

Analyse von Struktur und Dynamik ausgewählter Enzyme und potenzieller Wirkstofftargets unter Anwendung gepulster Synchrotron- und X-FEL Strahlung

Dissertation

Zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)
an der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften der
Universität Hamburg, Fachbereich Chemie

vorgelegt von

Nadine Werner

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum von Mai 2016 bis November 2019 in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Dr. Ch. Betzel im Laboratorium für Strukturbiologie von Infektion und Entzündung am Institut für Biochemie und Molekularbiologie des Fachbereichs Chemie der Universität Hamburg durchgeführt.

1. Gutachter: Prof. Ch. Betzel

2. Gutachter: Prof. A. Torda

Datum der Disputation: 28.02.2020

Datum der Druckfreigabe: 29.06.2020

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	V
Einheiten	VI
Zusammenfassung.....	1
Abstract	3
1 Einleitung	5
1.1 <i>Klebsiella Pneumoniae</i>	5
1.2 Wirkungsweise von Antibiotika	6
1.3 Resistenzmechanismen gegen Antibiotika	8
1.4 β -Lactamasen.....	12
1.5 CTX-M β -Lactamasen.....	13
1.6 Inhibierung von β -Lactamasen	14
1.7 Zielsetzung	16
2 Material und Methoden.....	17
2.1 Material	17
2.1.1 Chemikalien	17
2.1.2 Verbrauchsmaterialien	17
2.1.3 Medien, Puffer und Lösungen	17
2.1.4 Größenmarker	20
2.1.5 Kits	21
2.1.6 Proteinsequenz.....	21
2.1.7 Vektoren	21
2.1.8 Bakterienstämme	21
2.1.9 Geräte.....	21
2.1.10 Software	23
2.2 Methoden	24

2.2.1	Molekularbiologische Methoden	24
2.2.2	Proteinbiochemische Methoden.....	25
2.2.3	Biophysikalische Methoden	28
2.2.4	Proteinkristallisation	30
2.2.5	Röntgenstrukturanalyse	32
3	Ergebnisse und Diskussion	35
3.1	Rekombinante Expression und Reinigung.....	35
3.2	Charakterisierung	36
3.3	Kristallisation	41
3.4	Datensammlung und Refinement	46
3.4.1	Synchrotrondatensammlung von Einkristallen	46
3.4.2	Serielle Datensammlung am Synchrotron APS	49
3.4.3	Serielle Datensammlung am European XFEL	49
3.5	Modellinterpretationen.....	53
3.6	Vergleich der Synchrotron- und XFEL-Strukturen von CTX-M-14 mit Avibactam.....	56
3.7	Spezifität verschiedener Boronsäure-Inhibitoren	58
3.8	Vergleich von CTX-M-14 mit anderen β -Lactamasen.....	63
4	Ausblick	66
4.1	Zeitaufgelöste Messungen	66
4.2	Neutronenbeugung	68
5	Einleitung	70
5.1	<i>Komagataeibacter europaeus</i>	70
5.2	Quorum Sensing	71
5.3	Biofilme.....	72
5.4	Quorum Quenching	73
5.5	GqqA	75

5.6	Zielsetzung	77
6	Material und Methoden.....	78
6.1	Material	78
6.1.1	Medien, Puffer und Lösungen	78
6.1.2	Proteinsequenz.....	79
6.1.3	Vektoren	79
6.2	Methoden	80
6.2.1	Molekularbiologische Methoden	80
6.2.2	Proteinbiochemische Methoden.....	81
6.2.3	Biophysikalische Methoden	82
6.2.4	Proteinkristallisation	83
6.2.5	Röntgenstrukturanalyse	84
6.2.6	Docking	85
7	Ergebnisse und Diskussion	86
7.1	Rekombinante Expression und Reinigung	86
7.2	Pufferoptimierung	89
7.3	Charakterisierung	91
7.4	Kristallisation und Datensammlung.....	93
7.5	Lösung des Phasenproblems	96
7.6	Modell Interpretationen.....	98
7.6.1	Struktur von GqqA und SeGqqA.....	98
7.6.2	Vergleich der Struktur mit den SAXS-Daten.....	101
7.6.3	Vergleich von GqqA mit der Prephenatdehydratase 2qmx	102
7.7	Enzymaktivität und Substratspezifikation	105
7.8	Mutationen	108
8	Ausblick	113

Literaturverzeichnis	114
9 Anhang	121
A1. Sequenzalignment von CTX-M-14 und CTX-M-15	121
A2. DLS Daten der Pufferoptimierung von GqqA nach der Dialyse.....	121
A3. Chemikalien und Gefahrstoffe.....	125
Chemikalien.....	125
Kristallisationsscreens.....	128
GHS und Gefahrensymbole.....	129
H-Sätze	129
P-Sätze.....	130
A4. Abbildungsverzeichnis	132
A5. Tabellenverzeichnis	135
Danksagung	136
Publikationen.....	137
Eidesstattliche Erklärung.....	138

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Å	Ångström
AHL	Acylhomoserinlacton
APS	Ammoniumperoxodisulfat
APS	<i>Advanced Photon Source</i> , Synchrotron in Illinois, USA
Bis-Tris	Bis(2-hydroxyethyl) amino-tris(hydroxymethyl)methan
CD	Circulardichroismus
CHES	N-Cyclohexyl-2-aminoethansulfonsäure
CV	<i>column volume</i> / Säulenvolumen
DBO	Diazabicyclooctanone
DESY	Deutsches Elektronen Synchrotron
ddH ₂ O	bidestilliertes Wasser
DLS	dynamische Lichtstreuung
D _{max}	maximale Partikelgröße
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EPS	extrazelluläre polymere Substanzen
ESBL	<i>Extended-spectrum</i> β-Lactamase
ESI	Elektrospray-Ionisation
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
kDa	Kilodalton
LB-Medium	Luria-Bertani Medium
MDR	<i>Multi-drug resistance</i>
MES	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure
MISC	<i>Mix-and-inject serial crystallography</i>
MOPS	3-(N-Morpholino)propansulfonsäure
MRSA	Methicillinresistenter Staphylococcus Aureus
MS	Massenspektrometrie
MW	<i>molecular weight</i> / Molekulargewicht
MWCO	<i>Molecular Weight Cut-Off</i>
NaCl	Natriumchlorid
Ni-NTA	Nickel-Nitriloessigsäure
OD ₆₀₀	optische Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBP	Penicillin-bindende Proteine
PBPD	Periplasmatisch bindende Proteindomäne

PCR	<i>polymerase chain reaction</i> / Polymerase-Kettenreaktion
PDB	Proteindatenbank
PEG	Polyethylenglykol
PM	Proteingrößenstandard
R _g	Gyrationsradius
R _h	hydrodynamischer Radius
<i>r.m.s.d.</i>	<i>root mean square deviation</i>
rpm	<i>rounds per minute</i> / Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SAD	<i>Single-wavelength anomalous dispersion</i>
SAXS	<i>small-angle X-ray scattering</i> / Röntgenkleinwinkelbeugung
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i> / Natriumdodecylsulfat
SEC	<i>size-exclusion chromatography</i> / Größenausschlusschromatografie
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethyl ethylenediamine
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
UHH	Universität Hamburg
UKE	Uniklinikum Hamburg-Eppendorf
UV	Ultraviolett
XFEL	<i>X-ray free electron laser</i> / Röntgen Freier Elektronenlaser

Einheiten

°C	Grad Celsius
Å	Angström
AU	<i>absorption units</i> , Absorptionseinheiten
Da	Dalton
g	Gramm
h	Stunde
K	Kelvin
L	Liter
m	Meter
M	Molar (mol/l)
min	Minute
s	Sekunde
V	Volt

ZUSAMMENFASSUNG

Bakterielle Infektionen sind die Ursache einer Vielzahl von Krankheiten. Seit den 1930er Jahren werden Antibiotika zur Behandlung eingesetzt, allerdings haben sich verschiedene Mechanismen von Resistenzen gebildet. Diese Arbeit gliedert sich in zwei Bereiche, die im Zusammenhang mit der Problematik bakterieller Infektionen stehen. Die Funktion von zwei Enzymen wird anhand moderner strukturbioologischer Methoden charakterisiert. Im ersten Teil wird ein Protein behandelt, das β -Lactam Antibiotika hydrolysiert. Der zweite Teil der Arbeit charakterisiert ein Enzym, dessen Funktion auf der Störung des Quorum Sensing beruht. Diese Kommunikation zwischen Bakterien, spielt bei der Bildung von Biofilmen eine regulatorische Rolle. Innerhalb dieser Biofilme sind die Bakterien vor äußeren Einflüssen wie Antibiotika geschützt und die Erkrankungen somit nur schwer behandelbar.

Antibiotika-resistente Bakterien führen weltweit zu tausenden Todesfällen. Dabei treten auch vermehrt multiresistente Erreger auf, gegen die die meisten heute bekannten Antibiotika wirkungslos sind. Die β -Lactamase CTX-M-14 hydrolysiert den Lactamring von β -Lactam Antibiotika. Diese gehören zu den bis heute am häufigsten verabreichten Antibiotikaklassen. Eine Inhibierung dieser β -Lactamasen ist daher eine vielversprechende Vorgehensweise, um trotz Resistenzen Infektionen behandeln zu können.

Dazu wurde in dieser Arbeit die strukturelle Untersuchung der β -Lactamase CTX-M-14 aus dem pathogenen Bakterium *Klebsiella Pneumoniae* in Kooperation mit den Arbeitsgruppen von Prof. M. Aepfelbacher und Prof. H. Rohde (UKE) durchgeführt. Dieses medizinisch bedeutsame, da weit verbreitete Enzym wurde für verschiedene Röntgendiffraktionsmessungen kristallisiert. Zu diesem Zweck wurde das Protein rekombinant exprimiert und gereinigt. Es wurden Kristallisationsprotokolle entwickelt und optimiert, um reproduzierbare Kristalle definierter Größen zu erhalten und Diffraktionsdaten an verschiedenen Synchrotron- und XFEL-Strahlungsquellen aufgenommen. Die Proteinkristalle wurden vor der Messung mit neu zugelassenen β -Lactamaseinhibitoren versetzt, um ein besseres Verständnis von deren Bindung an das Enzym zu ermöglichen. Durch die reproduzierbare Kristallisation von Mikrokristallen können auch zukünftig verschiedene Wirkstoffe untersucht werden, um in einem zeitlich vertretbaren Rahmen Inhibitoren für β -Lactamasen zu entwickeln.

Viele Bakterien bilden Biofilme, die sie vor äußeren Einflüssen wie Antibiotika schützen. Biofilme spielen aber nicht nur in der Medizin eine große Rolle, sondern treten ubiquitär in der Umwelt auf. Die Bildung der Biofilme wird mittels Quorum Sensing, einem chemischen Kommunikationssystem, von den Bakterien in Bezug auf ihre Zelldichte abgestimmt. Der Mechanismus des Quorum Quenching verhindert diese Art der Kommunikation, wodurch die Bildung von Biofilmen verhindert werden kann.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde, die zu den Quorum Quenching Enzymen gehörende Acylase GqqA in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. W. Streit (Biozentrum, UHH) untersucht. Diese stammt aus dem Biofilm-produzierendem Essigsäurebakterium *Komagataeibacter europaeus*, welcher eine Bedeutung in der traditionellen Essigsäureproduktion hat. Bisher gab es keine Daten zur strukturellen Charakterisierung dieses Proteins. GqqA wurde rekombinant hergestellt und die Reinigung optimiert. Das Protein wurde in Lösung mit Messungen der dynamischen Lichtstreuung und des Circular dichroismus untersucht und erste strukturelle Informationen mit SAXS-Messungen gesammelt. GqqA wurde kristallisiert und die Kristalle mittels Seeding optimiert, um Röntgendiffraktionsdaten aufzunehmen. Aufgrund der geringen Homologie zu anderen Proteinen war eine Lösung des Phasenproblems mittels Molekularem Ersatz nicht möglich. Aus diesem Grund wurde das Protein in Minimalmedium mit Selenomethionin exprimiert. Mithilfe der eingebauten Selenatome konnte die Struktur durch SAD gelöst werden. Überraschenderweise enthielt die Struktur des SeGqqA nur zwei der erwarteten drei Domänen. Die vollständige Proteinstruktur konnte schließlich mit der SeGqqA-Struktur durch Molekularen Ersatz gelöst werden. Strukturell ähnelt GqqA den Prephenatdehydratasen, besitzt aber eine Acylase-Aktivität. Die Struktur unterscheidet sich von allen bisher bekannten Quorum Quenching Enzymen. Um die Oligomerisierung des Enzyms zu untersuchen wurden nach Analyse der Quartärstruktur und der Kristallkontakte fünf Mutanten erstellt und mit deren Charakterisierung begonnen.

ABSTRACT

Bacteria are the major source of infectious diseases. Since the 1930s antibiotics have been used to treat infections but different mechanisms of antibiotic resistance evolved. This thesis focuses on two proteins. One of them is a β -lactamase, which can hydrolyze β -lactam antibiotics. The other protein interrupts cellular communication called quorum sensing between bacteria, which plays a crucial role in biofilm formation. Inside these biofilms the bacteria are protected from outer influences like antibiotics and cannot efficiently be treated.

Antibiotic resistant bacteria cause thousands of deaths worldwide. There is also an increasing number of bacteria, which are multi-resistant and very difficult to medicate. β -Lactamases are enzymes which cleave the lactam ring of β -lactam antibiotics. These β -lactam antibiotics belong till now to the most frequently used classes of antibiotics. To combat bacterial infections the application of β -lactamase inhibitors is a common treatment in combination with β -lactam antibiotics who target the cell wall biosynthesis.

In the course of this work research on the β -lactamase CTX-M-14 from the pathogenic bacteria *Klebsiella Pneumoniae* was performed in cooperation with the groups of Prof. M. Aepfelbacher und Prof. H. Rohde (UKE). This enzyme is spread worldwide and plays an important role in resistance against β -lactam antibiotics. Crystallization of CTX-M-14 was established for different methods of X-ray diffraction data collection. Therefore, the protein was recombinantly expressed and purified. Crystals of various sizes were produced and measured at different synchrotron and XFEL radiation sources. The crystals were soaked with newly established β -lactamase inhibitors to elucidate their binding mechanisms to the enzyme. Established reproducible production of microcrystals allows a screening of different compounds to support future drug discovery approaches.

Many bacteria produce biofilms to prevent themselves from outer influences like antibiotics. Biofilms are not only a problem in medicine but are ubiquitous in the environment. The formation of biofilms is population density controlled via chemical communication by various small molecules called autoinducers. This communication is well known as quorum sensing. It can be interrupted by enzymatic quenching of this signal to prevent or stall biofilm formation. These mechanisms are called quorum quenching.

In the course of this work the acylase GqqA, which belong to the quorum quenching enzymes, was investigated in cooperation with the group of Prof W. Streit (Biozentrum, UHH). The enzyme is produced by the biofilm forming bacteria *Komagataeibacter europaeus*, which plays a role in the traditional vinegar production. Until now, there is no information available about the structural characterization of this protein. GqqA was recombinantly produced and the purification protocol was optimized. First structural information was obtained with DLS and CD spectroscopy, followed by SAXS measurements of the protein in solution. The protein crystallization was optimized with seeding experiments and first diffraction data were collected. Due to a low sequence homology to other proteins, it was not possible to solve the phase problem with molecular replacement. To overcome this problem the protein was expressed in minimal media supplemented with selenomethionine. The crystal structure of this protein was solved with SAD. Surprisingly, one of the expected three domains was missing in SeGqqA. This structure allowed to solve the complete structure by molecular replacement of crystals of the complete GqqA. Even the overall structure of GqqA is similar to known prephenate dehydratases, it has acylase activity, but a different polypeptide-fold compared to any till now known quorum quenching enzymes. Five mutants of GqqA were produced and their functional and structural characterization was initiated.

Kapitel A: β -Lactamase CTX-M-14

1 EINLEITUNG

1.1 *Klebsiella Pneumoniae*

Klebsiella pneumoniae ist ein zuerst 1883 von Carl Friedländer beschriebenes Gram-negatives, stäbchenförmiges Bakterium der Gattung *Klebsiella*. Es ist mit einer Schleimkapsel (Glycokalyx) umgeben und besitzt keine Flagellen, wodurch es sich nicht aktiv fortbewegen kann. Es lebt fakultativ anaerob, kann Lactose abbauen und molekularen Stickstoff fixieren. *K. pneumoniae* ist ein mesophiles Bakterium, das am besten zwischen 30 °C und 37 °C wächst. Es kann allerdings auch noch bei Temperaturen von bis zu 41 °C überleben (Zhu and Brill 1981).

K. pneumoniae wird in drei phylogenetische Gruppen unterteilt, *K. pneumoniae* (*KpI*), *K. Quasipneumoniae* (*KpII-A* und *KpII-B*), sowie *K. Variicola* (*KpIII*) (Brisse and Verhoef 2001). Zwischen den Gruppen tritt nur wenig Gentransfer auf. Alle drei können in Menschen Infektionen auslösen, am häufigsten tritt aber *KpI* auf, welches einen sehr variablen Genpool mit über 150 Stämmen besitzt (Holt, Wertheim et al. 2015). Alle Gruppen treten ubiquitär auf und finden sich in Gewässern, dem Boden und an Pflanzenwurzeln. Jede Gruppe scheint sich dabei an eine ökologische Nische angepasst zu haben. So findet man das Gen *nif*, das für die Stickstofffixierung nötig ist, bei den meisten Vertretern von *KpIII* (vorwiegend an Pflanzen), bei einigen von *KpII*, aber nur sehr selten in *KpI* (vorwiegend in Menschen und Tieren). Bei *KpII* konnte beobachtet werden, dass bei längerer Besiedelung von Menschen das *nif*-Operon verschwand. Die meisten Virulenzfaktoren findet man hingegen bei *KpI*. (Holt, Wertheim et al. 2015). *K. pneumoniae* kommt auf der Haut, den Atemwegen und im Verdauungstrakt von Tieren und Menschen vor und ist ein Teil der menschlichen Darmflora (Navon-Venezia, Kondratyeva et al. 2017). Bei gesunden Menschen treten meist keine Infektionen mit *K. pneumoniae* auf, bei immungeschwächten Personen kann es allerdings schwere Krankheiten wie Lungenentzündungen (Pneumonien), Wundinfektionen, Sepsis und Harnwegsinfekte auslösen (Broberg, Palacios et al. 2014). Das Bakterium gilt als Krankenhauskeim und führt dort als zunehmend multiresistenter und sehr robuster Keim zu etwa einem Drittel der Infektionen mit Gram-negativen Bakterien (Navon-Venezia, Kondratyeva et al. 2017). Problematisch hierbei ist auch die zunehmende Ausbreitung von Extended-spektrum β -Lactamasen (ESBLs) und Carbapenemasen in *K. pneumoniae*

(Tzouvelekis, Markogiannakis et al. 2012, Munoz-Price, Poirel et al. 2013). Diese Enzymklassen sind in der Lage eine Vielzahl von β -Lactam-Antibiotika abzubauen, was die Behandlung von Infektionen erschwert (Paczosa and Mecsas 2016). *Klebsiella* kann sich an medizinische Geräte wie Katheter und Beatmungsgeräte anheften und immungeschwächte Patienten infizieren. Weitere Risikogruppen sind ältere Menschen und Neugeborene, insbesondere Frühgeborene, deren Immunsystem noch nicht vollständig ausgebildet ist, wodurch sich die Bakterien ungehindert vermehren können (Pitout, Nordmann et al. 2015). Während der letzten Jahre kam es zu einigen epidemischen Ausbrüchen auf Neugeborenen-Intensivstationen mit mehreren Todesfällen (Bagattini, Crivaro et al. 2006, Yusef, Shalakhti et al. 2018).

1.2 Wirkungsweise von Antibiotika

Die Entdeckung des ersten Antibiotikums, des Penicillins, erfolgte bereits 1928 (Fleming 1929). Seitdem wurden viele weitere Antibiotika identifiziert und weiterentwickelt. Die meisten Antibiotika wurden zwischen 1930 und 1970 entdeckt (Dahal and Chaudhary 2018).

Antibiotika können in zwei Gruppen eingeteilt werden, je nachdem ob sie zum Zelltod führen (bakterizide Antibiotika) oder das Zellwachstum inhibieren, aber die Bakterien nicht töten (bakteriostatische Antibiotika) (Kohanski, Dwyer et al. 2010). Die Übergänge zwischen beiden Gruppen sind allerdings fließend und hängen auch vom Bakterium ab (Pankey and Sabath 2004). Die meisten eingesetzten Antibiotika sind Naturstoffe oder Naturstoffderivate, es werden aber auch synthetische Antibiotika eingesetzt. Für gewöhnlich werden nur bakterienspezifische Systeme als Angriffspunkte der Antibiotika verwendet, um dem menschlichen Organismus nicht zusätzlich zu schaden. Zu diesen bakterienspezifischen Systemen gehören die Zellwandsynthese, die bakteriellen Ribosomen und die Folsäuresynthese (Abb. 1) (Hubbard and Walsh 2003, Kohanski, Dwyer et al. 2007).

Einige Antibiotika stören die Zellwandsynthese. Das bekannteste Beispiel hierfür ist Penicillin, welches an verschiedene Penicillin-bindende Proteine (PBPs) binden kann (Waxman and Strominger 1983). Zu den PBPs gehört die D-Alanin-Transpeptidase, welche zur Quervernetzung und damit Stabilität der bakteriellen Zellwand benötigt wird. Durch die entstehenden Läsionen und den hohen osmotischen Druck kommt es zur Zellyse (Tomasz 1979).

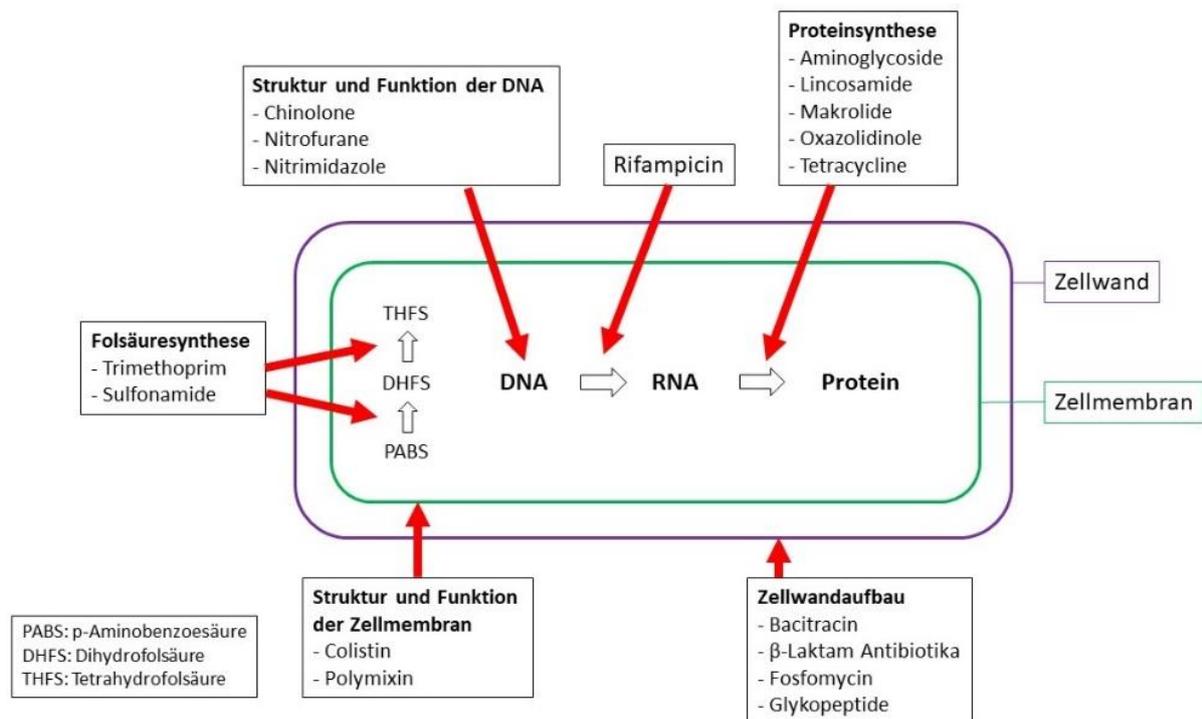


Abbildung 1: Wirkungsweise verschiedener Antibiotikaklassen auf eine Bakterienzelle.

Prokaryotische 70S Ribosomen (2,5 MDa) bestehen aus einer großen 50S und einer kleinen 30S Untereinheit. Das S steht für die Svedberg-Einheit und beschreibt das Sedimentationsverhalten. Eukaryotische 80S Ribosomen (4,2 MDa) bestehen hingegen aus 60S und 40S Untereinheiten. Beide Ribosomen unterscheiden sich nicht nur in ihrer Größe, sondern auch in ihrer Proteinzusammensetzung, wodurch gegen prokaryotische Ribosomen gerichtete Antibiotika nicht auf eukaryotische Ribosomen wirken. Je nachdem, wo die Antibiotika an das Ribosom binden, haben sie verschiedene Auswirkungen. Während sich Tetracycline an die 30S Untereinheit anlagern und das Binden der aminoacyl-tRNA verhindern, blockieren Makrolid-Antibiotika in der 50S Untereinheit den Tunnel, durch den das synthetisierte Peptid das Ribosom verlassen sollte (Poehlsgaard and Douthwaite 2005).

Die Folsäuresynthese findet nur in prokaryotischen Zellen statt, während Eukaryoten die für die DNA-Synthese wichtige Folsäure von außen aufnehmen müssen. Sulfonamide hemmen die Dihydropteroat-Synthase und damit die Bildung von Folsäure (Walsh 2000, Kohanski, Dwyer et al. 2010).

Es werden auch Alternativen zu klassischen Antibiotika gesucht. Die meisten momentan erforschten Substanzen können allerdings nur ergänzend oder prophylaktisch eingesetzt werden. Einige dieser Komponenten wirken auf die pathogenen Bakterien (Antikörper, Bakteriophagen, Anti-Biofilm Peptide), andere auf den Wirt (Stimulation des Immunsystems, Impfungen, Probiotische Bakterien) Einige dieser Komponenten befinden sich in unterschiedlichen Phasen der klinischen Studien und könnten schon innerhalb der nächsten Jahre zugelassen werden (Czaplewski, Bax et al. 2016, Wright 2016).

1.3 Resistenzmechanismen gegen Antibiotika

Zur Behandlung von bakteriellen Infektionen werden zumeist Antibiotika eingesetzt, jedoch treten leider bereits nach wenigen Jahren der klinischen Anwendung Resistenzen auf (Abb. 2). Diese Resistenzen können intrinsisch vorhanden sein, durch Mutationen entstehen oder durch horizontalen Gentransfer erworben sein (Blair, Webber et al. 2015, Baym, Stone et al. 2016). Heute sind viele Gründe für die schnelle Ausbreitung von Antibiotikaresistenzen bekannt. Dazu zählt z.B. ein zu sorgloser Einsatz von Antibiotika in der Landwirtschaft und Medizin. In der Tierzucht werden Antibiotika immer noch prophylaktisch verabreicht, während in der Medizin zu oft nicht geprüft wird, um welchen Erreger es sich handelt. Teilweise werden Antibiotika auch bei Viruserkrankungen verschrieben, obwohl diese in diesem Fall nutzlos sind, aber die Ausbildung von Resistenzen fördern. In einigen Ländern sind Antibiotika auch rezeptfrei erhältlich. Weitere Gründe für die wachsende Anzahl an Resistenzen sind die zunehmenden internationalen Reisen und Migrationen, sowie mangelnde Hygiene und unzureichende Abfallentsorgung. Aber auch Wildtiere tragen zur Verbreitung von Resistenzen bei (Berendonk, Manaia et al. 2015, Aslam, Wang et al. 2018).

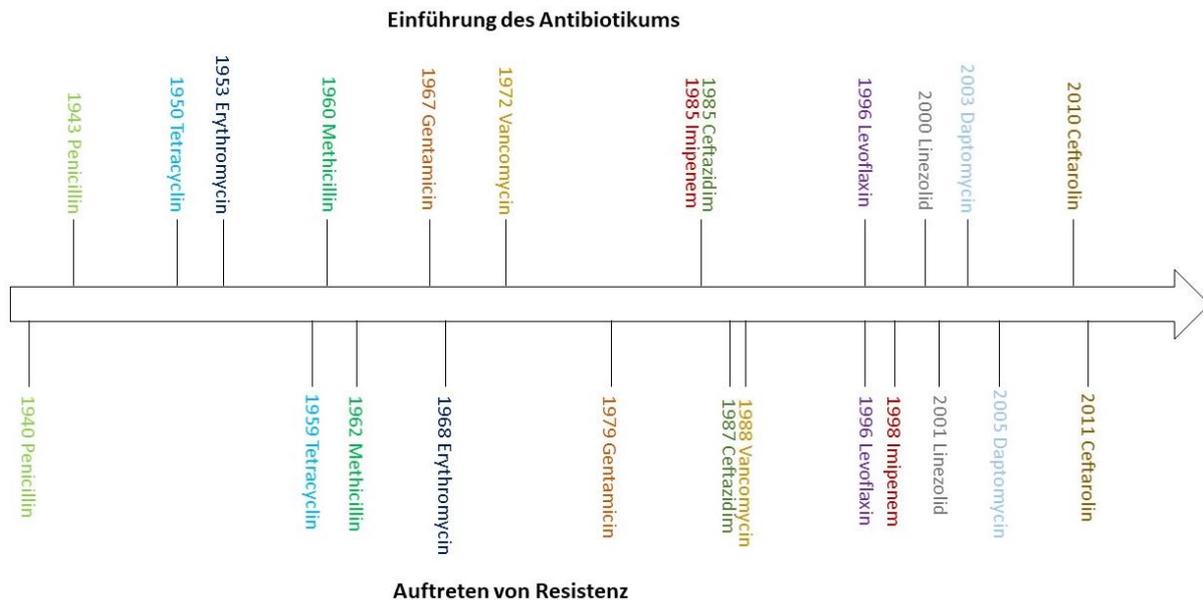


Abbildung 2: Markteinführung verschiedener Antibiotika und Auftreten erster Resistenzen

Heute wird *K. Pneumoniae* als Quelle und Reservoir für Antibiotikaresistenzgene gesehen, weil viele der wichtigsten Gene zuerst in *K. Pneumoniae* entdeckt wurden und folgend auch in anderen Gram-negativen Bakterien (Holt, Wertheim et al. 2015, Navon-Venezia, Kondratyeva et al. 2017). Bei *K. Pneumoniae* treten inzwischen Antibiotikaresistenzen gegen vier wichtige Antibiotikaklassen, Cephalosporine der 3. Generation, Aminoglycoside, Fluoroquinone und Carbapeneme, in jeweils bis zu 60 % der Bakterien auf. Besonders beunruhigend ist der Anstieg bei der Resistenz gegen das Reserveantibiotikum Carbapenem durch die Ausbreitung von Carbapenemasen (Torelli, Akhtar et al. 2019). Die Infektionen mit multiresistenten Bakterien können oft nur noch schwer behandelt werden und die Sterblichkeitsrate liegt bei bis zu 40 %. Oft sind mehrere β -Lactamasegene im selben *K. Pneumoniae*-Stamm vorhanden, die entweder auf dem gleichen oder auf unterschiedlichen Resistenzplasmiden liegen können. Es gibt verschiedene Mechanismen, die zur Resistenz gegen Antibiotika führen (Abb. 3) und im Folgenden kurz beschrieben werden (Walsh 2000).

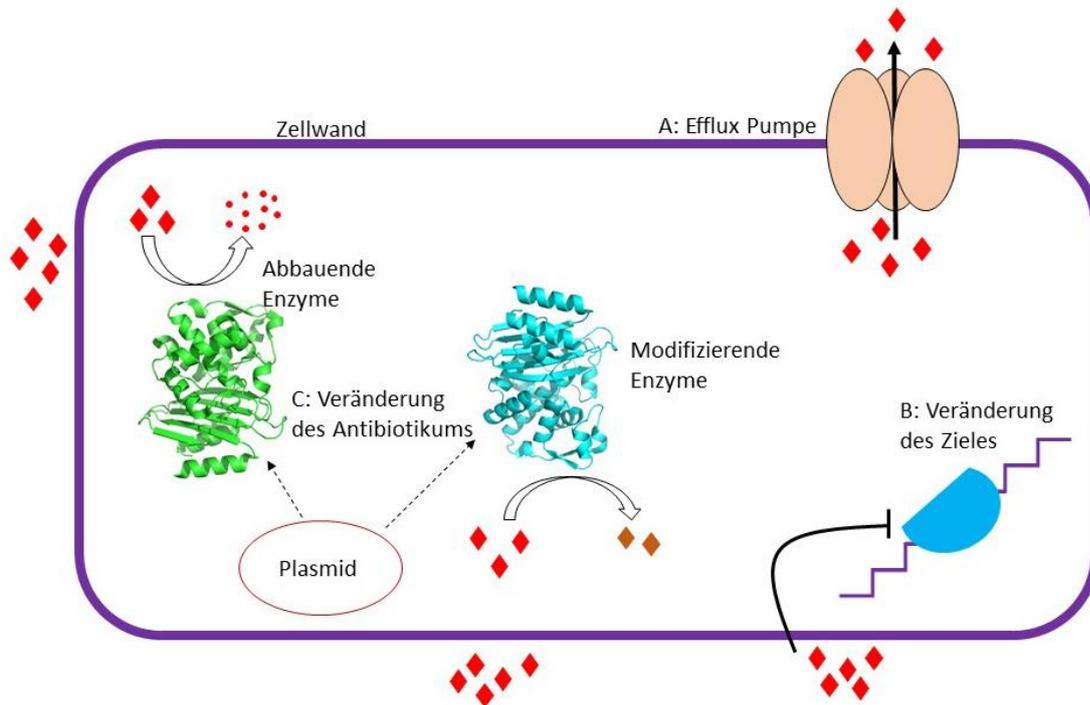


Abbildung 3: Mechanismen der Antibiotika-Resistenz. Die Antibiotika (rote Rauten) diffundieren in die Bakterienzelle, welche verschiedene Resistenzmechanismen besitzt. So können die Antibiotika mit Efflux-Pumpen und ABC Transportern wieder aus der Zelle transportiert werden (A), das Ziel kann verändert werden, sodass die Antibiotika nicht mehr daran binden können (B) oder das Antibiotikum wird durch Enzyme abgebaut oder modifiziert (C).

A) Zugänglichkeit zum Ziel

Gram-negative Bakterien sind durch ihre äußere Membran und die umgebende Schleimkapsel besser gegen das Eindringen von Antibiotika geschützt als Gram-positive Bakterien. Hydrophile Antibiotika können jedoch über Porine, die als unspezifische Kanäle fungieren, in das Innere des Bakteriums gelangen. Ein möglicher Mechanismus dagegen ist die Verringerung der Permeabilität der Membran indem die Anzahl unspezifischer Porine herunterreguliert oder durch spezifischere Porine ersetzt wird. Auf diese Weise können weniger Antibiotikamoleküle in das Bakterium eindringen. Antibiotika, die sich bereits im Inneren der Bakterienzelle befinden können mit Effluxpumpen aktiv wieder ausgeschleust werden. Es gibt Effluxpumpen die sehr spezifisch gegen ein sehr enges Spektrum von Antibiotika wirken (z.B. Tet-Pumpen), aber auch viele, die sehr unterschiedliche Antibiotika transportieren können (Lin, Nishino et al. 2015). Alle Bakterien haben mehrere Effluxpumpen in ihrer chromosomalen DNA codiert, manche befinden sich allerdings auch auf Plasmiden und können somit leicht durch horizontalen Gentransfer übertragen werden.

B) Modifizierung des Zieles

Die meisten Antibiotika binden sehr spezifisch an ihre Zielproteine. Treten in einigen Bakterien zufällige Mutationen auf, welche die Bindung des Antibiotikums verhindern, aber zugleich die natürliche Proteinfunktion gewährleisten, haben diese Bakterien einen Selektionsvorteil und können sich weiter vermehren. Zum Teil liegen auch bereits alternative Proteine vor. Ein Beispiel hierfür sind die für die Zellwandsynthese wichtigen Penicillinbindenden Proteine (PBP), welche durch Penicillin-Antibiotika inhibiert werden. In MRSA (*Methicillinresistenter Staphylococcus Aureus*) tritt zusätzlich zum normalen PBP oft auch ein Protein namens PBP2a auf, welches nicht durch Penicillin gehemmt wird und die weitere Zellwandsynthese ermöglicht.

Außerdem können Bakterien ihre eigenen Proteine zielgerichtet verändern, zum Beispiel durch Methylierung, wodurch das Binden des Antibiotikums verhindert wird.

C) Modifizierung des Antibiotikums

Besonders häufig werden die Antibiotika selbst von den Bakterien verändert. Diese Form der Resistenz wurde bereits 1940 durch die Entdeckung der Penicillinase bekannt. Heute kennt man bereits eine Vielzahl von Enzymen, die verschiedene Antibiotika, wie β -Lactame, Aminoglycoside, Phenicolide und Makrolide, hydrolysieren und damit unwirksam machen können. Durch die Expansion von Antibiotikaklassen und -derivaten hat sich auch das Wirkspektrum der hydrolysierenden Enzyme erweitert. Auf die Enzymklasse der β -Lactamasen wird im folgenden Abschnitt genauer eingegangen.

Eine andere Möglichkeit Antibiotika zu verändern ist die Transferierung verschiedener chemischer Gruppen, z. B. Acyl-, Nukleotid- oder Phosphatgruppen, an sensible Stellen des Antibiotikums, wodurch dieses sterisch an seiner Wirkung gehindert wird (Munita and Arias 2016).

1.4 β -Lactamasen

Seit den 1940er Jahren werden β -Lactam-Antibiotika zur Behandlung von Infektionen eingesetzt und auch heute noch sind sie aufgrund ihrer guten Verträglichkeit die meistverabreichte Antibiotikaklasse. Allerdings sind durch den häufigen Gebrauch einige Enzyme (β -Lactamasen) entstanden, die diese Antibiotika abbauen können (Livermore and Woodford 2006). Anfang der 1960er Jahre wurden die ersten beiden β -Lactamasegene, bla_{SHV-1} und bla_{TEM-1} identifiziert. Etwa zwanzig Jahre später traten die ersten *extended-spectrum* β -Lactamasen (ESBL) auf, die eine erhöhte Aktivität gegen β -Lactam-Antibiotika, darunter auch Cephalosporine der 3. Generation und Monobactame, besaßen. In den 2000er Jahren lösten CTX-M β -Lactamasen die zuvor am häufigsten auftretenden ESBLs TEM und SHV ab (Canton, Jose et al. 2012). Heute sind über 1600 β -Lactamasen bekannt (Papp-Wallace and Bonomo 2016).

β -Lactam-Antibiotika reagieren mit PBPs (Waxman and Strominger 1983). Dabei wird zunächst die nukleophile Hydroxylgruppe eines Serins durch ein Wassermolekül aktiviert. Dieses Serin greift den β -Lactamring des Antibiotikums an, dieser wird geöffnet und es entsteht ein Ester als kovalentes Intermediat, welches hydrolyseresistent ist. Dabei werden die PBPs inhibiert und die Zellwandsynthese gestoppt. β -Lactamasen können diese Inhibierung verhindern, indem sie das β -Lactam binden und hydrolysieren, ohne ein stabiles Intermediat zu bilden. β -Lactamasen sind Hydrolasen und werden in die Untergruppen A-D unterteilt, wobei Gruppe B die Metallo- β -Lactamasen umfasst und die Gruppen A, C und D zu den Serin- β -Lactamasen gehören (Palzkill 2018). Die Penicillinasen bilden die Gruppe A, die Cephalosporinasen die Gruppe C und die Oxacillinasen die Gruppe D. Der Mechanismus ist identisch zu dem der PBPs (Abb. 4), allerdings ist die Hydrolyse des Intermediates bei den β -Lactamasen deutlich schneller als bei den PBPs, sodass ein sehr effizienter Umsatz an β -Lactamen stattfindet, die nach der Ringöffnung wirkungslos sind (D'Costa and Wright 2009).

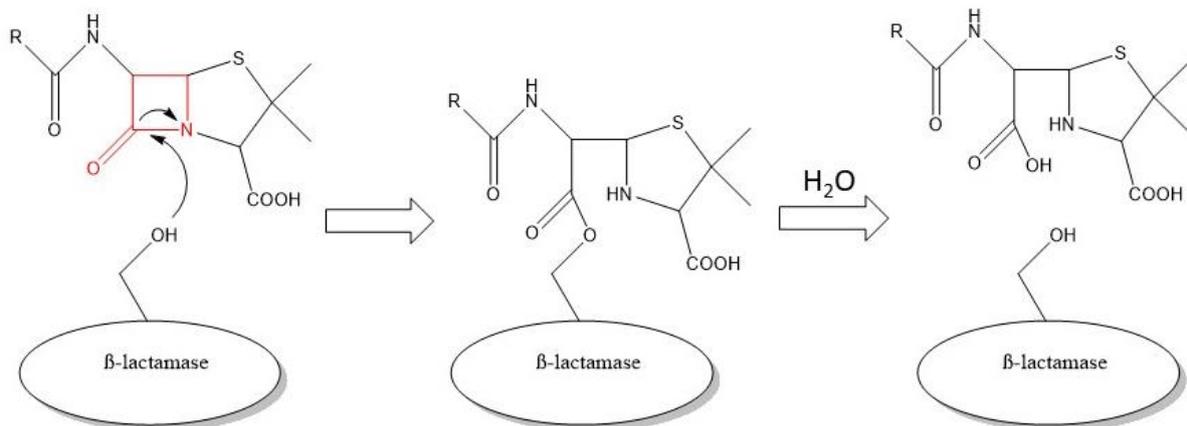


Abbildung 4: Mechanismus der Inhibition durch eine Serin- β -Lactamase. Das nukleophile Serin der β -Lactamase greift den β -Lactamring des Antibiotikums an, öffnet diesen und bildet einen Ester als kovalentes Intermediat. Durch die Hydrolyse des Esters löst sich dieser als inaktive Penicillinsäure vom Enzym. Der β -Lactamring ist in rot hervorgehoben.

1.5 CTX-M β -Lactamasen

Die CTX-M β -Lactamasen sind eine relativ heterogene Gruppe der β -Lactamasegruppe A. Man unterteilt sie in sechs Untergruppen (CTX-M-1, CTX-M-2, CTX-M-8, CTX-M-9, CTX-M-25 und KLUC, jeweils benannt nach dem zuerst entdeckten Enzym der Gruppe), deren Aminosäuresequenz sich um $\geq 10\%$ voneinander unterscheiden. Jede dieser Gruppen beinhaltet mehrere CTX-M-Varianten, deren Aminosäuresequenz sich um $\leq 5\%$ unterscheiden. Am häufigsten treten Vertreter der Gruppen CTX-M-1 und CTX-M-9 auf. Das in dieser Arbeit behandelte CTX-M-14 ist Teil der Untergruppe der CTX-M-9-Enzyme. Bisher sind auch vier Hybridstrukturen bekannt, ein Hybrid aus CTX-M-14 und einem unbekanntem Protein (CTX-M-45) und drei Hybride aus CTX-M-14 und CTX-M-15 (CTX-M-64, CTX-M-123 und CTX-M-132) (D'Andrea, Arena et al. 2013).

Der Ursprung der CTX-M Enzyme liegt in verschiedenen Unterarten von *Kluyvera*, welches zu den Enterobacteriaceae gehört und nur selten humane Infektionen auslöst. Zunächst lagen die Gene *bla*_{CTX-M} chromosomal vor. Einige dieser Gene wurden auf Plasmiden mobilisiert und konnten sich somit auch auf andere Bakterienspezies ausbreiten.

Der Name CTX ist eine Abkürzung des Antibiotikums Cefotaxim. Die Bezeichnung leitet sich von der vergleichsweise hohen Aktivität der Enzyme gegen Cefotaxim ab (Langan, Vandavasi et al. 2018). Aufgrund der elektrostatischen Umgebung und Flexibilität der Bindungstasche kann das voluminöse Cefotaxim effizient gebunden und hydrolysiert werden. Hingegen kann

das Antibiotikum Ceftazidim nur schlecht umgesetzt werden (Bonnet 2004). Durch den Gebrauch des Antibiotikums in Krankenhäusern entwickelten sich jedoch CTX-M-Mutanten, die dieses besser umsetzen konnten. Am wichtigsten stellten sich hierbei die Mutationen D240G und P167S/T heraus. Während die Substitution D240G zu einer größeren Beweglichkeit des B3 β -Stranges und somit einer besseren Zugänglichkeit zum aktiven Zentrum führt (Chen, Delmas et al. 2005), befindet sich P167S im Ω -Loop und beeinflusst die Interaktion des β -Lactams mit dem aktiven Zentrum (Kimura, Ishiguro et al. 2004). Beide Mutationen wirken sich allerdings nachteilig auf die Aktivität gegen Cefotaxim aus. Durch weitere Mutationen (z.B. N106S) wurde die Aktivität gegen Cefotaxim allerdings wiederhergestellt.

1.6 Inhibierung von β -Lactamasen

Einige Gram-negative Bakterien sind inzwischen gegen eine Vielzahl von Antibiotikaklassen resistent und können kaum noch behandelt werden. Eine Alternative zur Entwicklung immer neuer Antibiotika, besteht darin, die Resistenzmechanismen der Bakterien zu überwinden, beispielsweise durch Inhibierung der für den Resistenzmechanismus verantwortlichen Komponenten (Baym, Stone et al. 2016). Bei den β -Lactamasen wurden zunächst die drei Inhibitoren Clavulansäure, Tazobactam und Sulbactam jeweils in Kombination mit einem β -Lactam-Antibiotikum zur Behandlung von Infektionen verwendet. Diese Inhibitoren besitzen alle einen β -Lactam-Ring, aber haben selbst nur geringe antibiotische Wirkung. Es handelt sich um Suizid-Inhibitoren, die in gleicher Weise und statt der β -Lactam-Antibiotika an das Serin im aktiven Zentrum der β -Lactamasen binden, wodurch ihr β -Lactam-Ring geöffnet wird (Abb. 5). Durch Hydrolyse des Inhibitors löst sich dieser vom aktiven Serin und die β -Lactamase erlangt ihre Funktionsfähigkeit zurück (Ehmann, Jahic et al. 2012). Allerdings sind diese β -Lactamase Inhibitoren nur gegen β -Lactamasen der Gruppe A aktiv, während die Klassen B, C und D von Beginn an resistent gegen diese Inhibitoren waren. Einige β -Lactamasen der Klasse A, die zunächst sensitiv gegen die Inhibierung waren, wurden durch die Substitution einzelner Aminosäuren ebenfalls resistent. Seit Mitte der 1990er Jahre gibt es zudem β -Lactamasen, welche in der Lage sind Clavulansäure, Tazobactam und Sulbactam zu hydrolysieren, sodass die klassischen Antibiotika-Inhibitor Kombinationen heute oft nicht mehr in der Lage sind β -Lactamasen der multi-resistenten Erreger zu inhibieren. Teilweise konnte ein Wechsel des β -Lactams der Kombination wieder zur Aktivität gegen die pathogenen Organismen führen.

In den frühen 2000ern wurden Diazabicyclooctanone (DBOs) als synthetische nicht- β -Lactam β -Lactamase Inhibitoren entdeckt und innerhalb der folgenden Jahre wurden einige Derivate entwickelt, die sich hauptsächlich am C2-Rest unterscheiden (Papp-Wallace and Bonomo 2016). Diese Inhibitoren sind vorrangig gegen die Klassen A und C aktiv, zeigen aber auch Wirkung gegen einige β -Lactamasen der Klasse D. DBOs binden an das aktive Serin der β -Lactamase, können aber nicht hydrolysiert werden, sodass die β -Lactamase permanent inhibiert wird (Ehmann, Jahic et al. 2012, Ehmann, Jahic et al. 2013). Im Jahr 2015 wurde der erste nicht- β -Lactam β -Lactamase Inhibitor Avibactam als Medikament in Kombination mit Ceftazidim in den USA zugelassen (Both, Buttner et al. 2017), gefolgt von der Kombination Relebactam-Imipenem/Cilastatin in 2019 (Bush 2018, Zhanel, Lawrence et al. 2018).

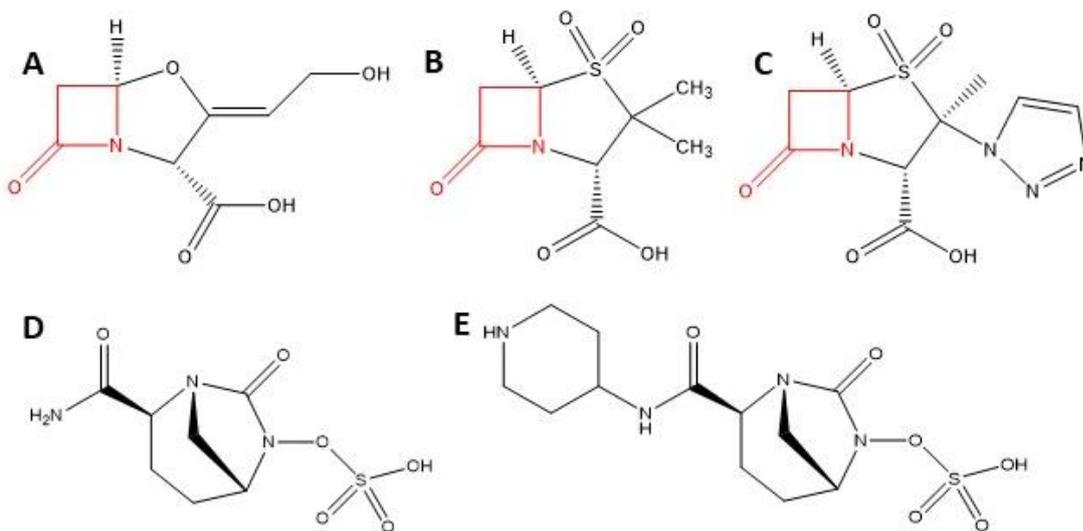


Abbildung 5 Chemische Strukturen ausgewählter β -Lactamase Inhibitoren: (A) Clavulansäure, (B) Sulbactam, (C) Tazobactam, (D) Avibactam und (E) Relebactam. Der β -Lactamring ist in rot hervorgehoben.

