL21(DE3) pET28a SurA Kp (Nr. 1595)	pET28a SurA aus Kp (GenScript)	Kanamycin	05.10.2017
<i>E.c.</i> BL21(DE3) pET28a SurA PA14 (Nr. 1594)	pET28a SurA aus PA14 (GenScript)	Kanamycin	05.10.2017

2.3 Proteinbiochemische-Methoden und Materialien

2.3.1 Überexpression von Proteinen

Erste Überexpressionstestläufe wurden mittels Induktion des T7/*lac* Promoters durch IPTG durchgeführt. Unterschiedliche IPTG-Konzentrationen (2.3.1.1.1 und 0), Temperaturen (2.3.1.1.1 und 3.2.2.1) und Medien (2.3.1.1.3 und 3.2.2.4) wurden getestet. Im weiteren Verlauf wurde auch das Verfahren der Autoinduktion nach Studier et al. (2005) [140] verwendet. Hiermit wurden alle Proteine gewonnen, die für die Aktivitätsmessung (2.3.6) verwendet wurden.

2.3.1.1 Testexpressionen

Für die erste Testexpression der drei generierten Expressionskonstrukte von *A.b.*, *K.p.* und *P.a.* SurA (*E.c.* BL21(DE3), siehe Tabelle 17) wurde zunächst eine ÜNK in 5 ml LB (+ 50 µg/ml Kanamycin) angesetzt und über Nacht bei 37 °C und geschüttelt. Diese wurde dann im Verhältnis 1:100 in 50 ml LB (+50 µg/ml Kanamycin) Subkultur überführt und für 2:45 h bei 37 °C und 180 rpm inkubiert. Dieser Vorgang wurde dann ein weiteres Mal wiederholt und nach 1,5 h begonnen die OD zu messen. Ziel war eine OD von 0,4-0,5, um diese dann mit 0,5 mM IPTG zu induzieren. Für die Expression wurde 5:15 h inkubiert. Die Probennahme der nicht-induzierten und induzierten GZL erfolgte wie in 2.3.4.2 und die Lyse wie in 2.3.1.1.4 beschrieben. Die Dokumentation erfolgte wie in 2.3.4.3 und 2.3.4.4 beschrieben. Ergebnisse siehe ab 3.2.1.

2.3.1.1.1 Unterschiedliche IPTG-Konzentrationen

Die Testexpression wurde hier im Vergleich zu 2.3.1.1 bereits etwas angepasst. Die ÜNK erfolgte hier bei 27 °C in oben beschriebenem Medium. Die Subkultur erfolgte im Verhältnis 1:20 in 10 ml LB (+50 µg/ml Kanamycin). Die Induktion wurde bei OD 0,5-0,7 mittels unterschiedlicher IPTG-Konzentrationen (0,1 mM, 0,25 mM, 0,5 mM) durchgeführt und über Nacht inkubiert. Die Probennahme,

Lyse und Dokumentation erfolgten wie im vorhergehenden Abschnitt beschrieben.

2.3.1.1.2 Unterschiedliche Temperaturen

Für die Testexpressionen bei verschiedenen Temperaturen wurden bereits Expressionskonstrukte verwendet, die synthetisierte Plasmide des Dienstleisters GenScript enthielten (Tabelle 16). Hier wurden die ÜNK wie oben beschrieben durchgeführt, die Temperaturen betragen jedoch 27 °C und 37 °C. Die Expressionen wurden mit 0,1 mM induziert und bei 25 °C und 37 °C durchgeführt. Die Probennahme, Lyse und Dokumentation erfolgten wie in Abschnitt 2.3.1.1 beschrieben.

2.3.1.1.3 Testexpression mit Autoinduktionsmedium

Für die Verwendung des Autoinduktionsmedium (Tabelle 2) erfolgte eine ÜNK der kodon-optimierten Expressionskonstrukte (Tabelle 16) in 5 ml LB (+ 50 µg/ml Kanamycin) bei 27 °C. Es erfolgte eine Subkultur 1:20 in 100 ml TB_{ai} (+ 100 µg/ml Kanamycin) und wurde bei 27 °C für 23 h inkubiert. Die Probennahme, Lyse und Dokumentation erfolgten wie in Abschnitt 2.3.1.1 beschrieben.

2.3.1.1.4 Lyse Testexpressionen

Die physikalische Lyse bei kleinvolumigen Vorversuchen erfolgte durch die Anwendung von Ultraschall. Weiter auf Eis gelagert, wurden die Falcons unter die Metallsonde des Sonificators (Branson Ultrasonics™ Sonifier 250 CE) so positioniert, dass die Sonde zentral im Lumen des Falcons liegt und nicht die Falconwand berührt. Am Gerät wurde die Amplitude der Ultraschallsonde auf 7 microns (µm) eingestellt. Das stellt die maximale Ausdehnung bzw. Schwingung der Ultraschallsonde dar, die die Vibrationen in die Flüssigkeit überträgt. Jedes Falcon wurde für 15 s dem Ultraschall ausgesetzt, mit einer anschließenden Kühlungsphase von mindestens 45 s auf Eis. Insgesamt wurden bis zu 15 Zyklen durchgeführt, bis die Bakteriensuspension von einer ausgeprägten Trübung bei Durchsicht gegen eine Lichtquelle eine leichte Transparenz aufwies.

2.3.1.2 Groß skalierte Überexpression mittels Autoinduktion

Die Kultivierung von *E.c.* BL21(DE3) mit entsprechendem Plasmid-Konstrukt (siehe Tabelle 17) erfolgte in zwei Schritten. Die Vorkultur wurde in 100-125 ml LB-Flüssigmedium (siehe 2.1.2.3), versetzt mit 50 µg/ml Kanamycin, in 250 ml Erlenmeyerkolben durchgeführt. Diese Kultur wurde mit dem gewünschten Expressionsstamm aus einer bei -80 °C gelagerten Glycerinkultur angeimpft und über Nacht bei 37 °C auf einem Schüttelinkubator inkubiert. 50 ml der Übernachtskultur wurde dann in die mit 3 l TB_{ai} Medium [140] und zugesetztem Kanamycin (100 µg/ml) vorbereiteten vier 3 l Erlenmeyerkolben aufgeteilt (Verhältnis Mediummenge zu Gesamtvolumen des Erlenmeyerkolbens 1:5 für eine ausreichende Belüftung der Kultur) überführt.

Das TB_{ai} Medium (2.1.2.3) ist für Expressionsvektoren mit T7/*lac*-Promotor in *E.c.* BL21(D3) ein geeignetes Medium, um eine Autoinduktion vorzunehmen. Dem Medium ist Lactose und eine begrenzte Menge Glucose als Quelle für Kohlenstoffe hinzugefügt. Die Selbstinduktion erübrigt das spezifische Abwarten auf eine bestimmte Wachstumsdichte der Kultur. Für das Wachstum der Bakterienzellen wird zuerst die Glucose metabolisiert. In dieser Phase, bis etwa zur mittleren bis späten Wachstumsphase, bleibt die Aufnahme von Lactose gehemmt. Nachdem die Glucose aufgebraucht ist, kann Lactose aufgenommen und durch das Enzym β-Galactosidase intrazellulär in den Induktor Allolactose umgewandelt werden. Allolactose löst den *lac*-Repressor von seiner spezifischen Bindungsstelle in der DNA, den *lac*-Operatoren, und ermöglicht so die Expression von Genen, die durch den *lac*-Promotor gesteuert werden.

Die Überexpressionskultur wurde bei 28 °C auf einem Schüttelinkubator (190 rpm) für 18 h inkubiert. Zur Weiterverarbeitung wurde die Bakterienkultur auf drei 1 l Zentrifugengefäße verteilt und bei 7000 rcf (Rotor: Beckmann, J-Lite JLA 8.1000) für 15 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die drei Pellets in 25 ml *Puffer A* (Tabelle 18) resuspendiert. Die Bakteriensuspension wurde im Becherglas auf Eis für sofortige Weiterverarbeitung der Proteinreinigung gelagert.

2.3.2 Proteinreinigung

Tabelle 18: Materialien und Puffer für die Proteinreinigung

Name	Zusammensetzung/ Dosierung	Hersteller
Lysozym	1,5 mg/ml (Stock 20 mg/ml)	Sigma-Aldrich
DNase I	1 Spatelspitze	
Protease-Inhibitor (SIGMAFAST™ Proteaseinhibitor- Cocktail-Tabletten)	1 Tablette für 20 g Zellmasse in 100 ml (EDTA-frei)	
MgCl ₂	2,5 mM (Stock 1 M)	
CaCl ₂	0,5 mM (Stock 1 M)	Merck KGaA, Darmstadt
Lyse-Puffer	HEPES 40 mM (9,53 g/l) NaCl 150 mM (8,76 g/l, 58,44 g/mol) Imidazol 10 mM (pH 7,4, 5 M KOH) Aqua dest. Sterilfiltration und entgasen (Ultraschallbad)	
HEPES-Puffer/ Dialyse-Puffer	HEPES 40 mM (9,53 g/l, 238,31 g/mol) (pH 7,4) Aqua dest.	Carl Roth GmbH + Co. KG
Beladungspuffer Eluent A ÄKTA (Kurz: <i>Puffer A</i>)	HEPES 40 mM (9,53 g/l) NaCl 150 mM (8,76 g/l) (pH 7,4) Aqua dest. Sterilfiltration und entgasen (Ultraschallbad)	
Elutionspuffer Eluent B ÄKTA (Kurz: <i>Puffer B</i>)	HEPES 40 mM (9,53 g/l) NaCl 150 mM (8,76 g/l) Imidazol 500 mM (34,04 g/l; 68,08 g/mol) (pH 7,4) Aqua dest. Sterilfiltration und entgasen (Ultraschallbad)	
Amicon® Ultra-15 Centrifugal Filter Devices; 30 kDa		Merck Millipore
Dialyse-Schlauch, 14 K MWCO		Carl Roth GmbH + Co. KG
Slide-A-Lyzer® Dialysis Cassette; 20 K MWCO		Thermo Scientific

ÄKTA, (Software UNICORN 5.31)		GE HealthCare Technologies
HiLoad® 26/600 Superdex® 75 pg		GE HealthCare Technologies

2.3.2.1 Aufschluss und Ultrazentrifugation

Der Aufschluss der Bakterienzellen erfolgte durch eine kombinierte chemische und physikalische Lyse.

Für die chemische Lyse der gepoolten Bakteriensuspension wurde 1,5 mg/ml Lysozym eingesetzt. Des Weiteren wurde eine Spatelspitze DNase I hinzugefügt, um die freiwerdende DNA zu hydrolysieren. Die frei gewordenen Proteasen wurden durch den hinzugefügten Protease-Inhibitor unter Hinzugabe der nach Herstellerangaben benötigten Kofaktoren MgCl₂ (2,5 mM) und CaCl₂ (0,5 mM) inhibiert. Die Bakteriensuspension wurde dann bei 4 °C auf einem Magnetrührer langsam rührend für 45 min. inkubiert.

Bei großen Probenmengen mit 3000 ml Ausgangskulturvolumen wurde der physikalische Zellaufschluss mittels French® Press (Heinemann, Schwäbisch Gmünd) durchgeführt. In einem vorgekühlten (4 °C) Stahlzylinder wurde die Bakteriensuspension aufgesogen und unter einem Druck von 1000 psi durch eine kleine Öffnung zurück in das Falcon abgelassen. Dabei entstehen an der Auslassöffnung Scherkräfte, die die Zellen platzen lässt. Dieser Vorgang wurde pro Probe mit dazwischenliegenden Kühlungsphasen von mindestens 45 s dreimal durchführt.

Die lysierten Proben wurden anschließend zur Entfernung von großen Zelltrümmern mit 4995 x g bei 4 °C für 15 min zentrifugiert.

Der zweite Zentrifugationsschritt erfolgte mit dem Überstand bei 20.000 x g für 20 min bei 4 °C. Der Überstand wurde danach erneut in geeignete Ultrazentrifugengefäße überführt. Der dritte Zentrifugationsschritt in einer Ultrazentrifuge trennte weitere größere Zellbestandteile von den freien Proteinen. Letztere lagen dann nach einer Zentrifugation mit 42.000 rpm (Beckman Coulter Rotor 45ti) für 60 min bei 4 °C im Überstand vor. Der Überstand wurde zuletzt mit einem 0,22 µM-Filter filtriert.

2.3.2.2 Nickel-Affinitäts-Chromatografie

Für den Reinigungsschritt der His-getaggtten SurA-Proteine wurde der in 2.3.2.1 beschriebene Überstand maschinell über eine HisTrap-Ni²⁺-Affinitäts-Chromatografie-Säule bei 4 °C geführt. Hierfür wurde eine HisTrap-Säule im ersten Schritt mit dem 10-fachen Säulenvolumen Aqua dest. equilibriert. Anschließend wurde mit Puffer A das ÄKTA-System gespült. Um die Probe ins System zu geben, wurde der sogenannte Superloop mit der Proteinlösung beladen und angeschlossen. Die His-getaggtten Proteine lagern sich dann in der Säule an die Ni²⁺-NTA-Beads an. Im Weiteren wurde mit Puffer A (Tabelle 18) die Säule gespült, um unspezifisch gebundene Proteine auszuwaschen und die erste Fraktion (F2-X2; siehe Abb. 22) verworfen. Anschließend wurde zum Lösen der Proteine von den Ni²⁺-NTA-Beads die Konzentration von Puffer B (Tabelle 18) in mehreren Schritten erhöht (siehe Abb. 22) und das Eluat in Fraktionen (A1-E4) á 2,5 ml gesammelt.

Zuletzt wurde die Ni²⁺-NTA-Säule in drei Schritten gereinigt. Zuerst wurde weiter mit zwei Säulenvolumen Puffer B gespült, anschließend mit vier Säulenvolumen Aqua dest. und zuletzt mit vier Säulenvolumen 20 % Ethanol. So konnte die Säule bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C gelagert werden.

2.3.2.3 Dialyse und Aufkonzentration

Die Dialyse wurde durchgeführt, um den gewünschten pH-Wert, die Salzkonzentration und die Entfernung des Imidazols des Ni²⁺-NTA gereinigten Proteins für die Größenausschlusschromatographie zu gewährleisten. Hierzu wurden die nach der Nickel-Affinitäts-Chromatografie erhaltenen, proteinhaltigen Fraktionen vereinigt, die gereinigte Proteinlösung in ein Dialysekästchen/-schlauch (Tabelle 18) gegeben und in einen 10-Liter-Behälter mit 5 l Dialysepuffer (4 °C) (siehe Tabelle 18) überführt. Der erste Dialyseschritt erfolgte über etwa 4 Stunden bei 4 °C. Danach wurde der Dialysepuffer gegen frischen Dialysepuffer (4 °C) ausgetauscht und als zweiten Schritt über Nacht bei einer Temperatur von 4 °C, begleitet von leichtem Rühren mittels eines Magnetrührers weiter dialysiert. Am nächsten Tag wurde der Dialysepuffer verworfen und die Proteinlösung aus dem Dialysekästchen mittels Spritze und Nadel entnommen.

Der Dialyseschlauch konnte nach Öffnen direkt in ein Becherglas umgefüllt werden.

Für die nachfolgende Größenausschluss-Chromatografie wurde die Proteinlösung mittels Amicon® Ultra-15 aufkonzentriert. Dieser Zentrifugations-Filter mit 30 kDa Ausschlussgröße wurde mit der Proteinlösung von ca. 32 ml beladen und bei 4 °C mit 4500 x g für wenige Minuten zentrifugiert, bis nur noch ein Volumen von 5 ml zurückgehalten wurde.

2.3.2.4 Größenausschluss-Chromatografie

Für eine zusätzliche Reinigung der zuvor mit Ni²⁺-NTA gereinigten Proteine wurde eine Größenausschluss-Chromatographie durchgeführt. Dabei werden die Proteine durch eine Säule mit porösen Dextranpolymerperlen geführt. Kleinere Proteine dringen gelegentlich in die Poren der Perlen ein, während größere Proteine schneller durch die Säule fließen, da ihre Größe sie daran hindert, in die Poren einzudringen. Auf diese Weise können die Proteine in der Lösung nach ihrer Größe separiert werden. Nach der Größenausschluss-Chromatographie werden einzelne Fraktionen gesammelt, und diejenigen, die das gewünschte Protein enthalten, können gepoolt werden, während die übrigen Fraktionen verworfen werden können, wie folgend spezifiziert wird.

Das Gesamtsystem zur Größenausschluss-Chromatografie ist in einem großen 4 °C Kühlschrank gelagert. Die Säule zu Größenausschluss-Chromatografie wurde automatisch mit der Protein-Lösung beladen. Der Durchlauf wurde nach einem Säulenvolumen plus weitere 50 ml von Puffer A beendet.

Die Fraktionen wurden mittels Adsorption bei 280 nm am Abgabepunkt der Säule gemessen. Eine grafische Darstellung ermöglicht die Identifizierung der proteinhaltigen Fraktionen (siehe Abb. 24). Alle Fraktionen wurden zudem durch SDS-PAGE-Analysen abgebildet (20 µl Proteinfraction und 20 µl 4x Laemmli, Gelbeladung mit 7,5 µl pro Tasche). Anschließend wurden mit Interpretation der Adsorptionsgraphen (bestehend aus Spitzenpeak mit vor- und nachgehender Schulter) und der SDS-PAGE die erwünschten Fraktionen ausgewählt und gepoolt.

2.3.3 BCA-Protein-Bestimmung

Die quantitative Protein-Bestimmung erfolgte durch eine photometrische Messung mittels Bicinchoninsäure (*bicinchoninic acid*, BCA). Bei dieser Methode werden Kupferionen (Cu^{+2} zu Cu^{+1}) in einer alkalischen Lösung durch das Protein reduziert, im Sinne einer Komplexbildung des Proteins mit den Kupferionen (Biuretreaktion). Neben der makromolekularen Struktur und der Anzahl der Peptid-Bindungen, ist die Anwesenheit der Aminosäuren Cystein, Cystin, Tryptophan und Tyrosin verantwortlich für die Reduktion und damit den Farbumschlag. Denn die reduzierten Kupferionen bilden mit BCA einen violett-farbenen Komplex. Letzterer kann bei einem Adsorptionsmaximum von 562 nm photometrisch quantifiziert werden.

Für die Bestimmung kam das Thermo Scientific™ Pierce™ BCA-Protein Assay (Fa. Thermo Scientific, Pierce Biotechnology, Rockford/USA) zur Anwendung. Gemäß des Herstellerprotokolls erfolgte die Durchführung in einer 96-Well-Platte (Greiner 96 Flat). Die photometrische Quantifizierung wurde an einem Tecan Infinite F50 mit der Software Magellan for F50 V 7.0 durchgeführt.

2.3.4 Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Polyacrylamid-Gelelektrophorese, kurz SDS-PAGE (aus dem Englischen abgeleitet von *sodium dodecyl sulfate polyacrylamid gel electrophoresis*), dient zur Auftrennung nach Molekülgröße und damit der Analyse von Proteinen. Natriumdodecylsulfat (SDS) ist ein Tensid, das die Proteine denaturiert, und zwar im Sinne einer Entfaltung der Sekundär-, Tertiär- und Quartärstruktur. Dabei lagern sich die langen Kohlenstoff-Ketten der Tenside an die entfaltete Aminosäure-Kette des Proteins an und bilden eine Mizelle. Das Protein erhält dadurch eine negative Ladung, die proportional zur Größe des Proteins, und damit proportional zum Molekulargewicht, ist. Im Spannungsfeld der Elektrophorese wandern diese zur Anode.

2.3.4.1 Gelherstellung für SDS-PAGE

Die Polyacrylamid-Gele mit einer Größe von 7 x 8,3 cm wurden in einer Gießvorrichtung von Bio-Rad gegossen. Dazu wurden jeweils zwei Glasscheiben mit entsprechendem Distanzhalter von 0,75 mM Stärke eingespannt. In die so

abgeschlossene Kammer wurde nun das Trenngel hineingegossen und zum Abschluss mit wenigen μl 70 % Isoprophylalkohol überschichtet, um eine plane Oberkante zu erzeugen. Nach Abschluss der Polymerisierung bei Raumtemperatur (RT) wurde das Isopropanol entfernt und das Sammelgel auf das Trenngel gegossen. Ein entsprechender Kamm wurde zur Ausbildung von Taschen zur späteren Beladung der Proben angebracht.

Das Trenngel und das Sammelgel unterscheiden sich im Wesentlichen in der Konzentration des Acrylamids, so dass das Sammelgel grobporiger ist, es hat einen niedrigeren pH-Wert und es weist eine geringere Leitfähigkeit auf. Diese so genannte Diskontinuität führt zu einer Konzentrierung der SDS-Protein-Mizellen an der Kante zum Trenngel. Dieser Stapelungseffekt führt zur schmalen und schärferen Proteinbanden.

Tabelle 19: Zusammensetzung Sammel- und Trenngel für SDS-PAGE

	Pro Trenngel	Pro Sammelgel
	<i>für Gelgröße 7 x 8,3 cm</i>	
10 % H ₂ O Millipor	1,9 ml	1,4 ml
30 % Acrylamide mix	1,7 ml	335 μl
Tris	1,3 ml (1,5 M, pH 8,8)	250 μl (1,0 M, pH 6,8)
10 % SDS	50 μl	20 μl
10 % Ammoniumpersulfat	50 μl	20 μl
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	2 μl	2 μl
Bromphenolblau (0,1 % (w/v) in H ₂ O)	-	5 μl

Neben den beschriebenen selbst hergestellten SDS-Gelen wurden die kommerziellen Mini-Protean® TGX™ Precast Gele (Bio-Rad Laboratories GmbH, München) unterschiedlicher Acrylamidkonzentrationen oder auch Gradientengele eingesetzt. Welches Gel jeweils verwendet wurde, ist im Einzelnen bei den Abbildungen angegeben.

2.3.4.2 Probenvorbereitung für SDS-PAGE

Tabelle 20: Materialien Probenvorbereitung für SDS-PAGE

Name	Hersteller
4x Laemmli Sample Buffer	Bio-Rad Laboratories GmbH, München

Zur Probenanalyse vor und nach der Proteinreinigung, um einerseits den Expressionserfolg und andererseits die Proteinreinigung zu überprüfen, wurden die Ganzzelllysate (GZL) vor und nach der Induktion, die lysierte Probe und deren Pellet, sowie der Überstand davon mit 4x Laemmli-Puffer, wie folgt beschrieben, versetzt. Beladungen sind in 2.3.4.3 beschrieben, oder bei Abweichung davon bei der jeweiligen Abb. deklariert.

Zur Herstellung von SDS-PAGE-Samples von GZL wurde zunächst die OD₆₀₀ einer Bakteriensuspension in einer Küvette in einer Verdünnung von 1:20 (Bakterienkultur/Medium) bestimmt. 1 ml des GZL wurde in Eppendorf-Reaktionsgefäßen mit 4500 rpm (Eppendorf Rotor FA-45-30-11) für 10 min zentrifugiert. Um nun die Proben auf eine einheitliche optische Dichte von 0,1 anzupassen, wurde je nach OD₆₀₀, das Pellet in Aqua dest. und 4x Laemmli resuspendiert. Bei einer gemessenen OD₆₀₀ von 0,025, die aufgrund der o.g. Verdünnung 0,5 entspricht, wurde das Pellet beispielsweise in einem Gesamtvolumen von 50 µl (jeweils 25 µl H₂O und 25 µl 4x Laemmli) resuspendiert.

Gereinigte Proteinproben wurden 1:5 (Volumen) mit 4x Laemmli versetzt.

Anschließend wurden die Proben für 10 min bei 95 °C inkubiert, um die Proteine zu denaturieren, wie anfangs beschrieben. Zur Weiterverarbeitung wurden sie auf RT abgekühlt.

2.3.4.3 Durchführung der SDS-PAGE

Tabelle 21: Materialien zur Durchführung der SDS-PAGE

Name	Zusammensetzung/Hersteller
SDS-Lauf-Puffer (Elektrophoresepuffer; 5x)	Tris 60,55 g, Glycin 288,15 g, SDS 10 g, Aqua dest. ad 2 l
PageRuler™ Prestained Protein Ladder (10 to 180 kDa)	Thermo Scientific™

Als Standard zur Bestimmung des Molekulargewichtes wurde in die erste Tasche des Polyacrylamid-Gels 3,5 - 5 µl des Größenstandards PageRuler™ geladen. Die weiteren Taschen wurden mit 10 µl der vorbereiteten GZL-Proben bzw. 7,5 µl der gereinigten Protein-Proben mit Hilfe einer Pipette oder Hamilton-Spritze

(Mikroliter-Glas-Spritze) beladen. Das im Laemmli-Puffer enthaltene Glycerin erhöht die Dichte der Probe, so dass sie auf den Boden der Geltasche sinkt.

Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte bei einer konstanten Spannung von 100-130 V, mit einer Laufzeit von 55-75 min. Die Laufmittelfront (Bromphenolblau aus dem Laemmli-Puffer) sollte am unteren Ende des Gels noch sichtbar sein. Damit sollte gewährleistet sein, dass kein Protein aus dem Gel gelaufen ist.

2.3.4.4 Coomassie-Färbung

Zur qualitativen und semi-quantitativen Ergebnissicherung der Proteinexpression oder Überwachung von Zwischenschritten wurde das SDS-Gel mit Coomassie-Brilliant-Blau Färbelösung in einem Schritt fixiert und gefärbt. Die Inkubation mit der Färbelösung (ca. 20 ml) erfolgte in einem verschließbaren Plastikgefäß über Nacht auf einem Wipptisch. Da sich der Farbstoff nicht nur an die basischen Seitenketten der Aminosäuren anlagert, sondern auch in die Poren des SDS-Gels einlagert, musste eine Entfärbung angeschlossen werden. Die Entfärbung, d.h. die Auswaschung des nicht an die Proteine gebundenen Farbstoffes, erfolgte in einem 500 ml-Becherglas, das mit ca. 250 ml Aqua dest. gefüllt wurde. Das gefärbte Gel wurde vorsichtig dort hinein transferiert. Zur schnelleren Entfärbung wurde das Wasser nun in der Mikrowelle erhitzt, aber nicht gekocht. Das Wasser wurde dafür mehrmals ausgetauscht und erneut erhitzt. Die Dokumentation erfolgte im Fusion Solo S (VILBER LOURMAT Deutschland GmbH).

Tabelle 22: Materialien zur Coomassie-Färbung der SDS-PAGE

Name	Zusammensetzung/Hersteller
Coomassie-Brilliant-Blau Färbelösung	Brilliant-Blue R250 0,15 % (w/v; 150 mg/ 100 ml) Methanol 50 % (w/v; 50 ml/ 100ml) Eisessig 10 % (w/v; 10 ml) Aqua dest. 40 % (w/v; 40 ml)
Kolloidales Coomassie [142]	0.02 % CBB-G250 5 % Aluminiumsulfat-(14-18)-Hydrat 10 % Ethanol (96 %) 2 % ortho-Phosphorsäure (100 %)

Im Verlauf der Arbeit stellten wir im Labor die Färbung auf die Methode nach Kang et al. [143] mit kolloidalem Coomassie um. Die geringere Toxizität (da hier das Methanol durch Ethanol ersetzt wird), die geringere Einlagerung des

Farbstoffes in die SDS-Poren und die damit verbundene einfachere Entfärbung ohne Erhitzen (in Aqua dest. über Nacht) und schlussendlich ein resultierendes schärferes Bild, sowie die kürzere Färbezeit (ca. 4 h) überzeugten.

Expressionserfolg zeigte sich bei Sichtbarkeit von Banden mit dem errechneten Ziel-Molekulargewicht von 49,4 kDa bei *A.b.* SurA, 48,3 kDa bei *K.p.* SurA und 48,7 kDa bei *P.a.* SurA. Der Vergleich zwischen den GZL der nicht induzierten Probe sowie der induzierten Probe, lieferten den Hinweis auf eine erfolgreiche Überexpression des jeweiligen SurA. Des Weiteren erlaubte die Auswertung ein Urteil über die Reinheit der Proteinfractionen.

2.3.5 Western-Blot

Der Western-Blot diente zur weiteren Spezifizierung der Proteine, die in der SDS-PAGE aufgetrennt wurden. Dazu wurden die Proteine elektrophoretisch aus dem Polyacrylamid-Gel auf eine adsorbierende Nitrozellulose-Membran transferiert, die dort aufgrund von hydrophoben Wechselwirkungen gehalten werden. Die Detektion erfolgt mittels spezifischer Antikörper, die an bestimmte Epitope eines Proteins binden können. Diese Bindung kann durch einen sekundären Antikörper, der meist an ein Enzym (alkalische Phosphatase oder Meerrettich-Peroxidase), oder direkt an ein Fluorophor gekoppelt ist, sichtbar gemacht werden.

2.3.5.1 Blot-Bedingungen

Tabelle 23: Geräte, Materialien und Puffer für Western-Blot

Name	Zusammensetzung/Hersteller
Mini-PROTEAN® Tetra Cell	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Amersham™ Protran™ Supported Nitrozellulose, PT 0.45 µM	GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg
Filterpapier Whatman	GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg
Blot-Puffer	Tris 25 mM (3,03 g/l) Glycin 150 mM Methanol 20 % (w/v) Einstellung auf pH 8,3

Die Durchführung des Western Blots erfolgte in einer Mini-PROTEAN® Tetra Cell. Alle folgenden Materialien wurden mit Blot-Puffer getränkt. In die

entsprechende Vorrichtung wurde das Polyacrylamid-Gel im Sandwich-Prinzip auf eine Nitrozellulose-Membran gelegt. Beide Seiten wurden als nächstes mit einem Filterpapier versehen, danach jeweils mit einem Schwamm bedeckt. Anschließend konnte die Vorrichtung zusammengepresst werden und mit der Membran zur Anode in die Mini-PROTEAN® Tetra Cell eingehängt werden. Letztere wurde mit Blot-Puffer gefüllt, ein Eis-Block hineingehängt und mitsamt einem Rührfisch auf einen Magnetrührer gestellt. Der Magnetrührer dient mit niedriger Drehzahl zur Umwälzung des Puffers, damit die Temperatur in der Tetra Cell gleichmäßig bleibt. Der Transfer erfolgte bei einer konstanten Stromstärke von 300 mA über 60 Minuten. Der Eisblock wurde nach 30 min gewechselt.

2.3.5.2 Ponceau-Rouge Färbung

Zur Überprüfung, ob der elektrophoretische Transfer der Proteine vom Polyacrylamid-Gel auf die Nitrozellulose-Membran erfolgreich war, wurde eine Ponceau-Rouge Färbung durchgeführt.

Tabelle 24: Materialien Ponceau-Rouge Färbung

Name	Zusammensetzung	Hersteller
Ponceau-Rouge Färbung	Ponceau S 0,5 % (w/v)	AppliChem GmbH, Darmstadt
	Essigsäure 1 %	Merck KGaA, Darmstadt

Der Farbstoff Ponceau S ist wasserlöslich, bindet reversibel an die positiv geladenen funktionellen Gruppen der primären Amine der Proteine und interferiert nicht mit dem anschließenden immunologischen Nachweis. Die Nitrozellulose-Membran wurde mit der Ponceau-Rouge Färbelösung für 2 min bei RT auf dem Wipptisch inkubiert. Die überschüssige nicht gebundene Färbelösung wurde mit Aqua dest. vorsichtig abgespült, bis die rötlichen Banden ausreichend kontrastiert sichtbar waren. Nach der Dokumentation mit dem Fusion Solo S, wurde die Membran intensiv mit Aqua dest. gewaschen, bis keine Farbschlieren mehr zu sehen waren (Methodendurchführung nach QIAexpress® Detection and Assay Handbook, Third Edition, October 2002, QIAGEN GmbH, Hilden).

2.3.5.3 Immunologischer Nachweis (Primär- und Sekundärantikörper)

Waren Proteine durch die Ponceau-Rouge Färbung nachweisbar, wurde im Anschluss ein immunologischer Nachweis der Zielproteine durchgeführt. Die exprimierten Proteine besitzen für die Nickel-Affinitäts-Chromatografie ein 6xHis-Tag, wie bereits beschrieben. Dieses 6xHis-Tag wurde zusätzlich als Ziel-Epitop für die Detektion mittels anti-6xHis-Antikörpern benutzt.

