

Technische Universität München  
Lehrstuhl für Mikrobiologie

**Biochemische Charakterisierung der *Francisella tularensis*  
gamma-Glutamyltranspeptidase als Target für die  
Entwicklung neuer Antiinfektiva**

Zohra Sahavi-Ouriaghi

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. Dirk Haller  
Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr. Thilo M. Fuchs  
2. Univ.-Prof. Dr. Markus Gerhard

Die Dissertation wurde am 01.12.2016 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 23.01.2017 angenommen.



**Inhaltsverzeichnis**

Zusammenfassung .....	1
Abstract .....	3
1 Einleitung .....	5
1.1 Tularämie.....	5
1.2 <i>Francisella tularensis</i> .....	5
1.2.1 Historischer Überblick und Taxonomie .....	5
1.2.2 Epidemiologie .....	7
1.3 Interaktionen zwischen Wirt und Erreger .....	9
1.3.1 Pathogenese.....	9
1.3.1.1 Intrazellulärer Zyklus .....	9
1.3.1.2 <i>Francisella</i> Pathogenitätsinsel .....	11
1.3.2 Angeborene und spezifische Immunantwort.....	12
1.4 Übertragungswege.....	16
1.5 Diagnostik und Klinik .....	17
1.6 Prophylaxe, Therapie und Impfung.....	19
1.6.1 Prophylaxe.....	20
1.6.2 Impfung .....	20
1.6.3 Therapie.....	21
1.7 <i>Francisella tularensis</i> als biologische Waffe.....	22
1.8 $\gamma$ -Glutamyltranspeptidase (gGT).....	23
1.8.1 Funktion und Vorkommen der gGTs .....	23
1.8.2 <i>Francisella tularensis</i> $\gamma$ -Glutamyltranspeptidase (FgGT) .....	26
1.9 Ziel der Arbeit .....	29
2 Material und Methoden .....	30
2.1 Material .....	30
2.1.1 Bakterienstämme und Plasmide .....	30

2.1.2	Oligodesoxynukleotide, Enzyme und Antikörper .....	31
2.1.3	Nährmedien, Lösungen, Puffer und Antibiotika .....	33
2.1.4	Chemikalien, Standards und Kits .....	39
2.1.5	Geräte und sonstige Materialien .....	40
2.2	Mikrobiologische Methoden.....	43
2.2.1	Vorbereitung von Geräten und Lösungen.....	43
2.2.2	Anzucht und Lagerung von <i>E. coli</i> -Stämmen.....	43
2.2.3	Herstellung chemisch kompetenter <i>E. coli</i> -Bakterien .....	43
2.2.4	Transformation chemisch kompetenter <i>E. coli</i> -Bakterien.....	44
2.2.5	Produktion rekombinanter Proteine in <i>E. coli</i> .....	44
2.2.5.1	Testexpression .....	44
2.2.5.2	Überexpression .....	44
2.2.5.3	Zellaufschluss .....	45
2.2.5.4	SUMO-Verdau.....	45
2.2.6	<i>Francisella</i> Fraktionierung .....	46
2.3	Molekularbiologische Methoden.....	47
2.3.1	PCR.....	47
2.3.2	DNA-Isolierung .....	50
2.3.3	Gelelektrophorese .....	50
2.3.4	Verdau mit Restriktionsendonukleasen .....	51
2.3.5	Ligation der DNA-Fragmente in Zielvektoren .....	51
2.3.6	Sequenzierung .....	51
2.4	FgGT Antikörperherstellung .....	51
2.4.1	Herstellung von monoklonalen Antikörpern .....	51
2.4.2	Herstellung von polyklonalen Antikörper .....	52
2.5	Proteinchemische Methoden.....	52

---

2.5.1	SDS-PAGE (Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese) .....	52
2.5.2	Westernblot .....	53
2.5.3	Chromatographische Verfahren .....	54
2.5.3.1	Affinitätschromatographie.....	54
2.5.3.2	Ionenaustauschchromatographie .....	55
2.5.3.3	Hydrophobe Interaktionschromatographie.....	57
2.5.3.4	Gelfiltrationschromatographie ( <i>Size Exclusion Chromatography</i> , SEC).....	58
2.5.4	Proteinkonzentrationsbestimmung .....	58
2.6	Analytische Methoden.....	60
2.6.1	Enzymkinetische Analyse / Aktivitätsassay .....	60
2.6.2	Inhibitor-Analyse.....	62
2.6.3	Entfaltungsassay .....	63
2.7	Kristallisation der FtgGT.....	64
2.8	Computerprogramme und Datenbanken .....	64
3	Ergebnisse .....	66
3.1	Klonierung und hetrologe Produktion verschiedener rekombinanter <i>Francisella</i> gGTs.....	66
3.1.1	Klonierung verschiedener rekombinanter <i>Francisella</i> gGTs.....	66
3.1.2	Heterologe Produktion bakterieller gGTs aus verschiedenen <i>Francisella</i> Spezies.....	70
3.1.2.1	Testexpression .....	70
3.1.2.2	Produktion und Reinigung der rekombinanten FgGT Proteine.....	71
3.2	Charakterisierung der <i>Francisella</i> gGT .....	74
3.2.1	Sequenzvergleich verschiedener gGTs .....	74
3.2.1.1	Enzymatische Aktivität und pH-Abhängigkeit der rekombinanten FgGTs .....	75

3.2.2	Lagerbedingungen für die rekombinante FtgGT .....	78
3.2.3	Test verschiedener Akzeptorsubstanzen.....	79
3.3	Assay Validierung .....	81
3.3.1	Qualität der Assay Reagenzien.....	81
3.3.1.1	Proteinreinheit > 80 %.....	82
3.3.1.2	Protein Stabilität .....	82
3.3.1.3	Reagenzienstabilität.....	83
3.3.2	Qualität der Messung.....	83
3.3.2.1	4 h Kinetik Messung.....	83
3.3.2.2	Korrelation von Kinetik- und Endpunktmessung.....	84
3.3.2.3	Signal / Hintergrund Verhältnis.....	85
3.3.2.4	Z' .....	86
3.3.3	Hochdurchsatztauglichkeit .....	86
3.3.3.1	Stabilität innerhalb der Messplatte und Readout-Stabilität .....	86
3.3.3.2	DMSO Toleranz .....	87
3.3.4	Orthogonaler Assay und Spezifitätsassay.....	87
3.4	Test von Inhibitoren <i>in vitro</i> .....	89
3.4.1	Screening von Substanzen .....	89
3.4.1.1	Screening der Priaxon Substanzbibliothek .....	89
3.4.1.2	Screening FtgGT spezifischer Substanzen .....	89
3.4.2	Test pAk als mögliche Inhibitoren .....	90
3.5	Röntgenkristallstruktur der <i>Francisella tularensis subsp. holarctica</i> gGT .....	92
3.5.1	Aufbereitung der FtgGT für die Röntgenkristall-Strukturanalyse.....	92
3.5.2	FtgGT Kristallstruktur und Vergleich zur <i>H. pylori</i> gGT .....	93
3.6	Reinigung endogener <i>Francisella tularensis subsp. holarctica</i> gGT .....	96

3.7	Lokalisation der endogenen <i>Francisella tularensis subsp. holarctica</i> gGT .....	100
3.7.1	Antikörper gegen die <i>Francisella tularensis subsp. holarctica</i> gGT .....	100
3.7.1.1	Monoklonale Antikörper .....	100
3.7.1.2	Polyklonale Antikörper .....	105
3.7.2	Lokalisation endogener <i>Francisella tularensis subsp. holarctica</i> gGT mittels Aktivitätsassay.....	107
3.7.2.1	Test der <i>Francisella</i> Fraktionen auf enzymatische Aktivität der FtgGT	107
4	Diskussion .....	109
4.1	Die biochemische Charakterisierung der <i>Francisella</i> $\gamma$ -Glutamyltranspeptidase	109
4.2	Die <i>Francisella</i> $\gamma$ -Glutamyltranspeptidase als Target für die Entwicklung von <i>Small Molecule Inhibitors</i> (SMIs).....	117
4.3	Antikörper als Inhibitoren oder FtgGT als Bestandteils eines Impfstoffes.....	122
5	Verzeichnisse.....	125
5.1	Abkürzungsverzeichnis .....	125
5.2	Abbildungsverzeichnis .....	130
5.3	Tabellenverzeichnis.....	134
5.4	Literaturverzeichnis.....	135
6	Anhang .....	144
6.1	Signalsequenz der klonierten und gereinigten <i>Francisella</i> gGTs .....	144
6.1.1	Sequenzierungsanalyse der klonierten <i>F. philomiragia</i> .....	149
6.2	Screening der verschiedener Substanzen im Aktivitätsassay .....	152
6.2.1	Ergebnisse der Priaxon Substanzbibliothek .....	152
6.2.2	Ergebnisse der spezifischen FtgGT Substanzen.....	172
	Danksagung.....	174



## Zusammenfassung

*Francisella tularensis* ist ein intrazelluläres Gram-negatives Bakterium, das die selten vorkommende Zoonose Tularämie verursacht, welche unbehandelt in 30-50 % der Fälle zum Tode führen kann. Die Schwere des Krankheitsverlaufes hängt von der Infektionsroute und der Menge des Erregers ab. Für eine Infektion sind 10-50 über die Luft übertragene Erreger ausreichend. Aufgrund der hohen Infektiosität und des möglichen tödlichen Krankheitsverlaufes wurde das Bakterium als biologische Waffe der Klasse A eingestuft.

Bisher ist kein Impfstoff gegen Tularämie für den Menschen zugelassen. Durch zunehmende Antibiotika-Resistenzen sind die Behandlungsmöglichkeiten der Tularämie zusätzlich limitiert. Diese Behandlungslücken könnten spezifische Antiinfektiva, sogenannte Pathoblocker, die das Bakterium nicht abtöten, sondern in seiner Infektiosität hemmen, füllen. In dieser Arbeit wurde die  $\gamma$ -Glutamyltranspeptidase der *Francisella tularensis* (FtgGT) als mögliches Target für die Entwicklung neuer Antiinfektiva untersucht. Das Enzym ist für das Wachstum des Bakteriums essentiell, da die FtgGT im Glutathionabbau eine Schlüsselrolle spielt und damit für die Cystein Versorgung des Bakteriums essentiell ist.

Zunächst wurden die Assaybedingungen des bisher beschriebenen Standard gGT Aktivitätsassays hinsichtlich der optimalen Enzymaktivität der FtgGT überprüft. Dabei zeigte sich, dass durch Zugabe eines Akzeptors die Reaktion nicht beschleunigt wird, wie es bisher in der Literatur für gGT anderer Spezies – z. B. gGT der *Helicobacter pylori* – beschrieben wurde. Auch in der Kristallstrukturanalyse, die im Rahmen dieser Arbeit in Zusammenarbeit mit Dr. Popowicz, Helmholtz Zentrum München, durchgeführt wurde, sind im Vergleich zur gGT von *Helicobacter pylori* (ca. 45 % identisch) Unterschiede zu erkennen. Bei einer sehr ähnlichen Gesamtfaltung beider Proteine unterscheidet sich die Orientierung der Aminosäureseitenketten im aktiven Zentrum erheblich. Dies erklärt die unterschiedlichen Abhängigkeiten von Akzeptorsubstanzen für die Transpeptidierungsreaktion.

Für die Suche nach spezifischen FtgGT Inhibitoren wurde dieser biochemische Aktivitätsassay nach den *European Federation of Pharmaceutical Industries and Associations* (EFPIA) Assay-Anforderungen validiert, um eine solide Grundlage für das Screenen von möglichen inhibitorischen Wirkstoffen zu bieten. Des Weiteren wurde dieser

Assay auch zur Lokalisation des endogenen Enzyms verwendet, nachdem die generierten monoklonalen und polyklonalen Antikörper keine ausreichende Spezifität und Sensitivität zeigten – mit Ausnahme eines Ratten-Hybridomaüberstandes, welcher nicht nachlieferbar war. Trotz eines vorhandenen Signalpeptides deuten die Ergebnisse zur Lokalisation darauf hin, dass das endogene Enzym FtgGT überwiegend im Cytosol lokalisiert ist.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden insgesamt 405 Substanzen aus der Substanzbibliothek von Priaxon, jedoch ohne einen Treffer (Hit), getestet. Auf der Basis einer eigenen hochaufgelösten FtgGT Kristallstruktur (Auflösung von 1,9 Å) konnten über ein *in silico* Screening weitere potentielle FtgGT Inhibitoren ausgewählt werden. Von den 87 Kandidaten wurden insgesamt 27 Substanzen getestet, die jedoch ebenfalls keine inhibitorische Wirkung auf die FtgGT zeigten. Für ein im Anschluss an diese Arbeit durchgeführte fragmentbasierte Suche nach FtgGT Inhibitoren wurde rekombinante FtgGT dem Kooperationspartner Dr. Popowicz (Helmholtz Zentrum München) zur Verfügung gestellt.

Zusätzlich zu den Substanzen wurden die bereits oben erwähnten generierten polyklonalen Antikörper im FgGT Aktivitätsassay getestet. Die erhaltenen Ergebnisse deuten darauf hin, dass die FtgGT durchaus als Antigen für die Induktion von aktivitätshemmenden Antikörpern dienen könnte. FtgGT könnte somit als Vakzin-Bestandteil eingesetzt werden.

Zusammenfassend liefert diese Arbeit durch die biochemische Charakterisierung, der Aufklärung der Kristallstruktur und der Etablierung eines FgGT Aktivitätsassay für das Screening eine solide Grundlage für die Suche nach FtgGT hemmenden Substanzen bzw. für die Wirkstoffentwicklung gegen Tularämie.

## Abstract

*Francisella tularensis* is an intracellular Gram-negative bacterium that causes tularemia, a rare zoonotic disease, which can result in a 30-50% mortality rate if left untreated. The clinical course of this disease depends on the route of infection and the infectious dose of bacteria. For an infection through the respiratory route, only 10-50 bacteria are sufficient. Due to its high virulence and its potential to lead to a lethal infection, *Francisella tularensis* has been classified by the US Centers for Disease Control and Prevention as a category A bioweapon.

To date, there is no licensed vaccine against *Francisella tularensis* for humans. Treatment options, however, are more and more limited due to increasing antibiotic resistance. These arising treatment gaps could be filled with specific anti-infectives, so-called pathoblockers, which do not kill the bacterium but inhibit its virulence. In this thesis,  $\gamma$ -glutamyltranspeptidase of *Francisella tularensis* (FtgGT) was characterized as a potential drug target for the development of new anti-infectives. This enzyme is crucial for bacterial growth since FtgGT plays a key role in generating the essential amino acid cysteine from glutathione and is therefore necessary for the cysteine supply in the bacteria.

Firstly, the assay conditions of the described standard gGT activity assay regarding the optimal enzyme activity of FtgGT were validated. It has been found that the reaction is not accelerated by adding an acceptor, as described in the literature for gGT of other species, such as gGT of *Helicobacter pylori*. Furthermore, in the crystal structure analysis, which was conducted in collaboration with Dr. Popowicz, Helmholtz Zentrum München, differences in comparison to gGT of *Helicobacter pylori* (approx. 45 % identical) have been found. The backbone structure of both proteins is very similar, but the orientation of the amino acid side chains in the active site is considerably different. This explains the different dependencies of acceptors for the transpeptidation reaction.

In order to search for specific FtgGT inhibitors, this biochemical activity assay was validated according to the European Federation of Pharmaceutical Industries and Associations (EFPIA) assay requirements. This provides a robust test system for the screening of potential specific inhibitors of FtgGT. Furthermore, this assay was also used to localize the endogenous enzyme after monoclonal and polyclonal antibodies did not

show sufficient specificity and sensitivity. Despite an existing signal peptide, the results for the localization experiments indicate that the endogenous enzyme FtgGT is predominantly localized in the cytosol.

In this thesis, a total of 405 substances from the Priaxon substance library were tested, yet without revealing a hit. Based on our own high-resolution FtgGT crystal structure (resolution of 1,9 Å), further potential FtgGT inhibitors could be selected via an *in silico* screening. A total of 27 substances of 87 candidates were tested, but they also showed no inhibitory effect on FtgGT. Recombinant FtgGT was provided for a fragment-based drug screen of FtgGT inhibitors.

In addition to these substances, the polyclonal antibodies mentioned above were tested in the FgGT activity assay. The results indicate that FtgGT could serve as an antigen for the induction of activity-inhibiting antibodies and thus could be used as a vaccine component.

In summary, the biochemical characterization, the elucidation of the crystal structure, and the establishment of an FgGT activity assay for the screening provided a sound foundation for the search of FtgGT inhibitory substances and for the development of the active substance against tularemia.

## 1 Einleitung

### 1.1 Tularämie

Die Tularämie, eine bakterielle Zoonose, wird durch Infektion mit dem Bakterium *Francisella* hervorgerufen. Nach einer Inkubationszeit von durchschnittlich 3-5 Tagen treten abrupt folgende Symptome auf: Fieber, Schüttelfrost, Halsschmerzen und Kopfschmerzen (Oyston, Sjostedt et al. 2004). Es sind aber auch Inkubationszeiten von mehreren Wochen beschrieben (Robert-Koch-Institut 2015). Weitere klinische Manifestationen und die Schwere des Krankheitsverlaufes hängen von der Infektionsroute, der Virulenz und der aufgenommenen Menge des Erregers ab. Der Erreger befällt nach dem Eindringen die Makrophagen des Wirtes, in denen er sich vermehrt und entzieht sich so der Kontrolle durch das menschliche Immunsystem. Der Krankheitsverlauf ohne Antibiose kann sich von Kopfschmerzen, Übelkeit, Lymphknotenschwellung bis hin zur Sepsis stark verschlechtern und schließlich im Endstadium zum Tode führen (WHO 2007). Unbehandelt liegt die Letalität bei 30-60 %, unter Antibiose immerhin noch bei 4-6 % bzw. 30 % (im Falle der typhösen Form). Die antibiotische Behandlung erfolgt in der Regel mit Gentamycin. Das Bakterium wurde von den Zentren für Krankheitskontrolle und Prävention (CDC, *Centers for Disease Control and Prevention*) als biologische Waffe eingestuft, da 10-50 Erreger zu einer erfolgreichen Infektion beim Menschen führen kann.

### 1.2 *Francisella tularensis*

#### 1.2.1 Historischer Überblick und Taxonomie

*Francisella tularensis* ist ein Gram-negatives, aerobes, unbewegliches, stäbchenförmiges Bakterium, welches erstmals 1911 von McCoy unter dem Namen „*Bacterium tularense*“ in Tulare County, Kalifornien (USA) aus Nagetieren mit einer pestähnliche Erkrankung isoliert und identifiziert wurde (Francis 1919, Sjostedt 2007). Es ist ein relativ kleines Bakterium mit einer Größe von 0,2-0,7 x 0,2 µm, welches keine Sporen bildet. Dieses fakultativ intrazelluläre Bakterium kann im Labor nur auf Spezialböden, die Cystein und Eisenverbindungen enthalten müssen, angezogen werden. Die optimalen Wachstumsbedingungen liegen bei einer Temperatur von 37 °C und einem pH-Wert zwischen 6,8-7,3. *Francisella tularensis* ist ein sehr widerstandsfähiger Organismus, der

bei niedrigen Temperaturen in Wasser, Heu, feuchter Erde oder in Tierkadavern überleben kann und die bakterielle Zoonose Tularämie verursacht. Der Name *Francisella* wurde zu Ehren von Dr. Edward Francis gegeben, da dieser in den 1920er Jahren entscheidende Erkenntnisse über das Bakterium, dessen Übertragung und den verursachten Krankheitsverlauf sammelte. Zu Anfang wurde *Francisella tularensis* jedoch aufgrund serologischer Studien in den Genus *Pasturella* eingegliedert (Hollis, Weaver et al. 1989, Sjostedt 2007). 1959 wurde das Bakterium aufgrund von Ergebnissen der DNA Hybridisierung in *Francisella tularensis* umbenannt und begründete ab da die eigene Familie *Francisellaceae*, in der gamma-Untergruppe der *Proteobacteria* (Ritter and Gerloff 1966, Sjostedt 2005). Dies wurde später durch 16S rRNA Sequenzierungsanalysen bestätigt, welche innerhalb des Genus *Francisella* eine Sequenzhomologie im 16S rRNA-Gen von mehr als 98 % ergaben (Forsman, Sandstrom et al. 1994). *Francisella* ist in fünf Spezies unterteilt: *F. tularensis*, *F. philomiragia*, *F. hispanienseis*, *F. noatunensis* und *F. asiatica*. Dabei handelt es sich bei den drei erstgenannten Spezies um Human- und Tierpathogene (Säuger) und bei *F. noatunensis*, *F. asiatica* um Fischpathogene. *F. noatunensis* Infektionen in Fischen verursachen eine Francisellosis und zeigen in Bezug auf Virulenzmechanismen und Wirtsantwort (*host response*) Ähnlichkeit zur *Francisella tularensis* Infektion in Säugern (Colquhoun and Duodu 2011). *F. hispanienseis* wurde bisher nur aus dem Blut eines Patienten isoliert (Bauerfeind, Kimmig et al. 2013). *F. philomiragia* gilt als selten und wenig virulent. *F. philomiragia* verursacht beim Menschen und Tieren entzündliche, granulomatöse Erkrankungen und trat bisher v. a. bei immungeschwächten Patienten auf, die mit Salz- oder Brackwasser (Atlantik und Mittelmeer) in Berührung kamen (WHO 2007, Bauerfeind, Kimmig et al. 2013). *F. tularensis* wird in vier Subspezies unterteilt, die sich genetisch, in ihren biochemischen Eigenschaften und hinsichtlich Verbreitungsgrad und Wirtspathogenität unterscheiden (Dennis, Inglesby et al. 2001, WHO 2007):

1. ***Francisella tularensis subsp. tularensis*** (Typ A) kommt in Nordamerika vor und ist bisher nur sporadisch in Europa nachgewiesen worden. Für Mensch und Tier (Säuger) ist es hochvirulent und wird überwiegend von Zecken und Stechfliegen übertragen.
2. ***Francisella tularensis subsp. holarctica*** (Typ B) hat eine geringere Virulenz für Mensch und Tier und kommt in der nördlichen Hemisphäre vor. Die Übertragung findet überwiegend über Wasser (Flüsse, Seen, Weiher) oder durch Arthropoden,

die als Vektoren dienen, statt. Der Typ B kommt in hasenartigen und kleinen Nagern vor und verursacht beim Menschen Tularämie mit einer geringeren Virulenz als die Tularämie, die von der Subspezies *tularensis* verursacht wird.

3. *Francisella tularensis subsp. novicida* kommt selten vor und wurde oft in Verbindung mit verunreinigtem Trinkwasser beobachtet. Dieser Keim ist hauptsächlich in den USA beschrieben, aber auch Fälle aus Australien und Spanien sind bekannt. Menschen werden durch Kontakt mit Nagetieren und Zecken infiziert.
4. *Francisella tularensis subsp. mediaasiatica* ist gering virulent und wurde bisher in Zentralasien beobachtet.

Menschen und Tiere werden überwiegend von den Subspezies *tularensis* und *holarctica* infiziert. Bei beiden Subspezies sind mehrere Subpopulationen mit unterschiedlicher Verbreitung und graduell unterschiedlicher Wirtspräferenz vorhanden (Bauerfeind, Kimmig et al. 2013).

### 1.2.2 Epidemiologie

Den ersten Meilenstein zur *Francisella* Epidemiologie lieferten Olsufiev et al. 1959, als sie feststellten, dass sich zwei verschiedene Subspezies mit unterschiedlicher Virulenz, in ihrer geographischen Verbreitung unterscheiden (Olsufiev, Emelyanova et al. 1959). Dabei handelte es sich um die *Francisella tularensis* Subspezies *tularensis* und *holarctica*. Wie bereits im vorherigen Abschnitt erwähnt wurde, hat *F. t. subsp. tularensis* eine höhere Virulenz als *F. t. subsp. holarctica*. Die Infektionen mit *F. t. subsp. tularensis* resultieren üblicherweise über den Kontakt mit Hasen, wohingegen Infektionen mit *F. t. subsp. holarctica* über Kontakt mit infiziertem Wasser wie Flüssen, Seen oder aquatischen Säugetieren wie Biber (Olsufiev, Emelyanova et al. 1959) erfolgen. Die möglichen Reservoirs sind kleine Säugetiere wie Mäuse, Wasserratten, Eichhörnchen, Kaninchen und Hasen. Bisher wurde bei über 250 Tierarten *Francisella* isoliert, was auf ein großes Wirtsspektrum hindeutet (Oyston, Sjostedt et al. 2004). Darunter sind Säugetiere, Vögel, Fische, Amphibien, Arthropoden und Protozoen enthalten. Die Infektion dieser Tiere wird durch Insektenstiche/-bisse von Zecken, Mücken, Flöhen oder durch Kontakt mit kontaminierter Umwelt verursacht. *Francisella* ist obligat wirtständig, kann aber auch in Endemiegebieten in Oberflächenwasser und Gewässersedimenten nachgewiesen werden und zumindest *F. t. subsp. holarctica* kann sich in aquatischen lebenden Protozoen vermehren (Bauerfeind, Kimmig et al. 2013).

Die endemischen Herde von *Francisella* liegen in Nordamerika sowie in Europa und Asien, wobei die wichtigsten Herde in den USA, Schweden und Russland liegen. Nachdem *Francisella* 1911 erstmalig in Kalifornien (USA) identifiziert wurde, konnte Tularämie in den USA regelmäßig beobachtet werden (Oyston, Sjostedt et al. 2004). Es werden durchschnittlich 125 Fälle pro Jahr in den USA gemeldet, wobei mehr als die Hälfte der Fälle in den Südstaaten Arkansas, Missouri, South Dakota und Oklahoma zu verzeichnen sind (Oyston, Sjostedt et al. 2004). In Europa liegen die endemischen Gebiete in den skandinavischen Ländern, in Tschechien, Slowakei, Österreich, Schweiz und Deutschland (Nordseeküste, Schleswig-Holstein, Mecklenburg und Mainfranken) (Bauerfeind, Kimmig et al. 2013). Die durch *Francisella* verursachte Tularämie kann auch als Epidemie mit mehr als 100 Fällen auftreten. Seit 2010 werden jährlich in Deutschland ca. 20 bis 30 humane Fälle an das Robert-Koch-Institut (RKI) übermittelt, jedoch muss mit einer relativ hohen Dunkelziffer gerechnet werden (Schmitt, Splettstosser et al. 2005, Splettstosser, Piechotowski et al. 2009), da die Erkrankung in vielen Fällen aufgrund des unterschiedlichen Verlaufes nicht erkannt wird. Auch Seroprävalenzstudien, bei der in Blutproben spezifische Antikörper nachgewiesen werden, deuten auf eine hohe Dunkelziffer hin. 2014 wurden 21 Fälle beschrieben und bis 25.02.2015 4 Fälle in Deutschland gemeldet (Robert-Koch-Institut 2015). Die jüngste Epidemie in Europa meldet das *Institute Public Health* (IPH) im Kosovo. Bei dem Tularämieausbruch sind 206 Fälle im Zeitraum Januar-Februar 2015 beobachtet worden, wobei der Ausbruch wahrscheinlich im November 2014 begann (Robert-Koch-Institut 2015). Tularämie wurde bis zu dem ersten Ausbruch 1999/2000 im Kosovo nicht beobachtet und ist seitdem endemisch geworden (Reintjes, Dedushaj et al. 2002, Grunow, Kalaveshi et al. 2012). Das Auftreten der Tularämie beim Menschen korreliert mit dem der geographischen Verbreitung bei Tieren (Bauerfeind, Kimmig et al. 2013). Zum Beispiel wurde in Schweden beobachtet, dass die erhöhte Häufigkeit der Tularämie bei Wölfen und Hasen mit dem Ausbruch von Tularämie bei Menschen korreliert (Tarnvik, Sandstrom et al. 1996). Eine Mensch-zu-Mensch Übertragung ist nicht bekannt. Besondere Gefährdung besteht für Jäger, Tierpräparatoren, Köche und Personen, welche in Landwirtschaft, mikrobiologischen Laboren oder Wildbrethandlungen arbeiten (Bauerfeind, Kimmig et al. 2013).

### 1.3 Interaktionen zwischen Wirt und Erreger

#### 1.3.1 Pathogenese

*Francisella* ist bisher in einer Vielzahl von Tieren nachgewiesen worden: Vögel, Reptilien, Fische, wirbellose Tiere sowie Säugetiere, inklusive dem Menschen. Außerhalb der Zellkultur wächst das fakultativ intrazelluläre Bakterium *Francisella* nur ausschließlich auf Spezialnährmedien, die Cystein und Eisenverbindungen enthalten.

*Francisella* infiziert verschiedene Zellen und kann sich in diesen vermehren, wobei primär Makrophagen, aber auch Neutrophile, dendritische Zellen, Hepatozyten und Epithelzellen infiziert werden (Pechous, McCarthy et al. 2009). Dabei erfolgt die Aufnahme über Phagozytose. Anschließend verlassen die Bakterien das Phagosom sehr rasch, um sich im Cytosol zu vermehren (Abbildung 1). Die Vermehrung in Makrophagen kann mehr als 1000 Replikationen umfassen (Anthony, Burke et al. 1991). Trotz der hohen Anzahl an Replikationen kann *F. tularensis* von polymorphonukleären Leukozyten phagozytisiert und getötet werden (Lofgren, Tarnvik et al. 1983, Lofgren, Tarnvik et al. 1984). Die bisherigen Daten deuten darauf hin, dass sich der intrazelluläre Transport von *Francisella tularensis* in den verschiedenen Zelltypen, Makrophagen, Neutrophilen, Epithelzellen und *Drosophila melanogaster* S2-Zellen, ähnelt (Asare and Kwaik 2010).

##### 1.3.1.1 Intrazellulärer Zyklus

Die Aufnahme von *Francisella* in die Wirtszelle wird durch verschiedene Rezeptoren vermittelt. Dabei wird *Francisella* über einen unüblichen Mechanismus der Phagozytose, der Looping-Phagozytose in Makrophagen aufgenommen (Clemens, Lee et al. 2005). Bei der Looping-Phagozytose wird durch den Phosphatidylinositol-3-Kinase Signalweg die Aktinstruktur verändert. Zudem ist diese von der Präsenz des Komplementfaktors C3 und dem Komplement-Rezeptors CR3 abhängig (Pechous, McCarthy et al. 2009). Die Aufnahme von *Francisella* in Zellen wird daneben auch von weiteren Rezeptoren vermittelt. Die Aufnahme bei Neutrophilen und dendritischen Zellen ist abhängig von der Opsonierung, wobei die Aufnahme in Makrophagen durch einen Opsonierungs-abhängigen und -unabhängigen Mechanismus möglich ist (Asare and Kwaik 2010). So werden z.B. nicht opsonierte *F. tularensis* von Makrophagen via Mannoserezeptoren aufgenommen (Schulert and Allen 2006). Antikörper-opsonierte *F. tularensis* werden von Makrophagen via FC gamma Rezeptoren (Balagopal, MacFarlane et al. 2006) aufgenommen.

Für die Vermehrung muss *F. tularensis* aus dem Phagosom ins Cytosol auswandern, wobei die Ansäuerung des Phagosoms für die Auswanderung essentiell ist. Wie bei anderen intrazellulären Pathogenen auch, begünstigt diese Ansäuerung die Aufnahme von Eisen aus dem Transferrin der Wirtszelle, welches für das Bakterienwachstum essentiell ist (Oyston, Sjostedt et al. 2004). Jedoch konnten in humanen Makrophagen lebende *F. tularensis* Erreger ausschließlich bei einem pH Wert von 6,7 gefunden werden (Clemens, Lee et al. 2004), sodass bisher der Mechanismus nicht erklärt werden konnte, wie *F. tularensis* ohne Ansäuerung Eisen beziehen kann (Oyston, Sjostedt et al. 2004). Ungefähr 15 Minuten nach Infektion gelingt es *F. tularensis* aus dem Phagosom in das Cytosol zu entkommen. Innerhalb des angesäuerten Kompartiments (Phagosoms) aktiviert *F. tularensis* Virulenzgene, die es *F. tularensis* ermöglichen die Phagosomenmembran zu zerstören, um somit ins Cytosol zu gelangen (Chong, Wehrly et al. 2008, Santic, Asare et al. 2008). Es gibt Hinweise darauf, dass ein Teil der Bakterien im Cytosol, durch Autophagozytose wieder in den endozytotischen Weg eintreten (Checroun, Wehrly et al. 2006). Dabei ist unklar, ob dieser Prozess eine adaptierte Strategie vom Bakterium oder ein Teil der zellulären Abwehr gegen die Infektion ist. Beobachtungen weisen darauf hin, dass die Bakterien durch Autophagozytose mit Nährstoffen versorgt werden (Steele, Brunton et al. 2013).

Sobald sich *F. tularensis* im Cytosol befindet, wird das Bakterium vom Inflammasom der Wirtszelle erkannt. Dabei werden pro-IL-1 und pro-IL-18 in ihre aktiven Formen gespalten (Asare and Kwaik 2010). Trotz der Aktivierung von Caspasen (die Apoptose induzieren) in der frühen Phase der Infektion (6-12 h post-Infektion) kann *F. tularensis* in der Wirtszelle überleben und sich vermehren. Dies ist möglich, da *F. tularensis* die Apoptose der Wirtszelle durch die Aktivierung von NF- $\kappa$ B und Ras, die das Zellüberleben stimulieren, hinauszögern kann (Santic, Pavokovic et al. 2010). Schlussendlich wird am Ende des Infektionszyklus durch die Induktion der Apoptose der Wirtszelle die cytoplasmatische Membran zerstört und die Bakterien werden aus der sterbenden Zelle freigesetzt, wodurch sie neue Zellen infizieren können. Eine Übersicht des intrazellulären Zyklus ist in der Abbildung 1 dargestellt.

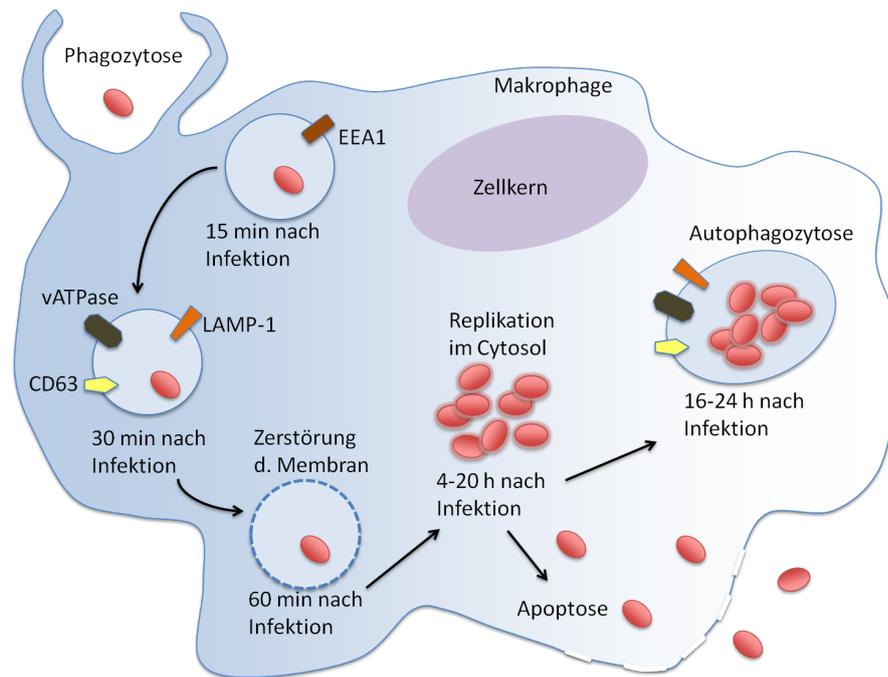


Abbildung 1 *F. tularensis* intrazellulärer Zyklus in einer Makrophage. *F. tularensis* wird über die Looping Phagozytose aufgenommen und verhindert die Reifung des Phagosoms. Dabei werden EEA1, LAMP-1, CD63 und vATPase rekrutiert. Mit Hilfe der vATPase wird das FCP (*Francisella* enthaltenes Phagosom) angesäuert und dadurch kann *F. tularensis* ins Cytosol der Makrophage entkommen. Im Cytosol vermehrt sich *F. tularensis* bzw. ein Anteil der *F. tularensis* tritt in die Autophagozytose ein. Die Apoptose der Makrophage wird induziert und somit die cytoplasmatische Membran zerstört. *F. tularensis* kann neue Zellen befallen. (abgewandelt von Oysten, Sjostedt et al. 2004; Pechous, McCarthy et al. 2009; Asare and Kuwaik 2010)

### 1.3.1.2 *Francisella* Pathogenitätsinsel

Asare und Kwaik haben die bisher insgesamt bekannten 268 Genprodukte, die für die Replikation von *F. tularensis* in Säugetierzellen wichtig sind, aufgelistet (Asare and Kwaik 2010). Darunter sind auch die Proteine und deren Regulatoren der *Francisella* Pathogenitätsinsel (FPI, *Francisella* Pathogenicity Island). Die meisten dieser Virulenzfaktoren haben eine wichtige Funktion für das Überleben in der Wirtszelle. Einige der FPI Produkte bilden zusammen ein Typ VI-ähnliches Sekretionssystem durch das Effektorproteine (wie z.B. IglI) ins Cytosol der Wirtszelle gelangen und die Biogenese des *Francisella*-enthaltenen Phagosoms (FCP, *Francisella*-containing phagosome) regulieren, und somit dem Bakterium ermöglichen die Phagosommembran zu zerstören und ins Cytosol zu gelangen (Golovliov, Baranov et al. 2003, Santic, Molmeret et al. 2007, Barker, Chong et al. 2009, Schmerk, Duplantis et al. 2009). Andere Proteine der FPI sind wichtig für die Replikation, haben aber keinen Einfluss auf das Entkommen ins Wirtscytosol, wie z.B. IglD (Santic, Molmeret et al. 2007). Obwohl manche Virulenzfaktoren bekannte Signalwege aktivieren, ist die Funktion der meisten Virulenzfaktoren nicht bekannt (Asare and Kwaik 2010).

### 1.3.2 Angeborene und spezifische Immunantwort

Die angeborene Immunantwort spielt bei der schnellen Erkennung und Abtötung von eindringenden Erregern eine wichtige Rolle. Eindringende Krankheitserreger werden dabei von den Zellen der angeborenen Immunantwort, wie Makrophagen, Neutrophile und dendritische Zellen durch Phagozytose und Induktion der Entzündungsreaktion abgetötet. Wie auch andere intrazelluläre Pathogene, muss *F. tularensis* die angeborene Immunantwort des Wirtes umgehen und das Phagosom verlassen. Die *Francisella* umhüllende Kapsel sowie die bakterienspezifische LPS Struktur (Lipopolysaccharid), schützen den Erreger davor, von der angeborenen Immunantwort erkannt zu werden. Diese Strukturen der *Francisella* schützen das Bakterium vor dem Wirtskomplementsystem indem es vor der Komplement-Opsonisierung und Eliminierung bewahrt wird (Jones, Faron et al. 2014).

Nach der Infektion der Wirtszelle mit *Francisella tularensis* gibt es verschiedene Mechanismen die Proliferation des Erregers einzudämmen. Im Detail bedeutet das, dass die Wirtszelle zunächst versucht durch das Aktivieren von Signalwegen das Austreten aus dem Phagosom in das Cytosol zu verhindern. Bei der Reifung des Phagosoms entsteht durch Fusion mit den endocytischen und lysomalen Vesikeln das Phagolysosom, in dem die Erreger zersetzt werden. Nach der Aufnahme in die Zelle bzw. nach Abspaltung von der Membran fusioniert dieses entstehende Phagosom mit Vesikeln des frühen Endosoms (*early endosome*). Dieser Prozess wird durch die Rab5 GTPase und dem Downstream-Effektor EEA1 (*early endosome antigen 1*) reguliert. Anschließend erfolgt eine Interaktion mit dem späten Endosomen, welches durch Rab7 GTPase reguliert wird. Dieses späte Endosom-ähnliche Phagosom wird mit Hilfe der vakuolären ATPase (vATPase) angesäuert. Dabei pumpt die vakuoläre ATPase Protonen in den Lumen des Phagosoms. Das angesäuerte Phagosom fusioniert mit dem Lysosom und bildet das Phagolysosom, in dem reichlich Säurehydrolasen enthalten sind. Dadurch können im Phagolysosom Erreger zersetzt werden. *Francisella* umgeht dies, indem es in die Biogenese/Reifung des Phagosoms eingreift. Das *Francisella*-enthaltene Phagosom nutzt vorübergehend EEA1, gefolgt vom Rekrutieren der späten endosomalen Marker Lamp1, Cd63 und Rab7 sowie die vakuoläre ATPase (vATPase) (Asare and Kwai 2010). Die Ansäuerung durch vATPase ist sehr wichtig, um *Francisella* zu ermöglichen ins Cytosol zu gelangen, wobei die Membran zerstört wird. Studien, in denen die vATPase mit Bafilomycin A inhibiert wird, ist das Entkommen des Bakteriums ins Cytosol verzögert (Chong, Wehrly et al.

2008, Santic, Asare et al. 2008). Bisher wurde nicht eindeutig gezeigt, ob *Francisella* vor dem Arrest der Phagosom-Reifung oder nach der Fusion mit dem Lysosomen ins Cytosol gelangt (Asare and Kwaik 2010). Makrophagen Experimente mit den *Francisella* Mutanten mirgR und fevR, Genprodukte der FPI (*Francisella* Pathogenitätsinsel) lassen vermuten, dass die Phagosom-Reifung in den Arrest geht, bevor *Francisella* ins Cytosol entkommen kann (Buchan, McCaffrey et al. 2009). Dies scheint nicht für alle Zelltypen der Fall zu sein. Studien mit Neutrophilen deuten darauf hin, dass *Francisella tularensis* nicht die Phagosom-Reifung in Neutrophilen inhibiert, aber weiterhin ins Cytosol entkommen kann, bevor das Phagosom zum Phagolysosom reift (McCaffrey and Allen 2006). Der Arrest der Phagosom-Reifung und das schnelle Entkommen ins Cytosol wurde auch in Insektenzellen gezeigt, was impliziert, dass *Francisella* Anthropoden- und Säugetierzellen nach demselben Mechanismus infiziert und in ihnen proliferiert (Santic, Akimana et al. 2009). Andererseits deuten Untersuchungen der sauren Phosphatasen darauf hin, dass es unterschiedliche Mechanismen zum Entweichen ins Cytosol bei den verschiedenen *F. t.* Subspezies gibt (Asare and Kwaik 2010). Im *Francisella*-Genom sind vier bis acht saure Phosphatasen, abhängig von der Subspezies vorhanden. Acht saure Phosphatasen wurden in dem Genom der Subspezies *novicida* gefunden, vier (AcpA, AcpB, AcpC und HAP) von diesen auch in dem Genom der hochvirulenten Subspezies *tularensis* (Mohapatra, Soni et al. 2008). Eine hämolytische Aktivität, die durch saure Phosphatasen verursacht werden kann, wurde nur in *F. t.* subsp. *novicida* und *F. philomiragia* beobachtet (Lai, Wang et al. 2003). Unabhängige Studien zeigten, dass Mutationen der sauren Phosphatasen AcpA, AcpC und HAP eine Verzögerung oder Inhibition des Entkommens ins Cytosol und eine Reduzierung der Vermehrung innerhalb humaner Makrophagen verursacht (Mohapatra, Balagopal et al. 2007, Asare and Kwaik 2010). Kombinierte Deletionen der sauren Phosphatasen in der Subspezies *novicida* hatten zur Folge, dass das Entkommen ins Cytosol und die Replikation im Cytosol komplett inhibiert wurden (Mohapatra, Soni et al. 2008). Im Gegensatz dazu zeigten Child *et al.*, dass die kombinierte Deletion von AcpA und AcpC in der Subspezies *tularensis* keinen Effekt auf das Entkommen ins Cytosol oder Replikation in humanen Makrophagen hatten (Child, Wehrly et al. 2010).

Während der frühen Infektionsphase, wenn *Francisella* noch im Phagosom ist, wird die Entzündungsreaktion in den Makrophagen durch Ausschüttung von TNF- $\alpha$  (Tumor Nekrose Faktor alpha) und den TLR-2 (Toll-like Rezeptor 2) abhängigen NF- $\kappa$ B Signalweg aktiviert (Telepnev, Golovliov et al. 2005). TNF- $\alpha$  und INF- $\gamma$  (Interferon

gamma) spielen eine wichtige Rolle für die Kontrolle der Infektion, aber auch bei dem Übergang von einer sublethalen Infektion in eine lethale Infektion (Pechous, McCarthy et al. 2009) und werden – wie auch NF- $\kappa$ B – durch den PI3K/Akt Signalweg induziert. Die NF- $\kappa$ B Aktivierung induziert die Sekretion von pro-inflammatorischen Zytokinen, welche u.a. die Fusion des Phagosoms mit dem Lysosom fördern (Rajaram, Butchar et al. 2009). *Francisella* verhindert dies durch das schnelle Entkommen ins Cytosol (nach ca. 15-30 Minuten), wie es im oberen Abschnitt bereits beschrieben wurde. Hat der Erreger das Cytosol erreicht, werden die NF- $\kappa$ B Aktivierung und TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8 und IL-12 Sekretion innerhalb von 5 Stunden nach Infektion herunter reguliert. Dies zeigten Studien, in denen IglC (FPI Protein) *Francisella* Mutanten, die nicht in der Lage sind ins Cytosol zu entkommen und TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8 und IL-12 nicht herunter regulieren (Telepnev, Golovliov et al. 2005). Zusätzlich werden nach dem Entkommen des Erregers ins Cytosol, durch Caspase-1 und Caspase-3 in der Wirtszelle, die Pyroptose- und Apoptose-Prozesse von infizierten Zellen in Gang gesetzt, wobei *Francisella* beide Prozesse verzögern kann (Asare and Kwai 2010). In Mäusemakrophagen induzieren cytosolische Bakterien die IRF-3 (*Interferon regulatory factor 3*) abhängige Aktivierung von Interferon Typ 1 (IFN-I), die eine Expressionserhöhung von AIM2 (*Absent in Melanoma-2*, ein IFN-induzierbares Protein) zur Folge hat. AIM2 erkennt *F. tularensis* (Fernandes-Alnemri, Yu et al. 2010) durch Bindung an die Bakterien dsDNA – darauf deutet die beobachtete Kolokalisierung der *F. tularensis* DNA mit AIM2 hin (Jones, Kayagaki et al. 2010). Nach der Bindung der *F. tularensis* DNA von AIM2 wird zusammen mit ASC (*Apoptosis-associated speck-like protein containing CARD*) und Caspase-1 ein Komplex gebildet, das Inflammasom (Mariathasan, Weiss et al. 2005, Fernandes-Alnemri, Yu et al. 2010, Jones, Kayagaki et al. 2010). Das AIM2-Inflammason führt über die Bindung des Adaptorproteins ASC zur Rekrutierung und Aktivierung von Caspase-1. Die Aktivierung der Caspase-1 führt wiederum zur Sekretion der proinflammatorischen Zytokine IL-1 $\beta$  und IL-18, und somit zur Pyroptose (Mariathasan, Weiss et al. 2005, Gavrillin, Bouakl et al. 2006). *F. tularensis* verhindert diesen Prozess, indem die Induktion von AIM2 durch das Protein MviN (*F. tularensis lipid/polysaccharide (MOP) transporter protein*) unterdrückt wird (Ulland, Buchan et al. 2010). Zudem sind zwei weitere Gene beschrieben – FTT\_0584 (kein orthologes Gen bekannt) und FTT\_0748 (homolog zur Transkriptionsregulatore der Familie IclR) –, die zeigten, dass sie ebenfalls die Caspase-1 und AIM2 abhängige IL-1 $\beta$  Sekretion unterdrücken (Weiss, Brotcke et al. 2007). 6 bis 12 Stunden nach Infektion

induziert *F. tularensis* die Caspase-3 Aktivierung in der Wirtszelle und somit die Induktion der Apoptose. Es gibt Hinweise, dass sowohl der intrinsische apoptotische Signalweg (Lai, Wang et al. 2003) als auch der extrinsische apoptotische Signalweg (Rajaram, Butchar et al. 2009) möglich ist. In der murinen Makrophagen-Zelllinie J774A.1 wird bei der Induktion der Apoptose durch *F. tularensis* LVS mitochondriales Cytochrom C in das Cytosol freigesetzt, wodurch Caspase-9 und schließlich Caspase-3 aktiviert werden, aber nicht Caspase-1, Caspase-8, Bcl-2 oder Bid (Lai and Sjostedt 2003) – dieses deutet auf den intrinsischen apoptotischen Signalweg hin. Andererseits zeigten Studien mit der murinen Makrophagen-Zelllinie RAW 264.7, dass *F. tularensis* die Caspase-3 Aktivierung über Sp-1/sp-3 in Abhängigkeit von der FAS Expression induziert – was darauf hindeutet, dass die Apoptose über den extrinsischen Signalweg induziert wird (Rajaram, Butchar et al. 2009) – um somit ins extrazelluläre Milieu zu gelangen. Zuvor wird die Apoptose von *Francisella* hinausgezögert, um bis zur Endphase der Infektion zu überleben. Dabei wird die Caspase-3 vermittelte Apoptose über Nf- $\kappa$ B (siehe oben) als auch über den Ras-Signalweg gehemmt. *F. tularensis* induziert die Ras Aktivierung durch die Rekrutierung von PKC $\alpha$  und PKC $\beta$ -I zum SOS2/GrB2 Komplex (Al-Khodor and Abu Kwaik 2010). Die dafür verantwortlichen bakteriellen Faktoren für die Aktivierung von Nf- $\kappa$ B und Ras sind bisher noch nicht beschrieben.