Ein weiterer Ansatz sind Boronsäurederivate als β -Lactamase Inhibitoren. Bereits Ende der 1970er Jahre wurde Borsäure als potenzieller β -Lactamase Inhibitor entdeckt, konnte zu diesem Zeitpunkt aber keine Marktreife erlangen (Papp-Wallace and Bonomo 2016). Boronsäure-derivate wie Vaborbactam binden kovalent an das aktive Serin der Serin- β -Lactamasen der Klassen A und C. Im Jahr 2017 wurde die Kombination Vaborbactam-Meropenem als Arzneimittel zugelassen (Bush 2018, Zhanel, Lawrence et al. 2018). Weitere Inhibitoren der DBO Familie, sowie einige Boronsäurederivate befinden sich momentan in unterschiedlichen Phasen der klinischen Studien (Bush and Bradford 2016, Papp-Wallace and Bonomo 2016).

1.7 Zielsetzung

In der Medizin gibt es eine zunehmende Verbreitung multiresistenter Krankheitserreger, die teilweise nicht mehr mit Antibiotika allein behandelbar sind. Wenn es jedoch gelingt, die für die Resistenz verantwortlichen Proteine, z.B. die β -Lactamase CTX-M-14, zu inhibieren, werden trotz der Resistenzsituation, auch zuvor nicht mehr wirksame Antibiotika wieder einsetzbar.

Ein Ziel dieser Arbeit war die Kristallisation von CTX-M-14 in verschiedenen Kristallgrößen, um das Protein für verschiedene moderne Methoden der Röntgenstrukturanalyse zu nutzen. Das sind die Einkristalldiffraktion von Makrokristallen und serielle Datensammlungen von Mikrokristallen an Synchrotron- und XFEL-Strahlungsquellen. Die letztere Methode soll die Möglichkeit eröffnen in einem überschaubaren Zeitrahmen möglichst viele Protein/Ligand Strukturen zu messen, um auf deren Basis neue Inhibitoren zu entwickeln. Die Qualität der Mikrokristallisation wurde durch Vergleich von Strukturanalysen bei hoher Auflösung an Mikrokristallen und einem größeren Kristall überprüft.

Zudem sollte zeitaufgelöst die Bindung des Inhibitors Avibactam untersucht werden. Dieser wird seit 2015 in Kombination mit Ceftazidim zur Behandlung von Infektionen eingesetzt. Ein Verständnis der detaillierten Bindung von Avibactam kann zur Entwicklung weiterer Inhibitoren beitragen. Auch wenn bisher keine vollständigen Resistenzen gegen Avibactam bekannt sind, ist es sinnvoll schon jetzt Alternativen zu entwickeln, bevor neue Resistenzen auftreten.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

Alle in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien wurden in analytischer Qualität von den Firmen Thermo Scientific, Sigma-Aldrich, Serva, Merck, Fluka und Applichem bezogen.

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 1 Übersicht der Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Hersteller
Reaktionsgefäße	Sarstedt
Falcon Röhrchen	Sarstedt
Pipettenspitzen	Sarstedt
Serologische Pipetten	Fischer Scientific
Amicon Ultra 4, Ultra 15, Ultra 0,5, MWCO 3 kDa, 10 kDa	Merck Millipore
Dialyse Schlauchmembran	Roth
Ni-NTA Agarose Matrix	Qiagen
Spritzen 1 ml, 5 ml, 10 ml, 20 ml	VWR
Spitzenvorsatzfilter 0,22 μ m	VWR

2.1.3 Medien, Puffer und Lösungen

Die einzelnen Medien, Lösungen und Puffer wurden, wenn nicht anders beschrieben, mit destilliertem Wasser angesetzt. Die Einstellung des pH-Wertes erfolgte mit Salzsäure beziehungsweise Natronlauge.

Tabelle 2 Allgemein eingesetzte Medien, Puffer und Lösungen

Medium/Lösung/Puffer	Substanz	Zusammensetzung
Agar-Medium	Trypton	10 g/L
	Hefeextrakt	5 g/L
	Natriumchlorid	10 g/L
	Agar	15 g/L
Ampicillin-Stocklösung	Ampicillin Natriumsalz	100 mg/ml
Coomassie-Entfärbelösung	Essigsäure	20 % (v/v)
Coomassie-Färbelösung	Isopropanol	25 % (v/v)
	Essigsäure	10 % (v/v)
	Coomassie Blau	0,1 % (w/v)
Elektrodenpuffer (10x)	Tris-HCL	250 mM
	Glycin	1,9 M
	SDS	1 % (w/v)
Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid-Stocklösung (IPTG)	IPTG	1 M
LB-Medium	Trypton	10 g/L
	Hefeextrakt	5 g/L
	Natriumchlorid	10 g/L
Probenpuffer (2x)	SDS	10 % (w/v)
	Bromphenolblau	0,5 % (w/v)
	Glycerin 100 %	25 % (v/v)
	Sammelgelpuffer (pH 6,8)	12,5 % (v/v)
	DTT	0,2 % (w/v)
Trenngelpuffer (pH 8,8)	Tris-Base	1,5 M
Sammelgelpuffer (pH 6,8)	Tris-Base	0,5 M

Tabelle 3 verwendete Puffer für die Reinigung von CTX-M-14

Puffer A	MES	20 mM
Puffer B	MES	20 mM
	NaCl	1 M

Tabelle 4 verwendete Puffer für Puffertest Thermofluor (jeweils 100 mM Endkonzentration)

Puffer	pH
Wasser	
Natriumcitrat	4; 5; 6
Natriumacetat	4,5
MES	6
K ₃ PO ₄	6
Bis-Tris	6,5
MES	6,5
Na ₃ PO ₄	7; 7,5
K ₃ PO ₄	7
HEPES	7
MOPS	7
Ammoniumacetat	7,3
TRIS-HCl	7,5; 8; 8,5
Imidazol	7,5
HEPES	8
Tricine	8
Bicine	8
Ammoniumacetat & Bicine	8,5
CHES	9

Tabelle 5 verwendete Salze für Salztest Thermofluor

Salz	Endkonzentration
Harnstoff	4 M
Guanidiumhydrochlorid	1M; 0,2 M
Natriumcitrat	0,2 M
Natriummalonat	1M; 0,2 M
Ammoniumsulfat	1 M; 0,2 M
NaCl	1 M; 0,6 M; 0,2 M
NH ₄ Cl	1 M; 0,2 M
MgSO ₄	1 M; 0,2 M
Na ₂ SO ₄	1 M; 0,2 M
KCl	0,2 M
LiCl	0,2 M
NaF	0,1 M
NaBr	0,1 M
NaI	0,1 M
MgCl ₂	5 mM
CaCl ₂	5 mM
ZnCl ₂	1 mM
NiCl ₂	1 mM
MnCl ₂	5 mM
CoCl ₂	1 mM
CuSO ₄	1 mM
EDTA	5 mM

2.1.4 Größenmarker

Für die SDS-PAGE wurde als Größenmarker der *Unstained Protein Molecular Weight Marker* von Fermentas verwendet.

2.1.5 Kits

Es wurde das kommerziell erhältliche Kit peqGold Plasmid Miniprep Kit I von PEQLAB Biotechnologie zur Plasmidisolation verwendet.

2.1.6 Proteinsequenz

CTX-M-14

SAVQQKLAALEKSSGGRLGVALIDTADNTQVLYRGDERFPMCSTSKVMAAAVLKQSETQKQLLNQPVE
IKPADLVNYPNPIAEKHVNGTMTLAELSAALQYSDNTAMNKLIAQLGGPGGVTAFAIRAIGDETFRLDRTE
PTLNTAIPGDPRDTTTPRAMAQLRQLTLGHALGETQRAQLVTWLKGNTTGAASIRAGLPTSWTVGDKT
GSGDYGTTNDIAVIWPQGRAPLVLVITYFTQPQQNAESRRDVLASAARIIAEG

2.1.7 Vektoren

Tabelle 6 Verwendeter Vektor für CTX-M14

Bezeichnung	Merkmale	Hersteller
pRSET A	T7-Promoter, Amp-Resistenz, N-term. (His)6-tag	Invitrogen

2.1.8 Bakterienstämme

Tabelle 7 Verwendete Bakterienstämme

Bakterienstamm	Genotyp	Hersteller
DH5 α	F- endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG Φ 80 <i>dlacZ</i> Δ M15 Δ (<i>lacZYA-argF</i>) U169, hsdR17(rK- mK+), λ -	Invitrogen
BL21 (DE3)	F- <i>ompT</i> hsdSB(rB-, mB-) <i>gal dcm</i> (DE3)	Invitrogen
BL21 (DE3) pLysS	F-, <i>ompT</i> , hsdSB (rB-, mB-), <i>dcm, gal, λ</i> (DE3), pLysS, Cm ^r	Invitrogen

2.1.9 Geräte

Die in dieser Arbeit verwendeten Geräte sind in folgender Tabelle aufgeführt.

Tabelle 8 Verwendete Geräte

Gerät	Gerätetyp	Hersteller
CD-Spektrometer	J-815 CD	Jasco
DLS-Messgeräte	SpectroLight 600	Xtal Concepts GmbH
	SpectroSize 300	Xtal Concepts GmbH
FPLC	ÄKTApurifier System	GE Healthcare, USA
Gelelektrophorese-Kammer	SE 260 Mighty Small II	Hoefer
Gelelektrophorese-Netzgerät	EV231	PEQLAB Biotechnologie
In-Haus Detektor	Mar345S	MarRESEARCH
In-Haus Strahlungsquelle	μ S _{CU}	Incoatec
Inkubationsschüttler	Innova 44	New Brunswick Scientific
	KS 3000 i control	IKA
Inkubator	BD 56	Binder
Ionenaustausch-chromatografiesäulen	HiTrap CM FF	GE Healthcare, USA
	HiTrap SP CM	GE Healthcare, USA
	HiTrap SP XL	GE Healthcare, USA
Kristallisationsroboter	Honeybee 961	Genomic Solutions
	Oryx4	Douglas Instruments
Magnetrührer	VMS-A	VWR International
Mikroskope	SZX12	Olympus
	CLSM	Zeiss
NanoDrop-Spektrometer	ND-1000	PEQLAB Biotechnologie
	ND-2000	PEQLAB Biotechnologie
qtPCR	Mini8 Plus	Coyote Bioscience
pH-Meter	SevenEasy	Mettler-Toledo
Photometer	GeneQuant TM 1300 Spectrophotometer	GE Healthcare, USA
Rollschüttler	RS-TR05	Phoenix Instruments
Schüttler	GFL-3014	GFL
Thermomixer	Comfort	Eppendorf

Ultraschallgerät	Soniprep 150	MSE
Waagen	TE3102S	Sartorius
	CP2245-OCE	Sartorius
Zentrifuge	Multifuge X1R	Heraeus
	5415 R	Eppendorf
	5418 R	Eppendorf
	Minispin Plus	Eppendorf

2.1.10 Software

Tabelle 9 Verwendete Software

Software	Anwendung	Referenz
Clustal Ω	Sequenzalignment	(Madeira, Park et al. 2019)
Expasy	Berechnung des Molekulargewichts	(Gasteiger 2005)
MolProbity	Evaluation von Proteinstrukturen	(Williams, Headd et al. 2018)
CCP4i	Refinement	(Winn, Ballard et al. 2011)
CrystFEL	Prozessierung serieller Daten	(White, Kirian et al. 2012)
Phenix	Molekularer Ersatz und Refinement	(Liebschner, Afonine et al. 2019)
XDS	Prozessierung	(Kabsch 2010)

2.2 Methoden

2.2.1 Molekularbiologische Methoden

2.2.1.1 Transformation

Zunächst wurde ein Aliquot (50 μ L) einer chemisch kompetenten Zelllinie auf Eis aufgetaut und mit 1 μ L DNA versetzt. Es erfolgte eine 15-minütige Inkubation auf Eis, gefolgt von einem Hitzeschock bei 42 °C für 40 s, um die DNA in die Zellen zu transformieren. Nach einer 2-minütigen Inkubation auf Eis wurden 500 mL steriles LB-Medium hinzugefügt und eine Stunde bei 37 °C und 300 rpm im Thermomixer inkubiert. Von diesem Ansatz wurden 100 μ L auf LB-Agar mit dem entsprechenden Antibiotikum ausplattiert und über Nacht bei 37 °C im Trockenschrank inkubiert.

2.2.1.2 Plasmidpräparation

Zunächst wurden 5 mL LB-Medium mit 5 μ L Ampicillin (100 mg/mL) versetzt und eine einzelne, der bei der Transformation erhaltenen Kolonien, mit einer Pipettenspitze gepickt und überführt. Die Kulturen wurden über Nacht bei 37 °C und 180 rpm inkubiert. Am folgenden Tag wurden die Kulturen für 10 min bei 4000 \times g und Raumtemperatur zentrifugiert. Die Extraktion der Plasmid-DNA erfolgte mit dem Kit *peqGold Plasmid Miniprep* nach Herstellerangaben. Die Elution wurde mit 50 μ L Elutionspuffer durchgeführt. Die Lagerung der isolierten Plasmid-DNA erfolgte bei -20 °C.

2.2.1.3 Rekombinante Genexpression

Für die rekombinante Expression des Zielproteins wurde zunächst eine Vorkultur von 150 mL LB-Medium mit 150 μ L Ampicillin (100 mg/mL) versetzt und mit Zellen aus einem Glycerolstock inokuliert. Die Kultivierung erfolgte über Nacht bei 220 rpm und 37 °C. Am nächsten Tag wurden 5 L fassende Schikanekolben mit jeweils 1 L LB-Medium und 1 mL Ampicillin (100 mg/ml) mit 25 mL der Vorkultur angeimpft. Die Inkubation des Ansatzes erfolgte bei 37 °C und 180 rpm. Bei der gewünschten OD₆₀₀ erfolgte die Induktion mit 1 mM IPTG. Nach einer Inkubationszeit von drei Stunden, wurde die Zellsuspension in 1 L-Zentrifugenbecher überführt und für 30 min bei 4000 \times g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellpellets bei -20 °C eingefroren.

2.2.2 Proteinbiochemische Methoden

2.2.2.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Polyacrylamid-Gelelektrophorese ist eine gängige Methode zur Auftrennung von Makromolekülen nach ihrer Ladung und ihrem Molekulargewicht. Die Gele bestehen aus zwei Bestandteilen, das Sammelgel dient zur Fokussierung der Probe und das Trenngel zur größenbedingten Separation der Proteine (Tab. 10). Das im Gel enthaltene Bisacrylamid bildet ein Molekularsieb, dessen Größe durch die Konzentration des Bisacrylamids variiert werden kann. Nach dem Anlegen einer elektrischen Spannung bewegen sich die Proteine aufgrund ihrer verschiedenen Größe mit unterschiedlicher Geschwindigkeit durch das Gel, wobei kleinere Moleküle schneller wandern.

Zur Vorbereitung der Proben wurden 10 μ L der Probe mit 10 μ L des reduzierenden, 2x konzentriertem Probenpuffers versetzt und 10 min bei 95 °C im Heizblock denaturiert. Das β -Mercaptoethanol im Probenpuffer reduziert Disulfidbrücken, während sich das negativ geladene Natriumdodecylsulfat (SDS) an die hydrophoben Bereiche des Proteins anlagert und dessen Eigenladung überdeckt, sodass die Trennung nur von der Proteingröße abhängt. Um die Größe der Proteine abschätzen zu können wurden 5 μ L eines Proteingrößenstandards auf das Gel aufgetragen, während von den Proben jeweils 20 μ L beladen wurden. Die Durchführung der Gelelektrophorese erfolgte bei einer konstanten Stromstärke von 25 mA in 1x Elektrodenpuffer.

Um die Proteine auf dem Polyacrylamidgel zu visualisieren, wurde dieses für mindestens 30 min in eine Coomassie-Färbelösung auf einem Schüttler inkubiert. Anschließend wurde diese Lösung gegen eine Entfärbelösung ausgetauscht und erneut inkubiert, bis die Proteinbanden auf dem Gel sichtbar wurden.

Tabelle 10 Zusammensetzung der SDS-Gele. Volumenangaben für die Vorbereitung von 4 Gelen.

Gelart	Zusammensetzung	Volumen
Sammelgel (4 %)	ddH ₂ O	9,2 mL
	30 % Acrylamid/Bisacrylamid (37,5:1)	2 mL
	Puffer	3,8 mL
	10 % (w/v) SDS	150 μ L
	TEMED	15 μ L
	10 % (w/v) APS	75 μ L
Trenngel (12 %)	ddH ₂ O	10,2 mL
	30 % Acrylamid/Bisacrylamid (37,5:1)	12 mL
	Puffer	7,5 mL
	10 % (w/v) SDS	300 μ L
	TEMED	15 μ L
	10 % (w/v) APS	150 μ L

2.2.2.2 Zellaufschluss

Die Zellpellets wurden bei Raumtemperatur aufgetaut und anschließend mit 10 mL Puffer resuspendiert. Anschließend wurde die auf Eis gelagerte Zellsuspension mit einem Sonifikator fünfmal für 30 s mit Ultraschall behandelt. Es folgte die Abtrennung der unlöslichen Bestandteile durch Zentrifugation für 30 min bei 4 °C und 17000 \times g. Der Überstand mit den löslichen Proteinen wurde weiterverwendet.

2.2.2.3 Dialyse

In Vorbereitung der Ionenaustauschchromatographie musste die Salzkonzentration in der Probe reduziert werden, wofür eine Dialyse durchgeführt wurde. Ein Zellulose-Dialyseschlauchs wurde zum Quellen einige Minuten in Wasser gelegt. Anschließend wurde ein Ende des Schlauches mit einer Klammer verschlossen und die Proteinlösung eingefüllt, bevor auch das andere Ende verschlossen wurde. Dabei wurde etwas Platz im Schlauch belassen, sodass die Flüssigkeit sich darin bewegen und gegebenenfalls an Volumen zunehmen konnte. Der Schlauch wurde in ein Gefäß mit Dialysepuffer gelegt und unter Rühren über Nacht bei 4 °C dialysiert. Dabei glichen sich die Salzkonzentrationen innerhalb und

außerhalb des Schlauches aus. Die Zugabe von DNase zur Proteinlösung vor der Dialyse konnte die folgende Filtration der Probe vereinfachen, war aber nicht unbedingt notwendig und wurde deshalb nur durchgeführt, wenn viel Protein zeitgleich gereinigt wurde.

2.2.2.4 Ionenaustauschchromatographie

Zur Isolation des Zielproteins wurde die dialysierte Proteinlösung zunächst filtriert und anschließend auf eine Kationentauscher-Säule gegeben. Diese besteht aus einer Agarose-Matrix, an die negativ geladenen Gruppen gebunden sind. Das positiv geladene CTX-M-14 ($pI = 9,0$) bindet an die Matrix und kann mit einem linearen Salzgradienten eluiert werden. Die Ionenaustauschchromatographie wurde mithilfe eines ÄKTApurifier Systems (GE Healthcare, USA) durchgeführt. Vor dem Lauf wurde die Säule zunächst mit einem Säulenvolumen dH_2O gespült und anschließend mit einem Säulenvolumen Puffer equilibriert. Die Probe wurde mithilfe einer Probenschleife aufgetragen. Während des Laufs mit einer konstanten Flussrate von $0,7 \text{ mL/min}$ wurde die UV-Absorption bei 280 nm kontinuierlich aufgezeichnet. Durch die signifikante UV-Absorption des Proteins konnten die Elutinsfraktionen ausgewählt werden. Das Zielprotein eluierte bei einer Salzkonzentration von ca. 50 mM NaCl .

2.2.2.5 Konzentration der Proteinlösung

Mithilfe eines Amicon Zentrifugalkonzentrators mit einem MWCO (*Molecular Weight Cut-Off*) von 10 kDa wurde die Proteinlösung bei $4000 \times g$ und $4 \text{ }^\circ\text{C}$ zentrifugiert. Nach Erreichen der gewünschten Konzentration wurde das Protein bei $4 \text{ }^\circ\text{C}$ gelagert.

2.2.2.6 Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Zur photometrischen Bestimmung der Proteinkonzentration wurde ein NanoDrop-Spektrometer verwendet, welches die spezifische Absorption der aromatischen Aminosäuren bei einer Wellenlänge von 280 nm misst. Für die Messung wurden $2 \text{ } \mu\text{L}$ der Proteinlösung verwendet. Die Proteinkonzentration kann mittels folgender Gleichung aus der Absorption berechnet werden.

$$c = \frac{A_{280} \cdot MW}{\varepsilon \cdot d}$$

Gleichung 1: Berechnung der Proteinkonzentration aus der Absorption.

Mit A_{280} = spezifische Absorption bei 280 nm, MW = Molekulargewicht, ε = spezifische Extinktionskoeffizient des Proteins bei 280 nm, d = Schichtdicke der Messküvette.

Das Molekulargewicht und der Extinktionskoeffizient wurden, basierend auf der Aminosäuresequenz von CTX-M-14, vom Programm ProtParam des *ExpASY Proteomics Servers* (Gasteiger 2005) ermittelt. Das Molekulargewicht für CTX-M-14 liegt bei 30,98 kDa und der Extinktionskoeffizient bei $25.565 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

2.2.3 Biophysikalische Methoden

2.2.3.1 Circular dichroismus (CD)-Spektroskopie

Die Circular dichroismus (CD)-Spektroskopie dient der Untersuchung optisch aktiver Substanzen mit polarisiertem Licht. Die Absorption des Proteins in Lösung wird über einen spezifischen Wellenlängenbereich gemessen. Aus der Position der Minima, Maxima, Nullpunkte und Wendepunkte kann die Sekundärstrukturzusammensetzung eines Proteins vorhergesagt werden (Kelly, Jess et al. 2005).

Die CD-spektroskopischen Messungen wurden an einem J-815 Gerät (Jasco, Deutschland) durchgeführt. Es wurden 100 μL der Proteinlösung in eine Quatzküvette mit einer Schichtdicke von 1 mm gegeben und 15x über einen Wellenlängenbereich von 260-180 nm bei einer konstanten Temperatur von 20 °C gemessen. Die Messungen wurden gemittelt und die nur Puffer enthaltenden Referenzmessungen abgezogen.

2.2.3.2 Dynamische Lichtstreuung

Die dynamische Lichtstreuung (DLS) gibt Aufschluss über den hydrodynamischen Radius R_h eines Proteins in Lösung. Der hydrodynamische Radius ist über die Stokes-Einstein-Gleichung (Gleichung 2) definiert.

$$R_h = \frac{\kappa T}{6\pi\eta D}$$

Gleichung 2: Berechnung des hydrodynamischen Radius R_h . κ = Boltzmann-Konstante, T = Temperatur, η = Viskosität, D = Diffusionskoeffizient.

Vor der DLS-Messung wurden die Proben 30-60 min bei $16000 \times g$ und 4°C zentrifugiert. Dann wurden $12 \mu\text{L}$ der Probe in eine Quartzküvette überführt und im DLS-Gerät SpectroSize 300 (XtalConcepts, Deutschland) bei einer konstanten Temperatur von 20°C gemessen.

2.2.3.3 Thermofluor-Assay

Die Thermofluor Methode dient zur Spezifikation der Proteinstabilität bei steigenden Temperaturen und kann verwendet werden, um den Schmelzpunkt eines Proteins zu bestimmen. Zunächst wurde ein Puffertest auf Basis der Bedingungen A1-B12 des RUBIC Buffer Screens (Molecular Dimensions, UK) durchgeführt. Es wurde eine 62x konzentrierte Verdünnung aus dem 5000x Stock des Farbstoffes SYPRO orange hergestellt. In den PCR-Reaktionsgefäßen wurden $21 \mu\text{L}$ Puffer, $2 \mu\text{L}$ Protein ($20 \mu\text{M}$) und $2 \mu\text{L}$ Farbstoff vermischt und in das *Mini8 Plus* Real-Time PCR System (Coyote, USA), das zuvor bereits auf 20°C equilibriert wurde, gestellt. Die Proben wurden mit einer Heizrate von $1^\circ\text{C}/\text{min}$ von 20°C auf 95°C erhitzt und jeweils nach 4°C die Temperatur für 20 s gehalten und die Fluoreszenz gemessen. Aus den sich ergebenden Fluoreszenzkurven kann der Schmelzpunkt bestimmt werden. Es wurde der Einfluss von 24 verschiedenen Puffern auf die Thermostabilität des Proteins verglichen.

Als nächstes wurden 31 Bedingungen aus dem Durham Salt Screen ausgewählt, um den Einfluss verschiedener Salze auf die Thermostabilität zu testen. Es wurden jeweils $10 \mu\text{L}$ der Screen Bedingung in einem PCR-Reaktionsgefäß vorgelegt. 1 mL Proteinlösung wurde mit $4 \mu\text{L}$ 5000x SYPRO Orange versetzt und jeweils $10 \mu\text{L}$ in die Reaktionsgefäße überführt. Es wurde das gleiche Programm im Real-Time PCR System verwendet wie zuvor.

2.2.4 Proteinkristallisation

2.2.4.1 Kristallisationsexperimente

Für ein Hochdurchsatzscreening unterschiedlicher Bedingungen wurden kommerziell erhältliche Screens verwendet. Die Kristallisation erfolgte mithilfe des *Honeybee 961* (Genomic Solutions, USA) Kristallisationsroboters in MRC2 Platten nach dem *Sitting-drop* Verfahren. Es wurden 50 μL Reservoirlösung vorgelegt und 0,5 μL mit der gleichen Proteinmenge gemischt. Die Platte wurde mit einer Folie versiegelt und bei Raumtemperatur gelagert. Folgende Screens wurden verwendet: JCSG-plus und PACT premier von Molecular Dimensions, UK sowie CompAS Suite von Qiagen, Deutschland.

2.2.4.2 Kristallisation von CTX-M-14 im *Sitting-drop* Verfahren

Es ist nahezu unmöglich die Bedingung vorherzusagen, bei der ein Protein kristallisiert. Für CTX-M-14 waren bereits Kristallisationsbedingungen bekannt (Chen, Shoichet et al. 2005, Nichols, Hargis et al. 2015), die jedoch nicht zu Kristallen der gewünschten Qualität führten. Im JCSG-plus -Screen wurden verschiedene Bedingungen gefunden und verfeinert. Die Bedingung 30 % PEG8000, 0,2 M Li_2SO_4 , 0,1 M $\text{C}_2\text{H}_3\text{NaO}_2$ pH 4,5 lieferte die besten Ergebnisse. Es wurde das Verfahren der Dampfdiffusion in MRC Maxi-Platten genutzt. Es wurde ein Reservoirvolumen von 100 μL und eine Tropfengröße von 4 μL verwendet, wobei Protein (10 mg/ml) und Präzipitat im Verhältnis 1:1 gemischt wurden. Die Kristallisationsplatten wurden mit einer Klebefolie versiegelt und bei Raumtemperatur gelagert. In regelmäßigen Abständen wurden die Platten unter dem Mikroskop auf mögliches Kristallwachstum überprüft.

2.2.4.3 Seeding

Um die Kristallisation zu beschleunigen oder kleinere Kristalle zu erhalten, wird oft die Methode des Seeding verwendet. Zur Präparation des dafür benötigten Seedstocks wurden vorhandene Kristalle mit einem Glasstab (CrystalCrusher) zerkleinert und in 50 μL Reservoirlösung aufgenommen. Durch Zugabe kleiner Metallkugeln konnten die Kristalltrümmer mit einem Vortexer weiter zerkleinert werden. Anschließend wurde eine

Verdünnungsreihe hergestellt. Mithilfe eines Haares konnten die Kristallkeime in den Kristallisationstropfen überführt werden.

Bei dieser konventionellen Seedstockpräparation sind die resultierenden Seedkristalle oft von unterschiedlicher Größe, was zu unterschiedlich großen Kristallen bei der nachfolgenden Kristallisation führt. Für die Messung von Einkristallen ist diese Methode ausreichend, für serielle Messungen werden allerdings Kristalle von möglichst homogener Größe benötigt, die zudem auch deutlich kleiner sein müssen als Kristalle, die bei der konventionellen Einkristalldiffraktion eingesetzt wurden. Deshalb wurde zur Generierung von Mikrokristallen eine abgewandelte Methode entwickelt, um einen Seedstock mit noch kleineren und homogenen Kristallkeimen zu erhalten. Die Kristalle aus einem vorangegangenen Batchexperiment wurden mit dem Glasstab an der Wand des Reaktionsgefäßes zerrieben, anschließend bei $200 \times g$ und $20 \text{ }^\circ\text{C}$ für 5 Minuten zentrifugiert und die am Boden abgesetzten Kristalle wieder mit dem Glasstab zerrieben. Dieser Vorgang wurde zehn Mal wiederholt. Daraufhin befanden sich im Überstand nur noch winzige Kristallstücke, die zu klein waren, um abzentrifugiert zu werden. Dieser Überstand wurde abgenommen und als Seedstock zur Präparation von Mikrokristallen verwendet.

Eine weitere Möglichkeit, vorrangig um möglichst große Kristalle zu erhalten, bietet das Makro seeding, bei dem die Kristalle nicht zerstört werden, sondern nur in eine frische Proteinlösung überführt werden, um weiter wachsen zu können.

2.2.4.4 Kristallisation von CTX-M-14 Mikrokristallen im Batch Verfahren

Die Produktion von Mikrokristallen erfolgte im Batchverfahren. Für einen Ansatz wurden 50 % Proteinlösung (20 mg/ml) und 45 % Präzipitat (40 % PEG8000, 0,2 M Li_2SO_4 , 0,1 M $\text{C}_2\text{H}_3\text{NaO}_2$ pH 4,5) mit 5 % Seedstock vermischt. Innerhalb einer Stunde, in der der Ansatz mehrfach durchmischt wurde, entstanden Kristalle von 5-15 μm Größe. Um das Kristallwachstum zu stoppen, wurde der Ansatz mit $200 \times g$ bei $20 \text{ }^\circ\text{C}$ für 10 Minuten zentrifugiert und ein Teil des proteinhaltigen Überstandes abgenommen und durch Präzipitat ersetzt.

2.2.4.5 *On-chip Kristallisation*

Die serielle Messung von Kristallen kann entweder durch ihre Injektion in einen Flüssigkeitsstrahl oder mithilfe von Chips erfolgen, auf denen sich die Kristalle befinden. Für letzteres ist es möglich zuvor im Batch gewachsene Kristalle auf den Chip zu übertragen, oder die Kristalle direkt auf dem Chip wachsen zu lassen. Die zweite Variante hat den Vorteil, dass weniger Überlagerungen der Kristalle auftreten. Es wurden zwei unterschiedlich große Chips verwendet. Für die Kristallisation wird zunächst Puffer in die Reaktionskammer gegeben, um ein Austrocknen des Ansatzes zu verhindern. In einem Reaktionsgefäß wurden 50 % Proteinlösung (10 mg/ml) und 45 % Präzipitat (40 % PEG8000, 0,2 M Li_2SO_4 , 0,1 M $\text{C}_2\text{H}_3\text{NaO}_2$ pH 4,5) mit 1 % Seedstock vermischt. Der Kristallisationsansatz wurde auf dem Chip verteilt und dieser in die Reaktionskammer geschoben. Der Aufbau wurde mit Parafilm versiegelt. Nach 1-1,5 h hatten die Kristalle eine Größe von ca. $30 \times 30 \mu\text{m}$ erreicht. Durch eine Variation in der Seedstockmenge konnte ein Einfluss auf Größe und Anzahl der Kristalle genommen werden.

2.2.5 Röntgenstrukturanalyse

2.2.5.1 *Einkristalldiffraktion*

Zunächst wurden die Kristalle mit einer Nylonschleife entsprechender Größe aufgenommen, in eine Cryolösung getaucht und folgend in Flüssigstickstoff eingefroren. Die CTX-M-14 Kristalle wurden zusätzlich zuvor für eine Stunde mit dem jeweiligen Inhibitor Avibactam *soaked*. Die Cryolösung bestand aus den jeweiligen Präzipitaten, welcher mit 25 % Glycerol versetzt wurde. Die Messungen erfolgten an der P11 Beamline (Meents, Reime et al. 2013) an Petra III am DESY, Hamburg. Der Kristall wurde auf ein Goniometer gesetzt und mit Stickstoff auf 100 K gekühlt. Die Datensammlung erfolgte über die Rotationsmethode. Es wurde mit einem Röntgenstrahldurchmesser von $100 \mu\text{m}$ und eine Wellenlänge von $1,0332 \text{ \AA}$ bzw. $0,9801 \text{ \AA}$ (Selen-Absorptionskante) gemessen. Es wurde ein Pilatus 6M fast Detektor verwendet. Die Diffraktionsdaten wurden mit dem Programm XDS (Kabsch 2010) prozessiert.

2.2.5.2 *Serielle Datensammlung am European XFEL*

Eine CTX-M-14 Mikrokristallsuspension, mit Kristallgrößen von ca. 3-8 μm , wurde zunächst mittels eines 20 μm Gravitationsfilters filtriert, um größere Kristalle zu entfernen. Das Avibactam wurde mit einer finalen Konzentration von 20 mM zur Kristallsuspension hinzugefügt und die Probe in eine Probenkammer injiziert. Die Probenkammer wurde an der SPB/SFX Messstation mit einer HPLC-Pumpe verbunden, die mittels Wasser den Kolben in die Probenkammer drückt, wodurch die Probe in den Injektionsschlauch überführt wurde. Durch die Pumpe kann hierbei eine konstante Flussrate auch bei höherer Viskosität gewährleistet werden. In einer im 3D-Druck hergestellten Düse wurde der Flüssigkeitsstrom der Kristallsuspension mit Heliumgas ummantelt, um diesen besser zu fokussieren. Das Heliumgas wurde durch einen GP1 Gasdruckregulator kontrolliert. Beide Flussraten wurden durch entsprechende Durchflussmesser überwacht. Der Flüssigkeitsstrahl (Durchmesser 1,8 μm , Geschwindigkeit 50-100 m/s) und der fokussierte, monochromatische Röntgenstrahl (Durchmesser 16 μm^2) wurden aneinander angepasst, sodass Röntgenstrahlen direkt auf den Flüssigkeitsstrom trafen. Die Diffraktion der Kristalle wurde von einem AGIPD 1M Detektor aufgezeichnet. Es wurde mit 300 Pulsen pro Sekunde mit einer mittleren Photonenenergie von 9,15 keV und einer mittleren Pulsenergie von 1,05 mJ gemessen (Wiedorn, Oberthür et al. 2018).

Zunächst wurden mit dem Programm Cheetah jene Detektorbilder automatisch identifiziert, die Proteindiffraktion zeigten. Dafür wurden die *peakfinder8* Parameter minSNR=8, minADC=250, minPix=1 and minPeaks=20 verwendet. Die Prozessierung der Daten erfolgte mit dem Programm CrystFEL (White, Kirian et al. 2012).

2.2.5.3 *Serielle Datensammlung am APS*

Diffraktionsexperimente wurden an der BioCARS 14 ID Beamline an der *Advanced Photon Source* (APS) im Argonne National Laboratory, USA durchgeführt. Anders als bei den zuvor genannten Messmethoden wurde hier polychromatische Strahlung („Pink Beam“) fokussiert auf 20 μm und direkt auf Chips gewachsene Kristalle verwendet. Die Chips wurden aus der Reaktionskammer genommen und auf eine Haltevorrichtung aufgesetzt. Um eine Austrocknung zu vermeiden wurde Puffer in die Reservoirs des Chips gegeben. Die Chips wurden mit Wasser bedampft und mit einem fusselfreien Tuch die Kristallisationslösung von

unten abgesaugt, wodurch nur die Kristalle auf den Chips verblieben. Durch Aufsetzen einer Umhüllung konnte die Austrocknung der Chips bis zu ihrem Einsatz vermieden werden. Die Chips wurden senkrecht zum Röntgenstrahl auf eine Halterung an der Messstation gesetzt und die Hülle entfernt. Stattdessen wurde der Chip mit Helium bedampft, welches einen kontrollierten Feuchtigkeitsgrad hatte. Am Computer wurde ein Raster definiert, das den kompletten Chip umfasste und im Abstand von jeweils 30 μm Diffraktionsdaten gesammelt. Die Daten wurden mit dem Programm CrystFEL (White, Kirian et al. 2012) prozessiert.

2.2.5.4 *Strukturbestimmung*

Die Struktur von CTX-M-14 war bereits vor Beginn dieser Arbeit bekannt. Für die Strukturlösung wurde ein molekularer Ersatz mit dem Programm: *Phaser* (McCoy, Grosse-Kunstleve et al. 2007) daher zunächst mit in der Protein Data Bank (PDB) hinterlegten Strukturen (PDB Codes 4UA6 und 5TWD) durchgeführt, nachdem alle Solvenzmoleküle aus den Dateien entfernt wurden. Später wurde die veröffentlichte Struktur von CTX-M-14 am European XFEL (PDB Code 6GTH) als Grundlage verwendet.

3 ERGEBNISSE UND DISKUSSION

3.1 Rekombinante Expression und Reinigung

Die Expression von CTX-M-14 erfolgte wie im Methodenteil beschrieben. In Abbildung 6 wird beispielhaft das Ergebnis einer SDS-PAGE-Analyse einer Expression dreier Kolben von CTX-M-14 in *E. coli* BL21 (DE3) -Zellen gezeigt. Das Molekulargewicht von CTX-M-14 beträgt 30,98 kDa.

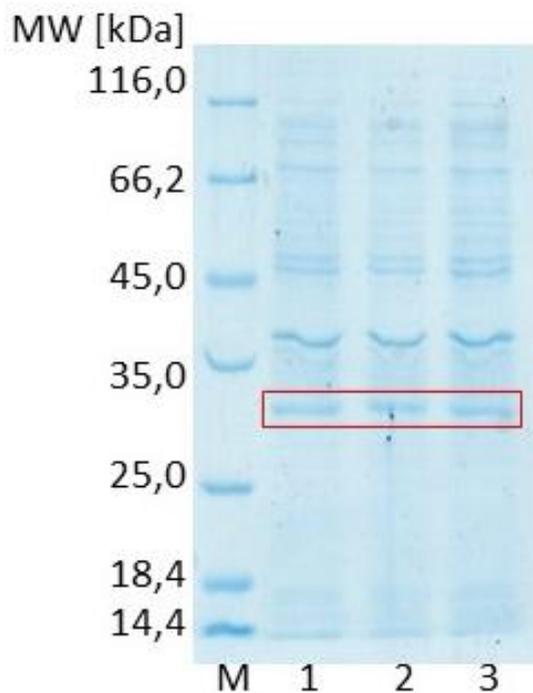


Abbildung 6: SDS-PAGE-Analyse, Expression von CTX-M-14 auf einem 12 %igen Polyacrylamidtrenngel. M: Proteingrößenstandard *Unstained Protein Molecular Weight Marker*, 1-3: Zellkulturen nach 3 h Expression. Die Banden des Zielproteins sind markiert. Nach dreistündiger Expression ist eine deutliche Bande bei etwa 31 kDa bei jeder Zellkultur sichtbar, was dem Molekulargewicht des Zielproteins entspricht.

Der Aufschluss der Zellpellets wurde wie beschrieben durchgeführt und der Überstand über Nacht dialysiert, um die hohe Salzkonzentration im Rohextrakt zu verringern, welche den folgenden Schritt der Ionenaustauschchromatografie beeinträchtigen würde. Nach dem Kationentauscher war das Protein bereits von sehr hoher Reinheit (Abb. 7 links), sodass keine weiteren Reinigungsschritte nötig waren. Anfangs wurde ein linearer Gradient bis zu 100 % Puffer B verwendet. Das Protein eluierte jedoch schon sehr früh von der Säule, sodass für eine

optimale Reinigung nur der Bereich bis 5 % Puffer B nötig war. Es wurde mit einem geringen Konzentrationsanstieg eluiert, um Unreinheiten abzutrennen (Abb. 7 rechts).

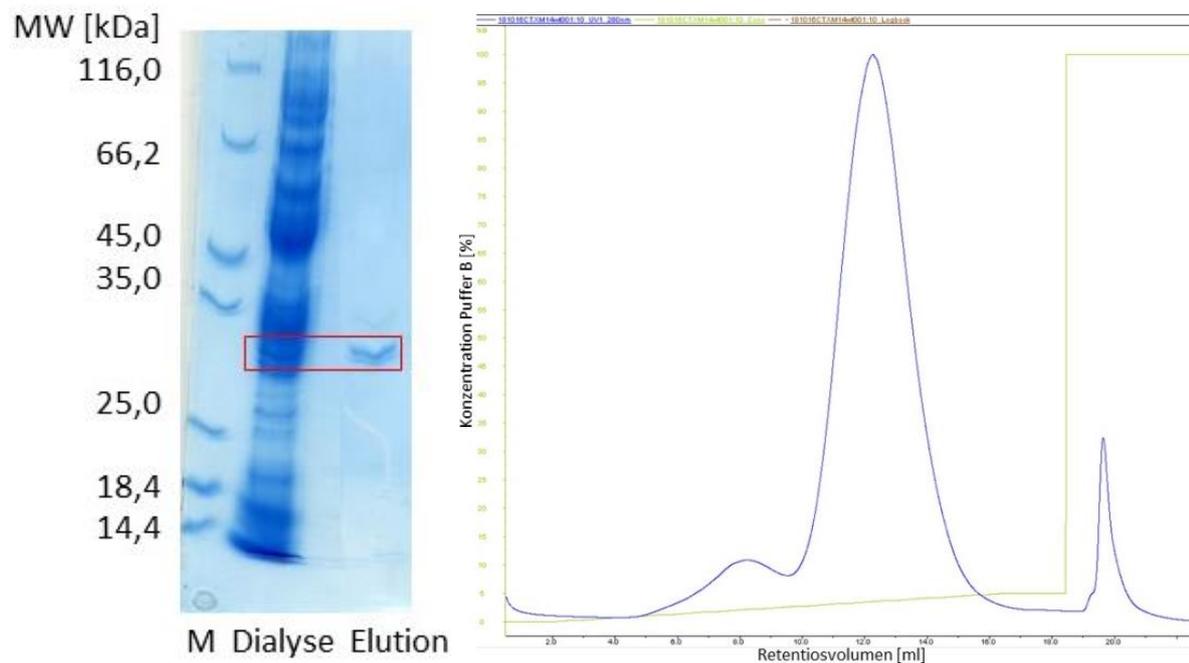


Abbildung 7: Reinigung von CTX-M-14. Links: SDS-PAGE-Analyse, Reinigung von CTX-M-14 auf einem 12 %igen Polyacrylamidtrenngel. M: Proteingrößenstandard *Unstained Protein Molecular Weight Marker*, Dialyse: die Probenentnahme erfolgte direkt nach der Dialyse, vor weiteren Reinigungsschritten, Elution: Elutionsfraktion nach der Reinigung mit einem Kationentauscher. Die Banden des Zielproteins sind markiert. Nach dem Kationentauscher sind zusätzlich zum Zielprotein nur noch sehr wenige schwache Banden anderer Proteine sichtbar. Rechts: Elutionsprofil des Kationentauschers. Der höchste Absorptionspeak (blau) trat bei einer Konzentration (grün) von ca. 3 % Puffer B auf, was ca. 50 mM NaCl entsprach.

3.2 Charakterisierung

Um die Dispersität des Proteins in Lösung einschätzen zu können und den polymeren Zustand zu ermitteln, wurden nach der Reinigung DLS-Messungen durchgeführt. Die Proteinlösung wurde zunächst auf mindestens 2 mg/mL konzentriert und anschließend bei $16.000 \times g$ und $4^\circ C$ für mindestens 30 min zentrifugiert. Die DLS-Messungen ergaben einen hydrodynamischen Radius von $2,5 \text{ nm} \pm 0,1 \text{ nm}$ (Abb. 8). Unter der Annahme eines globulären Proteins kann daraus ein Molekulargewicht von ca. 27,9 kDa errechnet werden, was dem Molekulargewicht des Proteins ohne Signalpeptid (27.85 kDa) entspricht. Demzufolge ist davon auszugehen, dass das Protein CTX-M-14 in Lösung monomer vorliegt. Außerdem liegt das Protein monodispers vor.

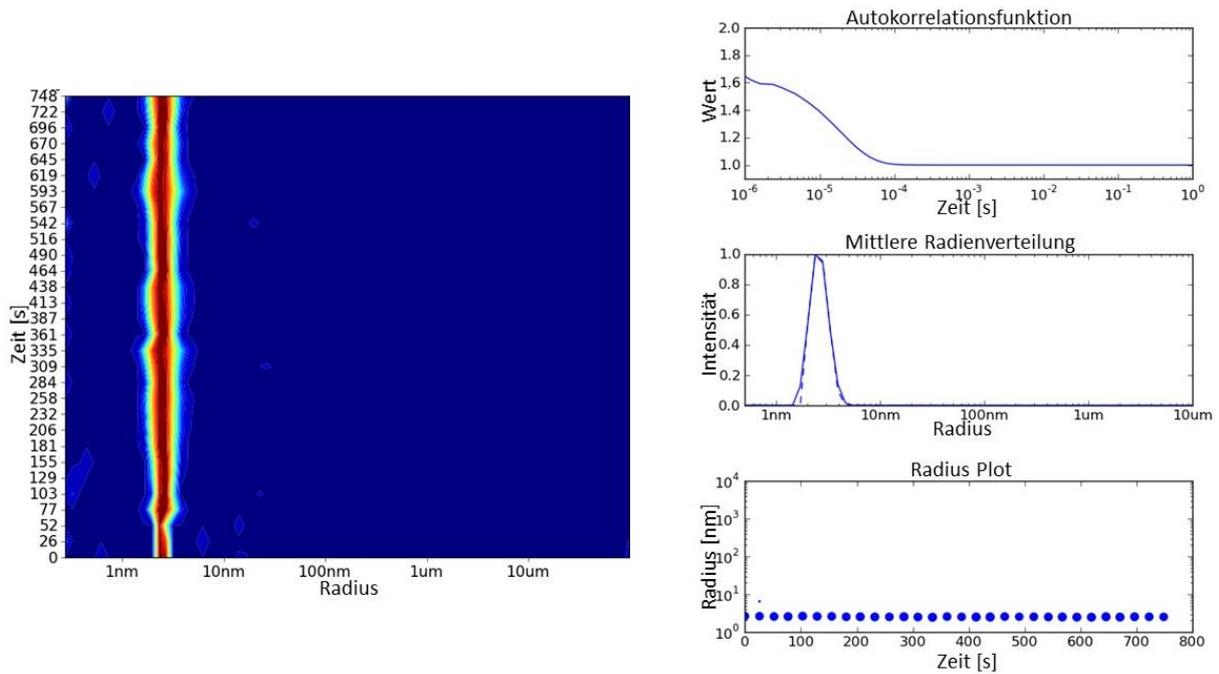


Abbildung 8: Ergebnisse der DLS-Messungen von CTX-M-14. Links: Radienverteilung der DLS-Messungen, bei denen der Radius in Abhängigkeit von der Zeit dargestellt wird. Rechts: Darstellung der Autokorrelationsfunktion, der mittleren Radienverteilung und des Radiusplots. Die DLS-Messungen zeigen, dass das Protein monodispers vorliegt. Der hydrodynamische Radius von 2,5 nm deutet darauf hin, dass das Protein als Monomer in Lösung vorliegt.

Es wurden CD-spektroskopische Messungen durchgeführt, um einen ersten Eindruck über die Anteile an Sekundärstrukturen zu erhalten. Es wurden 10 Proteinspektren im Wellenlängenbereich von 190-260 nm aufgenommen und akkumuliert. Der Proteinpuffer wurde fünf Mal gemessen und nach der Akkumulation vom Proteinsignal subtrahiert (Abb. 9). Durch die Messung konnte nachgewiesen werden, dass das Protein gefaltet vorliegt. Die Vorhersage der Verteilung der Sekundärstrukturen erfolgte nach dem Algorithmus von Yang *et al.* (Yang, Wu et al. 1986) und ergab einen α -helikalen Anteil von 43 %, 35 % β -Stränge und 22 % ungeordnete Teilstrukturen mit einem RMS-Wert von ca. 6 %.

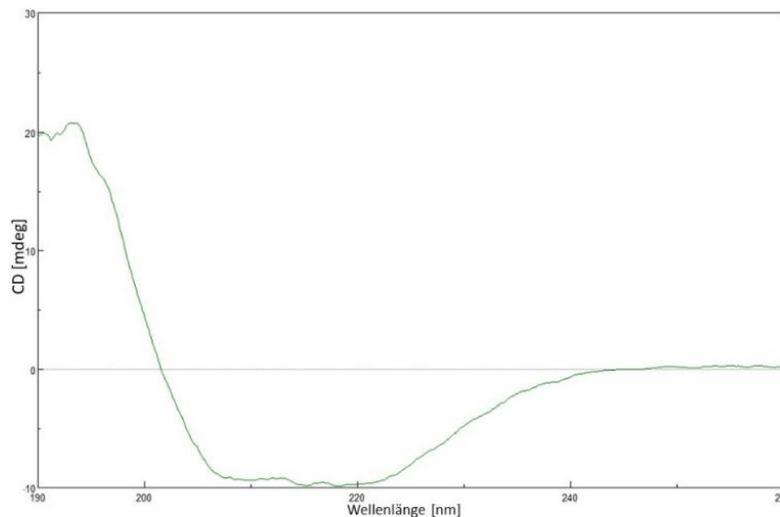
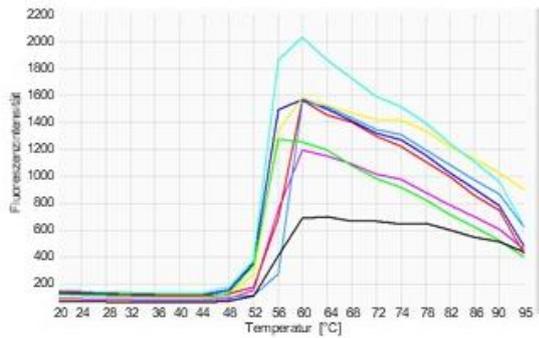
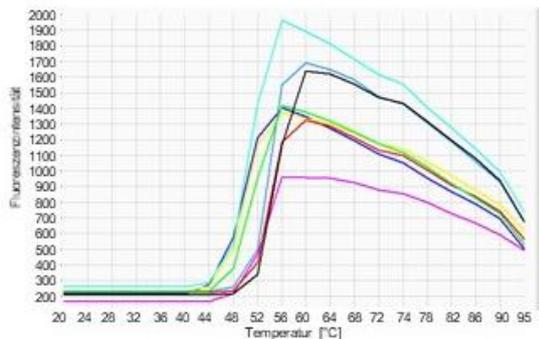


Abbildung 9 Messung des Circular dichroismus von CTX-M-14: Die CD-Messung zeigt, dass das Protein einen hohen Anteil an Sekundärstrukturen besitzt und somit gefaltet vorliegt.