Tabelle 25: Materialien und Puffer für Western-Blot

Name	Zusammensetzung/Hersteller
TBS-Puffer	Tris 10 mM, pH 7,5 (1,21 g/l) NaCl 150 mM (8,76 g/l)
TBS-Tween/Triton Puffer	Tris 20 mM, pH 7,5 (2,42 g/l) NaCl 500 mM (29,2 g/l) Tween 20 0,05% (v/v; 500 µl/L) Triton X-100 0,2% (v/v; 2 ml/L)
Blocking-Puffer	TBS-Puffer mit 3% (w/v) BSA
TBS-Puffer für Sekundärantikörper	TBS-Puffer mit 10 % (w/v) Milchpulver
Clarity™ Western ECL Substrate	Bio-Rad Laboratories GmbH, München

Im ersten Schritt wurden zunächst die nicht besetzten Proteinbindungsstellen der Nitrozellulosemembran abgesättigt. Dafür wurde die Membran bei RT für 1 h mit 5 ml Blocking-Puffer inkubiert. Das enthaltene bovine Serum-Albumin bindet an die freien Stellen auf der Membran. Die Inkubation wurde entweder in einem Falcon rollend oder in einem flachen Glasreaktionsgefäß, das auf einem Wipptisch positioniert wurde, durchgeführt. Nach zwei Waschschritten mit 5 ml TBS-Tween/Triton Puffer und einem Waschschrift mit 5 ml TBS-Puffer für je 10 min bei RT, wurde die Membran mit einem anti-6xHis-Antikörper (Maus) in einer Verdünnung von 1:1000 in TBS-Puffer mit 3 % (w/v) BSA über Nacht bei 4 °C oder 1 h bei RT inkubiert. Es folgten erneut zwei Waschrritte mit 5 ml TBS-Tween/Triton Puffer und einem Waschschrift mit 5 ml TBS-Puffer für je 10 min bei RT. Nach Entfernung der nicht gebundenen Erst-Antikörper, wurde ein anti-Maus-Antikörper verwendet, der mit einer Meerrettich-Peroxidase (HRP) gekoppelt ist, die für die Detektion verwendet wird. Die Inkubation mit dem anti-Maus-HRP-Antikörper (Goat) wurde in einer Verdünnung von 1:10.000 in TBS-Puffer mit 10 % (w/v) Milchpulver über 1 h bei RT durchgeführt. Das hinzugefügte

Milchpulver soll hier verhindern, dass durch längere Inkubationsschritte in protein-freiem Puffer wieder Bindestellen freigewaschen werden, an die dann der Antikörper unspezifisch bindet und damit ein starkes Hintergrundsignal verursacht. Vor der Detektion werden drei Waschschriffe mit TBS-Tween/Triton Puffer jeweils über 10 min bei RT durchgeführt.

Die Detektion erfolgte mittels Chemilumineszenz. Dazu kam das Kit Clarity™ Western ECL-Substrate von Bio-Rad zum Einsatz. Die Anwendung erfolgte laut Herstellerangaben. In diesem Verfahren wird Luminol in Anwesenheit von H₂O₂ durch die HRP oxidiert und es kommt zu einer Lichtemission, die mit dem Fusion Solo S dokumentiert wurde.

2.3.6 Luciferase-Assay

Zur Messung der Aktivität von SurA wurde ein in der Arbeitsgruppe etablierter *in vitro* Luciferase-basierter Aktivitäts-Assay angewandt. Der Test nutzt das Prinzip der Holdase-Funktion von SurA, welche Substrate in ungefaltetem Zustand stabil hält.

Tabelle 26: Materialien und Geräte Luciferase-Assay

Name	Zusammensetzung/Hersteller
Minimal Puffer	HEPES 50 mM MgSO ₄ 20 mM BSA 0,5 g/l (Fa. Biomol) (pH 7,4, mit 5 M KOH) sterilfiltriert
Luciferase (QuantiLum® Recombinant Luciferase)	Promega, US
Luciferase working solution	10 nM Luciferase in Minimal Puffer
Luciferin (Beetle Luciferin), 10 mM	Promega, US
Luciferin working solution	ATP-Lösung 300 µM Luciferin VE-H ₂ O
Compound 3976-0101, „Medozin“	
ATP Lösung, 20 mM	Sigma Aldrich
DMSO (Dimethylsulfoxid), Rotipuran	Carl Roth GmbH + Co. KG
Wasser, Ampuwa®	Fresenius Kabi AG, Bad Homburg
Viaflo elektronische Multikanalpipette	INTEGRA
Viaflo 384 base unit	INTEGRA
- 384-Kanal-Kopf, 0.5-12.5 µl	INTEGRA
- 96-Kanal-Kopf, 0.5-12.5 µl	INTEGRA

iEMS Shaker/Incubator	Thermo Fisher Scientific
Tecan Infinite® M200pro; Software: i-controll v1.11	Tecan Trading AG, Switzerland
384 Well Platte, PS, F-Bottom, White	Greiner Bio-one
96 Well Platte, PP, V-Bottom	Greiner Bio-one
Silverseal, Aluminium	Greiner Bio-one
GraphPad Prism Version 9.4.1	GraphPad Software

Luciferase dient hier als Substrat und zeigt entfaltet keine Lumineszenz. Wie in der schematischen Darstellung in Abb. 7 zu sehen ist, wird zuerst die Luciferase bei niedriger Temperatur (38 °C) entfaltet (*Step 1*). Im zweiten Schritt wird die entfaltete Luciferase von aktivem SurA gebunden und verhindert dadurch deren Rückfaltung. Somit zeigt sich kein Lumineszenz-Signal, wie im *Step 2* oben, zu sehen ist. Ist hingegen das SurA inaktiv oder inhibiert, so kann sich die Luciferase zurückfalten und ein Lumineszenz-Signal kann gemessen werden (*Step 2*, unten), das durch die Umwandlung von Luciferin in Oxyluciferin unter Verbrauch von ATP entsteht.

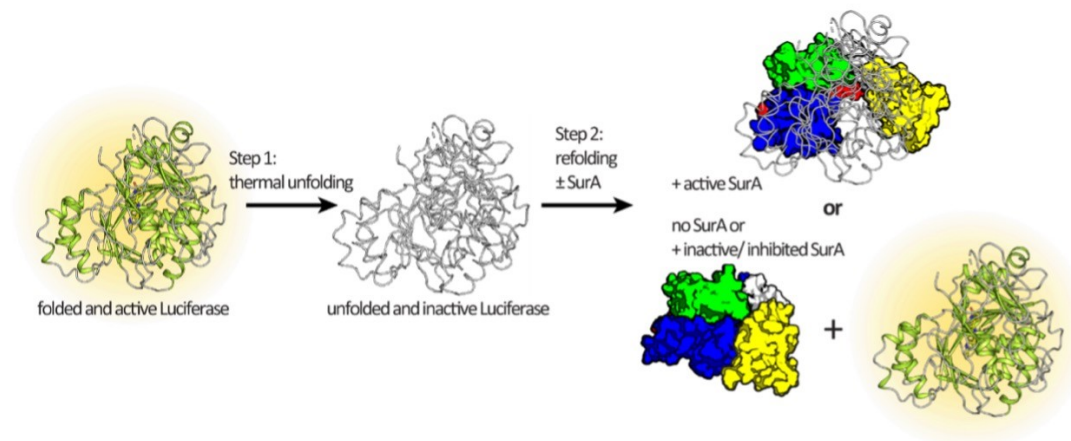


Abb. 7: Der Luciferase-Assay misst die Lumineszenz, die von gefalteter und damit aktiver Luciferase emittiert wird. Das Prinzip beruht auf der Holdase-Funktion von SurA, das die entfaltete Luciferase in einem inaktiven Zustand gebunden hält. Die Luciferase enthält Peptidmotive, die auch in OMPs vorkommen, und wird daher von SurA als Substrat erkannt. Ist inaktives SurA vorhanden, kann die Luciferase nicht gebunden werden, faltet sich zurück und emittiert Licht. (Darstellung erstellt von Fabian Renschler)

Wird ein wirksamer SurA-Inhibitor hinzugeführt, so wird die Aktivität von SurA reduziert, und die Luciferase kann nicht mehr gebunden werden. Somit bedeutet ein erhöhtes Lumineszenzsignal ein effektives Binden von funktionellen SurA-Inhibitoren an SurA. Der Assay bietet auch die Möglichkeit der Überprüfung der Funktionalität von SurA. SurA mit ausreichender Aktivität ist in der Lage, Luciferase zu binden und somit die Lumineszenz zu verringern. Ist die Aktivität

herabgesetzt oder nicht gegeben, ist das SurA nicht in der Lage, die Luciferase zu binden und das Lumineszenzsignal ist nur geringfügig verringert oder es ist ein hohes Lumineszenzsignal messbar.

Die Verbindung „Medozin“ (Compound 3976-0101) wurde zur Herstellung der Medozin-Stammlösung in DMSO gelöst. Anschließend wurden 90 µl der Medozin-Stammlösung (50 mM in DMSO) mit 4410 µl DMSO gemischt, um 4,5 ml einer 1 mM Medozin-Lösung bereitzustellen. Im zweiten Schritt erfolgte eine Verdünnung der 1 mM Medozin-Lösung, indem 500 µl davon mit 3500 µl DMSO gemischt wurden, um eine Endkonzentration von 125 µM zu erhalten. Anschließend wurden 50 µl DMSO in die Wells der Spalten 5-6 und 11-12 einer 96-Well-PP-V-Boden-Platte gegeben. Die Wells der Spalten 1-2 und 7-8 erhielten jeweils 50 µl der 1 mM Medozin-Lösung, während die Spalten 3-4 und 9-10 mit 50 µl der 125 µM Medozin-Lösung gefüllt wurden. Danach wurden die verdünnten Lösungen von der 96-Well-Platte in eine 384-Well-PP-V-Bodenplatte übertragen. Hierzu wurden beide Platten in einen Viaflo 384 eingesetzt, ausgestattet mit einem 96 x 12,5 µl-Kopf, und es wurden viermal 11 µl aus jeder Vertiefung der 96-Well-Platte in die 384-Well-Platte übertragen, die 96er-Platte also 4x mit einem Volumen von je 11 µl pro Well auf der 384er-Platte abgebildet.

Nach der Verdünnung des Compounds mussten die weiteren Lösungen für den Assay vorbereitet werden. Eine Luciferase-Working Solution wurde durch Verdünnen von 1 ml Aliquots, die 100 nM Luciferase in Minimalpuffer enthielten, mit 9 ml Minimalpuffer auf eine Konzentration von 10 nM eingestellt. Zusätzlich wurden 300 µl Luciferin (10 mM) mit 10 ml ATP-Lösung (20 mM) vermischt, um eine Luciferin-Working Solution herzustellen.

Um die *in-vitro*-Aktivität zu testen, musste das zuvor hergestellte SurA durch Hitzeeinwirkung aktiviert werden, da gereinigtes SurA in seiner ursprünglichen Form keine Aktivität zeigt. Hierfür wurden Aliquots von SurA (68-100 µM) für 30 Minuten bei 45-65 °C inkubiert (Aktivierungstemperatur). Ein Aliquot diente als Kontrolle und wurde bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Aliquots für 10 Minuten auf Raumtemperatur abgekühlt. Die Proben wurden dann mit Minimalpuffer auf eine Endkonzentration von 1,6 µM verdünnt.

Die 384-Well-Platte wurde anschließend in den Tecan Platten-Reader platziert. Das Protokoll enthält initial einen 10-minütigen Inkubationsschritt zur Temperatur-Äquilibration auf Raumtemperatur. Anschließend wird der Reihe nach, die Lumineszenz in einem Well gemessen, automatisch 10 µl Luciferin Working Solution injiziert und direkt danach erneut die Lumineszenz gemessen. Die im zweiten Messintervall gemessene Lumineszenz ist ein Maß für die Luciferaseaktivität und steht invers zur SurA-Aktivität wie oben beschrieben.

Statistische Auswertung und grafische Darstellungen der Aktivitätsassays erfolgten mit GraphPad Prism (Tabelle 26).

3 Ergebnisse

3.1 Klonierung von Vektoren zur Überexpression von SurA aus *A. baumannii*, *P. aeruginosa* und *K. pneumoniae*

Die SurA-Überexpressionskonstrukte wurden auf der Grundlage des Hochexpressionsplasmids pET-28a entworfen. Dieses wurde zur weiteren Verwendung mit den in Tabelle 9 beschriebenen Primern linearisiert. Die kodierenden Sequenzen wurden mittels Gibson-Assembly wie folgt integriert.

3.1.1 Amplifikation der kodierenden Sequenzen von *A.b.*, *P.a.* und *K.p.* SurA aus genomischer DNA

Aus den Stämmen *A.b.* AB5075, *P.a.* PA14 und *K.p.* ATCC 700603 (siehe 2.1.1) wurde die SurA kodierende Sequenz von der gDNA (siehe 2.2.2) mittels PCR (siehe 2.2.3.2 und Primer: Tabelle 9) amplifiziert (Abb. 9).

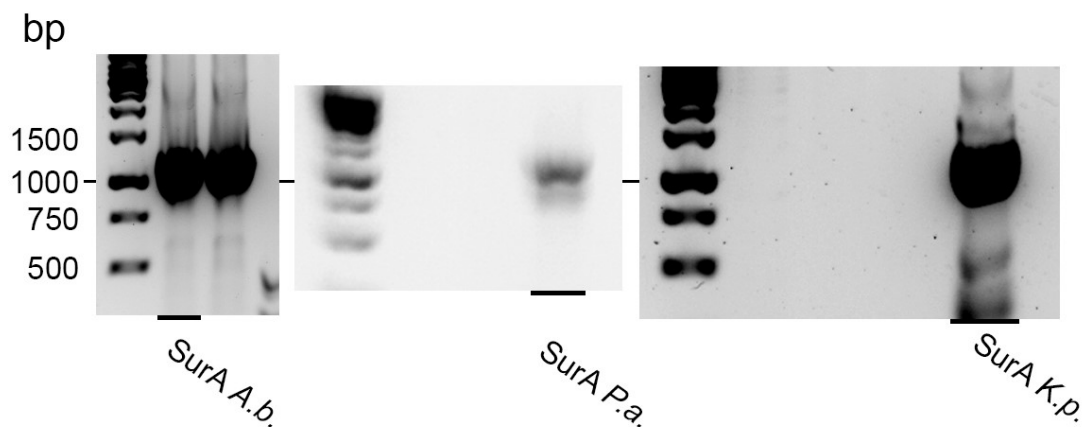


Abb. 9: Agarose-Gel der Amplifikation der kodierenden Sequenzen von *A.b.*, *P.a.* und *K.p.* Die erwarteten Bandengröße der jeweils gekennzeichneten Amplifikate sind 1402 bp (*A.b.*), 1384 bp (*P.a.*) und 1376 bp (*K.p.*). Zur Orientierung ist eine durchgehende Linie auf der Höhe des Markers von 1000 bp eingezeichnet.

Die gezeigten PCR-Produkte von SurA aus *A.b.*, *P.a.* und *K.p.* (mit der erwarteten Größe, wie in der Abb. 9 angegeben) wurden danach über Gibson Assembly (siehe 2.2.4.1) in das zuvor durch PCR eröffnete Plasmid pET-28a integriert (siehe 2.2.3.2) und anschließend in *E.c.* DH5 α und BL21(D3) transformiert (siehe 2.2.4.2).

3.1.2 Identifizierung und Verifizierung erfolgreich assemblierter Plasmide über Kolonie-PCR

3.1.2.1 *A.b.* AB5075

Nach der Transformation des Gibson-Assembly-Ansatzes wurden einige der auf dem Selektionsmedium gewachsenen Kolonien in einer Kolonie-PCR daraufhin überprüft, ob das in der Kolonie enthaltene Plasmid auch das gewünschte Insert enthält. Dazu wurden Primer verwendet, die im Plasmid binden und das Insert flankieren. So erhält man nach erfolgreicher Assemblierung ein PCR-Produkt von etwa 1500 bp (Abb. 9).

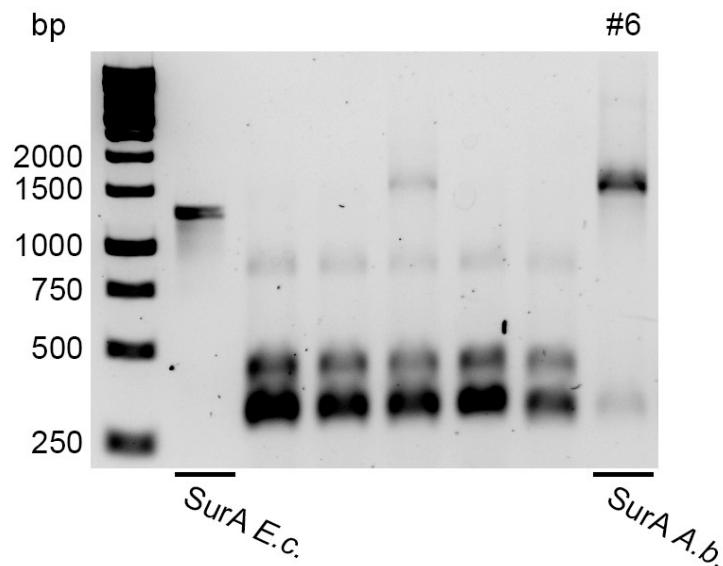


Abb. 10: Kolonie-PCR der Transformation von *E.c.* DH5 α pET28a SurA AB (siehe Tabelle 17). Klon #6 lieferte ein PCR-Produkt mit der erwarteten Größe von 1547 bp. In Spalte 1 neben dem Marker wurde das Expressionsplasmid pET28a SurA *E.c.* (Expression von SurA_{E.c.}) zur Kontrolle der Kolonie-PCR-Primer (Tabelle 9) mitgeführt.

In der Kolonie-PCR der Transformation von *E.c.* DH5 α pET28a SurA AB (in die Stammsammlung eingebrachter Stamm: siehe Tabelle 17) zeigte sich der Klon #6 mit richtiger Bandenhöhe von 1547 bp von insgesamt 12 kontrollierten Kolonien. Um sicherzustellen, dass das SurA-*A.b.*-Insert im Plasmid korrekt assembliert wurde und keinen Fehler in der Sequenz enthält, wurde eine Sequenzierung des Plasmides durchgeführt (FASTA und Chromatogramm im Anhang 8.1.1), die keine Abweichungen zur erwarteten Sequenz zeigte.

Anschließend wurde das verifizierte Plasmid ‚pET28a SurA Ab‘ in den Expressionsstamm *E.c.* BL21(D3) transformiert und in die Stammsammlung eingebracht (Tabelle 17).

3.1.2.2 *P.a.* PA14

Von den auf den Selektivplatten gewachsenen Klonen für die Transformation von pET28a_SurA PA14 wurden 17 Kolonien (*E.c.* DH5 α) und 10 Kolonien (*E.c.* BL21(D3)) ausgewählt, auf frische Platten replika-plattiert und in einer Kolonie-PCR (siehe 2.2.4.3) überprüft, ob die Insertion erfolgreich war (Abb. 11). Die Transformation in *E.c.* BL21(D3) war nicht erfolgreich und ist hier nicht abgebildet.

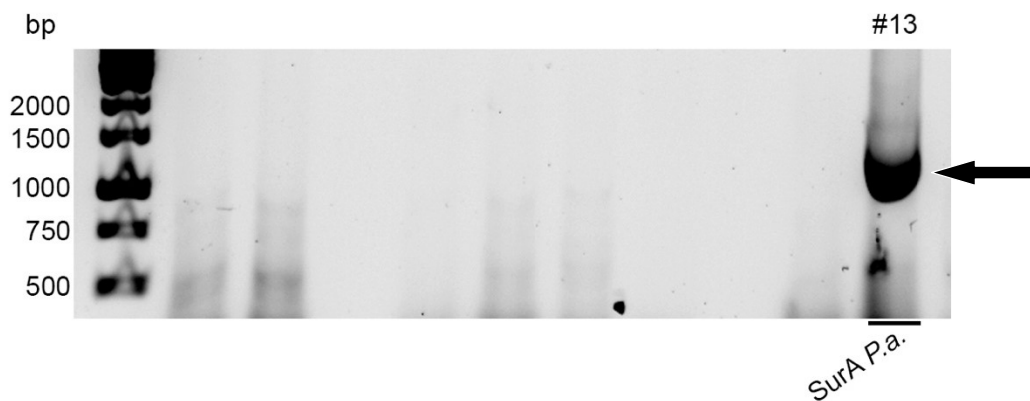


Abb. 11: Kolonie-PCR von *E.c.* DH5 α pET28a_SurA-PA14 Die erwartete Größe des PCR-Produktes bei erfolgreichem Assembly beträgt 1529 bp. Klon 13 liefert ein PCR-Produkt der erwarteten Größe.

Vom ausgewählten Klon #13 (*E.c.* DH5 α) wurde eine ÜNK angesetzt, Plasmid isoliert und für eine Sanger-Sequenzierung zu GATC versendet (Primer: Tabelle 9). Es wurde stets das gesamte Insert sequenziert. Die fehlerfreien Sequenzdaten sind im Anhang dieser Arbeit verfügbar (FASTA und Chromatogramm im Anhang 8.1.2).

3.1.2.3 *K.p.* ATCC 700603

Wie in den beiden vorangegangenen Abschnitten beschrieben, wurde auch für *E.c.* DH5 α pET28a SurA Kp eine Kolonie-PCR durchgeführt (Abb. 12).

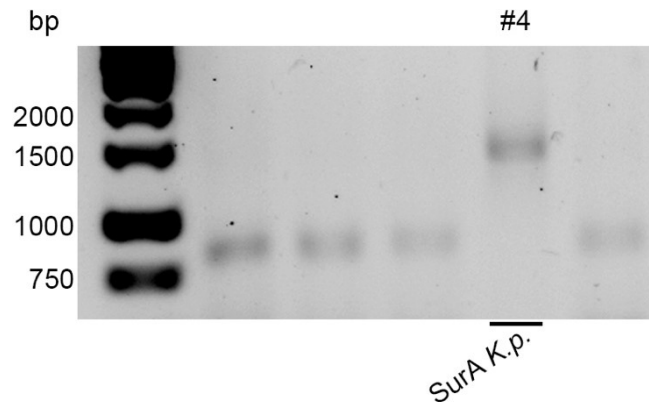


Abb. 12: Kolonie-PCR von E.c. DH5 α pET28a SurA KP (siehe Tabelle 17). Klon #4 liefert ein PCR-Produkt mit der erwarteten Größe von 1517 bp.

Von den 16 überprüften Kolonien zeigte sich Klon #4 mit der erwarteten PCR-Produkt-Größe von 1517 bp. Die Sequenzierung zeigte keine Fehler in der Sequenz auf und ist im Anhang zu finden (FASTA und Chromatogramm im Anhang 8.1.3).

3.2 Optimierung der Expressionsbedingungen

3.2.1 Testexpression mit den generierten Plasmiden

Um die Proteinexpression mit den generierten Konstrukten zu etablieren und optimieren, wurde eine Testexpression, wie unter 2.3.1.1 beschrieben, durchgeführt (Abb. 13).

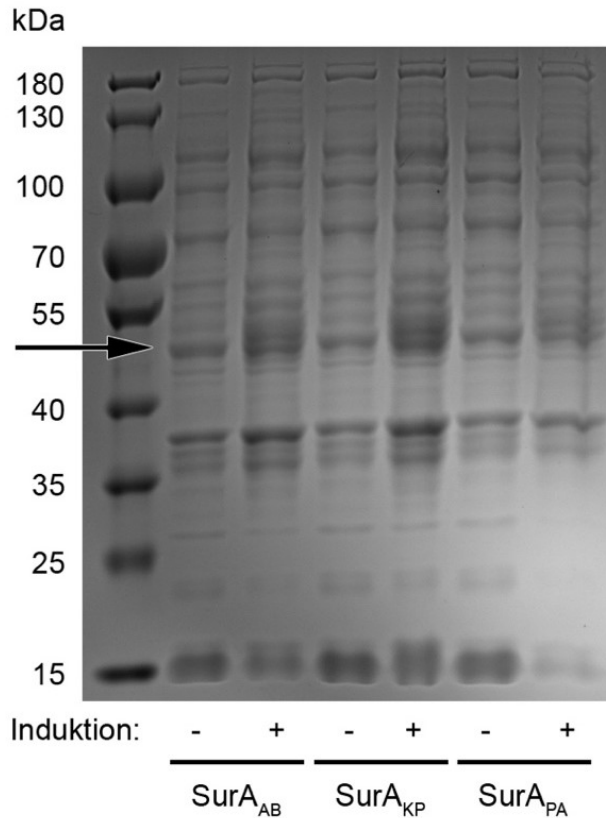


Abb. 13: Testexpression mit den Konstrukten pET28a_SurA-A.b., K.p. und P.a. in E.c. BL21(D3). Coomassie-gefärbtes SDS-Gel, beladen mit 10 µl GZL pro Spur, hergestellt aus Bakterien, welche jeweils vor und nach Induktion der Proteinexpression mit 0,5 mM IPTG, aus der Kultur entnommen wurden. Pro Spur wurde jeweils die gleiche Menge an Bakterien beladen.

Zu sehen ist eine schwache Induktion der SurA-Expression bei *A.b.* (erwartete Größe 49,4 kDa) und *K.p.* (48,3 kDa), nicht jedoch bei *P.a.* (48,7 kDa). Auch eine Erhöhung der in dieser Arbeit nicht abgebildete Induktorkonzentrationen von 1,0 mM brachten keinen wesentlichen Effekt. Daher sollte in einem nächsten Schritt die Expression verbessert werden.

3.2.1.1 Unterschiedliche IPTG Konzentrationen

Da eine erste Testexpression mit 0,5 mM IPTG nur eine schwache bzw. keine Expression ergab, sollte die Induktorkonzentration titriert und damit optimiert werden. Dazu wurden verschiedene Expressionsansätze parallel, aber mit verschiedenen Induktorkonzentrationen durchgeführt und verglichen (Abb. 14).

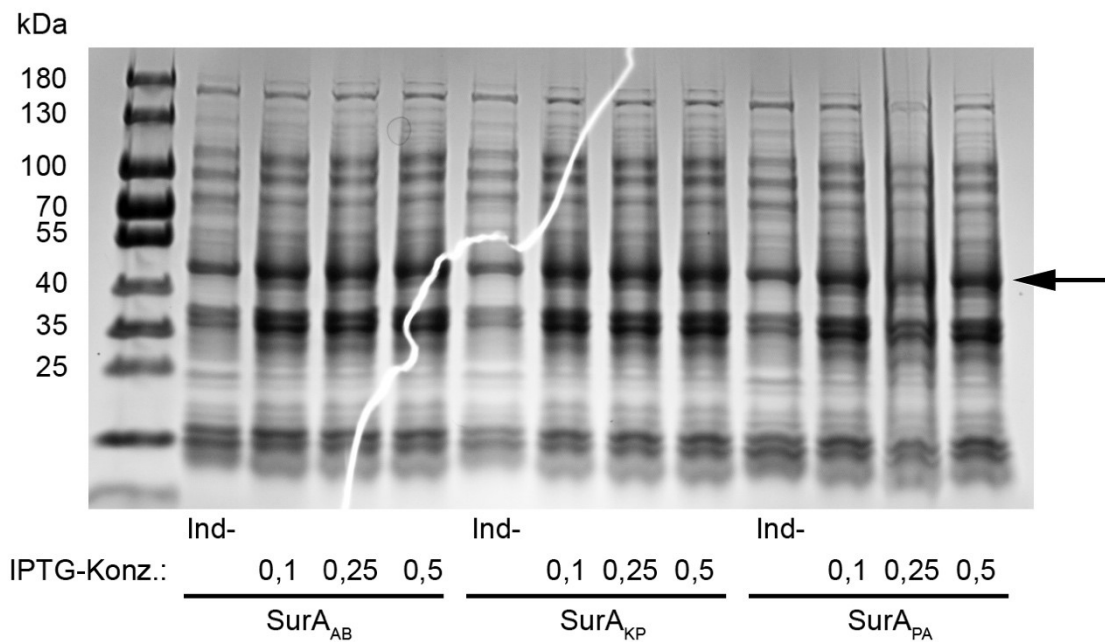


Abb. 14: Testexpression von *A.b.*, *K.p.* und *P.a.* SurA mit *E.c.* BL21(D3). SDS-PAGE, Comassie gefärbt mit Darstellung der GZL vor und nach Induktion der Kulturen mit unterschiedlichen IPTG-Konzentrationen, jeweils an die OD angepasst.

Zu sehen ist eine schwache Induktion aller Konstrukte (*A.b.*: erwartete Größe 49,4 kDa. *K.p.*: 48,3 kDa. *P.a.*: 48,7 kDa), aber keine wesentlichen Unterschiede in Hinblick auf die Konzentration von IPTG. In einem weiteren Versuch sollte daher geklärt werden, ob die Verwendung eines für die Proteinüberexpression, auch mittels T7 Promotor, optimierten *E. coli*-Stammes (Rosetta(DE3)), die Expression verbessern kann. Da der Expressionsstamm *E.c.* BL21(DE3) optimiert für *E.c.* eigene Codons translatiert, stellte ich mir die Frage, ob ein Expressionsstamm wie *E.c.* Rosetta (DE3) gegebenenfalls Codons von *A.b.*, *K.p.* und *P.a.* besser lesen kann.

3.2.1.2 Verwendung eines alternativen Expressionsstammes

Unter der Annahme, dass die nicht zufriedenstellende Expression möglicherweise an einer unterschiedlichen Codon Usage von *E. coli* und insbesondere den beiden Nonfermentern *A.b.* und *P.a.* liegen könnte, wurden die Plasmide in *E. coli* Rosetta(DE3) (eigentlich optimiert für die Expression eukaryotischer Proteine) transformiert und erneut eine Expression durchgeführt (Abb. 15).

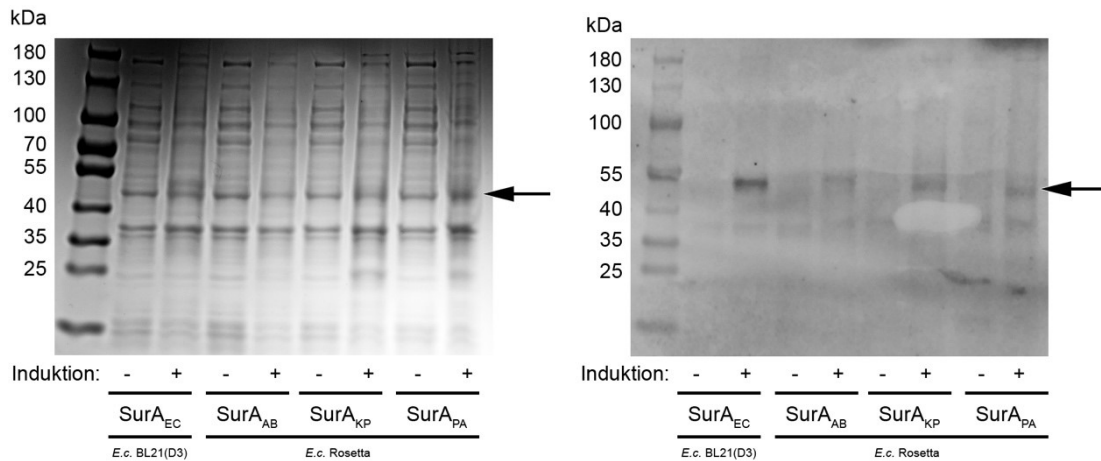


Abb. 15: Expression von *A.b.*, *K.p.* und *P.a.* SurA in *E.c.* Stamm 'Rosetta', sowie *E.c.* BL21(D3) SurA (= Laborstamm für die Expression von *E.c.* SurA, hier verwendet als Kontrolle). Die verwendete IPTG-Konzentration war hier 0,5 mM IPTG. Links: SDS-PAGE mit kaum erkennbarer Induktion, außer bei SurA_{EC}. Rechts: Western Blot mit Anti-6xHis-Antikörpern (alle SurA-Varianten tragen einen His-Tag).