Zusammenfassend entwickelte *Francisella* verschiedene Strategien, um der angeborenen Immunantwort entgegen zu wirken. Dabei werden nicht nur Komponenten der Immunabwehrmechanismen inhibiert, sondern auch andere Signalwege durch bakterielle Effektoren, die durch ein Typ VI-ähnliches Sekretionssystem in die Wirtszelle exportiert werden, manipuliert (Asare and Kwaik 2010). Im Falle des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B, der in der Wirtszelle die pro-inflammatorische Zytokine aktiviert, wird dieser von *Francisella* für die Induktion der Expression von antiapoptotischen Genen genutzt, um somit die Lebensfähigkeit der Zellen zu erhalten (Asare and Kwaik 2010). Zum anderen nutzt *Francisella* den Ras Signalweg der Wirtszelle, um die durch Caspase-3 induzierte Apoptose zu inhibieren. Die Caspase-3 Aktivität wird mit Hilfe von zwei unabhängigen Mechanismen manipuliert, um zum einen in der Wirtszelle bis zur Endphase der Infektion zu überleben (über den Ras-Signalweg) und zum anderen durch die Zelllyse ins extrazelluläre Milieu zu gelangen (Asare and Kwaik 2010), indem *F. tularensis* Sp-1/Sp-3 in Abhängigkeit der Fas Expression induziert, was zur Aktivierung von Caspase-3 führt (Rajaram, Butchar et al. 2009).

Schließlich nutzt *Francisella* das Ubiquitin-abhängige Proteasom der Wirtszelle für den Abbau der MHC II Moleküle in aktivierten Makrophagen, um die Antigenpräsentation an Effektor T-Zellen zu inhibieren (Wilson, Katkere et al. 2009). Dabei werden die MHC II Moleküle in IFN- $\gamma$ -aktivierte Makrophagen durch den Ubiquitin-vermittelten Transport zum Lysosom herunterreguliert (Wilson, Katkere et al. 2009). In Bezug auf die spezifische T-Zell Antwort bei *Francisella* Infektionen ist bisher wenig über T-Zell-Rezeptoren, Co-Rezeptoren, *Memory Profiles* und den MHC-Komplex (Haupthistokompatibilitätskomplex) bekannt (Pechous, McCarthy et al. 2009). Nichtsdestotrotz löst der Kontakt mit subletalen *Francisella* Konzentrationen eine stark schützende Immunität gegen eine zweite Infektion sowohl in Menschen, als auch in experimentellen Tiermodellen aus (Drabick, Narayanan et al. 1994, Stenmark, Lindgren et al. 2003). Nach einer *Francisella*-Infektion sind Antikörper nachweisbar, jedoch deuten Antikörper-Transferstudien in Tiermodellen darauf hin, dass diese Antikörper nur bei der Bekämpfung von schwach virulenten Stämmen eine Rolle spielen, aber bei hoch virulenten Stämmen nicht protektiv wirksam sind (Stenmark, Lindgren et al. 2003, Elkins, Cowley et al. 2007). Um die Infektion unter Kontrolle zu bekommen, müssen diese Antikörper mit einer effektiven zellulären Immunantwort gekoppelt sein (Pechous, McCarthy et al. 2009). Für die Bekämpfung der *Francisella* Infektion sind CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen wichtig. In Mäusen können entweder CD4<sup>+</sup> oder CD8<sup>+</sup> T-Zellen die *Francisella* Infektion mit schwach virulenten Stämmen, wie beispielsweise *F. tularensis* LVS, kontrollieren. Jedoch scheinen beide, CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen, für die Abwehr von Infektionen mit hoch virulenten Stämmen notwendig zu sein (Fulop, Mastroeni et al. 2001). Auch Pechous et. al. beschreiben, dass beide zelluläre Antworten für die Beseitigung von hoch virulenten Stämmen, wie Shu4, erforderlich sind und dass die Induktion solch einer Immunantwort essentiell für die Bildung einer Immunität gegen *F. tularensis* ist (Pechous, McCarthy et al. 2009).

#### 1.4 Übertragungswege

Tularämie wird beim Menschen über infizierte Tiere oder Vektoren wie Zecken, Mücken und Stechfliegen übertragen. Bisher ist keine Mensch-zu-Mensch-Übertragung bekannt. Auch über alimentäre Aufnahme des Erregers sind Tularämiefälle bekannt, z. B. über kontaminiertes Trinkwasser und kontaminierte Lebensmittel. Die Erreger können über Schleimhäute und die Haut, z. B. durch direkten Kontakt mit infizierten Tieren, übertragen werden (Ellis, Oyston et al. 2002). Ebenfalls kann eine Infektion über kontaminierte

Aerosole bzw. Inhalation erregerehaltigen Staubs (10-50 Erreger), z. B. durch Verarbeitung von Getreide (Ernte, Dreschen), das mit Sekreten und Exkreten infizierter Nager kontaminiert ist, stattfinden (Bauerfeind, Kimmig et al. 2013). In Deutschland ist die Erkrankung oftmals die Folge von Verarbeitung oder Verzehr infizierter Hasen.

## 1.5 Diagnostik und Klinik

Die geringe Inzidenz von Erkrankungen in Deutschland hat wahrscheinlich zur Folge, dass Tularämie aufgrund ihres variablen klinischen Krankheitsbildes und klinisch inapparenten Verlaufes als Differentialdiagnose selten in Erwägung gezogen wird. Es ist von einer hohen Dunkelziffer auszugehen (Schmitt, Splettstosser et al. 2005, Splettstoesser, Piechotowski et al. 2009). So wurden in Deutschland zwischen 1974-2005 durchschnittlich 3 Fälle pro Jahr gemeldet (Robert-Koch-Institut 2007). Jedoch werden seit 2010 20-30 Fälle pro Jahr gemeldet (Robert-Koch-Institut 2015), was eventuell auch ein Hinweis auf eine verbesserte Diagnostik sein kann. Der Nachweis des Erregers erfolgt durch Anzucht auf Spezialnährboden, PCR und Antikörpernachweis. Ein ELISA-basierter Immunassay und ein dazugehöriger Bestätigungs-Westernblot zum Nachweis von *Francisella* Infektionen ist von Schmitt et al. etabliert worden (Schmitt, Splettstosser et al. 2005). Der Nachweis im ELISA beruht auf der Detektion des bakterienspezifischen Zellwandbestandteiles LPS von *Francisella*.

In der Klinik unterscheidet man zwei Verlaufsformen der Krankheit. Dabei ist die Schwere der Erkrankung von der Infektionsroute abhängig und äußert sich in unterschiedlichen klinischen Manifestationen (Tabelle 1):

1. **Äußere Form:** An der Eintrittsstelle des Erregers entsteht eine rote Papel, die sich vergrößert, einschmilzt und geschwürig zerfällt. Zu der äußeren Form der Tularämie gehören u.a. die ulzeroglanduläre Form und glanduläre Form. (siehe unten).
2. **Innere Form:** Der Erreger wird durch Inhalation aufgenommen oder kann über das Blutssystem innere Organe erreichen. Die innere Form hat eine deutlich höhere Letalität als die äußere Form.

Die verschiedenen Tularämie Formen lassen sich darüber hinaus auch anhand ihrer klinischen Manifestationen einteilen:

- **Ulzeroglanduläre Form** ist die am häufigsten vorkommende Form der Tularämie (70-80 %). Die Infektion erfolgt über Hautkontakt (offenen Hautstellen) und Arthropodenbiss/-stich. Zu Beginn der Infektion erleidet der Patient einen Fieberanstieg. An der Eintrittsstelle der Haut bildet sich eine primäre Ulzeration, gefolgt von regionalen Lymphknotenschwellungen, die zu einer eitrigen und nekrotisierenden Entzündung der Lymphknoten führen.
- Bei der **glandulären Form** ist die Eintrittsstelle bisher nicht bekannt, aber wahrscheinlich erfolgt die Infektion auch wie bei der ulzeroglandulären Form über die Haut, wobei bei der glandulären Form kein Ulcus gebildet wird. Die Symptome sind u. a. Fieber und Lymphknotenschwellung, meistens in der Axillar- und Inguinalgegend. Die glanduläre Form der Tularämie kommt im Vergleich zu Erwachsenen häufiger bei Kinder vor, wie eine Fallstudie aus Missouri (USA) belegt (44 % Kinder im Vergleich zu 16 % Erwachsene); (Harik 2013).
- **Oculoglanduläre Form** wird durch die Infektion über das Auge hervorgerufen. Die Infektion des Auges kann z.B. durch Wischen mit der kontaminierten Hand erfolgen. Bei dieser Form von Tularämie sind folgende Beobachtungen typisch: einseitige Konjunktivitis mit Ödemen am Lid oder starkem Tränenfluss, Lichtempfindlichkeit und regionale Lymphknotenschwellung.
- Bei der **oropharyngealen Form** wird die Infektion über oropharyngealen Schleimhaut manifestiert. Dabei wird der Erreger durch kontaminiertes Wasser oder Lebensmittel aufgenommen. Die Kennzeichen der oropharyngealen Form der Tularämie sind: Fieber, Pharyngitis, Tonsillitis, meist einseitige, oft massive submandibuläre und zervikale Lymphknotenschwellung. Eine gastrointestinale Beteiligung mit Bauchschmerzen, Erbrechen und Durchfall ist bei einer hohen Aufnahme vom Erreger möglich.
- Die **pulmonale Form** ist die schwerwiegendste Form der Tularämie und hat eine hohe Mortalitätsrate. Bei dieser Art der Infektion werden die aerolisierten Bakterien über Inhalation aufgenommen. Zu den Symptomen gehören: Fieber, Husten, Brustschmerzen, Atemstörungen und Atemnot, Erbrechen, hiläre Lymphknotenschwellung. Bei einem schweren Verlauf kann eine Pneumonie auftreten.
- Bei der **typhösen Form** wird das Bakterium über die oropharyngeale Schleimhaut und die unteren Atemwege/Respirationstrakt aufgenommen. Die Symptome sind

Fieber ohne bekanntem Auslöser, Hepato- und Splenomegalie, Kopfschmerzen, Muskelschmerzen (Myalgie), Rachenschmerzen und Durchfall. Es ist eine schwere Erkrankung, die häufig zu einem septischen Schock führt (Harik 2013).

Auch bei nicht-pulmonalen Formen der Tularämie kann eine Pneumonie als Komplikation in Folge der Streuung des Erregers in die Lunge auftreten (Robert-Koch-Institut 2015). Die Subspezies *F. t. subsp. tularensis* verursacht einen schweren Krankheitsverlauf, der folgende Komplikationen haben kann: sekundäre Pneumonien, schwere Septikämien, Endokarditis, Leber- und Nierenversagen. Die durch die Subspezies *F. t. subsp. holarctica* verursachte Infektion hat einen milderen Krankheitsverlauf und führt selten zu Pneumonien. Gelegentlich treten Meningitis und Sepsis als Komplikation auf.

Tabelle 1 Verschiedene Formen der Tularämie beim Menschen (adaptiert von Tarnvik, Priebe et al. 2004, Harik 2013)

Tularämie Form		Symptome	Eintrittsstelle
Ulzeroglanduläre (Häufigkeit 70-80 %)	äußere Form	Papel an der Haut gefolgt von Ulzer; regionale Lymphknotenschwellung; Fieber	Haut
Glanduläre (Häufigkeit 2-12 %)		Regionale Lymphknotenschwellung ohne Hautulzera; Fieber	Nicht bekannt (wahrscheinlich über die Haut)
Oculoglanduläre (Häufigkeit 1-2 %)		Konjunktivitis; regionale Lymphknotenschwellung	Auge
Oropharyngeale (Häufigkeit 2-4 %)	innere Form	Pharyngitis; Tonsillitis; zervikale Lymphknotenschwellung; Fieber	oropharyngeale Schleimhaut
Pulmonale (Häufigkeit 8-13 %)		Pneumonie; Fieber	Atemwege
Typhösen (Häufigkeit 7-14 %)		Fieber unbekannter Ursache; Sepsis; Myalgie, Kopfschmerzen	oropharyngealen Schleimhaut oder Atemwege

## 1.6 Prophylaxe, Therapie und Impfung

In der Regel dauert die Tularämie 2-3 Wochen, wenn diese nicht behandelt wird, gefolgt von einer langen Rekonvaleszenz. Trotz medikamentöser Therapie beträgt die Letalität 4-6 % und bei der typhösen Form der Tularämie sogar 30 % (Bauerfeind, Kimmig et al.

2013). Die durch *F. t. subsp. tularensis* verursachte pulmonale Form der Tularämie kann unbehandelt in 30-60 % der Fälle zum Tode führen (Robert-Koch-Institut 2015).

### 1.6.1 Prophylaxe

Einer typischen Infektionsursache – mangelnde Hygiene – kann leicht vorgebeugt werden, indem sich Personen mit erhöhtem Risiko, wie Jäger oder Personal auf dem Schlachthof, besser schützen. Beim Verarbeiten von Wildtieren sollten z. B. die Hände beim Häuten der Tiere nicht in direkten Kontakt mit dem Tier kommen; Handschuhe, Augenschutz und staubdichte Atemmasken sind empfohlen. Auch beim Verzehr von Wild sollte darauf geachtet werden, dass das Fleisch vollständig durchgegart ist. Bei Outdoor-Aktivitäten in gefährdeten Gebieten, sollten Vorkehrungen zur Vermeidung von Insektenstichen und Zeckenbissen getroffen werden.

Zusätzlich müssen Veränderungen des Ökosystems, die zur Überpopulation von Nagetieren führen, bekämpft werden, um den Übertragungsherd zu minimieren (Robert-Koch-Institut 2015).

### 1.6.2 Impfung

Bisher gibt es in Deutschland keinen zugelassenen Impfstoff gegen *Francisella tularensis*. Der „live vaccine strain“ (LVS) ist ein attenuierter Stamm der Subspezies *F. t. subsp. holarctica* und wurde nach mehreren Passagen aus Mäusen isoliert. Dieser *F. t. subsp. holarctica* LVS ist immer noch für Mäuse, aber nicht für den Menschen virulent. Für die westlichen Länder ist dieser Lebendimpfstoff mit dem attenuierten Stamm LVS nicht zugelassen, lediglich in Russland wird dieser in Endemiegebieten eingesetzt. Während der 1960er Jahre wurde in den USA die Wirksamkeit dieses Impfstoffes untersucht. Ein Jahr nach der Impfung wurden die Probanden mit 200-20.000 Erregern infiziert. Die Mehrheit der geimpften Personen zeigten keine schweren klinischen Erkrankungen. Immunisierte Personen, die mit 20.000 Erregern infiziert wurden, zeigten modifizierte Erkrankungssymptome im Vergleich zu nicht immunisierten Personen, die alle eine Tularämie ausbildeten (WHO 2007). Zudem veröffentlichte Burke 1977 eine Studie, die darlegte, dass eine Impfung des Laborpersonals mit dem LVS eine Wirkung auf die Inzidenz der Tularämie-Fälle in Laboren hat. Die Häufigkeit der typhösen Tularämie sank von 5,7 auf 0,27 Erkrankungen pro 1.000 Mitarbeiter. Die Fälle der ulzeroglandulären Tularämie blieben unverändert, jedoch zeigten immunisierte Personen einen moderaten Krankheitsverlauf (Burke 1977). Für eine Zulassung als Lebendimpfstoff müsste der Stamm besser charakterisiert werden. Bisher ist nicht vollständig geklärt welche

Komponenten für die Attenuierung zuständig sind, unklar sind auch die Abwehrmechanismen gegen LVS. Außerdem kann es beim LVS zu spontanen Mutationen kommen, die sowohl eine höhere Abschwächung als auch den Verlust der Schutzwirkung des Impfstoffes zur Folge haben (Griffin, Crane et al. 2015). Zum Anderen dient der LVS als Basis für die Entwicklung eines Impfstoffes: mehrere Mutanten des LVS Stammes wurden generiert, vermitteln jedoch bisher nur gegen eine geringe Erregerdosis einen Schutz (Pechous, McCarthy et al. 2009). Auch der Versuch andere lebende attenuierte Impfstoffkandidaten aus unterschiedlichen *Francisella*-Stämmen – mit definierten Deletionen von Genen, die Virulenzfaktoren oder verantwortliche Enzyme für den Metabolismus, Housekeeping oder andere kritische Funktionen codieren (Marohn and Barry 2013) – zu generieren führten bisher zu keiner Entwicklung eines zugelassenen Impfstoffes. Ein vielversprechender Kandidat ist ein attenuierter *Francisella* Stamm, in dem das  $\gamma$ -Glutamyltranspeptidase Gen stillgelegt oder ausgelöscht wurde, auf den Le Butt, Ireland und Oysten ein Patent angemeldet haben (PCT-Nummer PCT/GB2010/000743, Veröffentlichung Dez. 2013). Ireland *et al.* setzen in ihren Versuchen auf  $\Delta$ gGT Mutanten in Hinblick auf die Entwicklung eines Impfstoffkandidaten (Ireland, Wang et al. 2013), welche vielversprechende Ergebnisse lieferten. Dabei zeigten FgGT Deletionen in dem hoch virulenten *Francisella tularensis* Stamm SCHU S4 sowohl *in vitro* als auch *in vivo* in Mausinfektionsversuchen einen hohen Attenuierungsgrad (Ireland, Wang et al. 2013).

Ein anderer Ansatz für die Entwicklung eines Impfstoffes wäre, nicht den ganzen Erreger als Vakzin einzusetzen, sondern einzelne Antigene bzw. Antigenkombinationen. Die passive Immunisierung mit generierten Antikörpern gegen *F. tularensis* LPS in Mäusen, zeigt einen signifikanten Schutz gegen den Stamm *F. tularensis* LVS. Jedoch wurde ein geringerer Schutz gegen den virulenten Stamm Schu S4 (*Francisella tularensis subsp. tularensis* Stamm) beobachtet, der bisher nicht erklärt werden kann (Jones, Faron et al. 2014). Auch das in dieser Arbeit charakterisierende Enzym FgGT wäre ein mögliches Antigen für ein *Francisella* Vakzin. Die FgGT ist für das Wachstum des Erregers essentiell (siehe 1.8.2) und könnte somit erfolgreich für die Induktion von Antikörpern eingesetzt werden.

### 1.6.3 Therapie

In Abhängigkeit von der Subspezies, dem Übertragungsweg, der aufgenommenen Erregermenge und dem Zeitpunkt des Beginns einer gezielten Therapie, gibt es eher milde und sehr schwere Krankheitsverläufe (Robert-Koch-Institut 2015). Daher ist ein

frühzeitiger Beginn der Antibiose sehr wichtig für den Therapieerfolg. Umso wichtiger ist es, eine möglichst frühe Diagnose stellen zu können um die Schwere des Tularämieverlaufes beeinflussen bzw. mildern zu können. Die Behandlung wird mit den Aminoglykosiden Gentamycin oder Streptomycin empfohlen (Harik 2013), wobei das am besten wirksame Antibiotikum gegen *Francisella* Infektionen Streptomycin ist. Es weist die höchste Heilungsrate und niedrigste Wiedererkrankungsrate (Enderlin, Morales et al. 1994) auf. Jedoch wird es wegen der starken Nebenwirkungen (v.a. Ototoxizität) in Deutschland nicht mehr verwendet (Robert-Koch-Institut 2015). Auch in den USA wird aufgrund der beschränkten Verfügbarkeit von Streptomycin, Gentamycin als beste Alternative für die Behandlung von Tularämie verwendet (Harik 2013). Bei schweren Krankheitsverläufen wird Gentamycin in Kombination mit Ciprofloxacin verwendet, da Gentamycin eine schlechte Gewebe- und Liquorpenetration hat (Robert-Koch-Institut 2015). Ciprofloxacin und Tetracyclin werden ebenfalls als Alternative empfohlen. In einigen Krankheitsfällen bei Tieren hat sich bei der therapeutischen Behandlung Oxytetracyclin bewährt (Bauerfeind, Kimmig et al. 2013). Beta-Lactam-Antibiotika, wie Penicillin sind gegen *F. tularensis* wirkungslos (WHO 2007). Gegen alle zur Behandlung von Tularämie bekannten Wirkstoffklassen Aminoglykoside, Chinolone (Ciprofloxacin) und Tetracyclin, sind bereits Resistenzen bekannt, die entweder in *F. tularensis* bewusst eingebracht (Norqvist, Kuoppa et al. 1996) oder beobachtet wurden (Eigelsbach, Hunter et al. 1975, La Scola, Elkarkouri et al. 2008). Auch eine Resistenz gegen Makrolide und Ketolide wurde in zentraleuropäischen Stämmen beobachtet (Kudelina and Olsufiev 1980). So ist es notwendig, andere Antiinfektiva als alternative Behandlungsmöglichkeit zu entwickeln. Ein vielversprechendes Target für ein Antiinfektiva stellt die in dieser Arbeit untersuchte *Francisella*  $\gamma$ -Glutamyltranspeptidase (FgGT) dar, die für das Bakterium essentiell ist.

### **1.7 *Francisella tularensis* als biologische Waffe**

Als biologische Waffen werden Krankheitserreger oder natürliche Giftstoffe eingesetzt. *F. tularensis* wurde von den amerikanischen CDC (*Centers for Disease Control and Prevention*) als ein „class A bioterrorism agent“ eingestuft, da ein Kontakt mit lediglich 10 Erregern über Inhalation ausreichend ist, bei einem Menschen eine Infektion hervorzurufen, welche unbehandelt eine Mortalität von 30-50 % hat (Sjostedt 2007). Aufgrund der einfachen Infektion (z.B. durch Hautkontakt oder Inhalation), der niedrigen

Infektionsdosis und der extrem starken Virulenz arbeiteten verschiedene Länder (z.B. Japan, die ehemalige Sowjetunion, USA) während des 2. Weltkrieges und dem Kalten Krieg daran, *F. tularensis* für die Verwendung als biologische Waffe zu entwickeln (Oyston, Sjostedt et al. 2004, Sjostedt 2007)). Ob *Francisella* als biologische Waffe schon einmal eingesetzt wurde, ist umstritten. Während des 2. Weltkrieges gab es entlang der deutsch-sowjetischen Front Epidemien, die diese Vermutung zulassen (Dennis, Inglesby et al. 2001). Mit der Anthrax-Attacke und dem Terroranschlag des 11. September 2001 in den USA wurde das Bewusstsein um die Gefahr, die von biologischen Waffen ausgeht, wieder geweckt. Ein Anstieg der Forschungsaktivitäten an *Francisella* (insbesondere in den USA) spiegelt sich in der Teilnehmerzahl der Internationalen Tularämie Konferenz wider. Im Jahre 2003 war die Konferenz für mehr als 200 Teilnehmern attraktiv, zweimal so viele wie in den Jahren zuvor (Oyston, Sjostedt et al. 2004).

Die Entwicklung eines effektiven Impfstoffes, insbesondere gegen den hochvirulenten Stamm *F. t. subsp. tularensis* hat für die „*Biodefense Community*“ eine hohe Priorität (Marohn and Barry 2013). Zudem ist es wichtig alternative Antiinfektiva zu entwickeln, da die Möglichkeit besteht, dass bei einem Einsatz von *Francisella* als biologischer Waffe, der Erreger nicht nur mit einer natürlichen Antibiotikaresistenz eingesetzt werden könnte, sondern darüber hinaus auch mit gezielt eingebauten Antibiotikaresistenzen verwendet werden könnte. Alternative Behandlungsstrategien könnten sogenannte Pathoblocker sein. Hierbei handelt es sich um Substanzen bzw. Wirkstoffe, die das Bakterium nicht abtöten, wie es bei einer klassischen Antibiose der Fall ist, sondern die Infektiosität des Bakteriums reduzieren. Diese haben zwei große Vorteile im Vergleich zu Antibiotika: weil Pathoblocker ein enges Wirkungsspektrum haben, werden Resistenzentwicklung und -ausbreitung deutlich reduziert, sowie die Nebenwirkungen auf die natürliche Keimflora verringert. Die *Francisella*  $\gamma$ -Glutamyltranspeptidase stellt solch ein Target für die Entwicklung eines spezifischen Antiinfektivums dar.

## 1.8 $\gamma$ -Glutamyltranspeptidase (gGT)

### 1.8.1 Funktion und Vorkommen der gGTs

Die gGT gehört zur Familie der N-terminalen-nukleophilen (Ntn)-Hydrolasen. Proteine aus dieser Familie werden posttranslational aktiviert. Dabei wird das inaktive Vorläuferprotein (Precursor, ca. 60 kDa) autokatalytisch zu einem Heterodimer, bestehend aus einer kleinen

Untereinheit (ca. 20 kDa, C-terminal) und einer großen Untereinheit (ca. 40 kDa, N-terminal), prozessiert. Thr380 (Nomenklatur *Helicobacter pylori* gGT, HpgGT) dient als katalytisches Nukleophil, sowohl in der autokatalytischen Spaltung des Vorläufers, als auch als N-terminale Aminosäure der kleinen Untereinheit in der enzymatischen Reaktion der  $\gamma$ -Glutamylspaltung (Chevalier, Thiberge et al. 1999, Boanca, Sand et al. 2006, Boanca, Sand et al. 2007). Dieses N-terminale Nukleophil und auch andere, katalytisch relevante bzw. die für die Bildung des Oxyanion-Lochs (aktives Zentrum) verantwortlichen Aminosäuren, weisen zwischen den gGTs verschiedener Spezies große Übereinstimmungen auf. Wie alle anderen Mitglieder dieser Familie besitzen die gGTs eine zentrale  $\alpha\beta\alpha$ -Kernstruktur (Brannigan, Dodson et al. 1995) und katalysieren die Hydrolyse der Amidbindung.

Beim nukleophilen Angriff im aktiven Zentrum greift das Thr380 (analog *F. tularensis* Thr412) die glutamyl –Amidbindung an und bildet mit Thr398 (analog *F. tularensis* Thr430) eine katalytische Dyade. Thr398 scheint für die enzymatische Aktivität des Enzyms wichtig zu sein, da eine Mutation von Thr398 in ein Alanin zu einem Verlust der Enzymaktivität führt, aber nicht zu einem Verlust der Autoprozessierung (Boanca, Sand et al. 2007). Aus diesem nukleophilen Angriff resultiert ein tetraedrisches Intermediat, welches durch die Bildung eines Oxyanion-Loch (Reste Gly472 und Gly473) stabilisiert wird. An dem  $\gamma$ -Glutamylrest kann nun  $H_2O$  oder eine Akzeptor angreifen und das Reaktionsprodukt wird freigesetzt (Boanca, Sand et al. 2006).

Die  $\gamma$ -Glutamyltranspeptidase (gGT) kommt sowohl in eukaryotischen als auch in prokaryotischen Zellen vor. Die gGT Homologien in der Aminosäuresequenz sind ausgeprägt, z.B. sind bakterielle versus Säugetier-Enzyme zu mehr als 20 % identisch, was auf eine deutliche Konservierung der Struktur und Funktion hinweist (Boanca, Sand et al. 2007). Innerhalb von Säugern sind Homologien der Aminosäuresequenz von ca. 80 % zu finden. Im Gegensatz dazu liegt aufgrund von Insertions/Deletions-Regionen in der Aminosäuresequenz die Homologie bei Bakterien nur noch bei ca. 30 % (Ida, Suzuki et al. 2014).

Bakterielle gGTs finden sich auch in Pathogenen wie *Francisella tularensis*, *Escherichia coli* und *Helicobacter pylori* wieder. Sie spielen eine Schlüsselrolle in der Synthese und dem Abbau von Glutathion und ermöglichen Bakterien, extrazelluläres Glutamin und Glutathion als Glutamat und Cysteinquelle zu nutzen. Die bakteriellen gGTs sind im

Periplasma bzw. in dem extrazellulären Raum lokalisiert, wohingegen in Säugetieren die gGTs membrangebunden vorliegen. Die gGTs in Pflanzen sind im Apoplast bzw. in Vakuolen lokalisiert.

Die Rolle der bakteriellen gGTs konnte bislang nicht im Detail aufgeklärt werden, sodass über die physiologische Funktion nicht viel bekannt ist. Es wird postuliert, dass die gGT eine Rolle bei der Aufnahme von Aminosäuren aus dem extrazellulären Raum und bei der Verwendung von poly- $\gamma$ -Glutamat als Stickstoffquelle spielt (Leduc, Gallaud et al. 2010). Die *F. tularensis* gGT ist ein Virulenz-determinierender Faktor, welcher für das Bakterium essentiell ist (im folgenden Abschnitt 1.8.2 wird näher darauf eingegangen). Auch die HpgGT ist für das Überleben des Erregers, welcher als Karzinogen eingestuft wurde und chronische Entzündungen verursacht, im Magen notwendig. Die HpgGT induziert sowohl einen G1 Zyklusarrest in den T-Zellen als auch Apoptose in AGS-Magenkarzinomzellen (Schmees, Prinz et al. 2007, Kim, Lee et al. 2010). Dabei ist die immunsuppressive Wirkung (Hemmung der T-Zell-Proliferation) von der enzymatischen Aktivität abhängig (Gerhard, Schmees et al. 2005, Schmees, Prinz et al. 2007). Für *Campylobacter jejuni* gGT wurden ähnliche Effekte beobachtet.

In Säugetierzellen fungieren Glutathion und dessen Konjugate als wichtige physiologische Substrate der gGT. Bei dieser Katalysereaktion wird eine  $\gamma$ -glutamyl-Gruppe auf Wasser (Hydrolyse) bzw. auf Aminosäuren oder Peptide (Transpeptidierung) übertragen (Meister, Tate et al. 1981). Die humane gGT (hsgGT) spielt eine wichtige Rolle für den Abbau von Xenobiotika und im Glutathion-Metabolismus, wobei die Aufnahme von extrazellulären Glutathion in die Zellen als zusätzliche Cystein-Quelle dient (Martin, Saladores et al. 2007). Zudem hat die humane gGT einen Einfluss auf die Tumorentwicklung, neurodegenerative Krankheiten und den Abbau von schädlichen Stoffen (z.B. krebserregende Fremdstoffe) in der Leber. Hauptsächlich kommt die humane gGT in der Leber vor, aber auch in der Gallenblase, Milz, Bauchspeicheldrüse und den Nieren ist die humane gGT zu finden.

Aufgrund der oben beschriebenen Charakteristika stellt die gGT in vielfältiger Weise ein interessantes Target für die Entwicklung sowohl von Antiinfektiva gegen Bakterien, wie auch für ein mögliches Krebstherapeutikum im Menschen dar. Durch Spezies-spezifische Antiinfektiva gegen die gGT von *H. pylori* bzw. *C. jejuni* kann die Kolonisierung und die chronische Infektion durch Aufhebung der Immununterdrückung unterbunden werden.

Andererseits könnte die Entwicklung eines hsgGT Inhibitors gegen die humane gGT eine wirksame Tumorbehandlung darstellen (Wickham, Regan et al. 2013).

### 1.8.2 *Francisella tularensis* $\gamma$ -Glutamyltranspeptidase (FgGT)

Für die Anzucht von *F. tularensis* ist bekannt, dass geeignete Nährmedien Cystein und Eisenverbindungen enthalten müssen, um das Bakterium außerhalb der Zellkultur vermehren zu können. Bioinformatische Analysen, sogenannte „*metabolic reconstruction*“ von Daten vollgenomsequenzierter *Francisella* Stämme zeigten, dass dies auf das Fehlen von funktionstüchtigen Enzymen in verschiedenen metabolischen Stoffwechselwegen der Cysteinsynthese zurückzuführen ist (Institut Mikrobiologie der Bundeswehr München, bisher noch nicht veröffentlicht). Für die Cystein-Gewinnung aus Glutathion in Bakterien spielt die  $\gamma$ -Glutamyltranspeptidase (gGT) eine Schlüsselrolle. Wird die gGT inhibiert oder fehlt diese gar, so kann der Erreger trotz Vorhandensein einer möglichen Glutathion-Quelle zur Cystein-Gewinnung nicht wachsen. Glutathion wird in einem 2- stufigen Prozess abgebaut, wobei die gGT den ersten Abbauschritt katalysiert. Das dabei entstandene Cysteinyl-Glycin wird im zweiten Abbauschritt von der Aminopeptidase N (penN) zu Cystein katalysiert (Abbildung 2). Im Folgenden wird auf den Reaktionsmechanismus der gGT Katalyse im ersten Schritt der GSH-Degradation näher eingegangen: Das  $\gamma$ -glutamyl Substrat – Glutathion – bindet an die gGT, was einen nukleophilen Angriff initiiert. Dabei wird eine Acyl-Bindung gebildet, indem die Hydroxy-Gruppe (OH-Gruppe) des Threonin (Thr) der gGT die  $\gamma$ -glutamyl Gruppe des GSH bindet. Es entsteht ein  $\gamma$ -glutamyl-Enzym-Zwischenprodukt. Diese gebildete Acyl-Bindung kann zum einen durch Wasser zu Glutamat und Cysteinyl-Glycin hydrolysiert werden – Hydrolyse-Reaktion. Zum anderen findet eine Transpeptidierungs-Reaktion statt, wenn hohe Konzentrationen an Dipeptiden oder Aminosäure-Akzeptor-Molekülen zugegeben werden. Bei der Transpeptidierungs-Reaktion greift das freie  $\alpha$ -Amin die Acyl-Bindung an, und überträgt die  $\gamma$ -glutamyl Gruppe auf den Akzeptor. Dabei entsteht eine neue  $\gamma$ -Glutamyl Bindung (Abbildung 2). Sowohl die Reaktion der Hydrolyse als auch die Reaktion der Transpeptidierung sind eine modifizierte Ping-Pong-Reaktion (Wickham, Regan et al. 2013) und sind in der Abbildung 2 dargestellt.

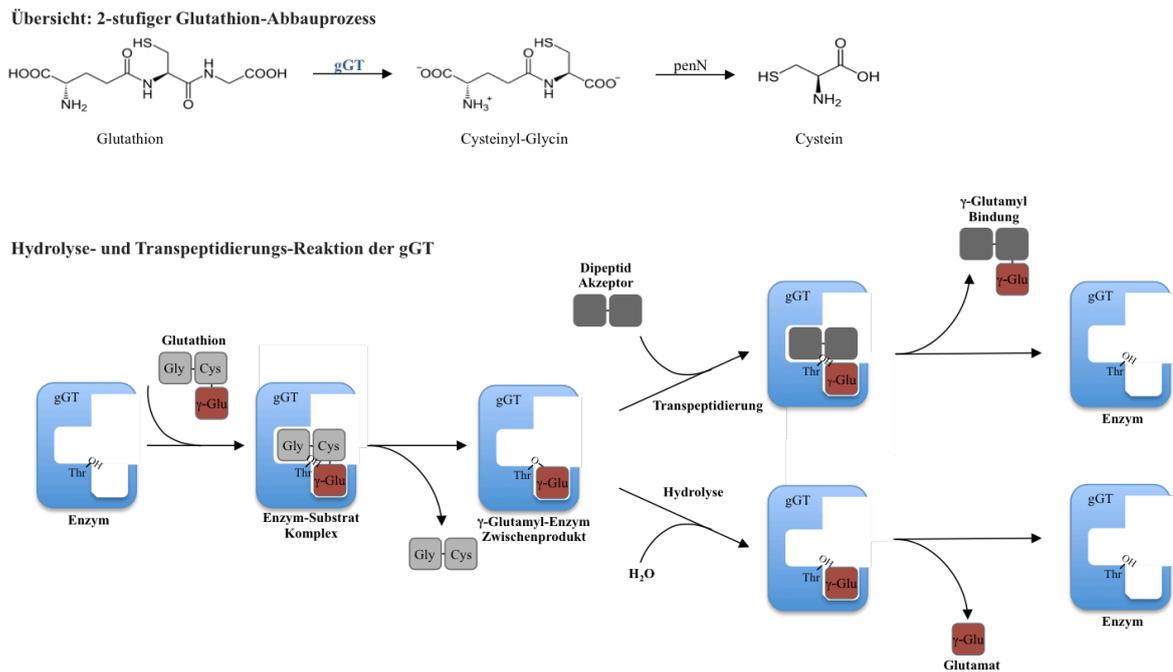


Abbildung 2 Glutathionabbau bzw. Hydrolyse- und Transpeptidierungsreaktion der gGT.

Der Glutathionabbau wird im ersten Schritt durch die gGT und im zweiten Schritt durch penN katalysiert. Die Glutathionspaltung wird durch einen nukleophilen Angriff der Hydroxygruppe (OH) von Threonin (Thr) initiiert. Dabei bildet die  $\gamma$ -Glutamyl Bindung des GSH mit der  $\gamma$ -glutamyl Gruppe ( $\gamma$ -Glu) eine Acyl-Bindung und Cysteinylglycin (CysGly) wird vom GSH abgespalten. Die Acyl-Bindung kann zum einen durch Wasser hydrolysiert werden – Glutamat entsteht – oder zum anderen in einer Transpeptidierungsreaktion auf ein Dipeptid Akzeptor übertragen werden – eine  $\gamma$ -Glutamyl Bindung entsteht. (Abbildung von Wickham et al. 2013 adaptiert)

Bei einer Immunantwort wird die T-Zell Proliferation durch Eisen gesteigert. Andererseits entziehen Bakterien mit Hilfe von Siderophoren der Umgebung Eisen, um ihre eigene Proliferation zu gewährleisten (Braun and Winkelmann 1987, Miethke and Marahiel 2007). So führen sowohl die Eisenkomplexierung und –aufnahme durch Siderophore, wie auch die gGT Aktivität zu einer verringerten T-Zell Proliferation und damit zu einer abgeschwächten Immunantwort.

In der bisherigen Literatur wurden die phänotypischen und metabolischen Eigenschaften der *F. tularensis*  $\gamma$ -Glutamyltranspeptidase anhand von Mutationsversuchen ( $\Delta$ gGT-Mutanten) beschrieben. Alkhuder et al. zeigten, dass die gGT *F. tularensis* erlaubt, extrazelluläres Glutathion und  $\gamma$ -glutamyl-Cystein Dipeptide als Cystein Quelle zu nutzen. *In vitro* konnten sich  $\Delta$ gGT Mutanten nicht vermehren, auch wenn eine Glutathion Quelle bzw.  $\gamma$ -Glu-Cys Quelle zur Verfügung gestellt wurde. Auch in Zellkulturen mit humanen Makrophagen THP1 und murinen Makrophagen-Ziellinien, wie J774, RAW und BMM (*mouse bone marrow-derived macrophages* aus BALB/c Mäusen) konnten sich  $\Delta$ gGT Mutanten nicht vermehren. Zudem zeigten *F. tularensis*  $\Delta$ gGT-Stämme in Maus-

Infektionsversuchen eine stark verminderte Kolonisierung und dementsprechend eine reduzierte Virulenz (Alkhuder, Meibom et al. 2009). Auch Kadzahev et al. zeigten, dass  $\Delta$ gGT-Mutanten stark attenuiert sind und die LD<sub>50</sub> mit  $> 10^5$  Zellen deutlich höher liegt im Vergleich einer bekannten LD<sub>50</sub> des Wildtyps von  $10^1$ - $10^2$  (Kadzhaev, Zingmark et al. 2009). Diese Daten deuten darauf hin, dass die Spaltung dieser Cystein-enthaltenen Peptide durch die aktive gGT essentiell für die Bereitstellung von Cystein ist und somit für das Wachstum des Erregers. Auch in der Impfstoffentwicklung wird auf solche  $\Delta$ gGT Mutanten gesetzt, die alternativ zum ehemaligen und nicht zugelassenen Lebendimpfstoffen auf Basis des LVS-Stammes als Vakzin entwickelt werden könnten (Ireland, LeButt et al. 2011).

*F. tularensis* ist auf das Wirts-Glutathion angewiesen, um sich intrazellulär vermehren zu können. Glutathion ist das häufigste Nichteisweiss-Thiol in Säugetierzellen und das meist verbreitetste niedermolekulare Peptid in eukaryotischen Zellen, welches zu 85-90 % im Cytosol in einer Konzentration von 1-10 mM in vielen verschiedenen Zelltypen vorliegt. Die Glutathion (GSH) Biosynthese ist von der Verfügbarkeit von Glutamat, Glycin und Cystein abhängig. Dabei ist Cystein der limitierende Faktor für die GSH Synthese, da Cystein in geringen Konzentrationen (0,1-0,25 mM) extrazellulär vorliegt. Glutamat und Glycin kommen in deutlich höheren Konzentrationen vor. Wahrscheinlich liegt auch ein geringer Anteil an  $\gamma$ -Glutamyl-Cystein vor, 95 % sind in GSH umgewandelt (Griffith 1999, Wu, Fang et al. 2004, Franco, Schoneveld et al. 2007). Als Cystein Quelle für *F. tularensis* dient somit hauptsächlich GSH.

Bislang ist in der Literatur zur Struktur, Lokalisation und zu einem möglichen Therapieansatz durch die spezifische Hemmung der *F. tularensis* gGT, trotz der deskriptiven Forschung, nichts bekannt. Aufgrund der essentiellen Rolle der *F. tularensis* gGT für den Erreger bei der Kolonisierung, ist dieses Enzym ein vielversprechendes Target für die Entwicklung von Antiinfektiva als Alternativen zu klassischen Antibiotika.

## 1.9 Ziel der Arbeit

Die Therapiemöglichkeiten der Tularämie werden aufgrund zunehmender Antibiotika-Resistenzen immer weiter eingeschränkt. Aus diesem Grund ist die Entwicklung von Spezies-spezifischen Antiinfektiva, sogenannten Pathoblocker notwendig. Diese zielen nicht darauf ab, den Keim abzutöten, sondern die Virulenz des Keims zu senken. Pathoblocker sind Substanzen, die Spezies-spezifische Komponenten hemmen, die für das Wachstum, der Virulenz oder der Immunevasion des Keimes essentiell sind. Vorteile dieser Pathoblocker sind zum einen eine Verlangsamung der Resistenzentwicklung und zum anderen wird die natürliche Keimflora nicht geschädigt. Auch die Behandlungen von antibiotikaresistenten Infektionen sind möglich. Somit würde im Falle der Tularämie ein Pathoblocker gegen das essentielle Enzym  $\gamma$ -Glutamyltranspeptidase des Erregers *Francisella tularensis* eine gezielte Therapie ermöglichen.

Das Ziel dieser Arbeit war es, neue potentielle Substanzen, die eine Hemmung der enzymatischen Aktivität der *Francisella tularensis*  $\gamma$ -Glutamyltranspeptidase bewirken, zu identifizieren. Zunächst sollte die *F. tularensis subsp. holarctica*  $\gamma$ -Glutamyltranspeptidase (FtgGT) rekombinant und nativ gereinigt werden. Die rekombinante FtgGT sollte näher charakterisiert werden, indem Stabilitäts-, pH-Optimierungs- und Akzeptorspezifitäts-Versuche im standardisierten gGT Aktivitätsassays durchgeführt werden. Zudem sollte für die nähere Charakterisierung die Lokalisation und somit die Adressierbarkeit der endogenen FtgGT analysiert werden. Zusätzlich sollten mit Hilfe der Kristallstruktur Erkenntnisse über das katalytische Zentrum gewonnen werden. Ebenfalls sollte ein spezifischer enzymatischer Assay zur Messung der Enzym-Aktivität etabliert und validiert werden, welcher zum Screening von möglichen inhibitorischen Substanzen verwendet werden sollte.

Mit Hilfe dieses Assays sollte eine von der Firma Priaxon AG, München, zur Verfügung gestellte Substanz-Bibliothek auf FgGT-Inhibitoren gescreent werden, um somit potentielle Kandidaten zu identifizieren. Ergänzend sollten anhand der *F. tularensis* gGT Kristallstruktur durch ein *in silico* Screening von kommerziell erhältlichen Substanzen neue inhibitorische Substanzen identifiziert werden. Die Identifizierung geeigneter Hit-Kandidaten würde die Basis für die Entwicklung spezifischer Antiinfektiva schaffen.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Bakterienstämme und Plasmide

##### Expressionsstamm:

**Arctic Express (DE3)** (Ferrer, Chernikova et al. 2004)

F<sup>-</sup>, *ompT*, *hsdS<sub>B</sub>* (r<sub>B</sub><sup>-</sup>, m<sub>B</sub><sup>-</sup>), *dcm*, *gal*, λ(DE3), *endA*, Hte [*cpn10cpn60* Gent<sup>r</sup>], Tet<sup>r</sup>

Die Kälte-angepassten Chaperone Cpn10 und Cpn60 von *Oleispira antarctica* werden koexprimiert. Es besteht eine Homologie von 74 % und 54 % Identität zu *E. coli* GroEL und GroES der Cpn10 und Cpn60 chaperone. Diese haben eine hohe Protein Rückfaltungsgaktivität bei 4 – 12°C.

##### Klonierungsstamm:

**DH5α** (Hanahan 1983)

Φ80*lacZ*ΔM15, *recA1*, *endA1*, *gyrA96*, *thi-1*, *hsdR17* (r<sub>k</sub><sup>-</sup>, m<sub>k</sub><sup>+</sup>), *supE44*, *relA1*, *deoR*, Δ(*lacZYA-argF*) U169, *phoA*

##### Plasmid:

#### **pET28b SUMO Vektor**

Der pET 28b Vektor (NOVAGEN, Bad Soden) ist ein 5368bp großes Plasmid und hat einen N-terminalen His Tag, Thrombin-Spaltstelle und T7 Promotor. Gene innerhalb der Klonierungs- /Expressionsregion werden durch die T7 RNA-Polymerase transkribiert. Der T7-Promotor steht unter der Kontrolle eines Lac-Operators. Durch die Zugabe von Lactose (bei Verwendung von Autoinduktionsmedium) werden das klonierte Gen und die chromosomale kodierte Polymerase, die unter der Kontrolle des lacUV5-Promotor-Operators stehen, induziert. Dadurch wird der (auf dem Plasmid kodierte) Lac-Repressor inaktiviert. Der SUMO Tag (256bp) wurde zwischen NdeI und NotI in die multiple Klonierungsstelle (MCS) kloniert.

## 2.1.2 Oligodesoxynukleotide, Enzyme und Antikörper

### Oligodesoxynukleotide

Die Oligodesoxynukleotide (Primer), die in dieser Arbeit verwendet wurden, wurden bei der Firma MWG Eurofins synthetisiert.

Sequenzierungsprimer:

SP6	5'-CATTTAGGTGACACTATAG-3'
T7-prom	5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3'
T7-term	5'-GCTAGTTATTGCTCAGCGG-3'

Tabelle 2: PCR-Primer für die FgGT

Name	Zielgen	RE	Primer Sequenz
FgGT SUMO for	FgGT tul, hol und novi	Bam HI	5'-CAGGGATCC ACAGGTTGGTTTTATTCCCT-3'
FgGT tul R	FgGT tul, hol	XhoI	5'- CAGCTCGAGTTAATAACCTATAGCTAA TGC GC -3'
FgGT nov R	FgGT novi	Bam HI	5'CAGCTCGAGTTAATAACCAATAGCTAATGCGC-3'
FgGT phil F2	FgGT phil	BamHI	5'- CAG GGATCC GGTTATGATTTTCATCCCTATCC -3'
FgGT phil R2	FgGT phil	XhoI	5'-CAGCTCGAGTCAATAGCCTATAGCTAAAGCAT -3'
FgGT noat F2	FgGT noat	SpeI	5'-AGCACTAGTGGTTATGATTTTATCCCTATTCAAGAA -3'
FgGT noat R2	FgGT noat	XhoI	5'-CAGCTCGAGTCAATAACCTATCGCTAAAGCATTAC-3'

### Enzyme

Die Restriktionsenzyme und Reaktionspuffer wurden von Promega bezogen und bei -20 °C gelagert. Die Enzyme wurden nach dem Protokoll des Herstellers eingesetzt. Die verwendeten Restriktionsenzyme sind in der Tabelle 3 aufgelistet.

Tabelle 3: Restriktionsenzyme

Name	Schnittstelle	Quelle
<i>Bam</i> HI (10 U/ $\mu$ l)	G <sup>▼</sup> GATCC CCTAG <sup>▲</sup> G	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>
<i>Xho</i> I (10 U/ $\mu$ l)	C <sup>▼</sup> TCGAG GAGCT <sup>▲</sup> C	<i>Xanthomonas holcicola</i>
<i>Spe</i> I (10 U/ $\mu$ l)	C <sup>▼</sup> TCGAG GAGCT <sup>▲</sup> A	<i>Sphaerotilus natans</i>

**DNase**

DNaseI, Applichem (Darmstadt)

**Lysozym**

Lysozyme, from chicken egg white, Sigma, (Deisenhofen)

**Proteaseinhibitor**ASBSF hydrochloride Bio Chemica, 4-(2-Aminoethyl)-benzenesulfonyl fluoride hydrochloride, Applichem  
Complete Protease inhibitor cocktail, Roche (Mannheim)**SUMO-Protease**0,7 mg/ml (= 25 $\mu$ M) SUMO-Protease, exprimiert in *E.coli* BL21 und gereinigt (Vorarbeiten des MIH TUM)**Antikörper****Primäre Antikörper für den Westernblot:**

Die Maus- und Ratten-Hybridomaüberstände gegen die gereinigte His-getagte rekombinante FtgGT, die bereits vor dieser Arbeit in der AG Gerhard von Dr. Christan Bolz hergestellt wurde (kodierte Sequenz ist mit der in dieser Arbeit beschriebenen FtgGT identisch), wurden in Kooperation mit Frau Prof. Kremmer (Helmholtz-Zentrum München) generiert. Insgesamt wurden 13 Maus- und 53 Ratten-Hybridomaüberstände zur Verfügung gestellt. Die polyklonalen Antiseren wurden gegen die gereinigte tagfreie rekombinante FtgGT im Auftrag von der Firma BioGenes GmbH (Berlin) hergestellt.

Tabelle 4: Primäre Antikörper

Name	Verwendete Verdünnungen	Hersteller
Anti 6x-Histidine tag (mouse)	1:5000	AbD Serotec (MCA 1396) Puchheim
Maus- und Ratten-Hybridomaüberstände gegen <i>Francisella t. subsp. holarctica</i>	verschiedene Verdünnungen	Helmholtz-Zentrum München
Polyklonale Antiseren gegen <i>Francisella t. subsp. holarctica</i>	verschiedene Verdünnungen	BioGenes GmbH Berlin

### Sekundäre Antikörper für den Westernblot:

Tabelle 5: Sekundäre Antikörper

Name	Verwendete Verd.	Hersteller
Anti-mouse IgG HRP	1:10000	Promega W402B, Mannheim
Anti-rabbit IgG HRP	1:5000	Promega W401B, Mannheim
Anti-rat IgG HRP	1:3000	DAKO P0450, Hamburg

### 2.1.3 Nährmedien, Lösungen, Puffer und Antibiotika

#### Nährmedien:

Alle Nährmedien wurden für 20 Minuten bei 121 °C und 2 bar autoklaviert. Für die Selektiv-Nährmedien wurden die entsprechenden Antibiotika zugegeben.