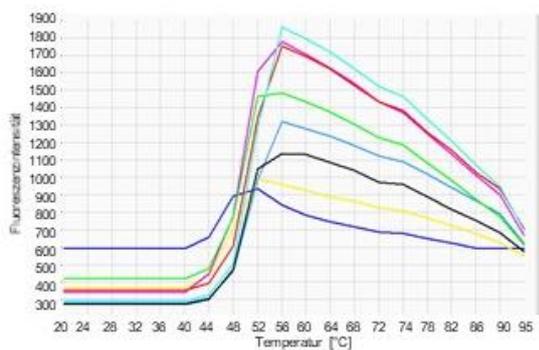
Die Thermofluor-Messungen dienen zur Überprüfung der Stabilität von CTX-M-14 in verschiedenen Puffern oder unter Addition von Salzen. Der protein-bindende Farbstoff SYPRO Orange fluoresziert in hydrophober Umgebung stärker als in hydrophiler Umgebung. Beim Erhitzen der Lösung denaturiert das Protein allmählich. Der Farbstoff lagert sich an den dadurch zugänglichen hydrophoben Kern des Proteins an, wodurch die Fluoreszenz steigt. Am höchsten ist diese, wenn das Protein komplett entfaltet vorliegt. Anschließend fällt das Signal aufgrund von Dissoziation des Farbstoffes wieder ab. Das Fluoreszenzsignal wird als Funktion gegen die Temperatur aufgetragen und ergibt eine sigmoidale Kurve. Der Wendepunkt dieser Kurve beschreibt zugleich den Schmelzpunkt des Proteins, an dem dieses zu 50 % entfaltet vorliegt. Dieser liegt für CTX-M-14 bei 56 °C. Aus dem Vergleich der unterschiedlichen Puffer wird deutlich, dass der Ausgangspuffer MES pH 6,0 bereits optimal für das Protein ist. Allerdings beeinflussen andere Puffer mit ähnlichen pH-Werten den Schmelzpunkt meist nur gering. Hingegen zeigte sich, dass pH-Werte über 7 die Thermostabilität von CTX-M-14 deutlich verringern (Abb. 10).



Puffer	TM
Wasser	55,79
100 mM Citrat pH4	53,54
100 mM NaAcetat pH4.5	52,21
100 mM Citrat pH5	56,28
100 mM MES pH6	56,06
100mM K_3PO_4 pH6	55,45
100 mM Citrat pH6	54,10
100 mM Bis-Tris pH6.5	53,28



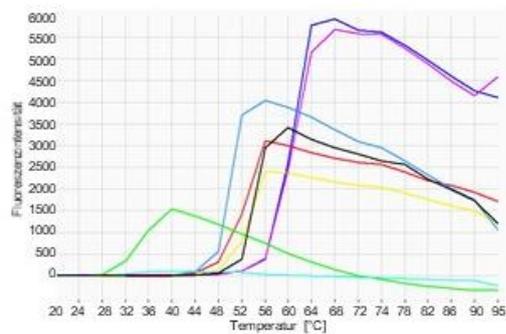
Puffer	TM
100 mM MES pH6.5	55,09
100 mM Na_3PO_4 pH7	50,53
100 mM K_3PO_4 pH7	51,10
100 mM HEPES pH7	53,53
100 mM MOPS pH7	53,70
100 mM NH_4 -Acetat pH7.3	52,44
100 mM TRIS-HCl pH7.5	49,60
100 mM Na_3PO_4 pH7.5	49,07



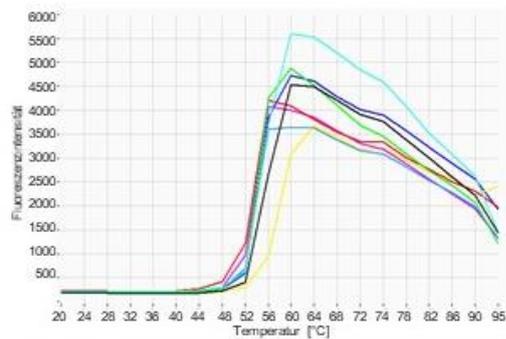
Puffer	TM
100 mM Imidazol pH7.5	49,31
100 mM HEPES pH8	50,92
100 mM TRIS-HCl pH8	48,10
100 mM Tricine pH8	50,53
100 mM BICINE pH8	50,33
100 mM NH_4 -Acetat	48,94
100 mM BICINE pH8.5	48,94
100 mM TRIS-HCl pH8.5	47,38
100 mM CHES pH9	44,15

Abbildung 10: Thermofluor Puffertest. Es wurde der Schmelzpunkt (TM) von CTX-M-14 in verschiedenen Puffern bestimmt. Zur besseren Veranschaulichung wurden die Schmelzpunkte im Vergleich zum Ausgangspuffer (100 mM MES pH6) eingefärbt, dabei steht grün für einen Schmelzpunkt ± 1 °C, gelb -2 bis -5 °C und rot für > -5 °C.

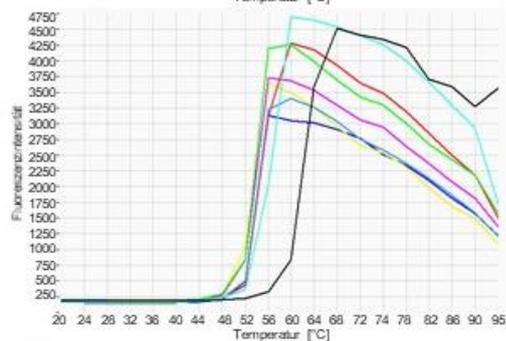
Die meisten Salze hatten nur eine geringe Auswirkung auf die Schmelztemperatur von CTX-M-14 (Abb. 11). Guanidin-HCl und Harnstoff wirken beide denaturierend auf Proteine, wodurch der Schmelzpunkt stark herabgesetzt wird. Hingegen wirken Sulfate stabilisierend. Unterschiedliche Metalle zeigen keinen Einfluss auf die Thermostabilität, sodass diese vermutlich keine Rolle für CTX-M-14 spielen. Dies wird auch durch die Messung mit EDTA bestätigt. Wären zweiwertige Metall-Ionen wichtig für die Thermostabilität von CTX-M-14 würde der Schmelzpunkt hier stark sinken.



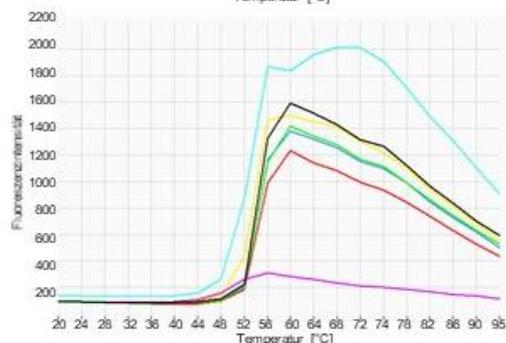
Salz	TM
Wasser	53,94
4 M Urea	32,65
1 M Gu-HCl	34,29
0.2 M Gu-HCl	49,64
0.2 M Na ₃ Citrat	52,16
1 M NaMalonat	60,44
0.2 M NaMalonat	52,54
1 M (NH ₄) ₂ SO ₄	60,25



Salz	TM
0.2 M (NH ₄) ₂ SO ₄	55,67
1 M NaCl	55,22
0.6 M NaCl	54,00
0.2 M NaCl	53,14
1 M NH ₄ Cl	52,15
0.2 M NH ₄ Cl	52,20
1 M MgSO ₄	57,61
0.2 m MgSO ₄	54,44



Salz	TM
1 M Na ₂ SO ₄	62,27
0.2 M Na ₂ SO ₄	56,33
0.2 M KCl	52,23
0.2 M LiCl	52,41
0.1 M NaF	54,95
0.1 M NaBr	52,22
0.1 M NaI	52,15
5 mM MgCl ₂	52,28



Salz	TM
5 mM CaCl ₂	54,31
1 mM ZnCl ₂	52,51
1 mM NiCl ₂	54,39
5 mM MnCl ₂	54,27
1 mM CoCl ₂	54,38
1 mM CuSO ₄	49,26
5 mM EDTA 7.5	52,83

Abbildung 11: Thermofluor Salzttest. Es wurde der Schmelzpunkt (TM) von CTX-M-14 unter Zugabe verschiedener Salze bestimmt. Zur besseren Veranschaulichung wurden die Schmelzpunkte im Vergleich zur Zugabe von Wasser eingefärbt, dabei steht dunkelgrün für einen Schmelzpunkt +3 bis +9 °C, hellgrün 0 bis +3 °C gelb 0 bis -5 °C und rot für > -5 °C.

Die Ergebnisse der biophysikalischen Untersuchungen von CTX-M-14 in Lösung zeigen, dass das Protein monodispers vorlag und dabei einen gefalteten und monomeren Zustand aufweist. Somit sind die Voraussetzungen für weitere strukturelle Untersuchungen gegeben.

3.3 Kristallisation

Die Kristallisation von Proteinen stellt oft eine Herausforderung in der Strukturbiologie dar. Es gibt verschiedene Möglichkeiten der Kristallisation. Am häufigsten wird die Methode der Dampfdiffusion verwendet, bei der Proteinlösung mit einer Präzipitat-Lösung in einem Tropfen vermischt und über bzw. neben ein Reservoir mit Präzipitat-Lösung gesetzt wird (Benvenuti and Mangani 2007). Durch die geringere Präzipitatkonzentration im Tropfen diffundiert Wasser aus diesem ins Reservoir und es kommt zu einem Anstieg der Protein- und Präzipitatkonzentration im Tropfen (Abb. 12). Während dieses Vorgangs erreichen die Konzentrationen einen gesättigten Bereich, in dem Kristallisation theoretisch möglich wäre. Allerdings muss zunächst eine Aktivierungsenergiebarriere überwunden werden. Diese wird in der metastabilen Zone noch nicht erreicht, sondern erst in der labilen Zone. In diesem auch Nukleationszone genannten Bereich kommt es zur spontanen Nukleation kleiner Kristalle (Nukleationskeime). Durch die Kristallbildung sinkt die Proteinkonzentration im Tropfen, welcher wieder die metastabile Phase erreicht. In dieser Phase ist ein weiteres Kristallwachstum möglich. Ist die Übersättigung im Tropfen zu hoch, kommt es zur Präzipitation des Proteins (Asherie 2004).

Bei der Kristallisation im Batchverfahren findet keine Diffusion statt, sodass die Kristallisationsbedingungen so gewählt werden müssen, dass sich der Kristallisationsansatz bereits zum Anfang in der labilen Zone der Kristallisation befindet (Wey and Karpinski 2002). Zu diesem Zweck werden meist höhere Protein- und Präzipitatkonzentrationen als im Batchverfahren eingesetzt. Je nach Größe des Kristallisationsansatzes gibt es zwei verschiedene Möglichkeiten der Durchführung. Für kleine Probenvolumina wird ein Tropfen des Kristallisationsansatzes in eine Microbatchplatte gegeben und mit Öl überschichtet. Je nachdem welches Öl hierfür verwendet wurde, findet eine langsamere oder keine Dampfdiffusion statt (Rayment 2002). Für größere Probenvolumina erfolgt der Kristallisationsansatz in einem verschließbaren Reaktionsgefäß.

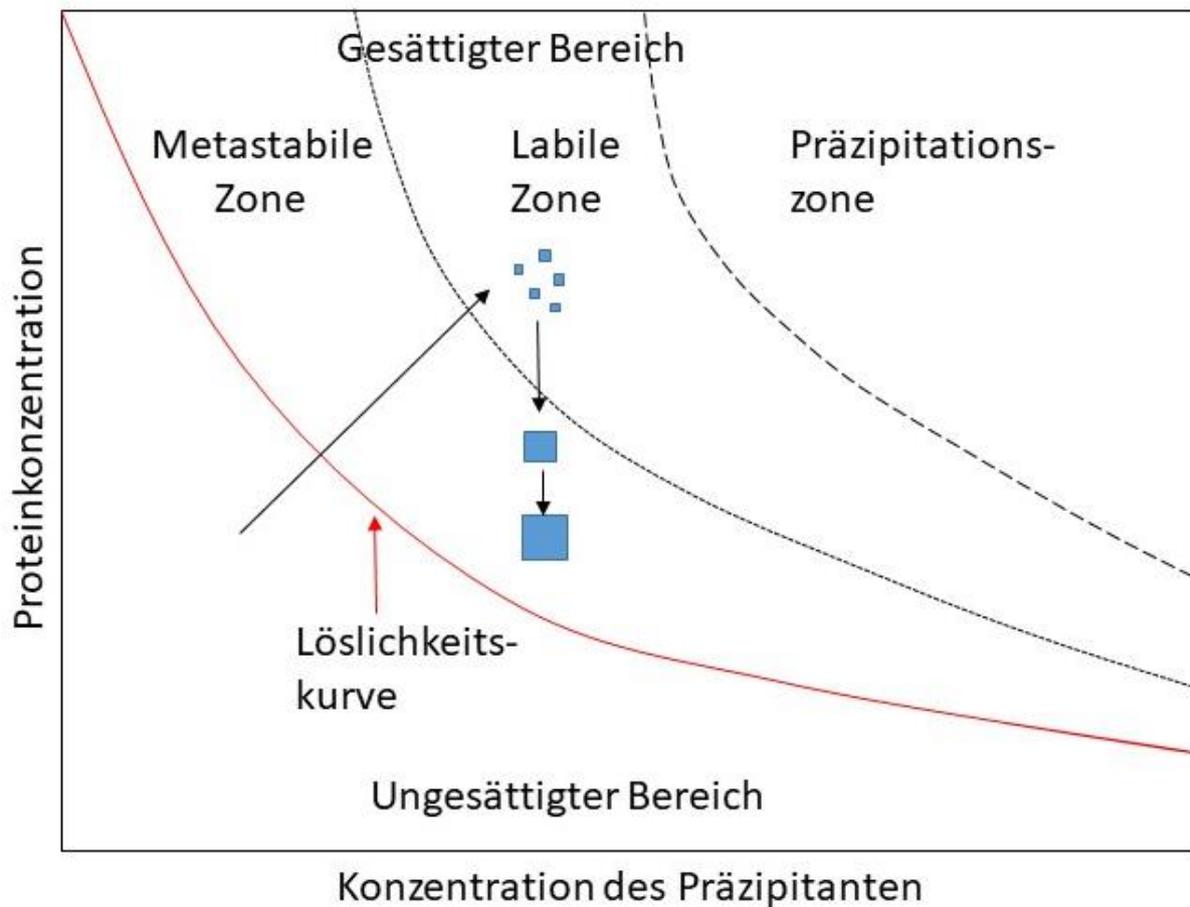


Abbildung 12: Phasendiagramm der Kristallisation mittels Dampfdiffusion. Bei der Diffusion von Wasser aus dem Kristallisationsansatz erhöhen sich die Protein- und Präzipitatkonzentrationen im Tropfen. Sobald die labile Zone erreicht wird, kann die Energiebarriere zur Kristallbildung überschritten werden und es kommt zur Bildung von Nukleationskeimen (blaue Quadrate). Die daraufhin sinkende Proteinkonzentration bewirkt den Wiedereintritt in die metastabile Zone, in der das Kristallwachstum stattfindet.

Eine Möglichkeit die Kristallisation zu beschleunigen, die Kristallqualität zu verbessern oder auch homologe Proteine oder Mutanten zu kristallisieren, bietet der Einsatz der Seedingmethode (Bergfors 2003). Beim Seeding werden Nukleationskeime zum Kristallisationsansatz hinzugefügt. Hierfür kann entweder eine kleine Menge der Seedstocklösung zum Kristallisationsansatz hinzugegeben werden, oder die Kristalle werden mithilfe eines Haars in diesen überführt. Beim Seeding muss die Aktivierungsenergie zur Kristallbildung nicht mehr überwunden werden, sodass normalerweise die Konzentrationen von Protein oder Präzipitat gesenkt werden, um in die metastabile Zone des Phasendiagramms zu gelangen, in welcher aus den Nukleationskeimen größere Kristalle wachsen (Bergfors 2003). Abhängig von der Konzentration der Nukleationskeime im

Seedstock entstehen unterschiedlich viele Kristalle, deren Größe sich umgekehrt proportional zur Anzahl verhält. Diese häufig verwendete Methode wird auch als Mikroseeding bezeichnet. Eine andere Möglichkeit des Seedings ist die Überführung von Makrokristallen in einen neuen Kristallisationsansatz (Benvenuti and Mangani 2007). Diese Methode wird vorrangig verwendet, um möglichst große Kristalle zu erhalten, wie sie beispielsweise für Neutronenbeugungsexperimente benötigt werden.

Bei der Kristallisation von CTX-M-14 wurde die Methode der Dampfdiffusion verwendet, um Makrokristalle zu produzieren und das Batch-Verfahren zur Herstellung von Mikrokristallen. Es konnten verschiedene Kristallformen erhalten werden (Abb. 13).

Die initial erhaltenen Kristalle sahen verwachsen aus (A), beugten aber dennoch bis ans Detektorlimit an der Beamline P11 (1,14 Å). Durch Seeding konnte die Kristallisation noch weiter beschleunigt und die Kristallmorphologie verbessert werden. Es zeigte sich hierbei, dass der Seedstock einen entscheidenden Einfluss auf die Kristallmorphologie hat. Je nachdem, welche Kristallform dort vorherrschend war, hatten auch die daraus entstehenden Kristalle eine favorisierte Form. Es konnten hexagonale (B, E, F), trigonale (C) und tetragonal-bipyramidale Kristalle (D) bei gleichen Bedingungen auftreten. Teilweise fanden sich auch zwei unterschiedliche Kristallformen im gleichen Kristallisationsansatz. Um Makrokristalle (A-D) zu erhalten wurde die Methode der Dampfdiffusion mit einer Proteinkonzentration von 10 mg/ml und dem Präzipitaten 22,5-35 % PEG8000, 0,2 M Li_2SO_4 , 0,1 M Natriumacetat pH 4,5 verwendet. Die Kristalle wuchsen innerhalb weniger Stunden (Abb. 14).

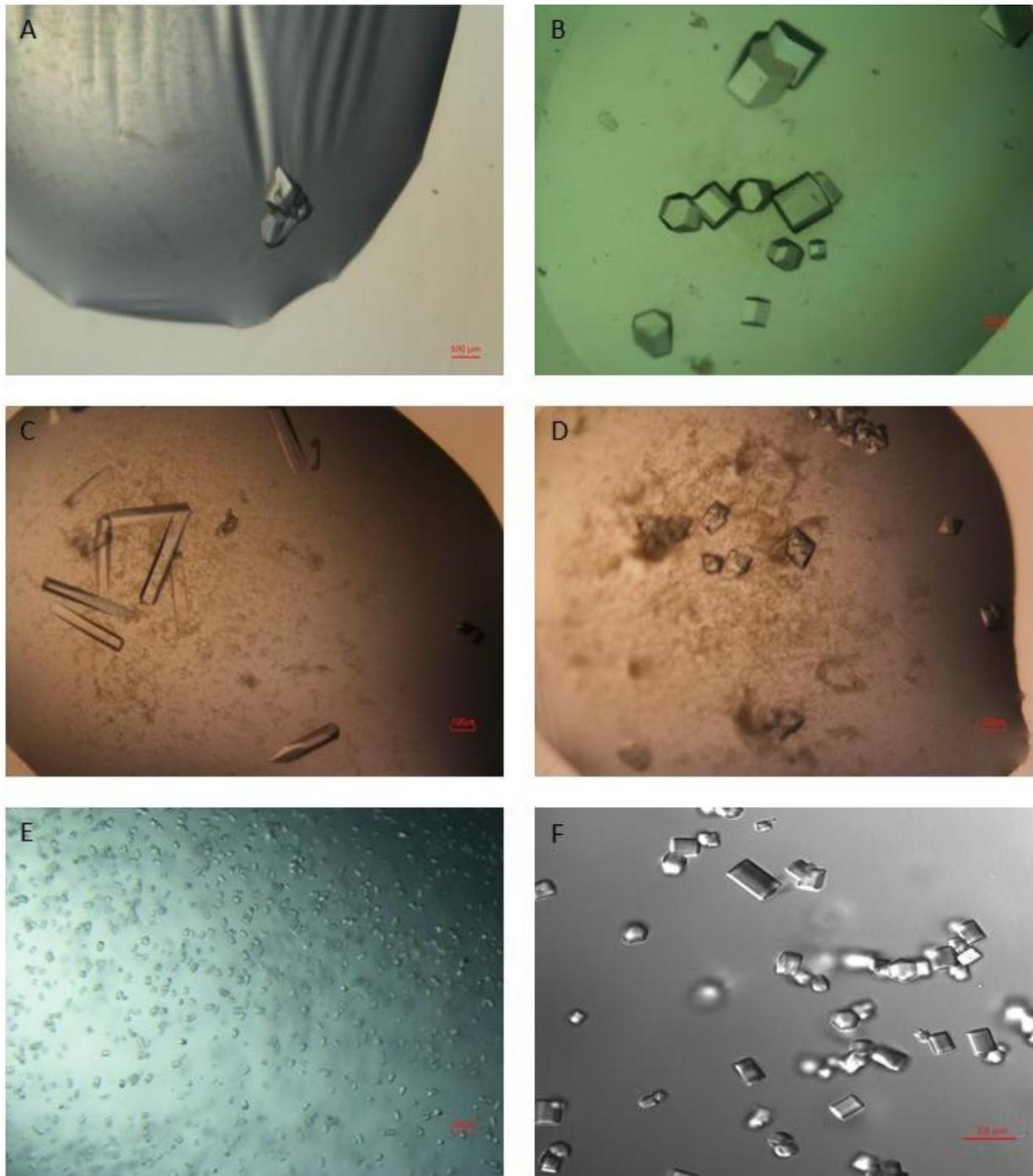


Abbildung 13: Kristalle von CTX-M-14. A-D: Makrokristalle mit verschiedenen Morphologien erhalten bei gleichen Kristallisationsbedingungen mittels Dampfdiffusion (22,5-35 % PEG8000, 0,2 M Li_2SO_4 , 0,1 M Natriumacetat pH 4,5, E-F: Im Batch-Verfahren erhaltenen Mikrokristalle (40 % PEG8000, 0,2 M Li_2SO_4 , 0,1 M Natriumacetat pH 4,5). In den Bildern A-E beträgt der eingezeichnete Maßstab jeweils 100 μm , in Abbildung F 10 μm .

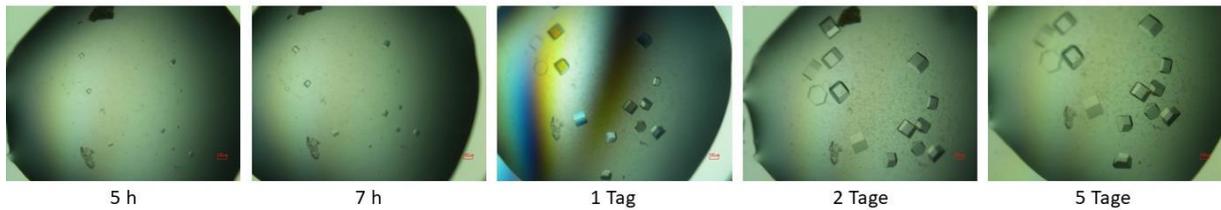


Abbildung 14: Kristallwachstum von CTX-M-14 innerhalb von fünf Tagen. Bereits fünf Stunden nach dem Kristallisationsansatz (32,5 % PEG8000, 0,2 M Li_2SO_4 , 0,1 M Natriumacetat pH 4,5) konnten Kristalle von etwa 50 μm Größe im Lichtmikroskop beobachtet werden. Diese wurden bis zum Tag 2 deutlich größer, anschließend nahm die Größe aber nur noch geringfügig zu. Alle Aufnahmen wurden mit der gleichen Vergrößerung des gleichen Kristallisationsansatzes aufgenommen. Der eingezeichnete Maßstab entspricht 100 μm .

Für die Aufnahme serieller Daten an Synchrotron- und XFEL-Strahlungsquellen wurde eine große Anzahl von Mikrokristallen von homogener Größe und Qualität benötigt. Dafür wurde die klassische Seedingmethode (Bergfors 2003) verändert. Anstatt die Protein- oder Präzipitatkonzentration zu verringern, um in die metastabile Zone des Phasendiagramms zu gelangen, wurde die Proteinkonzentration auf 20 mg/ml und die PEG-Konzentration auf 40 % erhöht. Dadurch gelangte das System noch weiter als zuvor in die Nukleationszone, sodass die Aktivierungsenergiebarriere leicht überwunden werden konnte und sehr viele Nukleationskeime entstanden. Der Seedstock entschied hierbei über die Größe, Anzahl und Homogenität der Mikrokristalle. Mit der konventionellen Seedstockpräparation war es nicht möglich die für die Messungen am European XFEL erforderliche Kristallgröße von 3-8 μm zu erreichen, da die erhaltenen Bruchstücke noch zu groß waren, aber mit den Metallkugeln nicht weiter zerkleinert werden konnten. Durch die Kombination aus vorsichtigem zentrifugieren und dem Zerreiben der Kristalle an der Wand des Reaktionsgefäßes, entstanden kleinste Kristallbruchstücke, die sich nicht mehr im Reaktionsgefäß absetzten. Dieser Überstand wurde verwendet, um Mikrokristalle zu erhalten. Nach dem Mischen der Lösungen wurde der Ansatz in regelmäßigen Abständen durchgemischt, wodurch gleichmäßig kleine Kristalle erhalten werden konnten. Die Mikrokristalle erreichten bereits nach 1-1,5 h die gewünschte Größe.

Bei der On-Chip Kristallisation am APS führte die in Hamburg erprobte Kombination von 20 mg/ml Proteinkonzentration, Seedstock und 40 % PEG8000 überraschenderweise zu nadelförmigen Kristallen, die nicht diffraktierten (Abb. 15). Durch Reduzierung der Proteinkonzentration auf 10 mg/ml konnten wieder hexagonale Kristalle erhalten werden. Wie sich zeigte, lag der Grund für diese Probleme am Seedstock, der vor Ort vorbereitet

wurde. Bei der Präparation des Seedstocks mit der dortigen Zentrifuge kam es zum Verklumpen der Seedkristalle. Alternativ wurde jeweils gewartet, bis die Kristalle sich von selbst abgesetzt hatten. Die mit diesem Seedstock erhaltenen Kristalle waren nicht mehr nadelförmig, später stellte sich jedoch heraus, dass sowohl hexagonale als auch trigonale Kristalle entstanden waren. Dies wurde vor Ort nicht bemerkt, weil das dortige Mikroskop keine ausreichende Vergrößerung bot, um die Form der 30 μm kleinen Kristalle unterscheiden zu können. Bei der zweiten Messzeit am APS wurde ein neuer Seedstock hergestellt, der auch bei einer Proteinkonzentration von 20 mg/ml zur hexagonalen Kristallform führte.

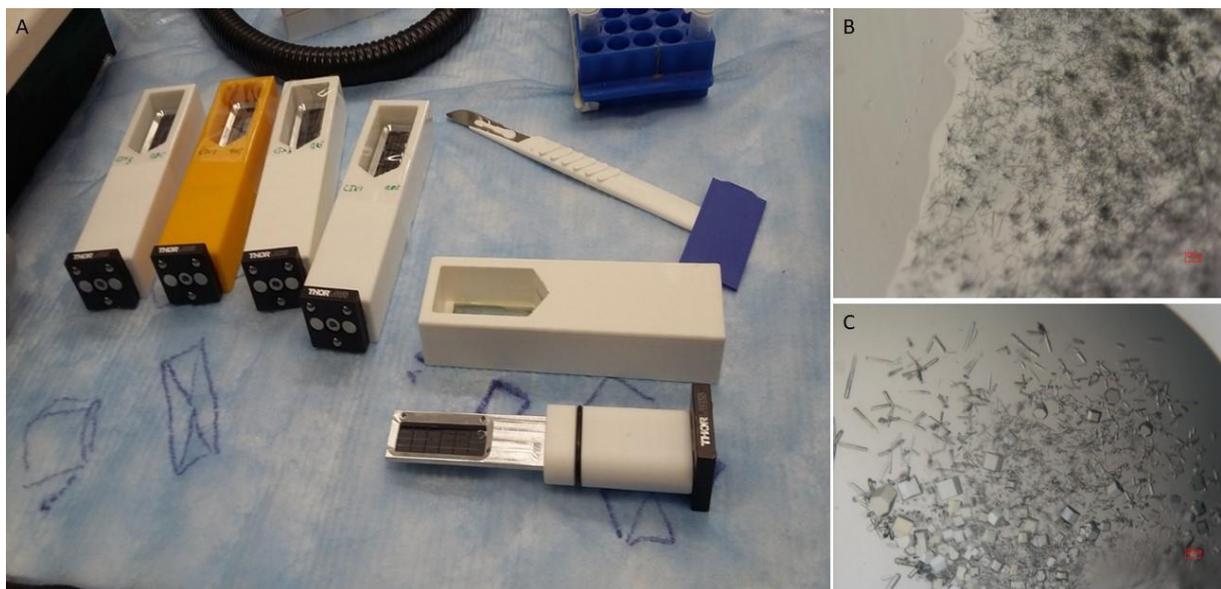


Abbildung 15: On-Chip Kristallisation von CTX-M14. Der Kristallisationsansatz wurde gleichmäßig auf einem Chip (A, unten im Bild) verteilt. Um eine Austrocknung während der Kristallisation zu verhindern wurde der Chip in einer mit 2 mL Puffer gefüllte Reaktionskammer inkubiert. Zunächst entstanden nadelförmige Kristalle (B), nach der Reduktion der Proteinkonzentration entstand eine Mischung aus zwei unterschiedlichen Kristallformen in einem Ansatz (C). Die Kristallbilder wurden von in Hamburg reproduzierten Ansätzen aufgenommen. Die abgebildeten Kristalle sind größer als die am APS gemessenen.

3.4 Datensammlung und Refinement

3.4.1 Synchrotrondatensammlung von Einkristallen

Ein Problem bei der Datensammlung mittels Röntgenstrahlung sind mögliche Strahlenschäden im Proteinkristall, die sekundär durch freie Radikale ausgelöst werden (Teng and Moffat 2000). Zu diesen möglichen Schäden zählen der Bruch von Disulfidbrücken, die Decarboxylierung von Glutamaten und Aspartaten und der Verlust von Hydroxylgruppen an

Tyrosinseitenketten. Als Folge entstehen allgemein eine Veränderung der Größe der Elementarzelle, erhöhte B-Faktoren, sowie eine geringere Diffraktion und somit der Verlust hoch aufgelöster Daten. Es gibt verschiedene Ansätze, um die Strahlenschäden zu begrenzen.

Makrokristalle werden meistens mit einer Nylonschleife aufgenommen, in eine Cryolösung eingetaucht und anschließend in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Cryolösung ersetzt das Lösungsmittel im Kristallgitter, welches beim Einfrieren kristallisieren und den Kristall zerstören oder zusätzliche Diffraktion verursachen könnte. Diese zusätzlichen Diffraktionsringe könnten Teile der Diffraktion des Kristalls überdecken, wodurch diese nicht nutzbar wären. Mehrere Kristalle wurden an den Beamlines P11 (Meents, Reime et al. 2013, Burkhardt, Pakendorf et al. 2016) und P13 (Cianci, Bourenkov et al. 2017) am PETRA III Synchrotron für Datensammlungen eingesetzt, wobei die Diffraktion bis zum Detektorlimit von 1,14 Å bzw. 1 Å aufgenommen wurde. Dabei wurde der Kristall gedreht, sodass von allen Orientierungen Diffraktionsdaten aufgenommen werden konnten, während die Kristalle konstant auf 100 K gekühlt wurden. Die Prozessierung der Daten erfolgte mit dem Programm XDS (Kabsch 2010) und die anschließenden Verfeinerungen der Koordinaten mit dem Programm PhenixRefine (Afonine, Grosse-Kunstleve et al. 2012) aus dem Phenix Softwarepaket (Liebschner, Afonine et al. 2019). Die Ergebnisse der Prozessierung und des Refinements sind in Tabelle 11 zusammengefasst. Beide Proteinstrukturen traten in der Raumgruppe $P2_12_12_1$ auf.

Genau wie in den biophysikalischen Methoden vorhergesagt, liegt CTX-M-14 als Monomer im Kristall vor. Der Matthews Koeffizient liegt bei $1,8 \text{ \AA}^3 \text{ Da}^{-1}$, entsprechend einem Solvenzanteil von 32 % (Matthews 1968). Das Phasenproblem wurde mittels Molekularem Ersatz mit den in der PDB hinterlegten Strukturen 4UA6 und 5TWD mit dem Programm Phaser (McCoy, Grosse-Kunstleve et al. 2007) aus dem Phenix Softwarepaket (Liebschner, Afonine et al. 2019) gelöst. Die anfangs erhaltenen Modelle wurden mit den Programmen PhenixRefine (Afonine, Grosse-Kunstleve et al. 2012) oder Refmac5 (Murshudov, Vagin et al. 1997) bis zur Konvergenz verfeinert.

Tabelle 11: Datensammlung und Refinement Statistik von Synchrotrondaten

Parameter	Apoprotein	Komplex mit Avibactam
Beamline	P13	P11
Wellenlänge [Å]	0,9762	1,0332
Raumgruppe	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁
Auflösung [Å]	30,0 – 1,0 Å (1,06 - 1,0 Å) ¹	43,5 – 1,14 Å (1,21 - 1,14 Å) ¹
Zellkonstanten	a=41,36 Å b=62,51 Å c=86,35 Å $\alpha=\beta=\gamma=90^\circ$	a=41,79 Å b=62,19 Å c=86,93 Å $\alpha=\beta=\gamma=90^\circ$
Anzahl gemessener Reflexe	1.461.599 (202.527) ¹	1.011.917 (132.110) ¹
unabhängige Reflexe	121.027 (19.132) ¹	83.276 (13.207) ¹
Vollständigkeit [%]	99,6 (98,4) ¹	99,8 (99,2) ¹
R _{meas} [%]	3,8 (22,6) ¹	5,8 (25,9) ¹
I/ σ (I)	36,48 (8,69) ¹	25,75 (7,52) ¹
CC _{1/2}	100,0 (98,5) ¹	99,9 (98,1) ¹
R _{work}	0,11	0,10
R _{free}	0,12	0,12
Rmsd Bindungen/ Winkel	0,008 Å/ 1,149°	0,029 Å/ 2,854°
Ramachandran favorisiert	96,4 %	97,7 %
Ramachandran erlaubt	2,4 %	2,3 %
Ramachandran Ausreißer	1,2 %	0 %

¹höchste Auflösungsschale

3.4.2 Serielle Datensammlung am Synchrotron APS

Bei den Messungen an der *Advanced Photon Source* (APS) wurden die Chips mit den darauf befindlichen Kristallen montiert und ein Raster festgelegt. Entlang dieses Rasters erfolgte die Messung. Die Kristalle liegen auf dem Chip in unterschiedlicher Orientierung vor, sodass viele Kristalle gemessen werden mussten, um einen vollständigen Datensatz zu erhalten. Die Flüssigkeit des Kristallisationsansatzes wird vor der Montage des Chips abgesaugt, wodurch der sonst durch Flüssigkeit erzeugte Hintergrund stark reduziert wird. Die Messung bei Raumtemperatur ermöglicht es, die Kristalle, ohne den Einsatz von Cryopuffern zu messen. Cryopuffer entsprechen nicht den Wachstumsbedingungen der Kristalle und können die Kristallordnung stören. Der Materialverbrauch dieser Methode ist im Vergleich zu anderen seriellen Messverfahren sehr gering. Die Messung eines Chips ist ausreichend für eine vollständige Datensammlung und benötigt nur 200 μL Probenvolumen.

Bei der Auswertung der ersten Messzeit zeigte sich, dass Kristalle zweier unterschiedlicher Raumgruppen ($P2_12_12_1$ und $P3_221$) auf dem gleichen Chip vorlagen. Vermutlich lagen beide Kristallformen bereits im Seedstock vor, aufgrund der schlechten Auflösung und Vergrößerung des dortigen Mikroskops waren allerdings keine Unterschiede im Habitus der Kristalle sichtbar. Durch eine Modifizierung des Programmes CrystFEL (White, Kirian et al. 2012) durch Aleksandra Tolstikova (Gruppe Henry Chapman) konnten die Daten nach Raumgruppen gefiltert und prozessiert werden, allerdings war die Datenqualität unzureichend und die Auflösung lag nur bei maximal 3 Å. Dies könnte in Zusammenhang mit den Kristallisationsproblemen vor Ort und der Seedstockpräparation liegen. Die Daten der zweiten Messung befinden sich aktuell noch in der Auswertung.

3.4.3 Serielle Datensammlung am European XFEL

Ein weiterer Ansatz zur Vermeidung von Strahlungsschäden ist das *Diffraction-before-destruction* Prinzip, für welches Mikrokristalle benötigt werden. Die kleinen Kristalle werden von einem starken Röntgenpuls getroffen und zerstört. Währenddessen wird die Diffraktion detektiert (Abb. 16). Aufgrund des sehr kurzen Energiepulses kann die Diffraktion aufgenommen werden, bevor Schäden am Kristall auftreten (Chapman, Caleman et al. 2014). Für diesen Ansatz werden sehr viele Kristalle benötigt, die kontinuierlich in die Interaktionszone des Röntgenstrahls transportiert werden müssen. Dies kann über einen

Flüssigkeitsstrom oder auf einem Kaptonband erfolgen. Die Kristalle haben eine zufällige Orientierung, wenn sie die Interaktionszone erreichen, sodass viele Kristalle vermessen werden müssen, um Daten aller Orientierungen zu erhalten. Die Messung von CTX-M-14 erfolgte am European XFEL mittels eines kontinuierlichen Flüssigkeitsstroms bei Raumtemperatur (Mancuso, Aquila et al. 2019). Die seriell aufgenommenen Diffraktionsdaten hatten eine Auflösung von $1,7 \text{ \AA}$, was zum Zeitpunkt der Messung dem dortigen Detektorlimit entsprach. Die meisten der aufgenommenen Diffraktionsbilder konnten indiziert werden und nur wenige Diffraktionsbilder zeigten eine zeitgleiche Messung mehrerer Kristalle (Abb. 17). Folglich waren sowohl die Kristallgröße als auch die Flussgeschwindigkeit des Flüssigkeitsstroms gut gewählt. Aus den einzelnen Diffraktionsbildern wurden zunächst die Zellkonstanten ermittelt (Abb. 18). Die Gaußsche Verteilung der ermittelten Werte weist nur geringe Abweichungen auf, was auf eine gute Uniformität der Kristalle hindeutet. Im Gegensatz zu den zuvor aufgenommenen Daten lagen diese allerdings in einer anderen kristallografischen Raumgruppe ($P3_221$) vor. Die Parameter der Datensammlung und Strukturlösung sind in Tabelle 12 zusammengefasst (Wiedorn, Oberthür et al. 2018).

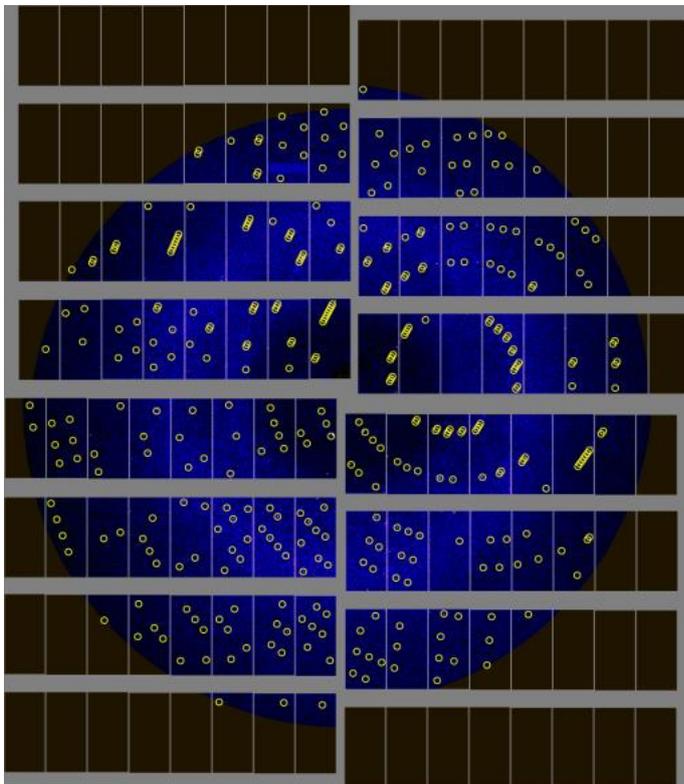


Abbildung 16: Beugungsbild von CTX-M-14 aufgenommen am EuXFEL. Die Positionen der Diffraction wurden durch die Software berechnet und gelb umkreist. Die Kristalle beugten bis zu einer Auflösung von $1,7 \text{ \AA}$.

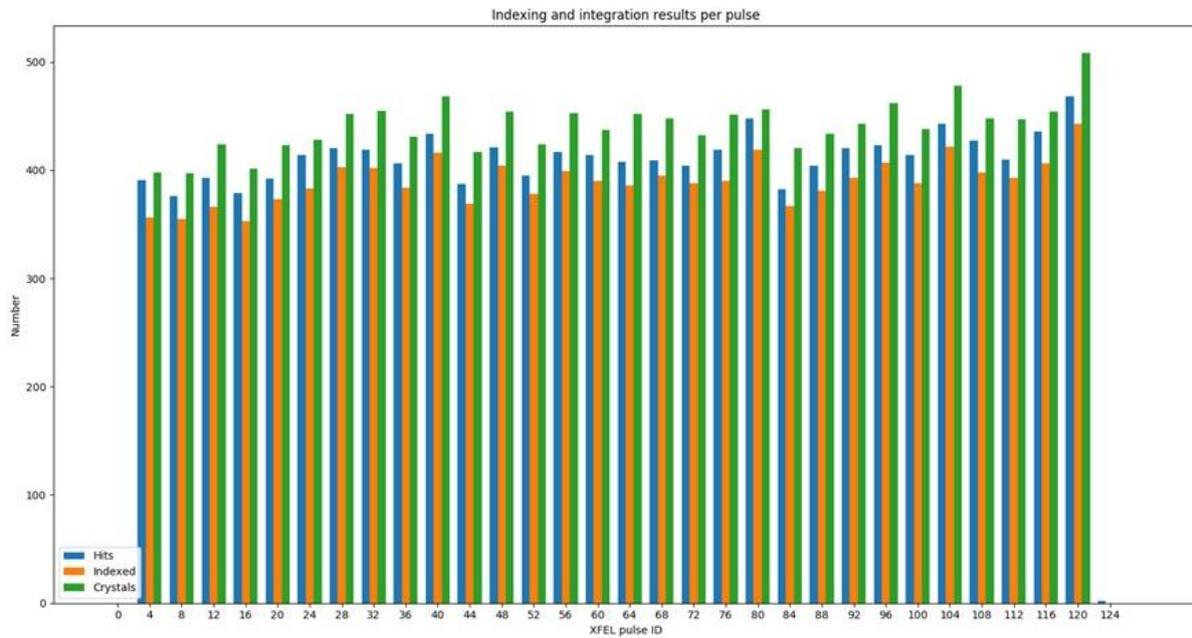


Abbildung 17: Indizierung der EuXFEL-Daten. Die Abbildung zeigt, dass die meisten der aufgenommenen Diffraktionsbilder (Hits, blau) indiziert werden konnten (orange). Dabei kam es nur vereinzelt zu zeitgleichen Messungen mehrerer Kristalle, wie aus dem leicht höheren grünen Balken ersichtlich wird.

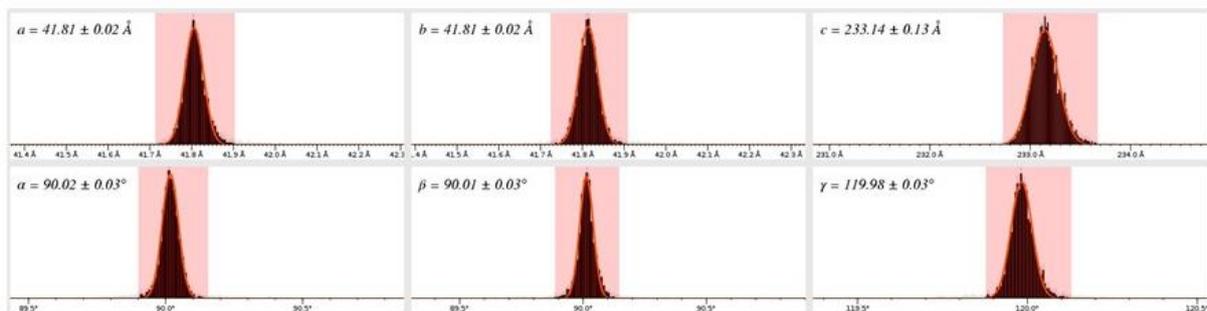


Abbildung 18: Bestimmung der Zellkonstanten der XFEL-Messung. Die Zellkonstanten wurden aus den einzelnen Diffraktionsbildern ermittelt, wobei sich eine Gaußsche Verteilung ergab. Der häufigste Wert und dessen mögliche Abweichung wurden angegeben.

Tabelle 12: Datensammlung und Refinement Statistik von CTX-M-14, gemessen am EuXFEL

Parameter	CTX-M-14
Photonen Energie	9150 eV
Fokus des Röntgenstrahls	15 μm
Pulsenergie an der Probe	526 μJ
Pulslänge	50 fs
Raumgruppe	P3 ₂ 21
Zellkonstanten	a=b=41,8 Å, c=233,3 Å $\alpha=\beta=90^\circ$, $\gamma=120^\circ$
Anzahl Hits/davon indiziert	14.445/12.474
unabhängige Reflexe	27.838 (2.715) ¹
Auflösung	34,6-1,69 Å (1,75-1,69 Å) ¹
Vollständigkeit	99,89 % (99,45 %) ¹
R _{split}	0,197 (0,476) ¹
I/ σ (I)	4,37 (2,30) ¹
CC _{1/2}	0,93 (0,63) ¹
Wilson B-Faktor	26,8 Å ²
R _{work}	0,18 (0,27) ¹
R _{free}	0,21 (0,30) ¹
Rmsd Bindungen/ Winkel	0,008 Å/ 1,22°
Ramachandran favorisiert	98,1 %
Ramachandran erlaubt	1,5 %
Ramachandran Ausreißer	0,4 %

¹höchste Auflösungsschale

3.5 Modellinterpretationen

Mithilfe des Programms DSSP (Kabsch and Sander 1983, Touw, Baakman et al. 2015) konnte die Sekundärstrukturverteilung von CTX-M-14 anschaulich dargestellt werden (Abb. 19). Die Helices bestimmen 43 % der Sekundärstruktur, während nur 19 % aus β -Strängen bestehen. Der helikale Anteil entspricht genau dem durch die CD-Messungen vorhergesagtem, allerdings ist der Anteil an β -Strängen mit 19 statt 35 % deutlich geringer. Diese Abweichung könnte am für die Auswertung der CD-Daten gewählten Algorithmus liegen, da diese zu teilweise erheblichen Unterschieden in der Auswertung der Daten führen.

CTX-M-14 besteht wie auch andere β -Lactamasen der Klasse A aus zwei Domänen, einer α/β -Domäne und einer α -Domäne (Abb. 20). Die erste Domäne setzt sich hierbei aus drei Helices, unter ihnen die N- und C-terminalen Helices, und fünf antiparallelen β -Strängen zusammen, die zweite, größere Domäne besteht aus 11 Helices und vier relativ kurzen β -Strängen.

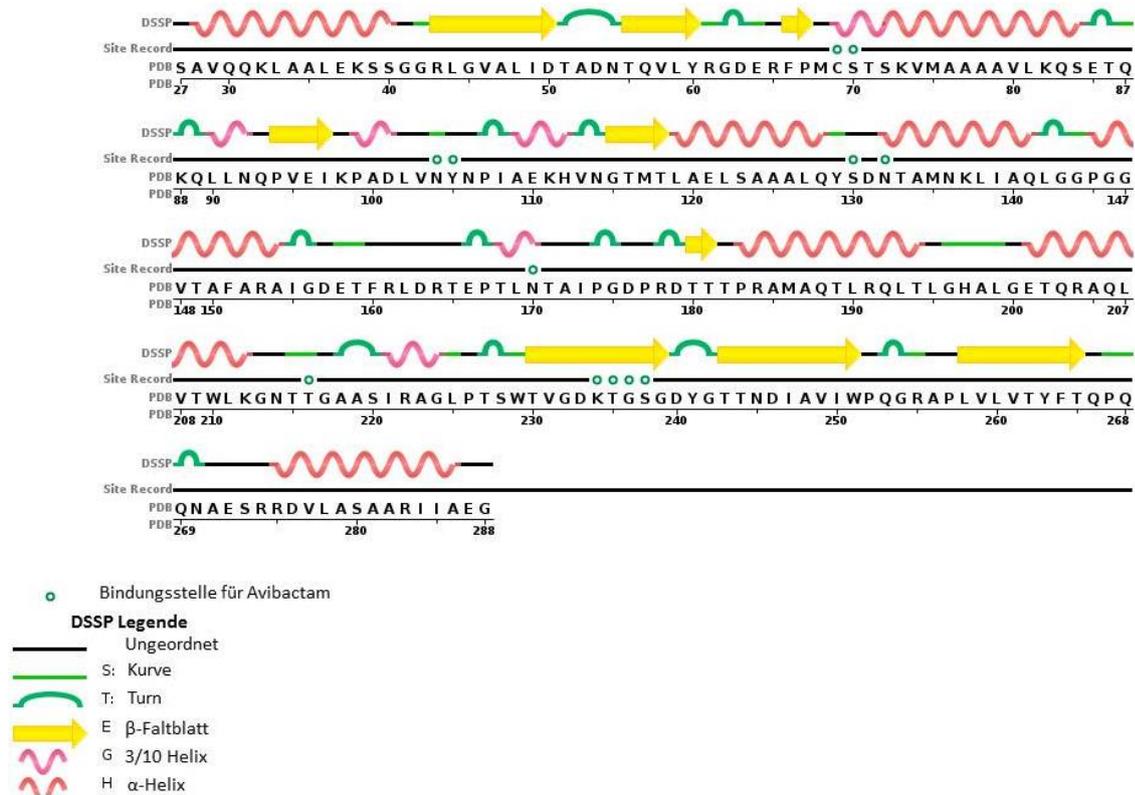


Abbildung 19: Sekundärstruktur von CTX-M-14. Die Visualisierung der Sekundärstruktur erfolgte mit dem Programm DSSP (Kabsch and Sander 1983, Touw, Baakman et al. 2015). 43 % des Proteins liegen helikal vor, verteilt auf 14 Helices und 19 % der Sekundärstruktur liegen als β -Stränge vor.