Im Coomassie-Gel, aber auch im Western Blot zeigt sich bei allen Konstrukten zwar eine Induktion, die aber im Vergleich zu *E.c.*-SurA, exprimiert in *E. coli* BL21(DE3), deutlich geringer ausfällt.

3.2.2 Testexpression mit Plasmiden mit kodon-optimierten SurA coding sequences

Nachdem weder die Titration der Induktorkonzentration noch die Verwendung eines alternativen Expressionsstammes eine signifikante Verbesserung der Proteinexpression herbeiführen konnten, wurden für die Expression in *E. coli* schließlich kodon-optimierte Versionen von SurA_{AB}, SurA_{PA} und SurA_{KP} beim Dienstleister GenScript (2.2.1) bestellt und für erneute Testexpressionen mit *E. coli* BL21(DE3) verwendet (Abb. 16).

3.2.2.1 Testexpression mit bisherigen Bedingungen

Eine erste Testexpression der kodon-optimierten Versionen aller drei Konstrukte wurde zu bisherigen Bedingungen durchgeführt, d.h. Expression in LB-Medium bei 37 °C und Induktion mittels IPTG mit einer Konzentration von 0,1 mM mit lediglich 3 h Inkubations- bzw. Expressionszeit.

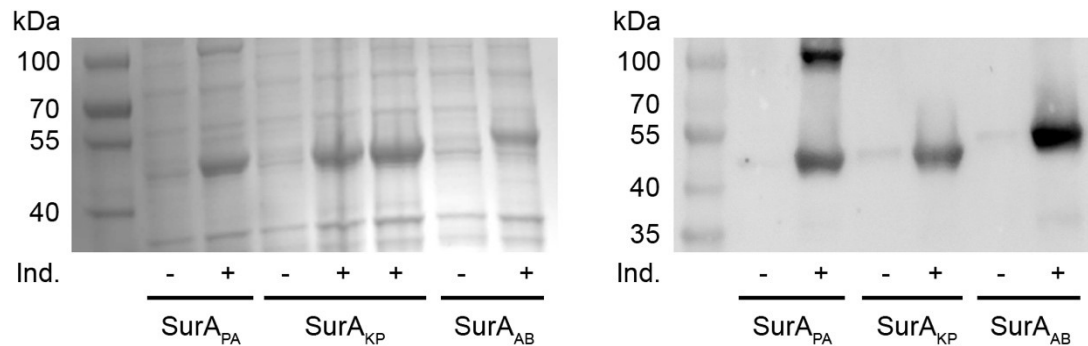


Abb. 16: Testexpression von SurA von kodon-optimierten Konstrukten des Dienstleisters GenScript – bisherige Bedingungen. Alle Banden entsprechen den gewünschten Zielgrößen (*P.a.*: 48,7 kDa. *K.p.*: 48,3 kDa. *A.b.*: 49,4 kDa.). Links: Coomassie-gefärbtes SDS-Gel, gezeigt sind GZL von SurA_{PA}, _{KP} und _{AB} jeweils vor und nach Induktion. Rechts: Western Blot mit Anti-6xHis-Antikörpern. Alle Abbildungen zeigen eine deutliche Induktion und Expression der His-getaggtten SurA-Varianten, insbesondere von SurA_{AB}.

Es zeigte sich auf Anhieb eine deutliche Expression von *P.a.*, *K.p.* und *A.b.* SurA. Sowohl mit dem Gedanken eines optimalen Laborablaufs als auch der Idee, dass die Expression von SurA bei niedriger Temperatur vielleicht weniger falsch gefaltete Proteine produziere, wurde in einem weiteren Schritt dennoch die Temperatur und Expressionszeit geändert.

3.2.2.2 Testexpression mit reduzierter Temperatur und längerer Expressionszeit

Eine weitere Testexpression unter Verwendung der kodon-optimierten Konstrukte wurde bei reduzierter Temperatur (27° C ÜNK und erste Subkultur, Expression 25 °C) und verlängerter Expressionszeit durchgeführt (Abb. 19).

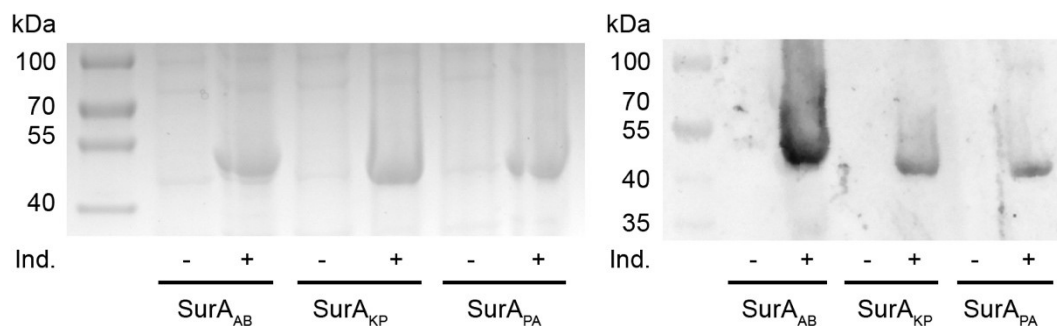


Abb. 17: Testexpression der kodon-optimierten Konstrukte des Dienstleisters GenScript – Temperatur- und Expressionszeitanpassung. Alle Banden entsprechen den gewünschten Zielgrößen (*A.b.*: 49,4 kDa. *K.p.*: 48,3 kDa. *P.a.*: 48,7 kDa). Links: Coomassie-gefärbtes SDS-Gel. Rechts: Western Blot mit Anti-6xHis-Antikörpern. Alle Abb. zeigen eine deutliche Expression der His-getaggtten SurA.

Mit gleicher IPTG Induktions-Konzentration von 0,1 mM, aber mit deutlich reduzierter Inkubationstemperatur zeigte sich ebenfalls eine deutliche

Expression von allen drei kodon-optimierten Konstrukten. Deutlich ist auch hier die im Vergleich stärkere Expression von SurA_{AB} zusehen.

3.2.2.2.1 Gegenüberstellung von 3.2.2.1 und 3.2.2.2

Um die zwei unterschiedlichen Kulturbedingungen besser vergleichen zu können, erfolgte ein Western Blot für den die Samples aus den beiden zuvor beschriebenen Ansätzen auf dasselbe Gel geladen wurden (Abb. 18).

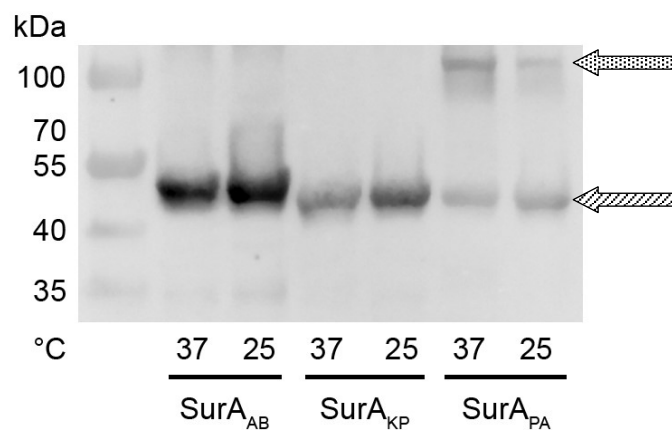


Abb. 18: Westernblot zum Vergleich der Expression von SurA bei unterschiedlichen Inkubationstemperaturen während der Expression und verlängerten. Die direkte Gegenüberstellung (quergestreifter Pfeil) zeigt eine höhere Expression bei 25 °C mit gleichzeitig längerer Expressionszeit. Hier also nur ein Vergleich zur Praxistauglichkeit der Expression über Nacht. Bei SurA_{PA} zeigt sich zudem eine Reduktion des unspezifischen Signals auf einer Höhe von ca. 100 kDa (gepunkteter Pfeil), (wie bereits in Abb. 16 zu sehen).

Die Übernacht-Expression zeigte eine zufriedenstellende Expression aller drei Konstrukte ohne signifikanten Nachweis von Degradationsprodukten und wurde im Weiteren beibehalten, da sie in Zusammenschau mit der langen Vorkultur bei guten Resultaten am besten in den Laborablauf zu integrieren war.

3.2.2.3 Testung unterschiedlicher Medien

Weitere Versuche, die hier nicht abgebildet sind, wurde mit unterschiedlichen Medien durchgeführt. Hier zeigte Terrific Broth (Tabelle 2) die beste Überexpression. Dieses Medium war dann die Grundlage für den folgenden Versuch einer Autoinduktion.

3.2.2.4 Anwendung des Autoinduktionsmediums

Mit einer ersten Testung von Terrific Broth (TB) und der weiteren inhaltlichen Auseinandersetzung mit diesem Medium rückte die Möglichkeit der

Autoinduktion in den Mittelpunkt der Versuche. Zu diesem Zweck wurde dem TB-Medium Laktose zugesetzt (Tabelle 2). Nach dem primären Glucoseverbrauch durch *E.c.* wird die Lactose intrazellulär zu Allolactose metabolisiert, die das *lac*-Operon aktiviert und damit die Expression selbst induziert, wie in 2.3.1.2 beschrieben. Ziel war es, den Laborprozess für die Expression im großen Maßstab zu vereinfachen, wenn das Expressionsergebnis ebenso überzeugend ist.

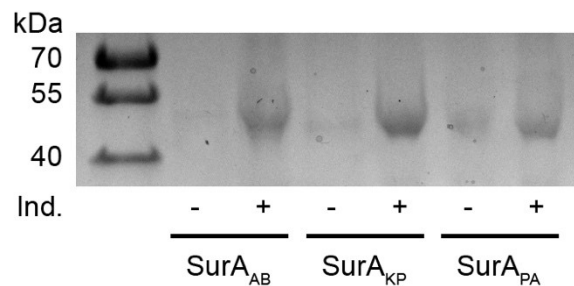


Abb. 19: Testexpression mit Autoinduktionsmedium nach Studier et al. (2005). GZL vor Induktion bedeutet hier Abnahme von Bakterien 1 h nach Überimpfen der Übernachtskultur in das Autoinduktionsmedium. Die Nach-Induktionssamples wurden nach weiteren 23 h Kultivierung bei 27 °C gewonnen. SDS-Page 6-20 %. Alle Ansätze zeigen eine deutliche Induktion der SurA-Expression.

Es konnte eine deutliche Induktion von SurA in allen Konstrukten beobachtet werden. Alle Banden lagen auf der gewünschten Zielhöhe. Die Autoinduktionsmethode wurde letztlich für alle weiteren Ansätze verwendet, weil sie bei geringem experimentellem Aufwand in der größten Bakterienbiomasse resultierte und gleichzeitig eine gute Proteinüberexpression zeigte.

3.3 Batch-Aufreinigungen unter optimierten Expressionsbedingungen

3.3.1 Batch-Aufreinigung von *P.a.* SurA

Die groß skalierte Batch-Aufreinigung diente zur Gewinnung ausreichend großer Mengen von SurA_{PA}, um das Chaperon anschließend in Aktivitätsmessungen weiter zu analysieren.

Die Expression erfolgte wie in 2.3.1.2 beschrieben in 3 l Kulturvolumen. Nach Zellyse wurde die Proteinreinigung mit der Nickel-Affinitäts-Chromatografie (Abb. 20) durchgeführt (siehe 2.3.2).

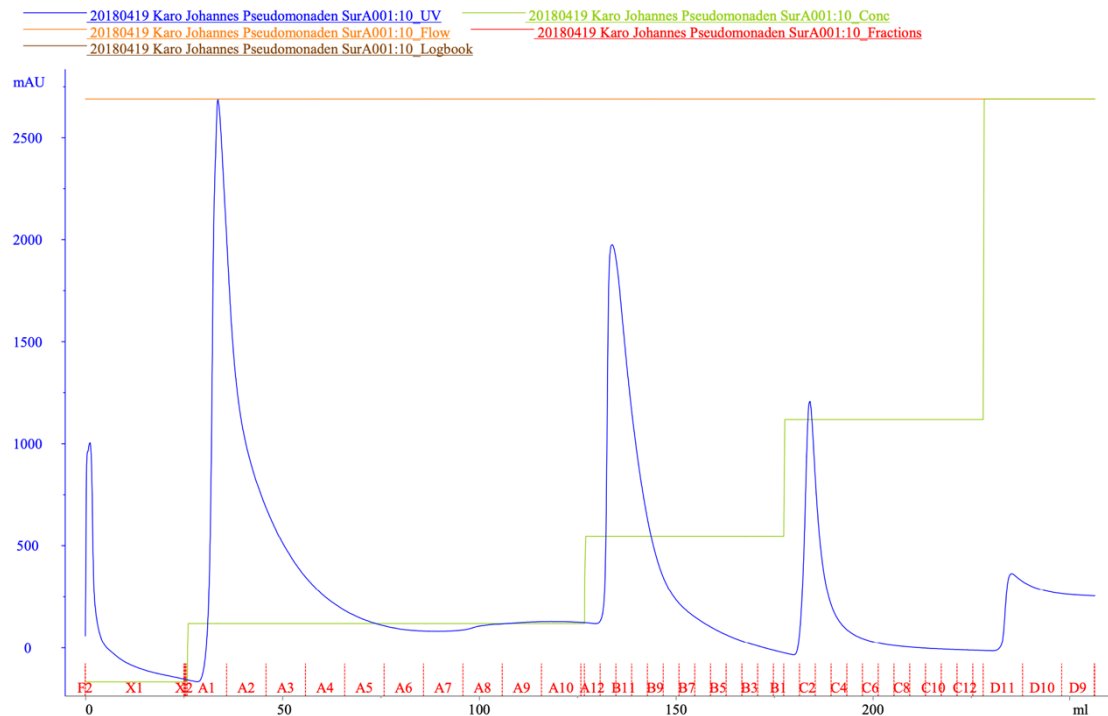


Abb. 20: Grafische Darstellung des ÄKTA-Programms der Nickel-Affinitätschromatographie von SurA_{PA}. Y-Achse (blau): UV-Absorption (280 nm). X-Achse (rot): Fraktionen und Elutionsvolumen (ml). Grüne Kurve: Konzentrationsverlauf von Puffer B, hier Stufenschema angewandt. Orange Linie: Flussrate (konstant bei X ml/min). Fraktion F2 ist der Proben-flow-through. Fraktionen A1-A4 stellen die Elution von unspezifisch gebundenen Proteinen dar. Fraktionen B12-B6 ist das spezifisch gebundene His-getaggte Protein zu erwarten.

In der grafischen Darstellung der Nickel-Affinitätschromatographie zeigten sich nach jeder stufenweisen Erhöhung der Imidazol-Konzentration abgrenzbare Peaks. Das gewünschte Protein, hier His-getaggtetes SurA_{PA}, wurde primär in den Fraktionen B12 bis B6 nachgewiesen.

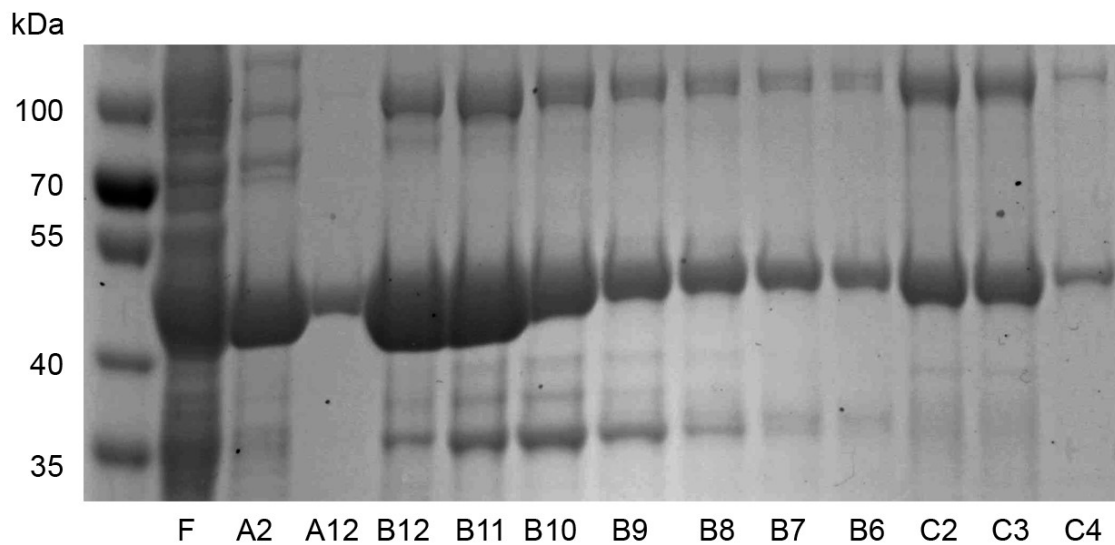


Abb. 21: Proteinfractionen der Nickel-Affinitätschromatographie von SurA_{PA}. SDS-PAGE (10%) ausgewählter Fraktionen (F: Flow through, A2, A12, B12 bis C4, vgl. Abb. 20) der Nickel-Affinitätschromatographie von SurA_{PA}. SurA_{AB} ~ 48,7 kDa.

Auf der SDS-PAGE ist eine deutliche Expression von SurA_{PA} in allen Fraktionen zu sehen. Neben der Zielbande sind allerdings auch Banden bei ca. 100 kDa und mehrere Banden mit einem Molekulargewicht unter 40 kDa zu sehen. Ein hier nicht abgebildeter Blot mit Anti-His-Antikörpern zeigte nur ein Signal auf einer Höhe von ~ 48,7 kDa, so dass es unwahrscheinlich ist, dass es sich bei den Banden mit geringem Molekulargewicht um Degradationsprodukte von SurA handelt (es sei denn, es handelt sich um Fragmente, die durch den Abbau kein His-Tag mehr enthalten).

Aufgrund der unerwünschten Verunreinigung auch der Fraktionen, die die höchsten Konzentrationen an SurA enthielten und die auch bei mehreren Wiederholungen der Aufreinigung nicht signifikant reduziert werden konnten, wurden zusätzlich andere Zellaufschlussmethoden getestet (nicht abgebildet). Eine gute Reinheit für SurA_{PA}, die downstream für eine Aktivitätsmessung unerlässlich ist, konnte jedoch auch mit weiteren Optimierungsversuchen nicht erreicht werden. Deswegen wurde im weiteren Verlauf auf eine Aktivitätsmessung mit SurA_{PA} verzichtet.

3.3.2 Batch-Aufreinigung von *A.b. SurA*

Die groß skalierte Batch-Aufreinigung von *A.b. SurA* diente der Gewinnung ausreichend großer Mengen an hochreinem SurA_{AB}, um das Chaperon anschließend in Aktivitätsmessungen zu analysieren.

Die Expression erfolgte wie in 2.3.1.2 beschrieben in 3 l Zellkulturvolumen. Nach Zellyse wurde die Proteinreinigung mit Nickel-Affinitäts-Chromatografie (Abb. 22) und Größenausschlusschromatografie (Abb. 24) durchgeführt (siehe 2.3.2).

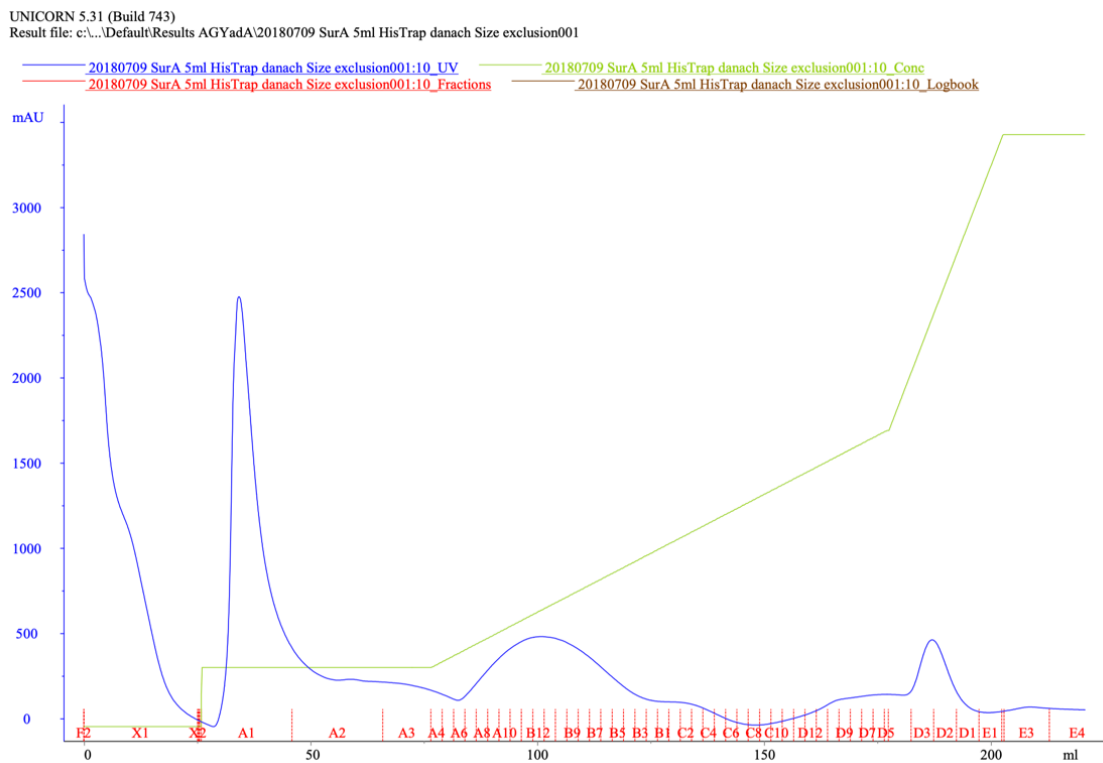


Abb. 22: Darstellung des ÄKTA-Programms für die Nickel-Affinitätschromatographie von SurA_{AB}. Y-Achse (blau): UV-Absorption (280 nm). X-Achse (rot): Fraktionen und Elutionsvolumen (ml). Grüne Kurve: Konzentrationsverlauf von Puffer B. In F2, X1 und X2, als abfallender Peak der UV-Absorption zu sehen, sind die ersten nicht bindenden Proteine der bereits geladenen Säule zu sehen. Nach der ersten Stufe der Erhöhung des Puffer B, werden durch die damit höhere Konzentration von Imidazol unspezifisch bindende Proteine aus der Säule gewaschen und als Peak in A1-A3 zu sehen. Nach weiterer linearer Erhöhung der Flussrate von Puffer B (ab A4) und damit der Erhöhung der Imidazolkonzentration im Elutionspuffer, werden die spezifisch gebundenen Proteine mit His-Tag von den Ni²⁺-NTA-Beads von der Säule eluiert (A8-C2).

Im Unterschied zur großen Batch-Aufreinigung von SurA_{PA}, wurde hier nach einer Stufenweisen Erhöhung der Imidazolkonzentration, ein linearer Gradient genutzt. Dadurch fällt, wie in Abb. 22 zu sehen ist, der Peak des gewünschten Proteins (hier Fraktionen A8-B5) flach aus. Fraktionen A8-C2 wurden dann zur

Überprüfung der Reinheit und Einschätzung der Proteinmenge in einer SDS-PAGE analysiert (Abb. 23).

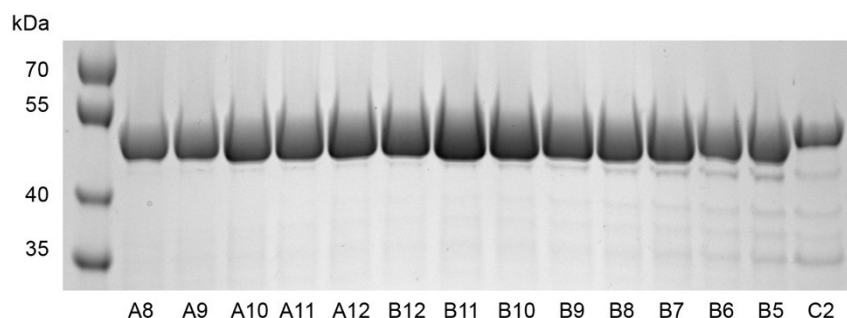


Abb. 23: Proteinfractionen der Nickel-Affinitätschromatographie von SurA_{AB}. Coomassie-gefärbte SDS-PAGE (10 %) ausgewählter Fraktionen (A8 bis C2, vgl. Abb. 22) der Nickel-Affinitätschromatographie von SurA_{AB}. Proteinzielgröße 49,4 kDa.

Die in Abb. 23 dargestellten Fraktionen zeigten alle eine prominente Bande der Zielgröße von ~ 49,4 kDa. Für die weitere Aufbereitung wurde lediglich die Fraktion C2 nicht berücksichtigt. Alle weiteren Fraktionen wurden gepoolt und für die anschließende Größenausschluss-Chromatografie per Zentrifugationsfiltration eingengt.

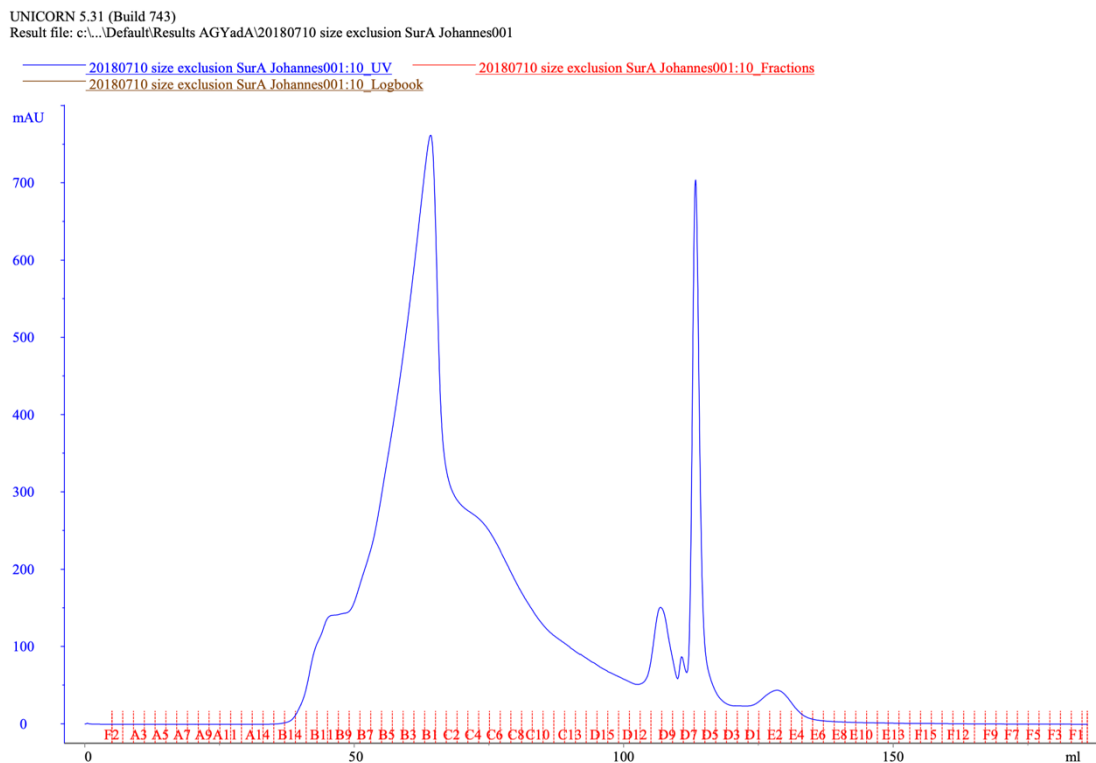


Abb. 24: Grafische Darstellung der Größenausschluss-Chromatographie von SurA_{AB}. Y-Achse (blau): UV-Absorption (280 nm). X-Achse (rot): Fraktionen und Elutionsvolumen (ml). Die UV-

Absorptionskurve zeigt im Wesentlichen zwei voneinander abgrenzbare Peak-Agglomerate. Der erste Peak mit jeweils zwei Schultern von Fraktionen B12-C9. Weitere kleinere ungewollte Proteine ab D12.

Die Größenausschluss-Chromatographie von SurA_{AB} zeigt eine gute Auftrennung der Proteingrößen mit abtrennbaren Peaks. Das gewünschte Protein sollte im ersten großen Peak abgebildet sein, so dass die Fraktionen B12-C9 zur weiteren Untersuchung in einem SDS-Gel überprüft wurden (Abb. 25).

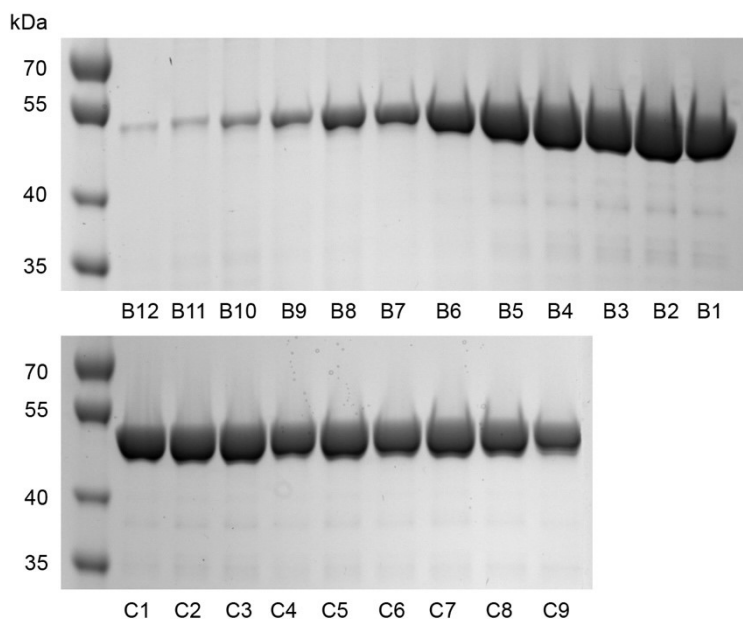


Abb. 25: Proteinfractionen der Größenausschluss-Chromatographie von SurA_{AB}. Coomassie-gefärbtes SDS-Gel (10%) ausgewählter Fraktionen (B12 bis C9, vgl. Abb. 24) nach der Größenausschluss-Chromatographie von SurA_{AB}. Proteinzielgröße ~ 49,4 kDa.

Insgesamt sind nur wenige unerwünschte Banden abseits der gewünschten Proteingröße von 49,4 kDa zu sehen. Gepoolt wurden die Fraktionen B12-B8 (genannt Peak 1), Fraktionen B3-B1 (Peak 2) und Fraktionen C3-C9 (Peak 3). Diese wurden mittels Zentrifugationsfiltration zu einer Ziel-Konzentrationen von etwa 80 µM eingeeengt. Die Proteinkonzentration wurde in den eingeeengten Proben nach 2.3.3 gemessen (Tabelle 27).

Tabelle 27: Final erzielte Volumen und Konzentrationen von SurA_{AB}

Name	Fraktionen	Volumen	Konzentration	Menge
Peak 1	B12-B8	0,6 ml	94,4 µM	2,8 mg
Peak 2	B3-B1	3,5 ml	68,44 µM	11,8 mg
Peak 3	C3-C9	3,0 ml	100,6 µM	14,92 mg

Die groß skalierte Batch-Aufreinigung von SurA_{AB} erbrachte eine ausreichende Menge an Protein, die mit Beurteilung der SDS-Gele eine gute Reinheit haben.

Somit sind die Voraussetzungen für eine Aktivitätsmessung von SurA_{AB} prinzipiell erfüllt.

3.4 Aktivitätsassays mit *E.c.* und *A.b.* SurA

Der durchgeführte Aktivitätsassay (siehe 2.3.6) mit *A.b.* SurA hatte das Ziel, im Vergleich mit SurA_{EC} (das für die Entwicklung des Assays und ein erfolgreiches Screening nach SurA-Inhibitoren bereits genutzt wurde), zu überprüfen, ob eine Aktivierung von SurA_{AB} durch Erwärmung ebenfalls möglich ist und ob sich die Aktivierungstemperaturen von SurA_{EC} und SurA_{AB} unterscheiden. Die Aktivierung führt zu einer Konformationsänderung von SurA, die die Holdase-Funktion von SurA im Assay erst ermöglicht. Dadurch kann SurA im Assay eine Interaktion mit Luciferase eingehen. Im zweiten Schritt sollte überprüft werden, ob ein für SurA_{EC} bereits identifizierter, wirksamer Inhibitor (Tabelle 26), auch SurA_{AB} inhibiert.