Luria-Bertani-(LB)-Medium	0,5 % (w/v) Hefeextrakt 1 % (w/v) Trypton 0,5 % (w/v) NaCl
Terrific-Brot-TB-Medium	24 g Hefeextrakt 12 g Trypton 4 ml Glycerol auffüllen auf 900 ml mit ddH <sub>2</sub> O

Autoinduktionsmedium	TB- Medium
	89 mM K-Phosphat
	2 mM MgSO <sub>4</sub>
	0,2 % (w/v) Laktose
	0,02 % Polypropylenglycerol
	100 µg/ml Kanamycin

### **Agarplatten**

LB-Agarplatten	0,5 % (w/v) Hefeextrakt
	1 % (w/v) Trypton
	0,5 % (w/v) NaCl
	1,5 % (w/v) Bacto-Agar

Kana-LB-Agarplatten	0,5 % (w/v) Hefeextrakt
	1 % (w/v) Trypton
	0,5 % (w/v) NaCl
	1,5 % (w/v) Bacto-Agar
	20 µg/ml Kanamycin

Genta-Kana-LB-Agarplatten	0,5 % (w/v) Hefeextrakt
	1 % (w/v) Trypton
	0,5 % (w/v) NaCl
	1,5 % (w/v) Bacto-Agar
	50 µg/ml Kanamycin
	20 µg/ml Gentamycin

### **Lösungen und Puffer:**

Für die Herstellung der Lösungen und Puffer wurde MILLIPORE Wasser (Qualitätsstufe Typ III) verwendet und diese anschließend sterilfiltriert. Die Lagerung erfolgte bei RT, falls nicht anders vermerkt wurde.

<b>1 % Agarose</b>	1 % (w/v) Agarose
	0,5 % TAE

**Aktivitätsassay-Lösungen:**

Puffer	100 mM Tris, pH 8
Substrat	5 mM gGpNA
	100 mM Tris, pH 8
Akzeptor	100 mM GlyGly
	100 mM Tris, pH 8

**10 % Ammoniumperoxodisulfat (APS)-Stammlösung** 100 mg/ml Ammoniumperoxodisulfat in H<sub>2</sub>O, Lagerung bei -20 °C

**Antibiotika-Stammlösungen (1000x)**

Chloramphenicol-Stammlösung	25 mg/ml Chloramphenicol in EtOH Lagerung bei 4 °C
Gentamycin-Stammlösung	100 mg/ml Gentamycin in H <sub>2</sub> O Lagerung bei 4 °C
Kanamycin-Stammlösung	25 mg/ml Kanamycinsulfat in H <sub>2</sub> O Lagerung bei 4 °C

**Coomassie Brilliant Blue-Färbelösung für SDS Gele** 50 % (v/v) Ethanol (96 %)  
10 % (v/v) Essigsäure (100 %)  
0,1 % (w/v) Coomassie Brilliant Blue G250  
Lösung wurde lichtgeschützt aufbewahrt

**Coomassie Brilliant Blue-Färbelösung für Membranen** 50 % (v/v) Ethanol (96 %)  
10 % (v/v) Essigsäure (100 %)  
0,1 % (w/v) Coomassie Brilliant Blue G250  
Lösung wurde lichtgeschützt aufbewahrt

**DNA-Probenpuffer** 50 % (v/v) Glycerin  
0,1 % (w/v) Bromphenolblau  
100 mM Tris/HCl, pH 8.0



**SDS-PAGE Lösungen**

Protogel <sup>TM</sup>	38 % (v/v) Acrylamid, 2 % (v/v) Bisacrylamid
1 x SDS-PAGE Laufpuffer	0,025 M Tris 0,2 M Glycin 0,1 % (w/v) SDS
4 x SDS-PAGE Auftragspuffer	40 % (w/v) Glycerin 5 % (v/v) $\beta$ -Mercaptoethanol 8 % (v/v) SDS 0,004 % (w/v) Bromphenolblau 0,24 M Tris/HCl, pH 6.8
SDS-PAGE Probenpuffer	LDS Puffer, BioRad (NuPage-Kit)
SDS-PAGE Sammelgelpuffer	0,4 % (w/v) SDS 0,5 M Tris/HCl, pH 6.8
SDS-PAGE Trenngelpuffer	0,4 % (w/v) SDS 1,5 M Tris/HCl, pH 8.8

**SDS-PAGE-Gel**

Sammelgel	0,5 ml SDS-PAGE Sammelgelpuffer 0,2 ml 40 % Protogel <sup>TM</sup> 10 $\mu$ l 10 % APS 2 $\mu$ l TEMED 1,288 ml dH <sub>2</sub> O
Trenngel (10 %)	1,5 ml SDS-PAGE Trenngelpuffer 30 $\mu$ l 10 % APS 1,5 ml 40 % Protogel <sup>TM</sup> 6 $\mu$ l TEMED 2,964 ml dH <sub>2</sub> O

**TAE-Puffer**

40 mM Tris
20 mM Essigsäure
1 mM EDTA

<b>TFB I</b>	40 mM Tris 20 mM MnCl <sub>2</sub> 30 mM KOAc 10 mM CaCl <sub>2</sub> 15 % (v/v) Glycerin -> durch Zugabe von Essigsäure auf pH 5,8 eingestellt.
<b>TFB II</b>	10 mM Tris/HCl 10 mM KCl 75 mM CaCl <sub>2</sub> 15 % (v/v) Glycerin -> durch Zugabe von KOH auf pH 7 eingestellt.
<b>Westernblot Lösungen</b>	
1x TBS	50 mM Tris pH 7.5 150 mM NaCl
1x TBS-T	1x TBS 0,1 % Tween 20
Blockpuffer	TBS-T 5 % (w/v) Magermilchpulver
Tank Blot Transferpuffer	20 mM Tris 200 mM Glycin 20 % Methanol
Semi-Dry Transferpuffer	48 mM Tris 39 mM Glycine 0,03 % SDS 20 % Methanol
ECL Lösung	ECL Westernblot Substrate, Pierce

### 2.1.4 Chemikalien, Standards und Kits

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien, Standards und Kits wurden, wenn nicht anders vermerkt, von folgenden Firmen bezogen:

AMERSHAM PHARMACIA Biotech	(Freiburg)
BIORAD LABORATORIES	(München)
BOEHRINGER MANNHEIM	(Mannheim)
FLUKA	(Neu-Ulm)
GIBCO/BRL	(Eggestein)
MERCK	(Darmstadt)
ROCHE DIAGNOSTICS	(Mannheim)
ROTH	(Karlsruhe)
SIGMA-ALDRICH	(Deisenhofen)

#### **Bradford-Lösung**

Roti Quant, Roth (Karlsruhe)

#### **DNA Aufreinigungs-Kit**

PCR und Gel Kit

GE™ Healthcare illustra GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit, GE Healthcare (Freiburg)

Mini Prep Kit

PureYield™ Plasmid Miniprep System, Promega (Mannheim)

Midi Prep Kit

PureYield™ Plasmid Midiprep System, Promega (Mannheim)

#### **Entfaltungssassay**

Sypro-Orange, protein gel stain

Invitrogen (Karlsruhe)

#### **Ligations-Kit**

T4 DNA Ligase, Promega (Mannheim)

2x Rapid Ligase Buffer, Promega (Mannheim)

10x Ligase Buffer, Promega (Mannheim)

#### **Marker**

Protein Marker

Protein Marker V, peqlab (Erlangen)

Precision Plus Protein Standards Dual Color, BioRad (München)

DNA Marker

1kb bench top ladder, Pomega (Mannheim)

<b>PCR-Kit</b>	Herculase II fusion DNA polymerase, 5x Herculase II reaction buffer, DMSO, dNTPs [je 25mM], Agilent Tech. (Santa Clara, USA) Green-Taq, GoTaq® Green Master Mix (M712), Promega (Mannheim)
----------------	--

### 2.1.5 Geräte und sonstige Materialien

#### ÄKTA-System:

ÄKTA™ avant 25	GE Healthcare GmbH (Freiburg)
----------------	-------------------------------

#### Autoklaven:

Provit 2200	Holzner GmbH (Nußloch)
-------------	------------------------

#### Chromatographie-Säulen:

HisTrapp FFcrude, 1 & 5 ml	GE Healthcare GmbH (Freiburg)
----------------------------	-------------------------------

High Screen Butyl HP, 1 ml	GE Healthcare GmbH (Freiburg)
----------------------------	-------------------------------

HiLoad 16/600 Superdex 200 pg, 120 ml	GE Healthcare GmbH (Freiburg)
---------------------------------------	-------------------------------

Resource Q, 6 ml	GE Healthcare GmbH (Freiburg)
------------------	-------------------------------

#### Dialyseschlauch

SnakeSkin Dialysis Tubing, 10K MWCO	Thermo Scientific (Waltham, USA)
-------------------------------------	-------------------------------------

#### Eismaschine

Ziegra GmbH (Isernhagen)
--------------------------

#### Elektrophorese-Kammern:

Agarose Elektrophorese Kammern	Bio-Rad (München)
--------------------------------	-------------------

XCell IITM Blot Module	Invitrogen (Karlsruhe)
------------------------	------------------------

XCell SureLock® Mini-Cell	Invitrogen (Karlsruhe)
---------------------------	------------------------

#### Filter:

0,22 µM Filter	Millipore (Eschborn)
----------------	----------------------

0,45 µm Filter	Millipore (Eschborn)
----------------	----------------------

#### Geldokumentation:

Entwickler Curix60	AGFA (Köln)
--------------------	-------------

ChemoCam Imager 3.2	iNTAS Imaging (Göttingen)
---------------------	---------------------------

UV Transilluminator, Eagle Eye Gel Doc	Bio-Rad (München)
--	-------------------

#### Geltrocknung:

MINI-Set Geltrocknung	Roth (Karlsruhe)
-----------------------	------------------

## Heizrührer / Schüttler:

Magnetischer Heizrührer	IKAMAG RET-G (Staufen)
Innova 2100 Plattenschüttler	New Brunswick Scientific (Göttingen)
Thermomixer compact	Eppendorf (Hamburg)
Titramax 100	Heidolph (Schwabach)

## Homogenisator

Homo genius PandaPlus 2000	GEA Niro Soavi (Düsseldorf)
----------------------------	-----------------------------

## Kühl- &amp; Gefrierschränke:

Gefrierschrank (-20°C)	Liebherr (Ochsenhausen)
HERAFreeze Basic (-86°C)	Thermo Scientific (Waltham, USA)
Kühlschrank (4°C)	Liebherr (Ochsenhausen)

## Netzgeräte:

PowerPac300	Bio-Rad (München)
PowerPac Basic (für SDS Gele)	Bio-Rad (München)
Trans-Blot, SD Semi-Dry Transfer Cell	Bio-Rad (München)

## Membran

Immobilion-P, Transfer-Membran	Millipore (Eschborn)
--------------------------------	----------------------

## PCR-Geräte:

T3000 Thermocycler	Biometra (Göttingen)
iCycler	BioRad (München)

## pH-Meter:

inLab pH 720	WTW inoLab (Weilheim)
--------------	-----------------------

## Pipetten:

Einkanalpipette, 0.5-10 µl	Corning GmbH (Kaiserslautern)
Einkanalpipette, 2-20 µl	Corning GmbH (Kaiserslautern)
Einkanalpipette, 20-200 µl	Corning GmbH (Kaiserslautern)
Einkanalpipette, 200-1000 µl	Corning GmbH (Kaiserslautern)
Multikanalpipette, 50-300µl	Corning GmbH (Kaiserslautern)

## Röntgenfilme

Fuji Medical X-Ray Film	Fuji (Düsseldorf)
-------------------------	-------------------

## Schüttelinkubatoren:

Multitron Pro	Infors AG (Bottmingen, Schweiz)
Spektrophotometer:	
Mithras LB940	Berthold (Bad Wildbad)
NanoDrop 1000	Thermo Scientific (Waltham, USA)
Sterilbank HeraSafe	Heraeus, Thermo Scientific (Langenselbold)
Ultraschallgerät:	
Sonoplus UW 2070	Bandelin (Berlin)
Vakuumpumpe:	
LABOPORT N811KN18	KNF Neuberger (Feiburg im Breisgau)
Waagen:	
Laboratory LC 2200 S	Sartorius (Göttingen)
XB120A	Precisa (Dietikon, Schweiz)
Wasserbäder:	
Wasserbad Julabo	Julabo Labortechnik GmbH (Seelbach)
Wasserbad	GFL (Burgwedel)
Vortex Genie 2	Schultheiss (München)
Zentrifugen:	
Biofuge Pico Zentrifuge	Heraeus, Thermo Scientific (Langenselbold)
Biofuge Primo R Zentrifuge	Thermo Scientific (Waltham, USA)
Centrifuge 5415D	Eppendorf (Hamburg)
Multifuge 3 S-R	Heraeus, Thermo Scientific (Langenselbold)
Micro 200R	Hettich (Tuttlingen)
Sorvall RC 6+ Centrifuge mit Rotoren SLA-1500, SLA-3000 und SS-34	Sorvall Instruments (Bad Homburg)
Zentrifugalkonzentratoren:	
Amicon Ultra-15 Zentrifugen-Filtereinheiten	Merck Millipore (Darmstadt)

Nanosep 10K Omega

Pall (Dreieich)

## 2.2 Mikrobiologische Methoden

### 2.2.1 Vorbereitung von Geräten und Lösungen

Alle hitzestabilen Materialien und Lösungen wurden bei 121 °C für 20 min und 2 bar autoklaviert. Lösungen, die nicht autoklaviert wurden, wurden durch ein Membranfilter der Größe 0,22 µm steril filtriert.

### 2.2.2 Anzucht und Lagerung von *E. coli*-Stämmen

Die Anzucht von *E. coli*-Stämmen erfolgte in LB-Medium, das mit dem entsprechenden Antibiotikum versetzt wurde und bei 37 °C unter Schütteln (Multitron II Inkubationsschüttler) bei 170 - 220 rpm inkubiert wurde. Das Antibiotikum lag in einer tausendfachen konzentrierten Stammlösung vor. Die Anzucht für die Testexpression und Überexpression der FgGT in AEpET28b SUMO *E. coli* erfolgte im Autoinduktionsmedium bei 20 °C unter Schütteln (Multitron Pro) bei 200 rpm.

Die Anzucht nach einer Transformation erfolgte auf Agarplatten, die im Brutschrank bei 37 °C über Nacht inkubiert wurden. Dabei erhielt man Einzelkolonien.

Die Lagerung der *E. coli* Stämme erfolgte als Glycerol-Stock bei -80 °C. Dafür wurde eine über Nacht 5 ml LB-Medium Kultur abzentrifugiert (10 min bei 1500xg), das Pellet in 500 µl LB-Medium resuspendiert und im Verhältnis 1:1 mit 87 % Glycerin versetzt. Die Probe wurde sofort in Flüssigstickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

### 2.2.3 Herstellung chemisch kompetenter *E. coli*-Bakterien

Für die Herstellung chemisch kompetenter *E. coli* Bakterien wurden 500 ml SOB-Medium mit dem entsprechendem Stamm einer Übernachtskultur inokuliert. Die Kultur wurde bei 37 °C und 200 rpm bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,4 - 0,7 angezogen, 15 min. auf Eis inkubiert und bei 1460xg und 4 °C für 10 min zentrifugiert. Das Pellet wurde in 50 ml eiskalter TFB-I Lösung resuspendiert und erneut bei 1460xg und 4 °C für 10 min zentrifugiert. Anschließend wurde das Pellet in 5 ml eiskalter TFB-II Lösung resuspendiert und in vorgekühlte Eppendorf-Reaktionsgefäße zu je 100 µl aliquotiert. Die hergestellten chemisch kompetenten Bakterien wurden bei -80 °C gelagert.

### **2.2.4 Transformation chemisch kompetenter *E. coli*-Bakterien**

Ein Aliquot chemisch kompetenter *E. coli* Zellen (50 µl) wurde aufgetaut und zu einem 10 µl Ligationsansatz bzw. ~100 ng Plasmid-DNA hinzugegeben. Das Gemisch wurde für 10 min auf Eis inkubiert. Danach folgte ein Hitzeschock bei 42 °C für 45 sec und eine erneute Inkubation auf Eis für 5 min. Es wurden 900 µl LB-Medium ohne Antibiotikum hinzugefügt und das Gemisch für 30-60 min im Brutschrank bei 37 °C inkubiert. In dieser Inkubationszeit wurde die Antibiotikaresistenz ausgeprägt. Anschließend wurde das Gemisch abzentrifugiert (10 min bei 1500xg) und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde im Restmedium (ca. 100 µl) resuspendiert und auf einer Agarplatte mit entsprechender Antibiotikaresistenz ausplattiert. Die Inkubation der Agarplatten erfolgte über Nacht im Brutschrank bei 37 °C.

### **2.2.5 Produktion rekombinanter Proteine in *E. coli***

#### **2.2.5.1 Testexpression**

Für die Testexpression wurde zunächst eine Vorkultur angesetzt. Dafür wurde mit einer frisch transformierten *E. coli* Einzelkolonie 5 ml LB-Medium (mit entsprechendem Antibiotikum) inokuliert und über Nacht unter Schütteln bei 37 °C inkubiert. Diese Vorkultur wurde verwendet, um 200 ml Autoinduktionsmedium mit einer OD<sub>600</sub>= 0,1 pro ml zu inokulieren. Es erfolgte eine Inkubation bei 20 °C für 20 h bei 200rpm. Insgesamt wurden für jedes Konstrukt mehrere Klone getestet. Für das SDS-Gel wurden jeweils eine Probe mit der OD<sub>600</sub>= 0,6 pro ml von der Vorkultur (nicht induzierte Probe) und der Kultur mit Autoinduktionsmedium (induzierte Probe) entnommen und für 10 min bei 1500xg und 4 °C zentrifugiert. Das Pellet wurde in 30 µl H<sub>2</sub>O aufgenommen, mit 10 µl 4x SDS Auftragspuffer versetzt und für 10 min bei 95 °C gekocht. Zur Analyse der Überexpression wurden diese Proben (nicht induziert und induziert) mittels SDS-PAGE (2.5.1) untersucht.

#### **2.2.5.2 Überexpression**

Für die Überexpression wurde zunächst eine Vorkultur (50-200 ml LB-Medium) aus dem Glycerol-Stock inokuliert und über Nacht unter Schütteln bei 37 °C inkubiert. Im nächsten Schritt wurden 1-5 L Autoinduktionsmedium mit der Vorkultur auf eine OD<sub>600</sub>= 0,1 pro ml inokuliert und bei 20 °C für 20 h bei 200rpm inkubiert. Für das SDS-Gel wurden jeweils eine Probe mit der OD<sub>600</sub>= 0,6 pro ml von der Vorkultur (nicht induzierte Probe) und der Kultur mit Autoinduktionsmedium (induzierte Probe) entnommen und für 10 min bei 1500xg bei 4 °C zentrifugiert. Das Pellet wurde in 30 µl H<sub>2</sub>O aufgenommen, mit 10 µl 4x

SDS Auftragspuffer versetzt und für 10 min bei 95 °C gekocht. Zur Analyse der Überexpression wurden diese Proben (nicht induziert und induziert) mittels SDS-PAGE (2.5.1) untersucht.

### 2.2.5.3 Zellaufschluss

Für den Zellaufschluss wurde das Bakterienpellet (mit überexprimierter FgGT) in einem 10x Volumen des Puffers NiNTA Puffer A (1 g Pellet/10 ml) aufgenommen. Die Pelletsuspension wurde mit 1 mM Proteaseinhibitor AEBSF, 150 U/ml DNase I und 5 mM MgCl<sub>2</sub> versetzt. Nach 15 Minuten Inkubation auf dem magnetischen Heizrührer bei 4 °C wurde das Gemisch 3x bei 800-1000 bar in 3-4 Durchgängen homogenisiert. Anschließend wurde das Gemisch bei 25000xg und 4 °C für 30 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde mit Hilfe eines Membranfilters der Größe 0,22 µm filtriert und konnte anschließend für die chromatographische Aufreinigung mittels Äkta-System verwendet werden (2.5.3).

Für die Reinigung der endogenen FtgGT wurde das Bakterienpellet einer 1-2 Liter Kultur des attenuierten Stammes *F. t. subsp. holarctica* LVS (Bakterienpellet vom Institut für Mikrobiologie der Bundeswehr erhalten) in 30 ml NiNTA Puffer A aufgenommen. Die Pelletlösung wurde mit 200 µg/ml Lysozym (Zerstörung der Peptidoglycan-Hülle), 1 mM Protease-Inhibitor, 150 U/ml DNase I und 5 mM MgCl<sub>2</sub> versetzt und anschließend für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Nach einer Ultraschall-Behandlung (5x für 1 Minute auf Eis) wurde die Lösung für 30 Minuten bei 4 °C und 25.000xg zentrifugiert. Der Überstand der Probe wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 30 µl 1500 U/ml DNase I versetzt. Nach einer Inkubation von 20 Minuten auf Eis wurde die Probe durch ein 0,45 µm Filter gegeben und wurde für die Reinigung an der Äkta verwendet.

### 2.2.5.4 SUMO-Verdau

Das SUMO-Protein (*small ubiquitin-related modifier*) ist ein 11 kDa großes Protein, welches zu der Gruppe der Ubiquitin-ähnlichen Modifizierer gehört. Es dient als Fusions-Tag, erhöht die Expression und die Löslichkeit der Proteine und kann mit Hilfe der SUMO-Protease spezifisch abgespalten werden (Malakhov, Mattern et al. 2004). Die SUMO-Protease, eine hoch aktive Cystein Protease, ist ein rekombinant hergestelltes Fragment des Ulp1 Proteins (Ubl-spezifische Protease 1) aus *Saccharomyces cerevisiae* (Li and Hochstrasser 1999). Sowohl das SUMO-Protein als auch die SUMO-Protease sind N-terminal mit einem His-Tag versehen. Dies ermöglicht es, nach der Abspaltung des SUMO-Tags mit Hilfe der SUMO Protease, sowohl das SUMO-Protein als auch die

SUMO-Protease mittels Affinitätschromatographie von dem zu reinigenden Zielprotein zu isolieren.

Die in dieser Arbeit verwendete SUMO-Protease wurde im BL21 Expressionsstamm produziert und mit Hilfe eines His-Tags mittels Affinitätschromatographie gereinigt (hergestellt von Christina Daschkin, Institut für Medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Hygiene TU München).

Die gereinigten Proteine mit einem N-terminalen SUMO-Tag wurden in einem molaren Verhältnis von 1:500 bzw. 1:250 der SUMO-Protease zur jeweiligen FgGT und 10x Protease Puffer versetzt. Nach einer 15 min Inkubation bei RT wurde das Protein mit Hilfe einer HisTrap FFcrude Säule gereinigt, wobei der SUMO-Tag und die SUMO-Protease aufgrund ihrer His-Tags in der Säule verbleiben (negative Anreicherung).

### **2.2.6 *Francisella* Fraktionierung**

Das Institut für Mikrobiologie der Bundeswehr stellte für diesen Versuch 2,8 g Bakterienpellet einer 1 L Kultur mit der OD<sub>600</sub> 3,42 und 50 ml Kulturüberstand in 1x PBS (2 h Inkubation von 1,86 g Bakterienpellet) des attenuierten Stammes *F. t. subsp. holarctica* LVS bereit. Die Fraktionierung des Bakterienpellets erfolgte nach einem Protokoll von McCaig et al. (McCaig, Koller et al. 2013). Das Pellet wurde in 20 ml 20 mM Tris HCl pH 8 resuspendiert, davon wurden 100 µl für die SDS-PAGE Probe entnommen (Gesamtlysat). Das resuspendierte Pellet wurde bei 10.000xg und 4 °C für 5 min (Sorval) zentrifugiert. Anschließend wurde das Pellet in 20 ml 20 mM TrisHCl pH 8 plus 20 % Saccharose resuspendiert und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Nach der Zugabe von 15 mM EDTA und 200 µg/ml Lysozym (Endkonzentrationen) erfolgte eine 40 minutige Inkubation auf Eis. Daraufhin wurden als Endkonzentration 26 mM MgCl<sub>2</sub> und 54 µl DNaseI (15.000 U/min) zugegeben und für 20 min auf Eis inkubiert. Die Bakterien wurden bei 10.000xg und 4 °C für 20 min zentrifugiert (Sorval). Der Überstand wurde abgenommen und entspricht der Periplasma-Fraktion. Das Pellet wurde in 20 ml 20 mM TrisHCl pH 8 plus Complete Protease Inhibitor Cocktail (1/2 Tablette, Roche) resuspendiert und in ein neues Reaktionsgefäß transferiert. Anschließend erfolgte ein Ultraschall-Aufschluss (15 s on, 15 s off für 2 min auf Eis). Das Gemisch wurde bei 8.000xg und 4 °C für 10 min (Sorval) zentrifugiert, um nicht aufgeschlossene Zellen abzutrennen. Der Überstand wurde anschließend bei 100.000xg und 4 °C für 1 h zentrifugiert (Ultrazentrifuge), um die Membran zu pelletieren. Der Überstand wurde in

ein neues Reaktionsgefäß überführt (entspricht der Cytoplasma Fraktion). Das Membranpellet wurde in 20 ml 20 mM TrisHCl pH 8 plus Complete Protease Inhibitor Cocktail (1/2 Tablette, Roche) plus 0,5 % Sarkosyl resuspendiert und für 5 min bei RT geschüttelt. Für die Pelletierung der äußeren Membran (*outer membrane*= OM) wurde das Gemisch bei 100.000xg und 4 °C 1 h zentrifugiert (Ultrazentrifuge). Nach der Überführung des Überstandes (entspricht der Membranfraktion) wurde das Pellet in 10 ml 20 mM TrisHCl pH 8 plus 0,3 M NaCl resuspendiert (entspricht der OM Fraktion).

Nach der Fraktionierung wurde der Kulturüberstand und die einzelnen Fraktionen auf die gleichen Pufferbedingungen eingestellt (20 % Saccharose, 15 mM EDTA, 200 µg/ml Lysozym, DNaseI, 0,3 M NaCl, 0,5 % Sarkosyl, Proteaseinhibitor und 20 mM TrisHCl pH 8), um diese in der Analyse untereinander vergleichen zu können. Die Analyse erfolgte mittels Aktivitätsassay (2.6.1). Alle Fraktionen und Probenpuffer (negativ Kontrolle= Hintergrund) wurden in einer Dreifachmessung und in drei verschiedenen Mengen 40 µl, 60 µl und 80 µl im FgGT Aktivitätsassay als 4 h Kinetik gemessen. Die gemessene Anfangsgeschwindigkeit der Verdünnungen wurde auf 1 g Pellet hochgerechnet und als Unit (µmol/min L-gGpNA Umsetzung) ausgerechnet. Eine Unit ist ein Maß dafür, wieviel µMol Substrat (L-gGpNA) vom Enzym (FtgGT) pro Minute umgesetzt werden. Anschließend wurde aus den Verdünnungen der Mittelwert gebildet und die Ergebnisse als relative FtgGT Aktivität dargestellt, wobei die Cytosol-Fraktion auf 100 % gesetzt wurde.

## 2.3 Molekularbiologische Methoden

### 2.3.1 PCR

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR, *polymerase chain reaction*) ermöglicht es mit Hilfe des Enzyms DNA-Polymerase die DNA *in vitro* zu vervielfältigen. Für die Reaktion werden folgende Komponenten benötigt: DNA, die amplifiziert werden soll; zwei Primer, die den Startpunkt der DNA-Amplifikation auf beiden Einzelsträngen der DNA initiieren; thermostabile DNA-Polymerase für die Replikation; Desoxyribonukleosidtriphosphate für die DNA-Synthese und Mg<sup>2+</sup>-Ionen für die Polymerase-Funktion. Die PCR besteht aus drei Schritten: 1. Denaturierung der doppelsträngigen DNA durch Erhitzung auf 94-96 °C (bis zu 15 min lang); 2. Primerhybridisierung (*primer annealing*), Anlagerung der Primer an die DNA bei einer 5-10 °C geringeren Temperatur als dem Schmelzpunkt der Primer (ca. 30 s lang); 3. Elongation (Polymerisation, Amplifikation) der einzelsträngigen DNA (ca.

30 s je 500 Basenpaare, abhängig von der verwendeten Polymerase). Dieser Zyklus wird 20-40 Mal wiederholt und wird in einem Thermocycler durchgeführt.

In dieser Arbeit wurde die PCR sowohl für die Amplifikation der FgGT aus genomischer *Francisella* DNA, als auch für das Screening von gepickten DH5 $\alpha$  pET28bSUMO FgGT Klonen angewendet.

Für die Screening-PCR wurden Primer verwendet, die entweder beide im Vektor pET28bSUMO binden oder je einer im Vektor und im Insert (FgGT spezifische PCR-Primer). Dadurch konnte ausgeschlossen werden, dass ein positives PCR Ergebnis durch Kontamination mit der Insert-DNA zustande kommt. Die verwendeten spezifischen Primer waren mit den für die Genamplifikation verwendeten Forward-Primern identisch.

Die durchgeführten PCR-Protokolle und PCR-Programme sind in den folgenden Tabellen aufgeführt:

Tabelle 6: PCR-Protokoll, FgGT Amplifikation aus genomischer *Francisella* DNA

Reagenzien	Volumen
5x Herculase II Reaktionspuffer	10 $\mu$ l
DNA- Template (20 ng)	
Forward- Primer [10 pmol]	1 $\mu$ l
Reverse-Primer [10 pmol]	1 $\mu$ l
dNTPs [je 25 mM]	0,5 $\mu$ l
Herculase II fusion DNA Polymerase	1 $\mu$ l
DMSO	2 $\mu$ l
Add. H <sub>2</sub> O	50 $\mu$ l

Tabelle 7: PCR-Programm, FgGT Amplifikation aus genomischer *Francisella* DNA

Temperatur	Zeit	Wiederholung
95 °C	2 min	1x
95 °C	20 s	36x
T <sub>m</sub> Primer	20 s	
68 °C	30 s	
68 °C	3 min	1x

Tabelle 8: PCR-Produkte der FgGT Amplifikations-PCR

PCR-Produkt	Primer-Paar	Produktgröße [bp]
FgGT hol	FgGT SUMO for/ FgGT tul R	1668
FgGT tul	FgGT SUMO for/ FgGT tul R	1668
FgGT novi	FgGT SUMO for/ FgGT nov R	1668
FgGT phil	FgGT phil F2/ FgGT phil R2	1665
FgGT noat	FgGT noat F2/ FgGT noat R2	1665

Tabelle 9: Screening PCR-Protokol

Reagenzien	Volumen
Green-Taq	7,5 µl
DNA-Template (von einer Mini-Pep)	2,5 µl
Forward-Primer [10pmol]	1 µl
Reverse-Primer [10pmol]	1 µl
H <sub>2</sub> O	3 µl
Gesamt-Volumen	15 µl

Tabelle 10: Screening PCR-Programm

Temperatur	Zeit	Wiederholung
95 °C	2 min	1x
95 °C	30 s	30x
Tm Primer	30 s	
68 °C	2 min	
68 °C	10 min	1x

### 2.3.2 DNA-Isolierung

Für die DNA-Isolierung wurde zunächst eine 5 ml Übernachtskultur mit LB-Medium und dementsprechende *E. coli* Klon angesetzt (2.2.2). Von dieser Kultur wurden 4 ml bei RT und 1460xg für 5 min zentrifugiert. Die DNA-Isolierung erfolgte gemäß des Herstellerprotokolls des PureYield™ Plasmid Miniprep System von Promega. Wurden größere Mengen benötigt, wurde eine 100 ml LB-Medium Kultur über Nacht angesetzt und bei RT und 5000 rpm für 20 min zentrifugiert. In diesem Fall wurde die Plasmid-DNA mit dem PureYield™ Plasmid Midiprep System von Promega nach Herstelleranleitung gereinigt. Die Plasmid-DNA wurde in 25-40 µl (Mini-Prep) bzw. 300-500 µl (Midi-Prep) Nuklease-freiem H<sub>2</sub>O eluiert. Die Lagerung erfolgte kurzfristig (1-2 Tage) bei 4 °C und längerfristig bei -20 °C.

### 2.3.3 Gelelektrophorese

Für die Gelelektrophorese wurden Agarosegele verwendet. Dazu wurde 1 % (w/v) Agarose in 1x TAE-Puffer aufgekocht und auf ca. 60 °C abgekühlt, und anschließend mit 5 µl Roti-Safe pro 100 ml Agarose versetzt. Das Gemisch wurde in eine Gelkammer mit Kamm gegossen. Nach dem Abkühlen wurde 1x TAE-Puffer dazugegeben bis das ausgehärtete Gel bedeckt war. Die Vernetzung des Gels ermöglichte eine Auftrennung der DNA nach ihrer Größe bei Anlegung einer Spannung. Die DNA-Proben wurden zunächst mit 1/10 DNA-Probenpuffer versetzt und schließlich in die Geltaschen pipettiert. Die Gelelektrophorese fand bei einer Spannung von 90 V für 40 min statt. Die DNA-Banden wurden mit Hilfe von UV-Licht bei der Wellenlänge von 302 nm sichtbar gemacht und mit

DNA Pick-tips ausgestanzt. Die Dokumentation erfolgte mit dem Imager Gel Doc XR+ System.

Die Aufreinigung der ausgestanzten DNA-Fragmente wurde mit dem Illustra GFX™ PCR and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare) nach dem Herstellerprotokoll durchgeführt. Die DNA wurde in 20 µl Nuklease-freiem H<sub>2</sub>O eluiert und gegebenenfalls bei -20 °C gelagert.

#### **2.3.4 Verdau mit Restriktionsendonukleasen**

Der Verdau mit Restriktionsendonukleasen erfolgte mit den entsprechenden Restriktionsenzymen der Firma Promega, sowohl für die verwendeten Plasmide, als auch für die DNA-Fragmente. Die Plasmide und die DNA-Fragmente wurden in einem Gesamtvolumen von 10 µl nach den Herstellerangaben inkubiert. Danach erfolgte die Analyse mit Hilfe der Gelelektrophorese (2.3.3).

#### **2.3.5 Ligation der DNA-Fragmente in Zielvektoren**

Für die Ligation der DNA-Fragmente in die Zielvektoren wurde die T4 Ligase (Promega; New England Biolabs) verwendet. Dies wurde nach Herstellerprotokoll durchgeführt. Nach der Inkubation des Ligationsansatzes wurden die daraus resultierenden Plasmide in chemisch kompetenten *E. coli DH5 α* transformiert (2.2.4).

#### **2.3.6 Sequenzierung**

Die Sequenzierung der klonierten Genkonstrukte wurde von der Firma MWG Eurofins nach dem Prinzip der Kettenabbruchmethode von Sanger (Sanger, Nicklen et al. 1977) durchgeführt. Dazu wurden 500-100 ng DNA und gegebenenfalls 30 pMol eines Sequenzierungsprimers an die Firma MWG Eurofins versendet. Die Ergebnisse der Sequenzierung wurden im TXT Format übermittelt und mit Hilfe des Onlinetools Nukleotid BLAST ([www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/)) analysiert.

### **2.4 FgGT Antikörperherstellung**

#### **2.4.1 Herstellung von monoklonalen Antikörpern**

Die monoklonalen Antikörper bzw. Hybridomaüberstände wurden in der Gruppe von Dr. Elisabeth Kremmer am Helmholtz Zentrum München hergestellt und für diese Arbeit zu Verfügung gestellt. Die Produktion erfolgte nach der Hybridom-Technik (Kohler and

Milstein 1975). Dazu wurden zunächst Mäuse und Ratten mit der zu Verfügung gestellten *F.t. subsp. holarctica* gGT (rekombinantes Protein mit einem 6x His-Tag aus Vorarbeiten von Dr. Bolz) immunisiert. Aus deren Milz wurden B-Lymphozyten isoliert und mit Myelomzellen fusioniert. Diese entstandenen Hybridomzellen besitzen sowohl die Eigenschaft der B-Lymphozyten - Produktion von FgGT Antikörpern - als auch der Myelomzelle – Fähigkeit zur unbegrenzten Vermehrung. Im ELISA positiv getestete Hybridomaüberstände, wurden für die Testung im Westernblot zur Verfügung gestellt.

#### **2.4.2 Herstellung von polyklonalen Antikörper**

Die polyklonalen Antikörper wurden als Auftragsarbeit von der Firma BioGenes GmbH in Berlin generiert. Dazu wurden zwei Kaninchen mit der rekombinanten *F.t. subsp. holarctica* gGT, die im Rahmen dieser Arbeit produziert wurde, immunisiert. Am ersten Tag der Immunisierung wurde jedem Tier 1,5 ml Präimmunserum entnommen. Nach 7 Tagen erfolgte die erste Boost-Injektion und nach weiteren 7 Tagen die zweite Boosterung. Das Bluten der Tiere erfolgte 14 Tage nach der letzten Boost-Injektion. Die Seren wurden zum Testen zur Verfügung gestellt. Des Weiteren erfolgten noch zwei weitere Boost-Injektionen im Abstand von 14 Tagen und eine anschließende Aufreinigung (Affinitätsreinigung) der Seren, um antigenspezifische Antikörper anzureichen. Diese Seren wurden pro Tier jeweils in einem 50 ml und 20 ml Aliquot geliefert.

### **2.5 Proteinchemische Methoden**

#### **2.5.1 SDS-PAGE (Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese)**

Die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese, die von Lämmli entwickelt wurde (Laemmli 1970), ermöglicht eine Trennung von Proteinen aufgrund ihrer Molekülmasse. Die Probenproteine werden durch Kochen denaturiert, das Detergens Natriumdodecylsulfat (SDS) lagert sich proportional zum Molekulargewicht der Proteine an diese an und überdeckt deren Eigenladung. Dabei werden ca. 1,4 Gramm SDS pro Gramm Protein gebunden und die Proteine werden gemäß ihrer Molekülmasse aufgetrennt, und zwar anhand des Siebeefferktes der Polyacrylamidmatix.

Bei der Probenvorbereitung wurde die Proteinprobe in einem Verhältnis von 1:4 mit 4x SDS-Probenpuffer versetzt und bei 95 °C für 5-10 min aufgeköcht. Vor dem Auftragen wurden die Proben zentrifugiert (1 min bei RT und 13000 rpm).

Für die Elektrophorese wurden 10 % Polyacrylamidgele verwendet. Das Gel wurde in die Elektrophoresekammer gespannt und die Kammer mit 1x SDS-Laufpuffer aufgefüllt. Nach dem Abziehen des Kammes wurden 5 bis 20 µl Proben in die Taschen aufgetragen (falls nichts anderes vermerkt wurde). Die SDS-PAGE wurde bei 150 V und max. 300 mA für 70 min durchgeführt.

Die Gele wurden durch Schwenken in der Coomassie Färbelösung für 15 bis 30 min gefärbt. Anschließend wurden die Gele mit der Entfärbelösung für mindestens 1 h oder über Nacht entfärbt. Die Nachweisgrenze der Coomassie Brilliant Blue G250 Färbung liegt bei ca. 0,2 bis 0,5 µg Protein / Bande.

### 2.5.2 Westernblot

Die Westernblot Methode ermöglicht die Identifizierung und Quantifizierung spezifischer Proteine in komplexen Proteingemischen (Towbin, Staehelin et al. 1979). Die Proteine werden mit Hilfe der SDS-PAGE (2.5.1) nach ihrer Molekulargröße aufgetrennt und auf eine Membran (z.B. Nitrocellulose oder PVDF) transferiert. Zum Transfer wird ein elektrisches Feld angelegt und die Proteine wandern in die Richtung der Anode. Die Haftung der Proteine auf der Membran erfolgt bei Nitrocellulose über ionische und polare Wechselwirkungen bzw. bei PVDF über hydrophobe und polare Wechselwirkungen. Das Proteinbandenmuster nach der Auftrennung mittels der SDS-PAGE (2.5.1) bleibt beim Transfer erhalten. Nach dem Transfer können die Proteinbanden mittels eines spezifischen Antikörpers detektiert und somit identifiziert werden. Dabei bindet der erste Antikörper das Protein auf der Membran, welcher wiederum von einem zweiten Antikörper, der radioaktiv markiert bzw. an ein Enzym (z.B. Peroxidase) gekoppelt ist, gebunden wird.

Nach der Auftrennung der Proteine mit Hilfe der SDS-PAGE (2.5.1) erfolgte der Transfer auf eine mit Methanol aktivierte PVDF Membran (Millipore), entweder nach dem Tank-Blot-Verfahren oder nach der Semi-Dry-Methode. Der Transfer wurde bei 230 mA für 90 min (Tank-Blot-Verfahren) bzw. bei 2 mA/cm<sup>2</sup> für 120 min (Semi-Dry-Methode) durchgeführt. Folgender Aufbau wurde für den Blot verwendet: Anode, drei Schwämme (nur beim Tank-Blot-Verfahren), drei Lagen Whatman Papier, Membran, SDS-Gel, drei Lagen Whatman Papier, drei Schwämme (nur beim Tank-Blot-Verfahren), Kathode. Die Schwämme und das Whatman Papier waren auf Gelgröße zugeschnitten und im jeweiligen Transferpuffer getränkt worden.

Nach Beendigung des Transfers wurde die Membran mit 1x TBS-T gewaschen und mit 5 % Magermilch für 30-40 min bei RT bzw. gegebenenfalls über Nacht bei 4 °C geblockt. Anschließend wurde die Membran für 1 h bei RT bzw. über Nacht bei 4 °C mit dem ersten Antikörper in 1 % Magermilch (Verdünnungen siehe Tabelle 4) inkubiert. Die Membran wurde 2x kurz und 3x für 10 min mit 1x TBS-T gewaschen. Die Inkubation mit dem zweiten Antikörper (Verdünnungen siehe Tabelle 5) erfolgte ebenfalls in 1 % Magermilch für 1,5 h bei RT. Anschließend wurde die Membran wieder 2x kurz und 3x für 10 min mit 1x TBS-T gewaschen. Alle bisherigen Schritte erfolgten unter Schütteln. Für die Detektion wurde die Membran mit 2 ml Pierce ECL Westernblot Substrat inkubiert und am ChemoCam Imager bzw. mittels Röntgenfilm am Entwickler Curix60, durchgeführt.

Nach der Detektion wurde die Membran 2x 5 min mit 1x TBS-T gewaschen und mit Coomassie Brilliant Blue-Färbelösung für Membranen 15 min unter Schütteln gefärbt. Anschließend erfolgte die Entfärbung mit der Entfärbelösung für Membranen unter Schwenken, bis klare Banden zu sehen waren.

### 2.5.3 Chromatographische Verfahren

#### 2.5.3.1 Affinitätschromatographie

Die Affinitätschromatographie ermöglicht die Trennung eines Analyten aus einer Lösung verschiedener Stoffe. In dieser Reinigungsmethode erfolgt die Trennung eines Proteins aus einer komplexen Proteinmischung durch die biospezifische Wechselwirkung (reversible Adsorption) des Proteins mit den bestimmten, an der Säulenmatrix gebundenen, chemischen Gruppen (Ligand). Durch die kompetitive Verdrängung aus der Bindung wird das Protein (Adsorbens) vom immobilisierten Liganden auf der Säulenmatrix eluiert. Die Chromatographien erfolgten unter Verwendung eines ÄKTA avant 25 Systems.

#### **Metallchelat-Affinitätschromatographie** (*Immobilized metal affinity chromatography; IMAC*)

Bei der Metallchelate-Affinitätschromatographie werden die Histidinseitenketten eines Proteins, die zuvor an das Protein N- bzw. C-terminal angefügt wurden, an das gebundene Übergangsmetallion in der Säulenmatrix gebunden. Mit Hilfe eines Imidazolgradienten wird das Protein eluiert. Dabei konkurriert das Imidazol mit dem Protein um die besetzten Bindungsstellen der Säule. Die verwendete HisTrap HP-Säule (5 ml) von der Firma GE Healthcare besitzt eine Ni<sup>2+</sup> Sepharose-Säulenmatrix, an die das 6xHis-markierte Protein gebunden wird.

Die Reinigung erfolgte bei 4 °C mit einem Drucklimit (Säulendruck 0,5 MPa und Delta Druck 0,3 MPa) und nach folgendem Protokoll:

<b>Flussrate</b>	5 ml/min als Down Flow (falls nicht anderes vermerkt ist)
<b>Equilibrieren</b>	5 Säulenvolumina (SV) NiNTA-Puffer A
<b>Beladen</b>	Einstellung: Probenventil ( <i>Sample inlet</i> ) mit einem Luftsensord 30-60 ml Proteinlösung in NiNTA-Puffer A mittels Auftragspumpe auf die Säule aufgeladen Durchfluss als 50 ml Fraktionen gesammelt, um eventuelles Restprotein aufzufangen
<b>Waschen</b>	10 SV NiNTA-Puffer A
<b>Eluieren</b>	linearer Gradient für NiNTA-Puffer B von 2 % auf 100 % (Einstellung hier <i>Up flow</i> ) Elution mit 5 SV und in 1 ml Fraktionen in einer Deep-Well-Platte gesammelt

Die Elution der Proteine wurde in einem Chromatogramm bei 280 nm verfolgt. Jede zweite Fraktion, deren Absorption bei 280 nm innerhalb des Protein-Peaks lag, wurde über die SDS-PAGE (2.5.1) analysiert.

Zur Regeneration der HisTrap HP-Säule, wurde im Anschluss der Reinigung folgendes Programm durchgeführt:

<b>Regeneration der Säule</b>	5 SV H <sub>2</sub> O 10 SV 0,5 M EDTA, um alte Ni <sup>2+</sup> -Ionen und damit noch restliche His-getagte Protein-Moleküle auszuspülen 5 SV H <sub>2</sub> O (Waschgang) 5 SV 1 M NaOH ( <i>Up Flow</i> ) und 30 min Inkubation, um das EDTA zu entfernen 10 SV H <sub>2</sub> O (Waschgang) 4 SV NiSO <sub>4</sub> (2,5 ml/ml), um die Säule zu beladen 10 SV H <sub>2</sub> O (Waschgang)
-------------------------------	--

Anschließend wurde die HisTrap HP-Säule in 20 % Ethanol gelagert.

### 2.5.3.2 Ionenaustauschchromatographie

Mit Hilfe der Ionenaustauschchromatographie können Proteine aufgrund ihrer Oberflächenladung getrennt werden. Dabei erfolgt eine elektrostatische Wechselwirkung von Proteinen mit einer geladenen Säulenmatrix, an der sich geladene funktionelle Gruppen (Kationen bzw. Anionen) befinden. Eine Matrix, die negative Seitenketten trägt, wird Kationenaustaucher (*cation exchange chromatography*, CEX) genannt und eignet sich für die Trennung positiv geladener Proteine. Im Gegensatz dazu besitzt ein

Anionenaustauscher (*anion exchange chromatography*, AEX) eine positiv geladene Matrix, die sich für die Trennung von negativ geladenen Proteinen eignet. Die Intensität der Matrixbindung wird von der Nettoladung der Proteine bestimmt. Die Nettoladung ist wiederum vom spezifischen isoelektrischen Punkt abhängig. Der isoelektrische Punkt wird als pH-Wert angegeben, an dem die positive und negative Ladung ausgeglichen ist. Liegt der pH-Wert des Laufpuffers nahe am isoelektrischen Punkt des Proteins, bindet das Protein nur schwach an die Matrix. Das gebundene Protein an der Matrix wird durch eine steigende Konzentration an im Laufpuffer gelösten Salzionen verdrängt und somit eluiert. Auch bei diesem Schritt ist die Salzkonzentration des Puffers wichtig, da bei geringer Salzkonzentration zunächst nur die schwach an die Matrix bindenden Proteine eluieren. Für eine erfolgreiche Trennung eines Proteingemisches müssen die entsprechenden Pufferbedingungen hinsichtlich pH-Wert und Ionenstärke optimiert werden.

Die Ionenaustauschchromatographie wurde bei 4 °C an der Äkta avant 25 durchgeführt. Dabei wurden die Säule Resource Q (6 ml; AEX) von GE Healthcare verwendet. Als Laufpuffer diente 20 mM NaP<sub>i</sub> und die Elution erfolgte durch einen linearen NaCl Gradienten. Die Reinigung erfolgte mit einem Vorsäulendrucklimit von 0,5 MPa, einem Druckdifferenzlimit von 0,3 MPa und nach folgendem Programm:

<b>Flussrate</b>	6 ml/min als <i>Down Flow</i> , falls nichts anderes vermerkt ist
<b>Equilibrieren</b>	2 SV Laufpuffer 20 mM NaP <sub>i</sub> pH 7,5 (Puffer A)
<b>Beladen</b>	Einstellung: Proben Ventil ( <i>Sample Inlet</i> ) mit einem Luftsensord Proteinlösung in Laufpuffer mittels Auftragspumpe mit 0,5 ml/min aufgetragen Durchfluss wurde als 15 ml Fraktionen gesammelt, um eventuelles Restprotein aufzufangen
<b>Waschen</b>	5 SV Laufpuffer 20 mM NaP <sub>i</sub> pH 7,5 (Puffer A)
<b>Eluieren</b>	9 SV Gradient von 0-100 % 20 mM NaP <sub>i</sub> pH 7,5 1 M NaCl; es wurden 1 ml Fraktionen gesammelt
<b>Regeneration</b>	mit einer Flussrate 1 ml/min 5 SV H <sub>2</sub> O ( <i>Down Flow</i> ) 4 SV 2 M NaOH ( <i>Up flow</i> ) 2 SV H <sub>2</sub> O ( <i>Up Flow</i> ) 4 SV 1 M NaOH ( <i>Up Flow</i> ) und 15 min Inkubation 5 SV H <sub>2</sub> O ( <i>Up Flow</i> ) 5 SV Ethanol ( <i>Up Flow</i> )

Die Elution der Proteine wurde durch Absorptionsmessung bei 280 nm verfolgt. Die anschließende Analyse der Elutionsfraktionen wurde mittels SDS-PAGE (2.5.1) und Aktivitätsassay (2.6.1) durchgeführt.

### 2.5.3.3 Hydrophobe Interaktionschromatographie

Die Hydrophobe Interaktionschromatographie (HIC) basiert auf Wechselwirkungen unpolarer Oberflächenregionen eines Proteins mit einer hydrophoben stationären Phase, wodurch Proteine in ihrer nativen Form isoliert werden können. Dabei binden Proteine, je hydrophober ihre Oberflächen sind, stärker an die hydrophobe Säulenmatrix. Dies wird durch die Verwendung eines Puffers mit hohen Salzkonzentrationen verstärkt, da so die Hydrathülle der Proteine teilweise entfernt wird. Zudem wird ein pH Wert gewählt, der nahe am isoelektrischen Punkt des zu isolierenden Proteins liegt. Damit das Protein möglichst ungeladen vorliegt und somit die hydrophoben Wechselwirkungen am größten sind. Die anschließende Elution der Proteine erfolgt mit einem Gradienten zu niedrigeren Salzkonzentrationen.