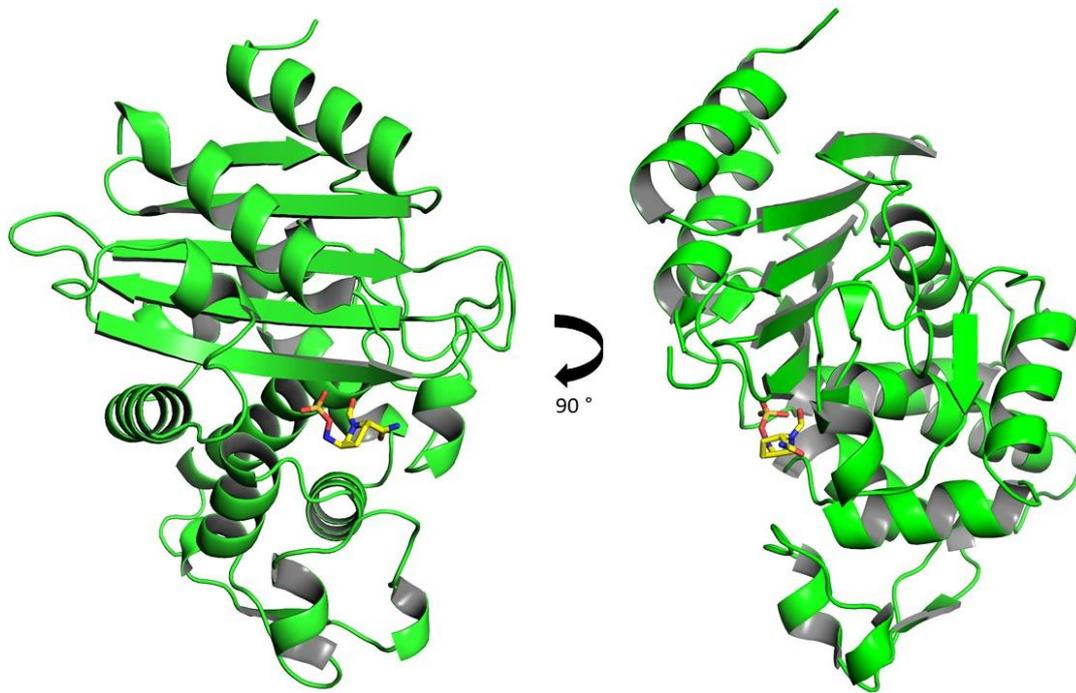


Abbildung 20: Tertiärstruktur von CTX-M-14. Das Protein besteht aus zwei Domänen, einer α/β -Domäne mit einem zentralen Faltblatt mit fünf β -Strängen und einer größeren, größtenteils aus α -Helices bestehenden Domäne. Der Inhibitor Avibactam (gelb) bindet kovalent im aktiven Zentrum.

Das aktive Zentrum des Enzyms befindet sich an der Berührungsfläche der beiden Domänen und ist von außen leicht zugänglich (Abb. 21). Die Aminosäurereste des aktiven Zentrums sind für β -Lactamasen der Klasse A stark konserviert. Bei der Substratbindung bildet sich eine kovalente Bindung des Substrates, in diesem Fall Avibactam, mit dem reaktiven Ser70, welches sich am N-Terminus der Helix2 befindet. Die Bindung des Substrates wird durch die Wechselwirkung mit verschiedenen anderen Seitenketten stabilisiert (Abb. 22). Dazu gehören Asn132 und Asn170, welche Wasserstoffbrücken zur Carboxamidgruppe des Avibactams bilden. Weitere Wechselwirkungen der Carboxamidgruppe bestehen zum katalytischen Wasser, sowie Aspartat- und Glycerolmolekülen. Die Sulfatgruppe wird durch Ser130, Lys234 und Thr235 positioniert. Außerdem interagiert Ser237 sowohl mit der Carboxamidgruppe als auch mit der Sulfatgruppe mittels Wasserstoffbrücken. Betrachtet man die Oberflächenladung des Proteins, wird eine positiv geladene Tasche deutlich, in der das negativ geladene Sulfat des Avibactams liegt (Abb. 23). Deutlich sichtbar ist auch die Ringöffnung des Avibactams, die nach oben beschriebenem Mechanismus durch Spaltung der C7-N6 Bindung erfolgte. Wenn kein Substrat zu CTX-M-14 hinzugegeben wird, befindet sich an dieser Stelle ein Phosphat, was für die hohe Affinität dieser Tasche zu negativ geladenen Molekülen spricht.

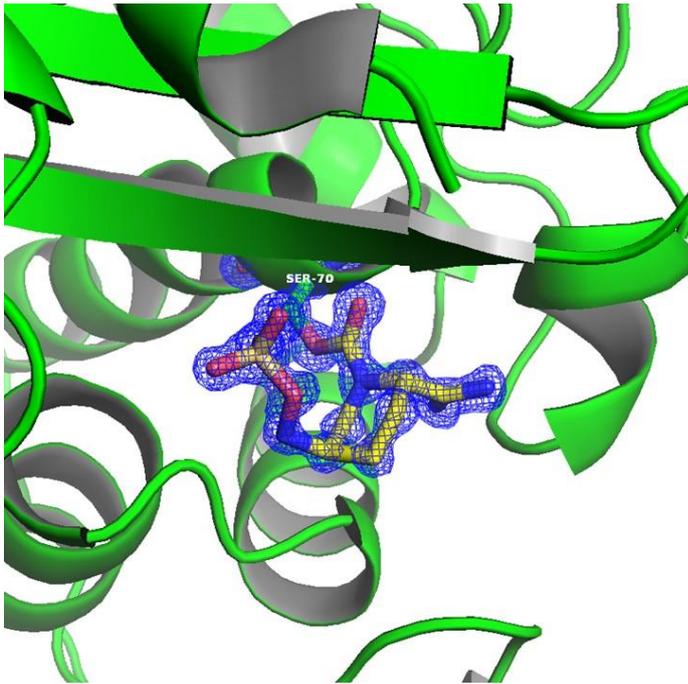


Abbildung 21 Bindung von Avibactam an das aktive Zentrum. Das aktive Zentrum wird mit 2 Fo-Fc Elektronendichte um den Liganden und das katalytische Ser70 dargestellt.

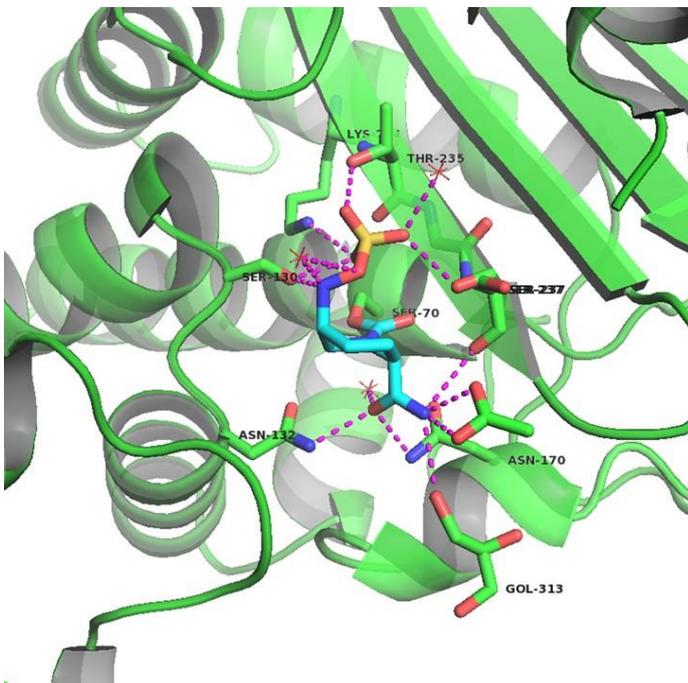


Abbildung 22: Wechselwirkungen von Avibactam im aktiven Zentrum von CTX-M-14. Die Carboxamidgruppe von Avibactam bildet Wasserstoffbrücken zu Asn132, Asn170, dem katalytischen Wasseratom sowie zu Solvenzmolekülen aus. Die Sulfatgruppe wird durch Ser130, Lys234 und Thr235 stabilisiert.

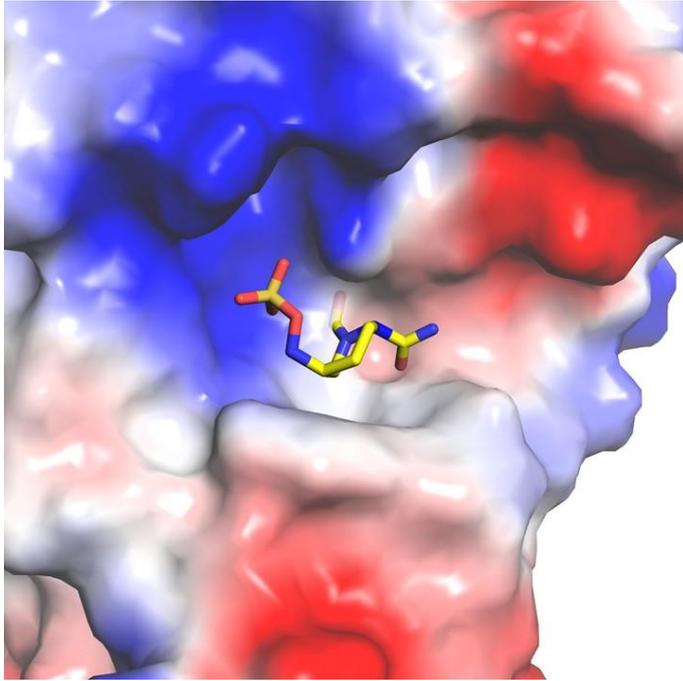


Abbildung 23: Elektrostatistisches Potential der Substratbindungstasche von CTX-M-14. In der Darstellung sind positiv geladene Bereiche blau und negative geladene Bereiche rot dargestellt. Es zeigt sich, dass die negativ geladene Sulfatgruppe des Avibactams in einer positiv geladenen Tasche von CTX-M-14 liegt.

3.6 Vergleich der Synchrotron- und XFEL-Strukturen von CTX-M-14 mit Avibactam

Beim Vergleich der mit Synchrotron-Daten (CTX_{Syn}) und XFEL-Daten (CTX_{XFEL}) gelösten Strukturen von CTX-M-14 mit Avibactam fallen nur sehr geringe Unterschiede auf (Abb. 24). Die Hauptkette verläuft bei beiden Proteinstrukturen identisch, aber einige Seitenketten liegen in unterschiedlichen Konformationen vor. Der RMSD-Wert liegt bei $0,28 \text{ \AA}$ für alle Atome. Bei CTX_{Syn} können drei Acetationen und elf Glycerolmoleküle identifiziert werden. Letztere wurden mit dem Cryopuffer zugeführt, sodass sie nicht der natürlichen Proteinumgebung entsprechen, bzw. keine biologische Bedeutung haben. Allerdings interagieren jeweils ein Glycerol- und Acetatmolekül über Wasserstoffbrücken mit dem am aktiven Zentrum gebundenen Avibactam. Bei CTX_{XFEL} werden diese Positionen alternativ von Wassermolekülen besetzt. Das für die Aktivierung des Ser70 nötige Wassermolekül ist in beiden Strukturen zu finden (Abb. 24B, roter Kreis). Ein zweites Wassermolekül, das nur bei CTX_{Syn} vorhanden ist, stabilisiert dort die Sulfatgruppe des Avibactam (oranger Kreis). Dieses Wassermolekül könnte der Grund für die unterschiedliche Konformation des Avibactams in

beiden Strukturen sein. Bei CTX_{Syn} ist außer dem gebundenen Avibactam noch ein freies Molekül mit intaktem Ringsystem zu finden (A blauer Kreis, C). Im Falle eines von CTX-M-14 umsetzbaren Substrates könnte dieses Molekül, nach der Hydrolyse des anderen, am aktiven Zentrum binden. Die Stapelung von Substraten wurde bereits in verschiedenen β -Lactamasen beobachtet (Olmos 2018). Die Sulfatgruppe des ungebundenen Avibactams wird durch Arg139 und Arg153 über Wasserstoffbrücken stabilisiert.

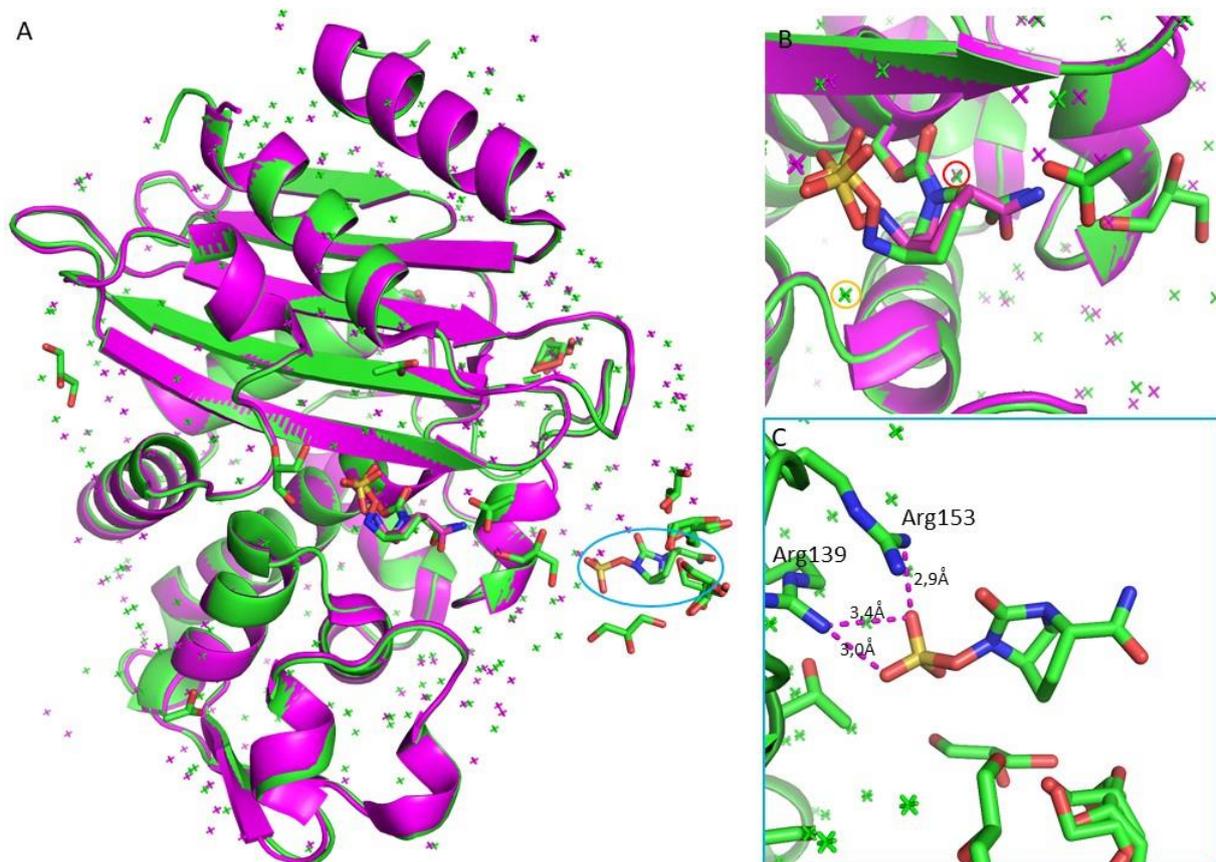


Abbildung 24: Überlagerung der über Synchrotron- und XFEL-Strahlung gelösten Strukturen von CTX-M-14. Die Strukturen aus den Synchrotron- (grün) und XFEL-Daten (pink) stimmen weitestgehend überein. Das Lösungsmittel ist ebenfalls dargestellt (A). Bei CTX_{Syn} liegt ein zweites Avibactammolekül am Rand der Struktur (A blauer Kreis, C). Die Sulfatgruppe wird mittels Salzbrücken stabilisiert. Im aktiven Zentrum (B) zeigt sich eine etwas andere Konformation des Avibactams. Die an der Stabilisierung des Inhibitors beteiligten Glycerolmoleküle und Acetationen kommen nur bei CTX_{Syn} vor, ebenso wie eines der beiden beteiligten Wassermoleküle nur in dieser Struktur sichtbar ist (oranjer Kreis). Das für die Aktivierung des Serin wichtige Wasser ist in beiden Strukturen konserviert (roter Kreis).

3.7 Spezifität verschiedener Boronsäure-Inhibitoren

Seit den 1970ern ist bekannt, dass Boronsäurederivate Serinproteasen inhibieren können (Philipp and Bender 1971). Seitdem wurden viele verschiedene Inhibitoren entwickelt. Für den medizinischen Einsatz dieser Komponenten ist deren Spezifität entscheidend, um unerwünschte Nebenwirkungen zu vermeiden (Smoum, Rubinstein et al. 2012). Im Jahr 2015 wurde ein Wirkstoffscreening verschiedener Boronsäurederivate für eine Carbapenemase von *K. Pneumoniae* (KPC) durchgeführt (Hecker, Reddy et al. 2015). Dabei wurde der zyklische Boronsäure Inhibitor Vaborbactam entwickelt (Abb. 25), welcher seit 2017 in Kombination mit Meropenem eingesetzt wird. Auch in anderen Bereichen der Medizin werden Boronsäurederivate eingesetzt. Das Krebsmedikament Bortezomib ist ein Boronsäurederivat und seit 2004 in der EU zugelassen. Dieses Medikament gilt als Proteasom-Inhibitor. Im Rahmen der Experimente, die zum Ende dieser Promotionsarbeit durchgeführt wurden, konnten Diffraktionsdaten von CTX-M-14 im Komplex mit Borsäure bzw. Bortezomib aufgenommen werden (Tab. 13). Dabei konnte gezeigt werden, dass Borsäure und Bortezomib auch an Ser70 von CTX-M-14 binden (Abb. 26).

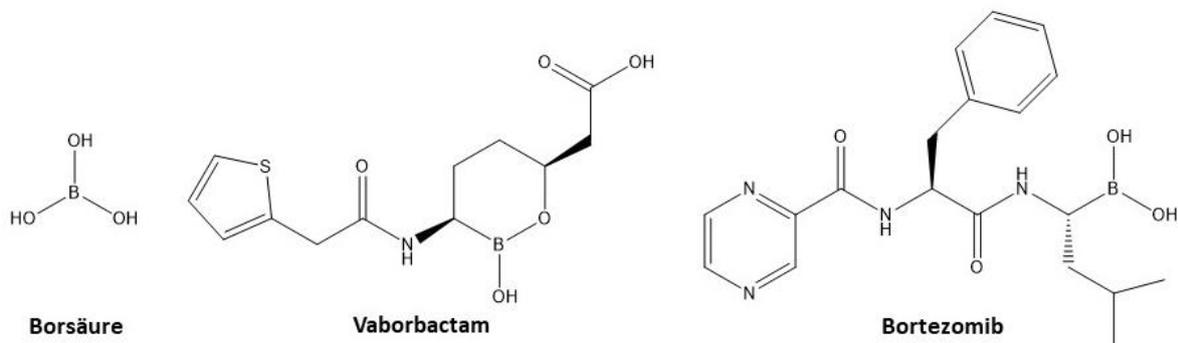


Abbildung 25: Chemische Strukturen von Borsäure, Vaborbactam und Bortezomib.

Tabelle 13: Datensammlung

Parameter	Komplex mit Borsäure	Komplex mit Bortezomib
Beamline	In-Haus Röntgenquelle	P11
Wellenlänge [Å]	1,5418	1,0332
Raumgruppe	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁
Auflösung [Å]	30,0 – 1,86 Å (1,97 - 1,86 Å) ¹	50 – 1,3 Å (1,38 – 1,3 Å) ¹
Zellkonstanten	a=41,36 Å b=62,27 Å c=86,46 Å $\alpha=\beta=\gamma=90^\circ$	a=41,33 Å b=62,36 Å c=86,27 Å $\alpha=\beta=\gamma=90^\circ$
Anzahl gemessener Reflexe	133.809 (19.120) ¹	701.129 (108.343) ¹
unabhängige Reflexe	19.394 (3054) ¹	105.779 (16.081) ¹
Vollständigkeit [%]	99,7 (98,6) ¹	99,4 (97,7) ¹
R _{meas} [%]	9,8 (50,0) ¹	9,2 (72,1) ¹
I/ σ (I)	18,45 (4,15) ¹	12,83 (2,41) ¹
CC _{1/2}	99,9 (87,1) ¹	99,9 (77,5) ¹
R _{work}	0,17	0,14
R _{free}	0,20	0,17
Rmsd Bindungen/ Winkel	0,002 Å/ 0,524°	0,012 Å /1,315°
Ramachandran favorisiert	95,7 %	96,3 %
Ramachandran erlaubt	3,12 %	2,86 %
Ramachandran Ausreißer	1,17 %	0,82 %

¹höchste Auflösungsschale

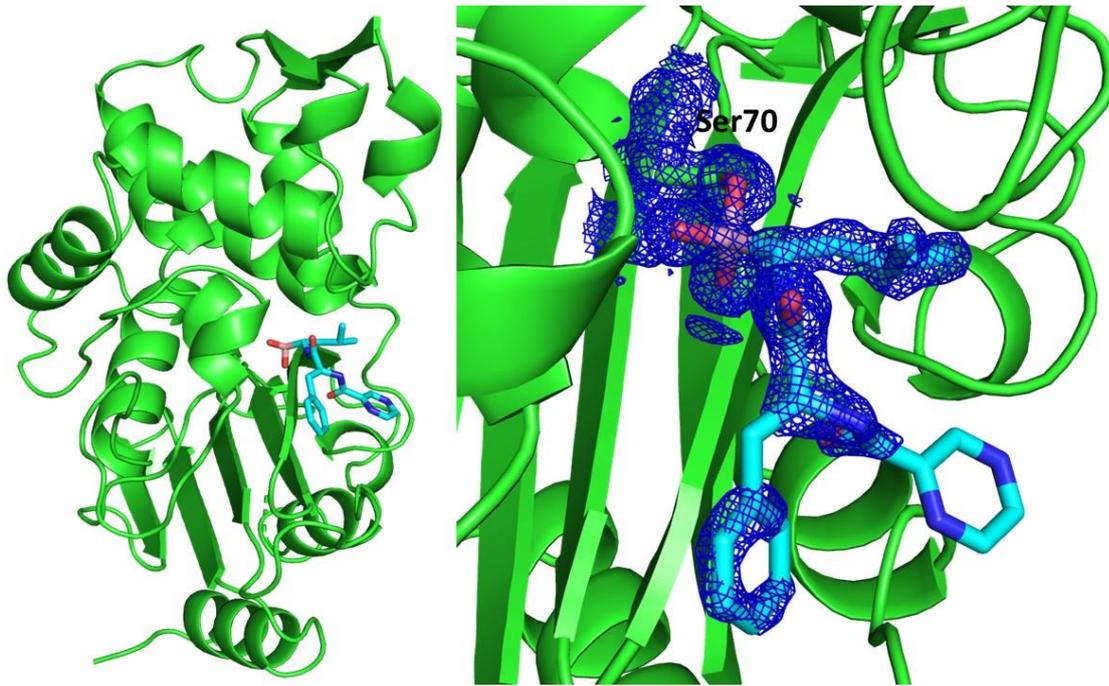


Abbildung 26: Bindung von Bortezomib an CTX-M-14. Bortezomib bindet ebenso wie die bekannten β -Lactamase-Inhibitoren an Ser70 im aktiven Zentrum. Die Elektronendichte von Bortezomib ist bei einem 1σ Konturlevel der $2Fo-Fc$ Elektronendichte dargestellt.

Die Struktur von CTX-M-15 wurde im Komplex mit Vaborbactam gelöst (PDB Code 4XUZ, (Hecker, Reddy et al. 2015)). CTX-M-15 gehört zur Untergruppe der CTX-M-1 Enzyme und besitzt 82,8 % Identität zu CTX-M-14 (Anhang A1). Die Tertiärstruktur aller CTX-M Enzyme ist identisch, sodass sie miteinander verglichen werden können (Abb. 27). Beim direkten Vergleich der Komplexe von CTX-M-14 mit Borsäure (rosa) und Bortezomib (cyan) sowie CTX-M-15 mit Vaborbactam (grün) zeigt sich, dass alle drei Substrate an der gleichen Stelle des aktiven Zentrums, am Ser70, binden. Dabei bildet sich jeweils eine kovalente Bindung zum Boratom aus. Beim Betrachten der Wechselwirkungen der einzelnen Substrate mit Enzym und Lösungsmittelatomen, fällt die unterschiedliche Anzahl an Wasserstoffbrücken auf (Abb. 28 - 30). Borsäure bildet sieben Wasserstoffbrücken aus, wobei auch ein Netzwerk von Wassermolekülen involviert ist. Vaborbactam bildet neun Wasserstoffbrücken aus und wird dadurch sehr gut im aktiven Zentrum stabilisiert. Bortezomib kann hingegen nur fünf Wasserstoffbrücken ausbilden, wobei die Ringsysteme offensichtlich flexibel sind und keine direkten Wechselwirkungen mit CTX-M-14 ausbilden (Abb. 26). Die großen Liganden Vaborbactam und Bortezomib verdrängen das Wasser aus dem aktiven Zentrum, was sich über einen negativeren Entropiewert günstig auf die Stabilität der Proteinstruktur auswirkt.

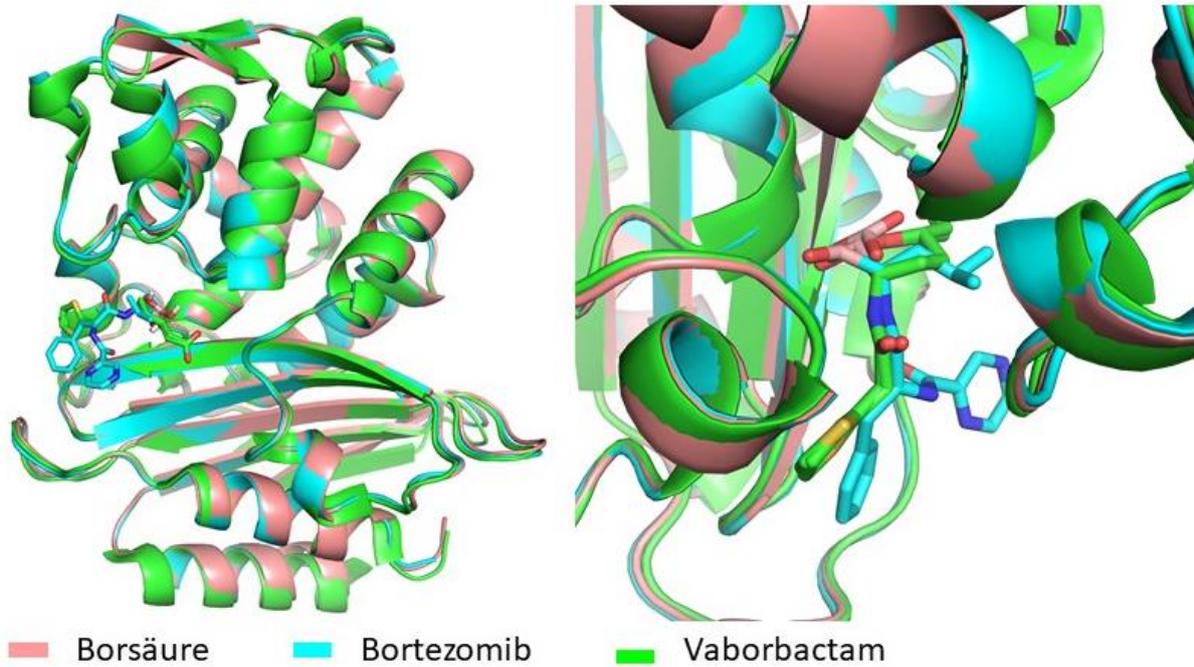


Abbildung 27: Vergleich der Strukturen von CTX-M-14 mit gebundener Borsäure bzw. Bortezomib und CTX-M-15 mit gebundenem Vaborbactam

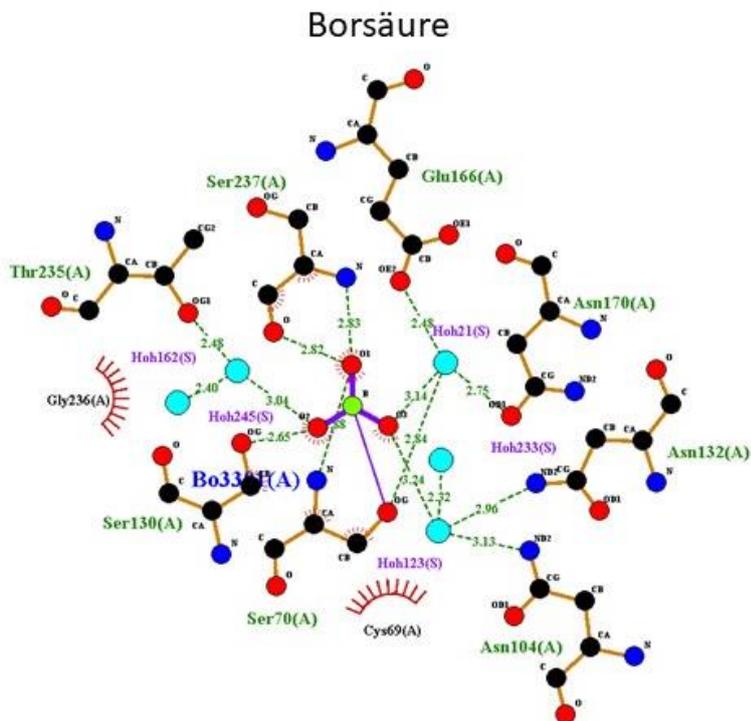


Abbildung 28: Wechselwirkungen von Borsäure im aktiven Zentrum von CTX-M-14. Borsäure bildet drei Wasserstoffbrücken zu den umliegenden Aminosäureresten und vier weitere Wasserstoffbrücken zu Wassermolekülen aus.

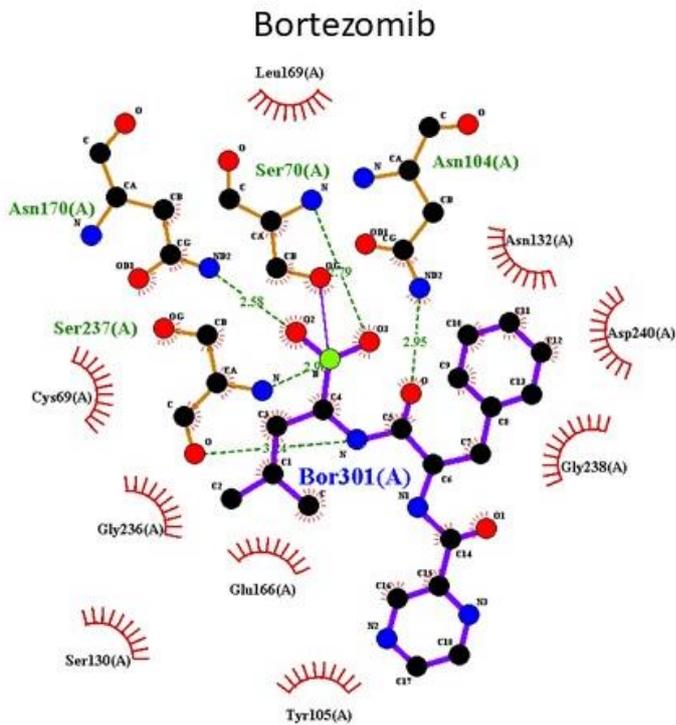


Abbildung 29: Wechselwirkungen von Bortezomib im aktiven Zentrum von CTX-M-14. Bortezomib bildet nur fünf Wasserstoffbrücken zu den umliegenden Aminosäureresten aus, wobei die Ringsysteme kaum stabilisiert werden und dadurch eher flexibel sind.

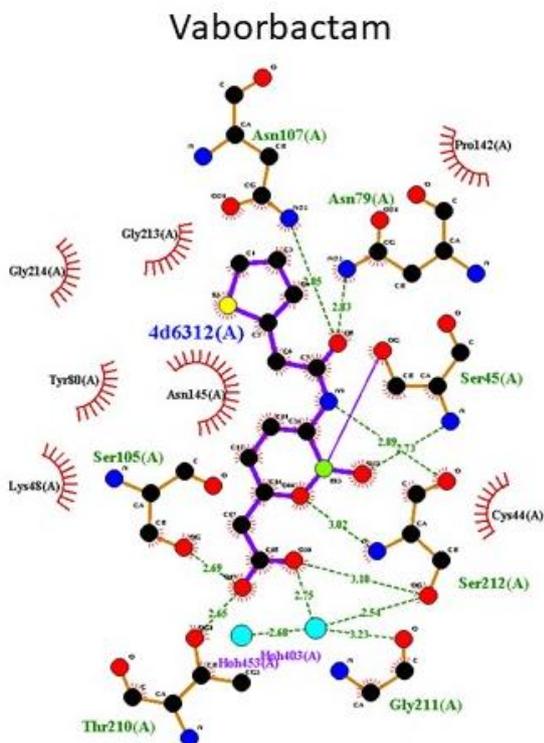


Abbildung 30: Wechselwirkungen von Vaborbactam im aktiven Zentrum von CTX-M-14. Vaborbactam bildet acht Wasserstoffbrücken zu den umliegenden Aminosäureresten und eine weitere zu einem Wassermolekül aus.

3.8 Vergleich von CTX-M-14 mit anderen β -Lactamasen

Die β -Lactamasen bilden eine sehr große und heterogene Familie von >1600 Enzymen. Mehr als 550 Proteine werden den Penicillinasen der Klasse A zugeordnet (Philippon, Slama et al. 2016). Über einen langen Zeitraum waren zunächst die β -Lactamasen TEM und SHV mit ihren Untervarianten bekannt, bevor die Gruppe der CTX-M Enzyme in den 2000ern zu der am häufigsten auftretenden β -Lactamase Familie ernannt wurde (Canton, Jose et al. 2012). Es wurden die vier Enzyme TOHO-1, TEM-1, SME-1 und SHV-1, die alle zur Gruppe A gehören, für einen Vergleich ausgewählt (Tabelle 14). Der Sequenzvergleich dieser vier Enzyme mit CTX-M-14 zeigt eine relativ hohe Homologie zwischen den einzelnen Enzymen, auch wenn die Sequenzidentität von TEM-1, SME-1 und SHV-1 jeweils unter 50 % zu CTX-M-14 liegt (Abb. 31). Das reaktive Ser70 (rot) ist in allen Enzymen konserviert, ebenso wie die anderen im aktiven Zentrum liegenden Aminosäurereste Ser130, Asp131, Asn132, Lys234, Thr/Ser235 und Gly236 (blau), welche das Substrat stabilisieren.

Tabelle 14: Vergleich ausgewählter β -Lactamasen mit CTX-M-14

Proteinname	Sequenzidentität zu CTX-M-14	PDB Code	Referenz
TOHO-1	84,2 %	1IYS	(Ibuka, Ishii et al. 2003)
TEM-1	38,1 %	1M40	(Minasov, Wang et al. 2002)
SME-1	48,9 %	1DY6	(Sougakoff, L'Hermite et al. 2002)
SHV-1	38,5 %	1SHV	(Kuzin, Nukaga et al. 1999)



Abbildung 31: Sequenzvergleich ausgewählter β -Lactamasen der Klasse A. Die Sequenzen der ausgewählten β -Lactamasen TOHO-1, TEM-1, SME-1 und SHV-1 weisen eine hohe Ähnlichkeit zu CTX-M-14 auf. Das für die Substratbindung genutzte Ser70 (rot) ist dabei ebenso konserviert wie die anderen Aminosäurereste des aktiven Zentrums (blau).

Diese hohe Ähnlichkeit findet sich auch in der Tertiärstruktur der Proteine (Abb. 32). Alle Proteine zeigen die gleiche Faltung und nur sehr geringe strukturelle Abweichungen voneinander. Die größten Abweichungen befinden sich an den terminalen Helices. Die N-terminalen Helices von TEM-1 und SHV-1 weichen um bis zu 4 Å von CTX-M-14 ab, bei den C-terminalen Helices sind dies bis zu 3 Å. Die geringsten Abweichungen weist wie erwartet TOHO-1 auf, welches dem CTX-M-14 mit 84 % Sequenzidentität am meisten ähnelt. Das aktive Zentrum ist in allen Proteinen sehr hoch konserviert, wie aufgrund der konservierten Sequenz zu vermuten ist.

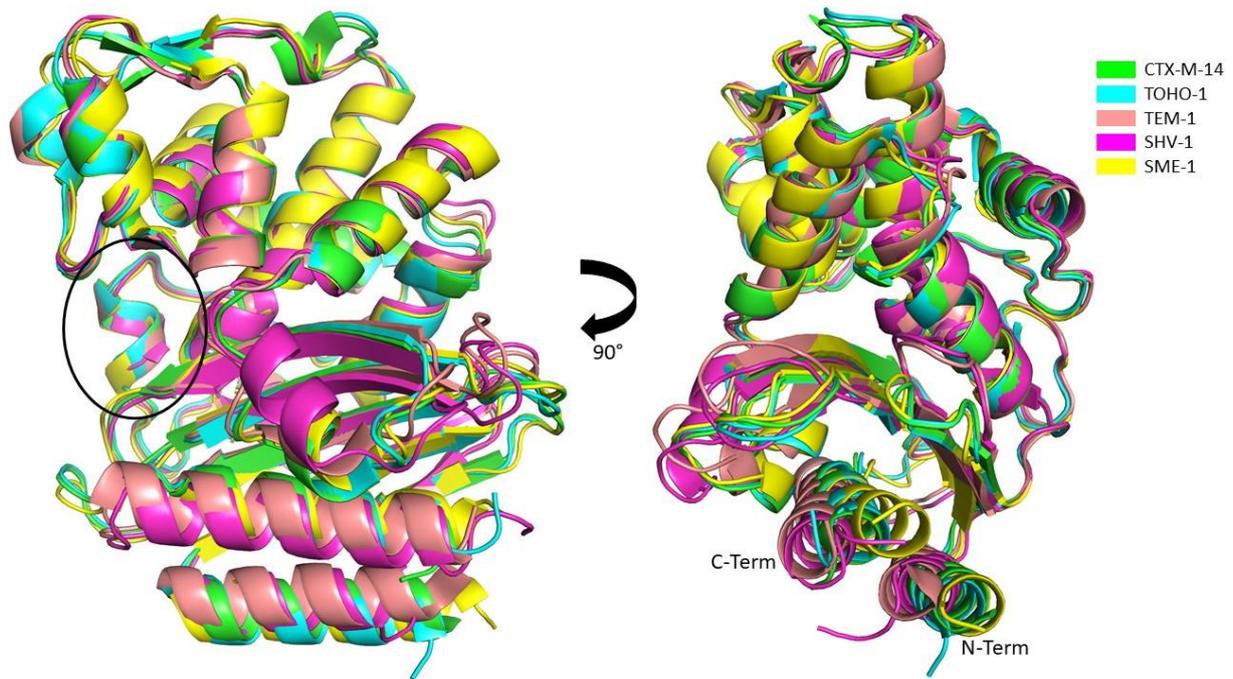


Abbildung 32: Strukturvergleich ausgewählter β -Lactamasen der Klasse A. Die Proteinstrukturen der ausgewählten β -Lactamasen TOHO-1, TEM-1, SME-1 und SHV-1 weisen eine identische Faltung zur Struktur von CTX-M-14 auf. Das aktive Zentrum (schwarzer Kreis) ist auch strukturell sehr hoch konserviert. Die größten strukturellen Abweichungen der Strukturen finden sich an den N- und C-terminalen Helices.

4 AUSBLICK

4.1 Zeitaufgelöste Messungen

Seit die erste Kristallstruktur eines Enzyms gelöst wurde, ist die hochaufgelöste Beobachtung von katalytischen Vorgängen innerhalb eines Enzyms ein Ziel der Strukturbiologie (Blake, Koenig et al. 1965, Kupitz, Olmos et al. 2017). Allerdings gibt es mehrere limitierende Faktoren. Zunächst war intensive Synchrotronstrahlung nötig (Moffat 1989), die jedoch Strahlenschäden in Kristallen verursachen. Zudem wurden Makrokristalle für die Messung benötigt. Die Diffusion von Substraten und Reaktionsprodukten in und aus einem Makrokristall ist deutlich langsamer als die Umsatzraten vieler Enzyme (Nienhaus, Nienhaus et al. 2005, Tremblay, Fan et al. 2010). Es ist zwar möglich Übergangszustände langsamer Reaktionen durch schnelles Einfrieren sichtbar zu machen, jedoch können keine Reaktionen bei Raumtemperatur beobachtet werden. Eine Möglichkeit dieses Problem zu umgehen bieten sogenannte *caged-Compounds* (Goeldner and Givens 2006). Dabei handelt es sich um aktive Substrate, welche mit einer photolabilen Schutzgruppe ausgestattet werden. Durch diese Schutzgruppe wird das Substrat nicht vom entsprechenden Enzym umgesetzt und kann mit diesem vermischt werden. Durch einen Laserpuls wird die Schutzgruppe abgespalten und das Enzym kann mit dem Substrat interagieren. Auf diese Weise konnte im Jahr 1990 die erste zeitaufgelöste Struktur eines Proteins mittels *caged-Compound* gelöst werden (Schlichting, Almo et al. 1990). Allerdings sind nur wenige Substrate als *caged-Compound* kommerziell erhältlich (Schlichting, Almo et al. 1990, Stoddard, Cohen et al. 1998). Die Entwicklung der XFELs ermöglicht hingegen die Untersuchung vieler anderer Enzym-Substrat-Systeme. Die Proteinkristalle und Substrate können je nach Aufbau der Düse z.B. direkt im Flug vermischt werden, sodass die Diffraktion ohne Verzögerung gemessen werden kann. Die hierfür verwendeten Mikrokristalle reduzieren die erforderliche Diffusionszeit, um die Substrate aufzunehmen, sodass dieser limitierende Faktor entfällt (Beyerlein, Dierksmeyer et al. 2017, Kupitz, Olmos et al. 2017). Außerdem treten dank des *Diffraction-before-destruction* Prinzips (Chapman, Fromme et al. 2011) keine Strahlenschäden auf, weil durch die sehr kurzen energiereichen Röntgenpulse die Diffraktionsdaten aufgenommen werden, bevor Schäden am Proteinkristall auftreten. Diese Methode erlaubt die Datensammlung bei Raumtemperatur, sodass die Enzyme in ihrem natürlichen Zustand gemessen werden können, soweit die aktiven Zentren im Kristall frei zugänglich sind. Es ist möglich, die Substrate erst direkt vor dem Eintritt in die

Interaktionszone des Röntgenstrahls mit den Enzymen zu mischen, sodass auch sehr kurze Reaktionszeiträume gemessen werden können. Diese Technik wird auch *Mix-and-inject serial crystallography* (MISC) genannt (Schmidt 2013, Kupitz, Olmos et al. 2017).

Im Jahr 2018 wurden Daten der β -Lactamase BlaC mit dem Antibiotikum Ceftriaxone an vier unterschiedlichen Reaktionszeitpunkten von 30 ms bis 2 s aufgenommen (Olmos, Pandey et al. 2018). Dazu wurden zwei unterschiedliche Kristallformen genutzt, die beide jedoch nicht optimal für diese Versuche waren. Die Plättchenförmigen Kristalle führten zu Datensätzen mit einem Auflösungsbereich zwischen 2,15 und 2,75 Å, mit vier Molekülen in der ASU, von denen nur zwei das Substrat im untersuchten Zeitraum banden. Die Besetzung des Substrates war in beiden Proteinketten mit ca. 90 % auch schon nach einem Zeitraum von 30 ms sehr gut. Die nadelförmigen Kristalle diffraktierten bis zu 1,8 Å Auflösung mit nur einem Molekül in der ASU, allerdings war die Besetzung des Substrats mit nur 50 % deutlich niedriger, was möglicherweise der kompakteren Kristallpackung zuzuschreiben ist.

Die bisherigen Experimente mit der β -Lactamase CTX-M-14 lieferten Kristalle in zwei Raumgruppen, jeweils mit nur einem Molekül in der ASU, dessen Reaktionszentrum sich an der Proteinoberfläche befindet und somit leicht zugänglich für Substrate verschiedener Größe ist. Daraus ergibt sich eine sehr gute Besetzung des aktiven Zentrums mit Substrat. Zudem konnte bereits gezeigt werden, dass sich die Mikrokristalle von CTX-M-14 für verschiedene Messmethoden eignen und auch die Probenzuführung mit einem Flüssigkeitsstrom möglich ist, welcher derzeit oft für die MISC verwendet wird. Die erreichte Auflösung war zwar etwas schlechter als bei den Makrokristallen, jedoch lag das auch am Detektoraufbau am EuXFEL, da dessen Auflösungslimit zum Messzeitpunkt bei 1,7 Å lag. Mit einem anderen Detektor wären vermutlich ähnliche Auflösungen wie für die Makrokristalle und Messungen am Synchrotron möglich. Während BlaC mit einem hydrolysierbaren Substrat untersucht wurde, wurde CTX-M-14 mit nicht hydrolysierbaren Inhibitoren untersucht. Demzufolge treten bei CTX-M-14 nur zwei Zustände auf, das ungebundene Substrat und das kovalent gebundene Substrat mit geöffnetem β -Lactamring. Der dritte Zustand, das hydrolysierte Substrat, entfällt. Die von A. Prester (UKE, Hamburg) durchgeführten Tapedrive-Versuche zeigten, dass die Substrate Avibactam und Relebactam bereits nach sehr kurzen Zeitintervallen von 250 ms zu nahezu 100 % an CTX-M-14 gebunden hatten. Beim Tapedrive wird ein Flüssigkeitsfilm mit enthaltenen Mikrokristallen auf einem Kaptonband aufgetragen und in die Interaktionszone

des Röntgenstrahls befördert. Durch unterschiedliches Design der aufragenden Düsen kann der Zeitraum zwischen dem Mixen des Proteins mit dem Substrat und der Diffraktionsdatenmessung variiert werden.

Durch die hohe Enzymaktivität von CTX-M-14 ist es leider nicht möglich zeitaufgelöste Messungen des Wildtypproteins an Synchrotronquellen durchzuführen. Auch bei den in dieser Arbeit betrachteten kovalent bindenden Inhibitoren ist es nicht möglich Zwischenzustände am Synchrotron zu messen. Es sind leider auch keine *caged* Substrate oder Inhibitoren vorhanden. Für die Messung der kurzlebigen Zwischenzustände der Bindung eines Substrates an CTX-M-14 ist daher die gepulste Röntgenstrahlung eines XFELs nötig. Die auf diesem Weg gewonnenen Daten sollen zu einem besseren Verständnis der Antibiotikaresistenz führen, um zukünftig neue Wirkstoffe entwickeln zu können.

4.2 Neutronenbeugung

Bisher wurden mehr als 150.000 Proteinstrukturen in der PDB hinterlegt. Bei den meisten dieser Strukturen gibt es allerdings keine Informationen über die Wasserstoffatome von Protein und Solvenz. Wasserstoff besitzt nur ein einzelnes Elektron, sodass die Röntgenstrahlen nur schwach gebeugt werden. Oft wird die Position der Wasserstoffatome nur anhand der dazu kovalent gebundenen Atome abgeleitet (Blakeley and Podjarny 2018). Um die Position der Wasserstoffatome direkt bestimmen zu können, wäre eine Auflösung von mindestens 1,0 Å nötig. Besonders Wasserstoffatome von mobilen Molekülen, z.B. von Wassermolekülen können aber meist auch nicht bei hochauflösenden Röntgendaten unter 0,8 Å lokalisiert werden (Ahmed, Blakeley et al. 2007).

Die Neutronenbeugung folgt den gleichen Prinzipien wie die Röntgenbeugung, allerdings findet die Beugung an den Atomkernen, nicht an den Elektronen statt (Sivia 2011). Der Impuls einer Bewegung wird am besten zwischen Körpern gleicher Masse übertragen, sodass Neutronen von den Protonen der Wasserstoffatome am besten gestreut werden. Die gesamte Streuung eines Atomkerns setzt sich aus der kohärenten und nicht-kohärenten Streuung zusammen. Die nicht-kohärente Streuung produziert ein gleichmäßiges Hintergrundsignal, während die kohärente Streuung zu Bragg Reflexionen führt (Blakeley and Podjarny 2018).

Ein weiterer Vorteil der Neutronenbeugung gegenüber der Röntgenbeugung ist, dass bei der Neutronenbeugung keine Strahlenschäden auftreten, weil bei der Bestrahlung keine freien Radikale entstehen. Folglich können Datensätze von einem einzelnen Kristall bei Raumtemperatur aufgenommen werden, ohne dass dieser Schaden nimmt. Allerdings muss dieser Kristall deutlich größer sein (ca. $0,5 \text{ mm}^3$) und die Messung dauert meist mehrere Tage.

Häufig werden die Proteinkristalle vor der Messung deuteriert. Deuterium hat eine niedrigere nicht-kohärente Streuung als Wasserstoff, wodurch der Hintergrund der Messung reduziert wird. Zeitgleich ist die kohärente Streuung des Deuteriums besser, sodass das Signal-zu-Rausch Verhältnis verbessert wird. Während Wasserstoffatome erst bei einer Auflösung ab $1,5 \text{ \AA}$ (Kurihara, Tanaka et al. 2004) lokalisiert werden können, ist dies bei Deuteriumatomen schon ab $2,5 \text{ \AA}$ möglich (Habash, Raftery et al. 2000).