Genutzt wurde das selbst aufgereinigte, hochreine SurA_{AB} (Peak 2 und 3 aus 3.3.2), sowie SurA_{EC}, das durch eine bereits etablierte Expressionsroutine (Tabelle 17) und Aufreinigung in regelmäßigen Abständen in unserer Arbeitsgruppe gewonnen und aliquotiert bei -80 °C gelagert, zur Verfügung stand. In den folgenden Abbildungen wurden jeweils dieselben Batches von SurA_{EC} (Abb. 26) und SurA_{AB} (Abb. 27 und Abb. 28) genutzt.

3.4.1 Luciferase Aktivitäts-Assays mit SurA_{EC}

Zunächst wurde der Aktivitätsassay unter Verwendung nur von SurA_{EC} durchgeführt, um das technisch anspruchsvolle Assay-Prozedere durchzuführen. Dabei sollte auch verifiziert werden, dass bereits vorbekannte Ergebnisse für SurA_{EC} reproduziert werden können. Schließlich sollte das verwendete Protokoll dann auch auf SurA_{AB} angewendet werden. Im in Abb. 26 dargestellten Versuch sollten mehrere Versuchsparameter ausgetestet werden. Zum einen sollten verschiedene Aktivierungstemperaturen (RT, 45, 50 und 55 °C) verwendet werden, um die optimale Aktivierungstemperatur von SurA_{EC} zu reproduzieren. Zum anderen sollte die Inhibition von SurA_{EC} durch den vorbekannten Inhibitor „Medozin“ (dessen Struktur aus patentrechtlichen Gründen nicht dargelegt werden kann) reproduziert werden. Dazu wurden Ansätze entweder mit DMSO als Lösemittelkontrolle (Endkonzentration in der Reaktion 5 %), oder mit in DMSO

gelöstem Inhibitor in zwei verschiedenen Konzentrationen (5 und 40 μM) analysiert. Zur genauen Durchführung des Assays siehe Gliederungspunkt 2.3.6. Als Readout für die Holdase-Aktivität von SurA dient hier eine Erniedrigung des Luciferase-Signals (welche durch die Bindung von SurA an die teilentfaltete Luciferase zustande kommt). Ist SurA holdase-aktiv, so resultiert das im Assay in einer schwachen Lumineszenz. Ist SurA inaktiv (weil z.B. nicht ausreichend aktiviert, oder durch einen Inhibitor an der Bindung der Luciferase gehindert), so kann sich die teilentfaltete Luciferase rückfalten, ist aktiv und kann ein hohes Lumineszenzsignal generieren.

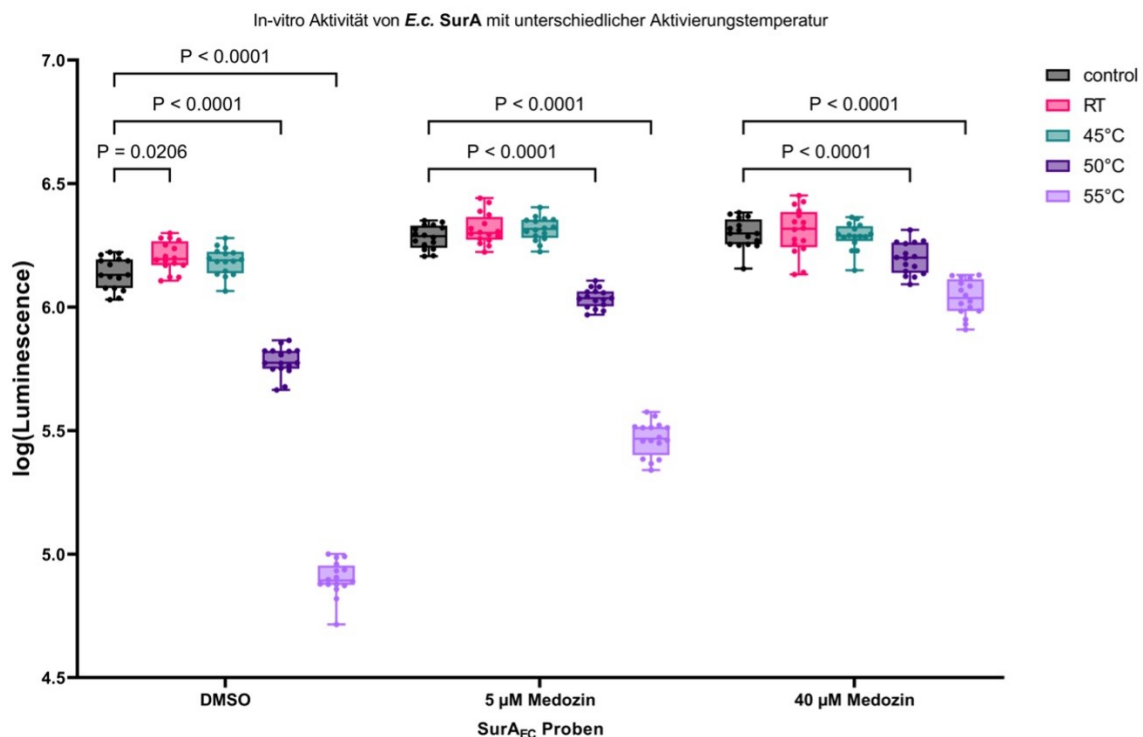


Abb. 26: Box-Plot des SurA_{Ec} Luciferase Aktivitäts-Assays. Zusammengefasst abgebildet ist ein Experiment mit jeweils vier technischen Replikaten bestehend aus vier Wells. SurA wurde 30 min bei Raumtemperatur (RT), 45, 50 und 55 °C inkubiert. Hier zu sehen die Reaktionen mit DMSO, mit 5 und 40 μM Medozin bei den genannten Aktivierungstemperaturen (siehe auch Legende rechts oben). Kontrolle bestehend aus Puffer mit Luciferase, so dass die Luciferase im gefalteten aktiven Zustand ist und entsprechend eine hohe Lumineszenz zeigt. Auf der Y-Achse ist die gemessene Lumineszenz logarithmisch aufgetragen.

In Abb. 26 (linkes Datenset) ist zu sehen, dass SurA, das nicht erhitzt wurde (RT) keine Holdase-Aktivität hat. Trotzdem kann es als Chaperone die Rückfaltung des teilentfalteten Luciferase unterstützen, wodurch ein kleiner, aber signifikanter Anstieg in der Lumineszenz detektierbar ist. Erst ab einer Aktivierungstemperatur

von 50 °C ist SurA in der Lage ist, das gemessene Lumineszenzsignal im Vergleich zur Kontrolle (nur Luciferase) zu reduzieren. Der Effekt ist mit einer Reduktion um mehr als eine log-Stufe maximal bei 55 °C (höhere Temperaturen wurden nicht getestet, da das Protein dann ausfällt). Hier ist es also möglich, SurA_{EC} durch Hitzeaktivierung von der Chaperone-Aktivität in eine Holdase-Aktivität zu überführen. Zusätzlich kann man aus dem Experiment ableiten, dass die Anwesenheit von DMSO grundsätzlich keinen störenden Einfluss auf das Testsystem hat.

Betrachtet man die Ansätze, die in Anwesenheit von 5 µM Medozin gemessen wurden (mittleres Datenset in Abb. 26), so sieht man in den Ansätzen, in denen SurA durch die Erhitzung auf 50 bzw. 55 °C aktiviert wurde, eine leichte Erhöhung des Lumineszenzsignals im Vergleich zu den entsprechenden Samples, in denen nur DMSO zugegeben wurde. Das bedeutet, dass bereits bei einer Inhibitorkonzentration von 5 µM eine Reduktion der SurA-Aktivität zu beobachten ist. Dieser Effekt kann durch eine Erhöhung der Inhibitorkonzentration auf 40 µM noch verstärkt werden (Abb. 26, rechtes Datenset), so dass in den Ansätzen, in denen SurA zuvor durch Erwärmung auf 50 bzw. 55 °C erfolgreich aktiviert wurde, das Lumineszenzniveau durch die Anwesenheit des Inhibitors nahezu bis auf das Niveau der Kontrollreaktion angehoben wird.

Zusammengefasst konnte dieser Versuch also bestätigen, dass SurA_{EC} ab einer Aktivierungstemperatur von 50 °C eine Aktivität zeigt, welche bei 55 °C maximal ist (nicht gezeigt wurden höhere Aktivierungstemperaturen, da über 55 °C das Protein beginnt, auszufallen). Zudem konnte bestätigt werden, dass der Inhibitor „Medozin“ in der Lage ist, SurA konzentrationsabhängig zu inhibieren.

Nachdem also der Assay erfolgreich durchgeführt und vormalige Ergebnisse reproduziert werden konnten, sollte nun der Assay mit SurA_{AB} durchgeführt werden und die Aktivierungstemperatur für SurA_{AB} bestimmt werden.

3.4.2 Luciferase Aktivitäts-Assays mit SurA_{AB}

Für eine erste Messung wurden die gepoolten Fraktionen A8-B5 aus Peak 2 der Batch-Aufreinigung von SurA_{AB} verwendet (siehe Abb. 22). Um sich einer Aktivierungstemperatur von SurA_{AB} anzunähern wurden Temperaturen in einem breiten Spektrum von 45-65 °C getestet. Die Testung von Temperaturen über 55 °C war hier möglich, da SurA_{AB} im Gegensatz zu SurA_{EC} auch bei diesen Temperaturen nicht sichtbar ausfiel.

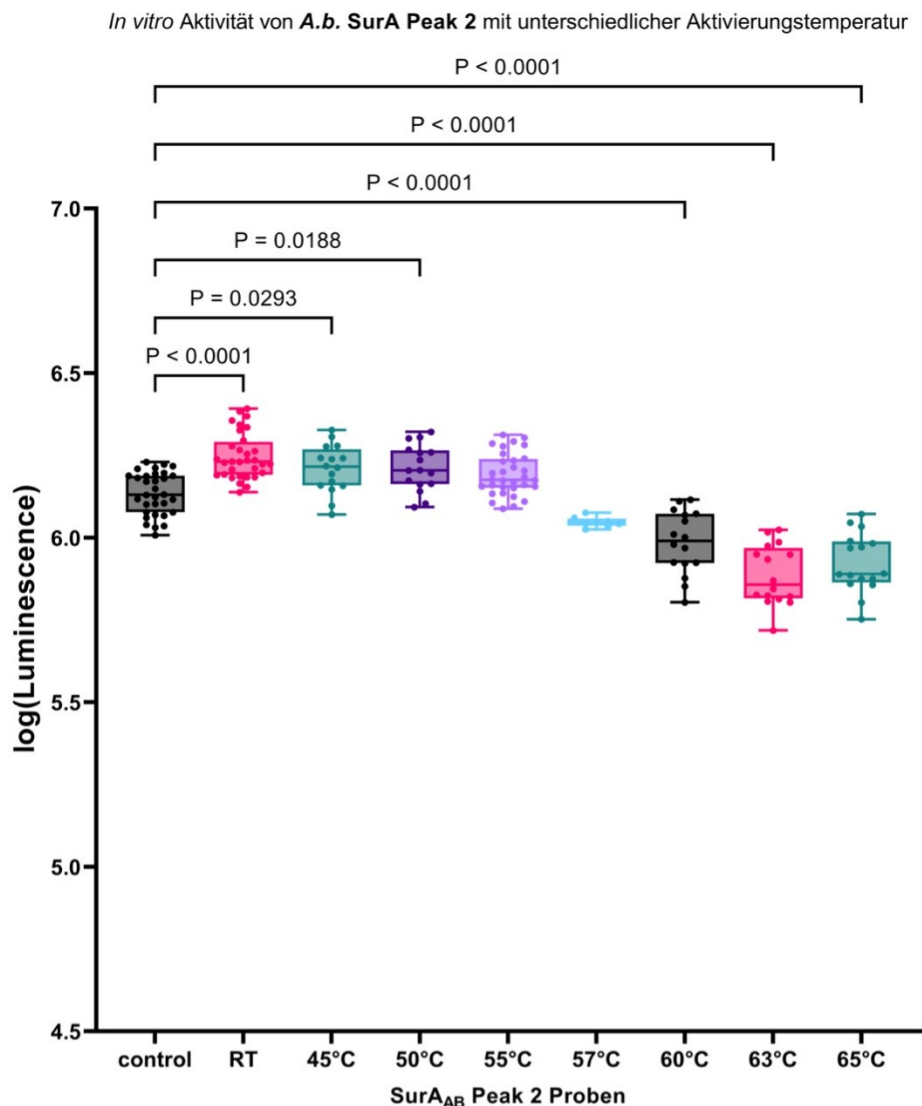


Abb. 27: Box-Plot des SurA_{AB}-Peak 2 Luciferase Aktivitäts-Assays. Abgebildet sind zwei unabhängige Experimente mit jeweils vier technischen Replikaten bestehend aus vier Wells. Im ersten Experiment wurde SurA_{AB} für 30 min bei Raumtemperatur (RT), 45, 50 und 55 °C inkubiert, im Zweiten bei RT, 55, 57, 60, 63 und 65 °C. Bei 57 °C sind aufgrund eines technischen Fehlers lediglich zwei technische Replikate erhoben und abgebildet. Hier zu sehen sind die Ansätze in Anwesenheit von DMSO bei den genannten Aktivierungstemperaturen. Kontrolle bestehend aus Puffer mit Luciferase. Auf der Y-Achse ist die gemessene Lumineszenz logarithmisch aufgetragen.

Der Aktivitätsassay mit *A.b.* SurA zeigt eine regelhafte Kontrolle, d.h. sie zeigt ein Lumineszenzsignal, das vergleichbar ist zu dem, das in vorherigen Versuchen für Kontrollansätze ermittelt wurde (siehe auch Abb. 26). In Anwesenheit von SurA_{AB}, das bei unterschiedlichen Temperaturen vorinkubiert wurde (RT, 45, 50 und 57 °C), zeigt sich eine schwache, aber signifikante, Zunahme der Lumineszenz (wie auch schon im Vorversuch mit SurA_{EC}). Das könnte damit erklärt werden, dass SurA_{AB} hier (unabhängig von der Aktivierungstemperatur) seine Chaperonfunktion erfüllt, mit der Luciferase interagiert und damit zu einem etwas höheren Anteil rückgefalteter Luciferase beiträgt. Bei höheren Aktivierungstemperaturen von *A.b.* SurA kommt es dagegen zu einer Reduktion des Lumineszenzsignals im Vergleich zur Kontrolle. Betrachtet man dieses Ergebnis allerdings in Zusammenschau mit den Ergebnissen für SurA_{EC} (Abb. 26), sehen wir selbst bei Aktivierungstemperaturen ≥ 55 °C keine drastische Reduktion (maximal um ca. 0,3 log Stufen) des Lumineszenzsignals, also findet vermutlich keine stabile Interaktion der Luciferase mit SurA_{AB} statt. Ergo kann SurA_{AB} durch die gewählten Bedingungen nicht als Holdase aktiviert werde. Bei einer Aktivierungstemperatur von 65 °C beobachtet man wiederum einen leichten Anstieg des Lumineszenzsignals. Das könnte darauf zurückzuführen sein, dass bei dieser Temperatur eine irreversible Konformationsänderung von SurA stattfindet, die einer Inaktivierung gleichzusetzen ist. Dieses hitzegeschädigte, inaktive SurA_{AB} kann die Luciferase nicht bei ihrer Rückfaltung unterstützen, was zu dem reduzierten Lumineszenzsignal führen könnte. Zusammenfassend zeigte dieses erste Experiment, das mit den gepoolten Fraktionen des Peak 2 durchgeführt wurde, dass SurA_{AB} sich im Assay anders verhält als SurA_{EC} und durch eine Wärmebehandlung mit den getesteten Temperaturen nicht so aktiviert werden kann, dass es eine stabile Interaktion mit der teilentfalteten Luciferase eingeht.

Um auszuschließen, dass dies womöglich an der verwendeten Proteinfraction liegt, wurde in einem sich anschließenden Experiment SurA_{AB} aus den gepoolten Fraktionen des Peak 3 getestet (Abb. 28).

In vitro Aktivität von *A.b. SurA Peak 3* mit unterschiedlicher Aktivierungstemperatur

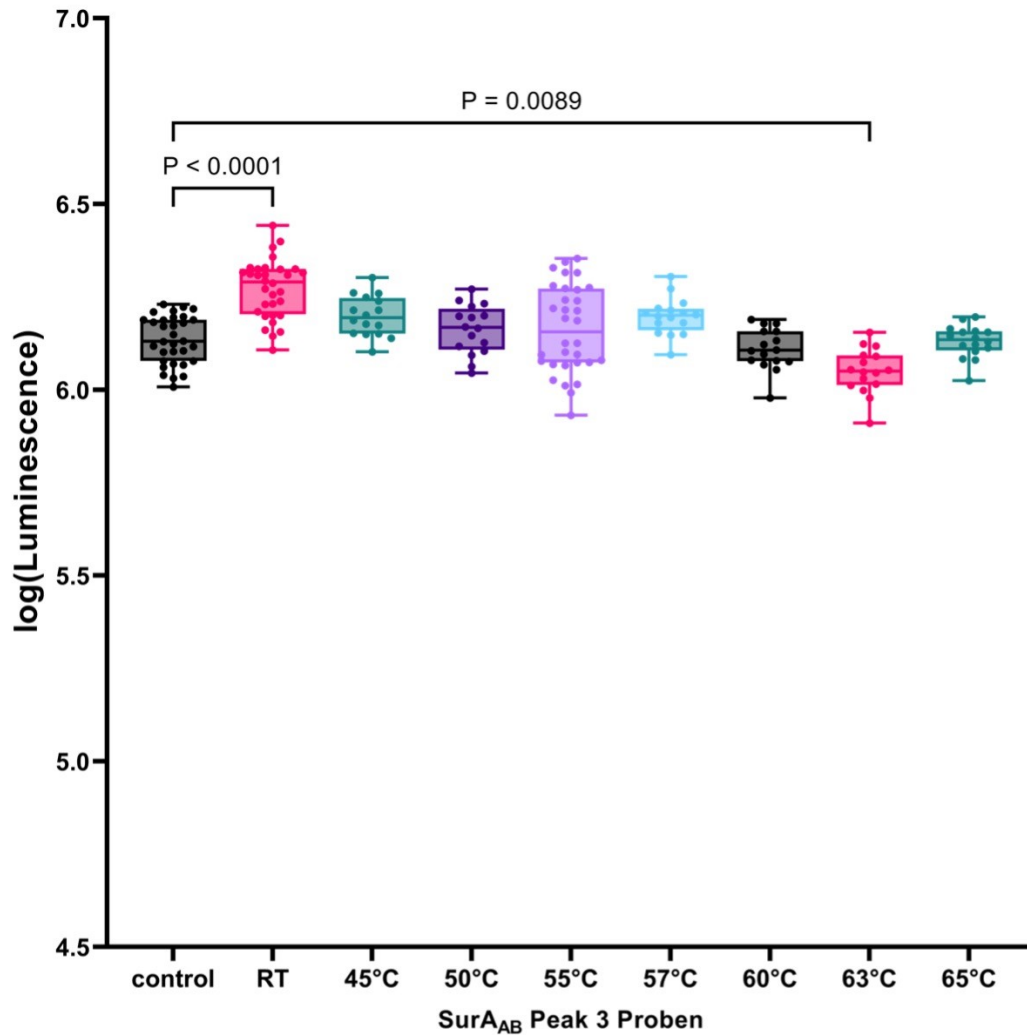


Abb. 28: Box-Plot des SurA_{AB}-Peak 3 Luciferase Aktivitäts-Assays. Abgebildet sind zwei unabhängige Experimente mit jeweils vier technischen Replikaten bestehend aus vier Wells. SurA wurde 30 min bei Raumtemperatur (RT), 45, 50, 55, 57, 60, 63 und 65 °C inkubiert. Hier zu sehen ist die Reaktion in Anwesenheit von DMSO mit SurA_{AB}, das mit den genannten Aktivierungstemperaturen vorbehandelt wurde. Die Kontrollreaktion enthält nur Puffer mit Luciferase. Auf der Y-Achse ist die gemessene Lumineszenz logarithmisch aufgetragen.

Kurz zusammengefasst, zeigte auch diese Proteinfraction ein Verhalten wie zuvor beschrieben. Die Kontrollreaktion zeigt das erwartete Lumineszenzsignal. Durch Hinzugabe von SurA_{AB} Peak 3 das mit den unterschiedlichen Aktivierungstemperaturen RT, 45, 50, 57, 60, 63 und 67 °C behandelt wurde, zeigt sich wie zuvor beschrieben bei den niedrigen Temperaturen ≤ 45 °C wieder eine leichte Zunahme der Lumineszenz, allerdings nur bei RT signifikant. Alle weiteren gemessenen Lumineszenzsignale zeigen ein variables Verhalten ohne signifikante Erhöhung oder Reduktion des Signals außer einer leichten Reduktion

um 0,1 log Stufen bei 63 °C. Es kann also angenommen werden, dass SurA_{AB} des Peaks 3 ebenfalls unter keiner der getesteten Aktivierungsbedingungen eine Holdase-Aktivität aufweist und somit keine stabile Interaktion mit der Luciferase eingehen kann.

3.5 Testung eines SurA-Inhibitors mit *A.b.* SurA

Aus Vorversuchen mit SurA_{EC} war uns bekannt, dass für eine rauscharme Quantifizierung durch den großen Unterschied der Lumineszenz (> 1 log Stufe, Abb. 26) der Interaktion des Inhibitors Medozin SurA in seiner Holdase-Form vorliegen muss. Dieses Ergebnis wurde hier noch einmal reproduziert. Wie zuvor gezeigt, konnten wir eine Überführung von SurA_{EC} von Chaperon zu Holdase durch eine Erwärmung bei 55 °C reproduzierbar herbeiführen. Für SurA_{AB} konnten wir jedoch keine Temperatur ermitteln, die zur erwünschten Änderung und damit Aktivierung der Holdasefunktion des Proteins führte. Allerdings ermöglicht auch die Untersuchung der Chaperonaktivität (nicht hitzeaktiviertes SurA) in Gegenwart von ansteigenden Medozinkonzentrationen eine Aussage über eine mögliche Interaktion zwischen SurA_{EC} und Inhibitor (Abb. 29).

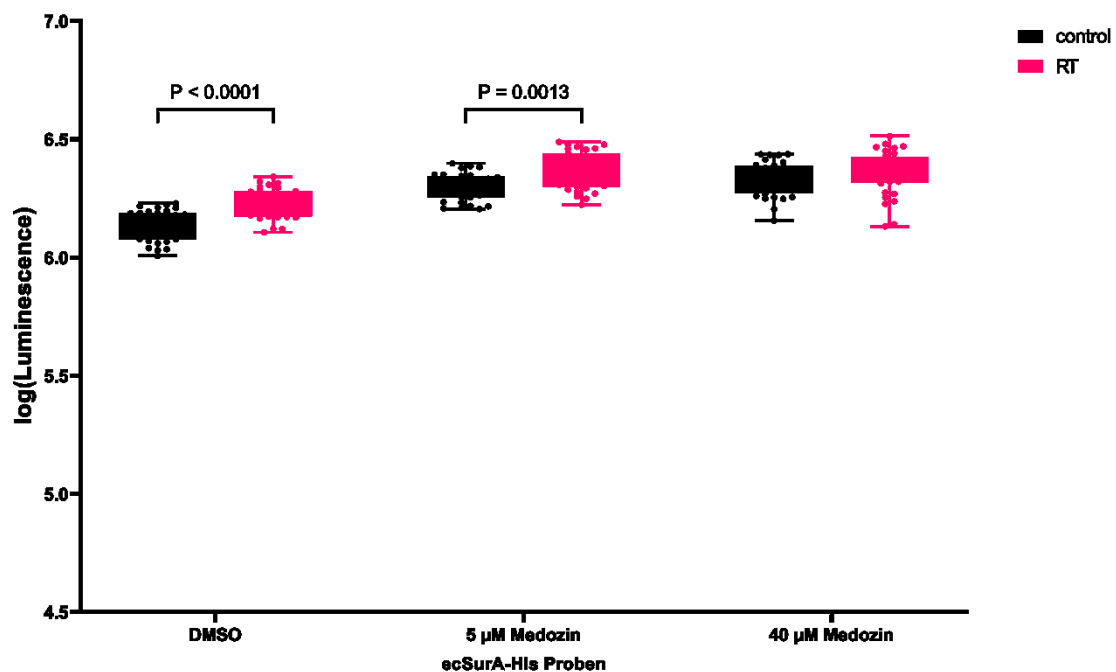


Abb. 29: Box-Plot des SurA_{EC} Luciferase Aktivitäts-Assays unterschiedlicher Medozin-Konzentrationen ohne vorherige Hitzeaktivierung von SurA. [Beschreibung weiter auf folgender Seite]

(zu Abb. 29) Abgebildet sind zwei unabhängige Experimente mit jeweils vier technischen Replikaten, bestehend aus vier Wells. In beiden Experimenten wurde SurA_{EC} für 30 min bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Hier zu sehen sind die Reaktionen mit DMSO, mit 5 μ M und 40 μ M Medozin bei der genannten Aktivierungstemperatur (siehe auch Legende rechts oben). Der Kontrollansatz enthält Puffer mit Luciferase. Auf der Y-Achse ist die gemessene Lumineszenz logarithmisch aufgetragen. Es wurde eine Two-Way ANOVA Analyse zum Vergleich des Kontrollansatzes und der SurA enthaltenden Probe durchgeführt.

Wie bereits beschrieben, beobachteten wir, dass die Gegenwart von SurA_{EC} in Abwesenheit von Medozin zu einer leichten, aber signifikanten Erhöhung des Lumineszenzsignals führt. Die Signifikanz sinkt allerdings mit höherer Medozinkonzentration, bis schließlich bei 40 μ M Medozin kein Unterschied zwischen der Lumineszenz der Kontrollreaktion und der Reaktion in Gegenwart von SurA_{EC} mehr sichtbar ist. Hier kann überlegt werden, dass eine Konkurrenz zwischen Medozin und Luciferase als jeweiliges Substrat der Bindungsstelle von SurA abläuft.

Die Testung von SurA_{AB} mit Medozin erfolgte für beide *A.b.* SurA-Fraktionen (Peak 3 und Peak 2), ist jedoch repräsentativ nur für Peak 2 gezeigt (Abb. 27).

Aufgrund der fehlenden Aktivierungsmöglichkeit von SurA_{AB} wurde SurA_{AB} für diese Versuche nicht hitzebehandelt, sondern nur bei Raumtemperatur vorinkubiert (RT). Neben der Kontrolle gab es Ansätze mit DMSO (Lösemittelkontrolle) und solche, die 5 bzw. 40 μ M Medozin enthielten.

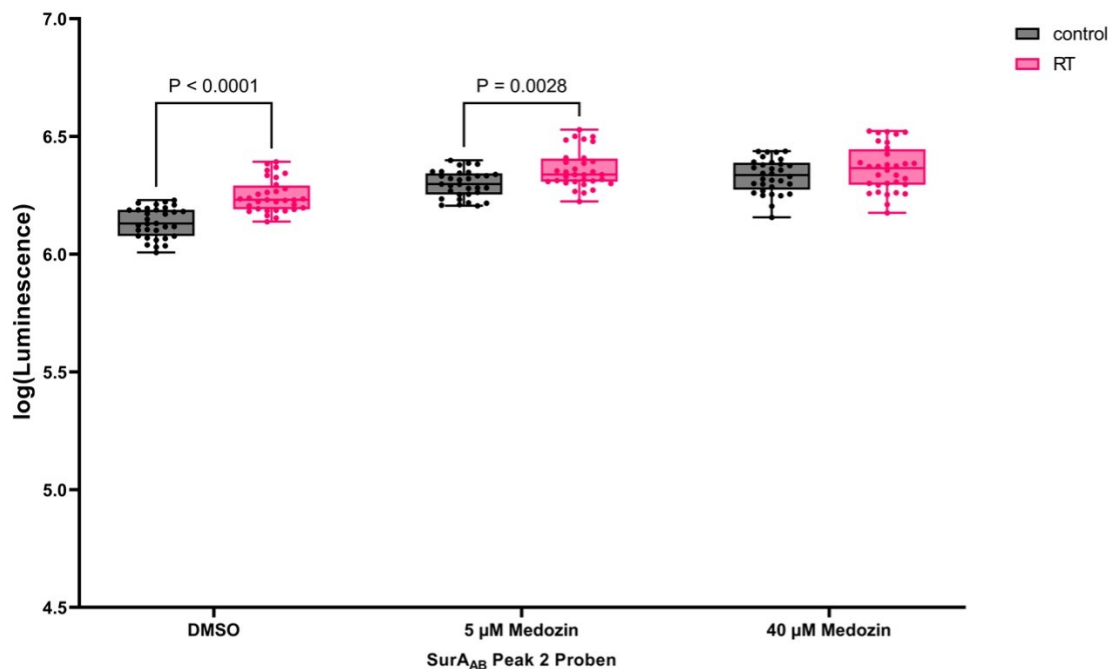


Abb. 30: Box-Plot des SurA_{AB}-Peak 2 Luciferase Aktivitäts-Assays mit unterschiedlichen Medozin-Konzentrationen. Abgebildet sind zwei unabhängige Experimente mit jeweils vier technischen Replikaten bestehend aus vier Wells. In beiden Experimenten wurde SurA_{AB} für 30 min bei Raumtemperatur (RT) vorinkubiert. Hier zu sehen sind die Reaktionen mit DMSO, mit 5 μM und 40 μM Medozin bei der genannten Aktivierungstemperatur (siehe auch Legende rechts oben). Die Kontrolle besteht aus Puffer mit Luciferase. Auf der Y-Achse ist die gemessene Lumineszenz logarithmisch aufgetragen. Es wurde eine Two-Way ANOVA Analyse zum Vergleich des Kontrollansatzes und der SurA enthaltenden Probe durchgeführt.

Tatsächlich konnten wir eine Inhibition der Chaperonfunktion von SurA_{AB} durch Medozin feststellen. Wie zuvor für SurA_{EC} (Abb. 29) beobachtet, reduzierte die Zugabe von Medozin den Unterschied der Lumineszenz zwischen der jeweiligen Kontrolle und der Reaktion in Gegenwart von SurA_{AB} was durch eine Konkurrenz von Luciferase und Medozin an der Substratbindestelle von SurA erklärbar wäre.

Zusammenfassend lässt sich also sagen, dass entgegen unseren Erwartungen SurA_{AB} durch keine der von uns getesteten Temperaturen in eine Konformation überführt werden kann, in der SurA als Holdase agiert. Mögliche Gründe hierfür sollen in der Diskussion erörtert werden. Allerdings konnte gezeigt werden, dass die Chaperonaktivität von SurA_{EC} und SurA_{AB} von Medozin gehemmt wird. Auch wenn die Überführbarkeit von Chaperon zu Holdase zwischen den beiden Proteinen nicht konserviert ist, besteht daher trotzdem die Hoffnung, dass ein SurA Inhibitor auch Effekte in *A. baumannii* hat.

4 Diskussion

Basierend auf dem Wissen, dass SurA als periplasmatische Chaperon in der Biomembranogenese von *E.c.*, *P.a.* und anderen Gram-negativen Erregern eine wichtige Rolle für die Virulenz und Antibiotikaresistenz spielt, sahen wir das Potential, die Anwendung eines bereits in der Entwicklung befindlichen SurA-Inhibitors auf *A.b.* auszuweiten. Die Generierung von Expressionskonstrukten und die Etablierung einer groß skalierten Expression von *A.b.* SurA, um hochreines Protein im mg-Maßstab zur Testung zu gewinnen, war erfolgreich, ebenfalls die Durchführung von Aktivitätsassays mit dem aufgereinigten Protein. Basierend auf einem Aktivitätsassay für *E.c.* SurA sollte auch die Aktivität von *A.b.* SurA in diesem Assay überprüft werden. Leider zeigte sich im Verlauf der Arbeit, dass zum einen die zelluläre Funktion von SurA in *A.b.* (im Gegensatz zu *E. coli*) durch redundante Systeme abgesichert zu sein scheint und dass sich das Protein auch *in vitro* trotz Sequenzhomologien anders verhält. So konnte die Holdasefunktion von SurA aus *A.b.* nicht durch eine Zuführung von Wärmeenergie aktiviert werden. Dennoch konnte gezeigt werden, dass der Inhibitor Medozin, wie auch in *E. coli*, Einfluss auf die Chaperonaktivität von SurA_{AB} zu nehmen scheint.