Bei der HIC wurde das Proteingemisch in Gegenwart hoher Salzkonzentrationen auf eine High Screen Butyl HP Säule (GE Healthcare) aufgetragen. Die aufgrund ihrer freigelegten hydrophoben Reste an der Säulenmatrix bindenden Proteine wurden mit einem absteigenden Salzgradienten eluiert. Die HIC wurde bei 4 °C mit einem Vorsäulendrucklimit von 0,5 MPa und einem Druckdifferenzlimit von 0,3 MPa an dem Äkta avant Chromatographiesystem nach folgendem Schema durchgeführt:

<b>Flussrate</b>	1 ml/min als <i>Down Flow</i> , falls nichts anderes vermerkt ist
<b>Equilibrieren</b>	2 SV 20 mM NaP <sub>i</sub> , 2 M (NH <sub>4</sub> ) <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> pH 7,5 (Puffer C)
<b>Beladen</b>	Einstellung: Proben Ventil ( <i>Sample Inlet</i> ) mit einem Luftsensoren Proteinlösung in Laufpuffer mittels Auftrags-Pumpe mit 0,5 ml/min aufgetragen Durchfluss wurde als 15 ml Fraktionen gesammelt, um eventuelles Restprotein aufzufangen
<b>Waschen</b>	10 SV 20 mM NaP <sub>i</sub> , 2 M NH <sub>4</sub> PO <sub>4</sub> pH 7,5 (Puffer C)
<b>Eluieren</b>	9 SV Gradient von 0-100 % 20 mM NaP <sub>i</sub> pH 7,5 (Puffer A); es wurden 1 ml Fraktionen gesammelt
<b>Regeneration</b>	mit einer Flussrate 0,6 ml/min ( <i>Down Flow</i> ) 5 SV NaOH 10 SV H <sub>2</sub> O 5 SV 20 % Ethanol

Die Elution der Proteine wurde mittels der Absorptionsmessung bei 280 nm anhand eines Chromatogramms dokumentiert. Die Analyse der Fraktionen erfolgte mit Hilfe einer SDS-PAGE (2.5.1) und per Aktivitätsassay (2.6.1).

#### 2.5.3.4 Gelfiltrationschromatographie (*Size Exclusion Chromatography*, SEC)

Bei der Gelfiltrationschromatographie werden Proteine nach ihrem hydrodynamischen Volumen aufgetrennt. Größere Moleküle können nicht in die Poren des Trenngels eindringen und eluieren als erstes. Kleinere Moleküle können sich in der porösen stationären Phase (Trenngel) bewegen und in ihre Poren eindringen, wodurch sich das ihnen zur Verfügung stehende Diffusionsvolumen vergrößert und ihre Retentionszeit verlängert. Dementsprechend eluieren kleinere Moleküle aufgrund ihres längeren Aufenthaltes in den Poren später als größere Moleküle.

Die Auftrennung erfolgte bei 4 °C mit einem Drucklimit (Säulendruck 0,5 MPa und Druckdifferenz 0,3 MPa) und nach folgendem Protokoll:

<b>Säule</b>	HiLoad 16/600 Superdex 200 pg, GE Healthcare
<b>Flussrate</b>	1 ml/min als <i>Down Flow</i> (falls nicht anderes vermerkt ist)
<b>Equilibrieren</b>	2 Säulenvolumina (SV) 5 mM Tris 140 mM NaCl pH 8
<b>Beladen</b>	Einstellung: Injektions-Ventil mit 5 ml über eine Probenschleife Proteinlösung in 5 mM Tris 140 mM NaCl pH 8 mittels Auftragspumpe auf die Säule aufgeladen
<b>Eluieren</b>	Elution mit 1 SV und in 1,8 ml Fraktionen in einer Deep-Well-Platte gesammelt
<b>Regeneration</b>	½ SV H <sub>2</sub> O 5 SV 1 M NaOH ( <i>Up flow</i> ) und 30 min Inkubation 1,5 SV H <sub>2</sub> O

Die Elution der Proteine wurde in einem Chromatogramm bei 280 nm verfolgt.

#### 2.5.4 Proteinkonzentrationsbestimmung

*Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford:*

Beim Bradford-Test wird mit Hilfe der Färbelösung Coomassie Brilliant Blue G250 der quantitative Proteingehalt einer wässrigen Lösung bestimmt (Bradford 1976). Für den Test wurden 50 µl der Standard-Verdünnungsreihe mit Rinderserumalbumin und der verdünnten Proteinlösung mit 200 µl verdünnter Bradford-Lösung (Roti-Quant, Roth)

versetzt. Die Lösungen wurden 5 min inkubiert und anschließend ihre OD<sub>595</sub> gemessen (Protokoll nach Hersteller für Proteinbestimmung in Mikrotiterplatten).

Mit Hilfe der auf Rinderserumalbumin basierenden Kalibrierungskurve wurde die Proteinkonzentration anhand dieser Gleichung bestimmt:

$$c = \frac{(A_{595} - b)}{m} \quad (1)$$

c: Proteinkonzentration [mg/ml]

A<sub>595</sub>: Absorption bei 595 nm

b: y-Achsenabschnitt der Kalibrierungsgeraden

m: Steigung der Kalibrierungsgeraden

**Formel 1:** Konzentrationsbestimmung aus Kalibrierungsgerade

*Bestimmung der Proteinkonzentration mittels Absorptions-Spektroskopie:*

Die Absorption von Proteinen kann bei 280 nm photometrisch bestimmt werden. Aus der Aminosäuresequenz kann der molare Extinktionskoeffizient bei 280 nm ( $\epsilon_{280}$ ) bestimmt werden, da die aromatischen Aminosäuren Tryptophan, Tyrosin und Cystine (Disulfidbrücken zwischen zwei Cysteinen) das UV-Licht im Bereich von 250 bis 300 nm absorbieren. Mit Hilfe des Extinktionskoeffizienten und dem bekannten Molekulargewicht kann der spezifische Extinktionskoeffizient ( $^{0.1\%}A_{280}$ ) berechnet werden (Pace, Vajdos et al. 1995):

$$\epsilon_{280} = 5500 \cdot N_{\text{Trp}} + 1490 \cdot N_{\text{Tyr}} + 125 \cdot N_{\text{Cys}} \quad (2)$$

**Formel 2:** Berechnung des molekularen Extinktionskoeffizienten

$$^{0.1\%}A_{280} = \frac{\epsilon_{280}}{M_R} \quad (3)$$

$\epsilon_{280}$ : molarer Extinktionskoeffizient bei 280 nm [ $M^{-1} \text{cm}^{-1}$ ]

$^{0.1\%}A_{280}$ : spezifischer Extinktionskoeffizient [ $\text{cm}^2 \text{mg}^{-1}$ ]

M<sub>R</sub>: Molare Masse [g/mol]

**Formel 3:** Berechnung des spezifischen Extinktionskoeffizienten

Durch die Anwendung des Lambert-Beerschen-Gesetzes kann die Proteinkonzentration (c) somit aus dessen Absorption berechnet werden:

$$c = \frac{A_{280}}{0,1\% A_{280} \cdot d} \quad (4)$$

c : Konzentration [mg/ml]  
 $A_{280}$  : Absorption bei 280 nm  
d : Schichtdicke der Küvette [cm]  
 $A_{280}^{0,1\%}$  : spezifischer Extinktionskoeffizient [ $\text{cm}^2 \text{mg}^{-1}$ ]

**Formel 4:** Lambert-Beersche-Gesetz

Bei der Messung wurde ein Absorptionsspektrum von 240 bis 340 nm aufgenommen, wobei bei 280 nm das Absorptionsmaximum des Proteins lag. Der Quotient  $A_{280}/A_{250}$  sollte mindestens den Betrag 1,8 ergeben. Zudem sollte keine Absorption oberhalb von 300 nm auftreten, um eine Verfälschung des Ergebnisses durch auf Aggregatbildung zurückgehende Lichtstreuung auszuschließen.

Die Proteinkonzentrationen wurden mit dem Gerät NanoDrop ND-1000 (Thermo Scientific) über das Absorptionsspektrum gemessen. Für die Bestimmung mussten der molare Extinktionskoeffizient und die molare Masse des jeweiligen Proteins eingegeben werden. Diese wurden mittels ProtParam ([web.expasy.org/protparam/](http://web.expasy.org/protparam/)) ermittelt.

Tabelle 11 Molekulargewichte (MW) und Extinktionskoeffiziente verschiedener *Francisella* Stämme

FgGT	MW (Da)	Extinktionskoeffizient
<i>Francisella tularensis subsp. tularensis</i>	59856,3 (*73263,3)	46760 (*48250)
<i>Francisella tularensis subsp. holarctica</i>	59945,3 (*73352,3)	46760 (*48250)
<i>Francisella tularensis subsp. novicida</i>	59836,2 (*73243,2)	46760 (*48250)
<i>Francisella philomiragia</i>	59588,9 (*72995,9)	48250 (*49740)
<i>Francisella tularensis noatunensis</i>	59616,1 (*73023,1)	48250 (*49740)

\* mit SUMO-Tag

## 2.6 Analytische Methoden

### 2.6.1 Enzymkinetische Analyse / Aktivitätsassay

Der Aktivitätsassay ermöglicht es, die gGT-katalysierte enzymatische Reaktion zu messen, und somit eine Aussage über die gGT Aktivität zu treffen. Zudem konnten Substanzen bzw. Inhibitor Kandidaten, die möglicherweise eine hemmende Wirkung auf die gGT Aktivität haben, getestet werden.

Die gGT katalysiert die Transpeptidierungsreaktion, bei der die  $\gamma$ -Glutamylgruppe eines Substrates (hier gamma-Glutamyl-para-Nitroanilid, gGpNA) auf eine Aminosäure oder, wie in diesem Fall, auf ein Dipeptid (z.B. GlyGly) übertragen wird. Der enzymatische Aktivitätsassay (Meister, Tate et al. 1981) basiert auf der Absorptionsmessung (405 nm) des p-Nitroanilins (pNA), welches bei der Spaltung des Substrates (gGpNA) freigesetzt wird.

Nach der Abspaltung des pNA kann die  $\gamma$ -Glutamylgruppe auf den Akzeptor (meist ein Dipeptid) übertragen oder zu Glutaminsäure hydrolysiert werden. Wird hierbei als Ausgangssubstrat die Isoform L-gGpNA verwendet, ist eine Rückreaktion möglich. Somit könnte das freigesetzte pNA als Akzeptor für den L- $\gamma$ -Glutamylrest fungieren, was bei der Verwendung der Isoform D-gGpNA als Substrat nicht möglich ist (Rückreaktion des pNA unter Anlagerung an den D- $\gamma$ -Glutamylrest findet nicht statt). Wird als Substrat die Isoform D-gGpNA in Abwesenheit eines Akzeptors eingesetzt, wird somit die reine Hydrolysereaktion gemessen (Wickham, Regan et al. 2012). Das Reaktionsschema der Freisetzung des p-Nitroanilins und der Übertragung eines  $\gamma$ -Glutamylrestes von gGpNA auf ein Akzeptor oder die hydrolytische Abspaltung als Glutaminsäure werden in Abbildung 3 dargestellt:

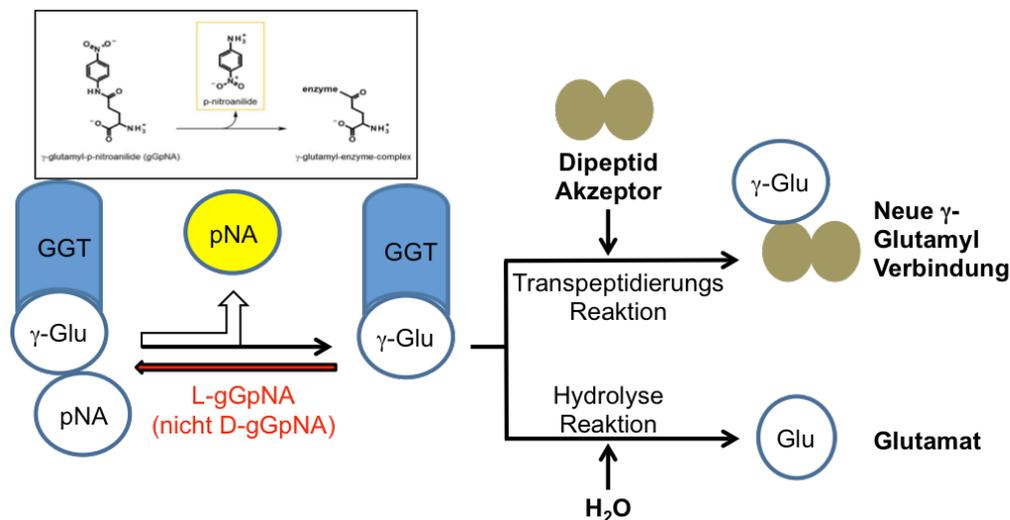


Abbildung 3 Prinzip des gGT Aktivitätsassays (abgewandelt von Wickham, Regan et al. 2012)

Der Aktivitätsassay wurde in einer 96-well Flachboden-Platte in einem Gesamtvolumen von 200  $\mu$ l durchgeführt. Die Reaktion fand in der Regel (außer zur Bestimmung des pH Optimums) in 0,1 M Tris pH 8 statt. Zudem wurden dem Assay 0,1 % BSA zugesetzt. Die Reaktion wurde unmittelbar vor der Messung durch die Zugabe von gGpNA bzw. FgGT in

einem Volumen von 40 µl gestartet. Die kinetische Messung erfolgte im Zeitraum von 15 min bis 4 h bzw. nach einer Inkubation (1-4 h bei 37 °C) als Endpunktmessung im Mithras LB940 (Bertholds). Für eine 4 Stunden Kinetikmessung wurden folgende Einstellungen am Mithras vorgenommen:

Total time:	14400 s
Counting time:	0,4 s
Cycle time:	64 s
Lamp Energy	1
Filter	F405 (Absorbance)-Slot B1
Dauer	4 h

Für die Endpunktmessung im Mithras LB940 (Berthold) wurden folgende Einstellungen verwendet:

Counting time:	0,5 s
Lamp Energy	1
Filter	F405 (Absorbance)-Slot B1

Alle Probenansätze wurden in Triplikaten gemessen. Für die Hintergrundbereinigung wurde von jedem Ansatz eine Referenz ohne gGT gemessen, und diese in der Auswertung von dem Probenwert abgezogen.

Für die Michalis Menten Kurven erfolgte die Umrechnung der pNA-Absorptionswerte in die molare Konzentration nach dem Lambert-Beerschen Gesetz ( $E_l = \epsilon \cdot c \cdot d$ , mit  $c$ =Konzentration [Mol/l],  $d$ =Schichtdicke [cm] und  $\epsilon$ =spezifischer Absorptionskoeffizient [l/(Mol\*cm)],  $\epsilon_{\text{pNA}}=8800$  l/(Mol\*cm)). Die Auswertung der Daten erfolgte mit dem Programm GraphPad Prism5.

### 2.6.2 Inhibitor-Analyse

Für die Inhibitor-Analyse wurde der bereits beschriebene Aktivitätsassay (2.6.1) verwendet. Zunächst wurde ein initiales Screening der Substanzen durchgeführt. Hierfür wurden die verdünnten Substanzen in 0,1 M Tris pH 8 in einem Volumen von 40 µl vorgelegt. Danach wurde jeder Ansatz mit jeweils 80 µl des Reaktionsgemisches (20 mM GlyGly, 0,1 % BSA, 18 nM FgGT) versetzt. Unmittelbar vor der Messung wurde durch Zugabe von 40 µl gGpNA (Endkonzentration 250 µM) die Reaktion gestartet und bei 37 °C im Brutschrank inkubiert (96-well Flachboden-Platte mit Deckel!). Nach der Inkubation von 4 h erfolgte die Endpunktmessung im Mithras LB940 (Berthold) mit den folgenden Einstellungen:

Counting time:	0,5 s
Lamp Energy	1
Filter	F405 (Absorbance)-Slot B1

Substanzen, die einen inhibitorischen Effekt zeigten, wurden gegebenenfalls in Triplikatmessungen verifiziert und anschließend in IC<sub>50</sub> Bestimmungen charakterisiert.

### 2.6.3 Entfaltungsassay

Die Stabilität der FgGT wurde in dieser Arbeit mit Hilfe ihrer Schmelzkurve im Entfaltungsassays bzw. Sypro-Orange-Assay (Ericsson, Hallberg et al. 2006, Lavinder, Hari et al. 2009, Phillips and de la Pena 2011) analysiert. Der Sypro-Orange Assay (*Thermal Shift Assay, Thermo Fluor Assay*) ist eine schnelle, temperaturbasierte Methode, die es ermöglicht, die Thermostabilität der Faltung eines gereinigten Proteins zu bewerten/ermitteln. Dabei bindet der Proteinfarbstoff Sypro-Orange an die hydrophoben Bereiche des denaturierenden Proteins und kann bei 610 nm fluoreszieren. Liegt das Protein in der gefalteten Form vor, wird Licht mit einer Wellenlänge von 492 nm emittiert. Die Denaturierung des Proteins wird durch die Erhöhung der Temperatur erreicht, wobei die verwendeten Puffer die Thermostabilität eines Proteins beeinflussen. Anhand der Zunahme der Fluoreszenz und mit steigender Temperatur kann die Schmelztemperatur des Proteins ermittelt werden. Die Messung wird in einem Realtime PCR-Cycler (qPCR-Cycler) durchgeführt.

Für Messung der *Francisella* gGT Thermostabilität wurden jeweils 5 µM Protein und 5x Sypro-Orange (Invitrogen) in einem 20 µl Ansätzen mit verschiedenen Puffer versetzt. Als Referenz wurde für jeden Ansatz eine Negativ-Kontrolle ohne Protein angesetzt. Die Messung erfolgte jeweils in Triplikate und mit folgendem Programm:

```
Lid: 98 °C, Volume 20 µl
1. 25 °C      3 min
2. 25 °C      31 s
3. 25 °C      30 s
               + 0,5 °C/cycle
               Ramp 0,5 °C/s
4. Plateread
5. Goto 3., 140x
6. 95 °C      5 s
7. Plateread
8. Goto 6., 70x
```

Die Auswertung erfolgte mit dem Programm Bio-Rad CFX Manger. Die Lage des Schmelzpunktes (Wendepunkt) entspricht dem Maximum der ersten Ableitung.

## 2.7 Kristallisation der FtgGT

Die Kristallisation der *F. t. subsp. holarctica* gGT (FtgGT) wurde in Kooperation mit dem Helmholtz Zentrum München, von Dr. Popowicz durchgeführt. Für die Bestimmung der Kristallstruktur wurde zunächst die FtgGT auf ~15 mg/ml konzentriert und in 0,2 M NaF und 20 % PEG 3350 bei pH 8 und 4 °C kristallisiert. Es wuchsen Kristalle in einer Größe von 0,2 x 0,3 x 0,3 mm an, die ein glattes Erscheinungsbild und keine makroskopischen Defekte zeigten. Die Kristalle wurden mit Hilfe von 30 % Glycerol als Gefrierschutzmittel konserviert und bei einer Auflösung von 1,9 Å gebeugt. Der vollständige Datensatz wurde in der Synchrotron Lichtquelle Schweiz (SLS, *Swiss Light Source*) gesammelt. Für die Strukturlösung wurden die Phasen (*initial phases*) mittels molekularem Ersatz (*molecular replacement*) im Programm Phaser (McCoy, Grosse-Kunstleve et al. 2007) gelöst – die veröffentlichte HpgGT Kristallstruktur (PDB:2NOO) diente als Vorlage. Bei diesem Verfahren wird aus einer sehr ähnlichen, bereits bekannten Proteinstruktur (hier die HpgGT Struktur) ein erstes, grobes Modell der unbekanntes FtgGT Struktur erstellt. Der anfängliche R-Faktor (*reliability factor*) betrug 0,504. Der R-Faktor ist ein Gütekriterium, die Abweichung zwischen beobachteten und aus dem Modell berechneten Struktur Faktoren angibt. Der R-Faktor zeigt, ob sich ein Modell verbessert – R-Faktor wird kleiner – oder verschlechtert hat. Die Proteinstruktur wurde durch manuelle Modellierung (Coot Software) vervollständigt (Emsley, Lohkamp et al. 2010). Zur Verfeinerung des Strukturmodells wurde die Coot Software (*cyclic rounds of model building*) sowie die REFMAC Software verwendet. Diese basieren auf einem parametrischen Schätzeverfahren, der die *maximum-likelihood* Methode (*maximum-likelihood refinement*).

## 2.8 Computerprogramme und Datenbanken

Adobe Illustrator	Version CS3, Adobe Systems Incorporated, 2007
CFX Manger	BioRad
GraphPad Prism5	Version 5.01, GraphPad Software 2007 <a href="http://www.graphpad.com">http://www.graphpad.com</a>
NEBcutter	Version 2.0, New England BioLabs ( <a href="http://tools.neb.com/NEBcutter2/">tools.neb.com/NEBcutter2/</a> )

---

Oligocalc	Version 3.26, Northwestern University, 2010 <a href="http://basic.northwestern.edu/biotools/OligoCalc.html">http://basic.northwestern.edu/biotools/OligoCalc.html</a>
Protein Blast	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/">www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/</a>
Nucleoid Blast	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/">www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/</a>
ProtParam	<a href="http://web.expasy.org/protparam/">web.expasy.org/protparam/</a>
Pubmed	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed</a>

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Klonierung und hetrologe Produktion verschiedener rekombinanter *Francisella* gGTs

Die Klonierungsstrategie der verschiedenen Gene für die *Francisella*  $\gamma$ -Glutamyltranspeptidasen (FgGT) war, das Gen FgGT über die jeweiligen Schnittstellen in den pET28bSUMO-Vektor, der einen His-SUMO-Tag besitzt, zu klonieren. Der Vorteil eines His-SUMO-Tags ist, dass das rekombinante Gesamtprotein zunächst über eine Ni<sup>2+</sup>-NTA Affinitätssäule isoliert wird (positive Anreicherung). Anschließend wird mit Hilfe der SUMO Protease der His-SUMO-Tag abgespalten und über eine Ni<sup>2+</sup>-NTA Affinitätssäule depletiert, da der SUMO-Tag und die SUMO-Protease aufgrund ihrer His-Tags in der Säule verbleibt (negative Anreicherung). Als Endprodukt erhält man ein hochreines tagfreies Protein im Durchlauf der Säule.

##### 3.1.1 Klonierung verschiedener rekombinanter *Francisella* gGTs

Für die Klonierung der codierenden DNA der FgGT Proteine wurde genomische DNA, die aus den jeweiligen Zielorganismen isoliert wurde, vom Institut für Mikrobiologie der Bundeswehr (München) zu Verfügung gestellt. Als Vorlage für die PCR Amplifikationen diente genomische DNA folgender *Francisellen*: *Francisella tularensis* subsp. *tularensis*, *Francisella tularensis* subsp. *holarctica*, *Francisella tularensis* subsp. *novicida*, *Francisella philomiragia*, *Francisella noatunensis*. Um Probleme mit der Löslichkeit und damit einer geringeren Ausbeute des produzierten rekombinanten Proteins zu vermeiden, wurde die N-terminale hydrophobe Signalsequenz von 46 Aminosäuren im Expressionskonstrukt ausgespart (Sequenzen im Anhang 6.1). Die PCR Produkte (Abbildung 4) wurden isoliert und mit den jeweiligen Restriktionsenzymen verdaut. Anhand der Einzelverdau-Kontrollen (pET28b SUMO BamHI, XhoI und SpeI) war zu sehen, dass jedes Restriktionsenzym geschnitten hatte. Somit konnte davon ausgegangen werden, dass der Vektor mit jeweils 2 Restriktionsenzymen geschnitten (linearisiert) wurde und die Inserts von beiden Seiten verdaut wurden (Abbildung 5). Die verdauten PCR Produkte wurden über die Schnittstellen BamHI und XhoI bzw. für *Francisella noatunensis* SpeI und XhoI mit dem linearisierten Zielvektor pET28bSUMO ligiert und in *E. coli* DH5 $\alpha$  transformiert. Anschließend wurden je 10-15 Klone mit Hilfe einer Screening PCR überprüft (exemplarisch für pET28bSUMO FgGT *holarctica* Klone in Abbildung 6). Dabei wurden Primer verwendet, die entweder beide im Zielvektor

pET28bSUMO (T7Prom und T7term) oder jeweils im Vektor und Insert (FgGT spezifische PCR-Primer) binden. Die Plasmid DNA der positiven Klone wurde isoliert und durch Sequenzierung mit den Primer T7Prom und SP6 bestätigt. Dabei wichen die FgGT Sequenzen der Spezies *F. noatunensis* und *F. philomiragia* von den bisher bekannten Sequenzen ab. Als Referenzsequenz wurde die gGT der *F. noatunensis subsp. noatunensis FSC774* aus der Quelle: SRA Archiv (*Sequence Read Archive*) verwendet. Im Expressionsplasmid der *F. noatunensis* gGT wurden zwei stille Punktmutationen gefunden (Position 1660 im klonierten FgGT Gen C gegen T und Position 1654 T gegen G). Das Expressionsplasmid der *F. philomiragia* besitzt insgesamt 30 Punktmutationen (siehe Anhang 6.1.1) im Vergleich mit der Referenz *F. philomiragia ATCC25017* (YP\_001676771.1). Diese Punktmutationen sind auch in einer unabhängigen PCR bestätigt worden. Auf Proteinebene sind aus diesem Grund 4 Aminosäuren (A210K, G289A, D375N, A472T) ausgetauscht. Nach Rücksprache mit dem Institut für Mikrobiologie der Bundeswehr München (Dr. Antwerpen) wurde mit diesem Expressionsplasmid weitergearbeitet, da auf dem Gebiet der *Francisella* Genomanalyse bisher vieles noch nicht bekannt ist und in dieser Arbeit hauptsächlich die *F. t. subsp. holarctica* näher untersucht wurde.

Je ein Expressionsplasmid mit korrekter Sequenz bzw. mit abweichender Sequenz für *F. noatunensis* und *F. philomiragia* wurde in der internen Plasmid-Datenbank hinterlegt.

Die Expressionsvektoren für die FgGT von *F. tularensis subsp. holarctica* und *F. noatunensis* sind exemplarisch in Abbildung 7 und Abbildung 8 dargestellt. Die Transkription des codierten Gens innerhalb der multiplen Klonierungsstelle im Expressionsvektor erfolgte mittels T7-Promotor, welcher unter der Kontrolle eines Lac-Operators stand. Die Expression wurde durch Laktose im Autoinduktionsmedium induziert. Dadurch wurde der Lac-Repressor, der auf dem Plasmid codiert ist, inaktiviert und somit konnte das FgGT Gen inklusive His-SUMO-Tag transkribiert werden. Des Weiteren enthalten die Expressionskonstrukte eine Kanamycin Resistenz zur Selektion.

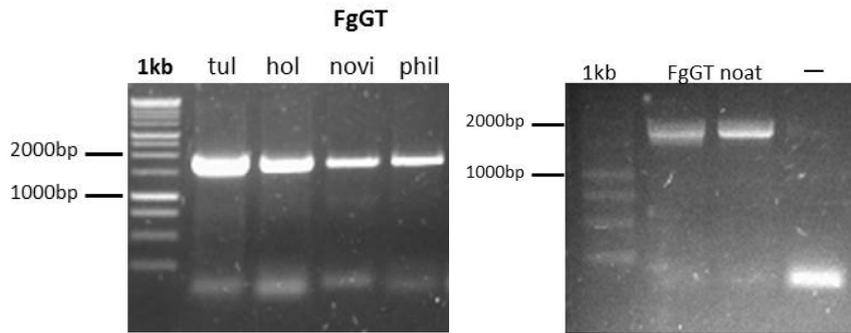


Abbildung 4 PCR Produkte der FgGT aus genomischer DNA in einem 1 % Agarosegel. Die FgGT-Produkte liegen bei ca. 1,66 kb. Links sind genomische PCR-Produkte, die für die FgGTs der folgenden Spezies codieren, zu sehen: *F. t. subsp. tularensis* (tul), *F. t. subsp. holarctica* (hol), *F. t. subsp. novicida* (tul), *F. philomiragia* (phil). Rechts sind die FgGT der *F. noatunensis* und die PCR-Negativ-Kontrolle (-, ohne DNA-Template) zu sehen.

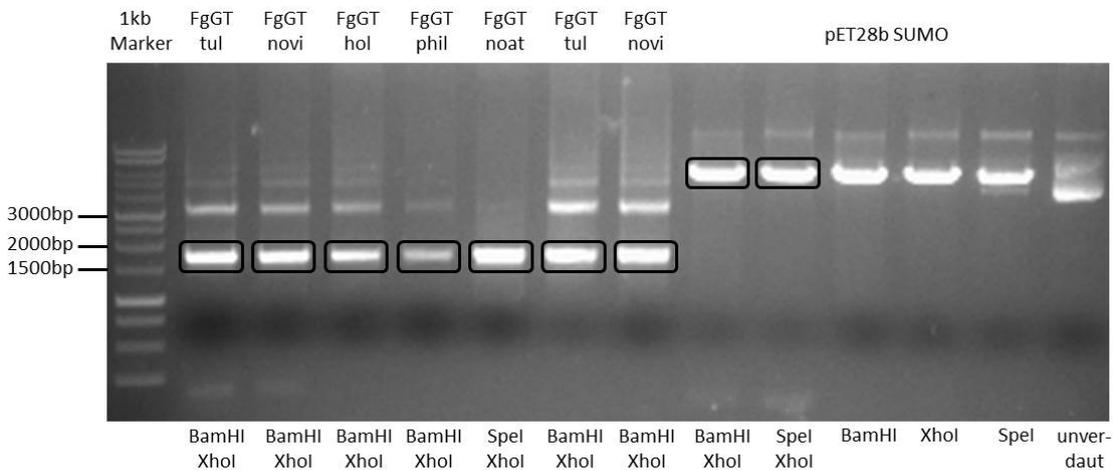


Abbildung 5 Restriktionsverdau der FgGT PCR-Produkte und des Vektors pET28bSUMO. Als Kontrolle wurde der Vektor zusätzlich mit je einem Restriktionsenzym verdaut. Die genomische PCR-Produkte, die für die FgGTs codieren, liegen bei ca. 1,66 kb und der Vektor bei ca. 5,6 bp. Die markierten Banden wurden ausgeschnitten und für den weiteren Verlauf verwendet. FgGT tul: *F. t. subsp. tularensis* gGT, FgGT hol: *F. t. subsp. holarctica* gGT, FgGT novi: *F. t. subsp. novicida* gGT, FgGT noat: *F. noatunensis* gGT, FgGT phil: *F. philomiragia* gGT.

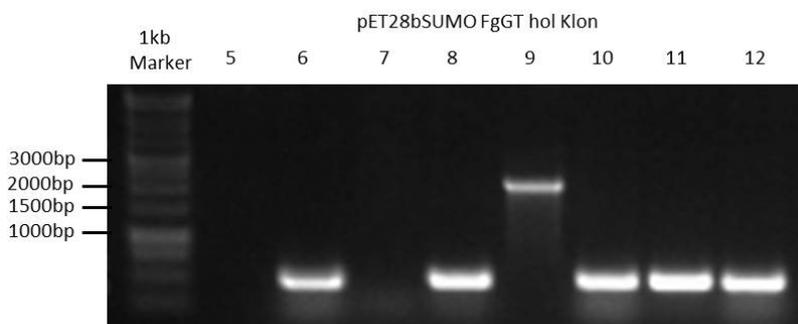


Abbildung 6 Screening PCR für FgGT *holarctica* Klone. Für den positiven Klon 9 ist die erwartete Bande bei ca. 2000 bp zu sehen. Die Screening PCR wurde mit den Primern T7Prom und T7term durchgeführt. Bei den unteren Banden in der Abbildung handelt es sich um Primer Dimer.

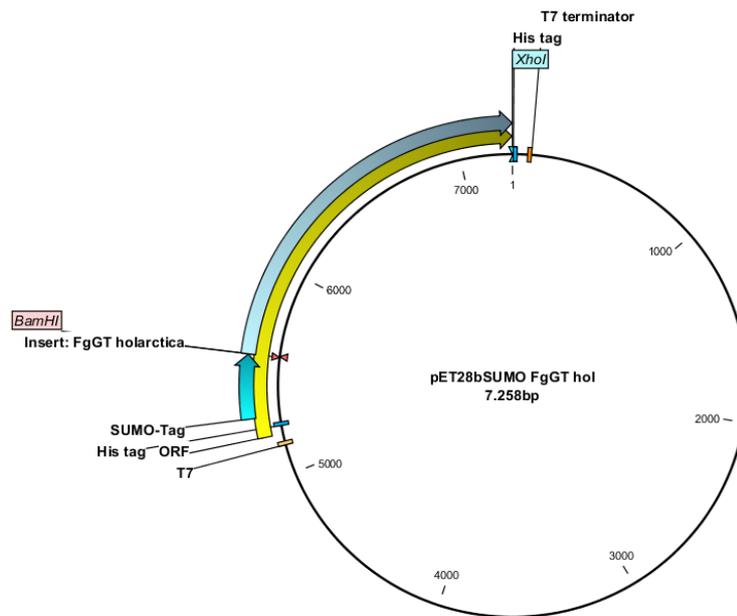


Abbildung 7 Klonierte *Francisella tularensis* subsp. *holarctica* gGT mit SUMO-Tag: Vektor Karte.

Die Expressionsplasmide für die gGTs von *Francisella tularensis* subsp. *tularensis*, *Francisella tularensis* subsp. *novicida* und *Francisella philomiragia* sind analog aufgebaut. Über die Schnittstellen BamHI und XhoI wurde das Insert ligiert. Das His-SUMO-FgGT Gen steht unter der Kontrolle des T7-Promoters, welcher unter der Kontrolle eines Lac-Operators steht. Die Expression der codierten His-SUMO-FgGT wird durch Laktose im Autoinduktionsmedium induziert. Gelber Pfeil= ORF (Open Reading Frame: SUMO- und His-Tag plus FgGT Insert), blauer Pfeil= Insert FgGT, türkiser Pfeil= SUMO-Tag an dem sich C-Terminal ein His-Tag befindet.

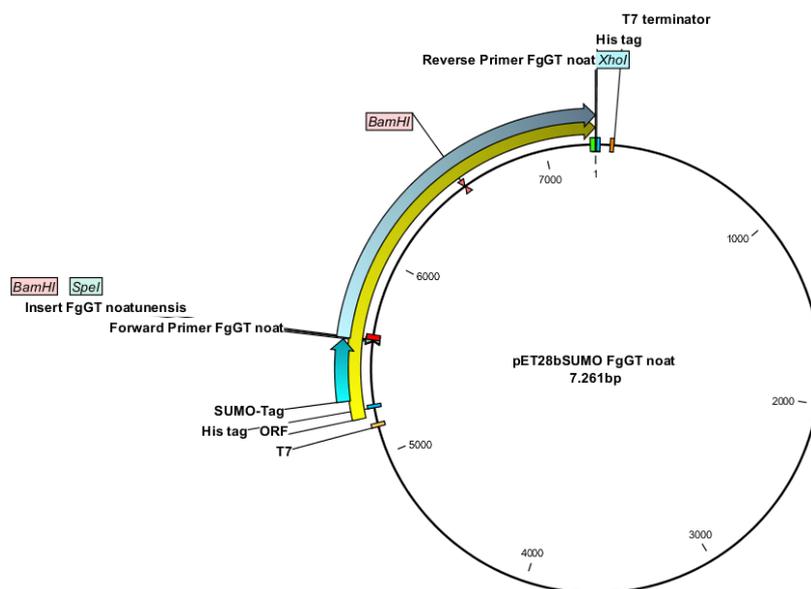


Abbildung 8 Klonierte *Francisella noatunensis* gGT mit SUMO-Tag: Vektor Karte.

Über die Schnittstellen SpeI und XhoI wurde das Insert ligiert, da die FgGT *noatunensis* eine interne BamHI Schnittstelle enthält. Das His-SUMO-FgGT *noatunensis* Gen steht unter der Kontrolle des T7-Promoters, welcher unter der Kontrolle eines Lac-Operators steht. Die Expression der codierten FgGT plus SUMO-Tag wird durch Laktose im Autoinduktionsmedium induziert. Gelber Pfeil= ORF (Open Reading Frame: SUMO- und His-Tag plus FgGT Insert), blauer Pfeil= Insert FgGT, türkiser Pfeil= SUMO-Tag an dem sich C-Terminal ein His-Tag befindet.

### 3.1.2 Heterologe Produktion bakterieller gGTs aus verschiedenen *Francisella* Spezies

#### 3.1.2.1 Testexpression

Die fünf rekombinanten *Francisella* gGTs wurden mittels heterologer Genexpression hergestellt. Zunächst wurden die Expressions-Konstrukte in *E. coli* Arctic Express (DE3) Zellen transformiert und eine Testexpression (2.2.5.1) durchgeführt. Die Induktion der Genexpression der FgGT-Proteine erfolgte durch Laktose, die im Autoinduktionsmedium vorhanden war. Von jedem Konstrukt wurden jeweils 5 Klone mittels SDS-PAGE und Westernblot mit Antikörpern gegen 6x-His überprüft. Der N-terminale SUMO-Tag (inklusive 6x-His) befindet sich nach der autokatalytischen Spaltung der FgGT an der großen Untereinheit, sodass im Westernblot mit Antikörpern gegen 6x-His der Precursor (Rest an nicht autokatalysiertes Protein) und die große Untereinheit detektierbar sind, aber nicht die kleine Untereinheit. Die erwarteten FgGT spezifischen Proteinbanden (Precursor + SUMO-Tag 73 kDa, große Untereinheit + SUMO-Tag 53 kDa und kleine Untereinheit 20 kDa nur in der SDS-PAGE) waren sowohl auf dem gefärbten SDS-Gel (Abbildung 9), als auch im Westernblot gegen 6x-His (Abbildung 10) eindeutig zu erkennen, wobei der Protein Marker im oberen Abschnitt (55-250 kDa) eine Verschiebung der apparenten Molekulargewichte aufweist. Aus diesem Grund sind die erwarteten apparenten Größen um ca. 20 kDa verschoben, d.h. der Precursor + SUMO-Tag lag bei 100 kDa und die große Untereinheit + SUMO-Tag bei 70 kDa. Von dem Klon mit der höchsten Produktion des jeweiligen rekombinanten Proteins wurde ein Glycerol-Stock angelegt und dieser bei -80 °C gelagert (eingekreiste Klone in Abbildung 9 und Abbildung 10).

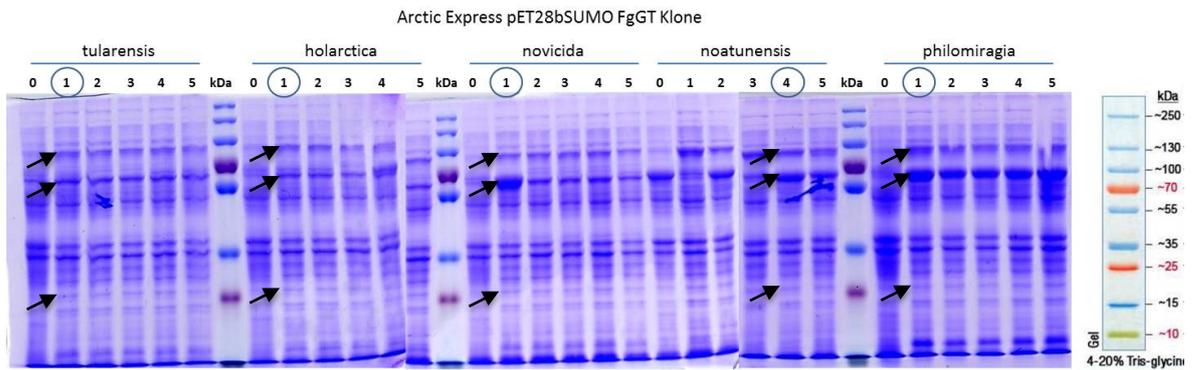


Abbildung 9 Testexpression: SDS-PAGE von Gesamtlysaten von jeweils fünf Arctic Express pET28bSUMO FgGT Klonen.

Precursor+SUMO-Tag liegt bei 73 kDa (hier ca. 100 kDa, Verschiebung des apparenten Molekulargewichtes des 1 kb-Marker, oberster Pfeil), große Untereinheit plus SUMO-Tag bei 53 kDa (hier ca. 70 kDa, mittlerer Pfeil) und kleine Untereinheit bei 20 kDa (unterer Pfeil). Ein Glycerol-Stock wurde von den eingekreisten Klonen angelegt.

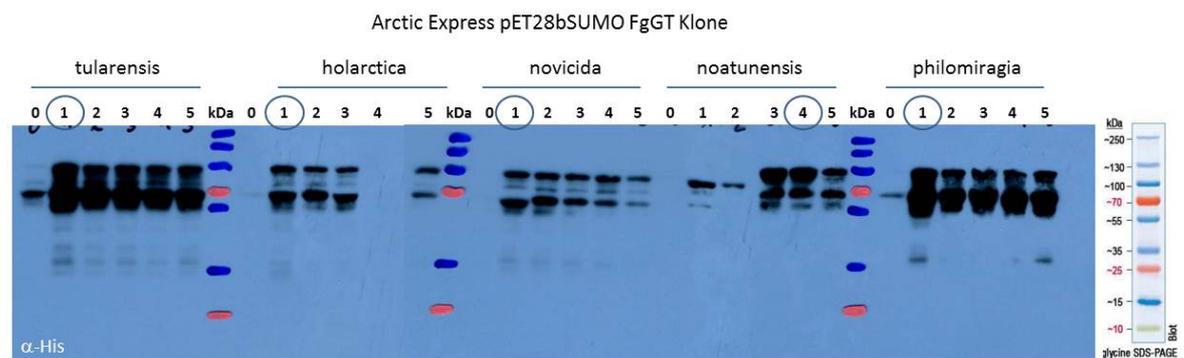


Abbildung 10 Westernblot gegen 6x-His der Testexpressionslysate der Arctic Express pET28bSUMO FgGT Klonen (s. Abbildung 9).

Eindeutige Signale der FgGT sind für den 73 kDa Precursor+SUMO-Tag (bei ca. 100 kDa, Verschiebung des apparenten Molekulargewichtes des Protein Marker) und für die große 53 kDa Untereinheit+SUMO-Tag (bei ca. 70 kDa) zu sehen. Pro Spur wurden OD<sub>600</sub> 0,15 aufgetragen; 0= nicht induzierte Probe, 1-5= induzierte Klone der jeweiligen *Francisella* Spezies.

### 3.1.2.2 Produktion und Reinigung der rekombinanten FgGT Proteine

Für die Produktion wurden wie im Abschnitt 2.2.5.2 beschrieben die FgGT Proteine aus einer 1-5 L Kultur nach dem Zellaufschluss mit Hilfe der Metallchelate-Affinitätschromatographie an der Äkta (2.5.3.1) gereinigt, da der N-terminale SUMO-Tag einen 6x-His enthält. Dabei wurden die einzelnen eluierten Protein-Fractionen anhand der Äkta-Cromatogramme (Abbildung 11) und SDS-PAGE charakterisiert. Anschließend wurden die FgGT enthaltenden Fractionen vereinigt und gegen Gefi-Puffer (100 mM HEPES pH 7,4, 140 mM NaCl) dialysiert (2x 1 h und 1x über Nacht), um das Imidazol zu entfernen. Nach der Durchführung der enzymatischen Abspaltung des His-SUMO-Tags, wurde das reine Protein erneut gegen Gefi-Puffer dialysiert. Im Westernblot konnte nach

einmaligen Durchführen des SUMO-Verdau noch die große FgGT Untereinheit mit SUMO-Tag bei 53 kDa detektiert werden. Der SUMO-Verdau musste zum zweiten Mal durchgeführt werden, um getaggetes Protein bis unter die Nachweisgrenze abzureichern (Abbildung 12). Die große FgGT Untereinheiten-Bande wurde in den Proben, die zum zweiten Mal mit der SUMO-Protease verdaut wurden, nicht mehr detektiert (Abbildung 12). Aus diesem Grund wurden für die darauf folgenden Reinigungen der FgGT für die Abspaltung des SUMO-Tags die doppelte Menge an SUMO-Protease für den Verdau eingesetzt (im Molaren Verhältnis 1:250). Nach der SUMO-Abspaltung blieb für alle FgGTs bis auf FgGT *noatunensis* die Aminosäure Serin (aufgrund der für die Klonierung verwendete BamHI Restriktionsschnittstelle) am N-terminalen Ende erhalten. Für die FgGT *noatunensis* N-terminal verblieben die Aminosäuren S-T-S (BamHI + SpeI Restriktionsstellen; Klonierung erfolgt über SpeI), da die SUMO-Protease zwischen den durch die BamHI Schnittstelle codierten Aminosäuren (G-S) spaltet. Anhand der Abschätzung der Proteinbande in der SDS-PAGE wurde eine Reinheit von 85 bis 95 % erreicht (Abbildung 11). Die Proteinkonzentration wurde mittels Bradford-Assay ermittelt. Insgesamt lag die Ausbeute an Protein pro 1 L Bakterienkultur für die folgenden FgGTs bei: FgGT *tularensis* 8,6 mg, FgGT *novicida* 9,5 mg, FgGT *philomiragia* 18 mg, FgGT *noatunensis* 9,3 mg und FgGT *holarctica* 13,5 mg  $\pm$  1,5 mg (wurde mehrmals gereinigt). Anschließend wurden die Proteine auf ihre Aktivität getestet und bis zur Verwendung bei -80 °C gelagert. Alle fünf rekombinant gereinigten *Francisella* gGTs zeigten eine enzymatische Aktivität.

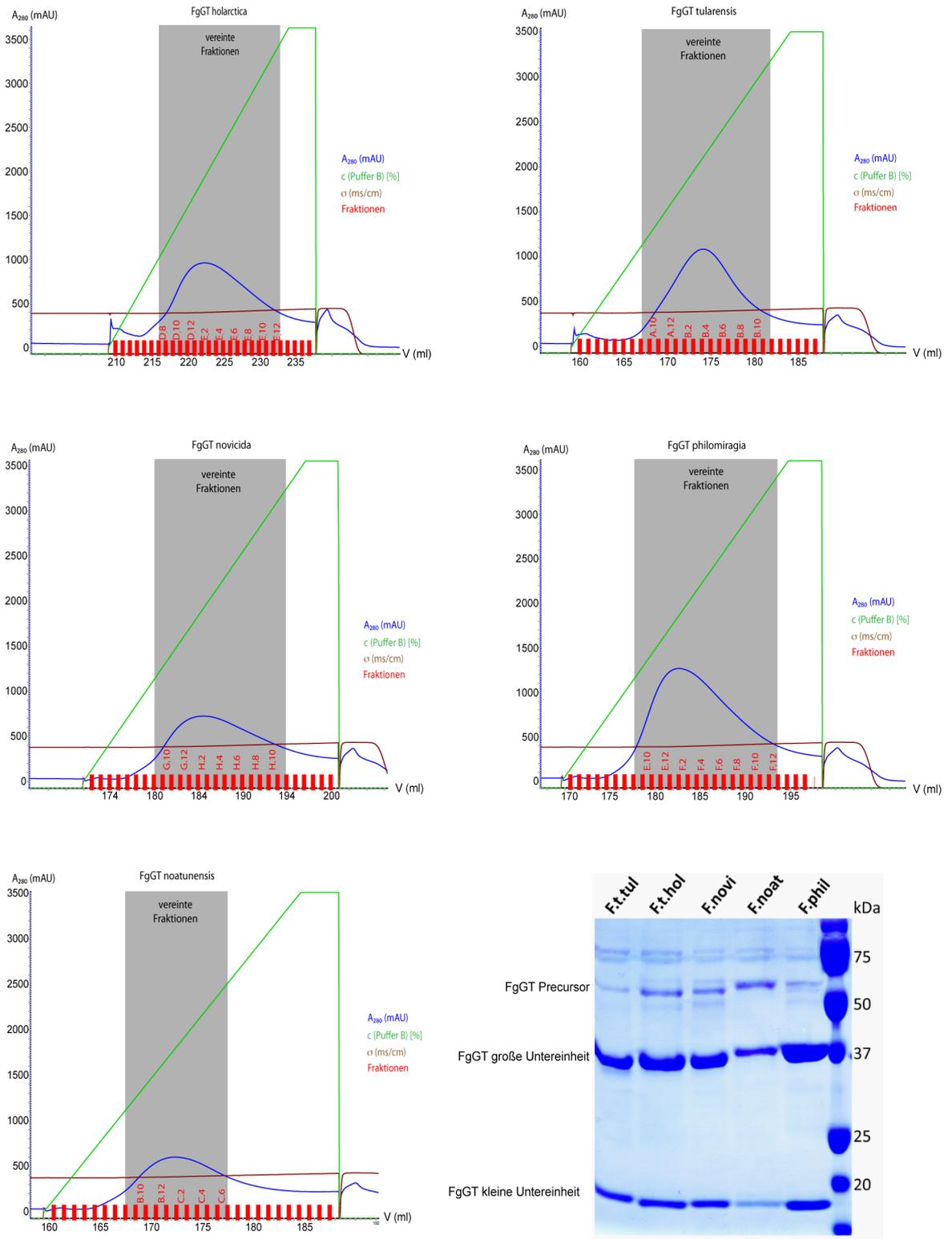


Abbildung 11 *Francisella* gGT (FgGT) Reinigung.

Es wurden fünf gGTs von verschiedenen *Francisella* Spezies gereinigt. Die Chromatogramme der Äkta Reinigung sind dargestellt. Fraktionen, die nach Überprüfen mittels SDS-PAGE (hier nicht aufgeführt) vereint wurden, sind grau hinterlegt; SDS-PAGE der gereinigten FgGTs nach SUMO-Tag Abspaltung: Große Untereinheit (40 kDa) und kleine Untereinheit (20 kDa) der FgGTs waren eindeutig erkennbar. Der Precursor (60 kDa) war schwach im SDS-PAGE erkennbar.