In der PDB befinden sich aktuell 162 Strukturen, die mit Neutronenbeugung gelöst wurden (Stand 23.01.2020). Bisher wurden sieben Strukturen von zwei unterschiedlichen β -Lactamasen mittels Neutronenbeugung gelöst. Dabei handelt es sich um Toho-1 (6C78, 5KSC, 4C3Q, 4BD1, 2XQZ, 2WYX) und CTX-M-97 (5A90).

CTX-M-14 soll in naher Zukunft ebenfalls mittels Neutronenbeugung analysiert werden. Dadurch sollen nicht nur die genauen Positionen der Wasserstoffatome ermittelt werden, sondern auch der Protonierungsgrad von Aminosäuren und Liganden. Bei der Hydrolyse der Penicilline durch CTX-M-14 spielt ein katalytisches Wassermolekül eine entscheidende Rolle, sodass die Kenntnis dessen genauer Orientierung zu einem grundlegenden Verständnis der Protonierungszustände dieses Vorgangs führen wird. Dadurch wäre es dann möglich die Entwicklung neuer Inhibitoren besser an die strukturellen Begebenheiten von CTX-M-14 anzupassen. Die bisher größten erhaltenen Kristalle besitzen ein Volumen von $0,22 \text{ mm}^3$, welches bereits ausreichend für erste Tests sein wird. Zudem kann die Kristallgröße mittels Makro seeding weiter erhöht werden.

Kapitel B: Acylase GqqA

5 EINLEITUNG

5.1 *Komagataeibacter europaeus*

Komagataeibacter europaeus ist ein Gram-negatives, aerobes Essigsäurebakterium, welches zur Familie der Acetobacteraceae gehört. Die Bakterien sind an der partiellen Oxidation von Kohlenhydraten und Alkoholen zu organischen Säuren beteiligt. Die traditionelle Essigherstellung erfolgt mit Hilfe dieser Essigsäurebakterien aus ethanolhaltigen Substraten. Die Bakterien bilden einen Cellulose-Biofilm an der Kontaktfläche zwischen Flüssigkeit und Luft. Dadurch wird die Sauerstoffversorgung gewährleistet und ein besseres Überleben unter Stress durch hohe Ethanol- und Essigkonzentrationen ermöglicht. Diese traditionelle Methode erzeugt zwar qualitativ hochwertige Essige, ist aber zeit- und kostenintensiv. Alternativ werden Essigsäurebakterien in speziellen Bioreaktoren unter Sauerstoffzufuhr schnell mit dem Substrat vermischt. Essigsäure ist für die meisten Bakterien bereits ab einer Konzentration von 0,5 % toxisch. Die kleinen lipophilen Moleküle können leicht durch die Cytoplasmamembran ins Zellinnere gelangen und dort zu einer Übersäuerung führen, die letztlich zum Zelltod führt. Essigsäurebakterien der Spezies *Komagataeibacter* können hingegen Essigsäurekonzentrationen von bis zu 20 % tolerieren. Die Mechanismen, die zu dieser Toleranz führen sind noch nicht komplett verstanden (Barja, Andrés-Barrao et al. 2016). Die Zusammensetzung der Lipidmembran verändert sich bei steigender Acetatkonzentration, wodurch die Oberfläche für den passiven Transport hydrophober Moleküle verringert wird. Zudem wird der Anteil an Glycolipiden in der Membran erhöht, wodurch die hydrophobe Barriere verstärkt wird (Trcek, Jernejc et al. 2007). Des Weiteren konnte festgestellt werden, dass die membrangebundene Alkoholdehydrogenase, welche Ethanol zu Acetaldehyd oxidiert, eine wichtige Rolle bei der Resistenz gegen hohe Essigsäurekonzentrationen spielt (Chinnawirotpisan, Theeragool et al. 2003).

5.2 Quorum Sensing

Quorum Sensing beschreibt die Regulation der Genexpression in Abhängigkeit von der Populationsdichte der Bakterien. Die Bakterien geben chemische Signalmoleküle, sogenannte Autoinducer, an ihre Umgebung ab. Abhängig von der Populationsdichte steigt die Konzentration der Autoinducermoleküle an und sobald ein spezifischer Schwellenwert überschritten wird, ändert sich das Expressionsmuster der Bakterien (Stevens, Dolan et al. 1994). Die Entdeckung und Beschreibung dieses Phänomens erfolgte Ende der 1970er Jahre (Nealson 1979). Dabei wurde der Zusammenhang zwischen der Populationsdichte zweier mariner Bakterien, *Vibrio fischeri* und *Vibrio harveyi*, und der Lichtproduktion durch das Protein Luciferase erkannt, welche nur bei hoher Zelldichte und somit einer hohen Konzentration von Autoinducermolekülen stattfand (Nealson and Hastings 1979). Außer der beschriebenen Lumineszenz wurden noch viele weitere Verhaltensmuster entdeckt, die durch Quorum Sensing reguliert werden. Dazu gehören die Virulenz pathogener Bakterien, Antibiotikaproduktion, Proliferation, Mobilität und auch die Bildung von Biofilmen. Die Kommunikation funktioniert zwischen Bakterien der gleichen Art, aber auch zwischen verschiedenen Spezies und auch einige Eukaryoten reagieren auf Quorum Sensing Signale. Gram-positive Bakterien nutzen Oligopeptide für die Kommunikation, während Gram-negative Bakterien Acylhomoserinlactone (AHLs) verwenden (Waters and Bassler 2005). Die AHLs bestehen aus einem Homoserinlactonring und einer durch eine Amidbindung verknüpften Acylkette von variabler Länge. Zudem kann der C3 Kohlenstoff vollständig reduziert vorliegen, aber auch eine Carboxyl- oder Hydroxylgruppe gebunden haben (Miller and Bassler 2001). Die Gram-negativen Bakterien besitzen mindestens Homologe der zwei regulatorischen Proteine LuxI und LuxR, die zuerst in *V. fischeri* beschrieben wurden. LuxI-homologe Proteine sind Autoinducer-Synthasen und produzieren die artspezifischen AHLs auf einem geringen basalen Level, welche aus der Zelle hinaus diffundieren (Abb. 33). Bei einer erhöhten Zelldichte liegen auch viele Autoinducermoleküle in der Umgebung vor, sodass auch deren Konzentration innerhalb der Zelle ansteigt. Sobald die Aktivierungsschwelle der LuxR-homologen Proteine überschritten wurde, binden die Autoinducer an den Regulator. Der LuxR-AHL-Komplex bindet an einen Promoter und aktiviert die spezifische Genexpression (Dong and Zhang 2005). Dazu zählen auch die LuxI- und LuxR-Gene, welche über einen positiven Feedback-Mechanismus verstärkt exprimiert werden. Dadurch wird die Produktion

von Autoinducern stark erhöht, welche in die Umgebung diffundieren, andere Zellen induzieren und somit zu einem populationsweit veränderten Phänotyp führen.

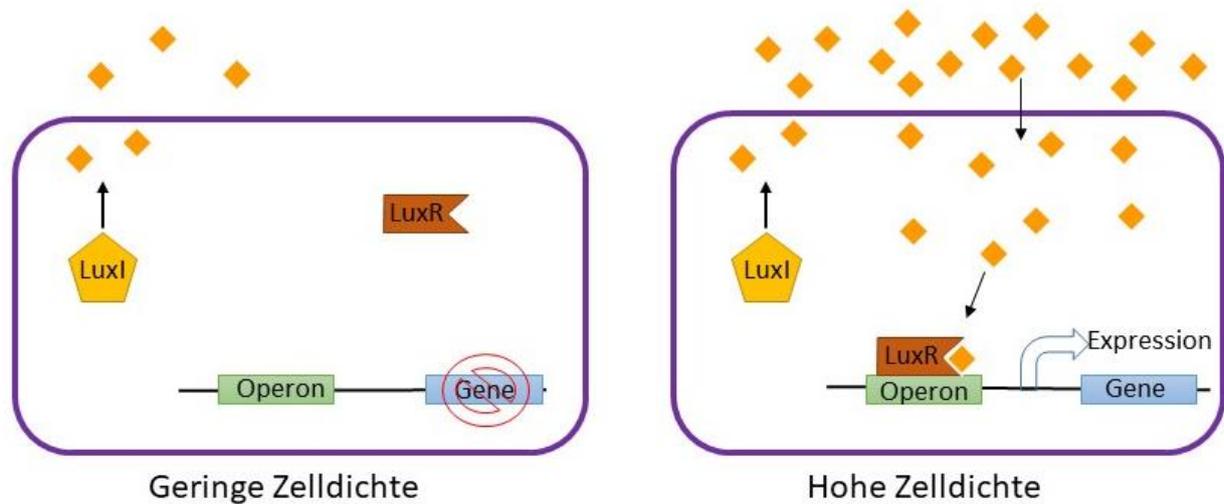


Abbildung 33: Schematische Darstellung des Quorum Sensing am Beispiel des LuxI/LuxR-Systems. Bei geringer Zelldichte werden zwar Autoinducermoleküle (orange Rauten) vom Protein LuxI produziert, ihre Konzentration ist aber zu gering, um einen Effekt hervorzurufen. Erst wenn die Konzentration von Autoinducern durch eine hohe Zelldichte über einen Schwellenwert ansteigt, bindet der Autoinducer an den LuxR-Regulator. Dieser Komplex kann dann an das spezifische Operon binden und die Genexpression initiieren.

5.3 Biofilme

Die Produktion von Biofilmen kann bei sehr vielen Bakterienarten beobachtet werden. Diese Biofilme bestehen aus ca. 10 % Bakterienzellen und aus 90 % von diesen Zellen produzierten, extrazellulären polymeren Substanzen (EPS). Zu diesen EPS gehören verschiedenen Polysaccharide, Proteine, Nukleinsäuren und Lipide, welche ein dreidimensionales Netzwerk bilden und sich an Oberflächen anheften können. In diesem Netzwerk werden die Bakterienzellen immobilisiert, wodurch eine höhere Zelldichte entsteht, welche gute Interaktionen zwischen den Zellen ermöglicht. Durch Tunnel innerhalb des EPS ist ein Stoffaustausch mit der Umgebung möglich, sodass Nährstoffe von außen aufgenommen und Abfallprodukte abgegeben werden können. Alle Komponenten von lysierten Zellen, wie DNA, bleiben im Biofilm vorhanden und können recycelt werden. Dadurch kann auch horizontaler Gentransfer stattfinden. Die Matrix schützt zudem die Bakterienzellen vor äußeren schädlichen Einflüssen, wie Antibiotika und dem Immunsystem des Wirts (Flemming and Wingender 2010). Die Biofilme können auch sekundär von anderen, teilweise schädlicheren

Bakterien besiedelt werden (Schauder and Bassler 2001). Der Aufbau eines Biofilms erfolgt in unterschiedlichen Stadien (Abb. 34). Zunächst heften sich einzelne Bakterien an einer Oberfläche adhäsiv an. Wenn eine bestimmte Zelldichte erreicht wird, wird ein alternatives Expressionsmuster aktiviert, welches zur Ausbildung einer Biofilmmatrix und der Immobilisierung der Bakterienzellen führt. In diesem Biofilm wächst die Zellpopulation weiter an. Außerdem können sich weitere Bakterienarten ansiedeln. Der Biofilm reift heran und bildet dabei turmartige Auswüchse. Schließlich lösen sich einige wieder mobilisierte Bakterien aus dem Biofilm und können neue Oberflächen besiedeln (Petrova and Sauer 2016, Hall and Mah 2017).

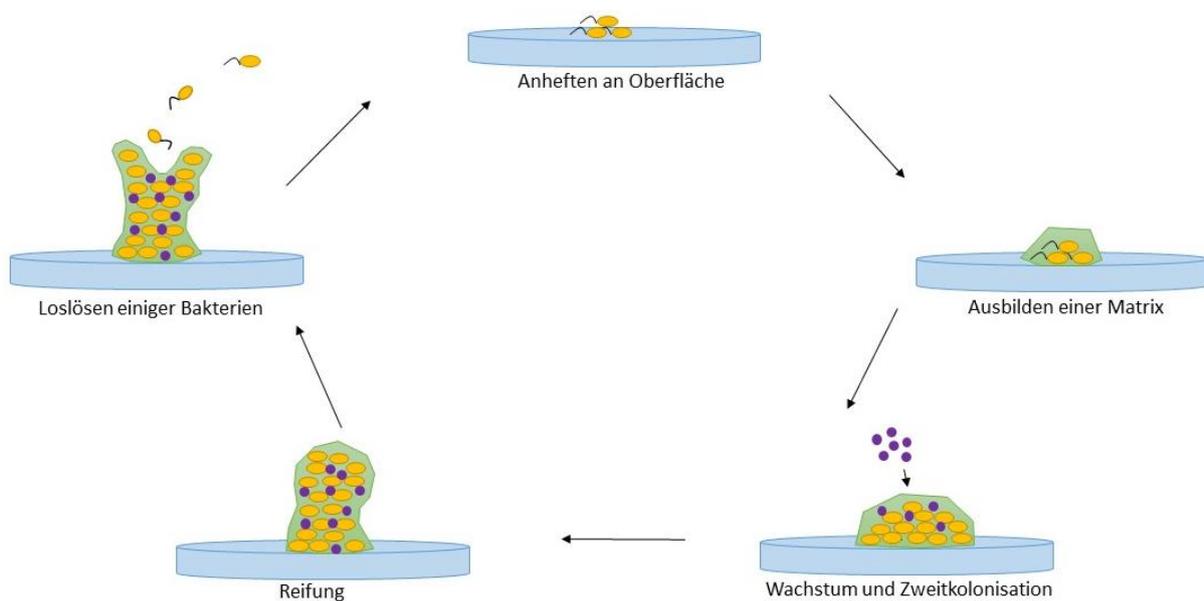


Abbildung 34: Bildung eines Biofilms auf einer Oberfläche. Die Bakterienzellen heften sich an einer Oberfläche an und bilden eine Matrix um sich aus. Dieser Biofilm kann auch von anderen Bakterienarten kolonisiert werden. Nach der Reifung lösen sich einige Bakterien aus dem Biofilm, um neue Oberflächen zu besiedeln.

5.4 Quorum Quenching

Seit der Entdeckung des Penicillins 1928 von Alexander Fleming (Fleming 1929) wurden viele Antibiotika entwickelt, die gegen akute Infektionen eingesetzt werden konnten. Diese Antibiotika greifen zumeist in das Wachstum der Bakterien ein oder töten diese ab (siehe Abschnitt 1.2). Für die Bakterien bedeutet dies einen hohen Selektionsdruck, welcher die Entstehung von Resistenzen begünstigt (Abschnitt 1.3). Bei der Unterdrückung des Quorum Sensings wird nur die Virulenz der Bakterien abgeschwächt, während ihr Wachstum nicht

eingeschränkt wird (Kalia and Purohit 2011). Somit sind sie einem deutlich geringerem Selektionsdruck ausgesetzt, was die Entwicklung von Resistenzmechanismen unwahrscheinlicher macht. Die nicht virulenten Bakterien können vom Immunsystem des Wirtes eliminiert werden (Hentzer and Givskov 2003). Eukariotische Zellen sind zwar teilweise in der Lage bakterielle Quorum Sensing Signale wahrzunehmen, verwenden diese aber nicht selbst zur Zell-Zell Kommunikation. Folglich hätte eine Inhibierung dieser Signale keine negativen Auswirkungen auf eukariotische Zellen.

Es gibt verschiedene Mechanismen des Quorum Quenchings. Bei einer geringen Zellpopulation kann die Fettsäuresynthese blockiert werden, welche auch Vorstufen für AHLs generiert. Dabei bieten sich besonders die Enoyl-ACP Reduktase und ihr Substrat S-Adenosyl-Methionin an. Eine weitere Möglichkeit besteht darin, die Bindung der AHLs an die Rezeptoren durch kompetitive Antagonisten zu verhindern, welche selbst an die Rezeptoren binden und diese dadurch inaktivieren. Häufig werden die AHLs durch Enzyme abgebaut. Hierbei spielen verschiedene Enzymklassen eine Rolle: Acylasen, Lactonasen, Paraoxonasen und Oxidoreduktasen (Abb. 35). Deaminasen und Decarboxylasen sind auch in der Lage AHLs abzubauen, spielen aber beim Quorum Quenching eine eher geringe Rolle.

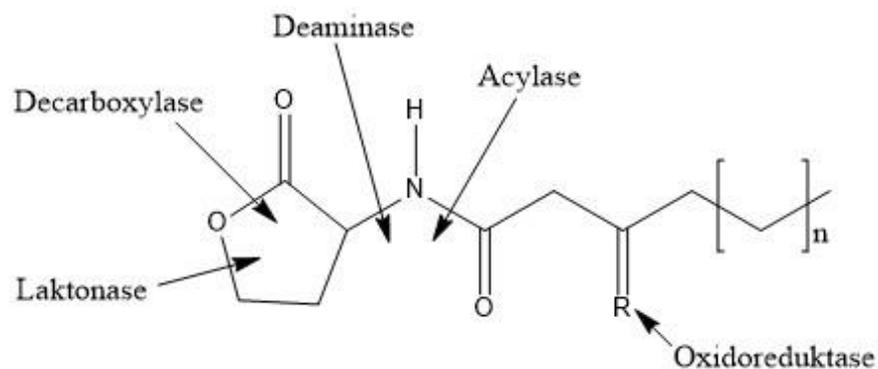


Abbildung 35: Übersicht der Angriffspunkte verschiedener Enzymklassen auf N-Acylhomoserinlactone

Acylasen spalten die Amidbindung des Homoserinlactons, während Lactonasen und Paraoxonasen den Lactonring hydrolysieren. Oxidoreduktasen oxidieren oder reduzieren den Rest am C3 Kohlenstoff unter Verbrauch von NADPH (Abb. 36) (Kalia and Purohit 2011).

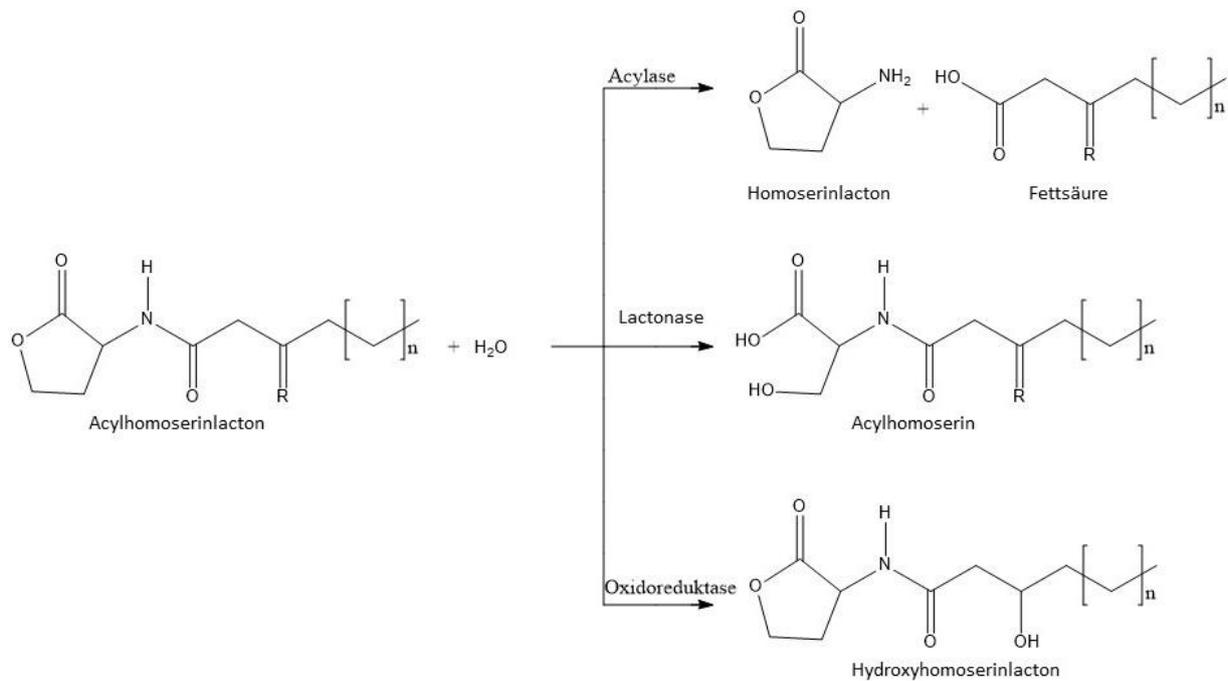


Abbildung 36: Mechanismen des Abbaus von Quorum Sensing Signalen durch unterschiedliche Enzyme. Acylasen hydrolysieren die Amidbindung. Lactonasen und Paraoxidasen öffnen den Lactonring, während Oxidoreduktasen den C3-Kohlenstoff reduzieren.

5.5 GqqA

GqqA ist eine Quorum Quenching Acylase, die 2015 in *Komagataeibacter europaeus* entdeckt wurde (Valera, Mas et al. 2016). GqqA besitzt keinerlei konservierte Domänen, wie sie bei anderen Quorum Quenching Enzymen auftreten und hat nur sehr geringe Sequenzhomologien zu diesen. Zunächst wurde GqqA aufgrund seiner Homologie den Prephenatdehydratasen zugeordnet, allerdings zeigte es keine Prephenatdehydrataseaktivität. Wie bei den Prephenatdehydratasen wurden bei GqqA am N-Terminus eine periplasmatisch bindende Proteindomäne (PBPD) der Typ 2 Superfamilie und am C-Terminus eine ACT-Domäne identifiziert. Die ACT-Domäne wurde nach drei allosterisch regulierten Enzymen benannt, welche diese Domäne besitzen; die Aspartatkinase, Chorismatmutase und TyrA (Prephenatdehydrogenase). Die ACT-Domäne ist eine regulatorische Domäne, die kleine allosterische Effektoren wie Aminosäuren bindet (Chipman 2001). Die PBPD ist die katalytische Domäne des Proteins, in der Substrate umgesetzt werden. GqqA hat einen starken Einfluss auf die Bildung von Cellulose-Biofilmen (Valera, Mas et al. 2016). Diese sind in der Essigherstellung nicht gewünscht, sodass der Einsatz von Quorum Quenching Enzymen wie GqqA biotechnologisch interessant ist.

GqqA bildet eine eigene phylogenetische Gruppe unter den Quorum Quenching Enzymen, alle anderen weisen sehr unterschiedliche Aminosäuresequenzen auf (Abb. 37).

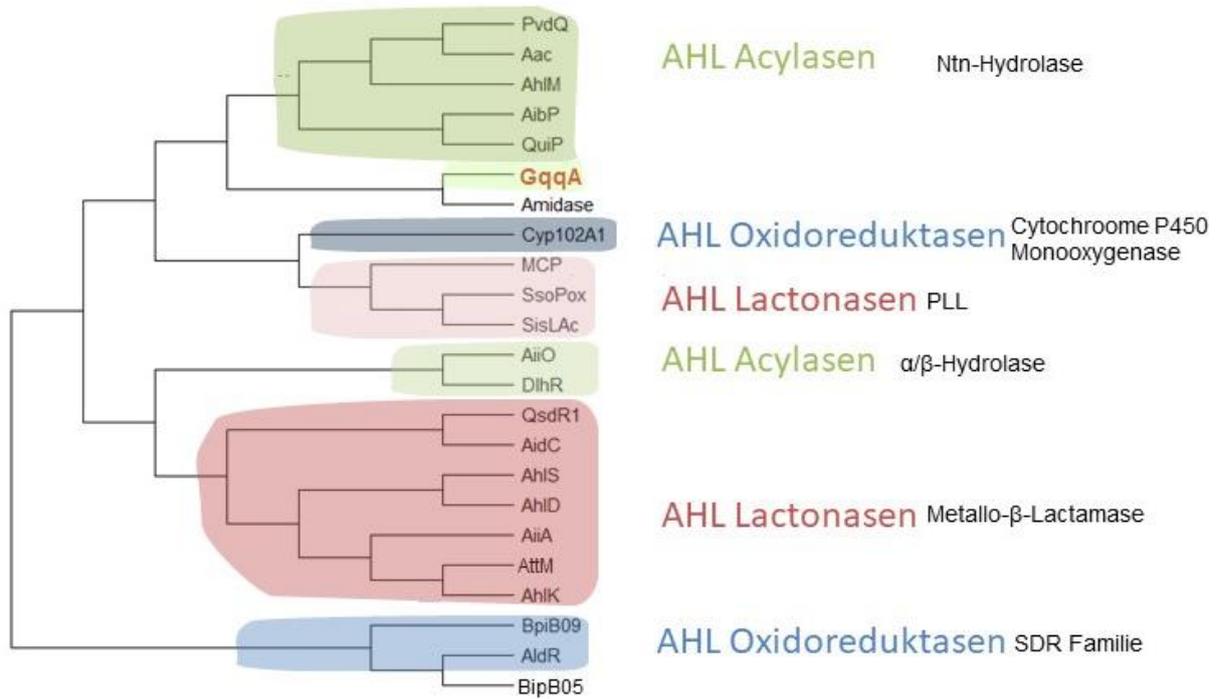


Abbildung 37: Phylogenetischer Baum verschiedener Quorum Quenching Enzyme. GqqA bildet eine eigene phylogenetische Gruppe innerhalb der bisher untersuchten Quorum Quenching Enzyme. Die NTN-Hydrolasen, welche zu den AHL Acylasen gehören besitzen einen hohen Verwandtschaftsgrad zu GqqA. (Abbildung erstellt von Katrin Petersen, bearbeitet).

5.6 Zielsetzung

Die Bildung von Biofilmen stellt nicht nur die Medizin, sondern auch andere Bereiche wie beispielsweise die Schifffahrt und Nahrungsmittelindustrie vor viele Herausforderungen. Verantwortlich für diese Biofilme sind Bakterien, die ihre Genexpression mittels Quorum Sensing abstimmen, um dann Biofilme zu synthetisieren. Erst wenn ein Schwellenwert an Signalmolekülen überschritten wird, der meist mit einer hohen Bakteriendichte korreliert, kommt es zu einer Änderung des Expressionsmusters.

Ein neuer Ansatz, um das Quorum Sensing zur Biofilmbildung zu unterbinden ist das Quorum Quenching. Die dazu beitragenden Enzyme blockieren entweder den Signalweg oder bauen die Signalmoleküle ab. Allerdings ist das Wissen zum Mechanismus des Quorum Quenchings bisher sehr begrenzt und bislang sind nur wenige involvierte Proteinstrukturen bekannt.

Ziel dieser Arbeit war die biochemische Charakterisierung und Strukturaufklärung einer neuen Acylase, die nur wenig Ähnlichkeit zu anderen bisher bekannten Quorum Quenching Enzymen aufweist. Zunächst sollte das Protein in Lösung mit verschiedenen Methoden, wie CD-Spektroskopie, DLS und SAXS charakterisiert werden. Anschließend sollte GqqA kristallisiert und am Synchrotron gemessen werden. Zudem sollte eine Möglichkeit gefunden werden das Phasenproblem zu lösen, um die Struktur zu erhalten. Des Weiteren sollte diese Acylase im Komplex mit ihrem Substrat untersucht werden.

6 MATERIAL UND METHODEN

In diesem Abschnitt werden nur für GqqA spezifische Materialien und Methoden aufgeführt. Die allgemeinen Methoden, z.B. die Expression in Vollmedium oder die Analyse über die dynamische Lichtstreuung wurden bereits in Kapitel 2 beschrieben und werden hier daher nicht wiederholt.

6.1 Material

6.1.1 Medien, Puffer und Lösungen

Tabelle 15: verwendete Medien und Puffer für GqqA

Puffer	Substanz	Zusammensetzung
5x M9 Salze (1 L)	Na ₂ HPO ₄ · 7H ₂ O	64 g
	KH ₂ PO ₄	15 g
	NaCl	2,5 g
	NH ₄ Cl	5 g
Minimalmedium (1 L)	5x M9 Salze	200 mL
	20 % Glucose in H ₂ O	25 mL
	1M MgSO ₄	2 mL
	1M CaCl ₂	100 µL
	10 g/L Thiamin	200 µL
	10 g/L Biotin	200 µL
Lysispuffer	NaH ₂ PO ₄	50 mM
	NaCl	300 mM
	Imidazol	10 mM
Waschpuffer	NaH ₂ PO ₄	50 mM
	NaCl	300 mM
	Imidazol	20 mM
Elutionspuffer	NaH ₂ PO ₄	50 mM
	NaCl	300 mM
	Imidazol	250 mM
SEC Puffer (pH5)	KH ₂ PO ₄	100 mM
	NaCl	150 mM

Tabelle 16 verwendete Puffer für Pufferoptimierung (jeweils 100 mM)

Puffer	pH
Kaliumphosphat	5,0; 6,0; 7,0
Natriumcitrat	4,5; 5,5
Bis-Tris-Propan	6,5
HEPES	7,0; 7,5; 8,0
Natriumacetat	4,5; 5,0
Ammoniumacetat	7,3
Imidazol	8,0
Bicine	8,5; 9,0
MES	5,8; 6,2; 6,5
TRIS	7,5; 8,0; 8,5

6.1.2 Proteinsequenz

GqqA

MNGERIIAFQGRPGAYSIDLACRQARPGWTLPCQTFAQTIAAVHDGRAELAMLACENSLAGRVPDIHAL
 LPEAGLFIVGEHFQRVEHCLLGIPGSTLADARRIHTHPVAMAQVRGIITELGLDPVVEFDTAGAAEMVRE
 WGRKEDVAVASALAAELNGLEILRRNVEDATHNTTRFYIASRRPATLPPPGPGFMTLLFRVNNQPGALY
 KALGGLATAGVNMTRLESYMLEGSFSATQFLMDVEGHPEAPPLARALDELSFFSEQQEILGVYPASPFRR
 KP

6.1.3 Vektoren

Tabelle 17 Verwendeter Vektor für GqqA

Bezeichnung	Merkmale	Hersteller
pET21a	T7-Promoter, Amp-Resistenz, N-term. (His) ₆ -tag	Invitrogen

6.2 Methoden

6.2.1 Molekularbiologische Methoden

6.2.1.1 Rekombinante Genexpression in M9 Minimalmedium

Zunächst wurden Vorkulturen in LB Medium steril angesetzt. Dafür wurden 100 mL Medium mit 100 μ L Amp100 und 5 mL 20 %iger Glucose versetzt und anschließend mit Zellen aus einem Glycerolstock angeimpft. Die Vorkulturen wurden über Nacht bei 37 °C und 220 rpm im Schüttelinkubator inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Vorkulturen 20 min bei 4 °C und 17.000 \times g zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Zellpellet wurde in 5 mL M9 Minimalmedium resuspendiert. In 5 L fassende Schikanekolben wurden jeweils 500 mL M9 Medium gegeben und mit je 500 μ L Amp100 versetzt. Dann wurde mit jeweils 1,25 mL des resuspendierten Pellets angeimpft. Die Zellkulturen wurden bei 37 °C und einer Drehzahl von 160 rpm im Schüttelinkubator inkubiert, bis eine OD₆₀₀ von 0,8 erreicht wurde. Anschließend wurden zur Repression der Methioninsynthese je 5 mL der Aminosäurelösung (Tabelle 18) in jeden Kolben gegeben.

Tabelle 18 Einwaage der Aminosäurestammlösung. Die Aminosäuren wurden in 20 mL H₂O gelöst.

Einwaage	Aminosäure
200 mg	L-Lysin
200 mg	L-Phenylalanin
200 mg	L-Threonin
200 mg	D, L-Isoleucin
100 mg	L-Leucin
200 mg	D, L-Valin

Zusätzlich wurden jeweils 20 mL der Selenomethionin-Stammlösung (1 g/L) pro Kolben hinzugefügt. Nach 15 min erfolgte die Induktion der Proteinexpression durch Zugabe von je 500 μ L 1M IPTG. Nach 3 h wurden die Zellen 30 min bei 4.000 \times g und 4 °C abzentrifugiert und das Pellet bei -20 °C eingefroren. Diese Proteinvariante wird folgend als SeGqqA bezeichnet.

6.2.1.2 Konzentrationsbestimmung

Die Konzentrationsbestimmung erfolgte wie in Kapitel 3.2.2.6 beschrieben. Das Molekulargewicht von GqqA liegt bei 30,51 kDa und der Extinktionskoeffizient bei $18.700 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

6.2.2 Proteinbiochemische Methoden

6.2.2.1 Zellaufschluss

Die Zellpellets wurden bei Raumtemperatur aufgetaut und mit 10 mL Lysispuffer resuspendiert. Anschließend wurde die auf Eis gelagerte Zellsuspension mit einem Sonifikator zehnmal für 30 s mit Ultraschall behandelt. Es folgte die Abtrennung der unlöslichen Bestandteile durch Zentrifugation für 30 min bei 4 °C und $17000 \times g$. Der Überstand mit den löslichen Proteinen wurde weiterverwendet.

6.2.2.2 Reinigung mittels Affinitätschromatografie

Das Zielprotein besitzt einen N-terminalen His₆-Tag, welcher mit hoher Affinität an Nickel bindet. Diesen Umstand nutzt man für eine Affinitätschromatografie mit einer Ni-NTA-Matrix in einem Glaskörper. Zunächst wurde die Matrix mit 5 Säulenvolumen (CV) Lysispuffer equilibriert und anschließend der Überstand des Zellaufschlusses aufgetragen. Nach einer Inkubation von 1 h bei 4 °C auf einem Rollschüttler wurde die Säule vertikal aufgehängt und der Durchfluss gesammelt. Die Matrix wurde mit 5 CV Waschpuffer gewaschen und das Protein mit 5 CV Elutionspuffer eluiert. Anschließend wurde das Volumen des Eluats auf 1 mL eingeeengt.

6.2.2.3 Größenausschlusschromatografie (SEC)

Die Größenausschlusschromatografie ermöglicht es Proteine nach ihrer Größe aufzutrennen. Große Proteine eluieren früher als kleine Proteine, weil diese in die Poren der Matrix eindringen und dadurch langsamer durch die Säule wandern. Es wurde eine *Superose 6 Increase 10/300 GL* Säule (GE Healthcare, USA) am *Äkta purifier* FPLC System (GE Healthcare, USA) verwendet. Die Säule wurde zunächst mit 1 CV Wasser gespült und mit 1 CV SEC-Puffer equilibriert. Die Injektion der Probe erfolgte mittels einer 1 mL Probenschleife. Nach der Injektion wurde mit 1,1 CV und einer Fließgeschwindigkeit von 700 $\mu\text{L}/\text{min}$ eluiert. Währenddessen wurde die UV-Absorption bei 280 nm und 254 nm aufgezeichnet. Das Eluat wurde in Fraktionen von 0,5 mL fraktioniert und die Fraktionen mit einem signifikanten UV-Signal mittels SDS-PAGE analysiert.

6.2.3 Biophysikalische Methoden

6.2.3.1 Röntgenkleinwinkelbeugung (SAXS)

Die Röntgenkleinwinkelbeugung (SAXS) wird verwendet, um Informationen über ein Protein in Lösung zu erhalten, z.B. über dessen Partikelgröße, seine Form oder den oligomeren Zustand. Dafür wird Röntgenstrahlung verwendet und die Streuung in den Winkeln von $0,1^\circ$ - 10° aufgenommen. Zunächst wurde die gereinigte Proteinlösung 30-60 min bei $16000 \times g$ und 4°C zentrifugiert und mit DLS, wie in Kapitel 3.2.3.2 beschrieben, analysiert, um die Monodispersität der Probe zu überprüfen. Es wurden immer mindestens drei verschiedene Proteinkonzentrationen gemessen. Die Messungen wurden an der P12 EMBL-Beamline des Speicherringes Petra III (DESY, Hamburg) durchgeführt. Das Probenvolumen von 20 μL wurde in einer Quartzkapillare mit einem monochromatischen Röntgenstrahl der Wellenlänge 1,24 Å bestrahlt und die Streuung am 3 m entfernten Detektor aufgezeichnet. Jeweils vor und nach jeder Messung wurde der Probenpuffer gemessen, um eine entsprechende Hintergrundkorrektur durchzuführen. Dafür wurde durch die an der Beamline integrierte Software das Puffersignal von dem Probensignal subtrahiert (Kikhney and Svergun 2015).

Die Datenprozessierung erfolgte mit den Programmen PRIMUS (Konarev, Volkov et al. 2003) und GNOM (Svergun 1992) des ATSAS Programmpaketes (Franke, Petoukhov et al. 2017). Mit diesen Programmen konnten der Guinier- und Kratky-Plot sowie die Abstandsverteilungsfunktion bestimmt werden, aus denen der Gyrationradius R_g und der maximale Partikelabstand D_{max} abgeleitet werden konnten. Anschließend wurden mit dem Programm DAMMIF (Franke and Svergun 2009) des ATSAS Online Servers *ab initio* Modelle berechnet.

6.2.4 Proteinkristallisation

6.2.4.1 Kristallisationsscreening

Für ein Hochdurchsatzscreening unterschiedlicher Kristallisationsbedingungen wurden kommerziell erhältliche Screens verwendet. Die Kristallisation erfolgte mithilfe des *Honeybee 961* Kristallisationsroboters (Genomic Solutions, USA) in MRC2 Platten nach dem *Sitting-drop* Verfahren. Es wurden 50 μ L Reservoirolösung vorgelegt und 0,5 μ L davon mit der gleichen Proteinmenge gemischt. Die Platte wurde mit einer Folie versiegelt und bei Raumtemperatur gelagert. Folgende Screens wurden verwendet: JCSG-plus, PACT premier von Molecular Dimensions, UK und CompPAS Suite von Quiagen, Deutschland.

6.2.4.2 Optimierung der Kristallisationsbedingung

Beim Screening von GqqA konnte nur eine Bedingung (0,8 M Natriumsuccinat pH 7) gefunden werden, bei der Proteinkristalle entstanden. Diese waren aber leider stark verwachsen, sodass die Kristallisationsbedingung weiter optimiert werden musste. Hierzu wurde das *Hanging-drop* Verfahren in Linbro Platten verwendet. 2 μ L Proteinlösung (10 mg/ml) wurden auf einem Deckgläschen mit 2 μ L Präzipitat gemischt und über ein mit 500 μ L Präzipitat gefüllten und mit Silikon abgedichteten Well platziert. Um die Kristallqualität zu verbessern wurden die Konzentration und der pH-Wert des Puffers variiert, sowie verschiedene Zusätze getestet. Außerdem wurde ein Seedstock hergestellt und mittels eines Haares Kristallisationskeime in die Tropfen überführt (siehe Kapitel 3.2.4.1). Eine weitere Kristallisationsbedingung (10 % PEG3350) lieferte zumeist nadelförmige Kristalle. Der für die Lösung des Phasenproblems verwendete SeGqqA-Kristall wuchs allerdings auch in dieser Bedingung.

6.2.5 Röntgenstrukturanalyse

6.2.5.1 *Diffractionsdatensammlung*

Zunächst wurden die Kristalle mit einer Nylonschleife entsprechender Größe aufgenommen, in eine Cryolösung, die aus der Präzipitatlösung mit 30 % PEG1500 bestand, getaucht und in Flüssigstickstoff eingefroren. Die Diffractionsdaten wurden an der Beamline P11 (Meents, Reime et al. 2013), an PETRAIII am DESY, Hamburg gesammelt. Der Kristall wurde auf ein Goniometer gesetzt und mit siedendem Stickstoff auf 100 K gekühlt. Die Datensammlung erfolgte mit der Rotationsmethode. Es wurde mit einem Röntgenstrahlfokus von 100 μm und eine Wellenlänge von 1,0332 Å bzw. 0,9801 Å (Selen-Absorptionskante) gemessen. Es wurde ein Pilatus 6M Fast Detektor verwendet. Die Diffractionsdaten wurden mit dem Programm XDS (Kabsch 2010) prozessiert.

6.2.5.2 *Strukturbestimmung*

Zunächst wurde versucht, das Phasenproblem mittels Molekularem Ersatz und Nutzung der nächst homologen Struktur (PDB Code 2QMX, 33,7 % Sequenzidentität) zu lösen, was leider jedoch nicht möglich war. Aus diesem Grund wurde ein Selenomethionin-substituiertes Protein kristallisiert und die Diffraction an der Selen-Absorptionskante gemessen. Dadurch konnte ein anomales Signal erhalten und die Struktur mittels SAD mit dem Online Server Autorickshaw (Panjikar, Parthasarathy et al. 2005) gelöst werden. Mit der SeGqqA-Struktur konnten dann weitere vorhandene Datensätze mittels Molekularem Ersatz mit den Programmen Molrep (Vagin and Teplyakov 1997) bzw. Phaser (McCoy, Grosse-Kunstleve et al. 2007) gelöst werden. Die Aminosäuren der noch fehlenden Domäne wurden manuell mit dem Programm Coot (Emsley and Cowtan 2004) in die Elektronendichte eingebaut. Die Strukturen wurden folgend mit den Programmen Refmac5 (Murshudov, Vagin et al. 1997) bzw. PhenixRefine (Afonine, Grosse-Kunstleve et al. 2012) verfeinert.

6.2.6 Docking

Für die Vorhersage des aktiven Zentrums wurde die Onlineplattform Swissdock (Grosdidier, Zoete et al. 2011, Grosdidier, Zoete et al. 2011) verwendet. Für die Dockingexperimente mit dem Substrat wurde das Programm Flexidock, welches zum Programmpaket Sybyl-X (Tripos, USA) gehört, verwendet. Zur Vorbereitung wurde aus dem GqqA-Strukturmodell nur das Polypeptid benutzt und der Ligand mit dem Programm JLigand (Lebedev, Young et al. 2012) aus dem CCP4-Paket (Winn, Ballard et al. 2011) erstellt. Sowohl zum Protein als auch zum Liganden wurden Wasserstoffatome hinzugefügt und Ladungen berechnet. Anschließend wurde der Ligand am Protein vorpositioniert. Über mehrere Zyklen wurde anschließend die freie Energie minimiert.

7 ERGEBNISSE UND DISKUSSION

7.1 Rekombinante Expression und Reinigung

Anfangs wurde das Protein gereinigt von K. Petersen für Kristallisationsexperimente zur Verfügung gestellt. Es zeigte sich aber, dass die eigene Produktion und Reinigung vorteilhafter waren. Zum einen war eine bessere und schnellere Verfügbarkeit gewährleistet, zum anderen konnte die Reinigung angepasst werden, um bessere Ergebnisse bei der Kristallisation zu erzielen. Dabei wurde zunächst das bereits vorhandene Expressions- und Reinigungsprotokoll befolgt (Valera, Mas et al. 2016).

Die Expression von GqqA erfolgte wie im Methodenteil beschrieben. In Abbildung 38 wird beispielhaft das Ergebnis einer SDS-PAGE-Analyse einer Expression zweier Kolben von GqqA in *E. coli* BL21 (DE3) -Zellen gezeigt. Das Molekulargewicht von GqqA beträgt 30,51 kDa.

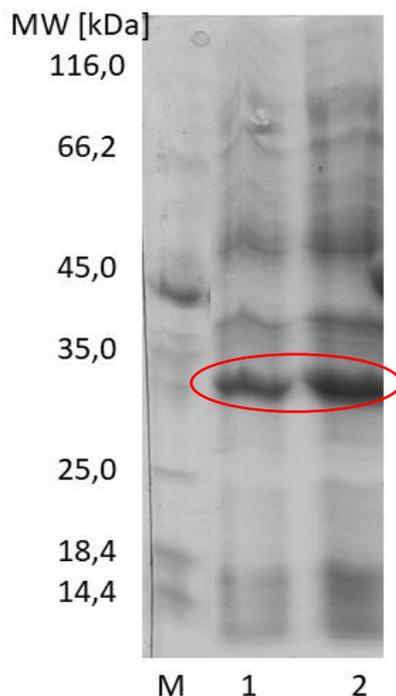


Abbildung 38: SDS-PAGE-Analyse, Expression von GqqA auf einem 12 %igen Polyacrylamidtrenngel. M: Proteingrößenstandard *Unstained Protein Molecular Weight Marker*, 1-2: Zellkulturen nach 3 h Expression. Die Banden des Zielproteins sind markiert. Nach dreistündiger Expression ist eine deutliche Bande bei etwa 30 kDa bei jeder Zellkultur sichtbar, welches dem Molekulargewicht des Zielproteins entspricht.

Die Reinigung erfolgte zunächst über eine Ni-NTA Affinitätsmatrix. GqqA besitzt einen N-terminalen His₆-Tag, der mit hoher Affinität an die Matrix bindet. Die hohe Imidazolkonzentration im Elutionspuffer verdrängt das Zielprotein wieder von der Matrix. Oft binden aber auch andere Proteine an die Matrix (Abb. 39), sodass ein weiterer Reinigungsschritt, oft eine Gelfiltration, zum etablierten Protokoll hinzugefügt wurde. Bei dieser Gelfiltration mit einer Superose6 Increase Säule bei Raumtemperatur zeigte sich, dass die Proteinlösung noch sehr viele unterschiedliche Proteine enthielt (Abb. 40 links). Zur Identifikation des Zielproteins wurden von den beiden höchsten Absorptionspeaks Proben für ein SDS-Gel entnommen (Abb. 40 rechts). Das Zielprotein GqqA eluierte während des höchsten Absorptionspeaks (Fraktionen C4-C7) und wies eine hohe Reinheit auf.

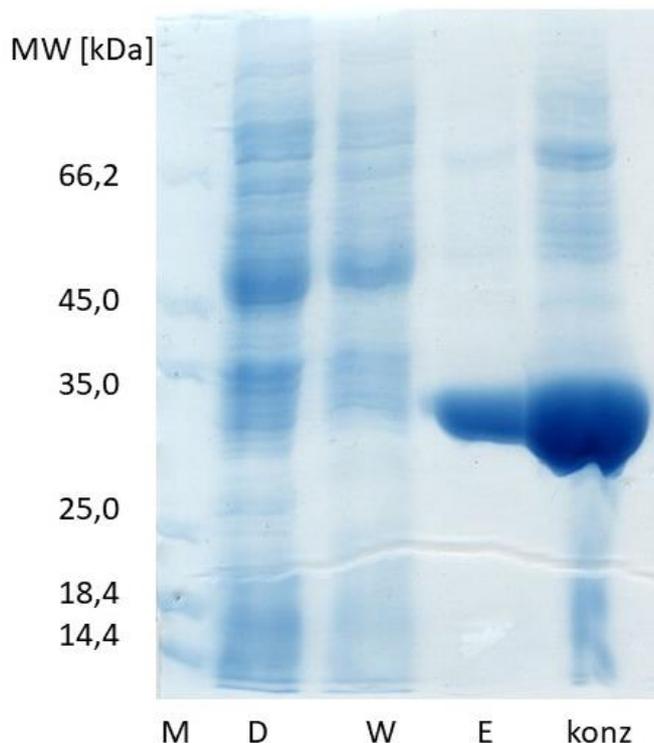


Abbildung 39: SDS-PAGE Analyse der Reinigung mittels Nickel-NTA Matrix. M: Proteingrößenstandard Unstained Protein Molecular Weight Marker, D: Durchfluss, W: Waschfraktion, E: Elution, konz: Konzentrat der Elution. Besonders im Konzentrat sind noch viele andere Proteinbanden neben der des Zielproteins zu sehen.

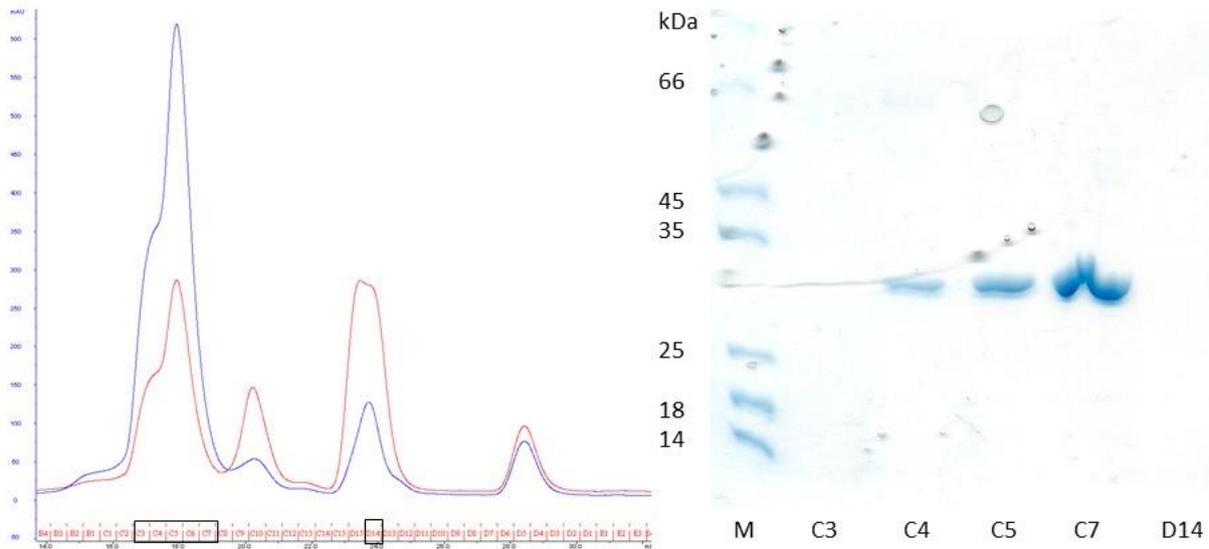


Abbildung 40: Gelfiltration von GqqA vor der Pufferoptimierung. Links: Elutionsprofil der Gelfiltration. Die Absorptionen (280 nm: blau, 254 nm: rot) zeigen deutlich, dass sich noch viele unterschiedliche Proteine in der Lösung befinden. Von den schwarz umrandeten Fraktionen wurde ein SDS-Gel angefertigt. Rechts: SDS-PAGE Analyse der Elutionsfraktionen der Gelfiltration. Mittels eines Größenstandards (M) konnte das Molekulargewicht der Proteinbanden bestimmt werden. Das Zielprotein GqqA befand sich in den Fraktionen C4-C7.

Während einer Langzeit-Messung der dynamischen Lichtstreuung zeigte sich jedoch, dass das Protein GqqA in diesem Puffer nicht stabil war und sich bereits nach wenigen Stunden Aggregate bildeten (Abb. 41). Folglich musste der Puffer optimiert werden, um eine bessere Stabilität des Proteins über einen längeren Zeitraum zu gewährleisten.