4.1 Die Rolle von SurA für die Außenmembranbiogenese in *A.b.* und anderen Gram-negativen Spezies

Zum Zeitpunkt der Konzipierung dieser Arbeit, der Expression erster *A.b.* SurA Batches und der Durchführung von Vorversuchen zur Aktivitätsmessung war Stand der Wissenschaft, dass SurA analog zu *E. coli* auch in *A.b.* das Potential als Target für neue Antiinfektiva hat. Doch unserer Arbeitsgruppe konnte kürzlich zeigen (Birkle et al., 2022), dass *A.b.* neben den Chaperonen SurA, Skp und DegP weitere, bis dato noch unbekannte, Pathways zur OM-Biogenese besitzen muss. In *A.b.* Knockoutmutanten von *surA*, *skp* und *degP* (als single-, doppel- oder triple-K.O.) zeigten sich nur geringe Unterschiede in der Außenmembranzusammensetzung und -permeabilität von *A.b.*. Im Infektionsmodell mit *Galleria mellonella* zeigte sich ein besseres Überleben bei Infektion mit einer Mutante ohne *skp*, nicht aber wenn *surA* ausgeknockt worden

war. Bei Doppel-Mutanten für *skp* und *surA* war die größte Veränderung im Phänotyp für Antibiotika-Sensitivität zu sehen und im Infektionsmodell mit der besten Überlebensrate von *G. mellonella* assoziiert [144]. So trägt SurA wohl auch zur Virulenz und OM-Integrität von *A.b.* bei, ist dort aber nicht von so großer Bedeutung wie z.B. in *E. coli*. Unsere aktuelle Arbeitshypothese ist nun, dass *A.b.* weitere periplasmatische Proteine besitzt, die den Transport von OMPs zum BAM-Komplex begleiten und daher ein K.O. von *surA* nicht mit so dramatischen Veränderungen einhergeht, wie in *E. coli* oder auch *P. aeruginosa* [133].

Wie schon in der Einleitung erwähnt, ist LptD ein OMP, das für die allermeisten Gram-negative Bakterien essenziell ist. Zusammen mit LptE bildet es einen Komplex zur Integration von LPS in die OM [125] und trägt damit zu einem sehr wesentlichen Teil zur Stabilität und der Bildung einer sehr effizienten Permeabilitätsbarriere der Außenmembran bei [145]. In *E.c.* ist der Einbau von LptD abhängig von SurA, führt zu einer Störung des LPS-Einbaus und verursacht dadurch multiple Phänotypen [121]. Interessant ist, dass *A.b.* in der Lage ist, eine Deletion von *lptD* zu überleben. Es zeigt sich bei deutlich reduziertem bis fehlendem Einbau von LPS in die Außenmembran zwar eine Veränderung in der Wachstumsdynamik und auch eine erhöhte Permeabilität der OM, aber der Verlust ist nicht letal [146]. Es wurde auch gezeigt, dass in *A.b.* ein SurA-unabhängiger Pathway zum Einbau von LptD bestehen muss [144]. Andere Gram-negative Erreger, wie auch *P.a.*, sind ohne LPS nicht überlebensfähig, oder sind nach einer Störung des LPS-Einbaus deutlich angreifbarer durch Antibiotika [147]. Durch den Verlust von LPS fehlt zudem der Angriffspunkt für die antibiotische Therapie mit Colistin [87]. Ein Überleben trotz LPS-Defizienz ist nicht nur bei *A.b.*, sondern auch bei *Neisseria meningitidis* möglich [132], [148], [149]. Mit Hilfe eines Infektionsmodells mit *G. mellonella* identifizierten Gebhardt et al. (2015) über 300 Gene, die für das Wachstum von *A.b.* in *G. mellonella* essenziell waren. Hier zeigten sich erstaunlicherweise bekannte Gene zum LPS Einbau wie *lptE* als nicht relevant [150]. Das ist erneut eine Parallele zu *N. meningitidis*. Worauf letztlich diese Fähigkeit auf zellulärer und molekularer Ebene basiert, ist jedoch noch nicht völlig verstanden. Festzuhalten bleibt, dass in *E.c.* viele Effekte eines SurA-Knockouts oder einer SurA-Inhibition auf einen

gestörtes LPS-Einbau zurückzuführen sind. Da *A.b.* im Gegensatz zu *E.c.* auch ohne LPS in der OM lebensfähig ist, hat ein Verlust von SurA in *A.b.* hier zunächst keine so dramatischen Auswirkungen.

Wie aber können OMPs in Abwesenheit von SurA in die OM von *A.b.* gelangen? Hierzu müssten alternative Transportsysteme und Chaperons vorhanden sein, um OMPs in entfaltetem Zustand von der inneren Membran (IM) zur OM zu bringen. Wang et al. (2016) brachten ein Modell eines integrierten Apparates zur Biogenese von OMPs auf. Im Gegensatz zu der Annahme, dass der BAM-Komplex in der OM und das SecYEG-Translokon in der IM als getrennte System zu betrachten sind, war die Idee, dass SurA nicht als freies Chaperon im periplasmatischen Raum anzusehen ist, sondern eine ständige Interaktion der P2 Domäne von SurA mit BamA und zur IM in Kontakt mit PpiD steht, ein inneres Membranprotein, das mit dem SecYEG-Translocon verbunden ist [151]. Alvira et al. (2020) diskutieren ein etwas fluideres Modell eines Superkomplexes, der von der IM zur OM eine Brücke schlägt. Hierzu muss ein Komplex aus SecYEG, SecDF und YidC in Interaktion mit periplasmatischen Chaperonen eine Verbindung zum Bam-Komplex herstellen. Die Rolle der Chaperone können sie mit ihrem Modell aber nicht erklären [152]. Beide Modelle eines Superkomplexes zum direkten Transfer durch den periplasmatischen Raum stellen dadurch das Konzept und damit auch die Bedeutung der Chaperons in Frage, werden aber in der Community sehr kontrovers diskutiert.

4.2 Struktur von SurA und Konformationsänderungen

Die Struktur von SurA scheint zur Aufrechterhaltung der Funktionen als Chaperon unterschiedliche Konformationen einzunehmen. Diese mögliche Dynamik wurde bereits durch Jia et al. (2020) postuliert. Mittels NMR-Spektroskopie zeigten sie eine dynamische Bewegung der beiden PPIase-Domänen. Sie postulieren zwei unterschiedliche Konformationszustände mit unterschiedlichen Positionen von P1 und P2 relativ zum NC-Core. In den jeweiligen Konformationen scheinen die Aktivitätszustände möglicherweise unterschiedlich zu sein [153]. Unsere Arbeitsgruppe untersuchte kürzlich mit Hilfe des gezielten Austauschs relevanter Aminosäuren in *E.c.* SurA die Funktion von

Salzbrücken, die SurA zwischen P2 und NC-Core ausbildet. Hier konnte im *in vitro* SurA Aktivitätsassay gezeigt werden, dass die Reduktion der Salzbrücken und die damit reduzierte Bindungsaffinität zwischen P2- und der NC-Domäne dazu führt, dass eine niedrigere Temperatur für die Aktivierung der Holdaseaktivität ausreicht. Hier kann, wie auch bei Jia et al. (2020) angenommen werden, dass die Flexibilität zwischen der P2- und der NC-Domäne entscheidend für diese Aktivität ist (Masterarbeit Janes Krusche und unveröffentlichte Daten der Arbeitsgruppe).

Ein weiterer Hinweis auf unterschiedliche Konformationen von SurA und der damit einhergehenden Funktionalität lieferten Schiffrin et al. (2022). Diese untersuchten die Interaktion zwischen dem BAM-Komplex und der Übergabe ungefalteter OMPs durch SurA. Es konnte gezeigt werden, dass beide PPIase-Domänen und die Kerndomäne NC entscheidend für die Interaktion sind. Vorrangig interagiert die C-Domäne von SurA mit den POTRA1 und 2 Domänen von BamA. Zudem verändert sich wohl die Konformation von SurA nach dem Kontakt mit dem BAM-Komplex [154]. Dies liefert erneut einen Hinweis darauf, dass SurA ein dynamisches periplasmatisches Protein ist und in unterschiedlichen Aktivitätszuständen vorliegt, die *in vitro* z. B. durch die Zuführung von Energie durch Erwärmung und *in vivo* durch Interaktionen mit anderen, an der Biomembranogenese beteiligten Proteinen hervorgerufen werden können.

Die OMPs werden vom Inneren der Zelle durch den Translokationskomplex aus SecYEG-SecDF-YidC (SEC Maschinerie) in den periplasmatischen Raum transportiert. Bisher gab es keine Kenntnisse darüber, was zwischen der Abgabe der ungefalteten OMPs vom SecYEG Komplex bis zum Faltungs- und Degradationsschutz durch Chaperone passiert. Troman et al. (2023) zeigten kürzlich eine direkte Interaktion zwischen der SEC Maschinerie und SurA. Die Autoren postulieren mit ihren Versuchen, dass SurA bereits während dem ATP-abhängigen Transport der OMPs in den periplasmatischen Raum seine Substrate direkt in Empfang nimmt und bindet. Dadurch ist sofort der Schutz vor

Degradation und Akkumulation gegeben und SurA begleitet die ungefalteten Intermediate zum BAM-Komplex, der in der OM verankert ist [155].

Die Struktur von SurA ist in vielen Gram-negativen Erregern hoch konserviert, in wenigen stark different (Abb. 31). Dies trägt zur Komplexität möglicher unterschiedlicher Dynamiken von SurA in unterschiedlichen Erregern bei und ist zu meinem Wissensstand bisher nur in *E.c.* untersucht. Diese Unterschiede können aber auch zu variablen Bindungsaffinitäten innerhalb der Domänen führen oder auch unterschiedliche Affinitäten zu verschiedenen Substraten bzw. OMPs, die für jeweilige Erreger wichtig sind.

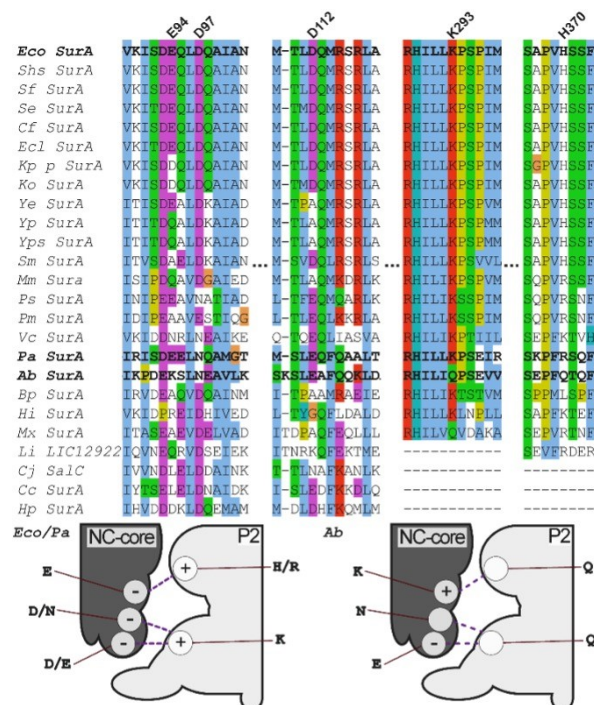


Abb. 31: Alignment von SurA Gram-negativer Erreger und Darstellung der Salzbrücken von *E.c./P.a.* sowie *A.b.* Oberer Teil der Abb. stellt ein erweitertes Alignment von SurA in Gram-negativen Erregern dar. Unterer Teil der Abb. zeigt links Salzbrücken in *E.c.* und *P.a.* und rechts Salzbrücken in *A.b.* zwischen NC-Core und P2-Domäne. (Grafik: Fabian Renschler)

A.b. zeigt weniger Salzbrücken zwischen den Domänen P2 und NC-Core und damit deutliche Unterschiede zu *E.c.* und *P.a.* SurA. Einerseits können wir mit unseren Ergebnissen die Hypothese aufstellen, dass durch die Strukturunterschiede die Konformationen von *A.b.* SurA sich von *E.c.* abweichend verhalten und dadurch der thermische Energieeintrag nicht zu einer Änderung des Konformationszustand verhilft, der von dieser Salzbrücke

stabilisiert wird. Folglich erklärt das Fehlen der Salzbrücke in *A.b.*, dass keine Holdasefunktion "aktiviert" werden konnte. Da aber sowohl für SurA_{EC} als auch SurA_{AB} eine Chaperonaktivität gezeigt werden konnte und diese von Medozin inhibiert wird (Abb. 29 und Abb. 30), ist anzunehmen, dass beide Proteine dennoch teilweise dieselben Funktionen ausführen können. Diese Erkenntnis ist wiederum konsistent mit den Beobachtungen von Birkle et al. (2022), die *in vivo* Unterschiede zwischen *E.c.* und *A.b.* aufgezeigt haben [144]. Interessant wäre nun zu untersuchen, ob die jeweiligen Proteine aus *A.b.*, *P.a.* und *E.c.* die Funktionen ihrer jeweiligen Homologe in den entsprechenden Knockoutmutanten komplementieren können. Dies würde ermöglichen, die Bedeutung der Salzbrücken zwischen P2 und NC-Core im Periplasma von lebenden Bakterien zu untersuchen.

Ein möglicher weiterer Forschungsansatz könnte sein, dass wir Salzbrücken in *A.b.* SurA durch Punktmutationen modifizieren, um die angenommene Aktivierung *in vitro* vornehmen zu können. Dies könnte die Salzbrücken-Hypothese weiter unterstützen.

Carbapenem-resistente *A.b.* bleiben weiterhin gefürchtete Erreger im klinischen Setting. Das Risiko für mögliche Ausbrüche in Krankenhäusern durch die ausgeprägte Umweltresistenz ist hoch. Die Folgen durch nosokomiale Infektionen für Patienten können fatale Verläufe nehmen, wenn keine Therapieoption mehr gegeben ist. Daher ist es sehr wichtig, neue potenzielle Wirkstofftargets in *A.b.* zu evaluieren. Dafür ist ein grundlegendes Verständnis über die intramolekularen Wechselwirkungen und damit die Regulation der Funktion und Aktivität von *A.b.* SurA essenziell.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass in Zusammenschau mit den während der Projektlaufzeit durch andere gewonnene Erkenntnisse über die sehr wahrscheinliche Existenz potenzieller weiterer Pathways zur Biomembranogenese von *A.b.*, das Chaperon SurA in *A.b.* wahrscheinlich kein geeignetes Target zur Antiinfektiva-Entwicklung ist. Somit ist es wichtig, den Fokus bei weiterer Forschung zu *A.b.* auf die noch nicht erkannten Pathways der OMPs zu legen, um damit mögliche Targets zur Entwicklung neuer Antiinfektiva

zu identifizieren. Allerdings haben die gewonnenen Erkenntnisse in Bezug auf die Dualität der Chaperon- und Holdase-Aktivitäten bei SurA-Proteinen in Gram-negativen Keimen zu einem besseren Verständnis von SurA über die Grenzen von *A.b.* hinweg verholfen und wichtige Hinweise auf die molekularen Mechanismen geliefert, die der Funktion und Regulation der Aktivität von SurA zugrunde liegen.

5 Zusammenfassung

Das periplasmatische Protein SurA trägt mit seiner Chaperonaktivität zur Verhinderung von Akkumulation und dem Schutz vor Degradation von Faltungsintermediaten von Außenmembranproteinen (OMP) bei. Die zur Außenmembran begleiteten und durch den BAM-Komplex eingebrachten OMPs sind maßgeblich für die Virulenz, Adhäsion, Antibiotika-Resistenz und Außenmembranpermeabilität Gram-negativer Bakterien verantwortlich. Der bisherige wissenschaftliche Fokus auf SurA bezieht sich hauptsächlich auf *Escherichia coli* (*E.c.*). Ergebnisse zu *Acinetobacter baumannii* (*A.b.*) SurA, sind bisher rar.

Mit dieser Arbeit wurde eine groß skalierte Expression von *A.b.* SurA etabliert und validiert, um damit die Aktivität von *A.b.* SurA an einem in unserem Labor etablierten *in vitro* Luciferase-Aktivitätsassay zu untersuchen. In einem weiteren Schritt sollte die Möglichkeit überprüft werden, ob ein bereits bei *E.c.* erfolgreich angewandter Inhibitor auch bei *A.b.* SurA eine Wirkung zeigt.

Das erfolgreich aufgereinigte *A.b.* SurA zeigt in den Aktivitätsassays keine wesentliche Funktionalität in der Interaktion zwischen thermisch aktiviertem SurA_{AB} und dem Substrat Luciferase. Die darauf angeschlossenen Versuche zur Inhibition durch Medozin, die bereits erfolgreich bei *E.c.* SurA eingesetzt wurde, konnte in dem Assay dadurch keine Inhibition zeigen. Unsere Testergebnisse bestätigen aber die wichtige Chaperonfunktion von *A.b.* SurA zur korrekten Faltung von Proteinen.

Mit heutigem Stand der Wissenschaft wissen wir, dass SurA von *A.b.* eine wahrscheinlich untergeordnete Rolle in der Aufrechterhaltung einer funktionierenden OM-Biogenese spielt. Die Struktur von *A.b.* SurA ist gegenüber SurA von *E.c.* mit weniger Salzbrücken ausgestattet. Dadurch kann *A.b.* SurA nicht thermisch in eine aktive Konformation überführt und stabilisiert werden, die zur Anwendung im Luciferase-Assay notwendig ist.

Diese Ergebnisse liefern dennoch einen wichtigen Beitrag zur Erkenntnis der postulierten dynamischen Konformationsmodelle von SurA.

Die postulierten dynamischen Konformationsmodelle zu *E.c.* SurA lassen sich gegebenenfalls nicht einfach auf *A.b.* übertragen. Aufgrund der unterschiedlichen Proteinsequenzen wird es vermutlich eine Vielzahl unterschiedlicher Bindungsaffinitäten innerhalb der SurA-Domänen und damit einer interspezifischen Vielfalt von Konformationsmöglichkeiten geben. Somit ist die erregerspezifische Untersuchung von SurA in weiteren Forschungsansätzen notwendig.

6 Literaturverzeichnis

- [1] C. Lübbert, L. Straube, C. Stein, O. Makarewicz, S. Schubert, J. Mössner, M. W. Pletz, und A. C. Rodloff, „Colonization with extended-spectrum beta-lactamase-producing and carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in international travelers returning to Germany“, *International Journal of Medical Microbiology*, Bd. 305, Nr. 1, S. 148–156, Jan. 2015, doi: 10.1016/j.ijmm.2014.12.001.
- [2] A. Kantele, T. Lääveri, S. Mero, K. Vilkmann, S. H. Pakkanen, J. Ollgren, J. Antikainen, und J. Kirveskari, „Antimicrobials Increase Travelers' Risk of Colonization by Extended-Spectrum Betalactamase-Producing Enterobacteriaceae“, *Clinical Infectious Diseases*, Bd. 60, Nr. 6, S. 837–846, März 2015, doi: 10.1093/cid/ciu957.
- [3] C. J. Murray *u. a.*, „Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis“, *The Lancet*, Bd. 399, Nr. 10325, S. 629–655, Feb. 2022, doi: 10.1016/S0140-6736(21)02724-0.
- [4] E. Tacconelli, E. Carrara, A. Savoldi, S. Harbarth, M. Mendelson, D. L. Monnet, C. Pulcini, G. Kahlmeter, J. Kluytmans, Y. Carmeli, M. Ouellette, K. Outtersson, J. Patel, M. Cavalieri, E. M. Cox, C. R. Houchens, M. L. Grayson, P. Hansen, N. Singh, U. Theuretzbacher, N. Magrini, und WHO Pathogens Priority List Working Group, „Discovery, research, and development of new antibiotics: the WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis“, *Lancet Infect Dis*, Bd. 18, Nr. 3, S. 318–327, März 2018, doi: 10.1016/S1473-3099(17)30753-3.
- [5] L. de la Maza, M. Pezzlo, C. Bittencourt, und E. Peterson, *Color Atlas of Medical Bacteriology*, Third Edition. Washington, DC: ASM Press, 2020.
- [6] P. J. M. Bouvet und P. A. D. Y. 1986 Grimont, „Taxonomy of the Genus *Acinetobacter* with the Recognition of *Acinetobacter baumannii* sp. nov., *Acinetobacter haemolyticus* sp. nov., *Acinetobacter johnsonii* sp. nov., and *Acinetobacter junii* sp. nov. and Emended Descriptions of *Acinetobacter calcoaceticus* and *Acinetobacter lwoffii*“, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, Bd. 36, Nr. 2, S. 228–240, doi: 10.1099/00207713-36-2-228.
- [7] P. P. Bosshard, R. Zbinden, S. Abels, B. Böddinghaus, M. Altwegg, und E. C. Böttger, „16S rRNA gene sequencing versus the API 20 NE system and the VITEK 2 ID-GNB card for identification of nonfermenting Gram-negative bacteria in the clinical laboratory“, *J Clin Microbiol*, Bd. 44, Nr. 4, S. 1359–1366, Apr. 2006, doi: 10.1128/JCM.44.4.1359-1366.2006.
- [8] B. E. W. Toh, D. L. Paterson, W. Kamolvit, H. Zowawi, D. Kvaskoff, H. Sidjabat, A. Wailan, A. Y. Peleg, und C. A. Huber, „Species identification within *Acinetobacter calcoaceticus-baumannii* complex using MALDI-TOF MS“, *J Microbiol Methods*, Bd. 118, S. 128–132, Nov. 2015, doi: 10.1016/j.mimet.2015.09.006.
- [9] C. L. Schoch, S. Ciuffo, M. Domrachev, C. L. Hotton, S. Kannan, R. Khovanskaya, D. Leipe, R. Mcveigh, K. O'Neill, B. Robbertse, S. Sharma, V. Soussov, J. P. Sullivan, L. Sun, S. Turner, und I. Karsch-Mizrachi, „NCBI Taxonomy: a comprehensive update on curation, resources and tools“, *Database*, Bd. 2020, S. baaa062, Jan. 2020, doi: 10.1093/database/baaa062.

- [10] S. Ewig, M. Kolditz, M. Pletz, A. Altiner, W. Albrich, D. Drömann, H. Flick, S. Gatermann, S. Krüger, W. Nehls, M. Panning, J. Rademacher, G. Rohde, J. Rupp, B. Schaaf, H.-J. Heppner, R. Krause, S. Ott, T. Welte, und M. Witznath, „Behandlung von erwachsenen Patienten mit ambulant erworbener Pneumonie – Update 2021: S3-Leitlinie der Deutschen Gesellschaft für Pneumologie und Beatmungsmedizin (DGP), der Paul-Ehrlich-Gesellschaft für Chemotherapie (PEG), der Deutschen Gesellschaft für Infektiologie (DGI), der Deutschen Gesellschaft für Internistische Intensivmedizin und Notfallmedizin (DGIIIN), der Gesellschaft für Virologie (GfV), des Kompetenznetzwerks CAPNETZ, der Deutschen Gesellschaft für Allgemeinmedizin (DEGAM), der Deutschen Gesellschaft für Geriatrie (DGG), der Deutschen Gesellschaft für Palliativmedizin (DGP), der Österreichischen Gesellschaft für Pneumologie (ÖGP), der Österreichischen Gesellschaft für Infektionskrankheiten und Tropenmedizin (ÖGIT), der Schweizerischen Gesellschaft für Pneumologie (SGP) und der Schweizerischen Gesellschaft für Infektiologie (SGInf)“, *Pneumologie*, Bd. 75, Nr. 09, S. 665–729, Sep. 2021, doi: 10.1055/a-1497-0693.
- [11] K. Sy, C. Si, und B. Jh, „Risk factors associated with bloodstream infection among patients colonized by multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*: A 7-year observational study in a general hospital“, *American journal of infection control*, Bd. 48, Nr. 5, Mai 2020, doi: 10.1016/j.ajic.2019.07.025.
- [12] J. Y. Jung, M. S. Park, S. E. Kim, B. H. Park, J. Y. Son, E. Y. Kim, J. E. Lim, S. K. Lee, S. H. Lee, K. J. Lee, Y. A. Kang, S. K. Kim, J. Chang, und Y. S. Kim, „Risk factors for multidrug resistant *Acinetobacter baumannii* bacteremia in patients with colonization in the intensive care unit“, *BMC Infect Dis*, Bd. 10, S. 228, Juli 2010, doi: 10.1186/1471-2334-10-228.
- [13] N. Yakut, E. K. Kepenekli, A. Karaaslan, S. Atici, G. Akkoc, S. O. Demir, A. Soysal, und M. Bakir, „Bacteremia due to *Acinetobacter ursingii* in infants: reports of two cases“, *The Pan African Medical Journal*, Bd. 23, Nr. 193, Art. Nr. 193, Apr. 2016, doi: 10.11604/pamj.2016.23.193.8545.
- [14] S. C. Ku, P. R. Hsueh, P. C. Yang, und K. T. Luh, „Clinical and microbiological characteristics of bacteremia caused by *Acinetobacter lwoffii*“, *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, Bd. 19, Nr. 7, S. 501–505, Juli 2000, doi: 10.1007/s100960000315.
- [15] R. Koch-Institut, „Infektionsepidemiologisches Jahrbuch meldepflichtiger Krankheiten für 2020“, S. 212, doi: 10.25646/8773.
- [16] N. Pfennigwerth und J. Schauer, „Bericht des Nationalen Referenzzentrums für gramnegative Krankenhauserreger – Zeitraum 1. Januar 2020 bis 31. Dezember 2020“, Nr. 36, S. 4–11, 2021, doi: 10.25646/8900.
- [17] D. Said, N. Willrich, O. Ayobami, I. Noll, T. Eckmanns, und R. Markwart, „The epidemiology of carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii* complex in Germany (2014-2018): an analysis of data from the national Antimicrobial Resistance Surveillance system“, *Antimicrob Resist Infect Control*, Bd. 10, Nr. 1, S. 45, März 2021, doi: 10.1186/s13756-021-00909-8.
- [18] J. M. Cisneros, C. M. Rosso-Fernández, C. Roca-Oporto, G. De Pascale, S. Jiménez-Jorge, E. Fernández-Hinojosa, D. K. Matthaiou, P. Ramírez, R. O. Díaz-Miguel, A. Estella, M. Antonelli, G. Dimopoulos, und J. Garnacho-Montero, „Colistin versus meropenem in the empirical treatment of ventilator-associated pneumonia (Magic Bullet study): an investigator-driven, open-label, randomized, noninferiority controlled trial“, *Crit Care*, Bd. 23, S. 383, Nov. 2019, doi: 10.1186/s13054-019-2627-y.
- [19] P. D. Lister, D. J. Wolter, und N. D. Hanson, „Antibacterial-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: clinical impact and complex regulation of chromosomally encoded resistance mechanisms“, *Clin Microbiol Rev*, Bd. 22, Nr. 4, S. 582–610, Okt. 2009, doi: 10.1128/CMR.00040-09.

- [20] R. A. Bonomo und D. Szabo, „Mechanisms of multidrug resistance in *Acinetobacter* species and *Pseudomonas aeruginosa*“, *Clin Infect Dis*, Bd. 43 Suppl 2, S. S49-56, Sep. 2006, doi: 10.1086/504477.
- [21] H. Lund-Palau, A. R. Turnbull, A. Bush, E. Bardin, L. Cameron, O. Soren, N. Wierre-Gore, E. W. F. W. Alton, J. G. Bundy, G. Connett, S. N. Faust, A. Filloux, P. Freemont, A. Jones, V. Khoo, S. Morales, R. Murphy, R. Pabary, A. Simbo, S. Schelenz, Z. Takats, J. Webb, H. D. Williams, und J. C. Davies, „*Pseudomonas aeruginosa* infection in cystic fibrosis: pathophysiological mechanisms and therapeutic approaches“, *Expert Rev Respir Med*, Bd. 10, Nr. 6, S. 685–697, Juni 2016, doi: 10.1080/17476348.2016.1177460.
- [22] K. Lee und S. S. Yoon, „*Pseudomonas aeruginosa* Biofilm, a Programmed Bacterial Life for Fitness“, *J Microbiol Biotechnol*, Bd. 27, Nr. 6, S. 1053–1064, Juni 2017, doi: 10.4014/jmb.1611.11056.
- [23] J. W. Sahl, J. D. Gillece, J. M. Schupp, V. G. Waddell, E. M. Driebe, D. M. Engelthaler, und P. Keim, „Evolution of a pathogen: a comparative genomics analysis identifies a genetic pathway to pathogenesis in *Acinetobacter*“, *PLoS One*, Bd. 8, Nr. 1, S. e54287, 2013, doi: 10.1371/journal.pone.0054287.
- [24] P. E. Fournier und H. Richet, „The epidemiology and control of *Acinetobacter baumannii* in health care facilities“, *Clin Infect Dis*, Bd. 42, Nr. 5, S. 692–699, März 2006, doi: 10.1086/500202.
- [25] L. Krizova, L. Dijkshoorn, und A. Nemeč, „Diversity and evolution of AbaR genomic resistance islands in *Acinetobacter baumannii* strains of European clone I“, *Antimicrob Agents Chemother*, Bd. 55, Nr. 7, S. 3201–3206, Juli 2011, doi: 10.1128/AAC.00221-11.
- [26] Y. Hu, J. Zheng, und J. Zhang, „Natural Transformation in *Acinetobacter baumannii* W068: A Genetic Analysis Reveals the Involvements of the CRP, XcpV, XcpW, TsaP, and TonB2“, *Frontiers in Microbiology*, Bd. 12, 2022, doi: 10.3389/fmicb.2021.738034.
- [27] G. A. Jacoby, „AmpC beta-lactamases“, *Clin Microbiol Rev*, Bd. 22, Nr. 1, S. 161–182, Table of Contents, Jan. 2009, doi: 10.1128/CMR.00036-08.
- [28] C. Héritier, L. Poirel, und P. Nordmann, „Cephalosporinase over-expression resulting from insertion of ISAba1 in *Acinetobacter baumannii*“, *Clin Microbiol Infect*, Bd. 12, Nr. 2, S. 123–130, Feb. 2006, doi: 10.1111/j.1469-0691.2005.01320.x.
- [29] A. P. Zavascki, C. G. Carvalhaes, R. C. Picão, und A. C. Gales, „Multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*: resistance mechanisms and implications for therapy“, *Expert Rev Anti Infect Ther*, Bd. 8, Nr. 1, S. 71–93, Jan. 2010, doi: 10.1586/eri.09.108.
- [30] M. Hamidian, J. J. Kenyon, K. E. Holt, D. Pickard, und R. M. Hall, „A conjugative plasmid carrying the carbapenem resistance gene blaOXA-23 in AbaR4 in an extensively resistant GC1 *Acinetobacter baumannii* isolate“, *J Antimicrob Chemother*, Bd. 69, Nr. 10, S. 2625–2628, Okt. 2014, doi: 10.1093/jac/dku188.
- [31] L. A. Gallagher, E. Ramage, E. J. Weiss, M. Radey, H. S. Hayden, K. G. Held, H. K. Huse, D. V. Zurawski, M. J. Brittnacher, und C. Manoil, „Resources for Genetic and Genomic Analysis of Emerging Pathogen *Acinetobacter baumannii*“, *Journal of Bacteriology*, Bd. 197, S. 2027–2035, Juni 2015, doi: 10.1128/jb.00131-15.
- [32] S. Rai, V. Manchanda, N. Singh, und I. Kaur, „Zinc-dependent carbapenemases in clinical isolates of family Enterobacteriaceae“, *Indian Journal of Medical Microbiology*, Bd. 29, Nr. 3, S. 275–279, Juli 2011, doi: 10.4103/0255-0857.83912.
- [33] D. Yong, M. A. Toleman, C. G. Giske, H. S. Cho, K. Sundman, K. Lee, und T. R. Walsh, „Characterization of a new metallo-beta-lactamase gene, bla(NDM-1), and a novel erythromycin esterase gene carried on a unique genetic structure in *Klebsiella pneumoniae* sequence type 14 from India“, *Antimicrob Agents Chemother*, Bd. 53, Nr. 12, S. 5046–5054, Dez. 2009, doi: 10.1128/AAC.00774-09.