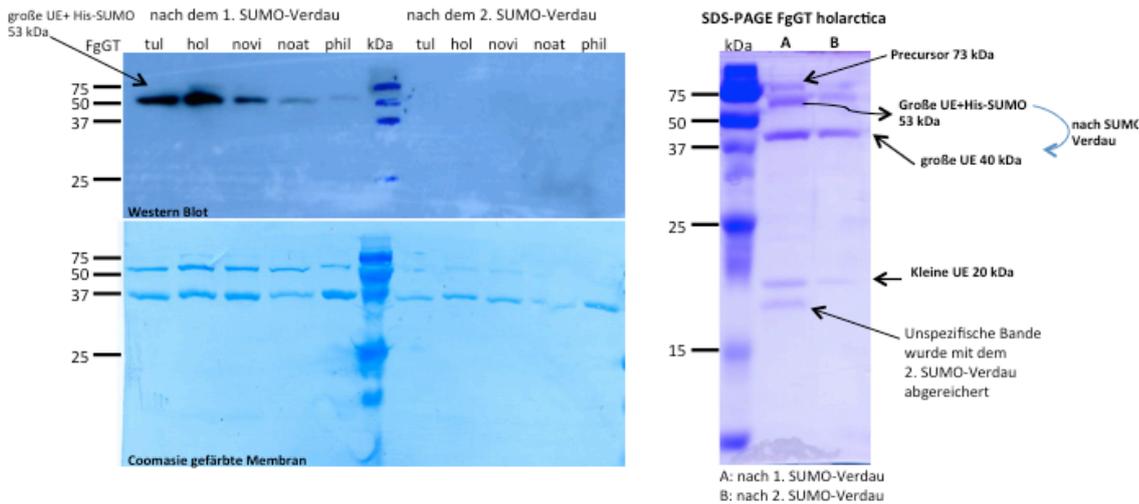


Abbildung 12 SUMO-Verdau der FgGTs.

Westernblot gegen  $\alpha$ -His: Die große Untereinheit der His-SUMO-FgGTs (bei 53 kDa) ist detektierbar. Nach dem 2. SUMO-Verdau ist keine Bande mehr zu sehen; Coomassie gefärbte Membran: Die große Untereinheit der FgGT mit und ohne SUMO-Tag ist auf der Membran nach dem 1. SUMO-Verdau vorhanden. Nach dem 2. SUMO-Verdau war nur noch die große Untereinheit ohne SUMO-Tag (bei 40 kDa) vorhanden. SDS-PAGE der FgGT *holarctica* (FgGT hol): Vergleich der FgGT hol nach dem 1. und 2. SUMO-Verdau Durchlauf; 2  $\mu$ g Protein pro Spur aufgetragen. Die unspezifische Bande vom ersten Durchlauf wurde nach dem 2. SUMO-Verdau abgereichert.

## 3.2 Charakterisierung der *Francisella* gGT

### 3.2.1 Sequenzvergleich verschiedener gGTs

Ziel dieser Arbeit ist es, Spezies-spezifische Inhibitoren der *Francisella* gGT zu finden. Ziel solch eines Spezies-spezifischen Inhibitors, ein sogenannter Pathoblocker, ist es, den Keim unschädlich zu machen. Im Falle einer Hemmung der *Francisella* gGT würde *Francisella* nicht mehr in der Lage sein, sich im befallenen Organismus zu vermehren. Solche Pathoblocker sollten eine Spezies-spezifische Wirkung haben und somit vor allem nicht das humane Homolog hemmen. Aus diesem Grund wurde zunächst eine Sequenzanalyse zur Abschätzung, welche Reste für die funktionellen Unterschiede in der Substratspezifität, Hydrolyse und Transpeptidierung verantwortlich sein könnten, durchgeführt. In dem multiplen Sequenzalignment (Abbildung 13) ist der Vergleich von verschiedenen *Francisella* gGTs und zusätzlich der bakteriellen gGT von *H. pylori* und der humanen gGT dargestellt. Die humane gGT weist im Vergleich zu den bakteriellen gGTs (*Francisella* und *H. pylori* gGT) im aktiven Zentrum Unterschiede in essentiellen Resten auf. Die Unterschiede in den Aminosäuren Tyr465 (nur für *H. pylori*) und Pro504 befinden sich im Bereich der Bindetasche für das Substrat und könnten unter Umständen für unterschiedliche Substratspezifität mitverantwortlich sein. Bei der humanen gGT ist das

sterisch unflexible Pro471 durch ein Alanin ersetzt. Gerade dieser Unterschied könnte darauf hinweisen, dass *Francisella* gGT Inhibitoren gefunden werden können, die das humane Homolog nicht binden.

		<b>R135</b>		<b>T412</b>
<i>F.tul.hol.</i>	...	DGNKNI	AINYREKAPAKA	...DHEKLQ
<i>F.tul.tul.</i>	...	DGNKNI	AINYREKAPAKA	...DHEKLQ
<i>F.novicida</i>	...	DGNKNI	AINYREKAPAKA	...DHEKLQ
<i>F.noatunensis</i>	...	DGNKNI	AINYREKAPAKA	...DREKLQ
<i>F.philomiragia</i>	...	DGNKNI	AINYREKAPAKA	...DREKLQ
<i>H.pylori G27</i>	...	NG-ENVALD	DFREKAPLKA	...LHEGSNT
<i>Homo sapiens</i>	...	TTRKAEV	INAREVAPRLA	...PDDG-GTA
		<b>N432</b>		<b>E451 D454</b>
<i>F.tul.hol.</i>	...	VSNTYTLN	YSYGS	...GIFLNNEMDDFAAKVGE
<i>F.tul.tul.</i>	...	VSNTYTLN	YSYGS	...GIFLNNEMDDFAAKVGE
<i>F.novicida</i>	...	VSNTYTLN	YSYGS	...GIFLNNEMDDFAAKVGE
<i>F.noatunensis</i>	...	VSNTYTLN	YSYGN	...GILLNEMDDFAAKVGV
<i>F.philomiragia</i>	...	VSNTYTLN	YSYGN	...GILLNEMDDFAAKVGV
<i>H.pylori G27</i>	...	VSVTYTTN	ASYGS	...GFLNEMDDFSIKPGN
<i>Homo sapiens</i>	...	VSATSTIN	LYFGS	...GILFNNEMDDFSS-PSI
		<b>F465</b>		<b>S483</b>
<i>F.tul.hol.</i>	...	ANVFG	LVQGEV	...RPLSSMTPT
<i>F.tul.tul.</i>	...	ANVFG	LVQGEA	...RPLSSMTPT
<i>F.novicida</i>	...	ANVFG	LVQGEA	...RPLSSMTPT
<i>F.noatunensis</i>	...	ANVFG	LVQGEA	...RPLSSMTPT
<i>F.philomiragia</i>	...	ANVFG	LVQGEA	...RPLSSMTPT
<i>H.pylori G27</i>	...	PNLYG	LVGGDA	...RPLSSMSPT
<i>Homo sapiens</i>	...	TNEFG	VPPSPA	...QPLSSMCPT

Abbildung 13 Sequenzalignement Alignment der für die Substratbindung und -Umsetzung wichtigen Sequenzbereichen verschiedener gGT Proteine.

Grau hinterlegt: Aminosäuren, die direkt im aktiven Zentrum der  $\gamma$ -Glutamyltranspeptidase beteiligt sind. Dargestellt sind nur die unmittelbaren Bereiche des aktiven Zentrums und Deletionen in der Aminosäuresequenz mittels eines Bindestriches. Im Alignment sind gGTs folgender Spezies dargestellt: *Francisella tularensis subsp. holarctica* (F.tul.hol., CAJ79205), *Francisella tularensis subsp. tularensis* (F.tul.tul., AJI69640), *Francisella tularensis subsp. novicida* (F.novicida, AJI61602), *Francisella noatunensis* (F.noatunensis AKU05619), *Francisella philomiragia* (F.philomiragia, AJI75728), *Helicobacter pylori* (H.pylori G27, Q84DD1) und *Homo sapiens* (P19440). Das Alignment wurde mit dem Onlinetool Protein BLAST ([www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/)) erstellt.

### 3.2.1.1 Enzymatische Aktivität und pH-Abhängigkeit der rekombinanten FgGTs

Die enzymatische Aktivität der rekombinanten FgGTs wurde mit Hilfe des von Meister et al. beschriebenen Assays (2.6.1) überprüft, der auf der enzymatischen Spaltung des artifiziellen Substrats gamma-Glutamyl-para-Nitroanilin beruht. Dieser Assay wurde ursprünglich für die humane gGT optimiert (Meister, Tate et al. 1981). Aufgrund der beschriebenen Unterschiede in der Aminosäuresequenz vor allem im Bereich des aktiven Zentrums und der Substratbindestelle zwischen der humanen gGT und der FgGT (Abbildung 13) muss überprüft werden, ob die bei Meister et al. beschriebenen Assaybedingungen die optimale Enzymaktivität der FgGTs unterstützen. Für die Analyse der pH-Abhängigkeit wurde die enzymatische Aktivität in einem pH-Bereich zwischen pH

6 und pH 9 untersucht. Als Puffersubstanz wurde für den Bereich pH 6 bis pH 7,5 HEPES und für den Bereich pH 7,5 bis pH 9 Tris verwendet, um eine optimale Pufferkapazität für den jeweiligen pH Bereich zu gewährleisten. Der Aktivitätsassay wurde mit gGpNA in verschiedenen Konzentrationen (50  $\mu$ M-1 mM) als Substrat und mit dem Dipeptid GlyGly als Akzeptor in Abhängigkeit vom pH-Wert durchgeführt. Dabei wurden die Anfangsgeschwindigkeiten in Abhängigkeit von der gGpNA-Konzentration gemessen. Aus den resultierenden Michaelis-Menten-Kurven konnten weder die Michaelis-Konstante  $K_M^{gGpNA}$ , noch die Maximalgeschwindigkeit  $v_{max}$  ermittelt werden, da die Sättigung der Reaktionsgeschwindigkeit in Abhängigkeit von der Substratkonzentration (gGpNA) nicht erreicht wurden. Dies ist auch mit veränderten Enzymkonzentrationen nicht gelungen.

Alle fünf rekombinant produzierten FgGTs zeigten ein pH-Optimum bei pH 8 (Abbildung 14), so dass die von Meister et al. beschriebenen und für die humane gGT optimierten Bedingungen für die FgGT beibehalten werden konnten. Weitere Analysen wie der Test verschiedener Akzeptoren wurden in dieser Arbeit nur noch für die *Francisella tularensis subsp. holarctica* gGT durchgeführt, diese wird in den folgenden Abschnitten mit FtgGT abgekürzt. Der Fokus wurde auf diese Subspezies gelegt, da diese die relevanteste *Francisella* Spezies für Europa ist.

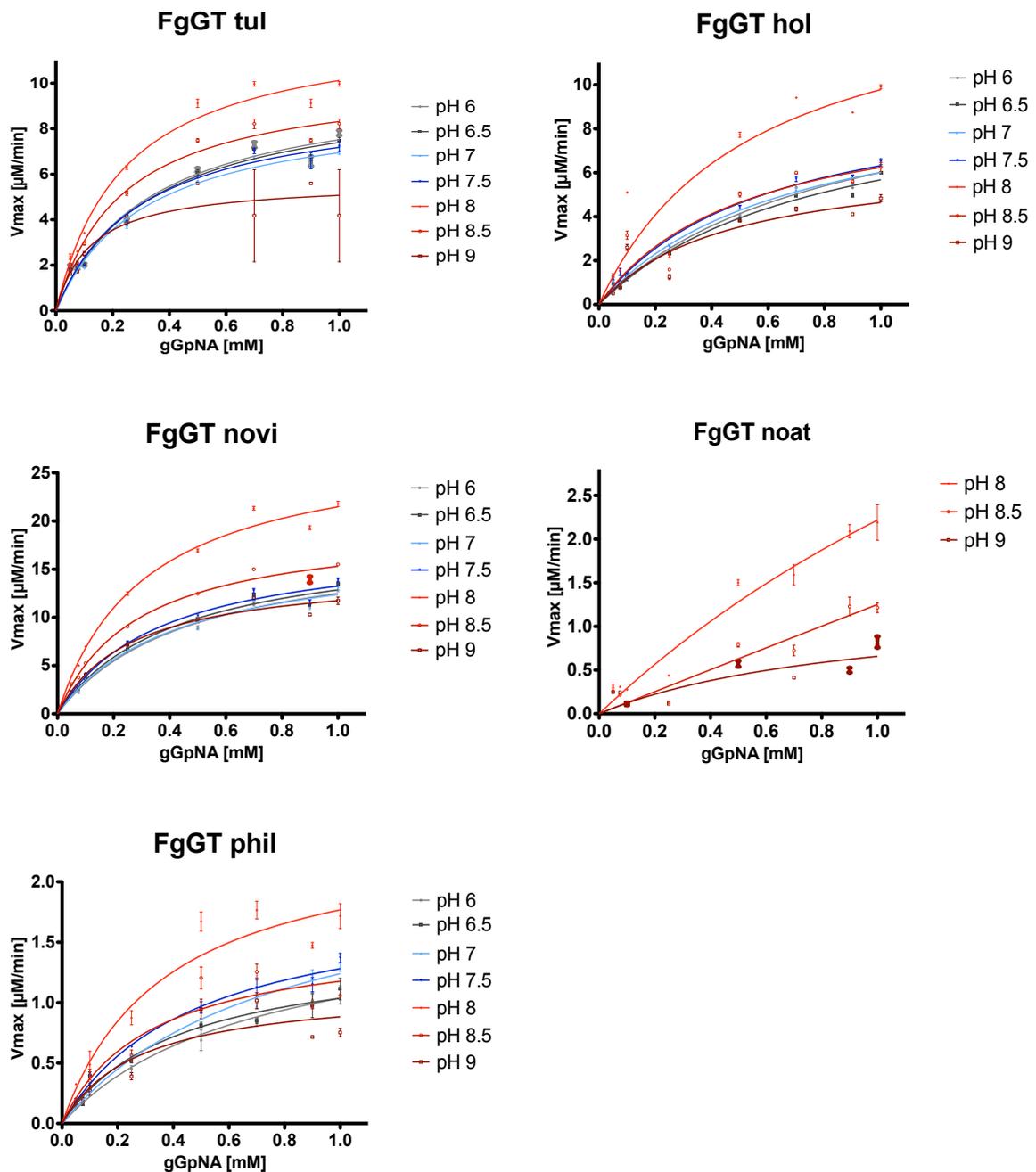


Abbildung 14 FgGTs Michelis-Menten-Kurven für verschiedene pH-Werte.

*Francisella tularensis subsp. tularensis* gGT (FgGT tul), *Francisella tularensis subsp. holarctica* gGT (FgGT hol), *Francisella tularensis subsp. novicida* gGT (FgGT novi), *Francisella philomiragia* gGT (FgGT phil), *Francisella noatunensis* gGT (FgGT noat). Für den Bereich pH 6-7,5 wurde ein HEPES-Puffer und für den Bereich pH 8-9 ein Tris-Puffer verwendet. Dargestellt sind die Mittelwertpunkte  $\pm$  Standardabweichung. Assaybedingungen: 1  $\mu$ g FgGT, 20 mM GlyGly, 1 mM gGpNA, 100 mM Tris pH 8,0 (je drei unabhängige Triplikat-Experimente)

### 3.2.2 Lagerbedingungen für die rekombinante FtgGT

Die Lagerung der FtgGT erfolgte bei -80 °C, da sich im Allgemeinen die Halbwertszeit eines Proteins in Lösung bei niedrigen Temperaturen verlängert, wobei das schnelle Einfrieren eine entscheidende Rolle spielt. Um zu gewährleisten, dass die Stabilität und Funktionalität bzw. enzymatische Aktivität der FtgGT während der Lagerung nicht verloren geht, wurden verschiedene Lagerungsbedingungen getestet. Salze in geringen Konzentrationen erhöhen meist die Löslichkeit von Proteinen. Allerdings verursachen sie in zu hohen Konzentrationen ein Aussalzen eines Proteins aus der Lösung – die Löslichkeit nimmt ab. Ein Zusatz von Saccharose in den Lagerpuffer führt zu einer längeren Haltbarkeit bzw. hat einen positiven Effekt auf die Stabilität eines Proteins. Aus diesen Gründen wurde zur Lagerung der FtgGT (*F. t. subsp. holarctica*) ein Tris basierter Puffer mit und ohne 2,5 % Saccharose, sowie ein HEPES basierter Puffer und zwei verschiedenen Kochsalzkonzentrationen getestet. Die Stabilität wurde sowohl über die Enzymaktivität, als auch über den Verlauf der Schmelzkurven (Bestimmung mit Hilfe des Entfaltungsassays) vor der Lagerung bei -80 °C und nach einer Lagerung von 4 Wochen bei -80 °C überprüft. Vor der Lagerung bei -80 °C zeigte der Puffer 2 (100 mM HEPES, 140 mM NaCl, pH 7,5) die höchste Enzymaktivität und der Puffer 4 (100 mM Tris, 500 mM NaCl, pH 8,3) den höchsten Schmelzpunkt im Entfaltungsassay. Diese Ergebnisse ließen sich auch nach einer vierwöchigen Lagerung bei -80 °C bestätigen. Für die Lagerung der FtgGT wurde der Puffer 2 (100 mM HEPES, 140 mM NaCl, pH 7,5) ausgewählt, da die enzymatische Aktivität am höchsten lag (Abbildung 15). Der Schmelzpunktunterschied von unter 5 °C im Vergleich zur Puffer 4 wurde vernachlässigt.

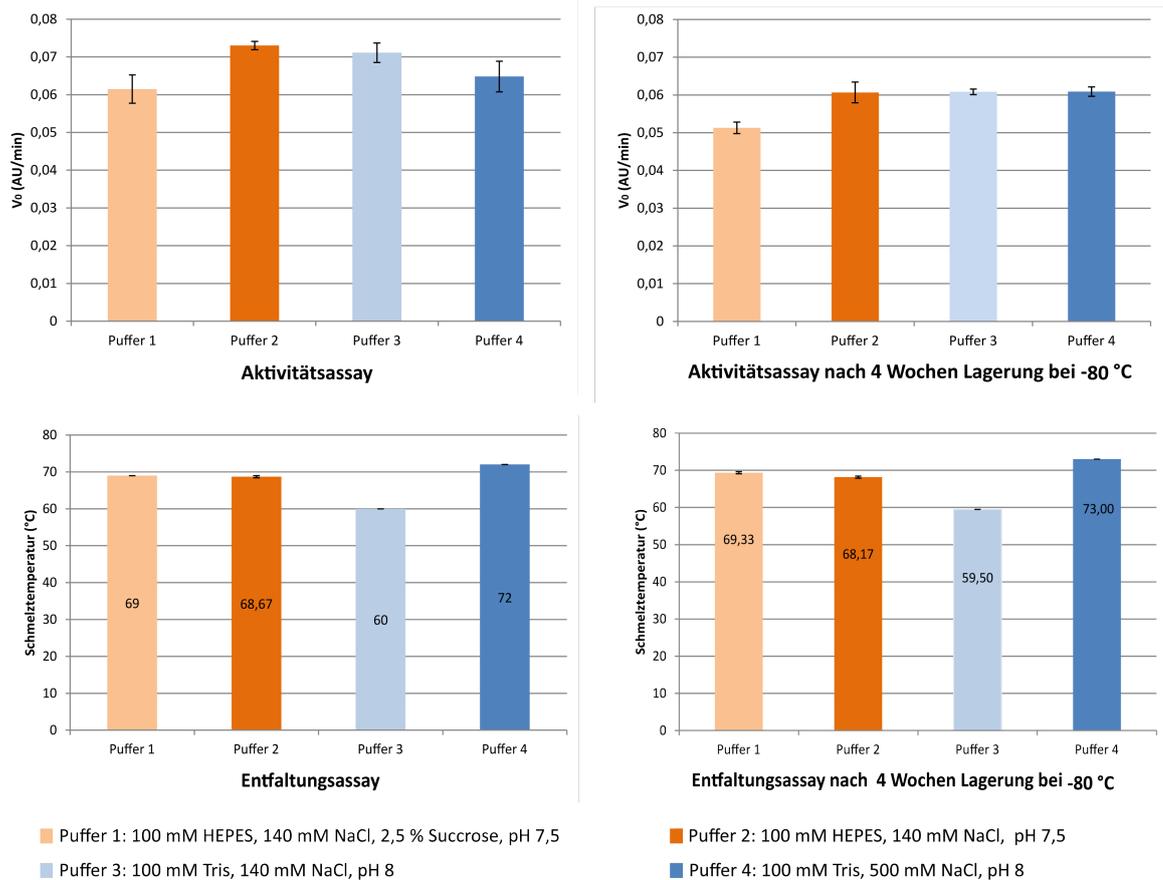


Abbildung 15 Stabilität der FtgGT in verschiedenen Lagerpuffer.

Getestet wurden vier verschiedene Lagerpuffer mittels FtgGT Aktivitätsassay (obere Graphen) und Entfaltungsassay (untere Graphen) unmittelbar nach der Reinigung der rekombinanten FtgGT und nach 4 Wochen einer Lagerung bei -80 °C. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung. Die Messungen erfolgten in drei unabhängigen Triplikat-Experimenten. Aktivitätsassaybedingungen: 1  $\mu$ g FtgGT, 20 mM GlyGly, 1 mM L-gGpNA, 100 mM Tris pH 8. Entfaltungsassaybedingungen: 5  $\mu$ M FtgGT, 5x Sypro-Orange in 20  $\mu$ l Gesamtvolumen (mit dem jeweiligen Puffer aufgefüllt).

### 3.2.3 Test verschiedener Akzeptorsubstanzen

In dem Standard-Aktivitätsassay wird das Dipeptid Diglycin (GlyGly) als Akzeptor für den Transglutaminierungsschritt verwendet. Für die Akzeptor-Spezifität wurde die Enzymaktivität der FtgGT in Anwesenheit von verschiedenen Akzeptorsubstanzen im Aktivitätsassay getestet. Folgende freie Aminosäure und Dipeptide standen für diese Experimente zur Verfügung: His, Ala, Gly, Cys, Gly-Gly, Ala-Ala, His-Gly, Cys-Gly und Gly-His.

Der Test der Akzeptorsubstanzen mit L-gGpNA als Substrat zeigte, dass einzelne Aminosäuren einen inhibitorischen Effekt auf die FtgGT Aktivität haben. Dipeptide hingegen hatten keinen Einfluss auf die enzymatische FtgGT Aktivität. Die Enzymaktivität konnte im Vergleich zur Aktivität ohne Akzeptor nicht gesteigert werden (Abbildung 16).

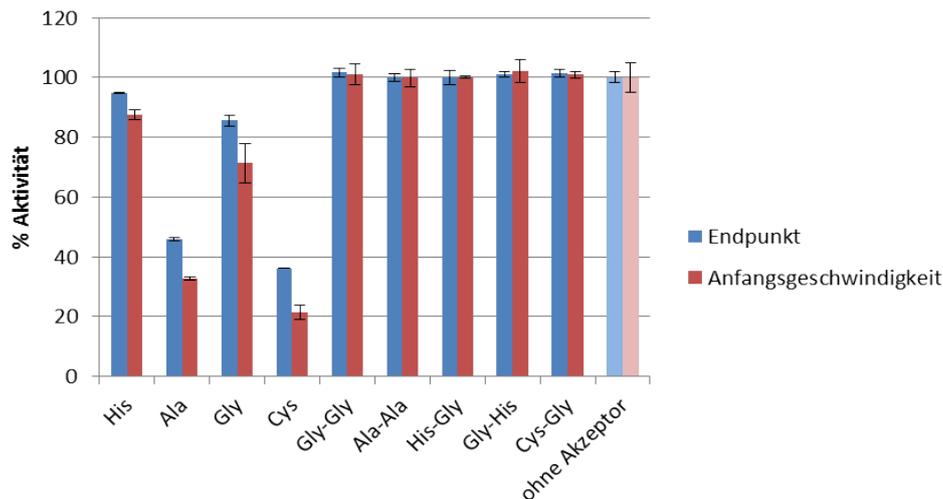


Abbildung 16 Akzeptorsubstanzen im Aktivitätsassay mit L-gGpNA als Substrat.

Die relativen Messwerte wurden auf den Wert ohne Akzeptor normalisiert. Analysiert wurden Anfangsgeschwindigkeit und Endpunkt. Einzelne Aminosäuren zeigten im Gegensatz zu Dipeptiden einen inhibitorischen Effekt auf die FtgGT Aktivität. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung. Die Ergebnisse wurden in drei unabhängigen Triplikatmessungen bestätigt. Assaybedingungen: 18 nM FtgGT, 20 mM Akzeptor, 250  $\mu$ M L-gGpNA, 0,1 % BSA, 100 mM Tris pH 8,0 (drei unabhängige Triplikat-Experimente).

Nach der enzymatischen Spaltung der L-gGpNA Isoform kann das frei gewordenen L-pNA wiederum als Akzeptor für den  $\gamma$ -Glutamylrest fungieren und somit ist die Rückreaktion möglich (2.6.1). Diese Rückreaktion ist bei Verwendung der D-gGpNA Isoform nicht möglich (Wickham, Regan et al. 2012). Um zu überprüfen, ob die enzymatische Nettoreaktion ohne Akzeptor (reine Hydrolyse) noch weiter gesteigert werden kann, wenn eine Rückreaktion ausgeschlossen ist, wurde im Weiteren die Aktivität der FtgGT unter Verwendung von D-gGpNA gemessen. Wie die Ergebnisse in Abbildung 17 zeigen, wurde mit D-gGpNA eine insgesamt geringere Enzymaktivität gemessen als mit L-gGpNA. Dies lässt darauf schließen, dass die FtgGT eine geringere Affinität zu der D-Form als zu der L-Form hat.

Auch wenn für die Messung der FtgGT Aktivität kein Akzeptor nötig ist, wurde in dieser Arbeit für weitere Anwendungen der FtgGT Aktivitätsassay weiterhin der Akzeptor GlyGly verwendet, um den Vergleich mit gGTs anderer Spezies zu ermöglichen.

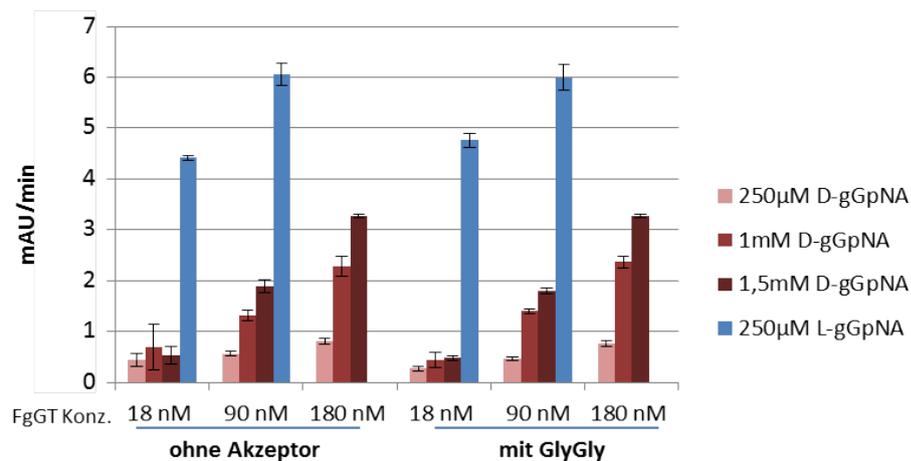


Abbildung 17 Vergleich der gGpNA Isoformen D-gGpNA und L-gGpNA im FgGT Aktivitätsassay. Bei Verwendung des D-gGpNAs ohne Zugabe eines Akzeptor (hier: GlyGly) wird die reine Hydrolyse gemessen. L-gGpNA kann sowohl die Transpeptidierung als auch die Hydrolyse katalysieren. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung. Assaybedingungen: x nM FtgGT, 20 mM Akzeptor, x  $\mu$ M gGpNA, 0,1 % BSA, 100 mM Tris pH 8,0 (drei unabhängige Triplikate-Experimente).

### 3.3 Assay Validierung

Um in einem Inhibitor-Screening robuste Ergebnisse zu erzielen, müssen die eingesetzten Screening Assays definierte Anforderungen erfüllen. Solch ein Anforderungskatalog wurde unter anderem von der *European Lead Factory*, einer im Rahmen der *European Innovative Medicines Initiative* (IMI) finanzierten *open-innovation* Plattform für die Wirkstoffforschung, von den im EFPIA (*European Federation of Pharmaceutical Industries and Associates*) Konsortium zusammengeschlossenen Unternehmen formuliert. Diese Anforderungen sind in drei Bereiche unterteilt: 1. Qualität der Assay Reagenzien, 2. Qualität der Messung, 3. Hochdurchsatztauglichkeit. Weiterhin muss ein inhibitorischer Effekt der Hit Substanzen auf seine Spezifität gegenüber der FtgGT getestet werden. Hierfür werden die Hit Substanzen in Aktivitätsassays anderer bakterieller gGTs und vor allem der humanen gGT getestet. Zusätzlich ist es für eine Validierung der identifizierten Hit Substanzen wichtig, deren Wirksamkeit mit unabhängigen Methoden zu zeigen. Hierfür werden orthogonale Assays (Counter Assays) benötigt, die die Wirksamkeit der FtgGT Inhibitoren beispielsweise in biologischen Assays zeigen.

#### 3.3.1 Qualität der Assay Reagenzien

Zunächst wurde die Enzymreinheit, die Proteininstabilität nach verschiedenen Einfrier-/Auftauzyklen und die Stabilität des Substrates gGpNA untersucht, um genaue und zuverlässige Messungen zu gewährleisten. Die Ergebnisse erfüllten alle erforderlichen

Kriterien und sind in Abbildung 18 bis Abbildung 25, sowie in der zusammenfassenden Tabelle 12 dargestellt.

### 3.3.1.1 Proteinreinheit > 80 %

Die Reinheit der FtgGT war größer als 80 %, gemäß der Abschätzung auf dem coomassiegefärbten SDS-Gel lag diese sogar bei größer als 90 % (Abbildung 18).

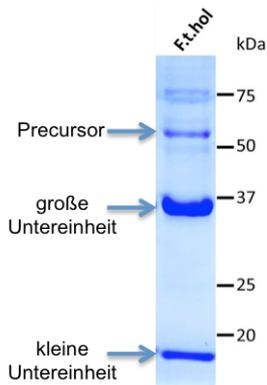


Abbildung 18 Gereinigte rekombinante FgGT *holarctica* (FtgGT) auf dem coomassiegefärbten SDS-Gel. Die von diesem SDS-Gel abgeschätzte Reinheit liegt bei > 90 %.

### 3.3.1.2 Protein Stabilität

Für die Untersuchung der Stabilität wurde die FtgGT nach einer steigenden Anzahl von Auftauzyklen (1-6x) im Aktivitätsassay getestet. Der relative Vergleich (100 % entspricht 1x aufgetaut) zeigte keinen nennenswerten Unterschied in der enzymatischen Aktivität (Abbildung 19). Dementsprechend ist das rekombinante Protein FtgGT ausreichend stabil für den Inhibitor Screening Assay.

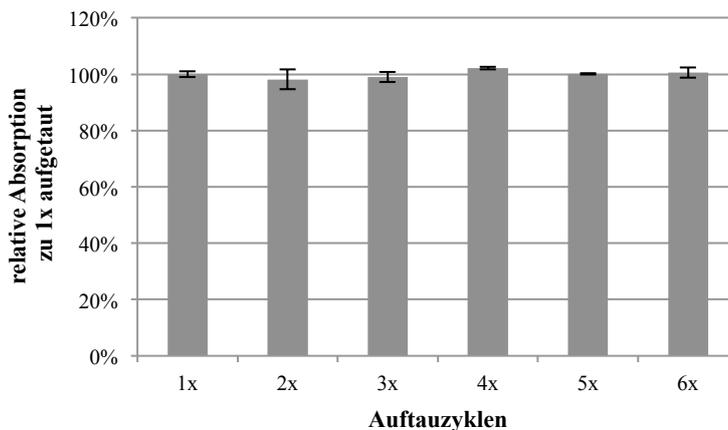


Abbildung 19 FtgGT Stabilität im Aktivitätsassay.

Relativer Vergleich der FtgGT Enzym Aktivität nach 1x bis 6x auftauen bei einer dazwischen liegenden Lagerung bei -80 °C. Der gemessene Wert der 1x aufgetaut Probe wurde auf 100 % gesetzt. Dargestellt sind die Mittelwerte ± Standardabweichung. Assaybedingungen: 18 nM FtgGT, 20 mM GlyGly, 250 µM L-gGpNA, 0,1 % BSA, 100 mM Tris pH 8,0, 4 h Reaktionszeit. Daten in der Abbildung beziehen sich auf den Endpunkt. (drei unabhängige Triplikat-Experimente)

### 3.3.1.3 Reagenzienstabilität

Um Aussagen über die Reagenzienstabilität treffen zu können, wurde das Substrat L-gGpNA bei verschiedenen Lagerbedingungen (9 h auf Eis, bei 4 °C, bei Raumtemperatur (RT) und bei 37 °C) untersucht. Diese Bedingungen wurden mit frisch aufgetautem Substrat im Aktivitätsassay verglichen. Die Analyse ergab eine minimale Abweichung von  $\pm 3\%$  in der enzymatischen Aktivität zwischen den verschiedenen Lagerbedingungen des L-gGpNAs vor Verwendung im Aktivitätsassay (Abbildung 20).

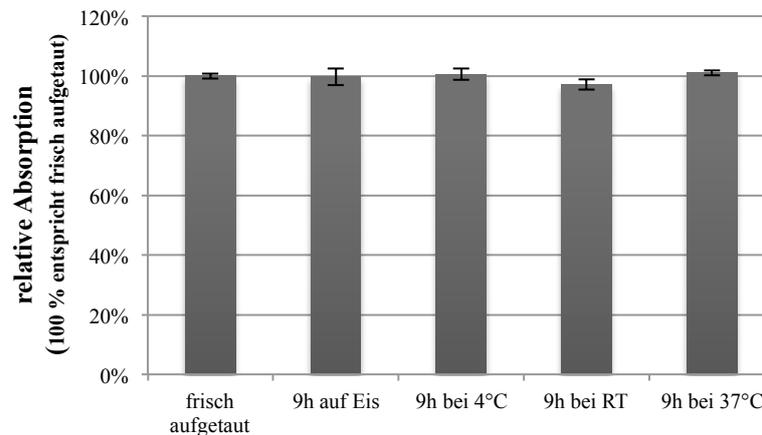


Abbildung 20 L-gGpNA Stabilität nach Inkubation bei unterschiedlichen Temperaturen.

Die Lagerung erfolgte für 9 h auf Eis, bei 4 °C, bei RT oder bei 37 °C. Keine nennenswerte Abweichung im Vergleich zu der frisch aufgetauten L-gGpNA Probe – dargestellt im relativen Vergleich (100 % entspricht frisch aufgetautem L-gGpNA). Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung. Assaybedingungen: 18 nM FtgGT, 20 mM GlyGly, 500  $\mu$ M L-gGpNA, 0,1 % BSA, 100 mM Tris pH 8,0, Endpunktmessung nach 4 h. (der unabhängige Triplikate-Messungen).

### 3.3.2 Qualität der Messung

Die Qualität der Messung wurde anhand von vier Kriterien untersucht: 4 h Anstieg des Absorptionssignals, ohne die Signalsättigung zu erreichen; Korrelation von Kinetik- und Endpunktmessung; Signal/Hintergrund-Verhältnis und die Bestimmung von Z'-Faktor als Maß für das Signalfenster zwischen Positiv- und Negativkontrolle (Zhang, Chung et al. 1999).

#### 3.3.2.1 4 h Kinetik Messung

Für ein erfolgreiches Inhibitor-Screening ist es notwendig, den Einfluss der Inhibitoren über einen Zeitraum von 4 h verfolgen zu können, um auch den Effekt von langsam bindenden Inhibitoren detektieren zu können. Aus diesem Grund ist es erforderlich, die relativen Mengen von Enzym und Substrat so einzustellen, dass über 4 h eine möglichst hohe Signalstärke bei einer möglichst konstanten Signalzunahme zu sehen ist, ohne dass das Signal in die Sättigung geht. Entsprechend des hier durchgeführten Experimentes

wurden für die Screeningassays eine Substratkonzentration von 250  $\mu\text{M}$  gGpNA und eine Enzymkonzentration von 18 nM FtgGT gewählt (Abbildung 21).

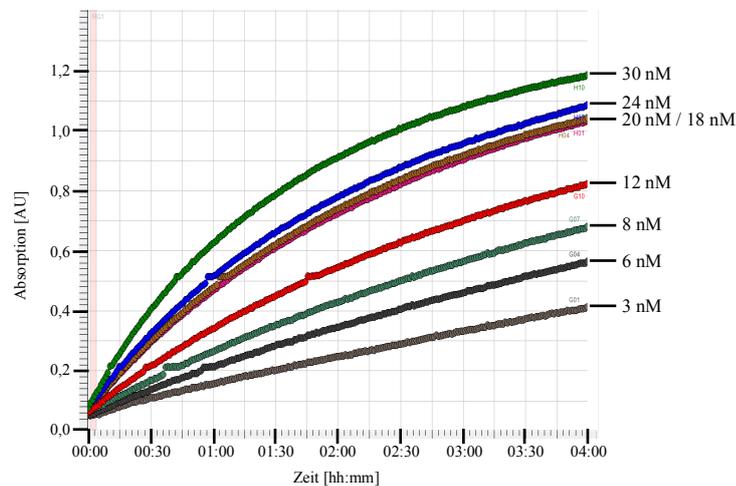


Abbildung 21 4 h Kinetik bei verschiedenen FtgGT Konzentrationen.

Assaybedingungen: x nM FtgGT, 20 mM GlyGly, 250  $\mu\text{M}$  L-gGpNA, 0,1 % BSA, 100 mM Tris pH 8,0 (drei unabhängige Triplikat-Experimente).

### 3.3.2.2 Korrelation von Kinetik- und Endpunktmessung

Für ein Hochdurchsatz-Screening (*High-Throughput-Screening*, HTS) ist es vorteilhaft, wenn die Ergebnisse aus der Bestimmung der Anfangsgeschwindigkeit und der Endabsorption nach 4 h (Endpunktmessung) korrelieren. Dies erlaubt in einem initialen Screening zunächst die alleinige Bestimmung der EndpunktabSORption, wodurch die Messzeit im Plattenlesegerät deutlich verkürzt und damit der Probendurchsatz erheblich erhöht werden kann.

Eine ausreichende Korrelation der Kinetik- und Endpunktmessung wurde mit der Titration des Referenzinhibitors Acivicin gezeigt (Abbildung 22). Zwar lagen die Kurven der Kinetik- und Endpunktreaktionsmessung nicht vollständig übereinander, jedoch ist die Endpunktbestimmung für ein initiales Screening zur Inhibitorsubstanz Identifizierung ausreichend, da der Kurvenverlauf in Abhängigkeit zur Acivicin-Konzentration identisch war.

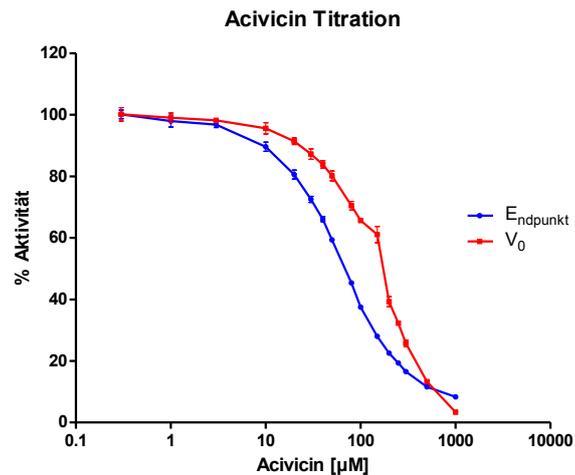


Abbildung 22 Korrelation der Kinetik – und Endpunktmessung bei einer Acivicin-Titration. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung. Assaybedingungen: 18 nM FtgGT-hol, 20 mM GlyGly, 250  $\mu$ M L-gGpNA, 0,1 % BSA, 0-1 mM Acivicin, 100 mM Tris pH 8,0, 4 h Messung (drei unabhängige Triplikate-Experimente).

### 3.3.2.3 Signal / Hintergrund Verhältnis

Für die Bestimmung des Signal/Hintergrund-Verhältnisses wurde die Hälfte einer 96-well Platte mit Enzym und die andere Hälfte ohne Enzym unter sonst identischen Aktivitätsassay-Bedingungen gemessen. Für das Signal/Hintergrund-Verhältnis ergab die Berechnung für die Anfangsgeschwindigkeit ( $V_0$ ) einen Wert von 17,27 und für den Endpunkt (EP) 17,15 (Abbildung 23), welche deutlich über dem geforderten Wert von  $>3$  lagen.

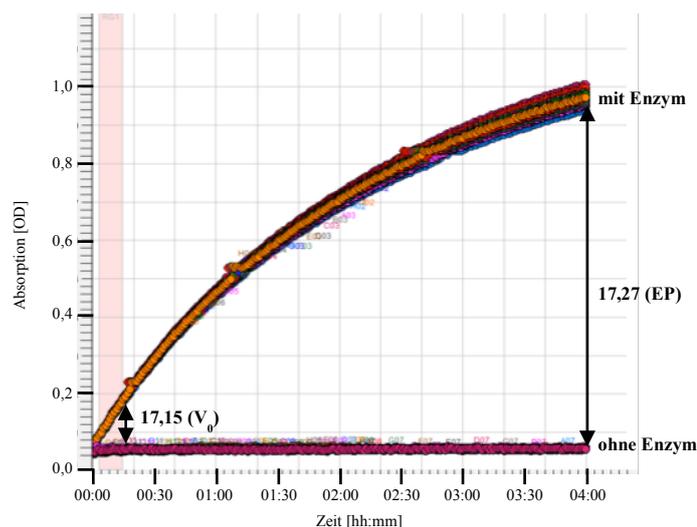


Abbildung 23 4 h Kinetik der FtgGT im Aktivitätsassay für die Berechnung des Signal/Hintergrund-Verhältnisses und dem  $Z'$ .

Rosa hinterlegter Bereich wurde zu Ermittlung der Anfangsgeschwindigkeit ( $V_0$ ) verwendet. Eingezeichnet sind die Signal/Hintergrundverhältnisse für die Anfangsgeschwindigkeit (17,15) und den Endpunkt (17,27). OD= optische Dichte; Assaybedingungen: 18 nM FtgGT, 20 mM GlyGly, 250  $\mu$ M L-gGpNA, 0,1 % BSA, 0-1 mM Acivicin, 100 mM Tris pH 8,0 (drei unabhängige Triplikate-Experimente).

### 3.3.2.4 Z'

Der Z'-Faktor gibt an, wie gut die statistische Unterscheidung von Signal- und Hintergrund-Messung ist. Damit ist Z' ein nützliches Maß der statistischen Effektgröße für den Vergleich von Assays und für die Aussage über die Qualität des Assays. Dabei wird der Z' Faktor wie folgt ermittelt:

Formel 5 Berechnung des Z-Faktors (Zhang, Chung et al. 1999)

$$\text{Z-Faktor} = 1 - \frac{3(\sigma_p + \sigma_n)}{|\mu_p - \mu_n|}$$

mit  $\sigma$ = Standardabweichung,  $\mu$ = Mittelwert, n= Negativkontrollen und p= Positivkontrollen.

Der Z' Faktor der Messung des Aktivitätsassays für FtgGT ergab den Wert 0,877 (V<sub>0</sub>) bzw. 0,958 (EP) (Abbildung 23) und erfüllte somit die vorgegebenen Anforderung von > 0,6.

### 3.3.3 Hochdurchsatztauglichkeit

Für die Anwendbarkeit des Assays im Hochdurchsatzformat (hier 96well Format) sollten unter diesem Punkt folgende Kriterien untersucht werden: Stabilität innerhalb der Messplatte, Readout-Stabilität und DMSO-Toleranz.

#### 3.3.3.1 Stabilität innerhalb der Messplatte und Readout-Stabilität

Es wurde eine 96well Platte mit denselben Bedingungen (18 nM FtgGT, 20 mM GlyGly, 250  $\mu$ M L-gGpNA, 0,1 % BSA, 100 mM Tris pH 8,0) für den FgGT Aktivitätsassay analysiert. Es erfolgte jeweils eine 4 h Kinetikmessung und Endpunktmessung nach 4 h Inkubation bei 37 °C. Nach Zugabe der Stopplösung (100  $\mu$ l 30 % Essigsäure) erfolgten eine weitere 2 h Kinetikmessung und eine Endpunktmessung nach 2 h Inkubation bei 37 °C. Die geforderten Kriterien der Assay Validierung wurden sowohl für die Stabilität innerhalb der Platte – Variationskoeffizienten CV < 10 % – (4 h Kinetik: V<sub>0</sub>  $\pm$ 8 %; E  $\pm$ 3 %; 4 h bei 37 °C: EP  $\pm$ 3 %) als auch für die Signal-Stabilität > 1 h (für 2 h Kinetik: EP  $\pm$ 3 %, bei 37 °C: EP  $\pm$ 3 %) erfüllt (Tabelle 12). Exemplarisch wurden die Ergebnisse der Mess- und Readout-Stabilität einer Endpunktmessung in Abbildung 24 dargestellt.

## Mess-Stabilität

98%	101%	101%	100%	100%	99%	100%	100%	100%	100%	102%	101%
101%	100%	98%	97%	100%	98%	100%	101%	100%	100%	101%	101%
101%	101%	100%	96%	100%	98%	100%	101%	100%	101%	101%	101%
100%	100%	98%	100%	98%	100%	98%	100%	98%	98%	101%	100%
101%	100%	100%	97%	100%	100%	100%	101%	98%	100%	101%	100%
101%	100%	100%	98%	100%	100%	100%	100%	98%	101%	101%	100%
101%	100%	101%	97%	98%	100%	98%	100%	100%	98%	100%	101%
102%	101%	100%	100%	99%	100%	102%	100%	98%	100%	99%	101%

## Readout-Stabilität

99%	101%	101%	100%	100%	99%	100%	101%	100%	100%	102%	101%
102%	100%	99%	99%	99%	99%	99%	101%	99%	99%	99%	100%
101%	101%	99%	99%	100%	99%	99%	101%	99%	101%	100%	101%
101%	100%	99%	99%	99%	100%	100%	100%	99%	99%	101%	101%
102%	101%	99%	99%	100%	100%	100%	102%	99%	99%	100%	100%
102%	100%	100%	99%	100%	100%	100%	100%	99%	100%	101%	100%
102%	100%	101%	99%	99%	100%	99%	99%	100%	99%	100%	101%
103%	102%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	99%	100%	100%	101%

bis 5% STABW>MW über 5% STABW>MW über 10% STABW>MW bis 5% STABW<MW über 5% STABW<MW über 10% STABW<MW

Abbildung 24 Mess- und Readout-Stabilität des Endpunktes innerhalb einer 96 well Platte. Der Mittelwert der FtgGT Aktivität entspricht 100 %. MW= Mittelwert, STABW= Standardabweichung. Assaybedingungen: 18 nM FtgGT, 20 mM GlyGly, 250 µM L-gGpNA, 0,1 % BSA, 100 mM Tris pH 8,0.

### 3.3.3.2 DMSO Toleranz

Für das spätere Screening von möglichen FtgGT Inhibitoren ist es nötig die DMSO Toleranz bis zu 4 % im Aktivitätsassay zu überprüfen, da die zu testenden Substanzen meist in DMSO gelöst werden. Im Aktivitätsassay wurden steigende DMSO-Konzentrationen zwischen 0-4 % getestet, ohne einen nennenswerten Einfluss auf die enzymatische FtgGT Aktivität zu haben (Abbildung 25). Laut den EFPIA Kriterien sollte die DMSO Toleranz größer 0,5 % betragen, was hier erfüllt war.

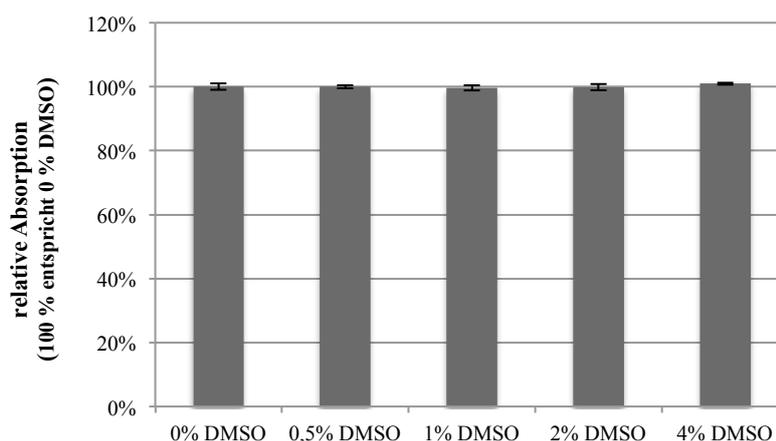


Abbildung 25 Toleranz der Enzymaktivität gegenüber steigender DMSO Mengen. Keine Unterschiede beim Einsetzen bis zu 4 % DMSO im Aktivitätsassay. Dargestellt sind die Mittelwerte ± Standardabweichung. Assaybedingungen: 18 nM FtgGT, 20 mM GlyGly, 250 µM L-gGpNA, 0,1 % BSA, 100 mM Tris pH 8,0, Endpunkt nach 4 h Messung, (drei unabhängige Triplikate-Experimente).

### 3.3.4 Orthogonaler Assay und Spezifitätsassay

Um eine robuste Screening Plattform aufzubauen, ist es notwendig, die hemmende Wirkung möglicher inhibitorischer Substanzen in einem zweiten, unabhängigen

Testverfahren zu bestätigen. In dem hier bearbeiteten Projekt erfolgte dieses mittels biologischer Assays, die das Wachstum von *Francisella* in Kulturmedium, bzw. in Co-Kultur mit eukaryontischen Zellen charakterisieren. Dieser Assay ist am Institut für Mikrobiologie der Bundeswehr etabliert worden. Entsprechende Experimente werden dort noch durchgeführt werden.

Weiterhin ist es notwendig, die inhibitorische Wirkung identifizierter Substanzen auf ihre Spezifität gegenüber der FtgGT zu überprüfen. Hierfür werden gGTs herangezogen, die bei einer klinischen Anwendung des Wirkstoffs im Menschen von Bedeutung sein könnten (humane gGT und *E. coli* gGT als Vertreter der gGTs der Darmflora, *Helicobacter pylori* gGT). Diese biochemischen gGpNA-basierten Assays wurden am Institut für Medizinische Mikrobiologie (MIH, TUM) etabliert und ebenfalls nach den Kriterien der *European Lead Factory* validiert.