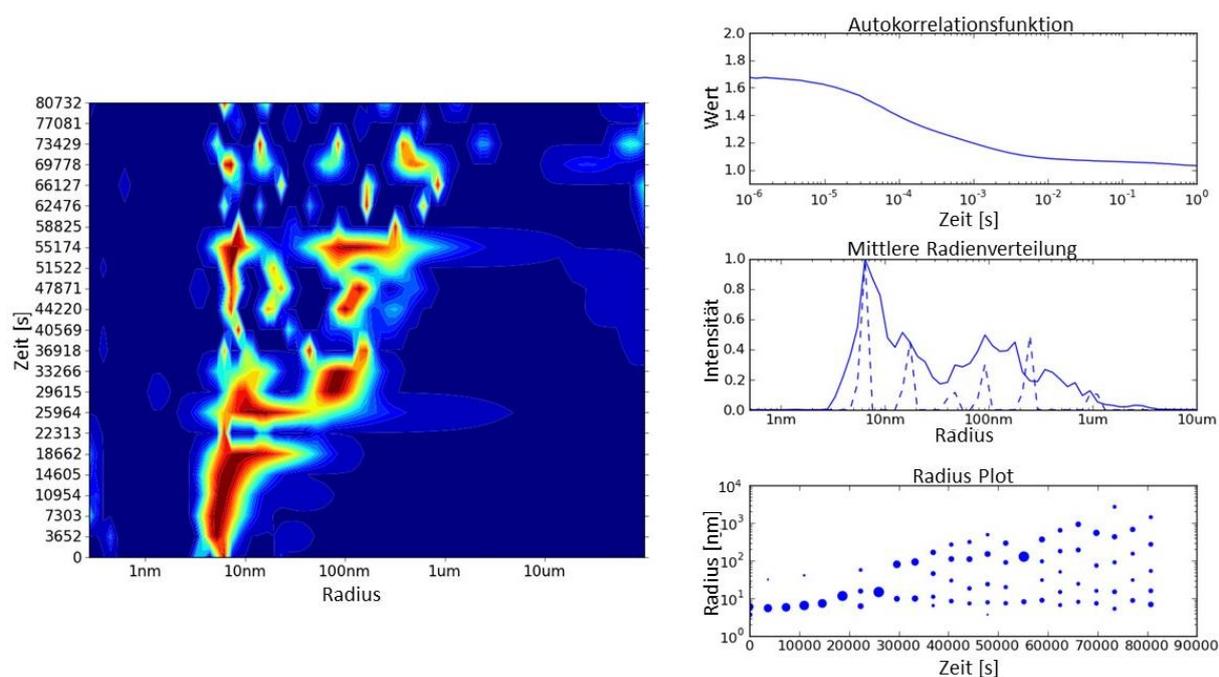


Abbildung 41: Ergebnisse der Langzeit-DLS-Messungen von GqqA vor der Pufferoptimierung. Links: Radienverteilung der DLS-Messungen, bei denen der Radius in Abhängigkeit von der Zeit dargestellt wird. Rechts: Darstellung der Autokorrelationsfunktion, der mittleren Radienverteilung und des Radiusplots. Die DLS-Messungen zeigen, dass das Protein polydispers vorliegt und die Reinigung optimiert werden muss.

7.2 Pufferoptimierung

Für die Pufferoptimierung wurde zunächst ein Screening verschiedener Puffer durchgeführt (Benvenuti and Mangani 2007). Von den im Methodenteil in Tabelle 16 beschriebenen Puffer wurden jeweils 500 μL der 22 Lösungen mit einer Konzentration von jeweils 0,1 M in einer Linbroplatte vorgelegt und 1 μL Proteinlösung (2 mg/mL) auf einem Deckgläschen mit 1 μL Reservoir gemischt und über das mit Silikon abgedichtete Well positioniert und bei Raumtemperatur belassen. Die Platte wurde in den nächsten drei Tagen auf Präzipitatbildung untersucht. Neun Tropfen blieben klar und die entsprechenden Pufferbedingungen wurden weiter untersucht. Hierfür wurden jeweils 50 μL Proteinlösung gegen 100 mL Puffer über Nacht bei 4 $^{\circ}\text{C}$ dialysiert. Nach 16 h wurden die dialysierten Proben über DLS analysiert (siehe Anhang A2). Die besten Ergebnisse wurden mit dem Puffer 0,1 M KH_2PO_4 pH 5 erhalten, welcher für die Größenausschlusschromatografie mit 150 mM NaCl versetzt wurde. Außerdem wurde die Reinigung über die Gelfiltrationssäule nun bei 4 $^{\circ}\text{C}$ durchgeführt. Das Protein war nach der Reinigung deutlich weniger verunreinigt (Abb. 42). Daraufhin konnte auch im Langzeit-DLS ein stabiles Signal erhalten werden (Abb. 43).

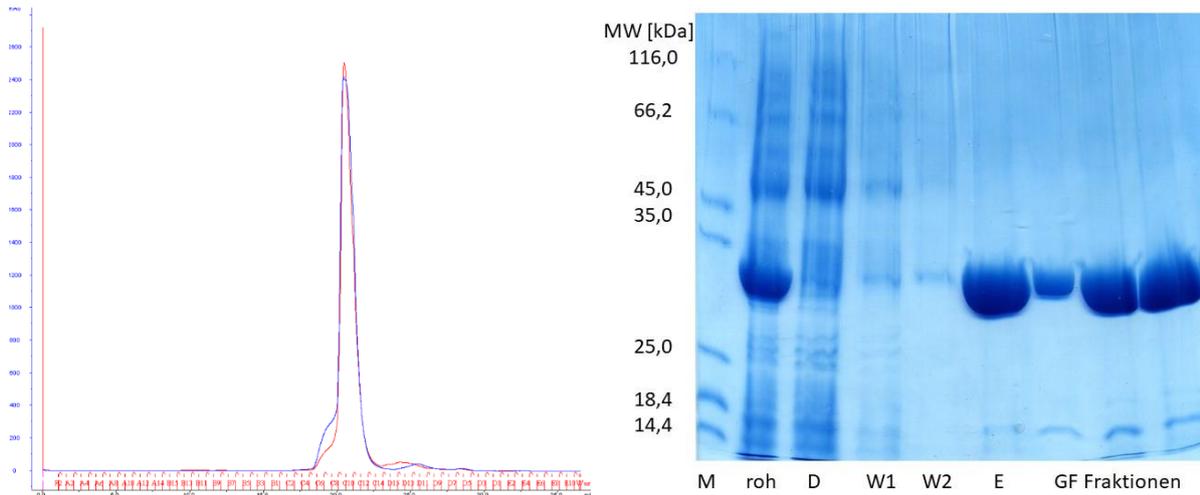


Abbildung 42: Optimierte Reinigung von GqqA. Links: Elutionsprofil der Gelfiltration nach der Pufferoptimierung. Die Absorption bei 280 nm ist blau dargestellt, die Absorption bei 254 nm rot. Nach der Ni-NTA Säule sind nur noch wenige Proteine in der Lösung, die gut voneinander getrennt werden können. Rechts: SDS-PAGE-Analyse, Reinigung von GqqA auf einem 12 %igen Polyacrylamidtrenngel. M: Proteingrößenstandard *Unstained Protein Molecular Weight Marker*, roh: Rohextrakt, D: Durchfluss, W1 und W2: Waschfraktionen, E: Elution, GF Fraktionen: Fraktionen nach der Gelfiltration. Während anfangs noch viele Fremdproteine in der Lösung sind, ist das Protein nach der Ni-NTA Säule bereits relativ sauber. Nach der folgenden Gelfiltration bleibt eine deutliche Bande bei etwa 30 kDa, was dem Molekulargewicht des Zielproteins entspricht.

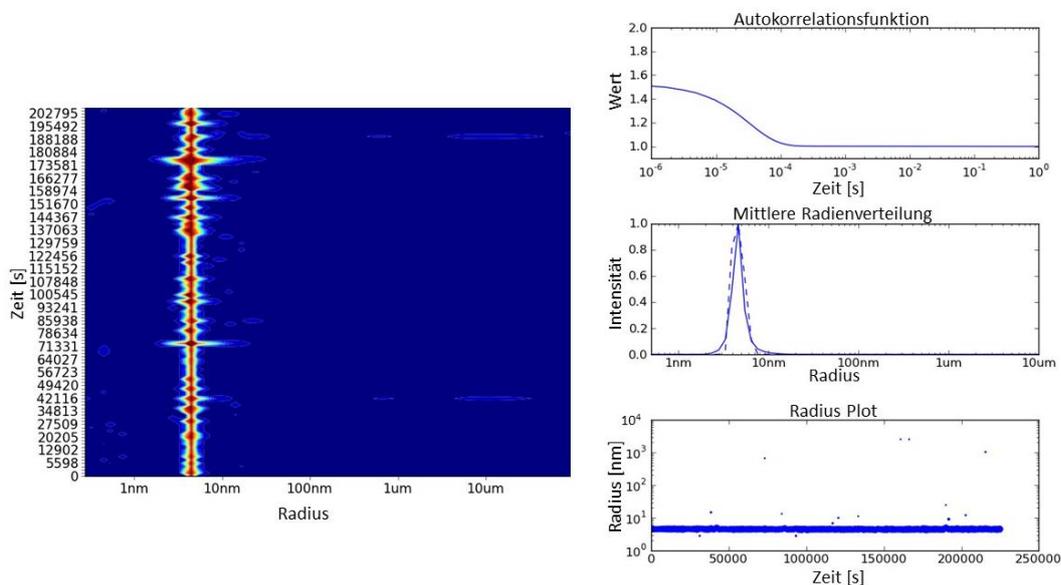


Abbildung 43: Ergebnisse der Langzeit-DLS-Messungen von GqqA nach der Pufferoptimierung. Links: Radienverteilung der DLS-Messungen, bei denen der Radius in Abhängigkeit von der Zeit dargestellt wird. Rechts: Darstellung der Autokorrelationsfunktion, der mittleren Radienverteilung und des Radiusplots. Die DLS-Messungen zeigen, dass das Protein über einen Zeitraum von vier Tagen monodispers vorliegt. Der hydrodynamische Radius von 4,5 nm deutet darauf hin, dass das Protein als Dimer in Lösung vorliegt.

7.3 Charakterisierung

Außer den Messungen der dynamischen Lichtstreuung wurden auch CD-spektroskopische Messungen durchgeführt (Abb. 44). Durch die Messung konnte nachgewiesen werden, dass das Protein gefaltet vorliegt. Die Vorhersage der Sekundärstruktur erfolgte nach dem CDSSTR Algorithmus des Dichroweb-Servers (Sreerama and Woody 2000) und ergab einen α -helikalen Anteil von 14 %, 36 % β -Faltblattstruktur und 50 % ungeordnete Teilstrukturen mit einem RMSD-Wert von 0,5 %.

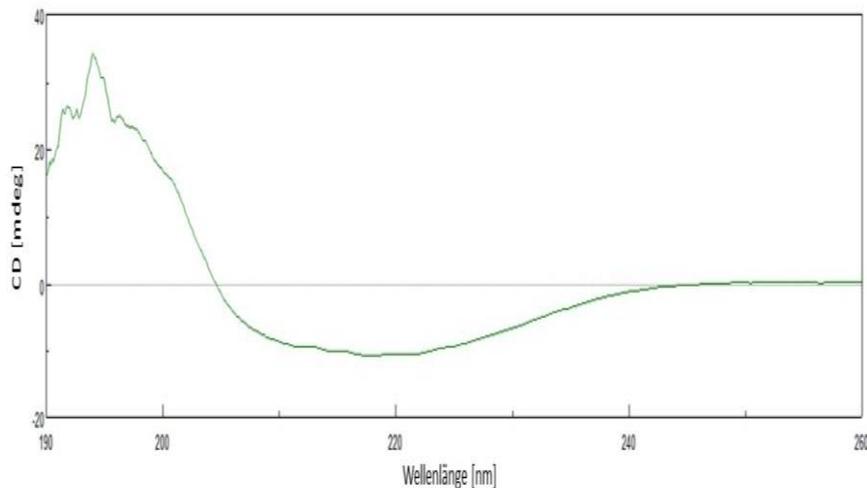


Abbildung 44: Messung des Circular Dichroismus von GqqA. Die CD-Messung zeigt, dass das Protein GqqA eine definierte Sekundärstruktur besitzt. Mit dem CDSSTR Algorithmus wurden 14 % α -helikale und 36 % β -Faltblattstruktur berechnet.

Die Röntgenkleinwinkelbeugung (SAXS) liefert Daten über die Größe, Masse und räumliche Struktur eines Biomoleküls in Lösung. Ergebnisse zu SAXS Messungen und Auswertungen für GqqA sind in Tabelle 18 zusammengefasst. Das daraus berechnete Molekulargewicht deutet ebenso wie DLS-Messungen darauf hin, dass GqqA in Lösung als Dimer vorliegt.

Die Analysen zweier zu GqqA homologer Prephenatdehydratasen (PDTs) (Tan 2008) zeigten für eine PDT eine sogenannte geschlossene Konformation (PDB code: 2qmx) und für eine weitere PDT eine offene Konformation (2qmw). Dabei wird die offene und geschlossene Konformation wie folgt erklärt, PDTs bestehen aus einer katalytischen periplasmatisch bindenden Proteindomäne (PBPD) und einer regulatorischen ACT Domäne, welche Aminosäuren wie Phenylalanin binden kann. Diese Bindung führt zur Feedbackinhibierung der PBPD, wodurch das Proteindimer von der offenen in die geschlossene Konformation übergeht

(Pohnert, Zhang et al. 1999). Die Bindung von Substraten ist in der offenen Form offensichtlich vereinfacht, aber wahrscheinlich auch noch in der geschlossenen Konformation möglich (Tan, Li et al. 2008).

Aus den bei unterschiedlichen Messungen aufgenommenen Daten (Tab. 19) konnten mit dem Programm DAMMIF zwei Modelle von GqqA erstellt werden, welche sowohl eine geschlossene Konformation als auch eine offene Konformation darstellen (Abb. 45).

Die Ergebnisse der biophysikalischen Untersuchungen von GqqA in Lösung zeigen, dass das Protein monodispers vorlag und dabei einen gefalteten und dimeren Zustand aufweist. Somit sind die Voraussetzungen für weitere strukturelle Untersuchungen gegeben.

Tabelle 19: Parameter der SAXS-Messung

Parameter der Datensammlung	Offene Konformation	Geschlossene Konformation
Ort der Datensammlung	EMBL Beamline P12, PETRA III, DESY, Hamburg	
Wellenlänge (Å)	1,24403	1,24403
Bereich von s (nm^{-1})	0,03 - 5	0,03 - 5
Expositionszeit (s)/ Expositionsperiode (s)	0,045/ 0,05	0,045/ 0,05
Detektorabstand (m)	3,0	3,0
Konzentrationsbereich der Probe (mg ml^{-1})	6,3-12,0	0,9 – 4,2
Temperatur (K)	293	293
Strukturelle Parameter		
R_g (nm), berechnet aus Guinier Näherung	3,36	2,69
D_{max} (nm), berechnet aus $p(r)$ Funktion	10,9	9,4
Molekulargewicht (kDa), berechnet aus $p(r)$ Funktion	80,99	58,37
Genutzte Software		
Initiale Prozessierung der Streuintensitäten	PRIMUSQT, GNOM	PRIMUSQT, GNOM
Ab-initio Modellierung	DAMMIF	DAMMIF

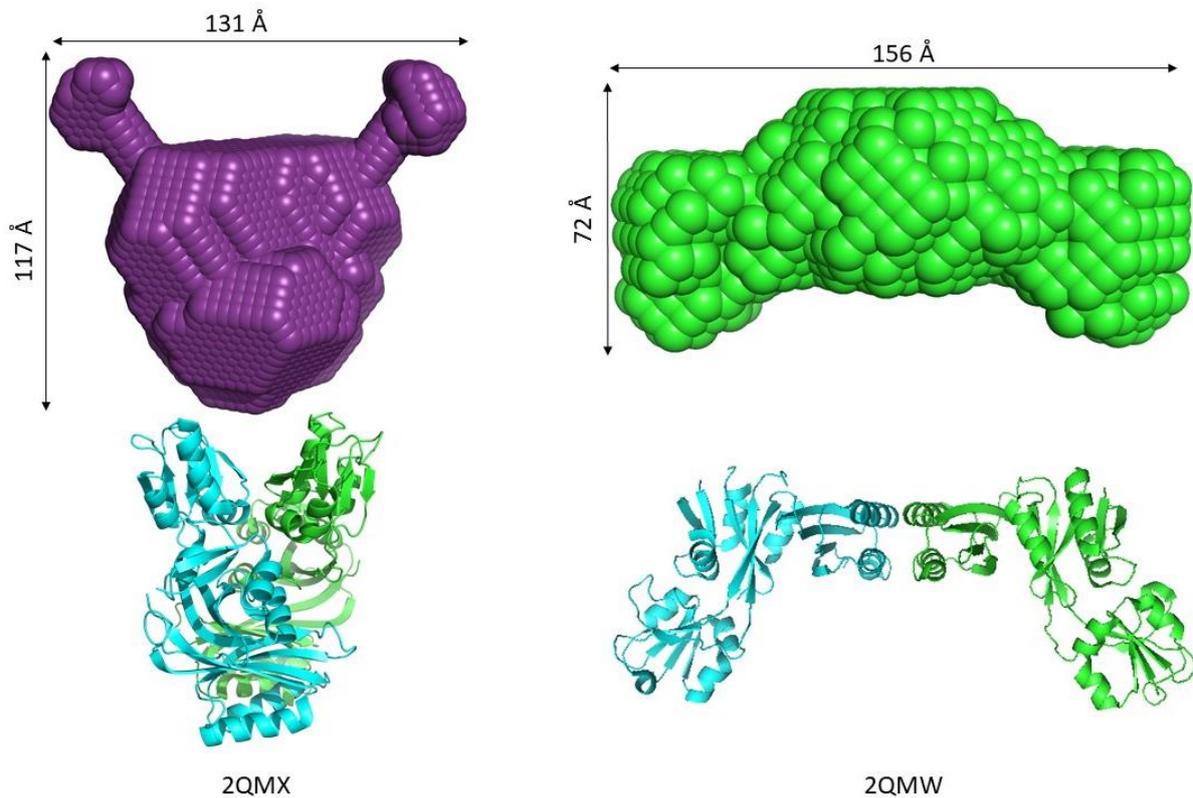


Abbildung 45: SAXS-Modelle von GqqA. Die Modelle zeigen, dass GqqA als Dimer in Lösung in seiner geschlossenen Form (links) oder der offenen Form (rechts) vorliegen kann. Zum Vergleich sind die homologen Strukturen mit den PDB-codes 2qmx und 2qmw (Tan, Li et al. 2008) abgebildet.

7.4 Kristallisation und Datensammlung

Zunächst wurde mit GqqA ein Screening unterschiedlicher Kristallisationsbedingungen durchgeführt. Dabei kristallisierte das Protein in der Bedingung 0,8 M Natriumsuccinat pH7. Die zuerst erhaltenen Kristalle waren noch stark verwachsen (Abb. 46A). Nachdem die Reinigung selbst übernommen und der zusätzliche Schritt der Gelfiltration eingeführt wurde, konnten bessere Kristallmorphologien erreicht werden. Die Kristallisation mit Mikroseeding resultierte in einer weiteren Verbesserung der Kristalle (B). Die durch Seeding erhaltenen Kristalle wurden zerkleinert und als neuer Seedstock verwendet. Nach der dritten Runde von Seedingexperimenten konnten je nachdem wie die Kristalle auf einer Oberfläche lagen hexagonale Kristalle unterschiedlicher Dicke erhalten werden (C, D). Während der Kristallisationsexperimente wurden die Kristallisationsbedingungen mehrfach variiert. Die besten Ergebnisse wurden bei 0,6 – 0,7 M Natriumsuccinat pH7 nach drei Tagen erreicht. Die Zugabe verschiedener Additive hatte keine oder sogar negative Auswirkungen auf die Kristallisation.

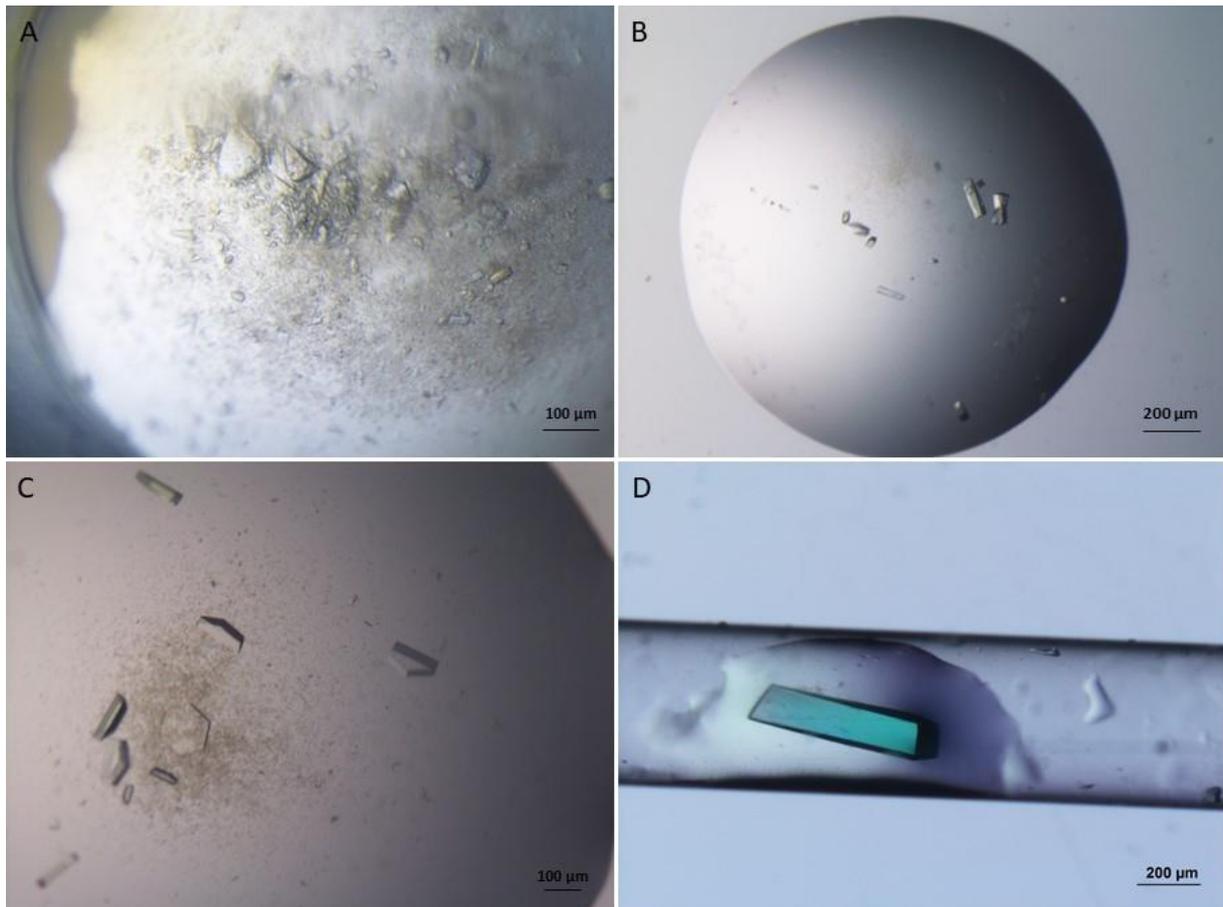


Abbildung 46: Kristallisation von GqqA. Die initialen Kristalle (A) waren noch stark verwachsen und besaßen keine klaren Kanten. Nach Optimierung der Proteinreinigung und dem ersten Mikroseeding konnten bessere Kristalle erhalten werden (B). Nach weiteren Seedingrunden waren hexagonale Kristalle entstanden (C, D).

Bei der Aufnahme von Röntgendaten zeigte sich, dass die Kristalle zwar eine gute Morphologie aufwiesen, aber verwachsen waren (Abb. 47A). Es wurde angenommen, dass der Cryopuffer mit 30 % PEG1500 die Kristallordnung stört. Aus diesem Grund wurden einige Kristalle mit alternativen Cryoprotektanten, wie unterschiedlichen PEGs, Zuckern, Glycerol oder Mineralöl getestet. Oft lösten sich die Kristalle in diesen Lösungen sofort auf, aber auch bei den Bedingungen, bei denen dies nicht passierte, waren die Diffraktionsdaten stets schlechter als mit PEG1500. Es konnten allerdings auch einige Kristalle zur Datensammlung genutzt werden. Diese Kristalle benötigten ca. zwei Monate zur Entstehung und zeigten keine Verwachsungen (B). Von diesen Kristallen konnten Datensätze aufgenommen und mit dem Programm XDS (Kabsch 2010) prozessiert werden (Tabelle 20).

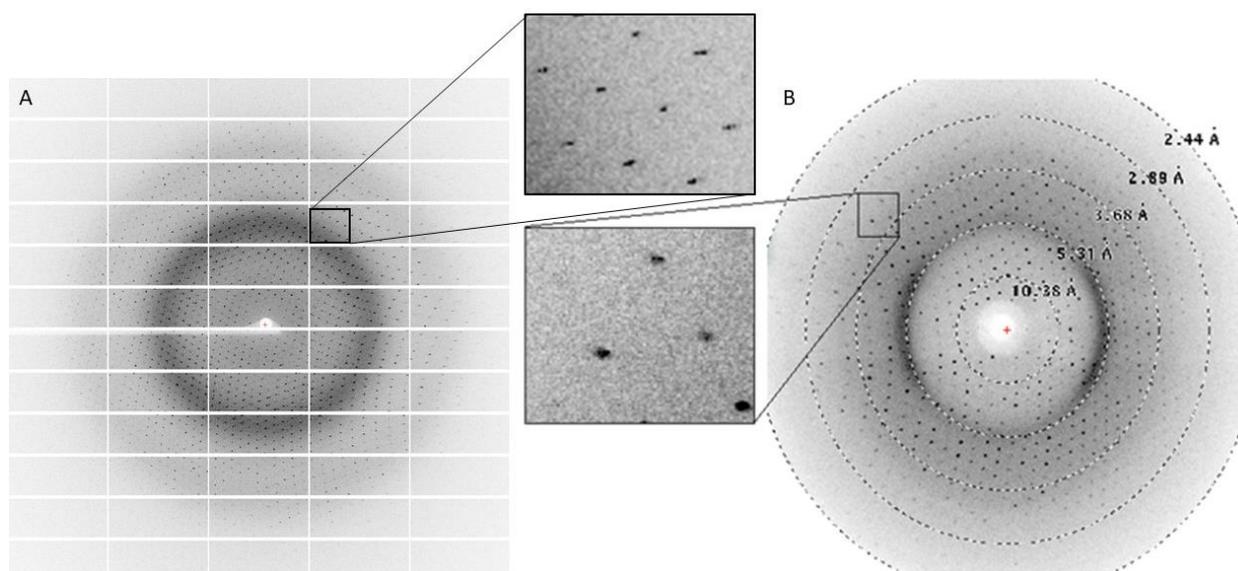


Abbildung 47: Diffractionsbilder von GqqA-Kristallen. Die Diffractionsdaten vieler Kristalle sind trotz guter Kristallmorphologie verzwillingt (A) und konnten nicht ausgewertet werden. Einige sehr langsam gewachsene Kristalle zeigen dieses Problem nicht (B).

Tabelle 20: Statistik der Datensammlung und Auswertung von SeGqqA und GqqA Kristallen

	SeGqqA	GqqA
Diffractionsquelle	BL P11 at PETRA III Synchrotron (DESY) /Hamburg	BL P11 at PETRA III Synchrotron (DESY) /Hamburg
Wellenlänge	0.9801 Å	1.0332 Å
Raumgruppe	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	P2 ₁
Zellkonstanten	a = 60,44 Å, b = 63,73 Å, c = 97,34 Å, $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$	a = 76,87 Å, b = 65,76 Å, c = 102,66 Å, $\beta = 104,27^\circ$
Auflösung	50,0 - 1,67 Å (1,78 - 1,67 Å) ¹	49,3-2,5 Å (2,6-2,5 Å) ¹
Anzahl gemessener Reflexe	545065 (85204) ¹	234394 (23288) ¹
unabhängige Reflexe	79955 (12767) ¹	34461 (3364) ¹
Vollständigkeit	99,7 % (98,0 %) ¹	99,44 % (98,53 %) ¹
Multiplicity	6,82 (6,67) ¹	6,8 (6,9) ¹
R _{meas.}	6,0 (60,9) ¹	4,4 (52,4) ¹
I/σ(I)	21,9 (3,36) ¹	29,35 (3,90) ¹

CC _{1/2}	99,9 (91,8) ¹	100 (96,9) ¹
R _{work}	0,16	0,22
R _{free}	0,20	0,27
Ramachandran favorisiert	96,9 %	96,4 %
Ramachandran erlaubt	1,8 %	3,3 %
Ramachandran Ausreißer	1,3 %	0,4 %

¹höchste Auflösungsschale

7.5 Lösung des Phasenproblems

Um aus den aufgenommenen Daten die Struktur berechnen zu können, werden die Intensitäten und Phaseninformationen der Messung benötigt. Allerdings lassen sich nur die Intensitäten, aber nicht die Phaseninformation, messen. In der Kristallografie wird dies als das Phasenproblem bezeichnet (Hauptman 1991). Es gibt verschiedene Möglichkeiten das Phasenproblem zu lösen. Die einfachste und häufig genutzte Möglichkeit ist der Molekulare Ersatz. Bei diesem werden die Phasen von einem zu mindestens 30 % homologen Protein als Startphasen für die Berechnung genutzt. Je höher die Homologie ist, desto wahrscheinlicher ist ein richtiger Lösungsansatz.

Das Protein mit dem PDB-code 2qmx besitzt die höchste Homologie zu GqqA, allerdings liegt die Identität nur bei 33,7 %. Es wurde versucht, die Struktur mit dem Monomer, Dimer oder einzelnen Domänen des homologen Proteins zu lösen, leider blieben jedoch alle Versuche erfolglos.

Eine weitere Möglichkeit das Phasenproblem zu lösen besteht, indem Schweratome in das Protein eingebracht werden und an deren Absorptionskante weitere Daten aufgenommen werden. Zunächst wurde versucht die GqqA-Kristalle mit Schwermetalllösungen, z.B. CdCl₂ zu soaken. Dabei traten die gleichen Probleme wie bei den unterschiedlichen Cryoprotektanten auf, entweder lösten die Kristalle sich sofort auf, oder die Diffraktionsdaten wurden schlechter. Eine andere häufig genutzte Möglichkeit, um Schweratome in ein Protein

einzubringen, besteht im Austausch von Methionin zu Selenomethionin. Dies geschieht schon während der Expression, entweder durch Einsatz eines Methionin-auxotrophen Zellstammes oder durch Expression in Minimalmedium. Es wurde die zweite Variante gewählt, um SelenoGqqA (SeGqqA) herzustellen. Die erhaltenen Proteinlösungen wurde mittels DLS auf Monodispersität überprüft (Abb. 48).

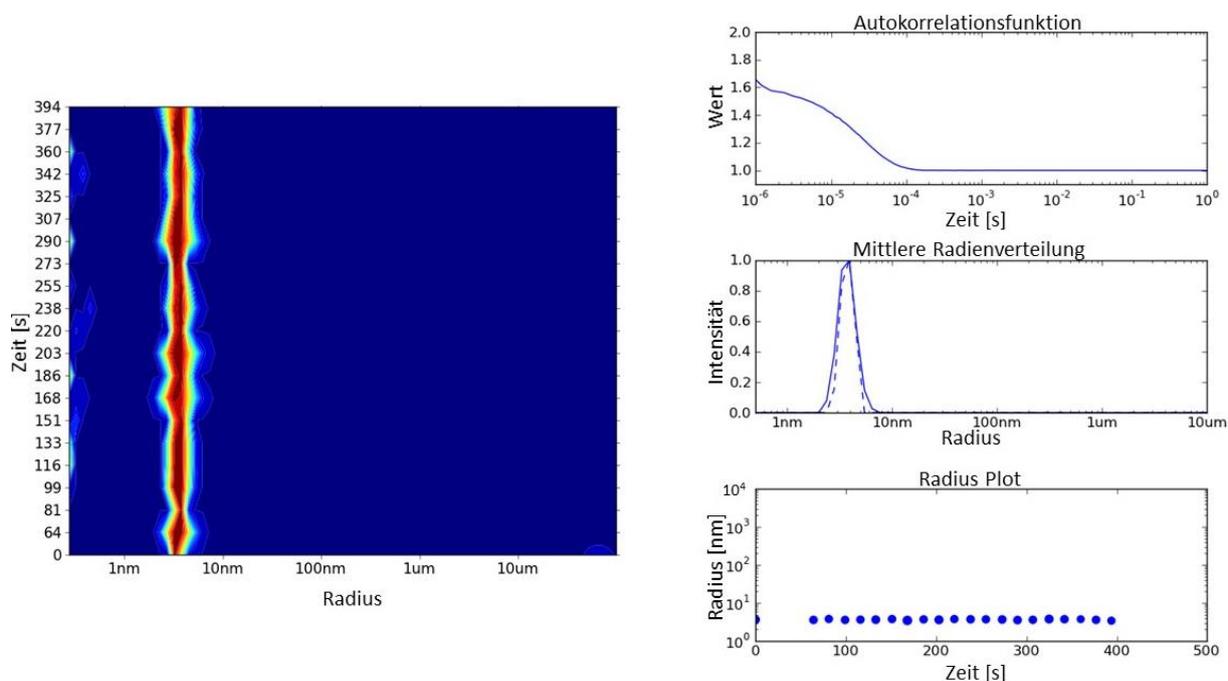


Abbildung 48: DLS-Messung von SeGqqA. Links: Radienverteilung der DLS-Messungen, bei denen der Radius in Abhängigkeit von der Zeit dargestellt wird. Rechts: Darstellung der Autokorrelationsfunktion, der mittleren Radienverteilung und des Radiusplots. Die DLS-Messungen zeigen, dass das Protein monodispers vorliegt. Der hydrodynamische Radius von 3,7 nm deutet darauf hin, dass das Protein als Dimer in Lösung vorliegt.

Mit SeGqqA wurde erneut ein Kristallisationscreening durchgeführt. In zwei der Wells mit den Kristallisationsbedingungen 5 % bzw. 10 % PEG3350 kam es zum Kristallwachstum (Abb. 49A). Die versuchte Reproduktion der SeGqqA-Kristalle in 24-Well Linbro Platten führte zu dünnen, nicht diffraktierenden Nadeln, sowohl für SeGqqA als auch für GqqA (B). Bei der für GqqA etablierten Bedingung mit Succinat wuchsen die SeGqqA-Kristalle in der bekannten hexagonalen Form (C) mit verzwilligten Diffraktionsdaten ähnlich dem normalem GqqA. Von einem der Kristalle aus dem Screening wurden an der Selenabsorptionskante von 0.9801 Å Diffraktionsdaten mit einer maximalen Auflösung von 1,7 Å aufgenommen. Mittels des anomalen Signals der Selenatome konnte die Struktur mit der Methode der *Single-wavelength anomalous dispersion* (SAD) auf der Online Plattform Autorickshaw (Panjikar, Parthasarathy

et al. 2005) gelöst werden. Mithilfe dieser Struktur war es anschließend möglich, die bereits vorhandenen Daten von GqqA mit Molekularem Ersatz zu lösen. Die Strukturen wurden anschließend mit Refmac5 (Murshudov, Vagin et al. 1997) aus dem CCP4i Paket (Winn, Ballard et al. 2011) verfeinert.

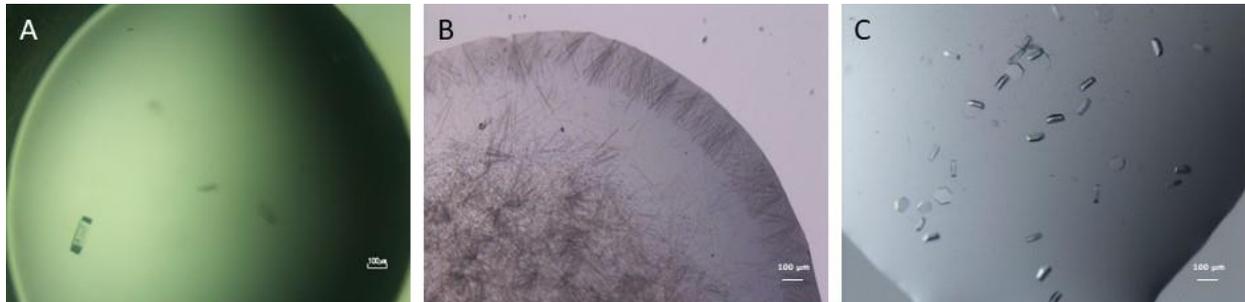


Abbildung 49: SeGqqA Kristalle in verschiedenen Kristallisationsbedingungen. Die im Screening in 5 % PEG3350 gewachsenen Kristalle diffraktierten bis 1,7 Å (A). Eine Reproduktion dieser Kristallisationsbedingung führte allerdings zu nicht diffraktierenden Nadeln (B). Mit 0,6-0,7 M Natriumsuccinat wurden hexagonale Kristalle erhalten, die zu verzwilligten Diffraktionsdaten führten.

7.6 Modell Interpretationen

7.6.1 Struktur von GqqA und SeGqqA

GqqA besitzt die höchste Homologie zur Familie der Prephenatdehydratasen. Die Prephenatdehydratasen bilden Dimere, die aus jeweils drei Domänen bestehen. Die N-terminale und mittlere Domäne bilden zusammen eine PBD, welche als katalytische Domäne für die Signalaufnahme und Signalverarbeitung verantwortlich ist, während die C-terminale Domäne eine ACT Domäne ist, welche als regulatorische Domäne allosterische Effektoren binden kann. Beispielsweise kann Phenylalanin an die ACT Domäne binden und dadurch das Enzym inhibieren.

GqqA liegt kristallografisch als Homodimer vor. Jedes Monomer besteht aus drei Domänen, die die gleiche Faltung wie die bisher bekannten Prephenatdehydratasen besitzt (Abb. 50). Die N-terminale und mittlere Domäne sind strukturell sehr ähnlich und bestehen aus einem β -Faltblatt mit vier parallelen und einem antiparallelen Strang, die von drei α -Helices umgeben sind. Bei der N-terminalen Domäne ist der antiparallele Strang des β -Faltblatts die Verbindung von mittlerer und C-terminaler Domäne, welche durch die N-terminale Domäne führt und in deren β -Faltblatt stabilisiert wird (Abb. 51).

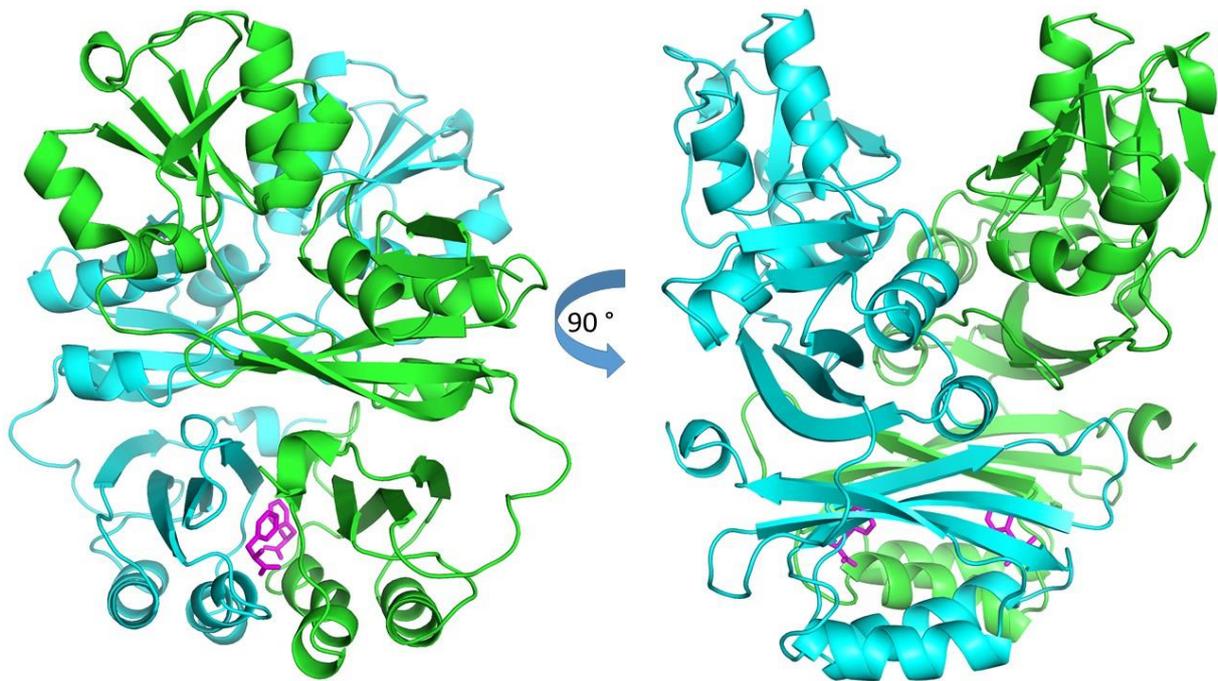


Abbildung 50: Bändermodell des GqqA-Dimers. An der N-terminalen Kontaktfläche des Dimers sind zwei Phenylalanine (pink) gebunden.

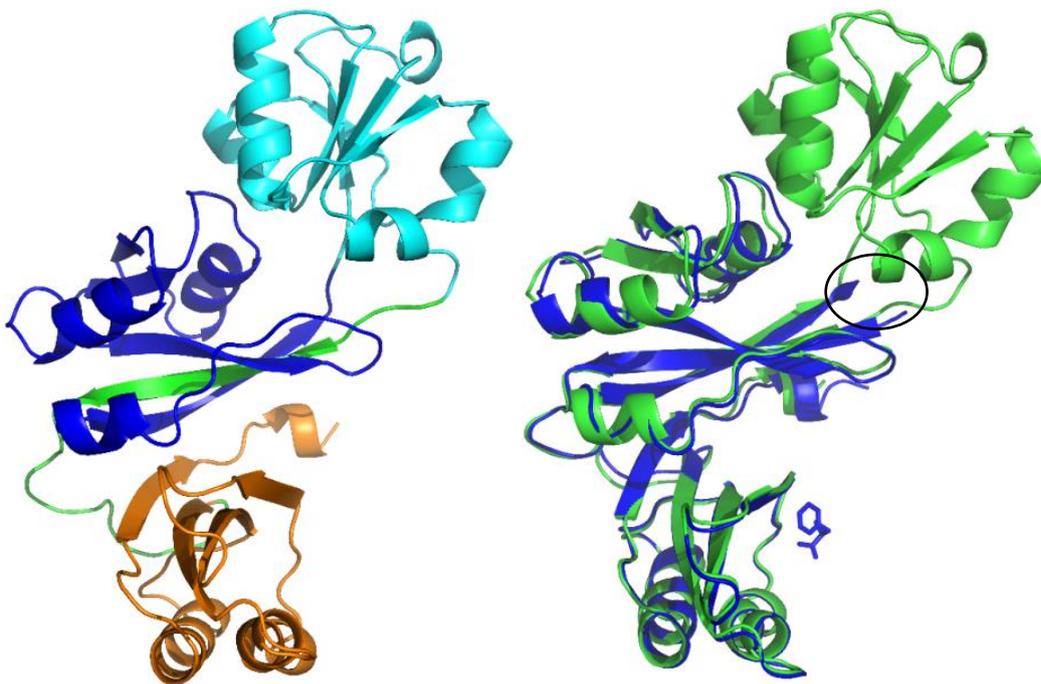


Abbildung 51: Bändermodelle des GqqA-Monomers. Links: Darstellung der unterschiedlichen Domänen von GqqA. Die mittlere Domäne (cyan) und die N-terminale Domäne (orange) sind durch einen Linker (grün) verbunden, welcher Teil des zentralen β -Faltblatts der N-terminalen Domäne (blau) ist. Rechts: Vergleich der GqqA und SeGqqA-Strukturen. Beim Vergleich der Strukturen fällt auf, dass beim SeGqqA (blau) im Vergleich zu GqqA (grün) die mittlere Domäne fehlt. Diese liegt am Rand des Proteins und hat nur wenige Wechselwirkungen mit den anderen Domänen. Die Schnittstellen (Kreis) sind leicht zugänglich. Zur besseren Veranschaulichung ist jeweils nur ein Monomer gezeigt.

Zwischen der N-terminalen und mittleren Proteindomäne befindet sich eine solventzugängliche Tasche, die das aktive Zentrum beinhaltet. Die C-terminale Domäne besteht aus einem 4-strängigen, antiparallelen β -Faltblatt und zwei α -Helices. Diese Helices bilden bei der Dimerisierung ein vier-Helix-Bündel und auch die β -Faltblätter interagieren miteinander, sodass ein 8-strängiges antiparalleles β -Faltblatt entsteht. An der Kontaktfläche der C-terminalen Domänen sind zwei Phenylalanine gebunden. Die Elektronendichte der Phenylalanine ist sehr gut definiert, sodass diese vermutlich schon während der Expression an das Protein gebunden hatten. Prephenatdehydratasen werden durch Phenylalanin gehemmt, bei GqqA handelt es sich aber vermutlich nur um ein Relikt aus der Entwicklung der Acylase GqqA aus einer Prephenatdehydratase, da GqqA keine PDT-Aktivität besitzt. Die C-terminale ACT-Domäne kommt auch in Kombination mit anderen Proteindomänen vor (Schuller, Grant et al. 1995, Kaplun, Vyazmensky et al. 2006, Kotaka, Ren et al. 2006), allerdings wurde meist nur die geschlossene Konformation beobachtet. Bei der offenen Konformation würden solventzugängliche Bereiche zwischen den ACT-Domänen entstehen, aber die Bildung der oben genannten Superstrukturen würde nicht stattfinden. Diese Strukturen verbessern allerdings die Stabilität des Proteins. Zwei Dimere der ACT-Domäne können zudem unter Bildung eines 8-Helix-Bündels ein Tetramer bilden. Bei GqqA konnte die Tetramerisierung ebenfalls beobachtet werden (Abb. 52).

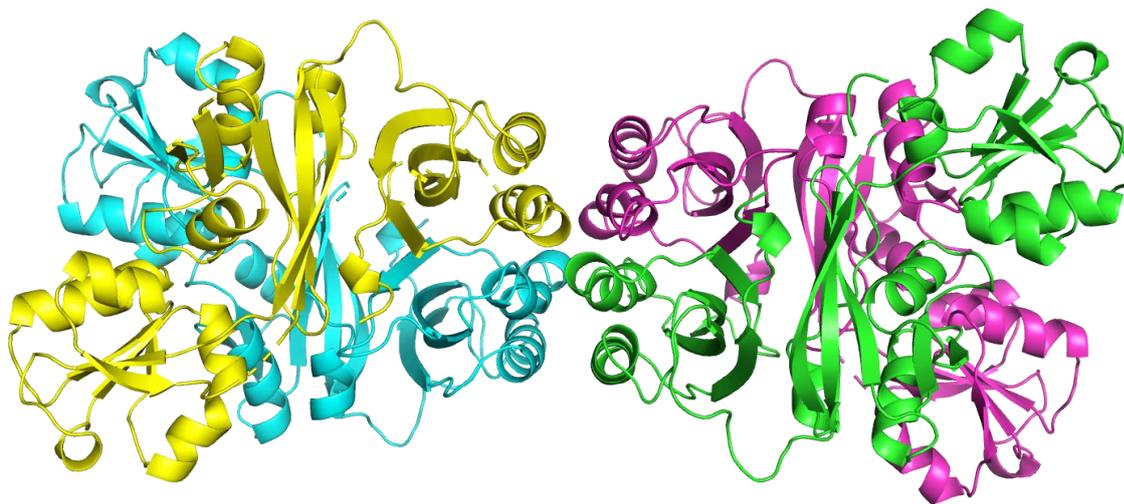


Abbildung 52: Tetramerisierung von GqqA. Bei der Tetramerisierung von GqqA bildet sich ein 8-Helix-Bündel heraus, welches zur weiteren Stabilisierung des Komplexes führt.

In der zuerst gelösten Struktur des SeGqqA waren überraschenderweise nur zwei der drei Domänen vorhanden. Die mittlere Domäne (AS 86-169) fehlte in dieser Struktur (Abb. 51 rechts). Diese Domäne befindet sich am Rand des Proteins und besitzt nur geringe Interaktionen zur N-terminalen Domäne. Die beiden Schnittstellen sind sich räumlich nahe und gut von außen zugänglich. Es ist nicht bekannt, ob GqqA eine Autoprocessing durchführt. Bei den Prephenatdehydratasen kommen keine Autoprocessingen vor, allerdings ist dieser Vorgang bei den NTN-Hydrolasen bekannt (Tan, Li et al. 2008), welche die höchste Verwandtschaft zu GqqA innerhalb der Klasse der Quorum Quenching Enzyme besitzen. Die beiden verbliebenen Domänen werden durch den im β -Faltblatt der N-terminalen Domäne stabilisierten Linker der C-terminalen Domäne, sowie über Wasserstoffbrücken miteinander verbunden.

7.6.2 Vergleich der Struktur mit den SAXS-Daten

Wird das Modell der SAXS-Daten mit der kristallografischen Struktur überlagert, wird eine gute Übereinstimmung sichtbar (Abb. 53). Durch die mit komplementären Methoden gemessenen Daten wird somit bestätigt, dass GqqA sowohl in Lösung als auch in der Kristallstruktur als Homodimer vorliegt. Dabei hat es jeweils die geschlossene Proteinkonformation angenommen. Die Tetramerisierung, welche bei GqqA im Kristall beobachtet werden konnte, findet offenbar in Lösung nicht statt. Die oberen Fortsätze des SAXS-Modells können zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht völlig erklärt werden. Es könnte sich um ein Artefakt aus der Mittelung der verschiedenen DAMMIF-Modelle handeln.