- [34] K. K. Kumarasamy, M. A. Toleman, T. R. Walsh, J. Bagaria, F. Butt, R. Balakrishnan, U. Chaudhary, M. Doumith, C. G. Giske, S. Irfan, P. Krishnan, A. V. Kumar, S. Maharjan, S. Mushtaq, T. Noorie, D. L. Paterson, A. Pearson, C. Perry, R. Pike, B. Rao, U. Ray, J. B. Sarma, M. Sharma, E. Sheridan, M. A. Thirunarayan, J. Turton, S. Upadhyay, M. Warner, W. Welfare, D. M. Livermore, and N. Woodford, „Emergence of a new antibiotic resistance mechanism in India, Pakistan, and the UK: a molecular, biological, and epidemiological study“, *The Lancet Infectious Diseases*, Bd. 10, Nr. 9, S. 597–602, Sep. 2010, doi: 10.1016/S1473-3099(10)70143-2.
- [35] M. Nikibakhsh, F. Firoozeh, F. Badmasti, K. Kabir, und M. Zibaei, „Molecular study of metallo- β -lactamases and integrons in *Acinetobacter baumannii* isolates from burn patients“, *BMC Infect Dis*, Bd. 21, Nr. 1, Art. Nr. 1, Dez. 2021, doi: 10.1186/s12879-021-06513-w.
- [36] U. Leungtongkam, R. Thummeepak, K. Tasanapak, und S. Sitthisak, „Acquisition and transfer of antibiotic resistance genes in association with conjugative plasmid or class 1 integrons of *Acinetobacter baumannii*“, *PLOS ONE*, Bd. 13, Nr. 12, S. e0208468, Dez. 2018, doi: 10.1371/journal.pone.0208468.
- [37] S. Magnet, P. Courvalin, und T. Lambert, „Resistance-Nodulation-Cell Division-Type Efflux Pump Involved in Aminoglycoside Resistance in *Acinetobacter baumannii* Strain BM4454“, *Antimicrob Agents Chemother*, Bd. 45, Nr. 12, S. 3375–3380, Dez. 2001, doi: 10.1128/AAC.45.12.3375-3380.2001.
- [38] P. Verma, P. Maurya, M. Tiwari, und V. Tiwari, „In-silico interaction studies suggest RND efflux pump mediates polymyxin resistance in *Acinetobacter baumannii*“, *J Biomol Struct Dyn*, Bd. 37, Nr. 1, S. 95–103, Jan. 2019, doi: 10.1080/07391102.2017.1418680.
- [39] K. A. Hassan, S. M. Jackson, A. Penesyan, S. G. Patching, S. G. Tetu, B. A. Eijkelkamp, M. H. Brown, P. J. F. Henderson, und Ian. T. Paulsen, „Transcriptomic and biochemical analyses identify a family of chlorhexidine efflux proteins“, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, Bd. 110, Nr. 50, S. 20254–20259, Dez. 2013, doi: 10.1073/pnas.1317052110.
- [40] P. Wiczorek, P. Sacha, T. Hauschild, M. Zórawski, M. Krawczyk, und E. Tryniszewska, „Multidrug resistant *Acinetobacter baumannii* - the role of AdeABC (RND family) efflux pump in resistance to antibiotics“, *Folia Histochem Cytobiol*, Bd. 46, Nr. 3, S. 257–267, 2008, doi: 10.2478/v10042-008-0056-x.
- [41] I. Marchand, L. Damier-Piolle, P. Courvalin, und T. Lambert, „Expression of the RND-type efflux pump AdeABC in *Acinetobacter baumannii* is regulated by the AdeRS two-component system“, *Antimicrob Agents Chemother*, Bd. 48, Nr. 9, S. 3298–3304, Sep. 2004, doi: 10.1128/AAC.48.9.3298-3304.2004.
- [42] M.-F. Lin, Y.-Y. Lin, C.-C. Tu, und C.-Y. Lan, „Distribution of different efflux pump genes in clinical isolates of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* and their correlation with antimicrobial resistance“, *J Microbiol Immunol Infect*, Bd. 50, Nr. 2, S. 224–231, Apr. 2017, doi: 10.1016/j.jmii.2015.04.004.
- [43] J. Vila, S. Martí, und J. Sánchez-Céspedes, „Porins, efflux pumps and multidrug resistance in *Acinetobacter baumannii*“, *J Antimicrob Chemother*, Bd. 59, Nr. 6, S. 1210–1215, Juni 2007, doi: 10.1093/jac/dkl509.
- [44] E. Sugawara und H. Nikaido, „OmpA is the principal nonspecific slow porin of *Acinetobacter baumannii*“, *J Bacteriol*, Bd. 194, Nr. 15, S. 4089–4096, Aug. 2012, doi: 10.1128/JB.00435-12.
- [45] A. S. Limansky, M. A. Mussi, und A. M. Viale, „Loss of a 29-kilodalton outer membrane protein in *Acinetobacter baumannii* is associated with imipenem resistance“, *J Clin Microbiol*, Bd. 40, Nr. 12, S. 4776–4778, Dez. 2002, doi: 10.1128/JCM.40.12.4776-4778.2002.

- [46] S. Zhang, Y. Wang, J. Lu, Z. Yu, H. Song, P. L. Bond, and J. Guo, „Chlorine disinfection facilitates natural transformation through ROS-mediated oxidative stress“, *ISME J*, Bd. 15, Nr. 10, S. 2969–2985, Okt. 2021, doi: 10.1038/s41396-021-00980-4.
- [47] L. C. S. Antunes, F. Imperi, A. Carattoli, and P. Visca, „Deciphering the Multifactorial Nature of *Acinetobacter baumannii* Pathogenicity“, *PLOS ONE*, Bd. 6, Nr. 8, S. e22674, Aug. 2011, doi: 10.1371/journal.pone.0022674.
- [48] M. Giannouli, L. C. S. Antunes, V. Marchetti, M. Triassi, P. Visca, and R. Zarrilli, „Virulence-related traits of epidemic *Acinetobacter baumannii* strains belonging to the international clonal lineages I-III and to the emerging genotypes ST25 and ST78“, *BMC Infect Dis*, Bd. 13, S. 282, Juni 2013, doi: 10.1186/1471-2334-13-282.
- [49] N. E. Scott, R. L. Kinsella, A. V. G. Edwards, M. R. Larsen, S. Dutta, J. Saba, L. J. Foster, und M. F. Feldman, „Diversity Within the O-linked Protein Glycosylation Systems of *Acinetobacter* Species“, *Mol Cell Proteomics*, Bd. 13, Nr. 9, S. 2354–2370, Sep. 2014, doi: 10.1074/mcp.M114.038315.
- [50] J. M. Boll, A. T. Tucker, D. R. Klein, A. M. Beltran, J. S. Brodbelt, B. W. Davies, und M. S. Trent, „Reinforcing Lipid A Acylation on the Cell Surface of *Acinetobacter baumannii* Promotes Cationic Antimicrobial Peptide Resistance and Desiccation Survival“, *mBio*, Bd. 6, Nr. 3, S. e00478-00415, Mai 2015, doi: 10.1128/mBio.00478-15.
- [51] N. Safdar und D. G. Maki, „The pathogenesis of catheter-related bloodstream infection with noncuffed short-term central venous catheters“, *Intensive Care Med*, Bd. 30, Nr. 1, S. 62–67, Jan. 2004, doi: 10.1007/s00134-003-2045-z.
- [52] R. C. Patel, S. P. Sahgal, S. Mortazavi, Y. K. Vyas, R. J. Adam, und V. S. Antonios, „Hematogenous Osteomyelitis by *Acinetobacter baumannii*: Case Report and Literature Review“, *World Journal of AIDS*, Bd. 01, Nr. 02, Art. Nr. 02, Juni 2011, doi: 10.4236/wja.2011.12004.
- [53] T. W. Loehfelm, N. R. Luke, und A. A. Campagnari, „Identification and characterization of an *Acinetobacter baumannii* biofilm-associated protein“, *J Bacteriol*, Bd. 190, Nr. 3, S. 1036–1044, Feb. 2008, doi: 10.1128/JB.01416-07.
- [54] E. De Gregorio, M. Del Franco, M. Martinucci, E. Roscetto, R. Zarrilli, und P. P. Di Nocera, „Biofilm-associated proteins: news from *Acinetobacter*“, *BMC Genomics*, Bd. 16, Nr. 1, Art. Nr. 1, Dez. 2015, doi: 10.1186/s12864-015-2136-6.
- [55] C. M. Harding, S. W. Hennon, und M. F. Feldman, „Uncovering the mechanisms of *Acinetobacter baumannii* virulence“, *Nat Rev Microbiol*, Bd. 16, Nr. 2, Art. Nr. 2, Feb. 2018, doi: 10.1038/nrmicro.2017.148.
- [56] A. H. K. Choi, L. Slamti, F. Y. Avci, G. B. Pier, und T. Maira-Litrán, „The pgaABCD locus of *Acinetobacter baumannii* encodes the production of poly-beta-1-6-N-acetylglucosamine, which is critical for biofilm formation“, *J Bacteriol*, Bd. 191, Nr. 19, S. 5953–5963, Okt. 2009, doi: 10.1128/JB.00647-09.
- [57] T. A. Russo, N. R. Luke, J. M. Beanan, R. Olson, S. L. Sauberman, U. MacDonald, L. W. Schultz, T. C. Umland, und A. A. Campagnari, „The K1 capsular polysaccharide of *Acinetobacter baumannii* strain 307-0294 is a major virulence factor“, *Infect Immun*, Bd. 78, Nr. 9, S. 3993–4000, Sep. 2010, doi: 10.1128/IAI.00366-10.
- [58] S. Vijayakumar, S. Rajenderan, S. Laishram, S. Anandan, V. Balaji, und I. Biswas, „Biofilm Formation and Motility Depend on the Nature of the *Acinetobacter baumannii* Clinical Isolates“, *Front Public Health*, Bd. 4, S. 105, 2016, doi: 10.3389/fpubh.2016.00105.
- [59] G. Wilharm, J. Piesker, M. Laue, und E. Skiebe, „DNA uptake by the nosocomial pathogen *Acinetobacter baumannii* occurs during movement along wet surfaces“, *J Bacteriol*, Bd. 195, Nr. 18, S. 4146–4153, Sep. 2013, doi: 10.1128/JB.00754-13.
- [60] J. S. Mattick, „Type IV pili and twitching motility“, *Annu Rev Microbiol*, Bd. 56, S. 289–314, 2002, doi: 10.1146/annurev.micro.56.012302.160938.

- [61] K. M. Clemmer, R. A. Bonomo, und P. N. Rather, „Genetic analysis of surface motility in *Acinetobacter baumannii*“, *Microbiology*, Bd. 157, Nr. 9, S. 2534–2544, Sep. 2011, doi: 10.1099/mic.0.049791-0.
- [62] T. J. Herdendorf, D. R. McCaslin, und K. T. Forest, „Aquifex aeolicus PilT, homologue of a surface motility protein, is a thermostable oligomeric NTPase“, *J Bacteriol*, Bd. 184, Nr. 23, S. 6465–6471, Dez. 2002, doi: 10.1128/JB.184.23.6465-6471.2002.
- [63] A. Gribun, Y. Nitzan, I. Pechatnikov, G. Hershkovits, und D. J. Katcoff, „Molecular and Structural Characterization of the HMP-AB Gene Encoding a Pore-Forming Protein from a Clinical Isolate of *Acinetobacter baumannii*“, *Curr Microbiol*, Bd. 47, Nr. 5, S. 434–443, Okt. 2003, doi: 10.1007/s00284-003-4050-4.
- [64] Y. Smani, M. J. McConnell, und J. Pachón, „Role of Fibronectin in the Adhesion of *Acinetobacter baumannii* to Host Cells“, *PLOS ONE*, Bd. 7, Nr. 4, S. e33073, Apr. 2012, doi: 10.1371/journal.pone.0033073.
- [65] C. H. Choi, J. S. Lee, Y. C. Lee, T. I. Park, und J. C. Lee, „*Acinetobacter baumannii* invades epithelial cells and outer membrane protein A mediates interactions with epithelial cells“, *BMC Microbiol*, Bd. 8, Nr. 1, Art. Nr. 1, Dez. 2008, doi: 10.1186/1471-2180-8-216.
- [66] C. H. Choi, E. Y. Lee, Y. C. Lee, T. I. Park, H. J. Kim, S. H. Hyun, S. A. Kim, S.-K. Lee, und J. C. Lee, „Outer membrane protein 38 of *Acinetobacter baumannii* localizes to the mitochondria and induces apoptosis of epithelial cells“, *Cellular Microbiology*, Bd. 7, Nr. 8, S. 1127–1138, 2005, doi: 10.1111/j.1462-5822.2005.00538.x.
- [67] A. Shadan, A. Pathak, Y. Ma, R. Pathania, und R. P. Singh, „Deciphering the virulence factors, regulation, and immune response to *Acinetobacter baumannii* infection“, *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, Bd. 13, 2023, doi: 10.3389/fcimb.2023.1053968.
- [68] C. Rumbo, M. Tomás, E. Fernández Moreira, N. C. Soares, M. Carvajal, E. Santillana, A. Beceiro, A. Romero, und G. Bou, „The *Acinetobacter baumannii* Omp33-36 Porin Is a Virulence Factor That Induces Apoptosis and Modulates Autophagy in Human Cells“, *Infection and Immunity*, Bd. 82, Nr. 11, S. 4666–4680, Okt. 2014, doi: 10.1128/iai.02034-14.
- [69] Y. Smani, J. Dominguez-Herrera, und J. Pachon, „Association of the Outer Membrane Protein Omp33 With Fitness and Virulence of *Acinetobacter baumannii*“, *Journal of Infectious Diseases*, Bd. 208, Nr. 10, S. 1561–1570, Nov. 2013, doi: 10.1093/infdis/jit386.
- [70] W. Huang, Y. Yao, S. Wang, Y. Xia, X. Yang, Q. Long, W. Sun, C. Liu, Y. Li, X. Chu, H. Bai, Y. Yao, und Y. Ma, „Immunization with a 22-kDa outer membrane protein elicits protective immunity to multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*“, *Sci Rep*, Bd. 6, Nr. 1, Art. Nr. 1, Feb. 2016, doi: 10.1038/srep20724.
- [71] S. Cook-Libin, E. M. E. Sykes, V. Kornelsen, und A. Kumar, „Iron Acquisition Mechanisms and Their Role in the Virulence of *Acinetobacter baumannii*“, *Infect Immun*, Bd. 90, Nr. 10, S. e0022322, Okt. 2022, doi: 10.1128/iai.00223-22.
- [72] L. C. S. Antunes, F. Imperi, K. J. Towner, und P. Visca, „Genome-assisted identification of putative iron-utilization genes in *Acinetobacter baumannii* and their distribution among a genotypically diverse collection of clinical isolates“, *Research in Microbiology*, Bd. 162, Nr. 3, S. 279–284, Apr. 2011, doi: 10.1016/j.resmic.2010.10.010.
- [73] T. J. Bateman, M. Shah, T. P. Ho, H. E. Shin, C. Pan, G. Harris, J. E. Fegan, E. A. Islam, S. K. Ahn, Y. Hooda, S. D. Gray-Owen, W. Chen, und T. F. Moraes, „A Slam-dependent hemophore contributes to heme acquisition in the bacterial pathogen *Acinetobacter baumannii*“, *Nat Commun*, Bd. 12, Nr. 1, Art. Nr. 1, Nov. 2021, doi: 10.1038/s41467-021-26545-9.

- [74] C. M. Harding, M. R. Pulido, G. D. Venanzio, R. L. Kinsella, A. I. Webb, N. E. Scott, J. Pachón, und M. F. Feldman, „Pathogenic *Acinetobacter* species have a functional type I secretion system and contact-dependent inhibition systems“, *Journal of Biological Chemistry*, Bd. 292, Nr. 22, S. 9075–9087, Juni 2017, doi: 10.1074/jbc.M117.781575.
- [75] L. V. Bentancor, A. Camacho-Peiro, C. Bozkurt-Guzel, G. B. Pier, und T. Maira-Litrán, „Identification of Ata, a Multifunctional Trimeric Autotransporter of *Acinetobacter baumannii*“, *Journal of Bacteriology*, Bd. 194, Nr. 15, S. 3950–3960, Juli 2012, doi: 10.1128/jb.06769-11.
- [76] M. Weidensdorfer, J. I. Chae, C. Makobe, J. Stahl, B. Averhoff, V. Müller, C. Schürmann, R. P. Brandes, G. Wilharm, W. Ballhorn, S. Christ, D. Linke, D. Fischer, S. Göttig, und V. A. J. Kempf, „Analysis of Endothelial Adherence of *Bartonella henselae* and *Acinetobacter baumannii* Using a Dynamic Human Ex Vivo Infection Model“, *Infection and Immunity*, Bd. 84, Nr. 3, S. 711–722, Feb. 2016, doi: 10.1128/iai.01502-15.
- [77] M. Zahn, T. D’Agostino, E. Eren, A. Baslé, M. Ceccarelli, und B. van den Berg, „Small-Molecule Transport by CarO, an Abundant Eight-Stranded β -Barrel Outer Membrane Protein from *Acinetobacter baumannii*“, *Journal of Molecular Biology*, Bd. 427, Nr. 14, S. 2329–2339, Juli 2015, doi: 10.1016/j.jmb.2015.03.016.
- [78] M. A. Mussi, V. M. Relling, A. S. Limansky, und A. M. Viale, „CarO, an *Acinetobacter baumannii* outer membrane protein involved in carbapenem resistance, is essential for l-ornithine uptake“, *FEBS Letters*, Bd. 581, Nr. 29, S. 5573–5578, Dez. 2007, doi: 10.1016/j.febslet.2007.10.063.
- [79] M. Catel-Ferreira, G. Coadou, V. Molle, P. Mugnier, P. Nordmann, A. Siroy, T. Jouenne, und E. Dé, „Structure–function relationships of CarO, the carbapenem resistance-associated outer membrane protein of *Acinetobacter baumannii*“, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, Bd. 66, Nr. 9, S. 2053–2056, Sep. 2011, doi: 10.1093/jac/dkr267.
- [80] H. Nikaido, „Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited“, *Microbiol Mol Biol Rev*, Bd. 67, Nr. 4, S. 593–656, Dez. 2003, doi: 10.1128/MMBR.67.4.593-656.2003.
- [81] T. J. Silhavy, D. Kahne, und S. Walker, „The bacterial cell envelope“, *Cold Spring Harb Perspect Biol*, Bd. 2, Nr. 5, S. a000414, Mai 2010, doi: 10.1101/cshperspect.a000414.
- [82] M. P. Bos, V. Robert, und J. Tommassen, „Biogenesis of the gram-negative bacterial outer membrane“, *Annu Rev Microbiol*, Bd. 61, S. 191–214, 2007, doi: 10.1146/annurev.micro.61.080706.093245.
- [83] W. Vollmer und J.-V. Höltje, „The architecture of the murein (peptidoglycan) in gram-negative bacteria: vertical scaffold or horizontal layer(s)?“, *J Bacteriol*, Bd. 186, Nr. 18, S. 5978–5987, Sep. 2004, doi: 10.1128/JB.186.18.5978-5987.2004.
- [84] P. Sperandeo, A. M. Martorana, und A. Polissi, „Lipopolysaccharide biogenesis and transport at the outer membrane of Gram-negative bacteria“, *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids*, Bd. 1862, Nr. 11, S. 1451–1460, Nov. 2017, doi: 10.1016/j.bbalip.2016.10.006.
- [85] A. H. Delcour, „Outer membrane permeability and antibiotic resistance“, *Biochim Biophys Acta*, Bd. 1794, Nr. 5, S. 808–816, Mai 2009, doi: 10.1016/j.bbapap.2008.11.005.
- [86] G. Zhang, T. C. Meredith, und D. Kahne, „On the essentiality of lipopolysaccharide to Gram-negative bacteria“, *Curr Opin Microbiol*, Bd. 16, Nr. 6, S. 779–785, Dez. 2013, doi: 10.1016/j.mib.2013.09.007.
- [87] J. H. Moffatt, M. Harper, P. Harrison, J. D. F. Hale, E. Vinogradov, T. Seemann, R. Henry, B. Crane, F. St Michael, A. D. Cox, B. Adler, R. L. Nation, J. Li, und J. D. Boyce, „Colistin resistance in *Acinetobacter baumannii* is mediated by complete loss of lipopolysaccharide production“, *Antimicrob Agents Chemother*, Bd. 54, Nr. 12, S. 4971–4977, Dez. 2010, doi: 10.1128/AAC.00834-10.

- [88] M. J. Powers und M. S. Trent, „Expanding the paradigm for the outer membrane: *Acinetobacter baumannii* in the absence of endotoxin“, *Mol Microbiol*, Bd. 107, Nr. 1, S. 47–56, Jan. 2018, doi: 10.1111/mmi.13872.
- [89] G. E. Schulz, „The structure of bacterial outer membrane proteins“, *Biochim Biophys Acta*, Bd. 1565, Nr. 2, S. 308–317, Okt. 2002, doi: 10.1016/s0005-2736(02)00577-1.
- [90] R. Koebnik, K. P. Locher, und P. Van Gelder, „Structure and function of bacterial outer membrane proteins: barrels in a nutshell“, *Mol Microbiol*, Bd. 37, Nr. 2, S. 239–253, Juli 2000, doi: 10.1046/j.1365-2958.2000.01983.x.
- [91] A. Tsirigotaki, J. De Geyter, N. Šoštarić, A. Economou, und S. Karamanou, „Protein export through the bacterial Sec pathway“, *Nat Rev Microbiol*, Bd. 15, Nr. 1, S. 21–36, Jan. 2017, doi: 10.1038/nrmicro.2016.161.
- [92] B. Van den Berg, W. M. Clemons, I. Collinson, Y. Modis, E. Hartmann, S. C. Harrison, und T. A. Rapoport, „X-ray structure of a protein-conducting channel“, *Nature*, Bd. 427, Nr. 6969, S. 36–44, Jan. 2004, doi: 10.1038/nature02218.
- [93] R. J. Schulze, J. Komar, M. Botte, W. J. Allen, S. Whitehouse, V. A. M. Gold, J. A. Lycklama A Nijeholt, K. Huard, I. Berger, C. Schaffitzel, und I. Collinson, „Membrane protein insertion and proton-motive-force-dependent secretion through the bacterial holo-translocon SecYEG-SecDF-YajC-YidC“, *Proc Natl Acad Sci U S A*, Bd. 111, Nr. 13, S. 4844–4849, Apr. 2014, doi: 10.1073/pnas.1315901111.
- [94] N. Harms, G. Koningstein, W. Dontje, M. Muller, B. Oudega, J. Luirink, und H. de Cock, „The early interaction of the outer membrane protein phoE with the periplasmic chaperone Skp occurs at the cytoplasmic membrane“, *J Biol Chem*, Bd. 276, Nr. 22, S. 18804–18811, Juni 2001, doi: 10.1074/jbc.M011194200.
- [95] N. Noinaj, J. C. Gumbart, und S. K. Buchanan, „The β -barrel assembly machinery in motion“, *Nat Rev Microbiol*, Bd. 15, Nr. 4, S. 197–204, Apr. 2017, doi: 10.1038/nrmicro.2016.191.
- [96] S. Behrens-Kneip, „The role of SurA factor in outer membrane protein transport and virulence“, *Int. J. Med. Microbiol.*, Bd. 300, Nr. 7, S. 421–428, Nov. 2010, doi: 10.1016/j.ijmm.2010.04.012.
- [97] P. E. Rouvière und C. A. Gross, „SurA, a periplasmic protein with peptidyl-prolyl isomerase activity, participates in the assembly of outer membrane porins“, *Genes Dev*, Bd. 10, Nr. 24, S. 3170–3182, Dez. 1996, doi: 10.1101/gad.10.24.3170.
- [98] A. Tormo, M. Almirón, und R. Kolter, „surA, an *Escherichia coli* gene essential for survival in stationary phase.“, *Journal of Bacteriology*, Bd. 172, Nr. 8, S. 4339–4347, Aug. 1990, doi: 10.1128/jb.172.8.4339-4347.1990.
- [99] S. W. Lazar und R. Kolter, „SurA assists the folding of *Escherichia coli* outer membrane proteins“, *J Bacteriol*, Bd. 178, Nr. 6, S. 1770–1773, März 1996, doi: 10.1128/jb.178.6.1770-1773.1996.
- [100] D. Missiakas, J. M. Betton, und S. Raina, „New components of protein folding in extracytoplasmic compartments of *Escherichia coli* SurA, FkpA and Skp/OmpH“, *Mol Microbiol*, Bd. 21, Nr. 4, S. 871–884, Aug. 1996, doi: 10.1046/j.1365-2958.1996.561412.x.
- [101] R. Chen und U. Henning, „A periplasmic protein (Skp) of *Escherichia coli* selectively binds a class of outer membrane proteins“, *Mol Microbiol*, Bd. 19, Nr. 6, S. 1287–1294, März 1996, doi: 10.1111/j.1365-2958.1996.tb02473.x.
- [102] A. N. Combs und T. J. Silhavy, „The sacrificial adaptor protein Skp functions to remove stalled substrates from the β -barrel assembly machine“, *Proc Natl Acad Sci U S A*, Bd. 119, Nr. 1, S. e2114997119, Jan. 2022, doi: 10.1073/pnas.2114997119.

- [103] K. Denoncin, J. Schwalm, D. Vertommen, T. J. Silhavy, und J.-F. Collet, „Dissecting the *Escherichia coli* periplasmic chaperone network using differential proteomics“, *Proteomics*, Bd. 12, Nr. 9, S. 1391–1401, Mai 2012, doi: 10.1002/pmic.201100633.
- [104] B. Lipinska, M. Zylicz, und C. Georgopoulos, „The HtrA (DegP) protein, essential for *Escherichia coli* survival at high temperatures, is an endopeptidase“, *J Bacteriol*, Bd. 172, Nr. 4, S. 1791–1797, Apr. 1990, doi: 10.1128/jb.172.4.1791-1797.1990.
- [105] C. Spiess, A. Beil, und M. Ehrmann, „A temperature-dependent switch from chaperone to protease in a widely conserved heat shock protein“, *Cell*, Bd. 97, Nr. 3, S. 339–347, Apr. 1999, doi: 10.1016/s0092-8674(00)80743-6.
- [106] T. Krojer, M. Garrido-Franco, R. Huber, M. Ehrmann, und T. Clausen, „Crystal structure of DegP (HtrA) reveals a new protease-chaperone machine“, *Nature*, Bd. 416, Nr. 6879, S. 455–459, März 2002, doi: 10.1038/416455a.
- [107] X. Ge, R. Wang, J. Ma, Y. Liu, A. N. Ezemaduka, P. R. Chen, X. Fu, und Z. Chang, „DegP primarily functions as a protease for the biogenesis of β -barrel outer membrane proteins in the Gram-negative bacterium *Escherichia coli*“, *FEBS J*, Bd. 281, Nr. 4, S. 1226–1240, Feb. 2014, doi: 10.1111/febs.12701.
- [108] K. L. Strauch, K. Johnson, und J. Beckwith, „Characterization of degP, a gene required for proteolysis in the cell envelope and essential for growth of *Escherichia coli* at high temperature“, *J Bacteriol*, Bd. 171, Nr. 5, S. 2689–2696, Mai 1989, doi: 10.1128/jb.171.5.2689-2696.1989.
- [109] S. E. Ades, „Regulation by destruction: design of the sigmaE envelope stress response“, *Curr Opin Microbiol*, Bd. 11, Nr. 6, S. 535–540, Dez. 2008, doi: 10.1016/j.mib.2008.10.004.
- [110] J. C. Malinverni und T. J. Silhavy, „Assembly of Outer Membrane β -Barrel Proteins: the Bam Complex“, *EcoSal Plus*, Bd. 4, Nr. 2, S. 10.1128/ecosalplus.4.3.8, Dez. 2011, doi: 10.1128/ecosalplus.4.3.8.
- [111] T. Wu, J. Malinverni, N. Ruiz, S. Kim, T. J. Silhavy, und D. Kahne, „Identification of a Multicomponent Complex Required for Outer Membrane Biogenesis in *Escherichia coli*“, *Cell*, Bd. 121, Nr. 2, S. 235–245, Apr. 2005, doi: 10.1016/j.cell.2005.02.015.
- [112] F. H. Alcock, J. G. Grossmann, I. E. Gentle, V. A. Likić, T. Lithgow, und K. Tokatlidis, „Conserved substrate binding by chaperones in the bacterial periplasm and the mitochondrial intermembrane space“, *Biochemical Journal*, Bd. 409, Nr. 2, S. 377–387, Dez. 2007, doi: 10.1042/BJ20070877.
- [113] J. R. Humes, B. Schiffrin, A. N. Calabrese, A. J. Higgins, D. R. Westhead, D. J. Brockwell, und S. E. Radford, „The Role of SurA PPLase Domains in Preventing Aggregation of the Outer-Membrane Proteins tOmpA and OmpT“, *Journal of Molecular Biology*, Bd. 431, Nr. 6, S. 1267–1283, März 2019, doi: 10.1016/j.jmb.2019.01.032.
- [114] S. W. Lazar, M. Almirón, A. Tormo, und R. Kolter, „Role of the *Escherichia coli* SurA protein in stationary-phase survival“, *J. Bacteriol.*, Bd. 180, Nr. 21, S. 5704–5711, Nov. 1998.
- [115] S. Behrens, R. Maier, H. de Cock, F. X. Schmid, und C. A. Gross, „The SurA periplasmic PPLase lacking its parvulin domains functions in vivo and has chaperone activity“, *EMBO J*, Bd. 20, Nr. 1–2, S. 285–294, Jan. 2001, doi: 10.1093/emboj/20.1.285.
- [116] A. N. Calabrese, B. Schiffrin, M. Watson, T. K. Karamanos, M. Walko, J. R. Humes, J. E. Horne, P. White, A. J. Wilson, A. C. Kalli, R. Tuma, A. E. Ashcroft, D. J. Brockwell, und S. E. Radford, „Inter-domain dynamics in the chaperone SurA and multi-site binding to its outer membrane protein clients“, *Nat Commun*, Bd. 11, Nr. 1, Art. Nr. 1, Mai 2020, doi: 10.1038/s41467-020-15702-1.