Tabelle 12 Überblick der Assay Validierungsanforderungen und –ergebnisse.

Bisher wurde kein 384well Format für den FtgGT Aktivitätsassay aufgrund der apparativen Ausstattung vorgesehen

	Anforderungen	FgGT	
Reagenz Qualität	Enzyme Reinheit > 80 %	> 80 %	✓
	Protein Stabilität Einfrier/ Auftau Zyklen	Für 4x Einfrier/Auftau Zyklen	✓
	Reagenz Stabilität > 8 h	Für 9 Std.: $V_0$ und EP < 5 %	✓
Qualität der Messung	4 h Kinetik Messung	18 nM FgGT	✓
	Korrelation von Kinetik- und Endpunkt- Messung	Acivicin Korrelation $V_0$ und EP	✓
	Signal / Hintergrund > 3	$V_0 = 17,27$ ; EP = 17,15	✓
	$Z' > 0,6$	$Z' = 0,877 (V_0)$ und $0,958 (EP)$	✓
HTS Anwendbarkeit	Stabilität innerhalb der Platte: CV < 10 %	4 h Kinetik : $V_0 \pm 8 \%$ ; EP $\pm 3 \%$ 4 h bei 37°C: EP $\pm 3 \%$	✓
	Read out Stabilität > 1 h	für 2 h: Kinetik: EP $\pm 3 \%$ bei 37°C: EP $\pm 3 \%$	✓
	DMSO Toleranz > 0,5 %	4 h Kinetik für 0 %, 0,5 %, 1 %, 2 %, 4 % DMSO Abweichung $\pm 3 \%$	✓
Counter-assays	384 well Format		?
	Othogonal Assay		BW
	Counterscreen für Spezifität		✓

✓ Anforderung erfüllt  
 ? Bisher nicht geplant  
 BW Bundeswehr

### 3.4 Test von Inhibitoren *in vitro*

#### 3.4.1 Screening von Substanzen

##### 3.4.1.1 Screening der Priaxon Substanzbibliothek

Im Rahmen dieser Arbeit stand die Priaxon Substanzbibliothek mit insgesamt 405 Substanzen, die zum Teil für die spezifische Hemmung der *H. pylori* gGT (HpgGT) optimiert wurden, zur Verfügung. Diese Substanzen wurden in dem etablierten FgGT Aktivitätsassay in einer Einzelmessung mit je 15, 30  $\mu\text{M}$ , 60  $\mu\text{M}$  und zusätzlich 60  $\mu\text{M}$  ohne Enzym als Hintergrundkontrolle überprüft. Als Positivkontrolle diente der Referenzinhibitor Acivicin. Als „*primary actives*“ sollten Substanzen eingestuft werden, die bei einer Konzentration von 60  $\mu\text{M}$  eine Inhibition größer als 20 % und eine konzentrationsabhängige Hemmung der gGT Aktivität („*dose response*“) zeigen. Keine der getesteten Substanzen zeigte einen solchen inhibitorischen Effekt auf die enzymatische Aktivität der FtgGT (siehe Anhang 6.2.1). Dies kann zum einen dadurch erklärt werden, dass die verwendete Bibliothek – wie oben bereits beschrieben – zum Teil auf die spezifische Hemmung der HpgGT optimiert wurde. Zum anderen waren die verwendeten Substanzen bereits seit über 1 Jahr in DMSO gelagert und könnten in dieser Zeit auf Grund von Instabilität abgebaut worden sein. Eine HPLC- oder MS-basierte Überprüfung, ob die Substanzen noch intakt sind, konnte im Rahmen dieses Projektes nicht durchgeführt werden. Zudem hat die FtgGT möglicherweise eine andere *active site*-Struktur als die HpgGT, was zunächst durch die Ergebnisse zu verschiedenen Akzeptorsubstanzen (3.2.3) – FtgGT zeigte eine geringe Affinität zum Substrat und eine sehr geringe Rückreaktion des Substrates – vermutet wurde. Aus diesem Grund wurde im Kapitel 3.5 eine detaillierte Analyse der Kristallstruktur durchgeführt.

##### 3.4.1.2 Screening FtgGT spezifischer Substanzen

Ein weiterer Ansatz neben der Überprüfung der Priaxon Substanzbibliothek war, anhand eines *in silico* Screenings möglich Inhibitoren zu finden. Bei einem *in silico* Screening wird durch eine computergestützte Simulation mit Hilfe der bekannten Kristallstruktur des zu untersuchenden Proteins eine Substanzbibliothek – Substanzen sind kommerziell erhältlich – auf Bindungspartner des Proteins durchsucht.

Für das *in silico* Screening musste zunächst eine Kristallstrukturaufklärung der FtgGT durchgeführt werden (siehe 3.5). Aufgrund der sehr guten Auflösung der Kristallstruktur (1.9 Å), die im nächsten Kapitel 3.5 beschrieben wird, wurde ein *in silico* Screen von

kommerziell erhältlichen Substanzen von Dr. Popowicz (Helmholtz Zentrum München) durchgeführt. Dazu wurde eine Bibliothek aus 22 Millionen Substanzen computerbasiert gescreent, was 87 Treffer (Hits) ergab. Eine Auswahl von geeigneten, für die FtgGT spezifischen Testsubstanzen wurde kommerziell erworben und auf ihre inhibitorische Wirkung im etablierten FgGT Aktivitätsassay untersucht. Insgesamt wurden 27 Substanzen von den 87 Treffern in einer Einzelmessung mit je 100  $\mu\text{M}$ , 300  $\mu\text{M}$ , 500  $\mu\text{M}$  und zusätzlich 500  $\mu\text{M}$  ohne Enzym als Hintergrundkontrolle im FgGT Aktivitätsassay getestet. Keine der getesteten Substanzen zeigte eine Hemmung der enzymatische FtgGT Aktivität (siehe Anhang 6.2.2).

### 3.4.2 Test pAk als mögliche Inhibitoren

In Vorexperimenten unserer Arbeitsgruppe (MIH/TUM) wurde gezeigt, dass die Immunisierung mit HpgGT die Bildung von Antikörpern induziert, die – im Gegensatz zu den bei einer Infektion nachweisbaren Antikörpern – die Aktivität der HpgGT hemmen. Analog zu diesen Experimenten wurde hier überprüft, ob die bei der Immunisierung von Kaninchen induzierten polyklonalen Antiseren (in unserem Auftrag hergestellt von BioGenes GmbH, s. Kapitel 2.4.2) die Aktivität der FtgGT hemmen.

Die affinitätsgereinigten anti-FtgGT Kaninchenserum 24331, 24332 und ein unverwandtes Kaninchenserum (pAk Kontrolle, pAk wurde nach dem selben Protokoll wie die FtgGT Kaninchenserum von der Firma BioGenes hergestellt) wurden für 2x 1 h und 1x über Nacht bei 4 °C gegen 1x PBS dialysiert, um mögliche Restverunreinigungen mit einzelnen (eventuell inhibitorischen) Aminosäuren zu reduzieren. Im etablierten FgGT Aktivitätsassay wurden diese in einer Dreifach-Messung mit je 2,5  $\mu\text{l}$ , 5  $\mu\text{l}$ , 10  $\mu\text{l}$  und 20  $\mu\text{l}$  getestet. Für die Inhibitor-Kontrolle wurde 100  $\mu\text{M}$  Acivicin und für die PBS-Kontrolle 18 nM FtgGT mit den jeweiligen Mengen an 1x PBS verwendet.

Die Kaninchenserum zeigten eine konzentrationsabhängige inhibitorische Wirkung auf die FtgGT, die in drei unabhängigen Experimenten gezeigt wurde (Abbildung 26). Das affinitätsgereinigte Kontrollkaninchenserum zeigte keine Hemmung der FtgGT (Abbildung 27). In Abbildung 26 und Abbildung 27 wurde die relative Aktivität der Endpunkte dargestellt. Analog dazu sind die Ergebnisse für die Anfangsgeschwindigkeit ( $V_0$ ). Somit handelt es sich um einen spezifischen hemmenden Effekt der FtgGT pAk auf die enzymatische FtgGT Aktivität.

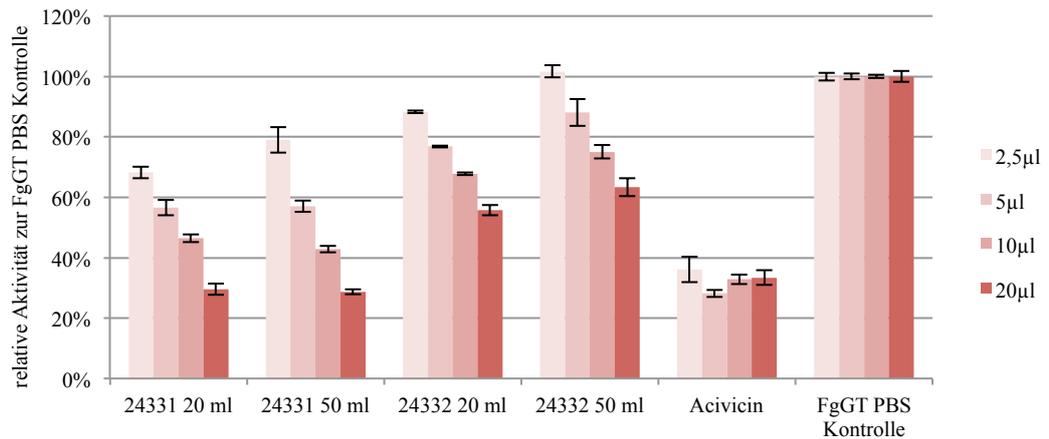


Abbildung 26 Vergleich der inhibitorischen Wirkung der Kaninchenseren 24331 und 24332 relativ zur PBS Kontrolle (ohne Serumzugabe).

Es wurden von beiden Kaninchenseren beide Aliquots (je 20 ml und 50 ml) getestet. 100 µM Acivicin wurde als Inhibitorkontrolle verwendet. Dargestellt sind die Mittelwerte ± Standardabweichung. Assaybedingungen: 18 nM FtgGT, 20 mM GlyGly, 250 µM L-gGpNA, 0,1 % BSA, 100 mM Tris pH 8,0, Endpunktmessung in drei unabhängigen Triplikatexperimenten.

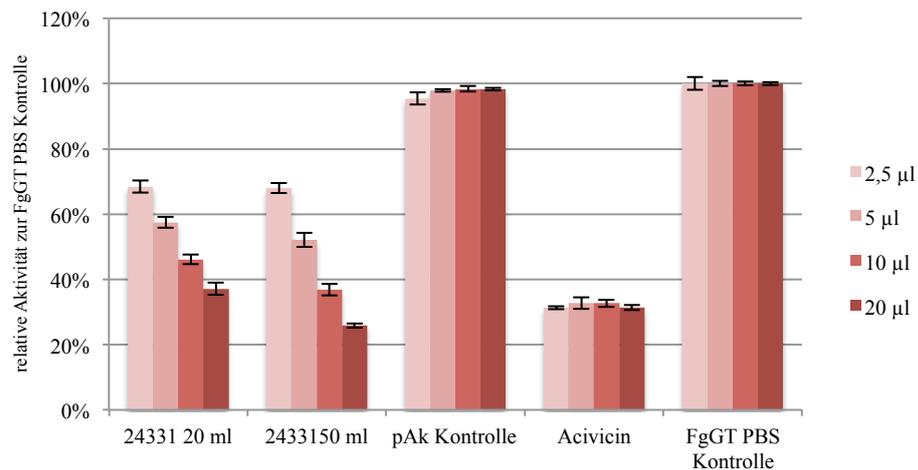


Abbildung 27 Relativer Vergleich der Kaninchenseren als mögliche FtgGT Inhibitoren.

FtgGT mit PBS Zugabe ohne Ak (Positiv-Kontrolle) wurde auf 100 % gesetzt. pAk Kontrolle: Kaninchenserum gegen ein unverwandtes Protein, welches nach demselben Protokoll wie die FtgGT Kaninchenseren von BioGenes GmbH hergestellt wurde. Getestet wurden beide Aliquots (20 ml und 50 ml Aliquot) des pAk 24331 im FtgGT Aktivitätsassay. 100 µM Acivicin wurde als Inhibitorkontrolle verwendet. Dargestellt sind die Mittelwerte ± Standardabweichung. Assaybedingungen: 18 nM FtgGT, 20 mM GlyGly, 250 µM L-gGpNA, 0,1 % BSA, 100 mM Tris pH 8,0, Endpunktmessung (drei unabhängige Triplikatmessungen).

### 3.5 Röntgenkristallstruktur der *Francisella tularensis* subsp. *holarctica* gGT

Für die nähere Charakterisierung der FtgGT wurde die Röntgenkristallstruktur analysiert. Zudem wurde die Kristallstruktur für andere Verfahren (3.4.1.2) zur Suche von wirksamen Inhibitoren benötigt, nachdem das Screening der Priaxon Substanzbibliothek (3.4.1.1) keinen wirksamen Inhibitor lieferte.

#### 3.5.1 Aufbereitung der FtgGT für die Röntgenkristall-Strukturanalyse

Für die Kristallisation wurde ein höherer Reinheitsgrad der bisher gereinigten FtgGT benötigt. Dazu wurde die bisher gereinigte FtgGT in 5 mM Tris, 140 mM NaCl pH 8,0 umgepuffert und erfolgreich eine Größenausschlusschromatographie (SEC, *Size Exclusion Chromatography*; 2.5.3.4) durchgeführt. Die zusammengeführten Fraktionen C10-D2 (Abbildung 28) wurden auf ein Volumen von 500 µl mit der Konzentration 7,87 mg/ml, eingengt und an das Helmholtz Zentrum München zur Kristallisation übergeben.

Zusätzlich wurden die Randfraktionen in der SDS-PAGE und FgGT Aktivitätsassay überprüft. Auf dem gefärbten SDS-Gel, waren für die Randfraktion des Hauptpeaks klare und starke Banden für die große und kleine Untereinheit der rekombinanten FtgGT zu sehen (Abbildung 29). Eine schwache Bande des Precursor (unprozessierten FtgGT Form) war bei ca. 60 kDa zu erkennen. Bei der Bande bei ca. 75 kDa handelte es sich vermutlich, um eine zu vernachlässigende Verunreinigung. Aus früheren Westernblot Experimenten mit anti 6x-His Antikörpern (3.1.2.2 Abbildung 12) konnte geschlossen werden, dass es sich bei der ca. 75 kDa Bande nicht um den Precursor mit dem SUMO-Tag handelte (Reinigung der rekombinanten FgGT erfolgte mit SUMO-Tag). Im Aktivitätsassay war eindeutig eine enzymatische Aktivität der rekombinanten FtgGT nach SEC messbar (Abbildung 29). Diese enzymatische Aktivität der SEC Randfraktionen wurde mit der Aktivität des Ausgangsmaterials für die SEC verglichen. Der leichte Unterschied in der Aktivität ließ sich dadurch erklären, dass für die Bestimmung der Proteinkonzentration vor und nach der SEC unterschiedliche Verfahren verwendet wurden.

Die zusammengeführten Fraktionen (C10-D2) für die Kristallisation hatten einen Reinheitsgrad von größer als 90 %.

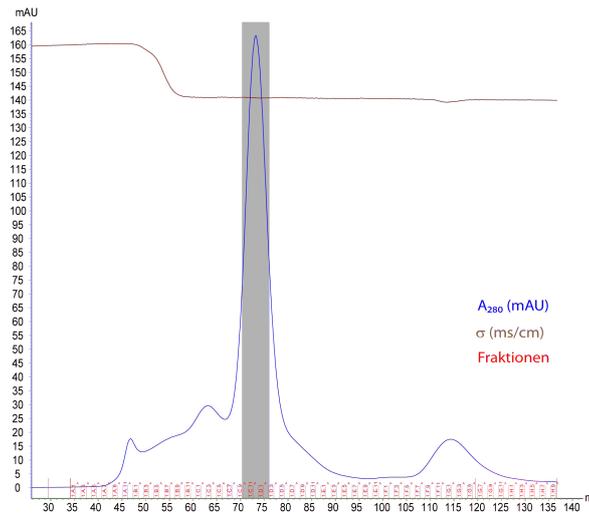


Abbildung 28 Chromatogramm der Ausschlusschromatographie (SEC). Die Fraktionen C10-D2 (grau hinterlegt) wurden für die Kristallisation verwendet.

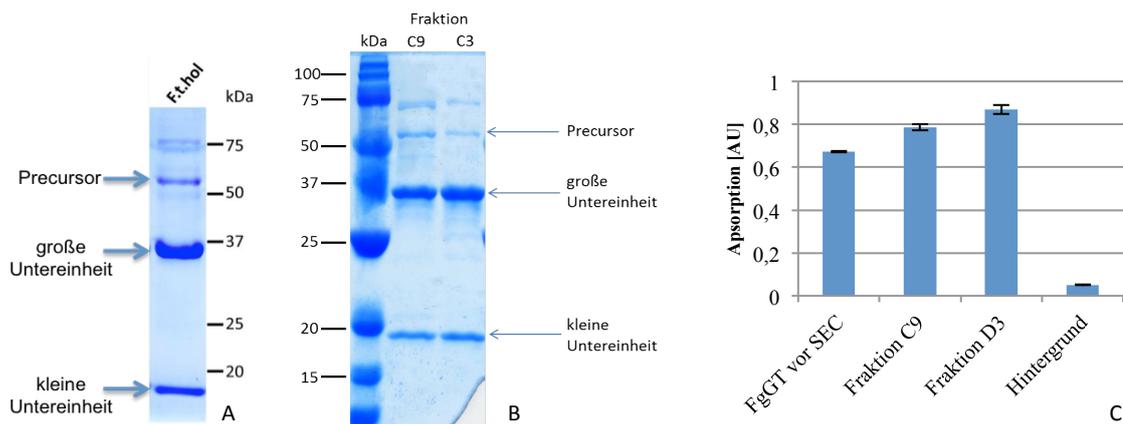


Abbildung 29 SDS-PAGE und FgGT Aktivitätsassay der SEC Fraktionen.

A: SDS-PAGE der FtgGT vor der SEC vs. B: SEC-Fraktionen (Randfraktionen C9 und D3, Fraktionen C10-D2 für Kristallisierung verwendet). FtgGT: Precursor bei 60 kDa, große UE bei 40 kDa und kleine UE bei 20 kDa. C: FgGT Aktivitätsassay der FtgGT vor der SEC vs. SEC-Fraktionen (Randfraktionen C9 und D3). Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung. Assaybedingungen: 18 nM FtgGT, 20 mM GlyGly, 0,1 % BSA, 250  $\mu$ M L-gPpNA, 100 mM Tris pH 8,0, 1 h Inkubation bei 37 °C, Endpunktmessung (drei unabhängige Triplikatmessungen).

### 3.5.2 FtgGT Kristallstruktur und Vergleich zur *H. pylori* gGT

Die Röntgenkristallstrukturanalyse wurde in wissenschaftlicher Zusammenarbeit von Dr. Popowicz (Helmholtz Zentrum München) durchgeführt.

Die FtgGT kristallisierte in der Raumgruppe P1 und die Einheitszelle enthielt zwei ternäre Komplexe. Mit Hilfe des molekularem Ersatzes (*molecular replacement*), wozu die bereits bekannte *Helicobacter pylori* gGT Kristallstruktur (PDB:2NQQ) diente, und dem Programm Phaser wurde die Struktur der FtgGT gelöst. Der initiale R-Faktor (*reliability factor*) betrug 0,504. Der R-Faktor ist ein quantitatives Maß für die Qualität und

Verlässlichkeit der Kristallstrukturbestimmung. Dabei beschreibt der R-Faktor die Abweichung zwischen gemessenen und berechneten Reflexen. Je kleiner der R-Faktor ist, desto besser ist das Modell. Anschließend wurde das Modell der FtgGT mittels Coot (manueller Modellbau) gebaut. Die Verfeinerung erfolgte in mehreren Zyklen der Modellbildung mittels Coot und nach der *maximum-likelihood* Verfeinerung mittels REFMAC. Die Parameter und Statistiken der Datensammlung und der Verfeinerung sind in Tabelle 13 zusammengefasst. In dieser Tabelle ist auch der  $R_{\text{free}}$  zum  $R_{\text{work}}$  angegeben. Wie bereits oben erwähnt beschreibt der R-Faktor die Korrektheit eines Modells. Der freie R-Faktor wird für die Beurteilung einer möglichen Übermodellierung (*overmodelling*) herangezogen. Dieser wird aus einem zufällig ausgewählten Teil der Daten (5 % der Reflexe) berechnet, die nicht in die Verfeinerung eingeflossen sind (Brunger 1992).  $R_{\text{work}}$  hingegen wird aus den Daten, die für die Verfeinerung verwendet wurden, ermittelt.  $R_{\text{free}}$  ist in der Regel größer als  $R_{\text{work}}$ , jedoch sollten die beiden statistischen Größen sich ähneln – wie es hier der Fall ist. Wäre es nicht der Fall, wäre dies ein Indiz dafür, dass das Modell überparametriert (*over-parameterized*) wurde, d. h. dass die Varianzkomponenten nicht eindeutig geschätzt werden konnten – damit wird eine Genauigkeit vorgetäuscht, die in Wahrheit nicht existiert. Sowohl die  $R_{\text{free}}$  und  $R_{\text{work}}$  Werte als auch der B-Faktor Wert entsprechen den bisher publizierten Werte für gGTs anderer Spezies. Der B-Faktor beschreibt das Maß der Abweichung der Elektronendichte. Ein weiteres Qualitätsmerkmal für das Modell ist, dass die Struktur nur geringe Abweichungen von Bindungslängen und Bindungswinkel zeigt. Das Ergebnis dieser guten Werte (R-Faktor, B-Faktor und R. m. s. Abweichungen) ist auf die hohe Auflösung von 1,9 Å zurückzuführen.

Die Analyse der kristallisierten FtgGT im Vergleich zur *Helicobacter pylori* gGT (HpgGT) zeigte, dass sie in ihrer Proteinrückgrat-Faltung (*Backbone*) identisch sind (Abbildung 30). Auch der Vergleich der aktiven Zentren (*active site*- Struktur) mit Hilfe des Referenzinhibitors Acivicin zeigte keine großen Faltungsunterschiede (Abbildung 30), wobei nur die HpgGT mit dem Referenzinhibitor ko-kristallisiert wurde. Die Unterschiede zwischen FtgGT und HpgGT liegen in den Seitenkettenstrukturen des aktiven Zentrums, wie die divergenten Ergebnisse im Aktivitätsassay mit unterschiedlichen Substraten und verschiedenen Akzeptormolekülen (3.2.3) nahelegen. Vergleicht man die Bindungsstellen im aktiven Zentrum der FtgGT und HpgGT, ist klar zu erkennen, dass die Hauptkette praktisch identisch ist, aber die Organisation der Seitenkettenstruktur des aktiven Zentrums signifikant unterschiedlich ist (Abbildung 30.).

Tabelle 13 Parameter und Statistiken der Datensammlung und Verfeinerung

	FtgGT
<b>Datensatz (<i>Data collection</i>)</b>	
Raumgruppe ( <i>Space group</i> )	P1
Zellparameter ( <i>Cell dimensions</i> )	
<i>a, b, c</i> [Å]	62,7; 99,4; 125,9
$\alpha, \beta, \gamma$	94,6; 90,0; 101,6
Auflösungsbereich ( <i>Resolution</i> ) [Å]	50-1,9 (1,95-1,9) *
$R_{\text{meas}}$	8,7 (74,8)
$I/\sigma I$	10,5 (2,16)
Vollständigkeit ( <i>Completeness</i> ) [%]	93,7 (93,6)
Redundanz ( <i>Redundancy</i> )	3,7 (3,7)
<b>Verfeinerung (<i>Refinement</i>)</b>	
Auflösungsbereich ( <i>Resolution</i> ) [Å]	20-1,9
Zahl der Reflexe ( <i>No. reflections</i> )	208 434
$R_{\text{work}}/ R_{\text{free}}$	16,4/20,2
Anzahl der Atome ( <i>No. atoms</i> )	
Protein	9854
Ligand/Ion	-
Wasser	Kein Wasserbildung
B-Faktoren ( <i>B-factors</i> )	
Protein	36,5
Ligand/ion	-
Wasser	-
R.m.s. Abweichungen ( <i>R.m.s deviations</i> )	
Bindungslänge ( <i>Bond lengths</i> ) [Å]	0,016
Bindungswinkel ( <i>Bond angles</i> ) [°]	1,0

\*Die höchste Auflösungsschale ist in Klammern angegeben.

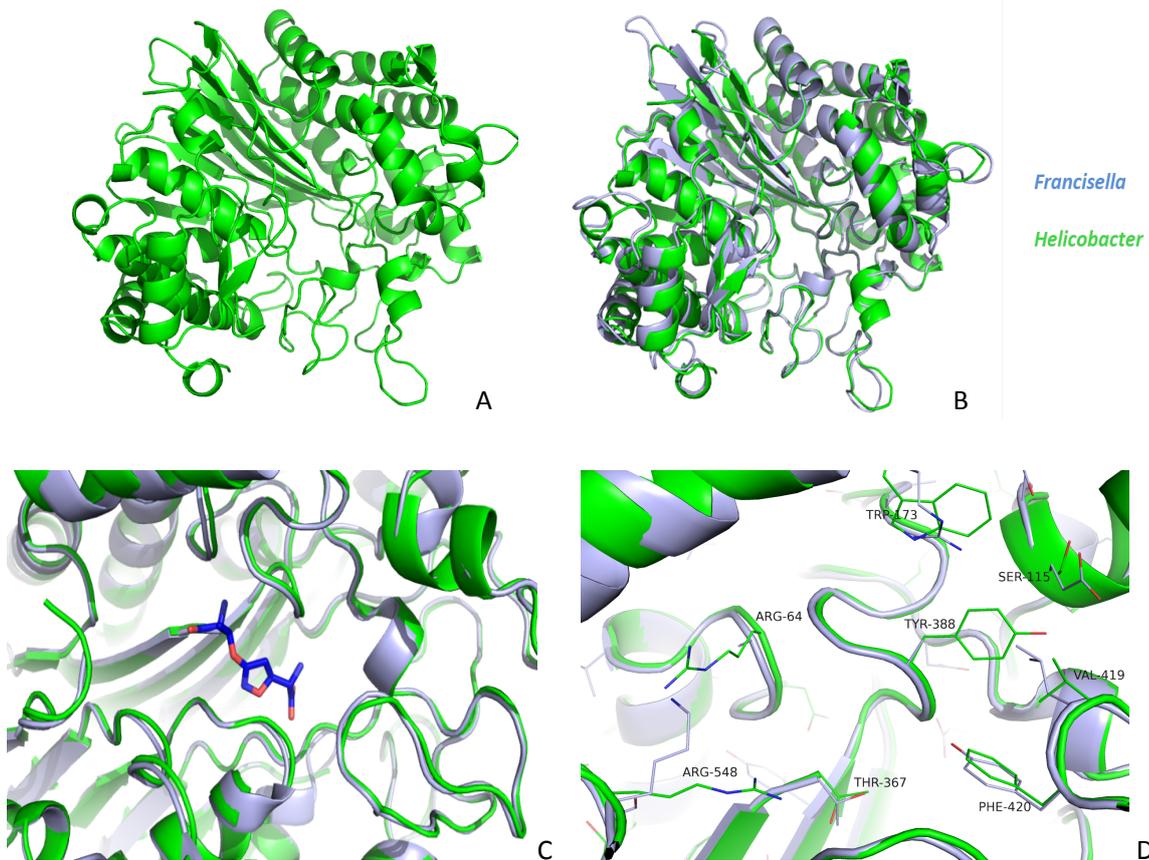


Abbildung 30 Kristallstrukturvergleich der *Francisella tularensis subsp. holarctica* gGT vs. *Helicobacter pylori* gGT.

A: Übersicht der FtgGT Apo-Struktur B: Überlagerung des Proteinrückgrats der FtgGT- und HpgGT-Strukturen. Die Proteinrückgratfaltung der beiden gGTs ist identisch. C: Überlagerung der Struktur des aktiven Zentrum von FgGT und HpgGT, wobei die Struktur des aktiven Zentrum hier mit dem Referenzinhibitor Acivicin nicht ko-kristallisiert, sondern modelliert wurde. Während die Hauptkette der beiden gGTs im aktiven Zentrum identisch ist, ist in D ein signifikanter Unterschied in der Seitenkettenorganisation zu erkennen. Die Analyse der Kristallstruktur wurde von Dr. Popowicz (Helmholtz Zentrum München) durchgeführt.

### 3.6 Reinigung endogener *Francisella tularensis subsp. holarctica* gGT

Die endogene *Francisella tularensis subsp. holarctica* gGT sollte aus Bakterienlysat als Referenz zur rekombinanten FtgGT gewonnen werden. Zusätzlich sollte das gereinigte endogene Enzym in der MALDI-MS (*Matrix assisted laser desorption/ionization* Massenspektroskopie) identifiziert und die Spaltstelle des Signalpeptids analysiert werden.

Die Reinigung der endogenen FgGT *holarctica* (FtgGT) aus dem attenuierten Stamm *Francisella tularensis subsp. holarctica* LVS wurde in zwei Schritten durchgeführt. Zunächst wurden eine Anionenaustauschchromatographie (AEC) und anschließend eine Hydrophobe Interaktionschromatographie (HIC) durchgeführt. Die Fraktionen jedes

Reinigungsschritten wurden im Aktivitätsassay analysiert und – falls eine gGT Aktivität nachgewiesen wurde – zusätzlich auf dem SDS-Gel analysiert.

Nach dem ersten Reinigungsschritt wurden die Fraktionen A9-B6 (Abbildung 31), die im FgGT-Aktivitätsassay die höchste enzymatische Aktivität zeigten (Abbildung 32), vereint. Diese Fraktionen wurden im Vergleich zu den Durchfluss- und Wasch-Fraktionen, Randfraktionen und Aufschlussproben in der SDS-PAGE analysiert. In der SDS-PAGE war keine eindeutige Aussage über prominente Banden, bei denen es sich um die FtgGT handeln könnte, möglich (Abbildung 33). In den Fraktionen „B6“, „A9 B4-B5“ und „A9-B6“ schienen die Precursor Bande bei ca. 60 kDa, die große Untereinheit (40 kDa) knapp unterhalb der 37 kDa und die kleine Untereinheit (20 kDa) unterhalb von 20 kDa in der SDS-PAGE erkennbar zu sein (Abbildung 33).

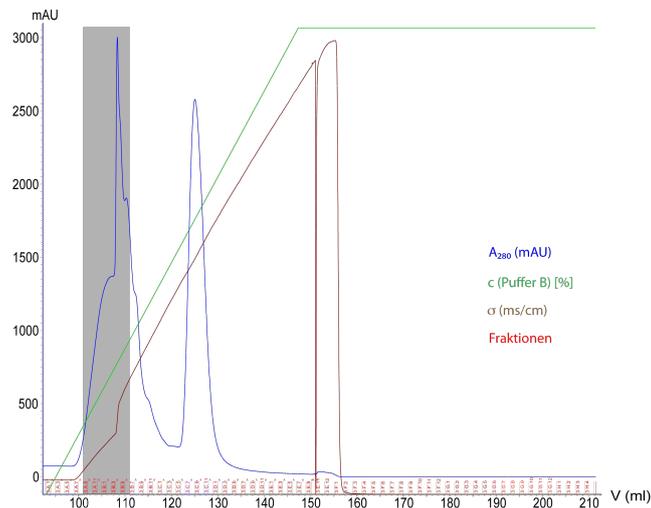


Abbildung 31 Chromatogramm der Anionenaustausch-Chromatographie (AEC) der endogenen FtgGT. Die eluierten Fraktionen A9-B6 (in rot eingerahmt) wurden für den nächsten Reinigungsschritt verwendet.

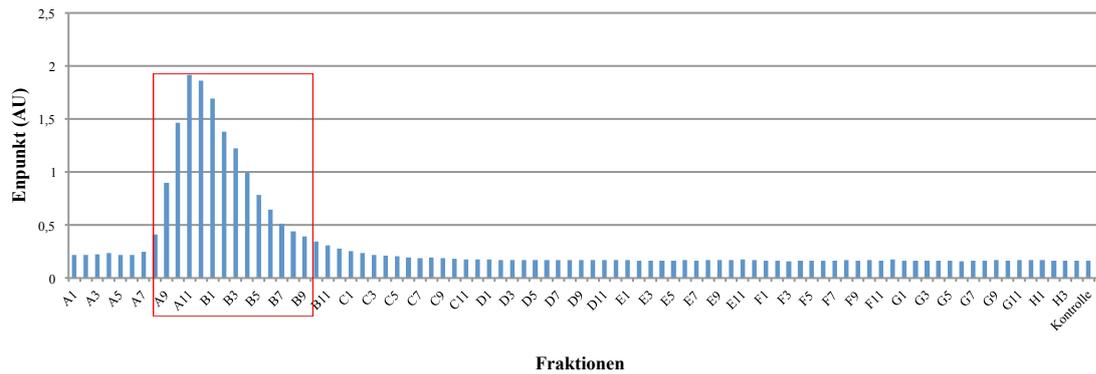


Abbildung 32 FgGT Aktivitätsassay der eluierten AEC-Fraktionen.

Fraktionen A9-B6 zeigten die höchste enzymatische Aktivität, wurden vereint und für den nächsten Reinigungsschritt verwendet. AU= Absorptionseinheit. Assaybedingungen: 10 µl Fraktion, 20 mM GlyGly, 0,1 % BSA, 2 mM L-gGpNA, 100 mM Tris pH 8,0.

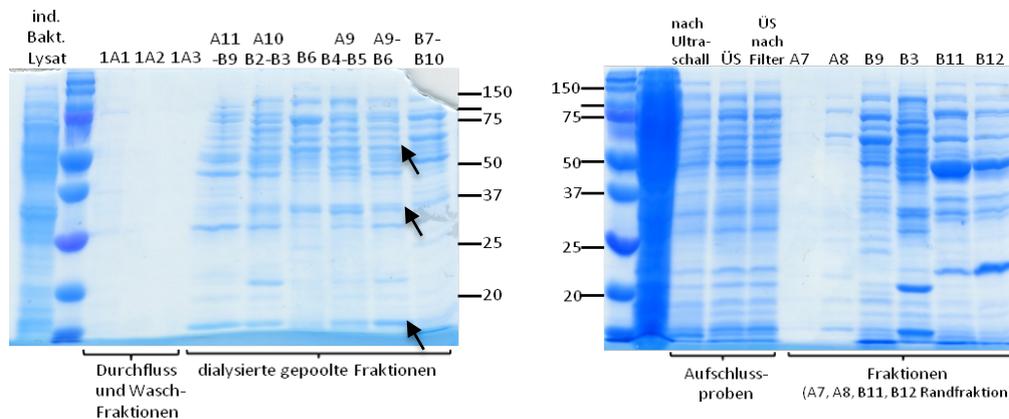


Abbildung 33 Coomassie gefärbte SDS-PAGE der AEC- Fraktionen (endogene FtgGT).

FtgGT: 60 kDa Precursor, 40 kDa große Untereinheit (knapp unterhalb der 37 kDa) und 20 kDa kleine Untereinheit (unterhalb der 20 kDa). Proben des Zellaufschlusses: nach Ultraschall-Behandlung, Überstand nach dem Zentrifugieren (ÜS) und Überstand nach dem Filtrieren. Die vereinten Fraktionen A9-B6 (mit der höchsten FtgGT Aktivität, s. Abbildung 32) wurde für die HIC verwendet.

Vor dem zweiten Reinigungsschritt wurden die vereinten Fraktionen A9-B6 gegen Hochsalzpuffer dialysiert, um die hydrophobe Oberfläche des Proteins freizusetzen und somit die Adsorption an die Säulenmatrix der HIC zu erleichtern. Nach diesem 2. Schritt zeigten die Fraktionen C8-C10 (Abbildung 34) die höchste enzymatische Aktivität im FgGT Aktivitätsassay (Abbildung 35). Die Westernblot Analyse zeigte, dass die Banden der endogenen FtgGT und der rekombinanten FtgGT sowohl mit dem polyklonalem Antikörper (Kaninchen) als auch monoklonalem Antikörper (Ratte) auf derselben Höhe detektiert (Abbildung 36) wurden und daher von sehr schwach angereicherten Proteinen stammten. Da die geringe Ausbeute an endogener FtgGT ihre weitere proteinchemische Analyse nicht zulässt, wurde auf weitere Reinigungsschritte verzichtet.

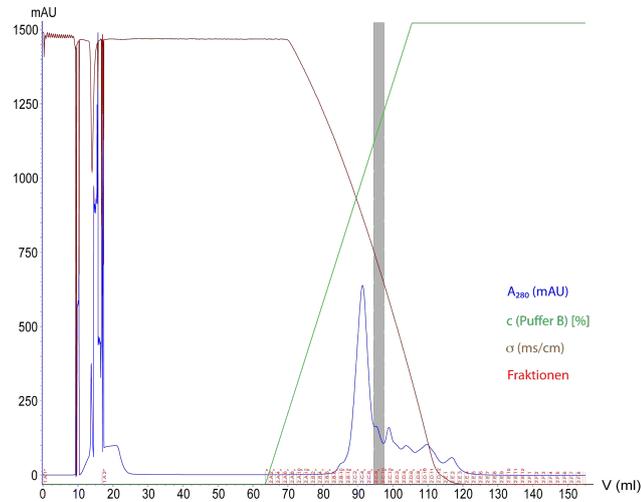


Abbildung 34 Chromatogramm der Hydrophoben Interaktionschromatographie (HIC) der endogenen FtgGT. In den Fraktionen C8-C10 (grau hinterlegt) lag die endogene FtgGT angereichert vor.

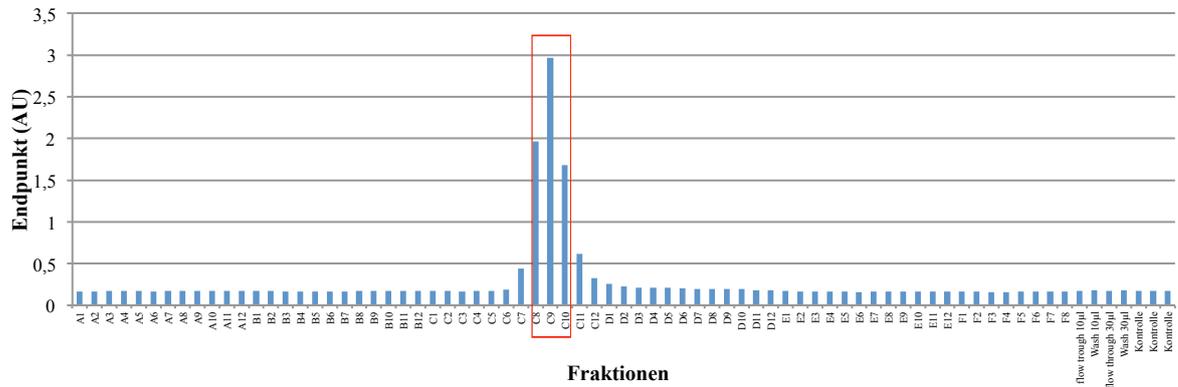


Abbildung 35 FgGT Aktivitätsassay der eluierten HIC-Fraktionen. Fraktionen C8-C10 (rot eingerahmt) zeigten die höchste enzymatische Aktivität. AU= Absorptionseinheit. Assaybedingungen: 10 µl Fraktion, 20 mM GlyGly, 0,1 % BSA, 2 mM L-gGpNA, 100 mM Tris pH 8,0.

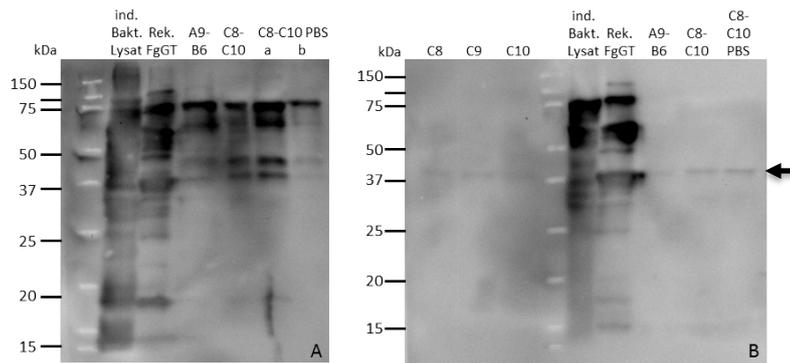


Abbildung 36 Detektion der angereicherten endogenen FtgGT (HIC-Fraktionen) im Vergleich zur rekombinant gereinigten FtgGT im Westernblot (WB).

A: WB mit pAk FtgGT (Kaninchenserum) als primären AK. Im Vergleich zur rekombinanten FtgGT ist ein vergleichbares Bandenmuster in den Fraktionen erkennbar. B: WB mit mAk 16B7 (monoklonaler Ratten-Hybridomaüberstand, s. Kapitel 3.7.1.) als primärem AK. Große UE Bande der endogenen FtgGT (ca. bei 40 kDa, Pfeil) in den Fraktionen schwach detektierbar.

### 3.7 Lokalisation der endogenen *Francisella tularensis* subsp. *holarctica* gGT

#### 3.7.1 Antikörper gegen die *Francisella tularensis* subsp. *holarctica* gGT

Die Lokalisation der endogenen FtgGT sollte im Westernblot mit verschiedenen *Francisella* Zellfraktionen untersucht werden. Dadurch sollte festgestellt werden in welchem Zellkompartiment die endogene FtgGT lokalisiert ist. Für diese Versuche wurde ein Antikörper gegen FtgGT benötigt, der dieses Protein möglichst sensitiv und spezifisch im Westernblot nachweisen kann.

##### 3.7.1.1 Monoklonale Antikörper

Zur Lokalisation der FtgGT über Immunoblot wurden zunächst monoklonale Antikörper in der Maus und der Ratte gegen die gereinigte His-getaggte FtgGT (dieses rekombinante Protein wurde bereits vor Beginn dieser Arbeit von Dr. Bolz hergestellt, die kodierende Sequenz ist mit der in dieser Arbeit beschriebenen FtgGT identisch) in Zusammenarbeit mit Frau Prof. Kremmer (Helmholtz Zentrum München) generiert. Insgesamt wurden 55 Ratten- und 13 Maus-Hybridomaüberstände getestet. Die 13 verschiedenen Maus-Hybridomaüberstände wurden gegen rekombinante His-getaggte FtgGT und überexprimierte FtgGT in *E. coli* Gesamtlisat im Westernblot getestet. Dabei stellte sich heraus, dass drei der getesteten Maus-Hybridomaüberstände (10M, 11M und 12M) für eine weitere Validierung geeignet waren, da diese sowohl für den Precursor (60 kDa) als auch für die große Untereinheit (40 kDa) der His-getaggen FtgGT ein starkes Signal im Westernblot zeigten (Abbildung 37). Die kleine Untereinheit (20 kDa) der His-getaggen FtgGT wurde von keinem Hybridomaüberstand erkannt. Um auszuschließen, dass die

Maus-Hybridomaüberstände womöglich den His-Tag erkennen, wurde der 10M Hybridomaüberstand im Westernblot gegen die rekombinante FtgGT (His-Tag frei, die im Rahmen dieser Arbeit gereinigt wurde) getestet. Das vorherige Ergebnis wurde bestätigt, sowohl der Precursor als auch die große Untereinheit wurden erkannt (Abbildung 37).

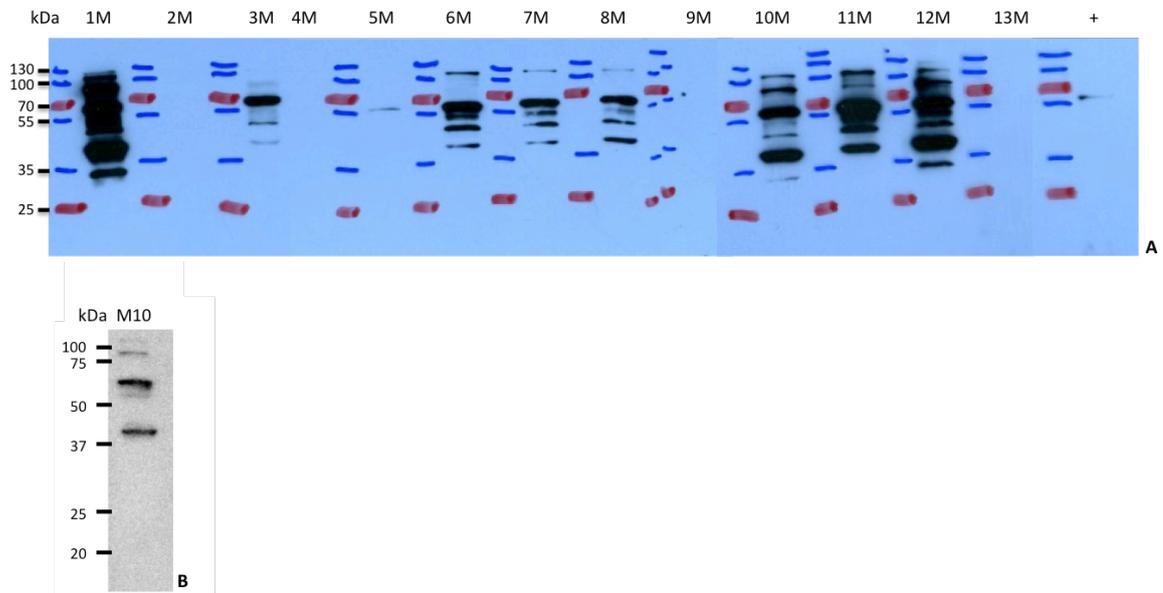


Abbildung 37 Maus-Hybridomaüberstände gegen rekombinante His-getagte FtgGT im Westernblot.

A Getestet wurden die Hybridomaüberstände in der Verdünnung 1:10 gegen 0,5 µg rekombinante His-getagte FtgGT. In B wurde als Kontrolle Klon M10 gegen 0,5 µg FtgGT (ohne His-SUMO-Tag) getestet, um auszuschließen dass in A der His-Tag erkannt wurde. Precursor bei 60 kDa, große Untereinheit bei 40 kDa wurden erkannt. Kleine Untereinheit bei 20 kDa wurde nicht erkannt. Westernblot Bedingungen: Blocken in 5 % Magermilch 30 min bei RT, 1. Ak über Nacht bei 4 °C, 2. Ak 1 h bei RT, Waschen mit 1xTBS/T (je 3x 10 min).

Als nächster Schritt wurden diese drei Maus-Hybridomaüberstände (M10, 11M und 12M) in verschiedenen Verdünnungen mit überexprimierter FtgGT in *E. coli* Gesamtlysat im Westernblot getestet. 12M zeigte ein sehr starkes Signal, wohingegen für die Überstände 10M und 11M je der Precursor und die große Untereinheit der FtgGT wie in der Positiv-Kontrolle (induziertes Bakterienlysat gegen  $\alpha$ -His) zu sehen war (Abbildung 38).

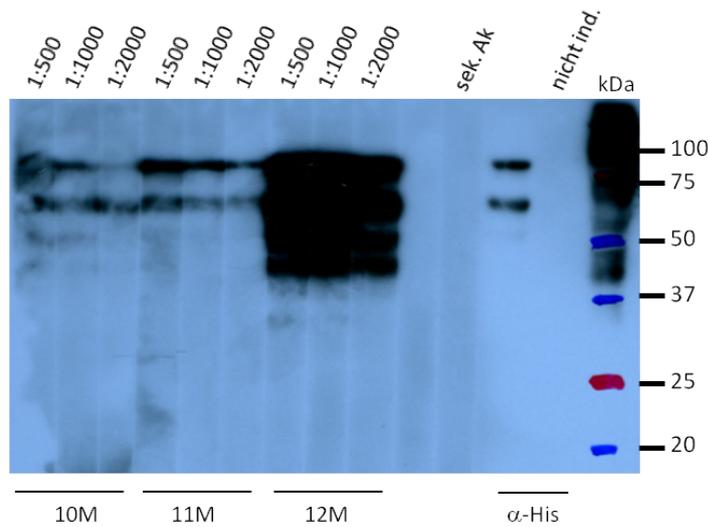


Abbildung 38 Hybridomaüberstände in verschiedenen Verdünnungen gegen Gesamtlysate von FtgGT überexprimierenden *E. coli*.

Getestet wurden Maus-Hybridomaüberstände 10M, 11M und 12M in den Verdünnungen 1:500, 1:1000 und 1:2000. 73 kDa Precursor + His-SUMO-Tag= zwischen 75-100 kDa, 53 kDa große Untereinheit + His-SUMO-Tag= zwischen 50-75 kDa, 20 kDa kleine Untereinheit= hier nicht zu sehen. Kontrollen: sek. Ak= Inkubation nur mit sekundären Antikörper, induziertes Bakterienlysate (*E. coli* Gesamtlysate mit überexprimierter FtgGT) und nicht ind.= nicht induziertes Bakterienlysate (*E. coli* Gesamtlysate ohne überexprimierter FtgGT) gegen α-His. Westernblot Bedingungen: Blocken in 5 % Magermilch 30 min bei RT, 1. Ak 1,5 h bei RT, 2. Ak 1 h bei RT, Waschen mit 1xTBS/T (je 3x 10 min).

Die 55 zur Verfügung gestellten Überstände von Rattenhybridoma Zelllinien wurden gegen gereinigte rekombinante FtgGT (0,5 µg) getestet. Für die Mehrheit der getesteten Überstände waren starke Banden für die 1:10 Verdünnung zu sehen (Abbildung 39), die in den Verdünnungen 1:100 und 1:1000 (deutlich) abnahmen (Abbildung 40).