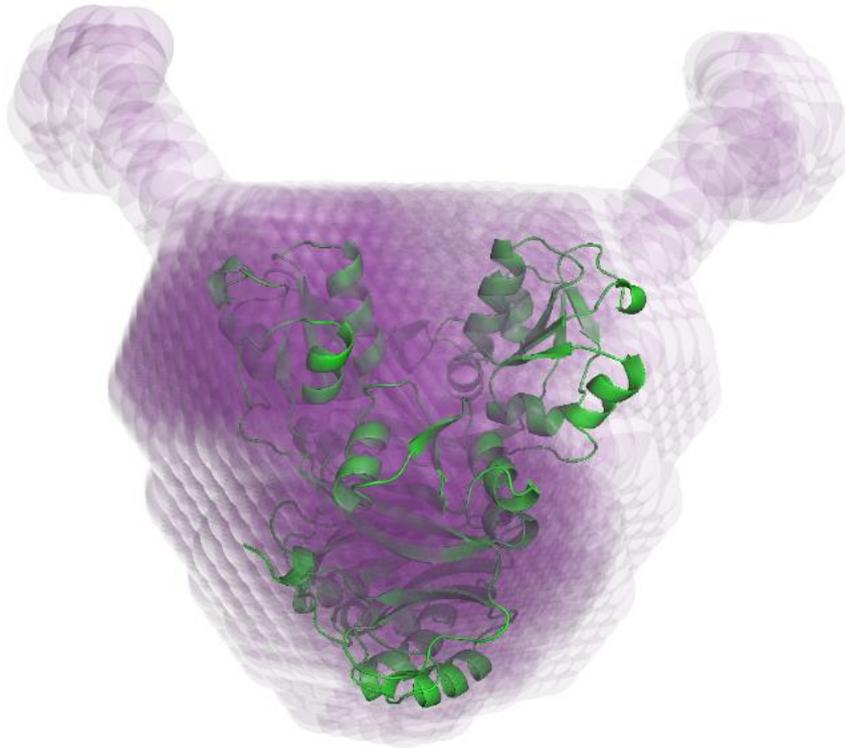


Abbildung 53: Überlagerung des berechneten Ab-initio SAXS-Modells mit der gelösten Struktur. Die Kristallstruktur von GqqA stimmt gut mit dem SAXS-Modell der geschlossenen Form überein.

7.6.3 Vergleich von GqqA mit der Prephenatdehydratase 2qmx

Die Strukturen der Acylase GqqA und der Prephenatdehydratase 2qmx weisen die gleiche Faltung auf. Die Domänen untereinander sind jedoch etwas unterschiedlich zueinander gelegen (Abb. 54). Diese Varianz sorgte vermutlich dafür, dass der Molekulare Ersatz nicht funktionierte. Ein entscheidender Unterschied zwischen den Strukturen ist der Loop zwischen den funktionellen Domänen. Der Loop von GqqA ist um fünf Aminosäuren kürzer und weist eine komplett unterschiedliche Sequenz auf. Dementsprechend hat dieser Loop auch eine andere Konformation in der Struktur (Abb. 54, rote Kreise)

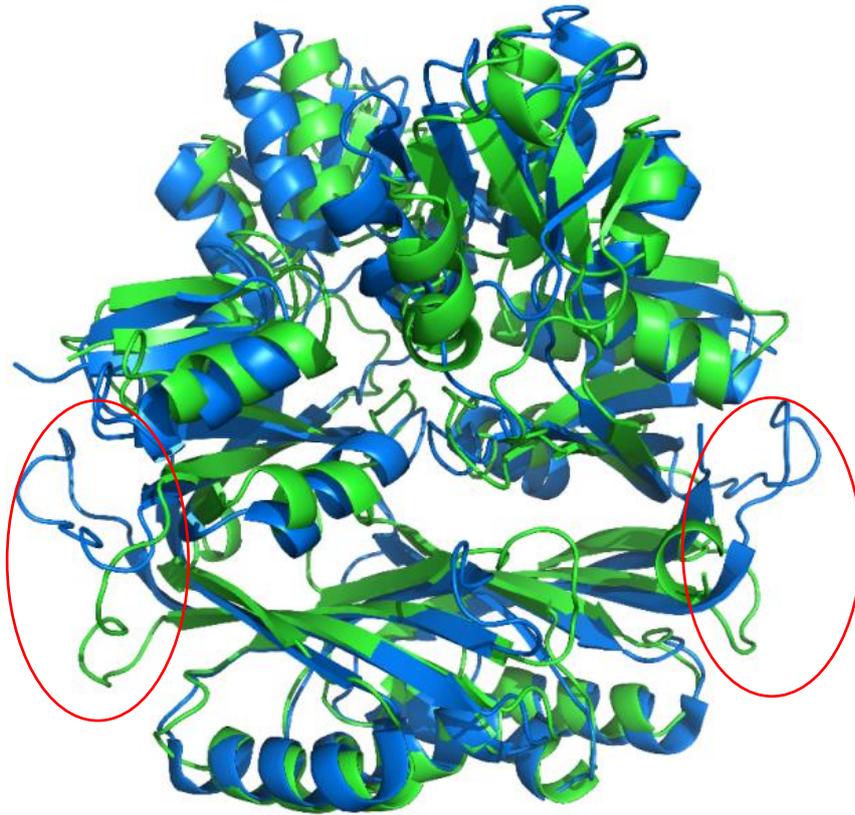


Abbildung 54: Überlagerung der Strukturen von GqqA und 2qmx. Die Strukturen von GqqA (grün) und 2qmx (blau) weisen die gleiche Faltung auf. Die Domänen sind untereinander allerdings etwas verschoben. Der größte Unterschied zwischen den Strukturen befindet sich im Loop zwischen den funktionalen Domänen (rote Kreise). Diese Loops weisen komplett unterschiedliche Sequenzen und räumliche Anordnungen auf.

Vergleicht man die Sequenzen von GqqA und 2qmx wird deutlich, dass die zwischen den beiden Proteinen konservierten Reste größtenteils in der PBPD liegen, während die ACT Domäne weniger stark konserviert ist (Abb. 55). Von den vier Aminosäureresten, welche in 2qmx als aktives Zentrum vermutet wurden (P52, T168, R169 und F170), sind drei in GqqA konserviert. An der Position des P52 liegt allerdings ein Alanin.

Im Protein 2qmx wurden die Reste A123, L204, N206, L215 und S233 als wichtig für die Aktivität als Prephenatdehydratase identifiziert (Tan, Li et al. 2008). Allerdings sind nur zwei dieser Reste (N209 und L218 in 2qmx bzw. N203 und L212 in GqqA) in GqqA konserviert. Daraus ergibt sich ein Hinweis auf eine geänderte Substratspezifität.

Identität: 33,7 %

Ähnlichkeit: 52,0 %

Periplasmisch bindende
Proteindomäne

GqqA	1	----MNGERIIAFQGRPGAYSIDLAC-RQARPGWITLPCQTFAQTIAAVHD	45
		. . : : : : : : : : : : : : : : : : :	
2qmx	1	SNAMTNW--LIAYQGEPEGAYSEIAALRFGEF----LPCESFDDVFSVAVTE	44
GqqA	46	GRAELAMLAACENSLAGRVDPDIHALLPEAGLFIVGEHFQQRVEHCLLGIPGS	95
2qmx	45	QKADYAVIPEENSLGGSIHQNYDLLRRPVVILAETFVKVEHCLLGLPGA	94
GqqA	96	TLADARRIHTHFVAMAQVRGII-TELGLDFVVEFDTAGAAEMVREWGRKE	144
2qmx	95	SVETATKAMSHPQALVQCHNFFATHPQIRAEFAAYDTAGSAKMVAESRDKS	144
GqqA	145	DVAVASALAAELNGLEILRRNVEDATHNTTRFY--IASRRPATLP-----P	188
2qmx	145	ALAIASKRAGELYGLDILKENLADEEWNITRFTCIAHENNPDISHLKVRP	194
GqqA	189	PGPGFMTTLFRVMNQPGALYKADGGLATAGVNMTRLESYMLEGSFSATQ	238
2qmx	195	DVARQHTSIVFALRNEQGSFLFRALATFALRGIDLTKIESRRESRKKAFEYL	244
GqqA	239	FLMDVEGHPEAPPLARALDELSFFSEQQEILGVY-PASPFRRKP	281
2qmx	245	FYADFIGHREDQNVHNALENLREFATMVKVLGSYGVVNP-----	283

ACT Domäne

Wichtig für PDT Aktivität

Aktives Zentrum bei Prephenatdehydratasen

Katalytisches Thr bei NTN-Hydrolasen

Abbildung 55: Sequenzvergleich von GqqA und der Prephenatdehydratase 2qmx. Die Sequenzen besitzen eine Identität von 33,7 %. Die Prephenatdehydratase besteht aus zwei funktionellen Untereinheiten, der PBPD (blau) und der ACT Domäne (orange). Die Aminosäuren des vermuteten aktiven Zentrums von 2qmx (grün) sind größtenteils auch in GqqA konserviert. Von den fünf Aminosäuren, die in 2qmx als wichtig für die Aktivität als Prephenatdehydratase identifiziert wurden (rot), sind hingegen nur zwei Aminosäuren in GqqA konserviert. Thr170 (violett) könnte nach dem Mechanismus der NTN-Hydrolasen als katalytischer Rest fungieren.

GqqA besitzt keine Prephenatdehydratase Aktivität, wie bereits von Valera *et al.* experimentell ermittelt wurde. Dazu wurde das Gen für GqqA in zwei *E. coli*-Stämme eingebracht, welchen das Gen *pheA* fehlte. Die Bakterien waren nicht in der Lage in Minimalmedium zu wachsen. Erst nach der Zugabe von Phenylalanin zum Medium fand ein Wachstum statt. Diese Untersuchung zeigte, dass GqqA die Phenylalaninsynthese von *pheA* nicht kompensieren kann (Valera, Mas *et al.* 2016).

7.7 Enzymaktivität und Substratspezifikation

GqqA bevorzugt Homoserinlactone mit einer mittleren Acyl-Kettenlänge von C8 bis C12 (Valera, Mas et al. 2016). Bisher waren alle Versuche eine Struktur mit Substrat oder einem Inhibitor zu komplexieren oder Cokristallisationsexperimente ohne Erfolg, was teilweise aber auch an der schlechten Datenqualität der aufgenommenen Diffraktionsdaten liegen kann. Um dennoch Daten zur Substratbindung zu erhalten, wurden Dockingstudien durchgeführt.

Zu Beginn dieser Arbeit war die Enzymspezifikation von GqqA noch unbekannt. Mit dem Programm Swissdock (Grosdidier, Zoete et al. 2011, Grosdidier, Zoete et al. 2011) wurden zunächst die möglichen Positionen und Aminosäuren eines aktiven Zentrums vorhergesagt (Abb. 56). Das Programm verwendet dazu ausgewählte kleinere Moleküle, um die wahrscheinlichsten Substratbindestellen zu lokalisieren. Für GqqA wurden zwei potenzielle Substratbindestellen je Monomer identifiziert, eines in einer Tasche des Proteins nahe der Kontaktfläche des Dimers (blaue Kreise) und eines in einer Furche an der Proteinoberfläche (rote Kreise).

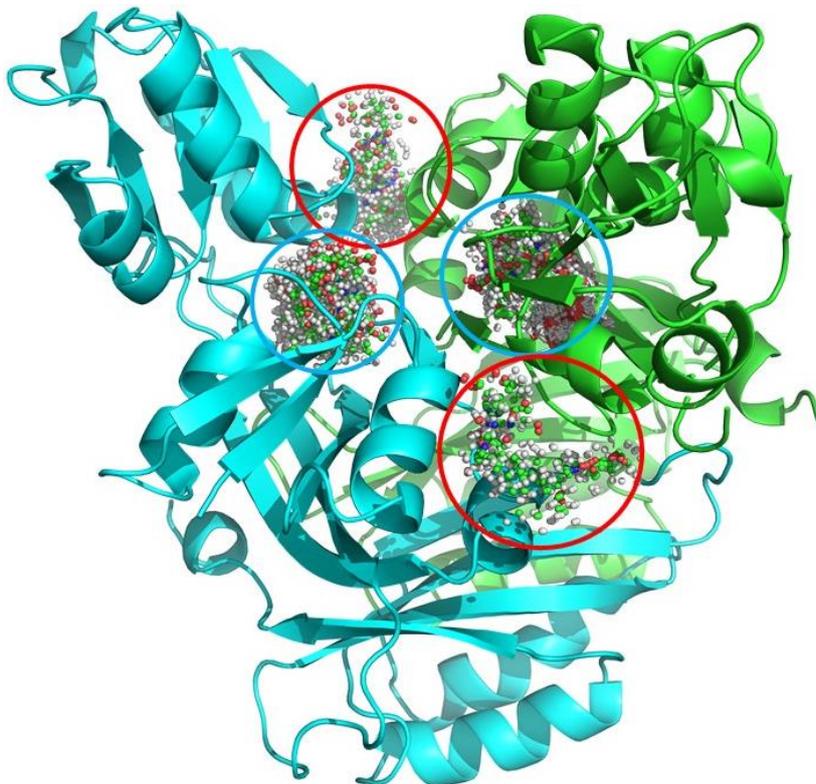


Abbildung 56: Mögliche Substratbindestellen von GqqA. Das Programm Swissdock (Grosdinier 2011) konnte zwei mögliche Positionen für die Substratbindung pro Monomer identifizieren (blaue bzw. rote Kreise).

Bisher sind verschiedene Arten von Quorum Quenching Enzymen identifiziert worden, die häufigsten Gruppen bilden dabei die Lactonasen, Acylasen und Oxidoreduktasen. Für NTN-Hydrolasen, welche den Acylasen zugeordnet sind, ist bekannt, dass sie zunächst ein Signalpeptid abspalten nachdem sie ins Periplasma diffundiert sind. Anschließend durchlaufen diese Enzyme zwei Autoprozessierungsschritte, bei denen ein kurzer Linker aus dem Protein entfernt wird. Die verbliebenen N- und C-terminalen Peptidketten (α - bzw. β -Peptid) lagern sich folgend nicht-kovalent aneinander an und bilden das aktive heterodimere Enzym. Bei den NTN-Hydrolasen ist diese Autoprozessierung wichtig für die Enzymaktivierung, da sich N-Terminal am β -Peptid ein Serin befindet, welches eine essentielle Funktion in der Katalyse hat (Fast and Tipton 2012).

Bei SeGqqA befindet sich N-Terminal am β -Peptid ein Treonin (Thr170), welches die gleiche Funktion wie Serin in einem Katalysemechanismus einnehmen könnte. Der in Abbildung 37 dargestellte phylogenetische Baum zeigt, dass die Verwandtschaft zu den NTN-Hydrolasen von allen Quorum Quenching Enzymen am nächsten ist. Strukturell gibt es allerdings einige Unterschiede zwischen dieser Enzymklasse und GqqA, welches den Prephenatdehydratasen ähnelt. Der am besten untersuchte Vertreter der NTN-Hydrolasen ist das Protein PvdQ. Bei diesem wird autoproteolytisch ein Segment von 23 Aminosäuren aus dem Protein ausgeschnitten, woraufhin sich ein 18 kDa und ein 60 kDa Fragment aneinander anlagern (Bokhove, Nadal Jimenez et al. 2010). GqqA (30,5 kDa) ist deutlich kleiner als PvdQ (84 kDa), allerdings beträgt der herausgeschnittene Teil im SeGqqA fast 1/3 des Gesamtproteins (84 AS bzw. 9 kDa). Das α -Peptid besteht aus 85 AS (9,2 kDa) und das β -Peptid aus 112 AS (12,3 kDa). Bei allen weiteren Kristallisationen und folgenden Datensammlungen war die Struktur allerdings immer komplett, sodass nicht sicher gesagt werden kann, ob GqqA eine Autoproteolyse durchführt, oder es sich um eine zufällige Konstellation, beispielweise durch Verunreinigung mit Proteasen handelte.

Auch beim kompletten GqqA ist diese Position eine potentielle Substratbindungsstelle. Je nach Vorpositionierung des Liganden bei Dockingexperimenten, kann die Acylkette sich in zwei unterschiedliche hydrophobe Furchen legen (Abb. 57). Thr170 besitzt dabei bereits einen Abstand von ca. 4 Å zum Substrat, würde sich aber vermutlich bei der Substratbindung noch ausrichten.

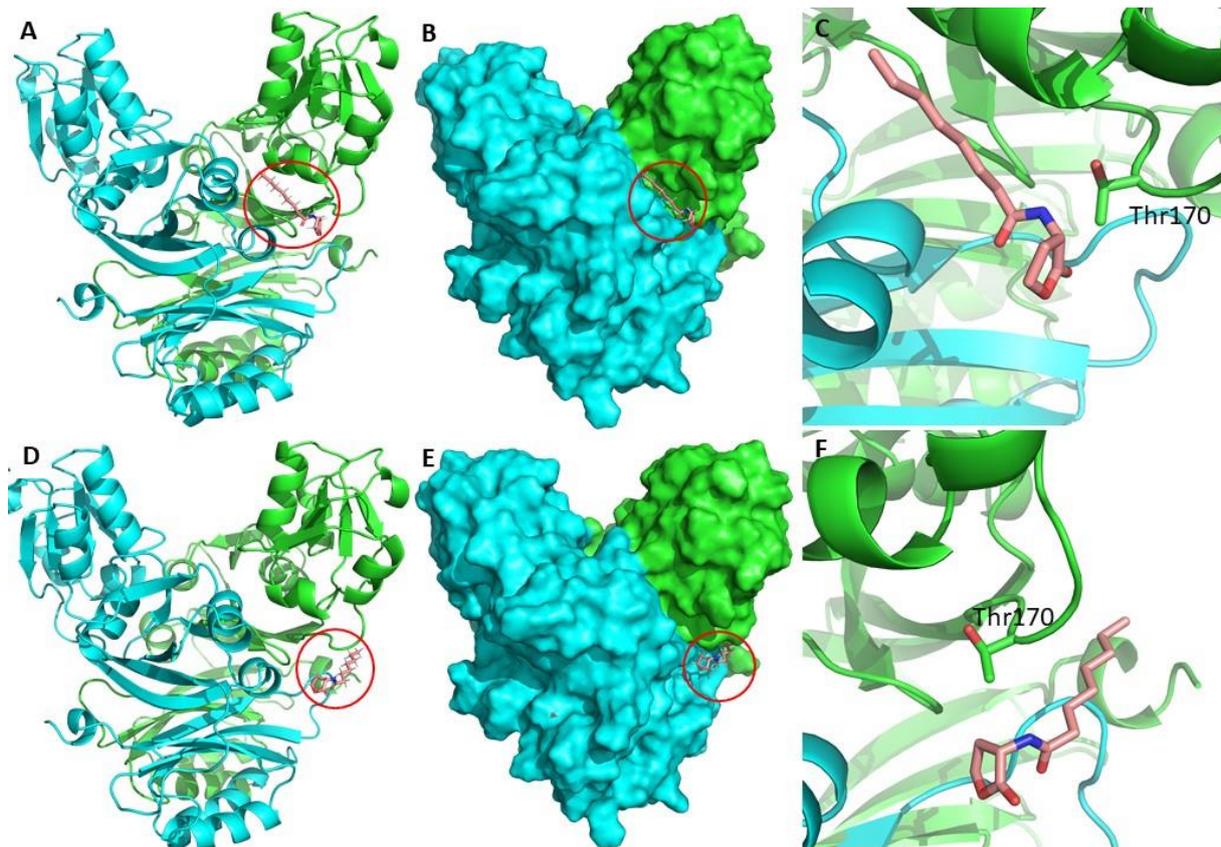


Abbildung 57: Docking von N-octanoyl-L-homoserinlacton an Thr170. Je nach Vorpositionierung des Liganden (roter Kreis) ergeben sich zwei Möglichkeiten für die Bindung an GqqA (A-C bzw. D-F). Die Darstellung des Oberflächenmodells zeigt, dass die hydrophobe Acylkette sich jeweils in unterschiedliche hydrophobe Furchen an der Proteinoberfläche legt (B und E). Die Detailbetrachtung (C und F) zeigt eine gute Positionierung des Liganden zum Thr170, welches sich bei der Substratbindung noch ausrichten könnte.

Eine weitere Möglichkeit für das katalytische Zentrum sind die Aminosäuren T174, R175 und F176. Diese wurden für die Prephenatdehydratasen als aktives Zentrum vermutet. Allerdings gibt es hierfür noch keine Bestätigung, da zum jetzigen Zeitpunkt weder Mutanten noch Kristallstrukturen von Prephenatdehydratasen mit gebundenem Substrat veröffentlicht wurden. Auch an dieser Stelle wurde eine Dockingstudie durchgeführt (Abb. 58). Das Substrat könnte in der solventzugänglichen Tasche in der Nähe der Dimer-Interaktionsfläche binden. Der gemessene Abstand beträgt auch hier ca. 4 Å. In diesem Dockingmodell konnte das Substrat allerdings aufgrund sterischer Hinderungen nicht tief genug in der Tasche binden, um eine Acylaseaktivität zu bestätigen. Die berechnete Position wäre typischer für eine Lactonase-Aktivität. Allerdings könnte der Lactonring zur Seite klappen, wodurch ein tieferes Eindringen möglich wäre. Dies wurde bei der Berechnung vom Programm nicht berücksichtigt.

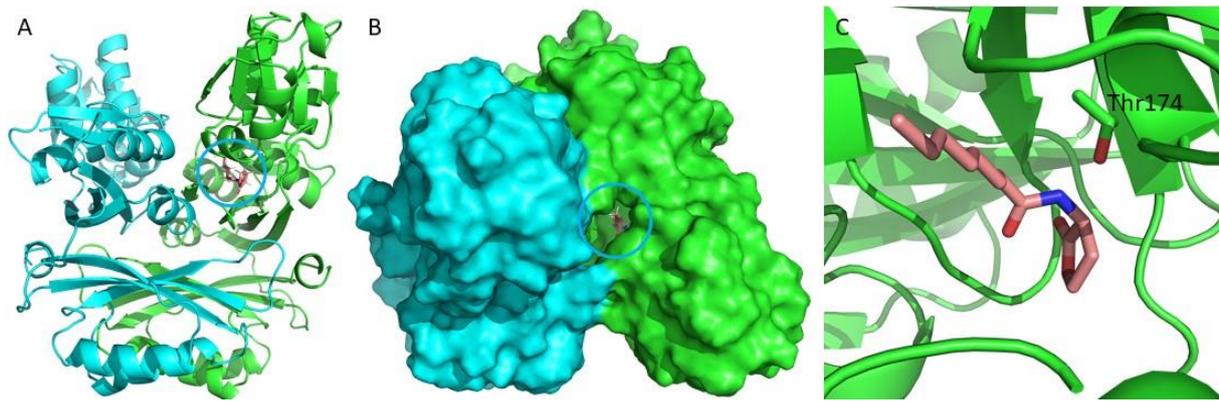


Abbildung 58: Docking von C8-HSL an Thr174. Der Lactonring bindet in einer solventzugänglichen Tasche des GqqA (A), während die Acylkette nach außen ragt (B, Ansicht von oben). Allerdings kann im Dockingmodell das Substrat aufgrund sterischer Hinderungen nicht tief genug in die Tasche gelangen, um eine Acylaseaktivität zu bestätigen (C). Die Position des Liganden wäre typischer für eine Lactonase.

Die Enzymklasse konnte durch ESI-MS/MS Messungen von K. Petersen (Institut für Mikrobiologie, Universität Hamburg) als die der Acylasen bestätigt werden. Das genaue aktive Zentrum sowie der genaue Mechanismus sind aber bisher noch nicht eindeutig identifizierbar. Hierzu sollen in Zukunft Mutationen der beiden Threonine T170 und T174 durchgeführt und untersucht werden.

7.8 Mutationen

Aufgrund der Kristallverwachsungen wurden die Proteinkontakte im Kristallgitter genauer analysiert (Abb. 59). Es wurden fünf Aminosäuren bzw. Bereiche ausgewählt, die Interaktionen zu Nachbarmolekülen des Dimers aufwiesen und mutiert (Abb. 59 unten). Diese Mutationen sind in Tabelle 21 zusammengefasst.

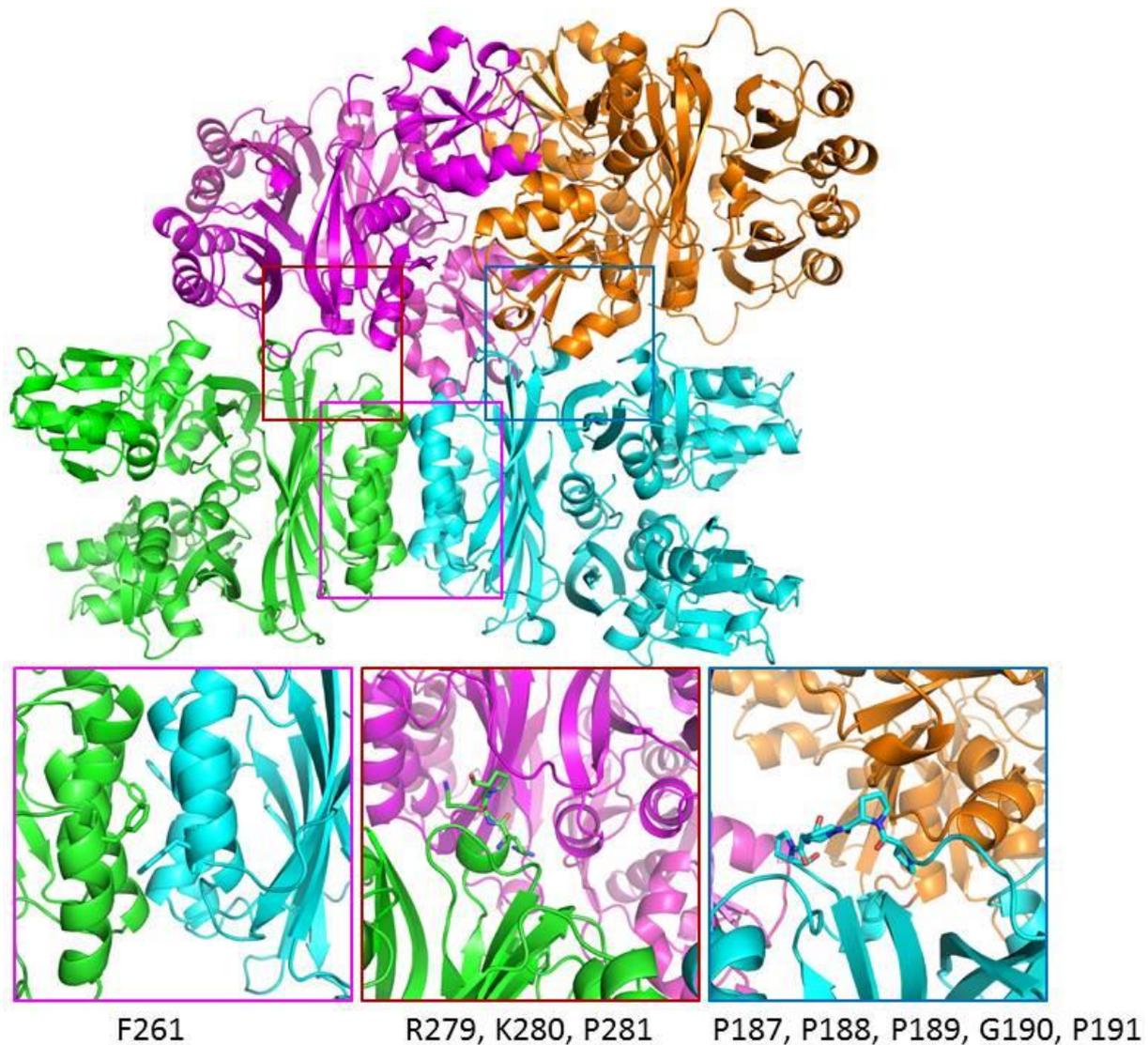


Abbildung 59: Bändermodell der räumlichen Anordnung benachbarter GqqA-Dimere im Kristallgitter und Vergrößerung von drei der Mutationsstellen. Die Mutationen sollen Wechselwirkungen zwischen benachbarten Dimeren verhindern. Die Stellen der Mutationen M1, M2 und M4 sind in farblich markierten Ausschnitten vergrößert dargestellt.

Tabelle 21: Mutanten von GqqA.

Name	Mutation
M1	F261S
M2	Δ 279-281
M3	R25S
M4	P187A, Δ 188-190, P191S
M5	T118V

Die Mutationen wurden von K. Petersen (Institut für Mikrobiologie, Universität Hamburg) durchgeführt, ebenso wie die Aktivitätstests der Mutanten. Bei diesen zeigte sich, dass nur die Mutanten M2 und M5 aktiv sind, während die Mutanten M1, M3 und M4 keine Aktivität zeigen (Abb. 60).

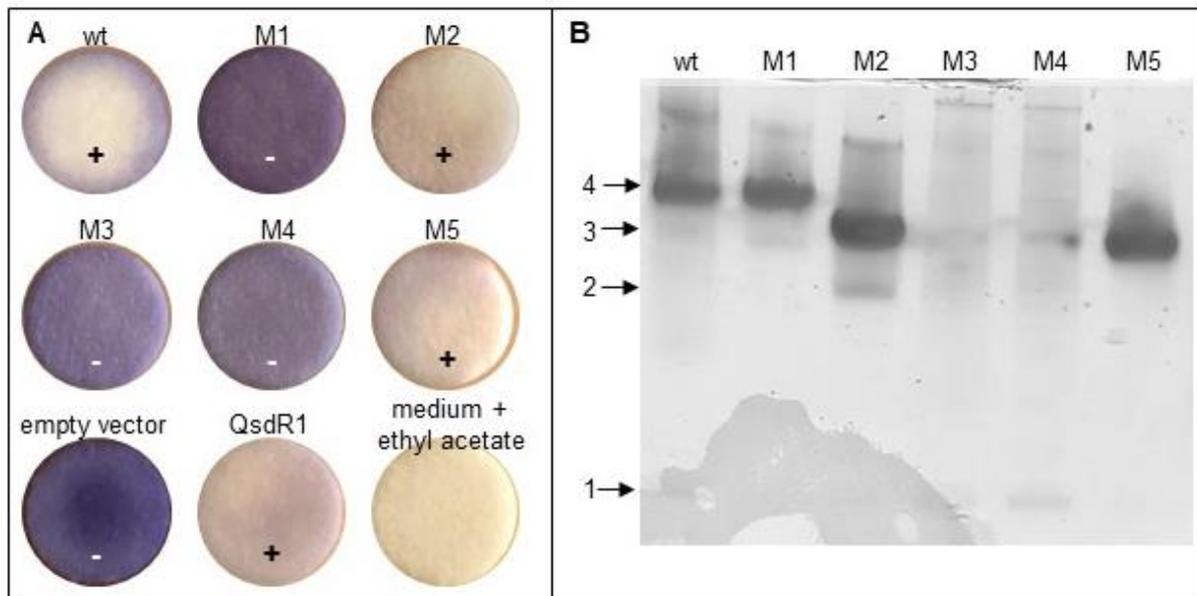


Abbildung 60: Aktivitätstest und Expression der Mutanten von GqqA. A: Bei diesem Aktivitätstest zeigt die lila Farbe das Vorhandensein von N-Acylhomoserinlactonen an. Werden diese vom Protein umgesetzt entfärbt sich die Lösung. Die Mutanten M2 und M5 sind ebenso wie der Wildtyp und die Lactonase QsdR1 in der Lage das Substrat abzubauen, während M1, M3 und M4 keine Aktivität zeigen. Der Leervektor, QsdR1 und das mit Ethylacetat versetzte Medium dienen als Kontrollen. B: SDS-PAGE Analyse der Expression der Mutanten von GqqA. Die Mutanten M1, M2 und M5 exprimieren ähnlich gut wie der Wildtyp (wt) mit einer Hauptbande bei 30 kDa (4). Zudem sind auch deutlich schwächere Nebenbanden (1-3) erkennbar. Bei den Mutanten M3 und M4 konnte keine Expression in *E. coli* festgestellt werden. Die Versuchsdurchführung und Erstellung der Abbildungen erfolgten durch K. Petersen.

Die Mutanten M3 und M4 ließen sich zudem nicht in *E. coli* exprimieren. Offenbar führen diese Mutationen zu unerwartet großen Strukturänderungen, sodass die Proteine sich falsch falten und vermutlich direkt wieder von Proteasomen abgebaut werden. Die Mutanten M1, M2 und M5 ließen sich nach dem für GqqA etablierten Protokoll reinigen und zeigten im DLS ein monodisperses Signal (Abb. 61).

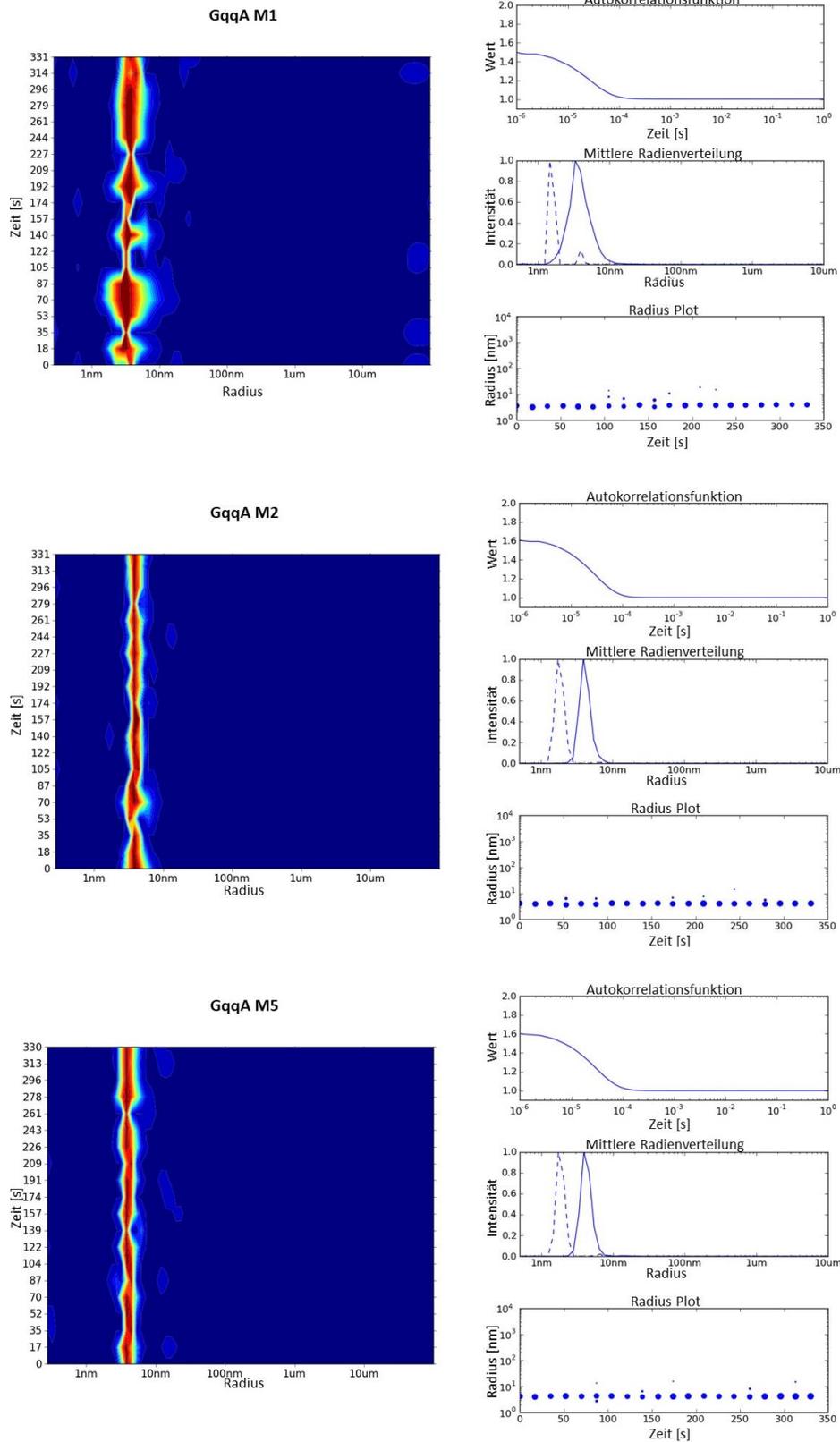


Abbildung 61: DLS- Messungen der GqqA Mutanten M1, M2 und M5. Links: Radienverteilung der DLS-Messungen, bei denen der Radius in Abhängigkeit von der Zeit dargestellt wird. **Rechts:** Darstellung der Autokorrelationsfunktionen, der mittleren Radienverteilungen und der Radiusplots. Die DLS-Messungen zeigen, dass die Proteine monodispers vorliegen.

Bisher konnten nur die Mutanten M2 und M5 unter den bekannten Bedingungen kristallisiert werden (Abb. 62). Diese Kristalle wiesen die gleiche Morphologie wie die Kristalle des Wildtyps auf. Die Diffraktionsdaten waren ebenso verzwillingt. Für M1 konnten bislang noch keine geeigneten Kristallisationsbedingungen identifiziert werden. Möglicherweise ist das mutierte Phe261 essenziell für die Tetramerisierung von GqqA und somit für die Ausbildung von stabilisierenden Proteinkontakten.

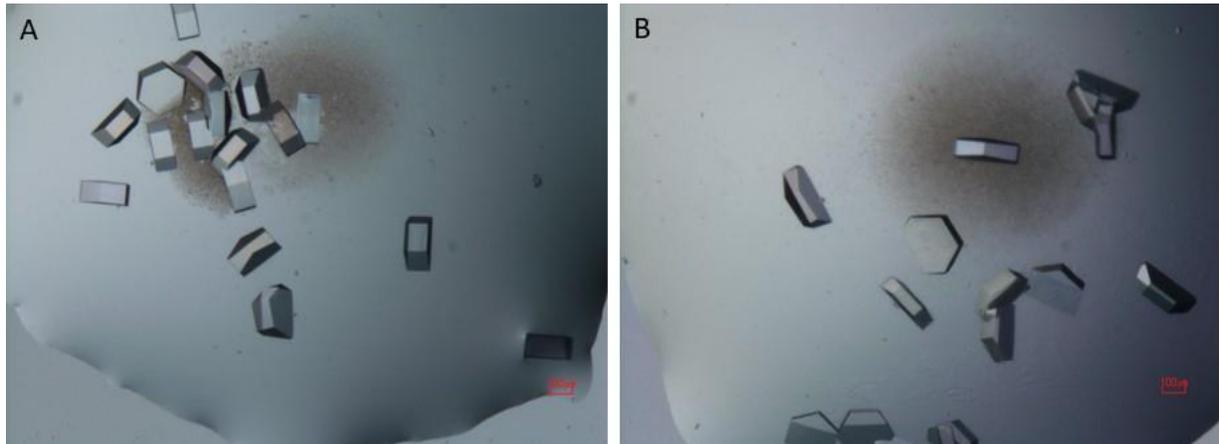


Abbildung 62: Proteinkristalle der Mutanten M2 und M5. Die Kristalle der Mutanten M2 (A) und M5 (B) weisen die gleiche Morphologie auf wie die Kristalle des Wildtyps.

8 AUSBLICK

Neben der Antibiotikaresistenz ist die Biofilmbildung eine zusätzliche Problematik bei Behandlung bakterieller Infektionen. Außerdem sind Biofilme in technischen Anwendungen der Biotechnologie Ursache verschiedenster Probleme. Daher ist es von grundsätzlicher Bedeutung, dass Inhibitoren für Enzyme des Quorum Sensing und Quorum Quenching gefunden werden.

GqqA gehört zu einer neuen Familie von Quorum Quenching-Acylasen, die sich aus Prephenatdehydratasen entwickelt haben. Auch über die PDTs gibt es bisher nur wenige Informationen. Es sind bislang zwar vier Strukturen aus unterschiedlichen Organismen bekannt (PDB Codes: 2qmx, 2qmw, 4lub, 3mwb), allerdings konnte bisher keines der Enzyme im Komplex mit einem Substrat charakterisiert werden. Auch Mutanten wurden bislang nicht analysiert. Potenzielle Aminosäuren eines aktiven Zentrums wurden daher bislang nur theoretisch vorhergesagt (Tan, Li et al. 2008). Wie in Kapitel 7.7 beschrieben ist momentan noch nicht bekannt, ob das aktive Zentrum von GqqA mit der vermuteten Position der aktiven Zentren in den PDTs übereinstimmt, oder eher dem Mechanismus der NTN-Hydrolasen folgt. Um diese Frage zukünftig zu klären muss entweder eine Proteinstruktur im Komplex mit ihrem Substrat gelöst werden oder Mutanten der möglichen katalytischen Reste Thr170 bzw. Thr174 hergestellt werden. Anschließend kann über Aktivitätstests eine dann inaktive Mutante verifiziert werden. Möglicherweise gelingt mit dieser Mutante dann auch die Strukturlösung eines Enzym-Substrat-Komplexes, sofern diese das Substrat binden.

Literaturverzeichnis

- Afonine, P. V., et al. (2012). "Towards automated crystallographic structure refinement with phenix.refine." Acta Crystallogr D Biol Crystallogr **68**(Pt 4): 352-367.
- Ahmed, H. U., et al. (2007). "The determination of protonation states in proteins." Acta Crystallogr D Biol Crystallogr **63**(Pt 8): 906-922.
- Asherie, N. (2004). "Protein crystallization and phase diagrams." Methods **34**(3): 266-272.
- Aslam, B., et al. (2018). "Antibiotic resistance: a rundown of a global crisis." Infect Drug Resist **11**: 1645-1658.
- Bagattini, M., et al. (2006). "Molecular epidemiology of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* in a neonatal intensive care unit." J Antimicrob Chemother **57**(5): 979-982.
- Barja, F., et al. (2016). Physiology of *Komagataeibacter* spp. During Acetic Acid Fermentation. Acetic Acid Bacteria: 201-221.
- Baym, M., et al. (2016). "Multidrug evolutionary strategies to reverse antibiotic resistance." Science **351**(6268): aad3292.
- Benvenuti, M. and S. Mangani (2007). "Crystallization of soluble proteins in vapor diffusion for x-ray crystallography." Nat Protoc **2**(7): 1633-1651.
- Berendonk, T. U., et al. (2015). "Tackling antibiotic resistance: the environmental framework." Nat Rev Microbiol **13**(5): 310-317.
- Bergfors, T. (2003). "Seeds to crystals." J Struct Biol **142**(1): 66-76.
- Beyerlein, K. R., et al. (2017). "Mix-and-diffuse serial synchrotron crystallography." IUCrJ **4**(Pt 6): 769-777.
- Blair, J. M., et al. (2015). "Molecular mechanisms of antibiotic resistance." Nat Rev Microbiol **13**(1): 42-51.
- Blake, C., et al. (1965). "Structure of hen egg-white lysozyme: a three-dimensional Fourier synthesis at 2 Å resolution." Nature **206**(4986): 757.
- Blakeley, M. P. and A. D. Podjarny (2018). "Neutron macromolecular crystallography." Emerging Topics in Life Sciences **2**(1): 39-55.
- Bokhove, M., et al. (2010). "The quorum-quenching N-acyl homoserine lactone acylase PvdQ is an Ntn-hydrolase with an unusual substrate-binding pocket." Proc Natl Acad Sci U S A **107**(2): 686-691.
- Bonnet, R. (2004). "Growing group of extended-spectrum beta-lactamases: the CTX-M enzymes." Antimicrob Agents Chemother **48**(1): 1-14.
- Both, A., et al. (2017). "Emergence of ceftazidime/avibactam non-susceptibility in an MDR *Klebsiella pneumoniae* isolate." J Antimicrob Chemother **72**(9): 2483-2488.
- Brisse, S. and J. Verhoef (2001). "Phylogenetic diversity of *Klebsiella pneumoniae* and *Klebsiella oxytoca* clinical isolates revealed by randomly amplified polymorphic DNA, *gyrA* and *parC* genes sequencing and automated ribotyping." Int J Syst Evol Microbiol **51**(Pt 3): 915-924.
- Broberg, C. A., et al. (2014). "Klebsiella: a long way to go towards understanding this enigmatic jet-setter." Fprime reports **6**.
- Burkhardt, A., et al. (2016). "Status of the crystallography beamlines at PETRA III." European Physical Journal Plus **131**(3): 1-9.

- Bush, K. (2018). "Game Changers: New beta-Lactamase Inhibitor Combinations Targeting Antibiotic Resistance in Gram-Negative Bacteria." ACS Infect Dis **4**(2): 84-87.
- Bush, K. and P. A. Bradford (2016). "beta-Lactams and beta-Lactamase Inhibitors: An Overview." Cold Spring Harb Perspect Med **6**(8).
- Canton, R., et al. (2012). "CTX-M enzymes: origin and diffusion." Frontiers in Microbiology **3**: 110.
- Chapman, H. N., et al. (2014). "Diffraction before destruction." Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences **369**(1647): 20130313.
- Chapman, H. N., et al. (2011). "Femtosecond X-ray protein nanocrystallography." Nature **470**(7332): 73-77.
- Chen, Y., et al. (2005). "Atomic resolution structures of CTX-M beta-lactamases: extended spectrum activities from increased mobility and decreased stability." J Mol Biol **348**(2): 349-362.
- Chen, Y., et al. (2005). "Structure, function, and inhibition along the reaction coordinate of CTX-M beta-lactamases." J Am Chem Soc **127**(15): 5423-5434.
- Chinnawirotpisan, P., et al. (2003). "Quinoprotein alcohol dehydrogenase is involved in catabolic acetate production, while NAD-dependent alcohol dehydrogenase in ethanol assimilation in *Acetobacter pasteurianus* SKU1108." Journal of Bioscience and Bioengineering **96**(6): 564-571.
- Cianci, M., et al. (2017). "P13, the EMBL macromolecular crystallography beamline at the low-emittance PETRA III ring for high- and low-energy phasing with variable beam focusing." Journal of Synchrotron Radiation **24**(1): 323-332.
- Czaplewski, L., et al. (2016). "Alternatives to antibiotics—a pipeline portfolio review." The Lancet Infectious Diseases **16**(2): 239-251.
- D'Andrea, M. M., et al. (2013). "CTX-M-type beta-lactamases: a successful story of antibiotic resistance." Int J Med Microbiol **303**(6-7): 305-317.
- D'Costa, V. and G. D. Wright (2009). Biochemical Logic of Antibiotic Inactivation and Modification. Antimicrobial Drug Resistance: 81-95.
- Dahal, R. H. and D. K. Chaudhary (2018). "Microbial Infections and Antimicrobial Resistance in Nepal: Current Trends and Recommendations." Open Microbiol J **12**: 230-242.
- Dong, Y. H. and L. H. Zhang (2005). "Quorum sensing and quorum-quenching enzymes." J Microbiol **43 Spec No**(1): 101-109.
- Ehmann, D. E., et al. (2013). "Kinetics of avibactam inhibition against Class A, C, and D beta-lactamases." J Biol Chem **288**(39): 27960-27971.
- Ehmann, D. E., et al. (2012). "Avibactam is a covalent, reversible, non-beta-lactam beta-lactamase inhibitor." Proc Natl Acad Sci U S A **109**(29): 11663-11668.
- Emsley, P. and K. Cowtan (2004). "Coot: model-building tools for molecular graphics." Acta Crystallogr D Biol Crystallogr **60**(Pt 12 Pt 1): 2126-2132.
- Fast, W. and P. A. Tipton (2012). "The enzymes of bacterial census and censorship." Trends Biochem Sci **37**(1): 7-14.
- Fleming, A. (1929). "On the Antibacterial Action of Cultures of a *Penicillium*, with Special Reference to Their Use in the Isolation of *B. Influenzae*." British Journal of Experimental Pathology **10**(3): 226-236.
- Flemming, H. C. and J. Wingender (2010). "The biofilm matrix." Nat Rev Microbiol **8**(9): 623-633.

- Franke, D., et al. (2017). "ATSAS 2.8: a comprehensive data analysis suite for small-angle scattering from macromolecular solutions." J Appl Crystallogr **50**(Pt 4): 1212-1225.
- Franke, D. and D. I. Svergun (2009). "DAMMIF, a program for rapid ab-initio shape determination in small-angle scattering." J Appl Crystallogr **42**(Pt 2): 342-346.
- Gasteiger, E., Hoogland, C., Gattiker, A., Wilkins, M. R., Appel, R. D., & Bairoch, A. (2005). "Protein identification and analysis tools on the ExPASy server." Humana press The proteomics protocols handbook: 571-607.
- Goeldner, M. and R. Givens (2006). Dynamic studies in biology: phototriggers, photoswitches and caged biomolecules, John Wiley & Sons.
- Grosdidier, A., et al. (2011). "Fast Docking Using the CHARMM Force Field with EADock DSS." Journal of Computational Chemistry **32**(10): 2149-2159.
- Grosdidier, A., et al. (2011). "SwissDock, a protein-small molecule docking web service based on EADock DSS." Nucleic Acids Res **39**(Web Server issue): W270-277.
- Habash, J., et al. (2000). "Direct determination of the positions of the deuterium atoms of the bound water in -concanavalin A by neutron Laue crystallography." Acta Crystallogr D Biol Crystallogr **56**(Pt 5): 541-550.
- Hall, C. W. and T. F. Mah (2017). "Molecular mechanisms of biofilm-based antibiotic resistance and tolerance in pathogenic bacteria." FEMS Microbiol Rev **41**(3): 276-301.
- Hauptman, H. A. (1991). "The Phase Problem of X-Ray Crystallography." Reports on Progress in Physics **54**(11): 1427-1454.
- Hecker, S. J., et al. (2015). Discovery of a cyclic boronic acid β -lactamase inhibitor (RPX7009) with utility vs class A serine carbapenemases, ACS Publications.
- Hentzer, M. and M. Givskov (2003). "Pharmacological inhibition of quorum sensing for the treatment of chronic bacterial infections." J Clin Invest **112**(9): 1300-1307.
- Holt, K. E., et al. (2015). "Genomic analysis of diversity, population structure, virulence, and antimicrobial resistance in *Klebsiella pneumoniae*, an urgent threat to public health." Proc Natl Acad Sci U S A **112**(27): E3574-3581.
- Hubbard, B. K. and C. T. Walsh (2003). "Der Aufbau von Vancomycin: so macht es die Natur." Angewandte Chemie **115**(7): 752-789.
- Ibuka, A. S., et al. (2003). "Crystal structure of extended-spectrum β -lactamase Toho-1: insights into the molecular mechanism for catalytic reaction and substrate specificity expansion." Biochemistry **42**(36): 10634-10643.
- Kabsch, W. (2010). "Xds." Acta Crystallogr D Biol Crystallogr **66**(Pt 2): 125-132.
- Kabsch, W. and C. Sander (1983). "Dictionary of protein secondary structure: pattern recognition of hydrogen-bonded and geometrical features." Biopolymers **22**(12): 2577-2637.
- Kalia, V. C. and H. J. Purohit (2011). "Quenching the quorum sensing system: potential antibacterial drug targets." Crit Rev Microbiol **37**(2): 121-140.
- Kaplun, A., et al. (2006). "Structure of the regulatory subunit of acetohydroxyacid synthase isozyme III from *Escherichia coli*." J Mol Biol **357**(3): 951-963.
- Kelly, S. M., et al. (2005). "How to study proteins by circular dichroism." Biochimica Et Biophysica Acta-Proteins and Proteomics **1751**(2): 119-139.