- [117] A. M. Waterhouse, J. B. Procter, D. M. A. Martin, M. Clamp, und G. J. Barton, „Jalview Version 2—a multiple sequence alignment editor and analysis workbench“, *Bioinformatics*, Bd. 25, Nr. 9, S. 1189–1191, Mai 2009, doi: 10.1093/bioinformatics/btp033.
- [118] E. Bitto und D. B. McKay, „The Periplasmic Molecular Chaperone Protein SurA Binds a Peptide Motif That Is Characteristic of Integral Outer Membrane Proteins“, *J. Biol. Chem.*, Bd. 278, Nr. 49, S. 49316–49322, Mai 2003, doi: 10.1074/jbc.M308853200.
- [119] E. Bitto und D. B. McKay, „Crystallographic structure of SurA, a molecular chaperone that facilitates folding of outer membrane porins“, *Structure*, Bd. 10, Nr. 11, S. 1489–1498, Nov. 2002, doi: 10.1016/S0969-2126(02)00877-8.
- [120] G. R. Soltes, J. Schwalm, D. P. Ricci, und T. J. Silhavy, „The Activity of *Escherichia coli* Chaperone SurA Is Regulated by Conformational Changes Involving a Parvulin Domain“, *J Bacteriol*, Bd. 198, Nr. 6, S. 921–929, Feb. 2016, doi: 10.1128/JB.00889-15.
- [121] D. Vertommen, N. Ruiz, P. Leverrier, T. J. Silhavy, und J.-F. Collet, „Characterization of the role of the *Escherichia coli* periplasmic chaperone SurA using differential proteomics“, *Proteomics*, Bd. 9, Nr. 9, S. 2432–2443, Mai 2009, doi: 10.1002/pmic.200800794.
- [122] B. A. Sampson, R. Misra, und S. A. Benson, „Identification and Characterization of a New Gene of *Escherichia coli* K-12 Involved in Outer Membrane Permeability“, *Genetics*, Bd. 122, Nr. 3, S. 491–501, Juli 1989.
- [123] R. Aono, T. Negishi, K. Aibe, A. Inoue, und K. Horikoshi, „Mapping of Organic Solvent Tolerance Gene *ostA* in *Escherichia coli* K-12“, *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, Bd. 58, Nr. 7, S. 1231–1235, Jan. 1994, doi: 10.1271/bbb.58.1231.
- [124] M. Braun und T. J. Silhavy, „*Imp/OstA* is required for cell envelope biogenesis in *Escherichia coli*“, *Molecular Microbiology*, Bd. 45, Nr. 5, S. 1289–1302, 2002, doi: 10.1046/j.1365-2958.2002.03091.x.
- [125] T. Wu, A. C. McCandlish, L. S. Gronenberg, S.-S. Chng, T. J. Silhavy, und D. Kahne, „Identification of a protein complex that assembles lipopolysaccharide in the outer membrane of *Escherichia coli*“, *Proc Natl Acad Sci U S A*, Bd. 103, Nr. 31, S. 11754–11759, Aug. 2006, doi: 10.1073/pnas.0604744103.
- [126] P. Sperandeo, R. Cescutti, R. Villa, C. Di Benedetto, D. Candia, G. Dehò, und A. Polissi, „Characterization of *lptA* and *lptB*, two essential genes implicated in lipopolysaccharide transport to the outer membrane of *Escherichia coli*“, *J Bacteriol*, Bd. 189, Nr. 1, S. 244–253, Jan. 2007, doi: 10.1128/JB.01126-06.
- [127] J. W. Erickson und C. A. Gross, „Identification of the sigma E subunit of *Escherichia coli* RNA polymerase: a second alternate sigma factor involved in high-temperature gene expression“, *Genes Dev*, Bd. 3, Nr. 9, S. 1462–1471, Sep. 1989, doi: 10.1101/gad.3.9.1462.
- [128] Q. P. Wang und J. M. Kaguni, „*dnaA* protein regulates transcriptions of the *rpoH* gene of *Escherichia coli*“, *J Biol Chem*, Bd. 264, Nr. 13, S. 7338–7344, Mai 1989.
- [129] K. Hiratsu, M. Amemura, H. Nashimoto, H. Shinagawa, und K. Makino, „The *rpoE* gene of *Escherichia coli*, which encodes sigma E, is essential for bacterial growth at high temperature“, *J Bacteriol*, Bd. 177, Nr. 10, S. 2918–2922, Mai 1995, doi: 10.1128/jb.177.10.2918-2922.1995.
- [130] J. Meccas, P. E. Rouviere, J. W. Erickson, T. J. Donohue, und C. A. Gross, „The activity of sigma E, an *Escherichia coli* heat-inducible sigma-factor, is modulated by expression of outer membrane proteins“, *Genes Dev*, Bd. 7, Nr. 12B, S. 2618–2628, Dez. 1993, doi: 10.1101/gad.7.12b.2618.
- [131] J. G. Sklar, T. Wu, D. Kahne, und T. J. Silhavy, „Defining the roles of the periplasmic chaperones SurA, Skp, and DegP in *Escherichia coli*“, *Genes Dev*, Bd. 21, Nr. 19, S. 2473–2484, Okt. 2007, doi: 10.1101/gad.1581007.

- [132] E. B. Volokhina, J. Grijpstra, M. Stork, I. Schilders, J. Tommassen, und M. P. Bos, „Role of the periplasmic chaperones Skp, SurA, and DegQ in outer membrane protein biogenesis in *Neisseria meningitidis*“, *J Bacteriol*, Bd. 193, Nr. 7, S. 1612–1621, Apr. 2011, doi: 10.1128/JB.00532-10.
- [133] K. Klein, M. S. Sonnabend, L. Frank, K. Leibiger, M. Franz-Wachtel, B. Macek, T. Trunk, J. C. Leo, I. B. Autenrieth, M. Schütz, und E. Bohn, „Deprivation of the Periplasmic Chaperone SurA Reduces Virulence and Restores Antibiotic Susceptibility of Multidrug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa*“, *Frontiers in Microbiology*, Bd. 10, 2019, Zugegriffen: 5. November 2023. [Online]. Verfügbar unter: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2019.00100>
- [134] A. C. Jacobs, M. G. Thompson, C. C. Black, J. L. Kessler, L. P. Clark, C. N. McQueary, H. Y. Gancz, B. W. Corey, J. K. Moon, Y. Si, M. T. Owen, J. D. Hallock, Y. I. Kwak, A. Summers, C. Z. Li, D. A. Rasko, W. F. Penwell, C. L. Honnold, M. C. Wise, P. E. Waterman, E. P. Lesho, R. L. Stewart, L. A. Actis, T. J. Palys, D. W. Craft, und D. V. Zurawski, „AB5075, a Highly Virulent Isolate of *Acinetobacter baumannii*, as a Model Strain for the Evaluation of Pathogenesis and Antimicrobial Treatments“, *mBio*, Bd. 5, S. e01076-14-e01076-14, Mai 2014, doi: 10.1128/mbio.01076-14.
- [135] L. A. Gallagher, E. Ramage, E. J. Weiss, M. Radey, H. S. Hayden, K. G. Held, H. K. Huse, D. V. Zurawski, M. J. Brittnacher, und C. Manoil, „Resources for Genetic and Genomic Analysis of Emerging Pathogen *Acinetobacter baumannii*“, *Journal of Bacteriology*, Bd. 197, S. 2027–2035, Juni 2015, doi: 10.1128/jb.00131-15.
- [136] J. K. Rasheed, G. J. Anderson, H. Yigit, A. M. Queenan, A. Doménech-Sánchez, J. M. Swenson, J. W. Biddle, M. J. Ferraro, G. A. Jacoby, und F. C. Tenover, „Characterization of the extended-spectrum beta-lactamase reference strain, *Klebsiella pneumoniae* K6 (ATCC 700603), which produces the novel enzyme SHV-18“, *Antimicrob. Agents Chemother.*, Bd. 44, Nr. 9, S. 2382–2388, Sep. 2000, doi: 10.1128/aac.44.9.2382-2388.2000.
- [137] R. C. Mierendorf, B. B. Morris, B. Hammer, und R. E. Novy, „Expression and Purification of Recombinant Proteins Using the pET System“, *Methods Mol Med*, Bd. 13, S. 257–292, 1998, doi: 10.1385/0-89603-485-2:257.
- [138] F. W. Studier und B. A. Moffatt, „Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes“, *J Mol Biol*, Bd. 189, Nr. 1, S. 113–130, Mai 1986, doi: 10.1016/0022-2836(86)90385-2.
- [139] K. J. Angelis, „Glover, D. M., (ed.): DNA Cloning. A Practical Approach, Vol. I and II.“, *Biol Plant*, Bd. 28, Nr. 5, S. 395–395, Sep. 1986, doi: 10.1007/BF02902255.
- [140] F. W. Studier, „Protein production by auto-induction in high-density shaking cultures“, *Protein Expression and Purification*, Bd. 41, Nr. 1, S. 207–234, Mai 2005, doi: 10.1016/j.pep.2005.01.016.
- [141] D. G. Gibson, L. Young, R.-Y. Chuang, J. C. Venter, C. A. Hutchison, und H. O. Smith, „Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases“, *Nat Methods*, Bd. 6, Nr. 5, Art. Nr. 5, Mai 2009, doi: 10.1038/nmeth.1318.
- [142] N. Dyballa und S. Metzger, „Fast and Sensitive Colloidal Coomassie G-250 Staining for Proteins in Polyacrylamide Gels“, *Journal of Visualized Experiments*, Nr. 30, Aug. 2009, doi: 10.3791/1431.
- [143] B. Huang, L. Zhang, W. Zhang, K. Liao, S. Zhang, Z. Zhang, X. Ma, J. Chen, X. Zhang, P. Qu, S. Wu, C. Chen, und Y.-W. Tang, „Direct Detection and Identification of Bacterial Pathogens from Urine with Optimized Specimen Processing and Enhanced Testing Algorithm“, *Journal of Clinical Microbiology*, Bd. 55, Nr. 5, S. 1488–1495, Mai 2017, doi: 10.1128/JCM.02549-16.

- [144] K. Birkle, F. Renschler, A. Angelov, G. Wilharm, M. Franz-Wachtel, B. Maček, E. Bohn, E. Weber, J. Müller, L. Friedrich, und M. Schütz, „An Unprecedented Tolerance to Deletion of the Periplasmic Chaperones SurA, Skp, and DegP in the Nosocomial Pathogen *Acinetobacter baumannii*“, *J Bacteriol*, Bd. 204, Nr. 10, S. e0005422, Okt. 2022, doi: 10.1128/jb.00054-22.
- [145] J. Weirich, C. Bräutigam, M. Mühlenkamp, M. Franz-Wachtel, B. Macek, I. Meuskens, M. Skurnik, K. Leskinen, E. Bohn, I. Autenrieth, und M. Schütz, „Identifying components required for OMP biogenesis as novel targets for antiinfective drugs“, *Virulence*, Bd. 8, Nr. 7, S. 1170–1188, 03 2017, doi: 10.1080/21505594.2016.1278333.
- [146] J. Bojkovic, D. L. Richie, D. A. Six, C. M. Rath, W. S. Sawyer, Q. Hu, und C. R. Dean, „Characterization of an *Acinetobacter baumannii* lptD Deletion Strain: Permeability Defects and Response to Inhibition of Lipopolysaccharide and Fatty Acid Biosynthesis“, *J Bacteriol*, Bd. 198, Nr. 4, S. 731–741, Jan. 2016, doi: 10.1128/JB.00639-15.
- [147] A. G. Walsh, M. J. Matewish, L. L. Burrows, M. A. Monteiro, M. B. Perry, und J. S. Lam, „Lipopolysaccharide core phosphates are required for viability and intrinsic drug resistance in *Pseudomonas aeruginosa*“, *Molecular Microbiology*, Bd. 35, Nr. 4, S. 718–727, 2000, doi: 10.1046/j.1365-2958.2000.01741.x.
- [148] M. P. Bos, B. Tefsen, J. Geurtsen, und J. Tommassen, „Identification of an outer membrane protein required for the transport of lipopolysaccharide to the bacterial cell surface“, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, Bd. 101, Nr. 25, S. 9417–9422, Juni 2004, doi: 10.1073/pnas.0402340101.
- [149] L. Steeghs, R. den Hartog, A. den Boer, B. Zomer, P. Roholl, und P. van der Ley, „Meningitis bacterium is viable without endotoxin“, *Nature*, Bd. 392, Nr. 6675, Art. Nr. 6675, Apr. 1998, doi: 10.1038/33046.
- [150] M. J. Gebhardt, L. A. Gallagher, R. K. Jacobson, E. A. Usacheva, L. R. Peterson, D. V. Zurawski, und H. A. Shuman, „Joint Transcriptional Control of Virulence and Resistance to Antibiotic and Environmental Stress in *Acinetobacter baumannii*“, *mBio*, Bd. 6, Nr. 6, S. 10.1128/mbio.01660-15, Nov. 2015, doi: 10.1128/mbio.01660-15.
- [151] Y. Wang, R. Wang, F. Jin, Y. Liu, J. Yu, X. Fu, und Z. Chang, „A Supercomplex Spanning the Inner and Outer Membranes Mediates the Biogenesis of β -Barrel Outer Membrane Proteins in Bacteria“, *J Biol Chem*, Bd. 291, Nr. 32, S. 16720–16729, Aug. 2016, doi: 10.1074/jbc.M115.710715.
- [152] S. Alvira, D. W. Watkins, L. Troman, W. J. Allen, J. S. Lorrinan, G. Degliesposti, E. J. Cohen, M. Beeby, B. Daum, V. A. Gold, J. M. Skehel, und I. Collinson, „Inter-membrane association of the Sec and BAM translocons for bacterial outer-membrane biogenesis“, *Elife*, Bd. 9, S. e60669, Nov. 2020, doi: 10.7554/eLife.60669.
- [153] M. Jia, B. Wu, Z. Yang, C. Chen, M. Zhao, X. Hou, X. Niu, C. Jin, und Y. Hu, „Conformational Dynamics of the Periplasmic Chaperone SurA“, *Biochemistry*, Bd. 59, Nr. 35, S. 3235–3246, Sep. 2020, doi: 10.1021/acs.biochem.0c00507.
- [154] B. Schiffrin, J. M. Machin, T. K. Karamanos, A. Zhuravleva, D. J. Brockwell, S. E. Radford, und A. N. Calabrese, „Dynamic interplay between the periplasmic chaperone SurA and the BAM complex in outer membrane protein folding“, *Commun Biol*, Bd. 5, Nr. 1, Art. Nr. 1, Juni 2022, doi: 10.1038/s42003-022-03502-w.
- [155] L. Troman, S. Alvira, B. Daum, V. A. M. Gold, und I. Collinson, „Interaction of the periplasmic chaperone SurA with the inner membrane protein secretion (SEC) machinery“, *Biochem J*, Bd. 480, Nr. 4, S. 283–296, Feb. 2023, doi: 10.1042/BCJ20220480.

7 Erklärung und Eigenanteil

Die vorliegende Arbeit wurde im Institut für Mikrobiologie und Hygiene des Universitätsklinikums Tübingen unter Aufsicht von PD Dr. rer. nat. Monika Schütz (M. Schütz) durchgeführt und von ihr konzipiert. Die Versuche wurden nach Einarbeitung durch o.g. Person, sowie (alle Namen in der Erklärung in Reihung nach chronologischem Auftreten) Ina Meuskens, Jonas Malte Schweers und Dr. rer. nat. Fabian Renschler (F. Renschler), von mir selbstständig durchgeführt. Die Erstellung der ersten Expressions-Konstrukte erfolgte in Zusammenarbeit mit M. Schütz und Ina Meuskens. Die Proteinaufreinigungen (ÄKTA) führte ich in Zusammenarbeit mit Ina Meuskens und Karolin Birkle durch. Die Durchführung der Aktivitätsassays erfolgte in Zusammenarbeit mit Malte Schweers und F. Renschler. Die Auswertungen der Aktivitätsassays erfolgten nach Rücksprache mit M. Schütz sowie F. Renschler. Ich versichere das Manuskript nach Anleitung durch M. Schütz und F. Renschler selbstständig verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

Tübingen, den 13.11.2023

Danksagung

Mit Begeisterung habe ich die Arbeit im Labor aufgenommen. Ich war fasziniert von den vielen neuen Informationen und Erkenntnissen. Die praktische Arbeit im Labor in der Arbeitsgruppe Schütz/Bohn war immer ein sehr angenehmes und freundschaftliches Arbeitsklima. Die gleichzeitige diagnostische Tätigkeit war für mich eine zeitliche Herausforderung, so dass ich von vielen Seiten ermutigt wurde, an meiner Dissertation festzuhalten und sie nun zum Abschluss zu bringen.

Ein ganz herzlich möchte ich mich bei PD Dr. Monika Schütz bedanken. Von Anfang bis Ende dieser Arbeit hast Du mich wirklich jederzeit unterstützt. Du hast mich bei jeder Frage fachlich beraten und mir wertvolles Wissen vermittelt, das mich weitergebracht hat. Auch die wohlwollende und freundschaftliche Ermutigung, am Ball zu bleiben und das Vertrauen, dass ich diese Aufgabe bewältigen kann, haben enorm dazu beigetragen, diese Arbeit nun endlich einreichen zu können.

An dieser Stelle möchte ich mich auch bei Apl. Prof. Dr. Silke Peter dafür bedanken, dass Du an mich geglaubt und mich mit einer Prise Druck vorangetrieben hast. Ich danke Dir auch für Dein Mentoring in allen beruflichen Fragen.

Ich möchte mich bei der gesamten AG Schütz/Bohn einschließlich der aktuellen und ehemaligen Mitarbeiterinnen und Mitarbeiter bedanken. Insbesondere Ina Meuskens, die mich am Anfang liebevoll in alle praktischen Laborarbeiten eingewiesen hat. Karolin Birkle und Malte Jonas Schweers für die viele Hilfe und Geduld. Ganz besonders möchte ich mich noch bei Dr. Fabian Renschler bedanken, der mich nun in der Finalisierungsphase unermüdlich und immer mit absolut positiver Energie begleitet hat. PD Dr. Erwin Bohn für die vielen kleinen Geschichten und das Teilen der Kunst.

Bei allen meinen diagnostischen Kolleginnen und Kollegen möchte ich bedanken. Ihr seid ein großer Teil daran, dass ich hier gerne bin und wir ein so gutes Miteinander pflegen. Ganz besonders mag ich Annika Schmidt danken, die an jeder Stelle hilfsbereit zur Seite steht und mir freundschaftlich jederzeit Mut zugesprochen hat. Bei Nikoletta Fila, Sophia Wolf, Paul D'Alvise, Kristina Schmauder, Elias Walter, Julia Guthier, Stefanie Döbele, Sebastian Grashorn, Berit Schulte, Matthias Marschal und meinen ehemaligen Kollegen Michael Buhl und Philipp Oberhettinger möchte ich mich bedanken. Danke, dass ihr an so vielen kleinen und großen Stellen im Arbeitsalltag immer für mich da seid.

Ich möchte mich bei meinem Freund Valentin Egle für all die Liebe und Unterstützung bedanken. Du hast immer an mich geglaubt, mir Mut gemacht und mich dadurch aufgebaut und gestärkt.

Meiner Familie und meinen Freunden danke ich für die jahrelange Unterstützung durch euch.

8 Anhang

8.1 FASTA und Chromatogramme

Chromatogramme erstellt mit: MacVector v 18.6.1

8.1.1 Ad 3.1.2.1 A.b.

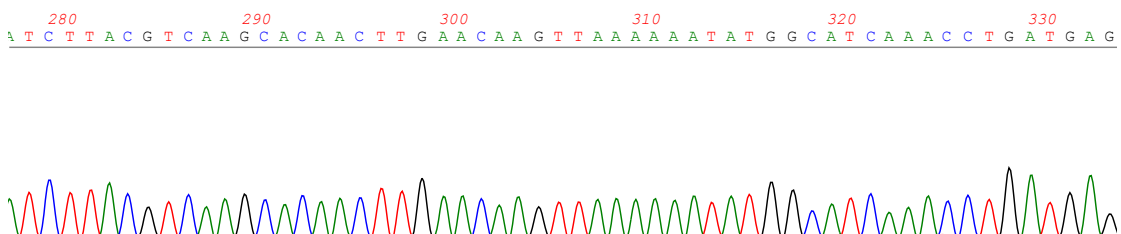
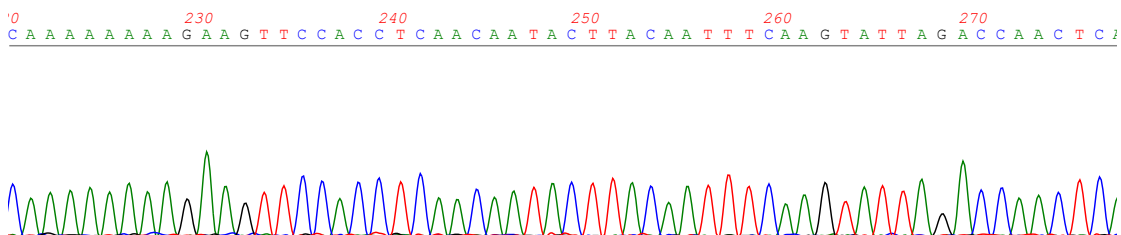
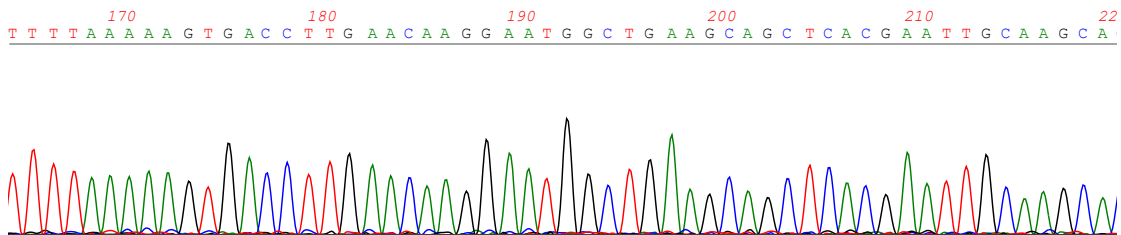
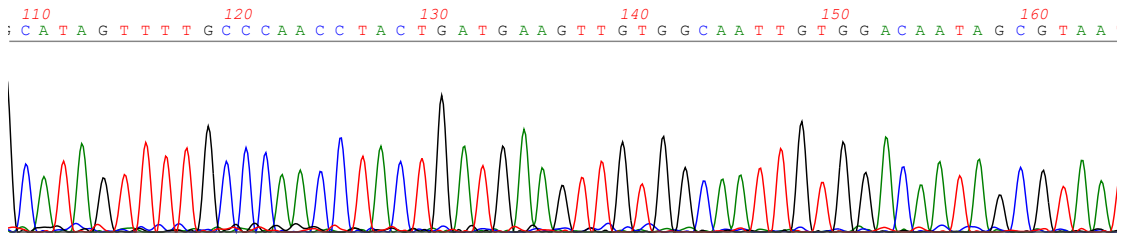
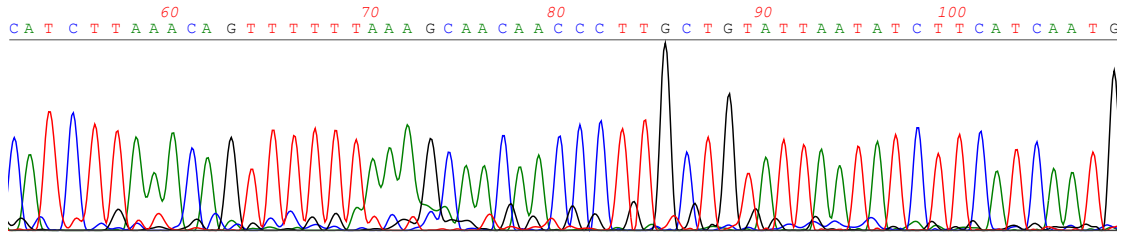
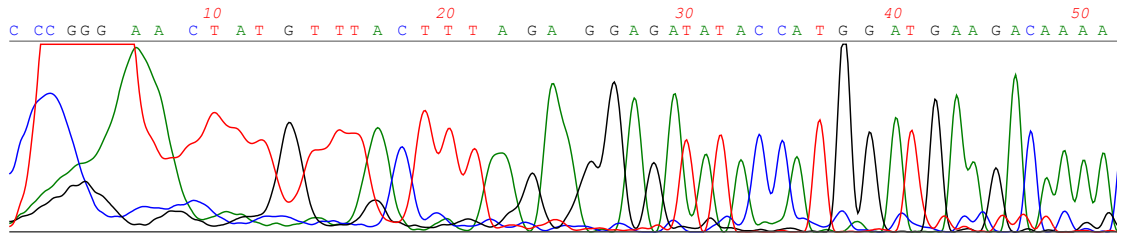
Forward, Teil 1

Primer: Lacoperon_seq_fwd: AATTGTGAGCGGATAACAAT

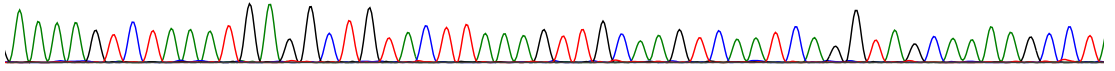
```
>29785855.seq - ID: 08GA74- on 2017/2/17-3:48:35
automatically edited with PhredPhrap, start with base no.:
26 Internal Params: Windowsize: 20, Goodqual: 19, Badqual:
10, Minseqlength: 50, nbadelimit: 1
```

```
gAGanaTACCatGGaTGAagACAAAACATCTTAAACAGTTTTTTAAAGCAACAACCCTT
GCTGTATTAATATCTTCATCAATGCATAGTTTTTGCCCAACCTACTGATGAAGTTGTGGC
AATTGTGGACAATAGCGTAATTTTTAAAAAGTGACCTTGAACAAGGAATGGCTGAAGCAG
CTCACGAATTGCAAGCACAAAAAAGAAGTTCCACCTCAACAATACTTACAATTTCAA
GTATTAGACCAACTCATCTTACGTCAAGCACAACCTTGAACAAGTTAAAAAATATGGCAT
CAAACCTGATGAGAAAAGTCTAAATGAGGCTGTACTTAAAGTTGCAAGTCAATCAGGTA
GCAAAGCCTAGAAGCCTTTCAACAAAAATTAGATGCGATTGCACCTGGAACCTTATGAA
AACTTACGTAGCCGTATTGCTGAAGATTTAGCAATTAATCGTCTGCGTCAACAGCAAGT
TATGTCTCGCATTAAAATCAGTGATCAAGATGTAGATAACTTCTTGAAGTCACCACAAG
GGCAAGCTGCTTTAGGTAATCAAGCTCATGTGATTTCATATGCGAATTTCCGGAGATAAC
CCTCAAGAAGTTCAAATGTAGCAAAAGAAGTTCGTTCCAACTTGCTCAAAGCAATGA
TTTTAAACGCTCTTAAAAAGCTTTCAACTGCGACTGTAAAAGTTGAAGGTGCAGATATGG
GAtTCCGtCCTCTTTCTGAnATACCGGCTGAACTTGCTGCTCGTATTACTCCACTGCaA
gnAcGGTCnAAnCAACTGaCTTAATTTCTGTACGCGAtGGTGTACATGnTTCTAAAACt
TTTTAgaACgTAAgcnaAaTGnaACagAAAGCATTAgTAcCAcaannT
```

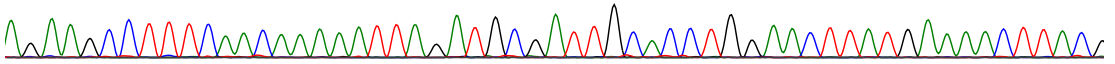
Chromatogramm



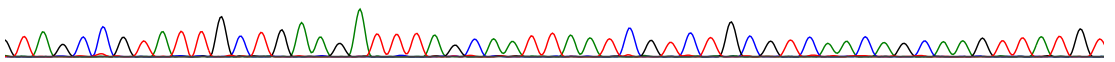
A A A A G T C T A A A T G A G G C T G T A C T T A A A G T T G C A A G T C A A T C A G G T A G C A A A A G C C T .



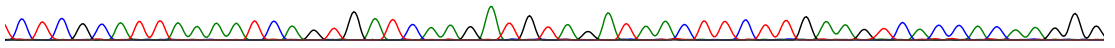
A G A A G C C T T T C A A C A A A A T T A G A T G C G A T T G C A C C T G G A A C T T A T G A A A C T T A C C



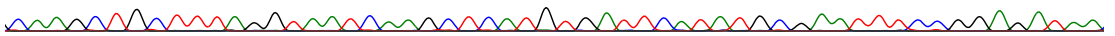
T A G C C G T A T T G C T G A A G A T T T A G C A A T T A A T C G T C T G C G T C A A C A G C A A G T T A T G T



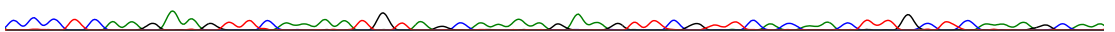
C T C G C A T T A A A A T C A G T G A T C A A G A T G T A G A T A A C T T C T T G A A G T C A C C A C A A G G G



C A A G C T G C T T T A G G T A A T C A A G C T C A T G T G A T T C A T A T G C G A A T T T C C G G A G A T A A



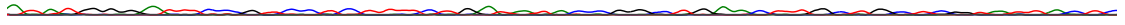
C C C T C A A G A A G T T C A A A A T G T A G C A A A A G A A G T T C G T T C A C A A C T T G C T C A A A G C A A



. T G A T T T A A A C G C T C T T A A A A A G C T T T C A A C T G C G A C T G T A A A A G T T G A A G G T G C A G



A T A T G G G A T T C C G T C C T C T T T C T G A T A T A C C G G C T G A A C T T G C T G C T C G T A T T A C T C



C A C T G C A A G G A C G G T C A A A A C A A C T G A C T T A A T T T C T G T A C G C G A T G G T G T A C A T G T T T



C T A A A A C T T T T T A G A A C G T A A G C A A A A T G G A A C A G A A A G C A T T A G T A C C A C A A T A T C A A



A C A C G C C A T A T T T C T T A T T C A A C C T T C G A A G T G G G A A G C C T G G A A A A T G C G A A A C



A T A T



Forward, Teil 2

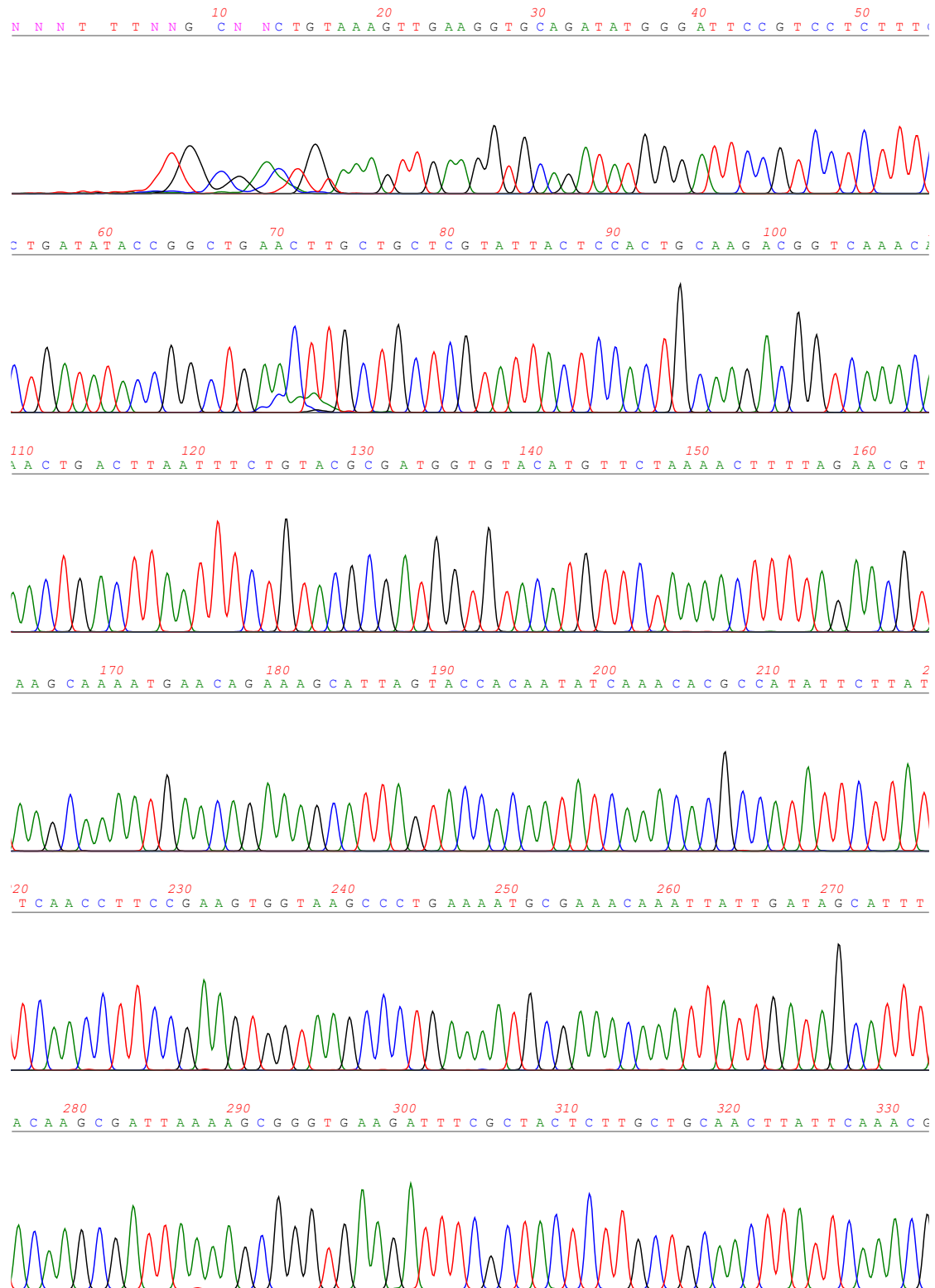
Primer: Seq_surA-Ab_fwd2:

CTCAAAGCAATGATTTAAACGCTCTTAAAAAGCTTTCAAC

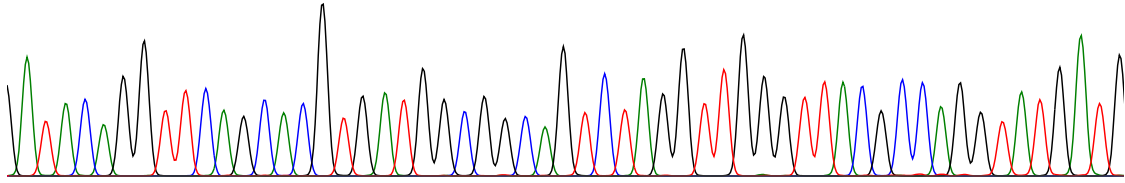
>32139513.seq - ID: 08GD68- on 2017/5/29-13:24:36
automatically edited with PhredPhrap, start with base no.:
14 Internal Params: Window size: 20, Goodqual: 19, Badqual:
10, Minseq length: 50, nbadelimit: 1

tGTAAaGTTGAaGGTGCAGATATGGgaTtCCGTCCTCTTTCTGATATACCGGCTGAaCT
TGCTGCTCGTATTACTCCACTGCAAGACGGTCAAACAACCTGACTTAATTTCTGTACGCG
ATGGTGTACATGTTCTAAAACCTTTTAGAACGTAAGCAAAATGAACAGAAAGCATTAGTA
CCACAATATCAAACACGCCATATTCTTATTCAACCTTCCGAAGTGGTAAGCCCTGAAAA
TGCGAAACAAATTATTGATAGCATTTACAAGCGATTAAAAGCGGGTGAAGATTTTCGCTA
CTCTTGCTGCAACTTATTCAAACGATACAGGTTTCAGCACGTGATGGCAGGAGTCTAGGT
TGGGTTACGCCAGGTATGATGGTTCCTGAGTTTGATAAAAAAATGCAGGAAATTCCTGT
AGGTGAAATTAGTGAACCTTTCCAAACTCAATTCGGCTGGCATACTTACAAGTGACAG
ACAAACGCGAAAAAGATATGACACATGAATATCAAGAGCGTATGGCACGTCAAATTTTA
GGTGAGCGTCAATTTAACTGAAATTGATAGCTGGTTACGTGAAGTCCGTGCAAATGC
TTATGTAGAAATTAAAGATCCAAGCCTCGACAAAAAGAACTTACAAAAAGCGCTCACC
ACCACCACCACCCTGAAAGCTTGCGGCCGCACTCGAGCACCAccACCACCACCCTGA
GATCCGGCTGCTAAcAAAGCCCGAAAGGAAGCTGAGTTGGCTGctgCCACCGCTGAGCA
AtAACTAgcATAACCCcTTg

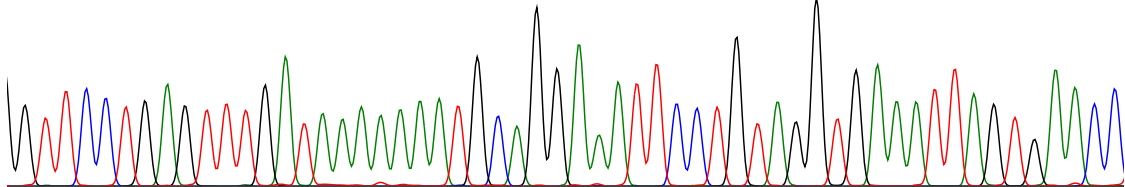
Chromatogramm



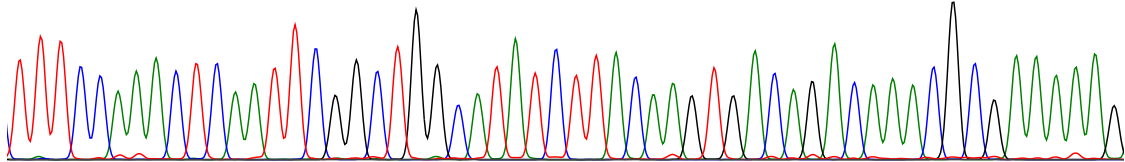
340 350 360 370 380
: A T A C A G G T T C A G C A C G T G A T G G C G G C A G T C T A G G T T G G G T T A C G C C A G G T A T G A T G



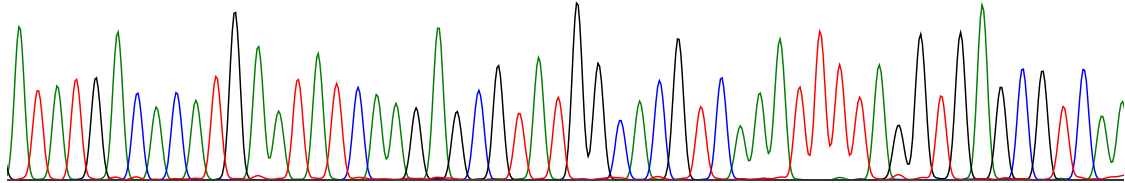
390 400 410 420 430 440
: G T T C C T G A G T T T G A T A A A A A A A T G C A G G A A A T T C C T G T A G G T G A A A T T A G T G A A C C



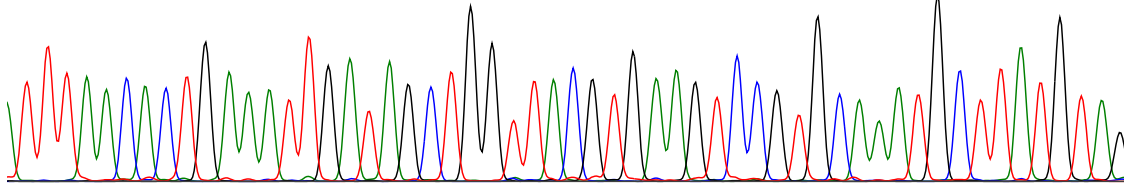
450 460 470 480 490 500
T T T C C A A A C T C A A T T C G G C T G G C A T A T C T T A C A A G T G A C A G A C A A A C G C G A A A A A G



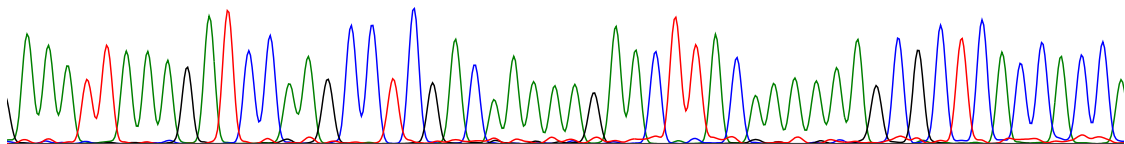
510 520 530 540 550
A T A T G A C A C A T G A A T A T C A A G A G C G T A T G G C A C G T C A A A T T T T A G G T G A G C G T C A A

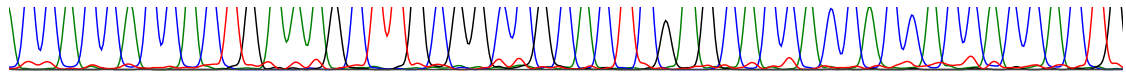


560 570 580 590 600 610
T T T A A C A C T G A A A T T G A T A G C T G G T T A C G T G A A G T C C G T G C A A A T G C T T A T G T A G

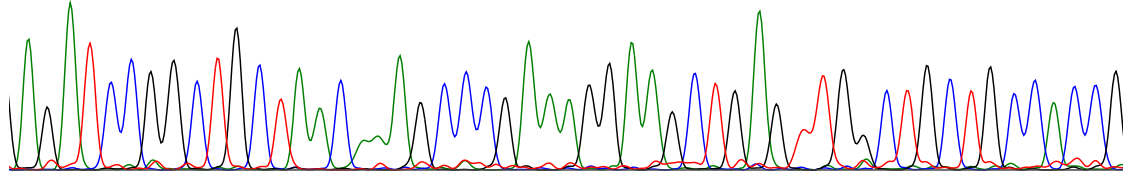


620 630 640 650 660
: A A A T T A A A G A T C C A A G C C T C G A C A A A A A G A A C T T A C A A A A A A G C G C T C A C C A C C A

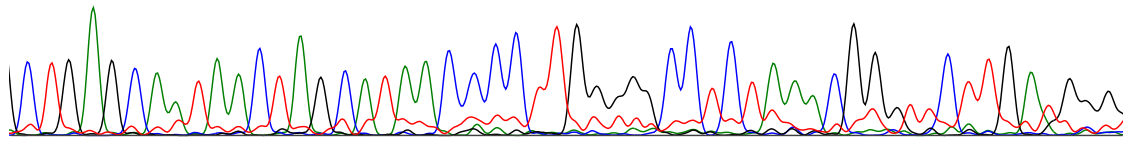




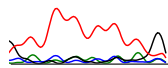
A G A T C C G G C T G C T A A C A A A G C C C G A A A G G A A G C T G A G T T G G C T G C T G C C A C C G



C T G A G C A A T A A C T A G C A T A A C C C C T T G G G G C C T C T A A A C G G T T C T T G A T G G C



S T T T T T G



8.1.2 Ad 3.1.2.2 P.a.

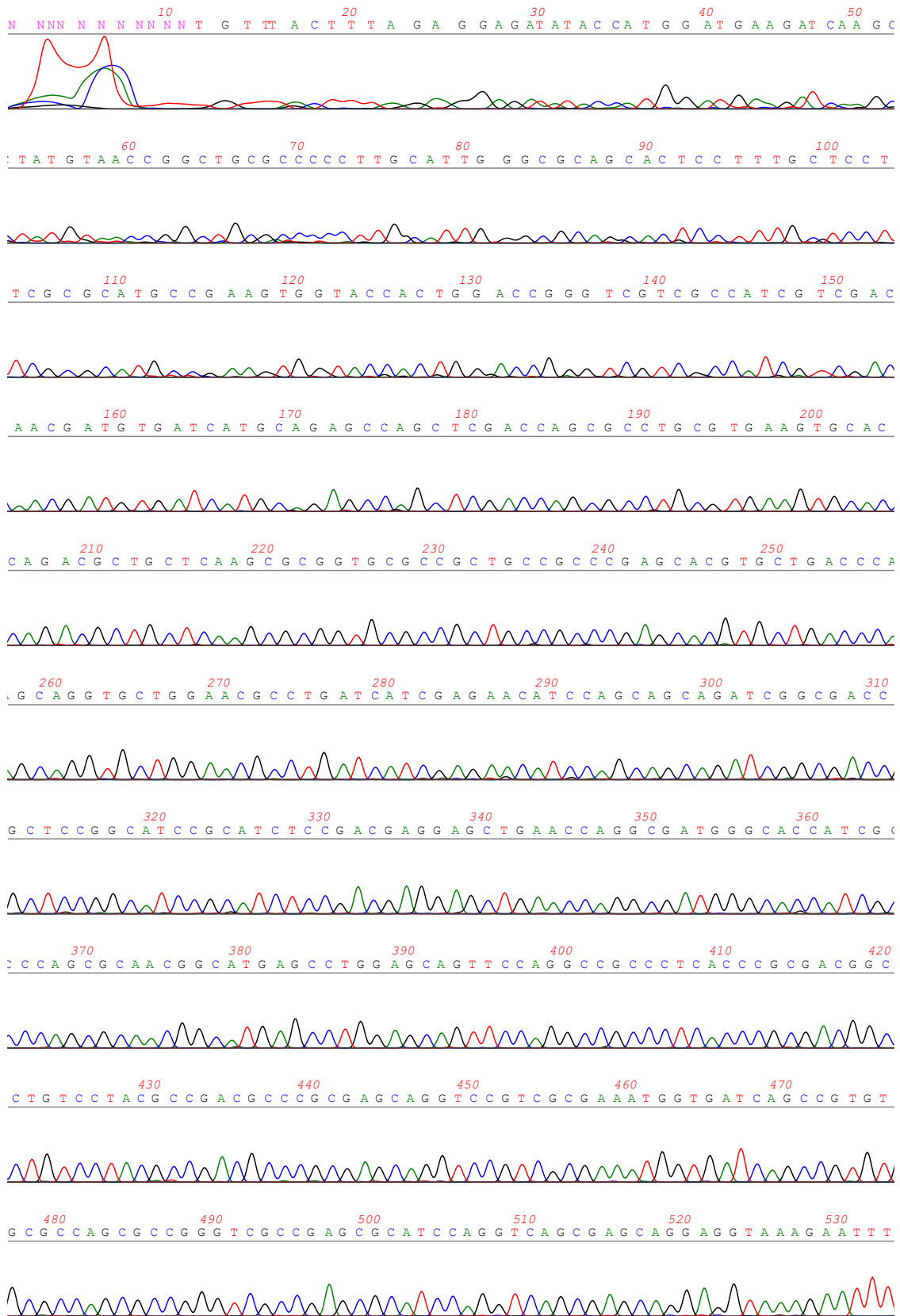
FASTA pET28a SurA-PA14#13

forward

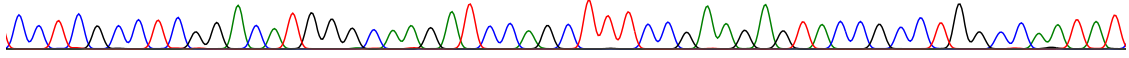
```
>28773578.seq - ID: 86FA04- on 2016/12/30-10:37:58  
automatically edited with PhredPhrap, start with base no.:  
25 Internal Params: Window size: 20, Goodqual: 19, Badqual:  
10, Minseq length: 50, nbadelimit: 1
```

```
GgaGanaTACcaTGGaTGAagatcaaGCTaTGTAaCCGGCTGCgCCCCCTTgCATtGGG  
CGCagcAcTCcTTTgctCCTTCGCGCATGCcgAaGTGGTACCACTggaCCGGGtCGTCG  
CCATCgtCGACAACGATGTGATCATGCAGAGCCAGCTCGACCAGCGCCTGCGTGAAGTG  
CACCAGACGCTGCTCAAGCGCGGTGCGCCGCTGCCGCCGAGCACGTGCTGACCCAGCA  
GGTGTGCTGGAACGCCTGATCATCGAGAACATCCAGCAGCAGATCGGCGACCGCTCCGGCA  
TCCGCATCTCCGACGAGGAGCTGAACCAGGCGATGGGCACCATCGCCCAGCGCAACGGC  
ATGAGCCTGGAGCAGTTCAGGCCGCCCTCACCCGCGACGGCCTGTCTACGCCGACGC  
CCGCGAGCAGGTCCGTCGCGAAATGGTGTGATCAGCCGTGTGCGCCAGCGCCGGGTCGCCG  
AGCGCATCCAGGTCAGCGAGCAGgAGGTAAAGAATTTCTCGCCTCGGACATGGGCAAG  
ATCCAGCTTTCCGAAGAGTACCGCTGGCCAATATCCTGATCCCGGTGCCGGAAGCCGC  
GTCCTCGGACGTGATCCAGGCCGCCGCAAGGCAGGCCAGGAGCTTTACCAGCAGCTCA  
AGCAGGGCGCCGACTTCGGCCAACTGGCGATTTCCCGCTCGGCCGGCGACAACGCCCTG  
GAAGGCGGCGAGATCGGCTGGCGCAAGGCCGCCAGTTGCCGCAGCCGTTTCGACAGCAT  
GATCGGCTCCCTGGCCGTGCGCGACGTCACCGAGCCTGTCCGCACCCCCGGCGGCTTCA  
TCATCCTCAAGCTGGAAGAGAAGCGCGGCGGCAGCAAGATGGTCCGTGACGAAGTGCAT  
GTCCGCCATATCCTGCTCAAGCCCAGCGAAATCCGCAGCGAAGCggagACCGanAaGCT  
ggcgCAgAaagcTGTACgAgCGCATCCAGtncnGgg
```

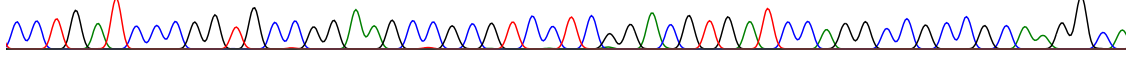
Chromatogramm



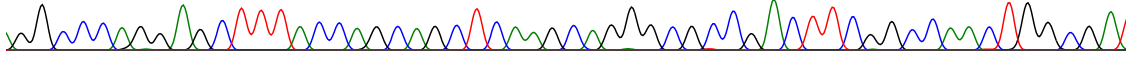
C C T C G C C C T C G G A C A T ⁵⁴⁰ G G G C A A G A T ⁵⁵⁰ C C A G C T T T C C G A A G A G T A C C G C C T G G C C A A T A T ⁵⁹⁰



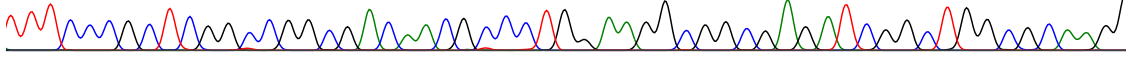
C C T G A T C C C ⁶⁰⁰ G G T G C C G G A A G C C G C G T C C T C G G A C G T G A T C C A G G C C G C C G C A A G G C A ⁶⁴⁰



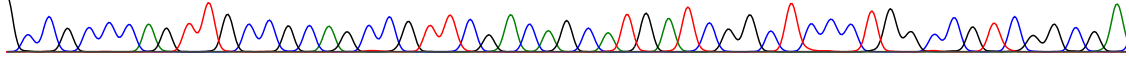
G G C C C A G G A G C T T T A C C A G C A G C T C A A G C A G G G C G C C G A C T T C G G C C A A C T G G C G A ⁶⁵⁰



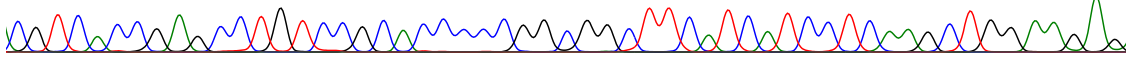
T T T C C C G C T C G G C C G G C G A C A A C G C C C T G G A A G G C G G C G A G A T C G G C T G G C G C A A G C ⁷¹⁰



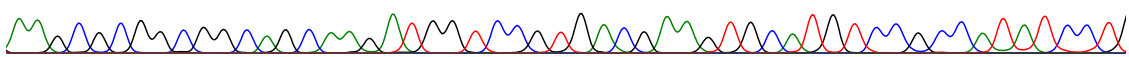
C C G C C C A G T T G C C G C A G C C G T T C G A C A G C A T G A T C G G C T C C C T G G C C G T C G G C G A ⁷⁷⁰



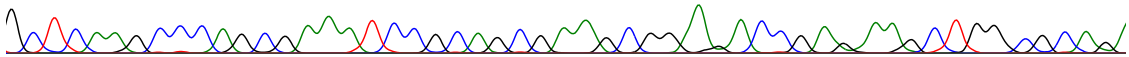
C G T C A C C G A G C C T G T C C G C A C C C C G G C G G C T T C A T C A T C C T C A A A G C T G G A A G A G ⁸²⁰



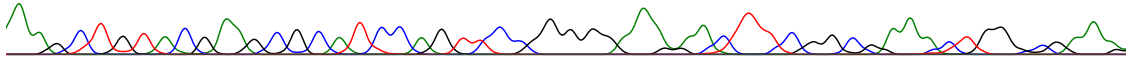
A A G C G C G G C C G G C A G C A A G A T G G T C C G T G A C G A A G T G C A T G T C C G C C A T A T C C T ⁸⁸⁰



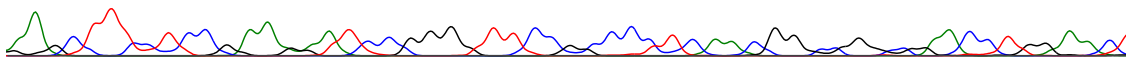
G C T C A A G C C C A G C G A A A T C C G C A G C G A A G C G G A G A C C G A G A A G C T G G C G C A G A ⁹³⁰



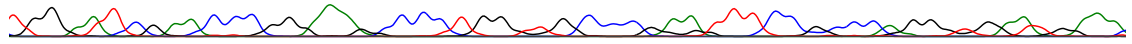
A A G C T G T A C G A G C G C A T C C A G T T C C G G G A A A A C T T C G G C G A A N T G G G N A A A ⁹⁸⁰



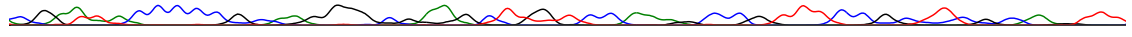
A A N T T T C T C C G A A G A A T C C G G G T T C C G C C C T C A A C G G C C G G N N A A C C T G G A A C ¹⁰³⁰



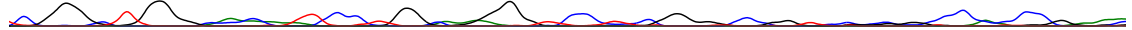
1090 1100 1110 1120 1130 1140
T G G A A T C G A A C C C G G A A A G C C C T G G G T G G C C C G A A T T T C C G C C C A G G G T G A A T G A A A



1150 1160 1170 1180 1190 1200
C G A A T A C C C C C G C A A G G G G C G A A G C T G M T N C C A A A G C C C G T T T C C G C T T C G C A A G T T T



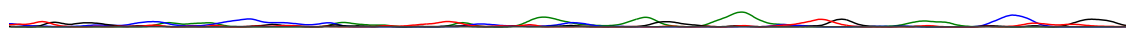
1210 1220 1230 1240 1250
C G G G C T G G G C A C A T T C C T G G N N N G G G T C C T C N G G G C C G G T C C N N G G C C A C C C G A A C



1260 1270 1280 1290 1300 1310
N G N C A N N G N N A A A N N N T T T C C C G N N G A A A C C A A C C A A G G G C G G N A A A N N N G T T A N



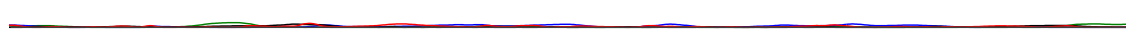
1320 1330 1340 1350 1360 1370
N T G G G N N N A A A C C N C C N A A A T T T A C N N A N C A A A A G G A N A A N T T G N N N A N N N C N T N G N N



1380 1390 1400 1410 1420 1430
N N N N G G C G G G N N N G N T N N N N N C G N N N N A N N G G G T C C N N N C T N G G G N T A A A A N N N



1440 1450 1460 1470 1480
N T A N N N N N N N N N N N N N G T C C A C A C C C N T G T C C G C T C C C A T C C N C N N N N N G N A A N



1490 1500 1510 1520 1530 1540
N T N T T N N T N G A G T G G N N N N N N N C T N N N C A G T T N N G N N T N N T T T A A N N N T C C C T C G C



1550 1560
C C G A C C G C T G T G A G G A A N N A



Chromatogramm



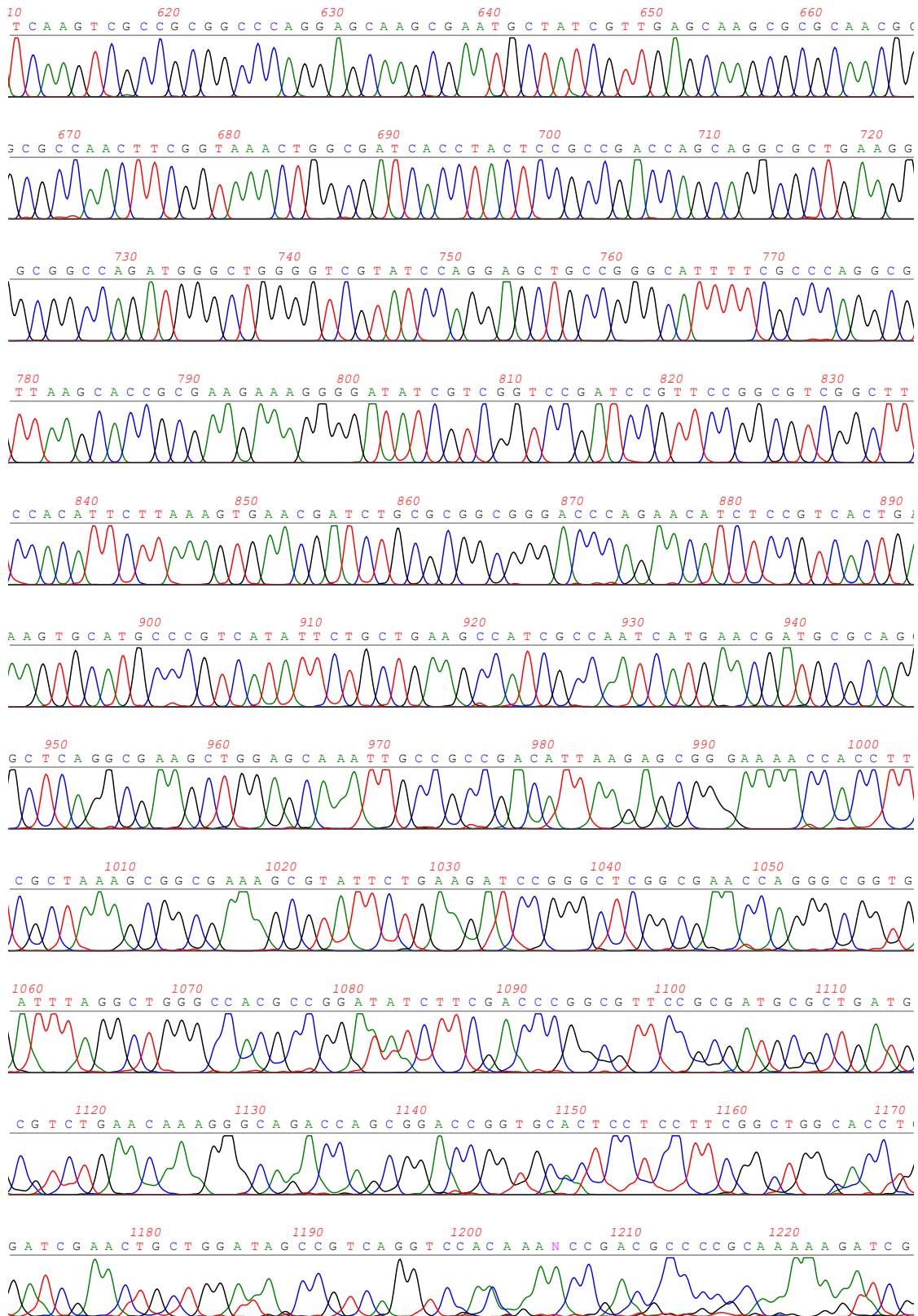


8.1.3 Ad 3.1.2.3 K.p.

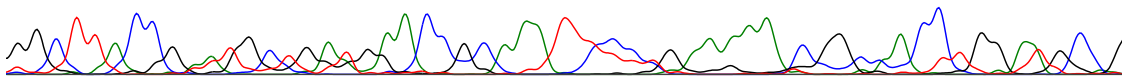
FASTA forward

>86FA74fwd 29288720.seq - on 2017/1/27-11:50:30
automatically edited with PhredPhrap, start with base no.:
47 Internal Params: Window size: 20, Goodqual: 19, Badqual:
10, Minseq length: 50, nbadelimit: 1

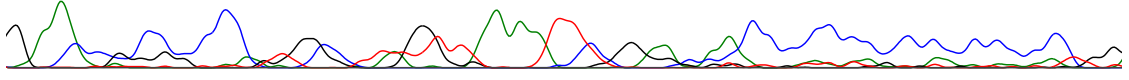
```
aactGGaaancGcTGCTTctCGGtatCgcntGaTcgcgaaataCcaGTTTcgCTGCCCC  
CCAGGTGGTCGataaagtancGGCCGTCgtcAATAATGGCGTCGTGCTGGAAAGCGACG  
TCGATGGTTTTGATGCAATCGGTTAAGCTCAATGCTGGTCAGGCTGGCCAACAGCTGCCG  
gATGACGCGACCCTGCGCCATCAGATCCTCGAAAGACTGATCATGGACCAGATCGTGT  
ACAGATGGGGCAGAAGATGGGCGTGAAGGTCTCTGACGACCAGCTCGATCAGGCCATCG  
CCAACATCGCTAAACAAAACAACATGACCATGGATCAGATGCGCAGCCGTCTGGCCTAT  
GAAGGCATCAACTACAACACCTACCGTAACCAGATCCGTAAAGAGATGCTGATTTCCGA  
AGTGCGTAACAATGAGGTGCGTCGTCGCATCACCGTGCTGCCGCAGGAAGTGGAAAGCGC  
TGGCCAAACAGATCGGCGACCAGAACGACGCCAGCACCGAGCTCAACCTGAGCCACATC  
CTGATCCCCTGCGGAGAACCCGACCTCCGATCAAGTCGCCGCGGCCAGGAGCAAGC  
GAATGCTATCGTTGAGCAAGCGCGCAACGGCGCCAACCTTCGGTAAACTGGCGATCACCT  
ACTCCGCCGACCAGCAGGCGCTGAAGGGCGGCCAGATGGGCTGGGgTCGTATCCAGGAG  
CTGCCGGGCATTTTCGCCAGGCGTTAAGCACCGCGAAGAAAGGGGATATCGTCGGTCC  
GATCCGTTCCGCGCTCGGCTTCCACATTCTTAAAGTGAACGATCTGCGCGGCGGGACCC  
AGAACATCTCCGTCACTGAAGTGCATGCCCGTCATATTCTGCTGAAGCCATCGCCAATC  
ATGAACGATGCGCAGGCTCAGGCGAAGCTGGAGCAAnTTGCCGCCGACATTAAGancgg  
gAAAaCCACCTTCGCTAAAGCGGCGAAAGCGTATTCTGAagaTCCGGGCTCGGCGAACC  
AGggCGGTGaTttAGGCTGGgCcAcGCCGgatnTCTTCGaCCcGgcgTtCcgcgangcg  
cTGangentCTGAACAAAGGgCAgaCcaGCGGaccGGtgcac
```

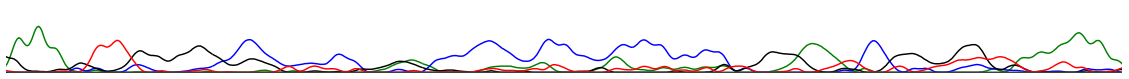
1230 1240 1250 1260 1270 1280
G G C T T A C C G A A T G C T G A T G A A C C G C A A A T T T C C T G A A A A A G N G G C A A C C T G G A N N C C G



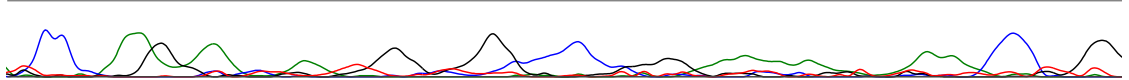
1290 1300 1310 1320 1330 1340
G A A C C G C G C C C C A T G C N T N A G T T A A A A T T N G N A A C A A C C C C C C C N C C C C C C N G G



1350 1360 1370 1380 1390
A A A G T T G G G G G C G N N C C N N N A C C C C N N C C N A C C C A C C A T G G A A T C G G N G N T A A A A A A



1400 1410 1420 1430 1440 1450
T C C C A A A N N N N C T T A A T T G G G C T G G C C C C C C C G G G A A A A A A A N A N A N N C C C T G G



1460 1470 1480
G G C C C A A A G A G T T T C T A G A G T T T T T T A A A C