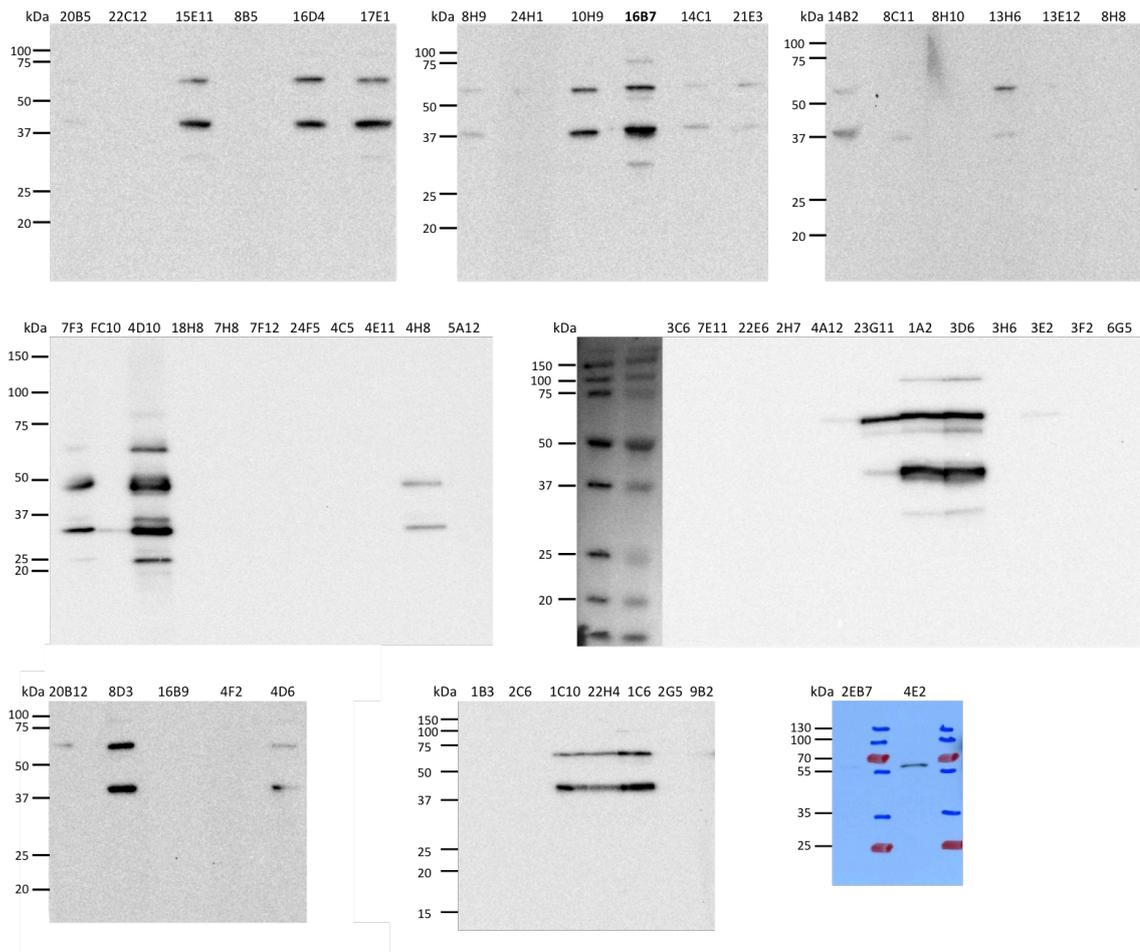


Abbildung 39 Ratten-Hybridomaüberstände gegen rekombinante FtgGT im Westernblot. Getestet wurden die Hybridomaüberstände in der Verdünnung 1:10 gegen 0,5 µg gereinigte rekombinante FtgGT – Precursor bei 60 kDa, große Untereinheit bei 40 kDa wurden erkannt. Kleine Untereinheit bei 20 kDa wurde nicht erkannt. Klon 2EB7 und Klon 4E2 wurden gegen rekombinante His-getagte FtgGT getestet – für Klon 4E2 Precursor (60 kDa) erkannt. Westernblot Bedingungen: Blocken in 5 % Magermilch 30 min bei RT, 1. Ak über Nacht bei 4 °C, 2. Ak 1 h bei RT, Waschen mit 1xTBS/T (je 3x 10 min).

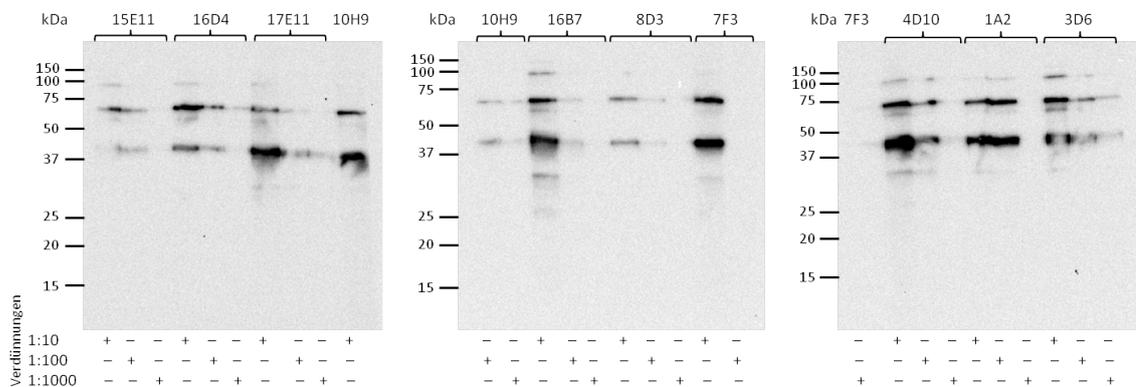


Abbildung 40 Ratten-Hybridomaüberstände in verschiedenen Verdünnungen gegen rekombinante FtgGT im Westernblot. Getestet wurden Hybridomaüberstände in den Verdünnungen 1:10, 1:100 und 1:1000 gegen 0,5 µg gereinigte rekombinante FtgGT. FtgGT – Precursor bei 60 kDa, große Untereinheit bei 40 kDa wurden erkannt. Kleine Untereinheit bei 20 kDa wurde nicht erkannt. Westernblot Bedingungen: Blocken in 5 % Magermilch 30 min bei RT, 1. Ak über Nacht bei 4 °C, 2. Ak 1 h bei RT, Waschen mit 1xTBS/T (je 3x 10 min).

Die Ratten-Hybridomaüberstände wurden nicht gegen Gesamtlysate von FtgGT exprimierenden *E. coli* Zellen (wie mit den Maus-Hybridomaüberständen) getestet, da ein Ratten-Hybridomaüberstand bereits (in einem Parallelversuch) ein positives Signal der endogenen FtgGT lieferte. Der Klon 16B7 erkannte als Einziger eindeutig zwei Banden im Westernblot, zum einen den Precursor bei ca. 60 kDa (schwaches Signal) und zum anderen die große Untereinheit bei ca. 40 kDa (starkes Signal) der endogenen FtgGT (Abbildung 41). In diesem Versuch wurden insgesamt drei Maus- und drei Ratten-Hybridomaüberstände gegen Gesamtlysate des attenuierten Stammes *F. t. subsp. holarctica* LVS, für die Detektion der endogenen FtgGT getestet. Der Ratten-Hybridomaüberstand 16B7 stand nur für eine begrenzte Anzahl an Experimenten zur Verfügung, da der entsprechende Klon nicht kultiviert und somit die Antikörper nicht nachgeliefert werden konnten.

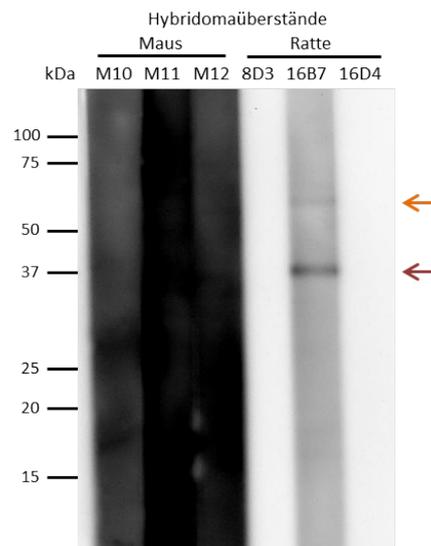


Abbildung 41 Maus- und Ratten-Hybridomaüberstände im Westernblot gegen Gesamtlysate des attenuierten *F. t. holarctica* LVS Stammes.

FtgGT: Precursor= 60 kDa (orangener Pfeil), große Untereinheit= 40 kDa (brauner Pfeil), kleine Untereinheit= 20 kDa (mit dem monoklonalen 16B7 Antikörper nicht detektierbar); Maushybridomaüberstände: M10, M11 und M12; Rattenhybridomaüberstände: 8D3, 16B7 und 16D4. Westernblot Bedingungen: Blocken 5 % Magermilch 30 min bei RT, 1. Ak 1,5 h bei RT, 2. Ak 1 h bei RT, Waschen mit 1x TBS/T (je 3x 10 min).

### 3.7.1.2 Polyklonale Antikörper

Parallel zu den monoklonalen Antikörpern sollten polyklonale Antikörper generiert werden, um die endogene FtgGT zu lokalisieren. Somit sollte die Wahrscheinlichkeit erhöht werden einen Antikörper mit ausreichender Sensitivität zu erhalten.

Für die Herstellung der polyklonalen Antikörper wurde als Auftragsarbeit von der Firma BioGenes in Berlin zwei polyklonale Antiseren gegen FtgGT in zwei Kaninchen generiert. Die dafür benötigte Menge an FtgGT (6,5 mg) wurde als Antigen für die Immunisierung und anschließender Affinitätsreinigung der FtgGT spezifischen IgGs bereitgestellt. Diese affinitätsgereinigten Kaninchenserum wurden im Westernblot gegen gereinigte FtgGT und *E. coli* Lysat mit überexprimierter FtgGT in verschiedenen Verdünnungen getestet. Beide Antiseren erkannten die gereinigte FtgGT (Abbildung 42 und Abbildung 43). Im Westernblot gegen *E. coli* Lysat mit überexprimierter FtgGT wurde allerdings kein eindeutiges Signal detektiert. Aus diesem Grund wurde Biogenes mit zwei weiteren Boostinjektionen und anschließender Anreicherung der spezifischen Antikörper über eine Affinitätssäule beauftragt. Die nach Ausbluten der Kaninchen gegen die FtgGT affinitätsgereinigten Antiseren wurden in verschiedenen Verdünnungen im Vergleich zu dem Ratten-Hybridomaüberstand 16B7 im Westernblot gegen *E. coli* Lysat mit überexprimierter FtgGT getestet. Beide Kaninchenserum zeigten im Gegensatz zum Ratten-Hybridomaüberstand unspezifische Banden (Abbildung 44). Auch nach der Anreicherung zeigten die Antiseren keine ausreichende Spezifität. In den weiteren Experimenten wurde daher der monoklonale Antikörper 16B7 verwendet.

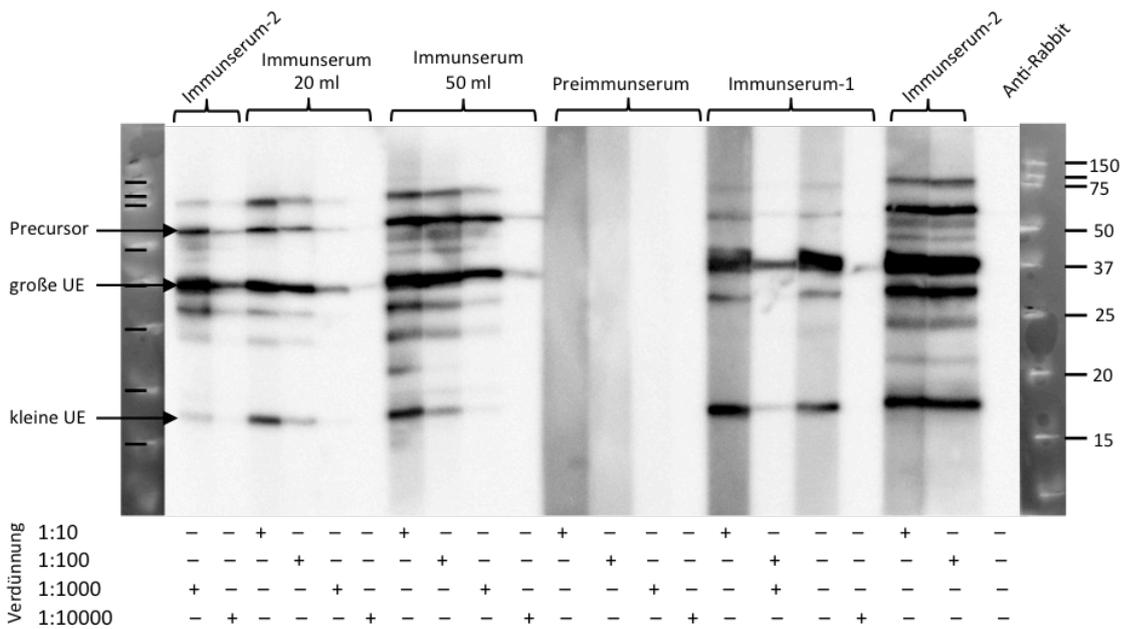


Abbildung 42 Polyklonales Kaninchenserum 24431 gegen rekombinante FtgGT im Westernblot. FtgGT: 60 kDa Precursor, große Untereinheit (UE)= 40 kDa große Untereinheit und kleine Untereinheit (UE)= 20 kDa kleine Untereinheit. Immunserum 1 und 2= affinitätsgereinigte Antiseren Aliquot 1 und 2, Immunserum 20 ml und 50 ml= nach Anreicherung der Antikörper und Affinitätsreinigung wurde die selbe Probe in Aliquot 20 ml und 50 ml abgefüllt. Pro Spur wurden 0,5 µg FtgGT aufgetragen. Westernblot Bedingungen: Blocken mit 5 % Magermilch 30 min bei RT, 1. Ak 1,5 h über Nacht bei 4 °C, 2. Ak: 1 h bei RT, Waschen mit 1x TBS/T (je 3x 10 min).

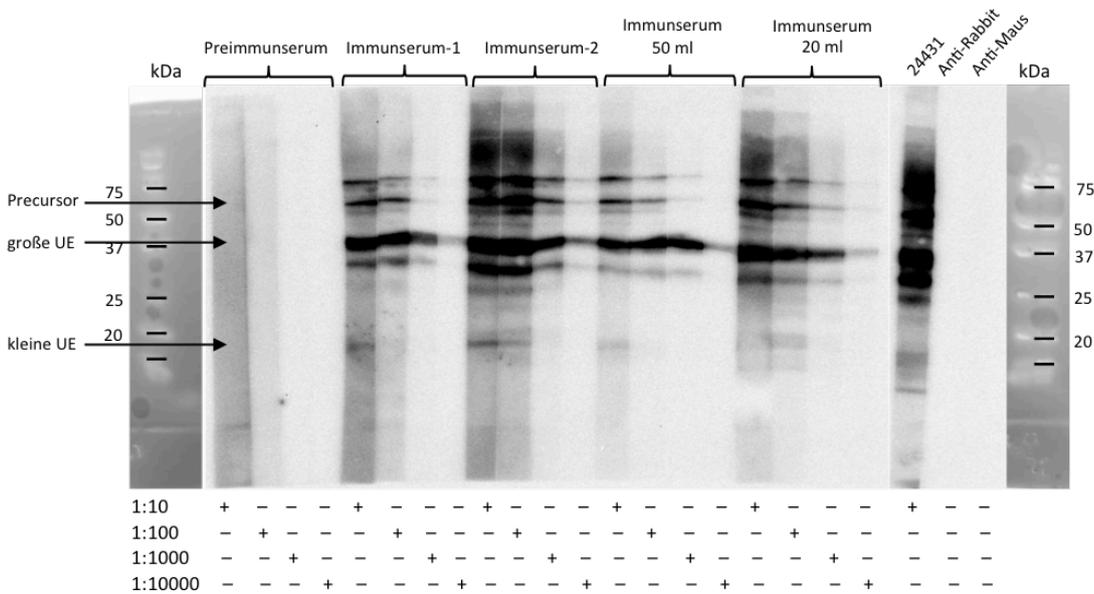


Abbildung 43 Polyklonales Kaninchenserum 24432 gegen rekombinante FtgGT im Westernblot. FtgGT: 60 kDa Precursor, große Untereinheit (UE)= 40 kDa und kleine Untereinheit (UE)= 20 kDa kleine Untereinheit. Immunserum 1 und 2= affinitätsgereinigte Antiseren Aliquot 1 und 2, Immunserum 20 ml und 50 ml= nach Anreicherung der Antikörper und Affinitätsreinigung wurde die selbe Probe in Aliquot 20 ml und 50 ml abgefüllt. Pro Spur wurden 0,5 µg FtgGT aufgetragen. Westernblot Bedingungen: Blocken mit 5 % Magermilch 30 min bei RT, 1. Ak 1,5 h über Nacht bei 4 °C, 2. Ak: 1 h bei RT, Waschen mit 1x TBS/T (je 3x 10 min).

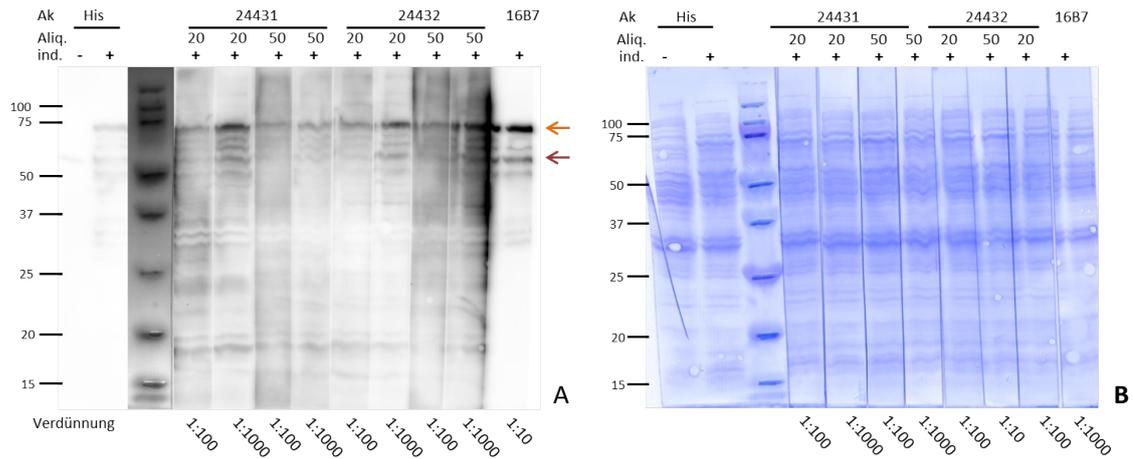


Abbildung 44 Polyklonale Kaninchenserum gegen *E. coli* Bakterienlysate mit überexprimierter FtgGT. Getestet wurden die Aliquots 20 ml (20) und 50 ml (50) Kaninchenserum, die nach Anreicherung der Antikörper und Affinitätsreinigung von der Firma BioGenes geliefert wurden. 16B7= Ratten-Hybridomaüberstand 16B7 (orangener Pfeil: Precursor, brauner Pfeil: große Untereinheit der FtgGT). A: Westernblot, Bedingungen: Blocken mit 5 % Magermilch 30 min bei RT, 1. Ak 1,5 h oder über Nacht bei 4 °C, 2. Ak: 1 h bei RT, Waschen mit 1x TBS/T (je 3x 10 min). B: Coomassie gefärbte Membran.

### 3.7.2 Lokalisation endogener *Francisella tularensis subsp. holarctica* gGT mittels Aktivitätsassay

#### 3.7.2.1 Test der *Francisella* Fraktionen auf enzymatische Aktivität der FtgGT

Nachdem beide Immunisierungsansätze nicht zu Antikörpern / Seren mit ausreichend spezifischer und deutlicher Erkennung der endogenen FtgGT im Westernblot geführt haben (mit Ausnahme des nicht mehr lieferbaren Hybridomaüberstand 16B7), wurde dazu übergegangen, die endogene FtgGT nach Zellfraktionierung anhand des FtgGT Aktivitätsassays zu detektieren und dadurch Aussagen über die Lokalisation zu treffen. Es wurde der Überstand der Gesamt-Bakterienkultur des attenuierten Stammes *F. t. subsp. holarctica* LVS, sowie die Fraktionen Periplasma, Cytosol, Membran und Outer Membran (OM) Fraktionen im Aktivitätsassay getestet. Der Test zeigte eine eindeutige FtgGT Aktivität in den Fraktionen Periplasma und Cytosol, wobei mit Abstand die höchste enzymatische Aktivität im Cytosol messbar war. An diesem Punkt ist anzumerken, dass die Reinheit der Fraktionen nicht überprüft werden konnte, da keine spezifischen *Francisella* Antikörper gegen Markerproteine einzelner Fraktionen zur Verfügung standen. Aus diesem Grund kann nicht ausgeschlossen werden, dass die geringe enzymatische Aktivität der FtgGT in den Fraktionen Kultur ÜS und Membranfraktion aus einer Kontamination resultieren.

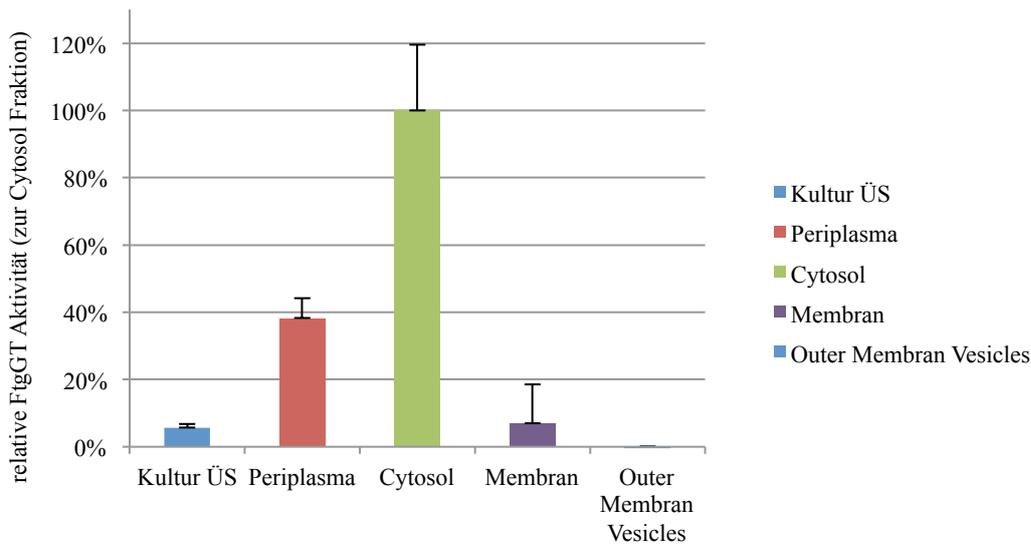


Abbildung 45 Relative Darstellung der enzymatischen endogenen FtgGT Aktivität in verschiedenen Bakterien-Fractionen.

Cytosol-Fraktion wurde auf 100 % gesetzt. Jede Fraktion wurde in einer Dreifachmessung und drei verschiedenen Verdünnungen im Aktivitätsassay getestet. Der Mittelwert wurde aus den Verdünnungswerten gebildet (Werte aller Verdünnungen wurden vorher auf 1 g Pellet normiert) und relativ zur Cytosol-Fraktion dargestellt. (Dargestellt sind die Mittelwerte + Standardabweichung.) Assaybedingungen: 40/60/80  $\mu$ l Fraktion, 20 mM GlyGly, 2 mM L-gGpNA, 0,1 % BSA, 100 mM Tris pH 8,0, 4 h Endpunktmessung (drei unabhängige Triplikatmessungen).

## 4 Diskussion

### 4.1 Die biochemische Charakterisierung der *Francisella* $\gamma$ -Glutamyltranspeptidase

*Francisella*  $\gamma$ -Glutamyltranspeptidase, ein virulenz-determinierender Faktor, ist trotz der bisherigen deskriptiven Forschung biochemisch und proteinchemisch nicht näher charakterisiert worden. Der FtgGT wird eine essentielle Rolle bei der intrazellulären Vermehrung des hoch infektiösen Bakteriums (Alkhuder, Meibom et al. 2009) zugeschrieben, das die seltene Zoonose Tularämie mit einer hohen Letalität (30-60 % in unbehandelten Fällen der pneumonalen Form) verursacht (Robert-Koch-Institut 2015). Jedoch sind weder die Struktur, ihre Lokalisation in den Bakterienzellen, noch die Möglichkeit neuer Therapieansätze durch spezifische Inhibition der FgGT in der Literatur beschrieben (mit Ausnahme von Impfstoffkandidaten). In dieser Arbeit wurden fünf gGTs aus verschiedenen *Francisella* Spezies bzw. Subspezies rekombinant hergestellt (*F. t. subsp. tularensis/holarctica/novicida*, *F. philomiragia*, *F. noatunensis*), die alle enzymatisch aktiv waren und daher höchst wahrscheinlich nativ gefaltet vorlagen. Für die nähere Charakterisierung wurde die *Francisella tularensis subsp. holarctica* gGT (FtgGT) ausgewählt, da diese Subspezies in der nördlichen Hemisphäre am weitesten verbreitet ist und als humanpathogenes Bakterium die Tularämie auslösen kann. Darüber hinaus kann davon ausgegangen werden, dass aufgrund der konservierten Aminosäuresequenz der  $\gamma$ -Glutamyltranspeptidase zwischen den einzelnen *Francisella* Stämmen (Homologie > 90 %, zwischen den *F. tularensis* Subspezies sogar > 98,8 %) keine Unterschiede in den Eigenschaften und der Funktion des Enzyms zwischen den verschiedenen *Francisella* Spezies, bzw. Subspezies zu erwarten sind. Die Aminosäuren, die das aktive Zentrum bilden, sind in allen *Francisella* Stämmen identisch.

In dieser Arbeit wurde der bisher in der Literatur beschriebene standardisierte enzymatische gGT Aktivitätsassay (Meister, Tate et al. 1981) für die *Francisella*  $\gamma$ -Glutamyltranspeptidase adaptiert und nach Vorgaben der EFPIA (*European Federation of Pharmaceutical Industries and Associations*) validiert. Dieser

ursprünglich auf die humane gGT optimierte Assay basiert auf der Absorptionmessung (bei 405 nm) des p-Nitroanilins, das bei der Übertragung des  $\gamma$ -Glutamylrests vom Donorsubstrat L-gGpNA auf ein Akzeptor freigesetzt wird. Aufgrund der Unterschiede der beschriebenen Aminosäuresequenzen, vor allem im aktiven Zentrum der humanen gGT und FtgGT (3.2.1), wurden zunächst die beschriebenen Assaybedingungen bezüglich pH-Optimum, Akzeptorspezifität und zusätzlich die Lagerbedingungen (Lagerpuffer und Lagertemperatur) überprüft.

Die Bestimmung des pH-Optimums zur Überprüfung der Assaybedingungen hinsichtlich der optimalen Enzymaktivität der FgGTs diente als erster Schritt zur Validierung des spezifischen FgGT Aktivitätsassays. Der in dieser Arbeit ermittelte Wert lag bei pH 8,0, wie er auch für andere gGTs (z.B. HpgGT und humane gGT) in der Literatur beschrieben wurde. Christian Bolz ermittelte in seiner Dissertationsarbeit (Bolz 2013, Bolz, Bach et al. 2016) ein Optimum von pH 7 für die *Francisella tularensis subsp. holarctica* gGT, welches in den hier durchgeführten pH-Abhängigkeitsversuchen nicht bestätigt werden konnte. Diese unterschiedlichen Ergebnisse lassen sich nicht erklären – die Assaybedingungen waren identisch. Der einzige Unterschied bestand darin, dass Christian Bolz eine His-getaggte FtgGT verwendet hat – in dieser Arbeit wurde eine (His-) tag freie FtgGT verwendet.

Ein wichtiges Kriterium für die Interassayvergleichbarkeit ist die Lagerungsstabilität der FgGT in Bezug auf Funktionalität bzw. Enzymaktivität. Dazu wurden zwei Lagerpuffer (Tris und HEPES) mit verschiedenen Kochsalzkonzentrationen und mit/ohne Saccharose getestet. Die Stabilität wurde über den Verlauf der Schmelzkurve im Entfaltungsassay (abgeleitete Schmelztemperaturen sind ein Maß für Proteinstabilität) und die Enzymaktivität via Aktivitätsassay unmittelbar nach der Reinigung der FtgGT und nach 4 Wochen Lagerung bei -80 °C analysiert. Die Analyse ergab die bestmögliche Lagerung der FgGT im Puffer: 100 mM HEPES, 140 mM NaCl bei pH 7,5.

Bei der Untersuchung der FtgGT Akzeptorspezifität wurde kein Unterschied der LgGpNA-Umsatzrate beim Austausch des Akzeptors GlyGly (Akzeptor des beschriebenen Standard-Aktivitätsassays) durch ein anderes Dipeptid bzw. ohne

Zugabe eines Akzeptors gemessen. Die Transpeptidierung spielt also keine bzw. eine im Vergleich zur Hydrolyse untergeordnete Rolle, da die Reaktion durch Zugabe des Akzeptors nicht beschleunigt wird. Dieses Phänomen wurde bisher in der Literatur für keine gGT einer anderen Spezies beschrieben. Bisher ist für andere gGTs bekannt, dass die Transpeptidierungsreaktion mit D-gGpNA und L-gGpNA bei Zugabe des Akzeptors GlyGly beschleunigt wird (Wickham, Regan et al. 2012). Lediglich Bolz hatte dieses Phänomen in seiner Dissertation (Bolz 2013, Bolz, Bach et al. 2016) beobachtet, jedoch nicht weiter untersucht.

Die beobachtete Reaktionsgeschwindigkeit (mAU/min) mit D-gGpNA oder L-GPNA als Substrat wurde durch Zugabe von Dipeptidakzeptoren nicht beeinflusst, jedoch zeigte L-gGpNA eine höhere Reaktionsgeschwindigkeit im Vergleich zu D-gGpNA. Auch Wickham *et al.* beobachteten bei Untersuchungen der humanen gGT, eine dreifach erhöhte Maximalgeschwindigkeit mit L-GpNA als Donorsubstrat im Vergleich zu D-gGPNA. (Wickham, Regan et al. 2012). In diesem Fall ließ sich dieses Phänomen durch die Eigenschaft von L-gGPNA, auch als Akzeptor zu fungieren und somit die Transpeptidierungsreaktion stattfindet, erklären. Die Reaktion der Transpeptidierung läuft schneller als die Hydrolyse (Wickham, Regan et al. 2012).

Die Erwartung, eine stärkere Nettoreaktion aufgrund der fehlenden Rückreaktion zu beobachten, bei der Messung mit der Isoform D-gGpNA, wurde nicht bestätigt, und lässt sich mit einer höheren Affinität der FtgGT zum L-gGpNA begründen. Die in der Kristallstrukturanalyse beobachteten Unterschiede in den Seitenketten des aktiven Zentrums zwischen HpgGT und FtgGT könnten hierfür eine Erklärung liefern: Die Seitenkettenstrukturen im aktiven Zentrum der FtgGT sind polar und unterstützen somit leichter eine Hydrolyse. Im Gegensatz dazu besitzt die HpgGT eine hydrophobe Seitenkettenstruktur, was die Beobachtung der unterschiedlichen Hydrolyseraten zwischen HpgGT und FtgGT (diese Arbeit und Bolz 2013) begründen könnte. Die durch HpgGT katalysierte Hydrolyse von L-gGpNA war ohne Zugabe eines Akzeptors hingegen nicht messbar. Trotz allem wurde der Akzeptor GlyGly – auch wenn dieser für die Messung der FtgGT Aktivität nicht nötig ist – in dieser Arbeit weiterhin verwendet, um eine Vergleichbarkeit des Assays zu den mit gGTs anderer Spezies (z.B. HpgGT) zu gewährleisten.

Für die Validierung eines Aktivitätsassay für das Screening nach potentiellen FtgGT Inhibitoren waren weitere Untersuchungen des bisher beschriebenen Aktivitätsassay notwendig. Dazu muss der spezifische FgGT Aktivitätsassay Informationen über die Enzymaktivität liefern und dabei ein schnelles und zuverlässiges Testen ermöglichen. Der Aktivitätsassay wurde nach den EFPIA Kriterien für HTS-Assays für die FtgGT angepasst, um zuverlässig potentielle Inhibitoren zu identifizieren, und um möglichst zu verhindern, dass Inhibitoren unerkant bleiben. Dafür mussten die Qualität der Reagenzien, Qualität der Messung und die Hochdurchsatztauglichkeit für den Aktivitätsassay gewährleistet sein. Für eine Zuverlässigkeit der Messung wurde die Qualität der Assayreagenzien überprüft: die Proteinreinheit war, wie gefordert, größer als 80 %, die Proteinstabilität nach unterschiedlichen Auftauzyklen (1-6x) und die Reagenzienstabilität des Substrates L-gGpNA (bei unterschiedlichen Temperaturen für 9 h stabil) waren gegeben. Für die Qualität der Messung wurde zunächst die relative Menge an Enzym und Substrat so eingestellt (18 nM FtgGT und 250  $\mu$ M gGpNA), dass über 4 h eine konstante Signalzunahme zu sehen war. Durch die Verfolgung des Einflusses von Inhibitoren über 4 h wird es ermöglicht, auch den Effekt von langsam bindenden Inhibitoren zu erkennen. Die weiteren Kriterien für die Qualität der Messung: Korrelation von Kinetik- und Endpunktmessung (ermöglicht initiales Screening), Signal/Hintergrund Verhältniss (gefordert > 3, lag hier bei 17) und die Bestimmung von  $Z'$  – Maß für die statistische signifikante Unterscheidung von Signal und Hintergrund unter Einbeziehung der Messwertstreuung – erfüllten die EFPIA Anforderungen. Die Hochdurchsatztauglichkeit des Assays wurde anhand der Stabilität innerhalb der Messplatte, Readout-Stabilität und der DMSO Toleranz untersucht und erfüllte ebenfalls die EFPIA Anforderungen Für den Aufbau einer robusten Screening Plattform ist es notwendig, Counter Assays zu etablieren. Zum einen sollen diese Counter Assays die hemmende Wirkung potentieller inhibitorischer Substanzen in einem zweiten unabhängigen Testverfahren bestätigen. Dies kann in diesem Fall mittels biologischer Assays, die am Institut Mikrobiologie der Bunderwehr (München) etabliert sind, erfolgen. Dabei wird das Wachstum von *Francisella* in Kulturmedium bzw. in Co-Kultur mit eukaryontischen Zellen bestimmt. Zum anderen soll die Spezifität der inhibitorischen Wirkung gegenüber der FtgGT überprüft werden. Dazu werden gGTs anderer Spezies, die

bei einer klinischen Anwendung beim Menschen relevant sind, wie die humane gGT, *E.coli* gGT und *H. pylori* gGT im jeweiligen biochemischen gGpNA-basierten Assay überprüft. Diese Assays wurden ebenfalls am Institut für Medizinische Mikrobiologie (MIH, TUM) nach den EFPIA Anforderungen validiert.

Alle EFPIA Anforderungen wurden erfüllt und sprechen somit für die Eignung und ausreichende Qualität des Assays zum Screenen von potentiellen Inhibitoren. Der Assay konnte im Rahmen dieser Arbeit aufgrund der apparativen Ausstattung nicht auf ein 384well Format adaptiert werden, sondern nur auf ein 96well Format. Prinzipiell ist die Adaption auf ein 384well Format möglich und würde den zeitlichen Aufwand für das Screenen auf potentielle Inhibitor Substanzen nochmals senken. Zudem ist durch die Überprüfung in Counter Assays/orthogonale Assays gewährleistet, dass die inhibitorische Wirkung des Inhibitors und die Spezifität des Inhibitors überprüft werden. Aktivitätsassays mit anderen bakteriellen gGTs (*H. pylori*, *E. coli*, *C. jejuni*) und der humanen gGT zur Überprüfung der Spezifität möglicher FtgGT Inhibitoren waren im Labor bereits etabliert.

Für das bessere Verständnis wie sich die FtgGT im biochemischen Aktivitätsassay verhält und für die Suche nach potentiellen FtgGT Inhibitoren wurde die FtgGT Kristallstruktur benötigt. In der Literatur ist im Gegensatz zur *H. pylori* und humanen gGT bisher keine Kristallstruktur der *Francisella* gGT beschrieben. Im Rahmen dieser Arbeit wurde in Kooperation mit dem Helmholtz Zentrum München (Dr. Popowicz) die FtgGT Kristallstruktur mit einer Auflösung von 1,9 Å gelöst. Die Kristallstruktur der FtgGT zeigte im Vergleich zur *Helicobacter pylori* gGT keine Unterschiede in der Basisstruktur (*backbone structure*) mit zentralen homologen  $\alpha\beta\alpha$ -Kernstruktur, die typisch für Ntn-Hydrolasen ist, sowie keine nennenswerten Faltungsunterschiede im aktiven Zentrum (*active site structure*). Die Unterschiede lagen in der Art und Orientierung der Aminosäureseitenketten im aktiven Zentrum (*active site*). Diese Strukturunterschiede können die Unterschiede in Hinblick auf Akzeptormoleküle und Substratisomeren zwischen der HpgGT und der FtgGT erklären. Das katalytische Zentrum der FtgGT ist im Vergleich mit der HpgGT polarer.

Die in dieser Arbeit erworbenen biochemischen Erkenntnisse über die FtgGT konnten, basierend auf ihrer Kristallstruktur und ihres Verhaltens im enzymatischen Aktivitätsassay, Einblicke in dessen katalytischem Zentrum gewähren. Diese Erkenntnisse über ein besseres Verständnis der Aktivität und des katalytischen Zentrums helfen, neue FtgGT spezifische Inhibitoren zu identifizieren und auf deren Selektivität zu untersuchen. So konnte mit Hilfe der hochauflösenden Kristallstruktur ein *in silico* Screening nach geeigneten FtgGT Inhibitoren unternommen werden (s. 4.2)

Zusätzlich wurde in dieser Arbeit die Lokalisation der endogenen FtgGT analysiert, da bisher in der Literatur zur Lokalisation der FtgGT nichts bekannt ist. Die meisten Proteine von Gram-negativen Bakterien sind im Cytoplasma lokalisiert, lediglich 20 % (Pugsley 1993) bzw. ca. 25 % (Tjalsma 2000) der synthetisierten Proteine sind außerhalb des Cytoplasmas zu finden. Diese Proteine besitzen ein Membran-Sortierungssignal in Form von hydrophoben Bereichen, welche ihnen die Integration in die Cytoplasmamembran ermöglichen (Pugsley 1993, Tjalsma, Bolhuis et al. 2000). Zum einen ist ein Teil dieser Proteine durch Transmembran-Segmente in der Membran verankert, und zum anderen besitzen einige ein N-terminales Signalpeptid, welches den Transport aus dem Cytoplasma vermittelt und anschließend von spezifischen Signalpeptidasen abgespaltet wird (Tjalsma, Bolhuis et al. 2000). Die FtgGT besitzt solch ein N-terminales Signalpeptid, was auf eine periplasmatische Lokalisation hindeutet. Diese Vermutung stimmt mit den in der Literatur beschriebenen Lokalisation zu der homologen *H. pylori* gGT (Homologie > 40 %) überein, die ebenfalls ein im Periplasma des Bakterium *Helicobacter* lokalisierter Virulenzfaktor ist (Chevalier, Thiberge et al. 1999, McGovern, Blanchard et al. 2001, Shibayama, Kamachi et al. 2003). Andererseits wurde die HpgGT von zwei unabhängigen Forschergruppen als sezerniertes Protein aus Bakterienkulturüberstand isoliert (Bumann, Aksu et al. 2002, Busiello, Acquaviva et al. 2004). Im Vergleich dazu wurde die *E. coli* gGT bisher nur im periplasmatischen Raum lokalisiert (Suzuki, Kumagai et al. 1986) und die *B. subtilis* gGT wird hauptsächlich ins Medium sekretiert (Xu and Strauch 1996). Die durchgeführten Experimente in dieser Arbeit zur Lokalisation des Virulenz-determinierenden Faktors FtgGT deuten darauf hin, dass das Enzym im

Cytoplasma des Bakteriums lokalisiert ist. Im Cytoplasma wurde die höchste Aktivität der endogenen FtgGT nachgewiesen. Relativ dazu wurden 40 % der FtgGT im Periplasma nachgewiesen. Im Rahmen dieser Arbeit konnten allerdings keine Experimente zum Ausschluss von Kontaminationen der Zellfraktionen – z. B. mit Hilfe von spezifischen *Francisella* Antikörper gegen Markerproteine einzelner Fraktionen – durchgeführt werden, da keine entsprechenden Antikörper zur Verfügung standen. Daher kann eine eventuelle Verunreinigung der periplasmatischen Fraktion nicht ausgeschlossen werden. Zudem ist es nötig die Ergebnisse der Lokalisation mit Hilfe des Aktivitätsassays anhand einer anderen Methode zu bestätigen. Die meisten der dafür in dieser Arbeit generierten Antikörper / Antiseren zeigten nicht die hierfür nötige Sensitivität und Spezifität. Die einzige Ausnahme stellte der Ratten-Hybridoma Klon 16B7 dar, der allerdings nicht weiter kultiviert werden und somit der entsprechende monoklonale Antikörper nicht nachgeliefert werden konnte.

Die Lokalisation der endogenen FtgGT hat eine biologische Bedeutung hinsichtlich der Aufnahme der FtgGT Substrate. FtgGT spielt eine entscheidende Rolle in der Gewinnung von Cystein für das Bakterium. Alkhuder et. al zeigten anhand von Mutationsversuchen das *Francisella tularensis* extrazelluläres Glutathion und  $\gamma$ -glutamyl-Cystein Dipeptide als Cystein Quelle nutzt (Alkhuder, Meibom et al. 2009). Die Ergebnisse zu Lokalisation der endogenen FtgGT deuteten darauf hin, dass dieser Vorgang der Cystein Gewinnung nicht extrazellulär stattfindet – im Kulturüberstand ist kaum eine enzymatische Aktivität messbar. Sollte die endogene FtgGT im periplasmatischen Raum lokalisiert sein – das Signalpeptid deutet darauf hin, und die Ergebnisse der Lokalisation mit Hilfe des Aktivitätsassays können dies nicht ausschließen (s. oben) – könnte die Aufnahme des Substrates Glutathion passiv über Poren der äußeren Membran geschehen. Die äußere Membran von Gram-negativen Bakterien ist für niedermolekulare, polare Moleküle durchlässig. Würde sich die hauptsächlich cytoplasmatische Lokalisation – verbunden mit einer physiologischen Rolle der endogenen FtgGt im Cytoplasma durch andere Analysemethoden bestätigen - wären für die Aufnahme von Glutathion ins Cytoplasma spezifische Transporter notwendig. Diese spezifischen Transporter könnten für die Therapie von *Francisella*-Infektionen von Bedeutung sein, da

durch Blockade oder Fehlen dieser spezifischen Transporter ein ähnlicher Effekt, wie der der  $\Delta$ gGT Mutanten (kein Wachstum von  $\Delta$ gGT Mutanten trotz Glutathion oder  $\gamma$ -glutamyl-Cystein Quelle (Alkhuder, Meibom et al. 2009)), zu beobachten sein sollte. Die bisherigen bekannten Glutathion Transporter sind ABC (ATP-binding cassette)-Proteine, die in ihrer einfachsten Form aus vier Kerndomänen bestehen: zwei porenbildende hydrophobe Transmembrandomänen und zwei Nukleotid-Bindungsdomänen, die durch Hydrolyse von ATP den Transport ermöglichen (Higgins, Hiles et al. 1986). Eine entscheidende Erkenntnis zum besseren Verständnis des Glutathion Imports in Gram-negativen Bakterien lieferte die Entdeckung eines spezifischen *solute-binding* Proteins (SBP), namens GbpA, welches spezifisch Glutathion bindet um den ABC (ATP-binding cassette) Dipeptid Transporter DppBCDF (eine Permease in der inneren Zellmembran von Gram-negativen Bakterien) zu primen (Vergauwen, Verstraete et al. 2013).

Für die Reinigung der endogenen FtgGT ist das Ergebnis der Lokalisation der endogenen FtgGT – Hauptlokalisierung im Cytoplasma – von Vorteil, da die allgemeine Proteinmenge im Periplasma – wie oben bereits erwähnt wurde – deutlich geringer ist. Somit wird erwartet, dass die Ausbeute der Reinigung der endogenen FtgGT höher liegen wird als wenn die endogene FtgGT nur im periplasmatischen Raum lokalisiert wäre. In dieser Arbeit konnte die endogene FtgGT aus Bakterienpellet des attenuierten Stamm *F. t. subsp. holarctica* LVS erfolgreich angereichert werden, aber nicht in einem ausreichend hohen Reinheitsgrad, der für weiterer Analysen – MALDI-TOF Massenspektrometrie Analyse bezüglich der Spaltstelle des Signalpeptids – notwendig ist. Um die in der angereicherten Probe noch immer stark vorhandenen Verunreinigungen abzutrennen, müsste mit Hilfe der Gelfiltration (*size exclusion chromatography*, SEC) die bisher angereicherte endogene FtgGT abgetrennt werden. Im Rahmen dieser Arbeit waren die zur Verfügung stehenden FtgGT Mengen sehr begrenzt, sodass dieser Schritt nicht mehr möglich war. Für eine erneute Reinigung der endogenen FtgGT müsste mit wesentlich mehr Ausgangsmaterial (> 10x) gearbeitet werden.

#### 4.2 Die *Francisella* $\gamma$ -Glutamyltranspeptidase als Target für die Entwicklung von *Small Molecule Inhibitors* (SMIs)

Die gGTs verschiedenster Spezies sind Gegenstand der Forschung zur Entwicklung von Therapien für die jeweiligen Erkrankungen. Auch bei der Entwicklung von Tumormedikamenten ist die gGT wiederzufinden. Aberrante Expression und Lokalisation der humanen gGT wurden in einer Vielzahl von Krankheiten, inklusive Krebs beobachtet (Hanigan, Frierson et al. 1999). Aufgrund ihrer metabolischen Funktion in Neoplasien (Pompella, De Tata et al. 2006) ist die humane gGT ein interessanter Kandidat für die Inhibitor-Entwicklung. Die Entwicklung eines Inhibitors gegen die humane gGT würde eine wirksame therapeutische Behandlung in der Tumorbekämpfung für die klinische Anwendung sein – die Überexprimierung der humanen gGT korreliert mit Krebserkrankungen– (Wickham, Regan et al. 2013). Die bisher untersuchten gGT Inhibitoren, wie Acivicin und weitere Glutamin-Analoga zeigten allerdings eine neurotoxische Wirkung (Wickham, Regan et al. 2012). Diese Inhibitoren hemmen nicht nur die gGT, sondern auch andere Glutamin-abhängige Amidotransferasen und Enzyme verschiedener Biosynthesewege (Aminosäuren und Pyrimidin) (Ahluwalia, Grem et al. 1990, Weber and Prajda 1994). Die beschriebene L-2-amino-4-Buttersäure, die ebenfalls gGT hemmt, zeigte im Vergleich zu den bisherigen Inhibitoren eine reversible Bindung an das Enzym (Stein, DeCicco et al. 2001). King et al. identifizierten mittels Hochdurchsatzscreenings (HTS) eine neue Substanz, die kein Glutaminanalog ist. Diese Substanz (OU749) inhibiert Spezies-spezifisch die humane gGT und ist in teilenden Zellen 150 fach weniger toxisch als der bekannte Referenzinhibitor Acivicin. Diese Studien haben eine neue Klasse von gGT Inhibitoren identifiziert, die eine Grundlage für eine Weiterentwicklung von Therapeutika, die sich in dem Wirkmechanismus der bisherigen toxischen Glutaminanaloge unterscheiden, bildet (King, West et al. 2009).

In den letzten Jahren geriet die Entwicklung von *Small Molecule Inhibitors* (SMIs) gegen bakterienspezifische Virulenzfaktoren (Pathoblocker) als neuer Ansatz bzw. Alternative zur Antibiotika für die Behandlung von verschiedenen Infektionserkrankungen immer mehr in den Fokus. Die sogenannten Pathoblocker sind vielversprechend, da diese nicht darauf abzielen, den Keim

abzutöten – wie es bisher beim Antibiotikaansatz der Fall ist – sondern den Keim in seiner Infektiosität zu hemmen. Zudem wird durch Einsatz von Pathoblockern die Resistenzentwicklung verlangsamt und die natürliche Keimflora des Patienten nicht geschädigt. Zunehmende Antibiotikaresistenzen, vor allem durch Kreuzresistenzen, fordern einen deutlich intensiveren Entwicklungsaufwand für Spezies-spezifische Antiinfektiva. Neben der hier untersuchten FtgGT sind auch gGTs anderer Spezies Gegenstand der Forschung in Hinblick auf die Entwicklung neuer Antiinfektiva und Impfstoffe, wie z. B. die *H. pylori* gGT.

In der Forschung von Spezies-spezifischen Antiinfektiva wurde in einer Mausstudie über *H. pylori* Infektionen gezeigt, dass der essentielle Virulenzfaktor HpgGT, welcher für die Etablierung der Infektion notwendig ist, durch Acivicin gehemmt werden kann. Somit führt diese Hemmung zu einer Beseitigung der Infektion (Dr. Florian Anderl, nicht publizierte Daten). Die FtgGT ist ebenfalls ein essentielles Enzym, das für das Wachstum des Bakteriums unabdingbar ist. Die FtgGT spielt eine Schlüsselrolle in der Cystein-Gewinnung aus Glutathion. Alkhuder et al. zeigten, dass die *F. tularensis* gGT für die Gewinnung von Cystein aus extrazelluläres Glutathion und  $\gamma$ -glutamyl-Cystein Dipeptide genutzt werden. Fehlt dieses Enzym oder wird es inhibiert, kann der Keim trotz Vorhandensein einer möglichen Glutathion-Quelle zur Cystein-Gewinnung nicht wachsen – dies wurde anhand von *in vitro* Mutationsversuchen/ $\Delta$ gGT-Mutanten gezeigt (Alkhuder, Meibom et al. 2009). Dieser Effekt wurde auch *in vivo* Versuchen bestätigt. Mausinfektionsversuche mit *F. tularensis*  $\Delta$ gGT-Stämme zeigten eine stark verminderte Kolonisierung (Alkhuder, Meibom et al. 2009) und die LD<sub>50</sub> lag mit  $> 10^5$  Zellen deutlich höher als im Vergleich der beschriebenen LD<sub>50</sub> des Wildtyps von  $10^1$ - $10^2$  (Kadzhaev, Zingmark et al. 2009). Eine Resistenzbildung gegen FtgGT, wie durch strukturelle Modifikation des Proteins, würde mit einer Reduktion der enzymatischen Aktivität korrelieren und somit die intrazellulären Vermehrung des Bakteriums limitieren. Aus diesen Gründen ist die FtgGT ein optimales Target für die Entwicklung spezifischer Inhibitoren.