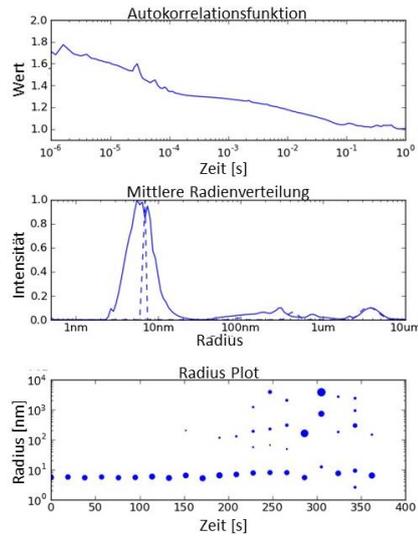
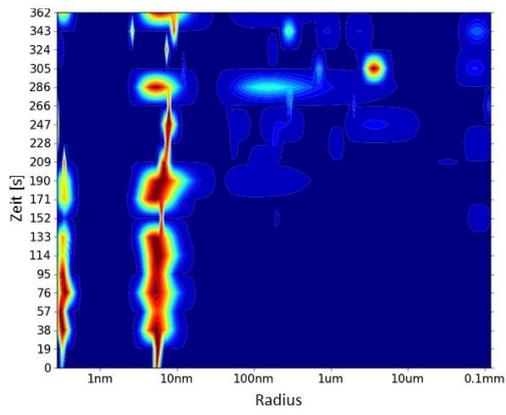
- Kikhney, A. G. and D. I. Svergun (2015). "A practical guide to small angle X-ray scattering (SAXS) of flexible and intrinsically disordered proteins." FEBS Lett **589**(19 Pt A): 2570-2577.
- Kimura, S., et al. (2004). "Role of a mutation at position 167 of CTX-M-19 in ceftazidime hydrolysis." Antimicrobial Agents and Chemotherapy **48**(5): 1454-1460.
- Kohanski, M. A., et al. (2010). "How antibiotics kill bacteria: from targets to networks." Nat Rev Microbiol **8**(6): 423-435.
- Kohanski, M. A., et al. (2007). "A common mechanism of cellular death induced by bactericidal antibiotics." Cell **130**(5): 797-810.
- Konarev, P. V., et al. (2003). "PRIMUS: a Windows PC-based system for small-angle scattering data analysis." Journal of Applied Crystallography **36**(5): 1277-1282.
- Kotaka, M., et al. (2006). "Structures of R- and T-state Escherichia coli aspartokinase III. Mechanisms of the allosteric transition and inhibition by lysine." J Biol Chem **281**(42): 31544-31552.
- Kupitz, C., et al. (2017). "Structural enzymology using X-ray free electron lasers." Structural Dynamics-U **4**(4): 044003.
- Kurihara, K., et al. (2004). "Neutron crystallographic study on rubredoxin from Pyrococcus furiosus by BIX-3, a single-crystal diffractometer for biomacromolecules." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(31): 11215-11220.
- Kuzin, A. P., et al. (1999). "Structure of the SHV-1 beta-lactamase." Biochemistry **38**(18): 5720-5727.
- Langan, P. S., et al. (2018). "Substrate Binding Induces Conformational Changes in a Class A β -lactamase That Prime It for Catalysis." ACS Catalysis **8**(3): 2428-2437.
- Lebedev, A. A., et al. (2012). "JLigand: a graphical tool for the CCP4 template-restraint library." Acta Crystallogr D Biol Crystallogr **68**(Pt 4): 431-440.
- Liebschner, D., et al. (2019). "Macromolecular structure determination using X-rays, neutrons and electrons: recent developments in Phenix." Acta Crystallographica Section D-Structural Biology **75**(10): 861-877.
- Lin, J., et al. (2015). "Mechanisms of antibiotic resistance." Front Microbiol **6**: 34.
- Livermore, D. M. and N. Woodford (2006). "The beta-lactamase threat in Enterobacteriaceae, Pseudomonas and Acinetobacter." Trends Microbiol **14**(9): 413-420.
- Madeira, F., et al. (2019). "The EMBL-EBI search and sequence analysis tools APIs in 2019." Nucleic Acids Res **47**(W1): W636-W641.
- Mancuso, A. P., et al. (2019). "The Single Particles, Clusters and Biomolecules and Serial Femtosecond Crystallography instrument of the European XFEL: initial installation." J Synchrotron Radiat **26**(Pt 3): 660-676.
- Matthews, B. W. (1968). "Solvent content of protein crystals." J Mol Biol **33**(2): 491-497.
- McCoy, A. J., et al. (2007). "Phaser crystallographic software." J Appl Crystallogr **40**(Pt 4): 658-674.
- Meents, A., et al. (2013). Development of an in-vacuum x-ray microscope with cryogenic sample cooling for beamline P11 at PETRA III. X-Ray Nanoimaging: Instruments and Methods, International Society for Optics and Photonics.
- Miller, M. B. and B. L. Bassler (2001). "Quorum sensing in bacteria." Annu Rev Microbiol **55**(1): 165-199.

- Minasov, G., et al. (2002). "An ultrahigh resolution structure of TEM-1 β -lactamase suggests a role for Glu166 as the general base in acylation." Journal of the American Chemical Society **124**(19): 5333-5340.
- Moffat, K. (1989). "Time-resolved macromolecular crystallography." Annu Rev Biophys Biophys Chem **18**(1): 309-332.
- Munita, J. M. and C. A. Arias (2016). "Mechanisms of Antibiotic Resistance." Microbiol Spectr **4**(2).
- Munoz-Price, L. S., et al. (2013). "Clinical epidemiology of the global expansion of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases." The Lancet Infectious Diseases **13**(9): 785-796.
- Murshudov, G. N., et al. (1997). "Refinement of macromolecular structures by the maximum-likelihood method." Acta Crystallogr D Biol Crystallogr **53**(Pt 3): 240-255.
- Navon-Venezia, S., et al. (2017). "*Klebsiella pneumoniae*: a major worldwide source and shuttle for antibiotic resistance." FEMS Microbiol Rev **41**(3): 252-275.
- Nealson, K. H. (1979). "Alternative Strategies of Symbiosis of Marine Luminous Fishes Harboring Light-Emitting Bacteria." Trends in Biochemical Sciences **4**(5): 105-110.
- Nealson, K. H. and J. W. Hastings (1979). "Bacterial bioluminescence: its control and ecological significance." Microbiol Rev **43**(4): 496-518.
- Nichols, D. A., et al. (2015). "Ligand-Induced Proton Transfer and Low-Barrier Hydrogen Bond Revealed by X-ray Crystallography." J Am Chem Soc **137**(25): 8086-8095.
- Nienhaus, K., et al. (2005). "Structural basis for photo-induced protein cleavage and green-to-red conversion of fluorescent protein EosFP." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(26): 9156-9159.
- Olmos, J. L., Jr., et al. (2018). "Enzyme intermediates captured "on the fly" by mix-and-inject serial crystallography." BMC Biol **16**(1): 59.
- Paczosa, M. K. and J. Meccas (2016). "*Klebsiella pneumoniae*: Going on the Offense with a Strong Defense." Microbiol Mol Biol Rev **80**(3): 629-661.
- Palzkill, T. (2018). "Structural and Mechanistic Basis for Extended-Spectrum Drug-Resistance Mutations in Altering the Specificity of TEM, CTX-M, and KPC beta-lactamases." Front Mol Biosci **5**: 16.
- Panjikar, S., et al. (2005). "Auto-Rickshaw: an automated crystal structure determination platform as an efficient tool for the validation of an X-ray diffraction experiment." Acta Crystallographica Section D-Structural Biology **61**(4): 449-457.
- Pankey, G. A. and L. D. Sabath (2004). "Clinical relevance of bacteriostatic versus bactericidal mechanisms of action in the treatment of Gram-positive bacterial infections." Clin Infect Dis **38**(6): 864-870.
- Papp-Wallace, K. M. and R. A. Bonomo (2016). "New beta-Lactamase Inhibitors in the Clinic." Infect Dis Clin North Am **30**(2): 441-464.
- Petrova, O. E. and K. Sauer (2016). "Escaping the biofilm in more than one way: desorption, detachment or dispersion." Current opinion in microbiology **30**: 67-78.
- Philipp, M. and M. L. Bender (1971). "Inhibition of serine proteases by arylboronic acids." Proc Natl Acad Sci U S A **68**(2): 478-480.
- Philippon, A., et al. (2016). "A Structure-Based Classification of Class A beta-Lactamases, a Broadly Diverse Family of Enzymes." Clin Microbiol Rev **29**(1): 29-57.

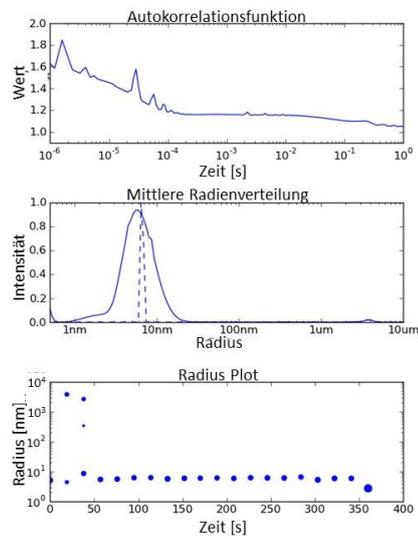
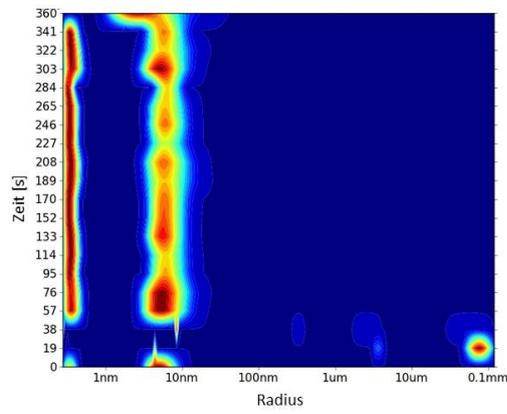
- Pitout, J. D., et al. (2015). "Carbapenemase-Producing *Klebsiella pneumoniae*, a Key Pathogen Set for Global Nosocomial Dominance." *Antimicrob Agents Chemother* **59**(10): 5873-5884.
- Poehlsgaard, J. and S. Douthwaite (2005). "The bacterial ribosome as a target for antibiotics." *Nature Reviews Microbiology* **3**(11): 870-881.
- Pohnert, G., et al. (1999). "Regulation of phenylalanine biosynthesis. Studies on the mechanism of phenylalanine binding and feedback inhibition in the *Escherichia coli* P-protein." *Biochemistry* **38**(38): 12212-12217.
- Rayment, I. (2002). "Small-scale batch crystallization of proteins revisited: an underutilized way to grow large protein crystals." *Structure* **10**(2): 147-151.
- Schauder, S. and B. L. Bassler (2001). "The languages of bacteria." *Genes Dev* **15**(12): 1468-1480.
- Schlichting, I., et al. (1990). "Time-resolved X-ray crystallographic study of the conformational change in Ha-Ras p21 protein on GTP hydrolysis." *Nature* **345**(6273): 309-315.
- Schmidt, M. (2013). "Mix and Inject: Reaction Initiation by Diffusion for Time-Resolved Macromolecular Crystallography." *Advances in Condensed Matter Physics* **2013**.
- Schuller, D. J., et al. (1995). "The Allosteric Ligand Site in the V-Max-Type Cooperative Enzyme Phosphoglycerate Dehydrogenase." *Nature Structural Biology* **2**(1): 69-76.
- Sivia, D. S. (2011). *Elementary scattering theory: for X-ray and neutron users*, Oxford University Press.
- Smoum, R., et al. (2012). "Boron Containing Compounds as Protease Inhibitors." *Chemical Reviews* **112**(7): 4156-4220.
- Sougakoff, W., et al. (2002). "Structure of the imipenem-hydrolyzing class A beta-lactamase SME-1 from *Serratia marcescens*." *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **58**(Pt 2): 267-274.
- Sreerama, N. and R. W. Woody (2000). "Estimation of protein secondary structure from circular dichroism spectra: comparison of CONTIN, SELCON, and CDSSTR methods with an expanded reference set." *Anal Biochem* **287**(2): 252-260.
- Stevens, A. M., et al. (1994). "Synergistic binding of the *Vibrio fischeri* LuxR transcriptional activator domain and RNA polymerase to the lux promoter region." *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**(26): 12619-12623.
- Stoddard, B. L., et al. (1998). "Millisecond Laue structures of an enzyme-product complex using photocaged substrate analogs." *Nature structural molecular biology* **5**(10): 891.
- Svergun, D. I. (1992). "Determination of the Regularization Parameter in Indirect-Transform Methods Using Perceptual Criteria." *Journal of Applied Crystallography* **25**(4): 495-503.
- Tan, K., et al. (2008). "Structures of open (R) and close (T) states of prephenate dehydratase (PDT)--implication of allosteric regulation by L-phenylalanine." *J Struct Biol* **162**(1): 94-107.
- Teng, T. Y. and K. Moffat (2000). "Primary radiation damage of protein crystals by an intense synchrotron X-ray beam." *J Synchrotron Radiat* **7**(Pt 5): 313-317.
- Tomasz, A. (1979). "The mechanism of the irreversible antimicrobial effects of penicillins: how the beta-lactam antibiotics kill and lyse bacteria." *Annual Reviews in Microbiology* **33**(1): 113-137.
- Torelli, N. J., et al. (2019). "Active-Site Druggability of Carbapenemases and Broad-Spectrum Inhibitor Discovery." *ACS Infect Dis* **5**(6): 1013-1021.
- Touw, W. G., et al. (2015). "A series of PDB-related databanks for everyday needs." *Nucleic Acids Res* **43**(Database issue): D364-368.

- Trcek, J., et al. (2007). "The highly tolerant acetic acid bacterium *Gluconacetobacter europaeus* adapts to the presence of acetic acid by changes in lipid composition, morphological properties and PQQ-dependent ADH expression." Extremophiles **11**(4): 627-635.
- Tremblay, L. W., et al. (2010). "Biochemical and structural characterization of *Mycobacterium tuberculosis* beta-lactamase with the carbapenems ertapenem and doripenem." Biochemistry **49**(17): 3766-3773.
- Tzouveleakis, L. S., et al. (2012). "Carbapenemases in *Klebsiella pneumoniae* and other Enterobacteriaceae: an evolving crisis of global dimensions." Clin Microbiol Rev **25**(4): 682-707.
- Vagin, A. and A. Teplyakov (1997). "MOLREP: an automated program for molecular replacement." Journal of Applied Crystallography **30**(6): 1022-1025.
- Valera, M. J., et al. (2016). "GqqA, a novel protein in *Komagataeibacter europaeus* involved in bacterial quorum quenching and cellulose formation." Microb Cell Fact **15**: 88.
- Walsh, C. (2000). "Molecular mechanisms that confer antibacterial drug resistance." Nature **406**(6797): 775-781.
- Waters, C. M. and B. L. Bassler (2005). "Quorum sensing: cell-to-cell communication in bacteria." Annu Rev Cell Dev Biol **21**: 319-346.
- Waxman, D. J. and J. L. Strominger (1983). "Penicillin-binding proteins and the mechanism of action of beta-lactam antibiotics." Annu Rev Biochem **52**(1): 825-869.
- Wey, J. and P. Karpinski (2002). Batch crystallization. Handbook of Industrial Crystallization, Elsevier: 231-248.
- White, T. A., et al. (2012). "CrystFEL: a software suite for snapshot serial crystallography." Journal of Applied Crystallography **45**(2): 335-341.
- Wiedorn, M. O., et al. (2018). "Megahertz serial crystallography." Nat Commun **9**(1): 4025.
- Williams, C. J., et al. (2018). "MolProbity: More and better reference data for improved all-atom structure validation." Protein Sci **27**(1): 293-315.
- Winn, M. D., et al. (2011). "Overview of the CCP4 suite and current developments." Acta Crystallogr D Biol Crystallogr **67**(Pt 4): 235-242.
- Wright, G. D. (2016). "Antibiotic adjuvants: rescuing antibiotics from resistance." Trends in microbiology **24**(11): 862-871.
- Yang, J. T., et al. (1986). [11] Calculation of protein conformation from circular dichroism. Methods in enzymology, Elsevier. **130**: 208-269.
- Yusef, D., et al. (2018). "Clinical characteristics and epidemiology of sepsis in the neonatal intensive care unit in the era of multi-drug resistant organisms: A retrospective review." Pediatr Neonatol **59**(1): 35-41.
- Zhanel, G. G., et al. (2018). "Imipenem–relebactam and meropenem–vaborbactam: two novel carbapenem-β-lactamase inhibitor combinations." Drugs **78**(1): 65-98.
- Zhu, J. and W. J. Brill (1981). "Temperature sensitivity of the regulation of nitrogenase synthesis by *Klebsiella pneumoniae*." J Bacteriol **145**(2): 1116-1118.

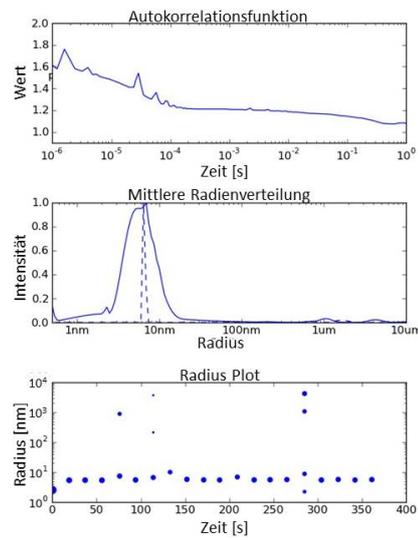
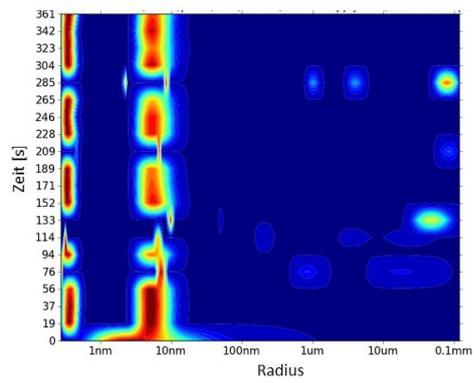
Bis Tris pH 6,5



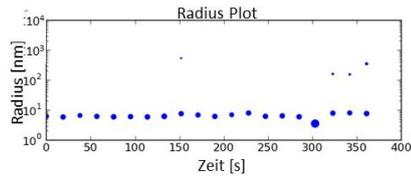
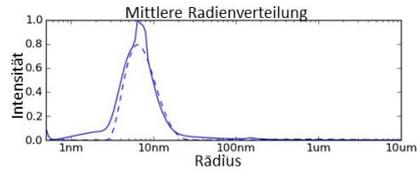
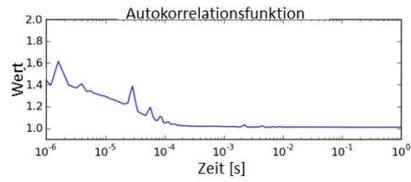
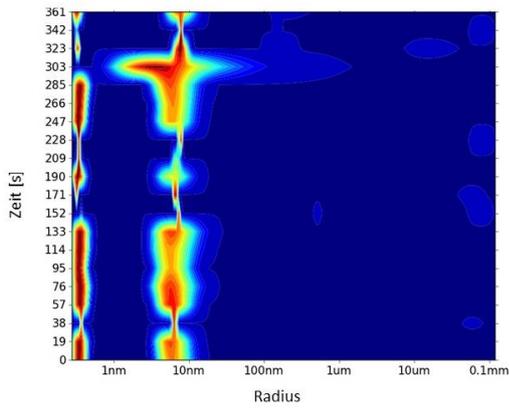
Hepes pH 7,0



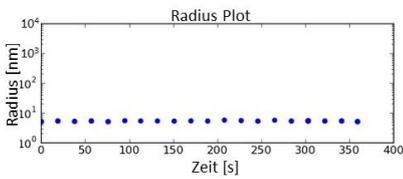
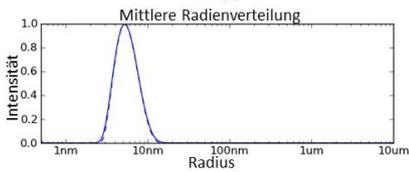
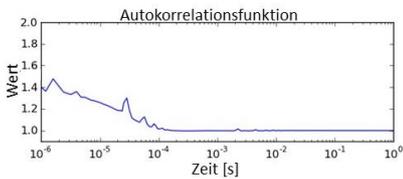
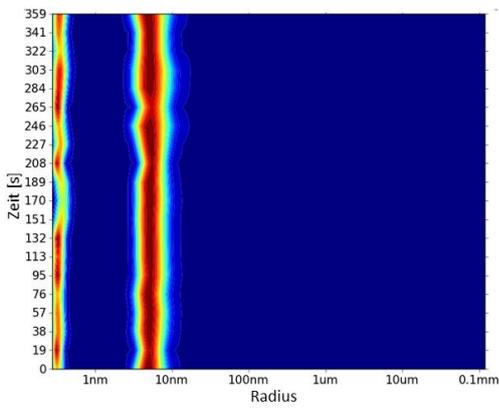
Hepes pH 7,5



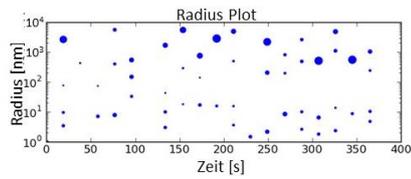
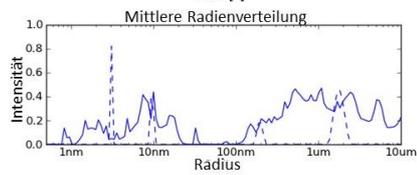
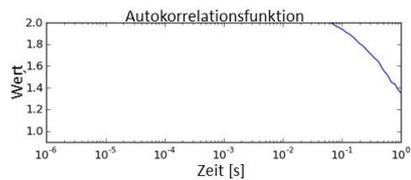
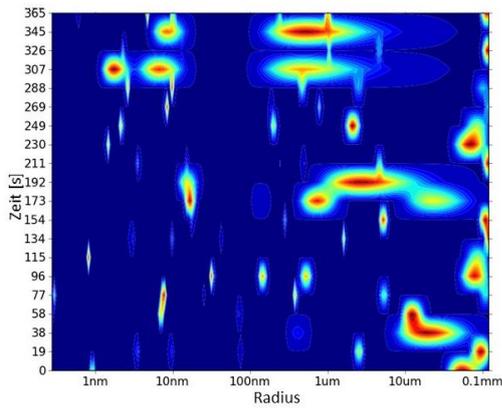
Hepes pH 8,0



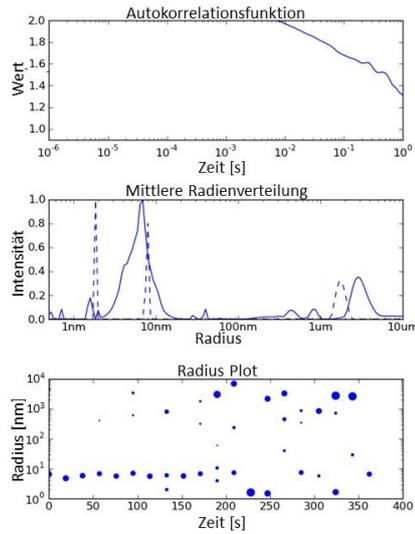
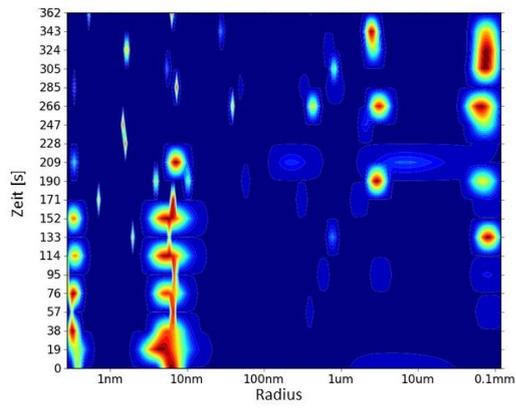
K₂HPO₄ pH 5,0



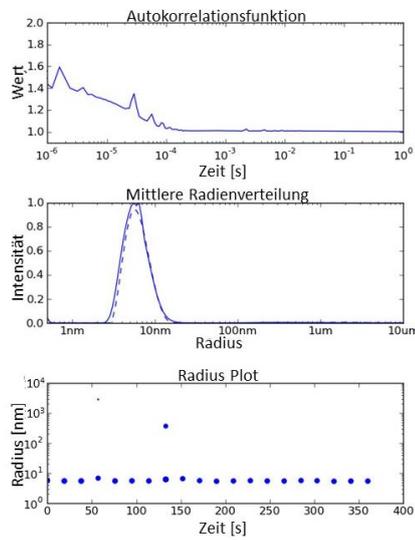
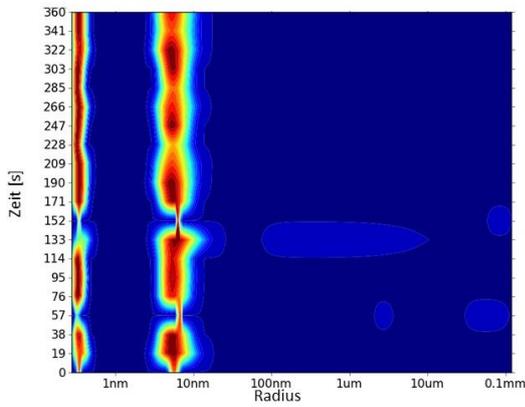
K₂HPO₄ pH 6,0



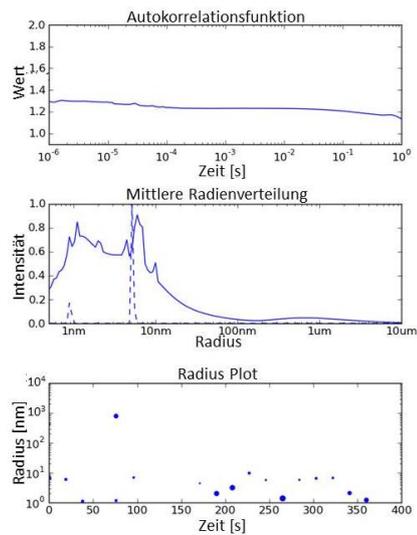
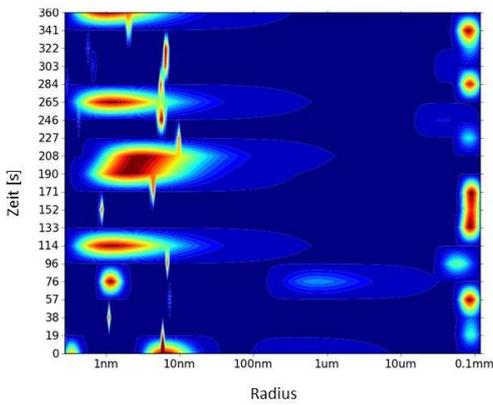
K₂HPO₄ pH 7,0



Natriumcitrat pH 4,7



Natriumcitrat pH 5,5



A3. Chemikalien und Gefahrstoffe

Chemikalien

Substanz	CAS-No.	GHS	H-Sätze	P-Sätze
Acrylamid	79-06-1	GHS06, GHS08	H301, H312, H315, H317, H319, H332, H340, H350, H316f, H372	P201, P280, P301+310, P305+351+338, P308+313
Agar	9002-18-0	-	-	-
Agarose	9012-36-6	GHS02	H226	P210, P240, P280, P303+261+353, P403+235, P501
Ammoniumacetat	631-61-8	GHS07	H315, H319, H335	P261, P280, P304+ P340, P305+351+ 338, P405, P501
Ammoniumchlorid	12125-02-9	GHS07	H302, H319	P305+351+338
Ammoniumsulfat	7783-20-2			
Ampicillin-Natriumsalz	69-52-3	GHS08	H334, H317	P280, P261, P302+352, P342+311
APS	7727-54-0	GHS03, GHS07, GHS08	H272, H302, H315, H317, H319, H334, H335	P280, P305+351+338, P302+352, P304+341, P342+311
Bicin	150-25-4	-	-	-
Biotin	58-85-5	-	-	-
Bis-Tris	6976-37-0	GHS07	H315, H319, H335	P261, P305+351+338
Bromphenolblau	115-39-9	-	-	-
Kalziumchlorid	10043-52-4	GHS07	H319	P305+351+338
CHES	103-47-9	GHS07	H319	P264, P280, P305+351+338, P337+313
Cobalt(II)chlorid		GHS07, GHS08, GHS09	H350i, H360F, H302, H317,	P201, P273, P280- P302+352, P304+340, P342+311

			H334, H341, H410	
Coomassie Brilliant Blau	6124-59-2	-	-	-
DTT	3483-12-3	GHS07	H302, H315, H319, H335	P302,352, P305+351+338
Essigsäure	64-19-7	GHS02, GHS05	H226, H314	P280, P305+351+338, P310
Ethanol	64-17-5	GHS02	H225, H319	P210, P240, P305+351+338, P403+233
Glucose	50-99-7	-	-	-
Glycerin	56-81-5	-	-	-
Glycin	56-40-6	-	-	-
Guanidium-Hydrochlorid	50-01-1	GHS07	H302, H315, H319	P305+351+388, P302+352
Harnstoff	57-13-6	-	-	-
Hefeextrakt	8013-01-2	-	-	-
HEPES	7365-45-9	-	-	-
Imidazol	288-32-4	GHS05, GHS07, GHS08	H302, H314, H360D	P201, P280, P301+P330+P331, P305+P351+P338, P308+P310
IPTG	367-93-1	-	-	-
D,L-Isoleucin	73-32-5	-	-	-
Isopropanol	67-63-0	GHS02, GHS07	H225, H319, H336	P210, P233, P240- P305+P351+P338, P403+P235
Kaliumchlorid	7447-40-7	-	-	-
Kaliumdihydrogenphosphat	7778-77-0	-	-	-
Kupfersulfat	7758-98-7	GHS07, GHS09	H302, H315, H319, H410	P273, P302+352, P305+351+338
L-Leucin	61-90-5	-	-	-
Lithiumchlorid	16712-20-2	GHS07	H302, H315, H319	P302+352, P305+351+338
Lithiumsulfat	10337-48-7	GHS07	H302, H319	P280, P301+P312+P330, P305+P351+P338, P337+P313
D,L-Lysin	70-54-2	-	-	-
Magnesiumchlorid	7791-18-6	-	-	-
Magnesiumsulfat	7487-88-9	-	-	-
Manganchlorid	7773-01-5	GHS07	H302	P264, P301+312, P330, P501
β-Mercaptoethanol	60-24-2	GHS05, GHS06,	H301+H331 , H310,	P273, P280, P302+P352,

		GHS08,	H315,	P304+P340,
		GHS09	H317, H318, H373, H410	P305+P351+P338, P308+P310
MES	4432-31-9	GHS07	H315, H319, H336	P261, P305+351+339
MOPS	1132-61-2	GHS07	H315, H319, H335	P261, P305, P351, P338
Natriumacetat	6131-90-4	-	-	-
Natriumbromid	7647-15-6	-	-	-
Natriumchlorid	7647-14-5	-	-	-
Natriumcitrat	6132-04-3	-	-	-
Natriumdihydrogenphosphat	10049-21-5	-	-	-
Natriumfluorid	7681-49-4	GHS06	H301, H315, H319	P302+352, P305+351+338, P308+310
Natriumhydroxid	1310-73-2	GHS05	H314	P280, P310, P305+351+338
Natriumiodid	7681-82-5	GHS09	H400	P273
Natriummalonat	141-95-7	-	-	-
Ni-NTA-Agarose		-	-	-
Nickel(II)chlorid	7791-20-0	GHS06, GHS08, GHS09	H350i, H360D, H341, H301, H331, H372, H315, H317, H334, H410	P273, P281, P302+352, P304+340, P309+310
Nickel (II)sulfat	10101-97-0	GHS07, GHS08, GHS09	H302, H332, H315, H317, H334, H341, H350i, H360D, H372, H410	P201, P273, P280, P302+352, P304+340, P308+313
PEG 1500	25322-68-3	-	-	-
PEG 3350	25322-68-3	-	-	-
PEG 8000	25322-68-3	-	-	-
L-Phenylalanin	63-91-2	-	-	-
Salzsäure	7647-01-0	GHS05, GHS07	H314, H335	P261, P280, P310, P305+351+338
SDS	151-21-3	GHS02, GHS06	H228, H302,	P210, P261, P280, P301+312+330,

			H311, H315, H319, H335	P305+351+338+310, P370+P378
Selenomethionin	3211-76-5	GHS06, GHS08, GHS09	H301, H331, H373, H410	P261, P273, P301+310, P311, P501
TEMED	110-18-9	GHS02, GHS05, GHS07	H225, H302, H314, H332	P261, P280, P305+351+338
Thiamin	59-43-8	-	-	-
L-Threonin	72-19-5	-	-	-
Tricin	5704-04-1	-	-	-
Tris	1185-53-1	GHS07	H315, H319, H335	P261, P305+351+338
Trypton	91079-40-2	-	-	-
D,L-Valin	516-06-3	-	-	-
Zinkchlorid	7646-85-7	GHS05, GHS07, GHS09	H302, H314, H410	P273, P280, P301+330+331, P305+351+338, P308+310

Kristallisationsscreens

Kristallisationsscreen	Anbieter	GHS	H-Sätze		P-Sätze	
ComPAS-Suite	Qiagen	GHS02, GHS06, GHS07, GHS08, GHS09	H225, H302, H315, H331, H332, H340, H350, H360FD, H373, H411	H301, H319,	P101, P270, P273, P280, P305+351+338, P309+311, P313	P201,
JCSG-plus	Molecular Dimensions	GHS02, GHS05, GHS06, GHS07, GHS08, GHS09	H225, H312, H315, H331, H335, H411	H301, H318,	P101, P270, P273, P280, P305+351+338, P309+311, P313	P201,
PACT premier	Molecular Dimensions	GHS06	H301, H412	H331,	P101, P273, P280, P309+311	P270,

GHS und Gefahrensymbole



Abbildung 63: GHS Piktogramme. Zusammenfassung aller GHS Piktogramme mit ihrer entsprechenden Nomenklatur.

H-Sätze

- H225 Flüssigkeit und Dampf leicht entzündbar.
- H226 Flüssigkeit und Dampf entzündbar.
- H228 Entzündbarer Feststoff.
- H271 Kann Brand oder Explosion verursachen; starkes Oxidationsmittel.
- H272 Kann Brand verstärken; Oxidationsmittel.
- H290 Kann gegenüber Metallen korrosiv sein.
- H301 Giftig bei Verschlucken.
- H302 Gesundheitsschädlich bei Verschlucken.
- H302+332 Gesundheitsschädlich bei Verschlucken oder Einatmen.
- H310 Lebensgefahr bei Hautkontakt.
- H311 Giftig bei Hautkontakt.
- H312 Gesundheitsschädlich bei Hautkontakt.
- H314 Verursacht schwere Verätzungen der Haut und schwere Augenschäden.
- H315 Verursacht Hautreizungen.
- H317 Kann allergische Hautreaktionen verursachen.
- H318 Verursacht schwere Augenschäden.
- H319 Verursacht schwere Augenreizung.
- H330 Lebensgefahr bei Einatmen.
- H332 Gesundheitsschädlich bei Einatmen.
- H334 Kann bei Einatmen Allergie, asthmaartige Symptome oder Atembeschwerden verursachen.
- H335 Kann die Atemwege reizen.
- H336 Kann Schläfrigkeit und Benommenheit verursachen.

- H340 Kann genetische Defekte verursachen.
- H341 Kann vermutlich genetische Defekte verursachen.
- H350 Kann Krebs erzeugen.
- H350i Kann bei Einatmen Krebs erzeugen.
- H351 Kann vermutlich Krebs erzeugen.
- H360 Kann die Fruchtbarkeit beeinträchtigen oder das Kind im Mutterleib schädigen
- H361d Kann vermutlich das Kind im Mutterleib schädigen.
- H361f Kann vermutlich die Fruchtbarkeit beeinträchtigen.
- H372 Schädigt die Organe bei längerer oder wiederholter Exposition.
- H400 Sehr giftig für Wasserorganismen.
- H410 Sehr giftig für Wasserorganismen mit langfristiger Wirkung.

P-Sätze

- P201 Vor Gebrauch besondere Anweisungen einholen.
- P210 Von Hitze, heißen Oberflächen, Funken, offenen Flammen sowie anderen Zündquellenarten fernhalten. Nicht rauchen.
- P220 Von Kleidung/ brennbaren Materialien fernhalten/entfernt aufbewahren.
- P233 Behälter dicht verschlossen halten.
- P260 Staub / Rauch / Gas / Nebel / Dampf / Aerosol nicht einatmen.
- P261 Einatmen von Staub / Rauch / Gas / Nebel / Dampf / Aerosol vermeiden.
- P264 Nach Gebrauch ... gründlich waschen.
- P273 Freisetzung in die Umwelt vermeiden.
- P280 Schutzhandschuhe / Schutzkleidung / Augenschutz / Gesichtsschutz tragen.
- P301+310 Bei Verschlucken: Sofort Giftinformationszentrum, Arzt oder ... anrufen.
- P301+330+331 Bei Verschlucken: Mund ausspülen. Kein Erbrechen herbeiführen.
- P302+352 Bei Kontakt mit der Haut: Mit viel Wasser und Seife waschen.
- P303+361+353 Bei Kontakt mit der Haut (oder dem Haar): Alle beschmutzten, getränkten Kleidungsstücke sofort ausziehen. Haut mit Wasser abwaschen/duschen.
- P304+340 Bei Einatmen: Die Person an die frische Luft bringen und für ungehinderte Atmung sorgen.
- P305+351+338 Bei Kontakt mit den Augen: Einige Minuten lang behutsam mit Wasser spülen. Vorhandene Kontaktlinsen nach Möglichkeit entfernen. Weiter spülen.
- P308+313 Bei Exposition oder falls betroffen: Ärztlichen Rat einholen / ärztliche Hilfe

- hinzuziehen.
- P310 Sofort Giftinformationszentrum, Arzt oder ... anrufen.
- P320 Besondere Behandlung dringend erforderlich (siehe ... auf diesem
 Kennzeichnungsetikett).
- P321 Besondere Behandlung (siehe ... auf diesem Kennzeichnungsetikett).
- P337+313 Bei anhaltender Augenreizung: Ärztlichen Rat einholen / ärztliche Hilfe
 hinzuziehen.
- P342+311 Bei Symptomen der Atemwege: Giftinformationszentrum, Arzt oder ... anrufen.
- P361 Alle kontaminierten Kleidungsstücke sofort ausziehen.
- P403+322 Behälter dicht verschlossen an einem gut belüfteten Ort aufbewahren.
- P405 Unter Verschluss aufbewahren.
- P501 Inhalt/Behälter ... zuführen.

A4. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Wirkungsweise verschiedener Antibiotikaklassen auf eine Bakterienzelle.	7
Abbildung 2: Markteinführung verschiedener Antibiotika und Auftreten erster Resistenzen .	9
Abbildung 3: Mechanismen der Antibiotika-Resistenz.....	10
Abbildung 4: Mechanismus der Inhibierung durch eine Serin- β -Lactamase.....	13
Abbildung 5 Chemische Strukturen ausgewählter β -Lactamase Inhibitoren	15
Abbildung 6: SDS-PAGE-Analyse, Expression von CTX-M-14 auf einem 12 %igen Polyacrylamidtrenngel	35
Abbildung 7: Reinigung von CTX-M-14	36
Abbildung 8: Ergebnisse der DLS-Messungen von CTX-M-14.....	37
Abbildung 9 Messung des Circular dichroismus von CTX-M-14	38
Abbildung 10: Thermofluor Puffertest.....	39
Abbildung 11: Thermofluor Salzttest.....	40
Abbildung 12: Phasendiagramm der Kristallisation mittels Dampfdiffusion.....	42
Abbildung 13: Kristalle von CTX-M-14.....	44
Abbildung 14: Kristallwachstum von CTX-M-14 innerhalb von fünf Tagen	45
Abbildung 15: On-Chip Kristallisation von CTX-M14.....	46
Abbildung 16: Beugungsbild von CTX-M-14 aufgenommen am EuXFEL	50
Abbildung 17: Indizierung der EuXFEL-Daten	51
Abbildung 18: Bestimmung der Zellkonstanten der XFEL-Messung.....	51
Abbildung 19: Sekundärstruktur von CTX-M-14	53
Abbildung 20: Tertiärstruktur von CTX-M-14.....	54
Abbildung 21 Bindung von Avibactam an das aktive Zentrum	55
Abbildung 22: Wechselwirkungen von Avibactam im aktiven Zentrum von CTX-M-14.....	55
Abbildung 23: Elektrostatisches Potential der Substratbindungstasche von CTX-M-14.....	56
Abbildung 24: Überlagerung der über Synchrotron- und XFEL-Strahlung gelösten Strukturen von CTX-M-14.....	57
Abbildung 25: Chemische Strukturen von Borsäure, Vaborbactam und Bortezomib.	58
Abbildung 26: Bindung von Bortezomib an CTX-M-14	60
Abbildung 27: Vergleich der Strukturen von CTX-M-14 mit gebundener Borsäure bzw. Bortezomib und CTX-M-15 mit gebundenem Vaborbactam	61
Abbildung 28: Wechselwirkungen von Borsäure im aktiven Zentrum von CTX-M-14	61

Abbildung 29: Wechselwirkungen von Bortezomib im aktiven Zentrum von CTX-M-14.....	62
Abbildung 30: Wechselwirkungen von Vaborbactam im aktiven Zentrum von CTX-M-14.	62
Abbildung 31: Sequenzvergleich ausgewählter β -Lactamasen der Klasse A.....	64
Abbildung 32: Strukturvergleich ausgewählter β -Lactamasen der Klasse A	65
Abbildung 33: Schematische Darstellung des Quorum Sensing am Beispiel des LuxI/LuxR- Systems.....	72
Abbildung 34: Bildung eines Biofilms auf einer Oberfläche.....	73
Abbildung 35: Übersicht der Angriffspunkte verschiedener Enzymklassen auf N- Acylhomoserinlactone.....	74
Abbildung 36: Mechanismen des Abbaus von Quorum Sensing Signalen durch unterschiedliche Enzyme	75
Abbildung 37: Phylogenetischer Baum verschiedener Quorum Quenching Enzyme.....	76
Abbildung 38: SDS-PAGE-Analyse, Expression von GqqA auf einem 12 %igen Polyacrylamidtrenngel	86
Abbildung 39: SDS-PAGE Analyse der Reinigung mittels Nickel-NTA Matrix.	87
Abbildung 40: Gelfiltration von GqqA vor der Pufferoptimierung	88
Abbildung 41: Ergebnisse der Langzeit-DLS-Messungen von GqqA vor der Pufferoptimierung.	89
Abbildung 42: Optimierte Reinigung von GqqA.....	90
Abbildung 43: Ergebnisse der Langzeit-DLS-Messungen von GqqA nach der Pufferoptimierung.	90
Abbildung 44: Messung des Circular dichroismus von GqqA	91
Abbildung 45: SAXS-Modelle von GqqA.....	93
Abbildung 46: Kristallisation von GqqA.....	94
Abbildung 47: Diffraktionsbilder von GqqA-Kristallen.....	95
Abbildung 48: DLS-Messung von SeGqqA.....	97
Abbildung 49: SeGqqA Kristalle in verschiedenen Kristallisationsbedingungen	98
Abbildung 50: Bändermodell des GqqA-Dimers	99
Abbildung 51: Bändermodelle des GqqA-Monomers	99
Abbildung 52: Tetramerisierung von GqqA.....	100

Abbildung 53: Überlagerung des berechneten Ab-initio SAXS-Modells mit der gelösten Struktur.....	102
Abbildung 54: Überlagerung der Strukturen von GqqA und 2qmx	103
Abbildung 55: Sequenzvergleich von GqqA und der Prephenatdehydratase 2qmx	104
Abbildung 56: Mögliche Substratbindestellen von GqqA.....	105
Abbildung 57: Docking von N-octanoyl-L-homoserinlacton an Thr170.....	107
Abbildung 58: Docking von C8-HSL an Thr174.....	108
Abbildung 59: Bändermodell der räumlichen Anordnung benachbarter GqqA-Dimere im Kristallgitter und Vergrößerung von drei der Mutationsstellen	109
Abbildung 60: Aktivitätstest und Expression der Mutanten von GqqA.....	110
Abbildung 61: DLS- Messungen der GqqA Mutanten M1, M2 und M5.....	111
Abbildung 62: Proteinkristalle der Mutanten M2 und M5	112
Abbildung 63: GHS Piktogramme	129

A5. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Übersicht der Verbrauchsmaterialien	17
Tabelle 2 Allgemein eingesetzte Medien, Puffer und Lösungen.....	18
Tabelle 3 verwendete Puffer für die Reinigung von CTX-M-14	19
Tabelle 4 verwendete Puffer für Puffertest Thermofluor (jeweils 100 mM Endkonzentration)	19
Tabelle 5 verwendete Salze für Salzttest Thermofluor	20
Tabelle 6 Verwendeter Vektor für CTX-M14.....	21
Tabelle 7 Verwendete Bakterienstämme.....	21
Tabelle 8 Verwendete Geräte	22
Tabelle 9 Verwendete Software.....	23
Tabelle 10 Zusammensetzung der SDS-Gele. Volumenangaben für die Vorbereitung von 4 Gelen.	26
Tabelle 11: Datensammlung und Refinement Statistik von Synchrotrondaten	48
Tabelle 12: Datensammlung und Refinement Statistik von CTX-M-14, gemessen am EuXFEL52	
Tabelle 13: Datensammlung.....	59
Tabelle 14: Vergleich ausgewählter β -Lactamasen mit CTX-M-14	63
Tabelle 15: verwendete Medien und Puffer für GqqA.....	78
Tabelle 16 verwendete Puffer für Pufferoptimierung (jeweils 100 mM)	79
Tabelle 17 Verwendeter Vektor für GqqA	79
Tabelle 18 Einwaage der Aminosäurestammlösung. Die Aminosäuren wurden in 20 mL H ₂ O gelöst.	80
Tabelle 19: Parameter der SAXS-Messung.....	92
Tabelle 20: Statistik der Datensammlung und Auswertung von SeGqqA und GqqA Kristallen	95
Tabelle 21: Mutanten von GqqA.	109

DANKSAGUNG

Zunächst möchte ich mich ganz herzlich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. Christian Betzel für die Bereitstellung meiner Themen, die Betreuung während der gesamten Promotionszeit und die Begutachtung meiner Arbeit bedanken. Außerdem möchte ich mich für die Möglichkeit der Teilnahme an dem Workshop in Granada und den Messzeiten in den USA bedanken.

Mein weiterer Dank gilt Dr. Markus Perbandt als meinem Zweitbetreuer für die Anregungen und Unterstützung, die meine Arbeit vorangebracht haben.

Ich bedanke mich außerdem bei Prof. Dr. Torda für die Übernahme des Zweitgutachtens meiner Dissertation und meinen Disputationsgutachtern Prof. W. Streit und Dr. T. Hackl.

Ein großer Dank geht an Prof. Wolfgang Streit und Katrin Petersen für die Bereitstellung des GqqA-Plasmids und die gute Zusammenarbeit.

Ein weiterer Dank geht an Prof. Martin Aepfelbacher, Prof. Holger Rohde und Anna Both für die Bereitstellung des CTX-M-14-Plasmids und Andreas Prester für die Zusammenarbeit bei diesem Thema.

Ein großes Dankeschön geht an die Mitarbeiter der Beamlines P11 (DESY), P12 und P13 (EMBL) und des European XFELs in Hamburg sowie an BioCARS am APS, USA für die geduldige Unterstützung bei vielen Messzeiten.

Vielen lieben Dank auch an Prof. Winfried Hinrichs, der mir trotz seines Ruhestands noch immer Unterstützung und Anregungen lieferte.

Ein großer Dank geht auch an alle Mitglieder der Arbeitsgruppe für die Zusammenarbeit und gemeinsamen Erlebnisse und Erfahrungen.

Schließlich möchte ich mich ganz besonders bei meiner Familie bedanken, die mich auf meinem gesamten Weg immer unterstützt hat.

PUBLIKATIONEN

Wiedorn, M. O., Oberthür, D., Bean, R., Schubert, R., **Werner, N.**, Abbey, B., ... & Barty, A. (2018). Megahertz serial crystallography. *Nature communications*, 9(1), 4025.

Nadine Werner, Katrin Petersen, Pablo Perez Garcia, Jennifer Chow, Christel Vollstedt, Manolo Ferrer, Laura Fernandes, Sven Falke, Markus Perbandt, Winfried Hinrichs, Christian Betzel & Wolfgang R. Streit (2020). The *Komagataibacter europaeus* CECT 8546 GqqA protein resembles the paradigm of a novel type of acylase acting on N-Acyl homoserine lactones. *Scientific Reports*. In Preparation.

Werner, N., Prester, A., Rohde, H., Aepfelbacher, M., Oberthür, D., Perbandt, M., Betzel, C. (2020). Rediscovery of Bortezomib as boron-based lactamase inhibitor. In Preparation

EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG

„Hiermit versichere ich an Eides statt, die vorliegende Dissertation selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel benutzt zu haben. Die eingereichte schriftliche Fassung entspricht der auf dem elektronischen Speichermedium. Ich versichere, dass diese Dissertation nicht in einem früheren Promotionsverfahren eingereicht wurde.“

Hamburg, 24.01. 2020

Nadine Werner