Mit Hilfe des validierten Assays wurden 405 Substanzen aus der Priaxonbibliothek gescreent. Keine der Substanzen führte, selbst in der höchsten

eingesetzten Konzentration (60  $\mu\text{M}$ ), zu einer Hemmung der FtgGT. Dies ist nicht sehr überraschend, da die Hit-Raten aus konventionellen Substanzbibliotheken für die Antiinfektiva-Entwicklung im Allgemeinen als gering eingestuft werden. Dies wird darauf zurückgeführt, dass diese Substanzbibliotheken meist auf eukaryotische Targets optimiert sind (Macielag 2012). Darüber hinaus waren die Substanzen für eine möglichst spezifische Wirkung auf die HpgGT ausgewählt: viele dieser Substanzen zeigten für die HpgGT, nicht aber für die *E. coli* gGT oder die humane gGT eine inhibitorische Wirkung (Daschkin 2015). Demnach war eine sehr niedrige Hit-Rate für die FtgGT zu erwarten gewesen, was aber den auch in dieser Arbeit verfolgten Ansatz der Suche nach einem Spezies-spezifischen Pathoblocker bestätigte. Weiterhin waren alle Substanzen zum Zeitpunkt des Screenings bereits mehrere Monate in DMSO gelöst. Von daher ist nicht auszuschließen, dass einige der Substanzen aufgrund von mangelnder Stabilität bereits chemisch verändert (eventuell degradiert) und daher nicht mehr aktiv waren.

Die in diesem Projekt gelöste FtgGT Kristallstruktur mit einer sehr guten Auflösung von 1,9 Å erlaubt eine andere Herangehensweise als das konventionelle Screening zur Identifizierung von Inhibitoren. Ein *in silico* Screening (ISS) wurde in Kooperation mit dem Helmholtz Zentrum München (Dr. Popowicz) für die Identifizierung von möglichen FtgGT Inhibitoren durchgeführt. Diese Methode senkt die Kosten des Screenings für die Identifizierung von Inhibitoren, da eine Vorauswahl von Substanzen getroffen wird und somit die zu testenden Substanzen im Screening reduziert werden. Mit Hilfe dieser Methode konnten für andere Proteine, z. B. Caspasen (Fattorusso, Jung et al. 2005) oder Protein-Kinasen (Forino, Jung et al. 2005, Sandberg, Ma et al. 2005) neue Inhibitoren identifiziert und validiert werden.

Bei dem *in silico* Screening Ansatz wurden ca. 22 Mio. kommerziell erhältliche Substanzen auf ihre Bindungsaffinität zur FtgGT gescreent, wobei 87 Treffer (Hits) erzielt wurden. Aus den 87 Treffern – FtgGT spezifischen Substanzen – wurden 27 Substanzen kommerziell erworben und auf ihre hemmende Wirkung getestet. Keine der getesteten Substanzen konnte unter den eingesetzten Bedingungen die enzymatische FtgGT Aktivität hemmen. Jedoch kann nicht ausgeschlossen werden, dass einer dieser getesteten Substanzen die FtgGT

bindet. Derartig schwach aktive Substanzen würden aber dennoch nicht weiter verfolgt werden, da eine erfolgreiche Optimierung sehr aufwendig und aufgrund der schwachen Bindung wenig erfolgversprechend ist.

Ein weiterer Ansatz zur Wirkstoffentwicklung, der sehr vielversprechend und kostensparend im Vergleich zur klassischen Methode Hochdurchsatzscreening (HTS) von Substanzbibliotheken ist, wäre die Wirkstoffentwicklung mittels fragmentbasiertem Ansatzes. Ein Screening mit einer Substanzbibliothek von 1000 Fragmenten liefert ähnliche Informationen wie ein Hochdurchsatzscreening von einer Bibliothek mit einer Milliarde Substanzen (Aretz and Rademacher 2015). Beim fragmentbasiertem Ansatz werden Bibliotheken, die niedermolekulare Substanzen mit einer Größe von 150-300 Da enthalten, durchsucht. Die Wahrscheinlichkeit einer Substanz im aktiven Zentrum zu binden nimmt mit ihrer Komplexität ab (Hann, Leach et al. 2001), jedoch besitzen Substanzen mit einer niedrigen chemischen Komplexität (wie Fragmente) eine geringere Affinität. Dazu werden hoch sensitive biophysikalische Methoden – für die Suche nach der Bindung zwischen Fragment und Protein – verwendet: z. B. Kernspinresonanzspektroskopie (NMR), Oberflächenplasmonenresonanz-Spektroskopie (SPR, *surface plasmon resonance*), *Thermal Shift Assay* (TSA), funktionale Tests, isothermer Titrationskalorimetrie (ITC), Röntgenkristallographie oder computergestützte Methoden (Davis and Erlanson 2013). Die Liganden beobachtende NMR-Methode hat die höchste Empfindlichkeit für die Detektion schwacher Bindung und die niedrigste Fehlerquote, da viele Qualitätskontrollen mit durchgeführt werden können (Aretz and Rademacher 2015). Um den Durchsatz zu erhöhen werden bis zu 10 Fragmente in einem Ansatz gescreent. Für das NMR Screening wurden im Rahmen dieser Arbeit dem Kooperationspartner Dr. Popowicz (Helmholtz Zentrum München) gereinigte rekombinanten FtgGT zu Verfügung gestellt. Treffer aus solch einem fragmentbasiertem Ansatz für die FtgGT würden dann in dem validierten FgGT Aktivitätsassay getestet werden. Fragmente, die eine hemmende Wirkung auf die FtgGT zeigen würden, könnten in weiteren Versuchen näher charakterisiert und validiert werden. Nach einer solchen Validierung der Fragmente folgt die Fragmententwicklung, die durch ein Erweitern eines Fragments (*growing*), Verknüpfen (*linking*) oder Verschmelzen

von Fragmenten (*merging*) erfolgt, um aus einem milli- bis hoch mikromolaren Binder einen nanomolaren Liganden als Wirkstoff zu entwickeln. Mit Hilfe eines Fragmentscreens identifizierten Tsai *et al.* einen B-RAF Inhibitor (Tsai, Lee et al. 2008). Onkogene Mutationen in der Proteinkinase B-RAF korrelieren mit einem erhöhten Schweregrad der Erkrankung und einem verminderten Ansprechen auf die Chemotherapie für eine Vielzahl von humanen Tumoren (Houben, Becker et al. 2004, Samowitz, Sweeney et al. 2005, Riesco-Eizaguirre, Gutierrez-Martinez et al. 2006). Anhand dieses fragmentbasierten Ansatzes wurde der Wirkstoff Vemurafenib, ein B-RAF-Inhibitor, von Plexikon und Roche gegen fortgeschrittenen und metastasierenden Hautkrebs entwickelt und im Jahre 2011 zugelassen. Zudem sind momentan ca. 30 Substanzen aus der fragmentbasierten Wirkstoffentwicklung in klinischen Phasen (Aretz and Rademacher 2015). Speziell im Bereich der Antiinfektiva-Entwicklung gegen Gram-negative Erreger bietet der fragmentbasierte Ansatz im Vergleich zum klassischen HTS von Substanzbibliotheken einen besonderen Vorteil: Da die Substanzbibliotheken meist für eukaryotische Zielstrukturen optimiert sind, können diese Substanzen die sehr komplexe Zellwand speziell der Gram-negativen Bakterien schlecht durchdringen und werden daher von diesen Pathogenen nur unzureichend aufgenommen. In dem fragmentbasierten Ansatz wurde in Bezug auf die Art der daraus entstehenden Wirkstoffen jedoch keine Vorselektion vorgenommen, so dass diesem für den medizinischen Erfolg der daraus abgeleiteten Substanzen entscheidenden Aspekt der Aufnahme in Gram-negative Bakterien frühzeitig im Design des Substanzgerüsts Rechnung getragen werden kann.

Zusammenfassend wurden im Rahmen dieser Arbeit erste Versuche zur Entwicklung von spezies-spezifischen Antiinfektiva durchgeführt. Die hochaufgelöste Kristallstruktur ermöglicht die Suche nach neuen Inhibitoren gegen die FtgGT mit Hilfe verschiedener Methoden zur Wirkstoffentwicklung. Diese Treffersubstanzen konnten mit dem in dieser Arbeit validierten enzymatischen FgGT Aktivitätsassay auf ihren inhibitorischen Effekt untersucht werden. Der fragmentbasierte Ansatz wird in der Arbeitsgruppe weiterhin verfolgt und hat gute Voraussetzungen Substanzen zu identifizieren, die zur fragmentbasierten Wirkstoffentwicklung dienen. Andere Möglichkeiten für die

Entwicklung von Antiinfektiva wären weiterhin das *in silico* Screening oder auch ein FtgGT strukturbasiertes Design von Substanzen (*de novo design of tailored compounds*). Eine Identifizierung von FtgGT Inhibitoren mit den hier beschriebenen Methoden würde die Entwicklung von neuen Antiinfektiva ermöglichen, die eine Kreuzreaktion mit anderen Bakterien und dem humanen Homolog vermeiden. Für die Untersuchung des Bindungsmodus möglicher FtgGT Inhibitoren an das Enzym wäre ein weiteres Ziel „soakable crystals“ zu erhalten, die nach Kristallisation mit verschiedenen löslichen Inhibitoren inkubiert werden können. Nach Einlagerung des jeweiligen Inhibitors kann die Inhibitor-gebundene Struktur gelöst werden und somit detaillierte Information über die genaue Interaktion des Inhibitors mit dem Enzym erhalten werden.

### **4.3 Antikörper als Inhibitoren oder FtgGT als Bestandteils eines Impfstoffes**

Die von der Firma BioGenes GmbH (Berlin) generierten polyklonalen Antikörper gegen FtgGT zeigten eine konzentrationsabhängigen inhibitorischen Effekt auf die FtgGT im validierten enzymatischen FgGT Aktivitätsassay. In der Arbeitsgruppe wurden ähnliche Ergebnisse für die *H. pylori* gGT beobachtet. Die mit *H. pylori* gGT immunisierten Mäuse bildeten Antikörper, die die Aktivität der HpgGT – im Gegensatz zu anderen bei einer Infektion nachweisbaren Antikörper – hemmen konnten (nicht publizierte Daten). Somit könnte HpgGT als Impfstoff nicht nur zur Prophylaxe sondern auch zur Therapie genutzt werden. *Helicobacter pylori* ist als Karzinogen der Klasse 1 von der WHO eingestuft worden und verursacht eine chronische Entzündung mit zum Teil ausgeprägter Immunantwort, die ineffektiv ist. *Helicobacter pylori* kann trotz Immunantwort im Wirt überleben, die vorhandene Antikörperantwort ist nicht ausreichend und die Entzündung kann sich zum Magenkrebs entwickeln.

Die Ergebnisse in dieser Arbeit deuten darauf hin, dass die FtgGT als Vakzine-Bestandteil möglicherweise eine Induktion von aktivitätshemmenden Antikörpern induzieren könnte. Nachdem die gGT für das Wachstum von *F. tularensis* essentiell ist (Alkhuder, Meibom et al. 2009), könnte somit durch Immunisierung mit der FtgGT eine Schutzwirkung erzielt werden. Es kann

ausgeschlossen werden, dass die FtgGT pAk einen unspezifischen Effekt auf die FgGT Aktivität ausüben, da die pAk Kontrolle, ein Kaninchenserum gegen ein unverwandtes Protein, keinen Effekt auf die Aktivität zeigte. Allerdings müsste für die Abschätzung der Spezifität des FtgGT pAk, ein gGT pAk einer anderen Spezies noch getestet werden. Weitere Validierungen im Mausmodell sollten sowohl für *F. tularensis* LVS als auch für den virulenteren Stamm Schu S4 durchgeführt werden. Jones *et al.* weisen darauf hin, dass z. B. die Expression der *Francisella* Pathogenitätsinsel (FPI) Gene im Stamm Schu S4 drei mal höher ist als für den attenuierten Stamm LVS. Antikörper, die gegen *F. tularensis* LPS und Kapsel generiert wurden, zeigten in murinen Infektionsmodellen gegen LVS, jedoch nicht gegen dem virulenten Stamm Schu S4 einen Schutz (Jones, Faron *et al.* 2014). Solch einen Effekt würde man für die FtgGT Antikörper nicht erwarten, da die FtgGT für das intrazelluläre Wachstum essentiell ist.

Im Gegensatz zu einem Lebendimpfstoff hätte solch ein FtgGT Vakzine mehrere Vorteile. Lebendimpfstoffe werden in der Regel etwas schlechter vertragen und bergen das Risiko einer Rückmutation und die damit verbundenen Auslösung der Erkrankung (meist in abgeschwächter Form). Bisher gibt es den attenuierten Stamm LVS als Lebendimpfstoff, der bisher nicht zugelassen ist. Als eine Alternative zu diesem Impfstoff setzen Ireland *et al.* auf  $\Delta$ gGT-Mutanten (auf Basis des LVS-Stammes) im Hinblick auf die Entwicklung eines Impfstoffes (Ireland, LeButt *et al.* 2011).

Im Falle der FtgGT als Vakzin stellt sich ein ganz anderes Problem dar. Im Gegensatz zu dem Erreger *H. pylori* handelt es sich bei dem Erreger *F. tularensis* um ein intrazelluläres Bakterium, und somit ist die Zugänglichkeit für die Antikörper erstens zum intrazellulären Erreger und zweitens zum Enzym FtgGT im Periplasma bzw. Cytoplasma nicht gegeben. Bisher sind in der Literatur keine Mechanismen beschrieben, die den Transport von Antikörper in eine Zelle ermöglichen. Jedoch können die generierten polyklonalen Antikörper in einem Pharmakophormodell hilfreiche Erkenntnisse für die Entwicklung eines neuen Wirkstoffes (*Small Molecule Inhibitors*) gegen FtgGT liefern. In solch einem Modell werden die Wechselwirkungen – Wasserstoffbrückenbindungen, ionische Wechselwirkungen, sowie elektrostatische und hydrophobe Interaktionen – der polyklonalen Antikörper mit der FtgGT (Target) beobachtet

und Aufschluss über die pharmakologische Wirkung der polyklonalen Antikörper geben. Basierend auf dieser Wechselwirkung können Phamakophore bzw. *Small Molecule Inhibitors* abgeleitet werden oder bekannte Pharmakophore Datenbanken auf potenzielle FtgGT Inhibitoren durchsucht werden.

Tularämie ist zwar eine seltene Zoonose, die von *Francisella* verursacht wird, jedoch treten immer wieder neue Epidemien auf, wie kürzlich im Kosovo (Ende 2014/Anfang 2015, Quelle Robert-Koch Institut). *Francisella* könnte als biologische Waffe eingesetzt werden. Nach 9/11 und den Anthrax Anschlägen 2001 in den USA wurde das Bewusstsein – Einsatz von biologischen Waffen auch in der heutigen Zeit – wieder geweckt. Dies verdeutlicht wie wichtig es ist, Eigenschaften und Struktur des Erregers und die Immunantwort im Menschen besser zu verstehen, um neue Antiinfektiva und Impfstoffe zu entwickeln.

## 5 Verzeichnisse

### 5.1 Abkürzungsverzeichnis

Die Aminosäuren wurden gemäß des Einbuchstaben- oder Dreibuchstaben-Codes abgekürzt.

Å	Ångström ( $1 \text{ Å} = 10^{-10} \text{ m}$ )
AEX	Anionenaustauschchromatographie
AIM2	<i>Absent in Melanoma-2</i>
Ak	Antikörper
Amp <sup>r</sup>	Ampicillin-Resistenz
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure
ASC	<i>Apoptosis-associated speck-like protein containing CARD</i>
ATP	Adenosintriphosphat
A <sub>x</sub>	Absorption bei einer Wellenlänge x nm
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin ( <i>bovine serum albumine</i> )
CDC	Zentren für Krankheitskontrolle und Prävention ( <i>Centers for Disease Control and Prevention</i> , Behörde der USA)
CEX	Kationenaustauschchromatographie
C-terminal	Carboxyterminales Ende einer Polypeptidkette
CV	Variationskoeffizient
d	Schichtdicke der Küvette [cm]

Da	Dalton [ $\frac{\text{g}}{\text{mol}}$ ]
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphate
dsDNA	doppelsträngige Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EEA1	<i>early endosom antigen 1</i>
EFPIA	<i>European Federation of Pharmaceutical Industries and Associations</i>
<i>et al.</i>	und andere (Autoren) ( <i>et alii</i> )
EP	Endpunkt, Endabsorption
FCP	Francisella enthaltene Phagosom
FgGT	<i>Francisella</i> gamma-Glutamyltranspeptidase
FtgGT	<i>Francisella tularensis subsp. holarctica</i> $\gamma$ -Glutamyltranspeptidase
FPI	<i>Francisella</i> Pathogenitätsinsel ( <i>Pathogenicity Island</i> )
g	Erdbeschleunigung (Angabe für relative Zentrifugalbeschleunigung)
gGT	$\gamma$ -Glutamyltranspeptidase
GTP	Guanosintriphosphat
HIC	Hydrophobe Interaktionschromatographie
HRP	<i>Horseradish Peroxidase</i>
HTS	Hochdurchsatz-Screening ( <i>High-Throughput-Screening</i> )
GSH	Glutathion
h	Stunde(n)

HpgGT	<i>Helicobacter pylori</i> $\gamma$ -Glutamyltranspeptidase
IFN-1	Interferon Typ I
IMAC	Metallchelat-Affinitätschromatographie ( <i>Immobilized metal affinity chromatography</i> )
IMI	<i>Innovative Medicines Initiative</i>
IRF-3	Interferon <i>regulatory factor 3</i>
ISS	<i>in silico</i> Screening
Kan	Kanamycin
kDa	kiloDalton ( $1 \cdot 10^3 \frac{\text{g}}{\text{mol}}$ )
$K_M$	Michaelis-Konstante, entspricht der Enzymkonzentration, bei der halbmaximale Geschwindigkeit erreicht ist
LB	Luria Bertoni
LPS	Lipopolysaccharid, bakterienspezifische Zellwandbestandteile
M	Molar (mol/l)
MALDI-MS	Massenspektroskopie ( <i>Matrix assisted laser desorption/ionization</i> )
MHC	Hapthistokompatibilitätskomplex
MIH	Institut für Medizinische Mikrobiologie
min	Minute(n)
MPa	Megapascal ( $1 \cdot 10^3 \text{ Pa}$ )
MviN	<i>Francisella tularensis</i> lipid/poly saccharide (MOP) transporter protein
N-terminal	Aminoterminales Ende einer Polypeptidkette
NMR	Kernspinresonanzspektroskopie

OD <sub>x</sub>	optische Dichte bei der Wellenlänge x nm
OM	Outer Membran
ori	Replikationsstartpunkt eines Plasmids ( <i>origin of replication</i> )
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
qPCR	Realtime PCR
R-Faktor	<i>reliability factor</i>
RKI	Robert-Koch-Institut
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur [°C]
s	Sekunde(n)
SDS	Natriumdodecylsulfat ( <i>sodium dodecyl sulfate</i> )
SEC	Gelfiltrationschromatographie ( <i>Size exclusion chromatography</i> )
SMIs	<i>Small Molecule Inhibitors</i>
SRA	<i>Sequence Read Archive</i>
subsp.	Subspezies
SUMO	kleiner Ubiquitin-verwandter Modifikator ( <i>Small Ubiquitin-related Modifier</i> )
SV	Säulenvolumen
TEMED	N, N, N', N' - Tetramethylethylendiamin
T <sub>M</sub>	Schmelztemperatur [°C]
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan

TUM	Technische Universität München
U	Unit; eine Unit entspricht der Menge an Enzym, die unter Standardbedingungen 1 $\mu\text{mol}$ Substrat pro Minute umsetzt.
UE	Untereinheit
Ü. N	über Nacht
V	Volt
$V_0$	Anfangsgeschwindigkeit
v. a.	vor allem
vATPase	vakuolare Adenosintriphosphatase
Vol	Volumen [l]
w/v	Masse pro Volumen ( <i>weight per volume</i> )
$0,1\% A_x$	spezifischer Extinktionskoeffizient bei x nm
$\lambda$	Wellenlänge [nm]
$\epsilon_x$	molarer Extinktionskoeffizient bei der Wellenlänge x [ $\frac{1}{\text{M cm}}$ ]
z. B.	zum Beispiel

## 5.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 <i>F. tularensis</i> intrazellulärer Zyklus in einer Makrophage. ....	11
Abbildung 2 Glutathionabbau bzw. Hydrolyse- und Transpeptidierungsreaktion der gGT. .....	27
Abbildung 3 Prinzip des gGT Aktivitätsassays (abgewandelt von Wickham, Regan et al. 2012). ....	61
Abbildung 4 PCR Produkte der FgGT aus genomischer DNA in einem 1 % Agarosegel. ....	68
Abbildung 5 Restriktionsverdau der FgGT PCR-Produkte und des Vektors pET28bSUMO. .....	68
Abbildung 6 Screening PCR für FgGT <i>holarctica</i> Klone. ....	68
Abbildung 7 Klonierte <i>Francisella tularensis subsp. holarctica</i> gGT mit SUMO-Tag: Vektor Karte. ....	69
Abbildung 8 Klonierte <i>Francisella noatunensis</i> gGT mit SUMO-Tag: Vektor Karte. ....	69
Abbildung 9 Testexpression: SDS-PAGE von Gesamtllysaten von jeweils fünf Arctic Express pET28bSUMO FgGT Klonen. ....	71
Abbildung 10 Westernblot gegen 6x-His der Testexpressionslysate der Arctic Express pET28bSUMO FgGT Klone (s. Abbildung 9). ....	71
Abbildung 11 <i>Francisella</i> gGT (FgGT) Reinigung. ....	73
Abbildung 12 SUMO-Verdau der FgGTs. ....	74
Abbildung 13 Sequenzalignment Alignment der für die Substratbindung und – Umsetzung wichtigen Sequenzbereichen verschiedener gGT Proteine. ....	75
Abbildung 14 FgGTs Michelis-Menten-Kurven für verschiedene pH-Werte. ....	77
Abbildung 15 Stabilität der FtgGT in verschiedenen Lagerpuffer. ....	79
Abbildung 16 Akzeptorsubstanzen im Aktivitätsassay mit L-gGpNA als Substrat. ....	80
Abbildung 17 Vergleich der gGpNA Isoformen D-gGpNA und L-gGpNA im FgGT Aktivitätsassay. ....	81
Abbildung 18 Gereinigte rekombinante FgGT <i>holarctica</i> (FtgGT) auf dem coomassiegefärbten SDS-Gel. ....	82
Abbildung 19 FtgGT Stabilität im Aktivitätsassay. ....	82
Abbildung 20 L-gGpNA Stabilität nach Inkubation bei unterschiedlichen Temperaturen. ....	83
Abbildung 21 4 h Kinetik bei verschiedenen FtgGT Konzentrationen. ....	84
Abbildung 22 Korrelation der Kinetik – und Endpunktmessung bei einer Acivicin- Titration. ....	85

Abbildung 23 4 h Kinetik der FtgGT im Aktivitätsassay für die Berechnung des Signal/Hintergrund-Verhältnisses und dem Z'	85
Abbildung 24 Mess- und Readout-Stabilität des Endpunktes innerhalb einer 96 well Platte.	87
Abbildung 25 Toleranz der Enzymaktivität gegenüber steigender DMSO Mengen.	87
Abbildung 26 Vergleich der inhibitorischen Wirkung der Kaninchenserum 24331 und 24332 relativ zur PBS Kontrolle (ohne Serumzugabe).	91
Abbildung 27 Relativer Vergleich der Kaninchenserum als mögliche FtgGT Inhibitoren.	91
Abbildung 28 Chromatogramm der Ausschlusschromatographie (SEC). Die Fraktionen C10-D2 (grau hinterlegt) wurden für die Kristallisation verwendet.	93
Abbildung 29 SDS-PAGE und FgGT Aktivitätsassay der SEC Fraktionen.	93
Abbildung 30 Kristallstrukturvergleich der <i>Francisella tularensis subsp. holarctica</i> gGT vs. <i>Helicobacter pylori</i> gGT.	96
Abbildung 31 Chromatogramm der Anionenaustausch-Chromatographie (AEC) der endogenen FtgGT.	97
Abbildung 32 FgGT Aktivitätsassay der eluierten AEC-Fraktionen.	98
Abbildung 33 Coomassie gefärbte SDS-PAGE der AEC- Fraktionen (endogene FtgGT).	98
Abbildung 34 Chromatogramm der Hydrophoben Interaktionschromatographie (HIC) der endogenen FtgGT.	99
Abbildung 35 FgGT Aktivitätsassay der eluierten HIC-Fraktionen.	99
Abbildung 36 Detektion der angereicherten endogenen FtgGT (HIC-Fraktionen) im Vergleich zur rekombinant gereinigten FtgGT im Westernblot (WB).	100
Abbildung 37 Maus-Hybridomaüberstände gegen rekombinante His-getagte FtgGT im Westernblot.	101
Abbildung 38 Hybridomaüberstände in verschiedenen Verdünnungen gegen Gesamtllysat von FtgGT überexprimierenden <i>E. coli</i> .	102
Abbildung 39 Ratten-Hybridomaüberstände gegen rekombinante FtgGT im Westernblot.	103
Abbildung 40 Ratten-Hybridomaüberstände in verschiedenen Verdünnungen gegen rekombinante FtgGT im Westernblot.	103
Abbildung 41 Maus- und Ratten-Hybridomaüberstände im Westernblot gegen Gesamtllysat des attenuierten <i>F. t. holarctica</i> LVS Stammes.	104
Abbildung 42 Polyklonales Kaninchenserum 24431 gegen rekombinante FtgGT im Westernblot.	106

Abbildung 43 Polyklonales Kaninchenserum 24432 gegen rekombinante FtgGT im Westernblot.....	106
Abbildung 44 Polyklonale Kaninchenseren gegen <i>E. coli</i> Bakterienlysate mit überexprimierter FtgGT.....	107
Abbildung 45 Relative Darstellung der enzymatischen endogenen FtgGT Aktivität in verschiedenen Bakterien-Fractionen.....	108
Abbildung 46 Screening der Priaxon Substanzbibliothek im FgGT Aktivitätsassay (Substanzen 1-17).....	152
Abbildung 47 Screening der Priaxon Substanzbibliothek im FgGT Aktivitätsassay (Substanzen 18-27).....	153
Abbildung 48 Screening der Priaxon Substanzbibliothek im FgGT Aktivitätsassay (Substanzen 28-39).....	154
Abbildung 49 Screening der Priaxon Substanzbibliothek im FgGT Aktivitätsassay (Substanzen 40-61).....	155
Abbildung 50 Screening der Priaxon Substanzbibliothek im FgGT Aktivitätsassay (Substanzen 62-82).....	156
Abbildung 51 Screening der Priaxon Substanzbibliothek im FgGT Aktivitätsassay (Substanzen 83-104).....	157
Abbildung 52 Screening der Priaxon Substanzbibliothek im FgGT Aktivitätsassay (Substanzen 105-126).....	158
Abbildung 53 Screening der Priaxon Substanzbibliothek im FgGT Aktivitätsassay (Substanzen 127-142).....	159
Abbildung 54 Screening der Priaxon Substanzbibliothek im FgGT Aktivitätsassay (Substanzen 143-164).....	160
Abbildung 55 Screening der Priaxon Substanzbibliothek im FgGT Aktivitätsassay (Substanzen 165-186).....	161
Abbildung 56 Screening der Priaxon Substanzbibliothek im FgGT Aktivitätsassay (Substanzen 187-207).....	162
Abbildung 57 Screening der Priaxon Substanzbibliothek im FgGT Aktivitätsassay (Substanzen 208-229).....	163
Abbildung 58 Screening der Priaxon Substanzbibliothek im FgGT Aktivitätsassay (Substanzen 230-251).....	164
Abbildung 59 Screening der Priaxon Substanzbibliothek im FgGT Aktivitätsassay (Substanzen 252-273).....	165

---

Abbildung 60 Screening der Priaxon Substanzbibliothek im FgGT Aktivitätsassay (Substanzen 274-295).....	166
Abbildung 61 Screening der Priaxon Substanzbibliothek im FgGT Aktivitätsassay (Substanzen 296-317).....	167
Abbildung 62 Screening der Priaxon Substanzbibliothek im FgGT Aktivitätsassay (Substanzen 318-339).....	168
Abbildung 63 Screening der Priaxon Substanzbibliothek im FgGT Aktivitätsassay (Substanzen 340-361).....	169
Abbildung 64 Screening der Priaxon Substanzbibliothek im FgGT Aktivitätsassay (Substanzen 362-383).....	170
Abbildung 65 Screening der Priaxon Substanzbibliothek im FgGT Aktivitätsassay (Substanzen 384-405).....	171
Abbildung 66 Screening der kommerziell erhältlichen Substanzen 1-5 im FgGT Aktivitätsassay. ....	172
Abbildung 67 Screening der kommerziell erhältlichen Substanzen 6-27 im FgGT Aktivitätsassay.....	173

### 5.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Verschiedene Formen der Tularämie beim Menschen (adaptiert von Tarnvik, Priebe et al. 2004, Harik 2013).....	19
Tabelle 2: PCR-Primer für die FgGT .....	31
Tabelle 3: Restriktionsenzyme .....	32
Tabelle 4: Primäre Antikörper.....	33
Tabelle 5: Sekundäre Antikörper.....	33
Tabelle 6: PCR-Protokoll, FgGT Amplifikation aus genomischer <i>Francisella</i> DNA .....	48
Tabelle 7: PCR-Programm, FgGT Amplifikation aus genomischer <i>Francisella</i> DNA .....	49
Tabelle 8: PCR-Produkte der FgGT Amplifikations-PCR .....	49
Tabelle 9: Screening PCR-Protokol .....	49
Tabelle 10: Screening PCR-Programm .....	50
Tabelle 11 Molekulargewichte (MW) und Extinktionskoeffiziente verschiedener <i>Francisella</i> Stämme.....	60
Tabelle 12 Überblick der Assay Validierungsanforderungen und –ergebnisse.....	88
Tabelle 13 Parameter und Statistiken der Datensammlung und Verfeinerung.....	95

## 5.4 Literaturverzeichnis

- Ahluwalia, G. S., J. L. Grem, Z. Hao and D. A. Cooney (1990). "Metabolism and action of amino acid analog anti-cancer agents." *Pharmacol Ther* **46**(2): 243-271.
- Al-Khodor, S. and Y. Abu Kwaik (2010). "Triggering Ras signalling by intracellular *Francisella tularensis* through recruitment of PKC $\alpha$  and beta1 to the SOS2/GrB2 complex is essential for bacterial proliferation in the cytosol." *Cell Microbiol* **12**(11): 1604-1621.
- Alkhuder, K., K. L. Meibom, I. Dubail, M. Dupuis and A. Charbit (2009). "Glutathione provides a source of cysteine essential for intracellular multiplication of *Francisella tularensis*." *PLoS Pathog* **5**(1): e1000284.
- Anthony, L. D., R. D. Burke and F. E. Nano (1991). "Growth of *Francisella* spp. in rodent macrophages." *Infect Immun* **59**(9): 3291-3296.
- Aretz, J. and C. Rademacher (2015). Fragmentbasierte Wirkstoffentwicklung. *Nachrichten aus der Chemie*. **63**: 116-121.
- Asare, R. and Y. A. Kwaik (2010). "Exploitation of host cell biology and evasion of immunity by *Francisella tularensis*." *Front Microbiol* **1**: 145.
- Balagopal, A., A. S. MacFarlane, N. Mohapatra, S. Soni, J. S. Gunn and L. S. Schlesinger (2006). "Characterization of the receptor-ligand pathways important for entry and survival of *Francisella tularensis* in human macrophages." *Infect Immun* **74**(9): 5114-5125.
- Barker, J. R., A. Chong, T. D. Wehrly, J. J. Yu, S. A. Rodriguez, J. Liu, J. Celli, B. P. Arulanandam and K. E. Klose (2009). "The *Francisella tularensis* pathogenicity island encodes a secretion system that is required for phagosome escape and virulence." *Mol Microbiol* **74**(6): 1459-1470.
- Bauerfeind, R., P. Kimmig, H. G. Schiefer, T. Schwarz, W. Slenczka and H. Zahner (2013). *Zoonosen*, Deutsche Ärzte-Verlag GmbH.
- Boanca, G., A. Sand and J. J. Barycki (2006). "Uncoupling the enzymatic and autoprocessing activities of *Helicobacter pylori* gamma-glutamyltranspeptidase." *J Biol Chem* **281**(28): 19029-19037.
- Boanca, G., A. Sand, T. Okada, H. Suzuki, H. Kumagai, K. Fukuyama and J. J. Barycki (2007). "Autoprocessing of *Helicobacter pylori* gamma-glutamyltranspeptidase leads to the formation of a threonine-threonine catalytic dyad." *J Biol Chem* **282**(1): 534-541.
- Bolz, C. (2013). *Untersuchungen zum biochemischen Wirkmechanismus der Helicobacter pylori gamma-Glutamyltranspeptidase*, Technische Universität München.
- Bolz, C., N. C. Bach, H. Meyer, G. Muller, M. Dawidowski, G. Popowicz, S. A. Sieber, A. Skerra and M. Gerhard (2016). "Comparison of enzymatic properties and small molecule inhibition of gamma-glutamyltranspeptidases from pathogenic and commensal bacteria." *Biol Chem*.
- Bradford, M. M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." *Anal Biochem* **72**: 248-254.
- Brannigan, J. A., G. Dodson, H. J. Duggleby, P. C. Moody, J. L. Smith, D. R. Tomchick and A. G. Murzin (1995). "A protein catalytic framework with an N-terminal nucleophile is capable of self-activation." *Nature* **378**(6555): 416-419.
- Braun, V. and G. Winkelmann (1987). "Microbial iron transport: structure and function of siderophores." *Progr Biochem Med* **5**: 67-99.
- Brunger, A. T. (1992). "Free R value: a novel statistical quantity for assessing the accuracy of crystal structures." *Nature* **355**(6359): 472-475.
- Buchan, B. W., R. L. McCaffrey, S. R. Lindemann, L. A. Allen and B. D. Jones (2009). "Identification of migR, a regulatory element of the *Francisella tularensis* live vaccine

- strain *iglABCD* virulence operon required for normal replication and trafficking in macrophages." *Infect Immun* **77**(6): 2517-2529.
- Bumann, D., S. Aksu, M. Wendland, K. Janek, U. Zimny-Arndt, N. Sabarth, T. F. Meyer and P. R. Jungblut (2002). "Proteome analysis of secreted proteins of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*." *Infect Immun* **70**(7): 3396-3403.
- Burke, D. S. (1977). "Immunization against tularemia: analysis of the effectiveness of live *Francisella tularensis* vaccine in prevention of laboratory-acquired tularemia." *J Infect Dis* **135**(1): 55-60.
- Busiello, I., R. Acquaviva, A. Di Popolo, T. G. Blanchard, V. Ricci, M. Romano and R. Zarrilli (2004). "*Helicobacter pylori* gamma-glutamyltranspeptidase upregulates COX-2 and EGF-related peptide expression in human gastric cells." *Cell Microbiol* **6**(3): 255-267.
- Checroun, C., T. D. Wehrly, E. R. Fischer, S. F. Hayes and J. Celli (2006). "Autophagy-mediated reentry of *Francisella tularensis* into the endocytic compartment after cytoplasmic replication." *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(39): 14578-14583.
- Chevalier, C., J. M. Thiberge, R. L. Ferrero and A. Labigne (1999). "Essential role of *Helicobacter pylori* gamma-glutamyltranspeptidase for the colonization of the gastric mucosa of mice." *Mol Microbiol* **31**(5): 1359-1372.
- Child, R., T. D. Wehrly, D. Rockx-Brouwer, D. W. Dorward and J. Celli (2010). "Acid phosphatases do not contribute to the pathogenesis of type A *Francisella tularensis*." *Infect Immun* **78**(1): 59-67.
- Chong, A., T. D. Wehrly, V. Nair, E. R. Fischer, J. R. Barker, K. E. Klose and J. Celli (2008). "The early phagosomal stage of *Francisella tularensis* determines optimal phagosomal escape and *Francisella* pathogenicity island protein expression." *Infect Immun* **76**(12): 5488-5499.
- Clemens, D. L., B. Y. Lee and M. A. Horwitz (2004). "Virulent and avirulent strains of *Francisella tularensis* prevent acidification and maturation of their phagosomes and escape into the cytoplasm in human macrophages." *Infect Immun* **72**(6): 3204-3217.
- Clemens, D. L., B. Y. Lee and M. A. Horwitz (2005). "*Francisella tularensis* enters macrophages via a novel process involving pseudopod loops." *Infect Immun* **73**(9): 5892-5902.
- Colquhoun, D. J. and S. Duodu (2011). "*Francisella* infections in farmed and wild aquatic organisms." *Vet Res* **42**: 47.
- Daschkin, C. (2015). Combating Bacterial Infections with Novel Small-Molecule Therapeutics – Target Identification, Assay Development and Compound Screening Technische Universität München.
- Davis, B. J. and D. A. Erlanson (2013). "Learning from our mistakes: the 'unknown knowns' in fragment screening." *Bioorg Med Chem Lett* **23**(10): 2844-2852.
- Dennis, D. T., T. V. Inglesby, D. A. Henderson, J. G. Bartlett, M. S. Ascher, E. Eitzen, A. D. Fine, A. M. Friedlander, J. Hauer, M. Layton, S. R. Lillibridge, J. E. McDade, M. T. Osterholm, T. O'Toole, G. Parker, T. M. Perl, P. K. Russell, K. Tonat and B. Working Group on Civilian (2001). "Tularemia as a biological weapon: medical and public health management." *JAMA* **285**(21): 2763-2773.
- Drabick, J. J., R. B. Narayanan, J. C. Williams, J. W. Leduc and C. A. Nacy (1994). "Passive protection of mice against lethal *Francisella tularensis* (live tularemia vaccine strain) infection by the sera of human recipients of the live tularemia vaccine." *Am J Med Sci* **308**(2): 83-87.
- Eigelsbach, H. T., D. H. Hunter, W. A. Janssen, H. G. Dangerfield and S. G. Rabinowitz (1975). "Murine model for study of cell-mediated immunity: protection against death from fully virulent *Francisella tularensis* infection." *Infect Immun* **12**(5): 999-1005.

- Elkins, K. L., S. C. Cowley and C. M. Bosio (2007). "Innate and adaptive immunity to Francisella." Ann N Y Acad Sci **1105**: 284-324.
- Ellis, J., P. C. Oyston, M. Green and R. W. Titball (2002). "Tularemia." Clin Microbiol Rev **15**(4): 631-646.
- Emsley, P., B. Lohkamp, W. G. Scott and K. Cowtan (2010). "Features and development of Coot." Acta Crystallogr D Biol Crystallogr **66**(Pt 4): 486-501.
- Enderlin, G., L. Morales, R. F. Jacobs and J. T. Cross (1994). "Streptomycin and alternative agents for the treatment of tularemia: review of the literature." Clin Infect Dis **19**(1): 42-47.
- Ericsson, U. B., B. M. Hallberg, G. T. Detitta, N. Dekker and P. Nordlund (2006). "Thermofluor-based high-throughput stability optimization of proteins for structural studies." Anal Biochem **357**(2): 289-298.
- Fattorusso, R., D. Jung, K. J. Crowell, M. Forino and M. Pellecchia (2005). "Discovery of a novel class of reversible non-peptide caspase inhibitors via a structure-based approach." J Med Chem **48**(5): 1649-1656.
- Fernandes-Alnemri, T., J. W. Yu, C. Juliana, L. Solorzano, S. Kang, J. Wu, P. Datta, M. McCormick, L. Huang, E. McDermott, L. Eisenlohr, C. P. Landel and E. S. Alnemri (2010). "The AIM2 inflammasome is critical for innate immunity to Francisella tularensis." Nat Immunol **11**(5): 385-393.
- Ferrer, M., T. N. Chernikova, K. N. Timmis and P. N. Golyshin (2004). "Expression of a temperature-sensitive esterase in a novel chaperone-based Escherichia coli strain." Appl Environ Microbiol **70**(8): 4499-4504.
- Forino, M., D. Jung, J. B. Easton, P. J. Houghton and M. Pellecchia (2005). "Virtual docking approaches to protein kinase B inhibition." J Med Chem **48**(7): 2278-2281.
- Forsman, M., G. Sandstrom and A. Sjostedt (1994). "Analysis of 16S ribosomal DNA sequences of Francisella strains and utilization for determination of the phylogeny of the genus and for identification of strains by PCR." Int J Syst Bacteriol **44**(1): 38-46.
- Francis, E. (1919). "Deer-fly fever, or pahavant valley plague. A disease of man of hitherto unknown etiology." Public Health Rep. **34**: 2061-2062.
- Franco, R., O. J. Schoneveld, A. Pappa and M. I. Panayiotidis (2007). "The central role of glutathione in the pathophysiology of human diseases." Arch Physiol Biochem **113**(4-5): 234-258.
- Fulop, M., P. Mastroeni, M. Green and R. W. Titball (2001). "Role of antibody to lipopolysaccharide in protection against low- and high-virulence strains of Francisella tularensis." Vaccine **19**(31): 4465-4472.
- Gavrilin, M. A., I. J. Bouakl, N. L. Knatz, M. D. Duncan, M. W. Hall, J. S. Gunn and M. D. Wewers (2006). "Internalization and phagosome escape required for Francisella to induce human monocyte IL-1beta processing and release." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(1): 141-146.
- Gerhard, M., C. Schmees, P. Volland, N. Endres, M. Sander, W. Reindl, R. Rad, M. Oelsner, T. Decker, M. Mempel, L. Hengst and C. Prinz (2005). "A secreted low-molecular-weight protein from Helicobacter pylori induces cell-cycle arrest of T cells." Gastroenterology **128**(5): 1327-1339.
- Golovliov, I., V. Baranov, Z. Krocova, H. Kovarova and A. Sjostedt (2003). "An attenuated strain of the facultative intracellular bacterium Francisella tularensis can escape the phagosome of monocytic cells." Infect Immun **71**(10): 5940-5950.
- Griffin, A. J., D. D. Crane, T. D. Wehrly and C. M. Bosio (2015). "Successful protection against tularemia in C57BL/6 mice is correlated with expansion of Francisella tularensis-specific effector T cells." Clin Vaccine Immunol **22**(1): 119-128.

- Griffith, O. W. (1999). "Biologic and pharmacologic regulation of mammalian glutathione synthesis." *Free Radic Biol Med* **27**(9-10): 922-935.
- Grunow, R., A. Kalaveshi, A. Kuhn, G. Mulliqi-Osmani and N. Ramadani (2012). "Surveillance of tularaemia in Kosovo, 2001 to 2010." *Euro Surveill* **17**(28).
- Hanahan, D. (1983). "Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids." *J Mol Biol* **166**(4): 557-580.
- Hanigan, M. H., H. F. Frierson, Jr., P. E. Swanson and B. R. De Young (1999). "Altered expression of gamma-glutamyl transpeptidase in human tumors." *Hum Pathol* **30**(3): 300-305.
- Hann, M. M., A. R. Leach and G. Harper (2001). "Molecular complexity and its impact on the probability of finding leads for drug discovery." *J Chem Inf Comput Sci* **41**(3): 856-864.
- Harik, N. S. (2013). "Tularemia: epidemiology, diagnosis, and treatment." *Pediatr Ann* **42**(7): 288-292.
- Higgins, C. F., I. D. Hiles, G. P. Salmond, D. R. Gill, J. A. Downie, I. J. Evans, I. B. Holland, L. Gray, S. D. Buckel, A. W. Bell and et al. (1986). "A family of related ATP-binding subunits coupled to many distinct biological processes in bacteria." *Nature* **323**(6087): 448-450.
- Hollis, D. G., R. E. Weaver, A. G. Steigerwalt, J. D. Wenger, C. W. Moss and D. J. Brenner (1989). "*Francisella philomiragia* comb. nov. (formerly *Yersinia philomiragia*) and *Francisella tularensis* biogroup *novicida* (formerly *Francisella novicida*) associated with human disease." *J Clin Microbiol* **27**(7): 1601-1608.
- Houben, R., J. C. Becker, A. Kappel, P. Terheyden, E. B. Brocker, R. Goetz and U. R. Rapp (2004). "Constitutive activation of the Ras-Raf signaling pathway in metastatic melanoma is associated with poor prognosis." *J Carcinog* **3**(1): 6.
- Ida, T., H. Suzuki, K. Fukuyama, J. Hiratake and K. Wada (2014). "Structure of *Bacillus subtilis* gamma-glutamyltranspeptidase in complex with acivicin: diversity of the binding mode of a classical and electrophilic active-site-directed glutamate analogue." *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **70**(Pt 2): 607-614.
- Ireland, P. M., H. LeButt, R. M. Thomas and P. C. Oyston (2011). "A *Francisella tularensis* SCHU S4 mutant deficient in gamma-glutamyltransferase activity induces protective immunity: characterization of an attenuated vaccine candidate." *Microbiology* **157**(Pt 11): 3172-3179.
- Ireland, R., R. Wang, J. B. Alinger, P. Small and C. M. Bosio (2013). "*Francisella tularensis* SchuS4 and SchuS4 lipids inhibit IL-12p40 in primary human dendritic cells by inhibition of IRF1 and IRF8." *J Immunol* **191**(3): 1276-1286.
- Jones, B. D., M. Faron, J. A. Rasmussen and J. R. Fletcher (2014). "Uncovering the components of the *Francisella tularensis* virulence stealth strategy." *Front Cell Infect Microbiol* **4**: 32.
- Jones, J. W., N. Kayagaki, P. Broz, T. Henry, K. Newton, K. O'Rourke, S. Chan, J. Dong, Y. Qu, M. Roose-Girma, V. M. Dixit and D. M. Monack (2010). "Absent in melanoma 2 is required for innate immune recognition of *Francisella tularensis*." *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**(21): 9771-9776.
- Kadzhaev, K., C. Zingmark, I. Golovliov, M. Bolanowski, H. Shen, W. Conlan and A. Sjostedt (2009). "Identification of genes contributing to the virulence of *Francisella tularensis* SCHU S4 in a mouse intradermal infection model." *PLoS One* **4**(5): e5463.
- Kim, K. M., S. G. Lee, J. M. Kim, D. S. Kim, J. Y. Song, H. L. Kang, W. K. Lee, M. J. Cho, K. H. Rhee, H. S. Youn and S. C. Baik (2010). "*Helicobacter pylori* gamma-glutamyltranspeptidase induces cell cycle arrest at the G1-S phase transition." *J Microbiol* **48**(3): 372-377.

- King, J. B., M. B. West, P. F. Cook and M. H. Hanigan (2009). "A novel, species-specific class of uncompetitive inhibitors of gamma-glutamyl transpeptidase." *J Biol Chem* **284**(14): 9059-9065.
- Kohler, G. and C. Milstein (1975). "Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity." *Nature* **256**(5517): 495-497.
- Kudelina, R. I. and N. G. Olsufiev (1980). "Sensitivity to macrolide antibiotics and lincomycin in *Francisella tularensis holarctica*." *J Hyg Epidemiol Microbiol Immunol* **24**(1): 84-91.
- La Scola, B., K. Elkarkouri, W. Li, T. Wahab, G. Fournous, J. M. Rolain, S. Biswas, M. Drancourt, C. Robert, S. Audic, S. Lofdahl and D. Raoult (2008). "Rapid comparative genomic analysis for clinical microbiology: the *Francisella tularensis* paradigm." *Genome Res* **18**(5): 742-750.
- Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." *Nature* **227**(5259): 680-685.
- Lai, X. H. and A. Sjostedt (2003). "Delineation of the molecular mechanisms of *Francisella tularensis*-induced apoptosis in murine macrophages." *Infect Immun* **71**(8): 4642-4646.
- Lai, X. H., S. Y. Wang, H. Edebro and A. Sjostedt (2003). "Francisella strains express hemolysins of distinct characteristics." *FEMS Microbiol Lett* **224**(1): 91-95.
- Lavinder, J. J., S. B. Hari, B. J. Sullivan and T. J. Magliery (2009). "High-throughput thermal scanning: a general, rapid dye-binding thermal shift screen for protein engineering." *J Am Chem Soc* **131**(11): 3794-3795.
- Leduc, D., J. Gallaud, K. Stingl and H. de Reuse (2010). "Coupled amino acid deamidase-transport systems essential for *Helicobacter pylori* colonization." *Infect Immun* **78**(6): 2782-2792.
- Li, S. J. and M. Hochstrasser (1999). "A new protease required for cell-cycle progression in yeast." *Nature* **398**(6724): 246-251.
- Lofgren, S., A. Tarnvik, G. D. Bloom and W. Sjoberg (1983). "Phagocytosis and killing of *Francisella tularensis* by human polymorphonuclear leukocytes." *Infect Immun* **39**(2): 715-720.
- Lofgren, S., A. Tarnvik, M. Thore and J. Carlsson (1984). "A wild and an attenuated strain of *Francisella tularensis* differ in susceptibility to hypochlorous acid: a possible explanation of their different handling by polymorphonuclear leukocytes." *Infect Immun* **43**(2): 730-734.
- Macielag, M. J. (2012). *Chemical Properties of Antimicrobials and Their Uniqueness*. In: Dougherty, T. J., Pucci, M. J. (Eds.) *Antibiotic Discovery and Development* (pp. 793-820), Springer, e-ISBN: 978-1-4614-1400-1.
- Malakhov, M. P., M. R. Mattern, O. A. Malakhova, M. Drinker, S. D. Weeks and T. R. Butt (2004). "SUMO fusions and SUMO-specific protease for efficient expression and purification of proteins." *J Struct Funct Genomics* **5**(1-2): 75-86.
- Mariathasan, S., D. S. Weiss, V. M. Dixit and D. M. Monack (2005). "Innate immunity against *Francisella tularensis* is dependent on the ASC/caspase-1 axis." *J Exp Med* **202**(8): 1043-1049.
- Marohn, M. E. and E. M. Barry (2013). "Live attenuated tularemia vaccines: recent developments and future goals." *Vaccine* **31**(35): 3485-3491.
- Martin, M. N., P. H. Saladores, E. Lambert, A. O. Hudson and T. Leustek (2007). "Localization of members of the gamma-glutamyl transpeptidase family identifies sites of glutathione and glutathione S-conjugate hydrolysis." *Plant Physiol* **144**(4): 1715-1732.

- McCaffrey, R. L. and L. A. Allen (2006). "Francisella tularensis LVS evades killing by human neutrophils via inhibition of the respiratory burst and phagosome escape." J Leukoc Biol **80**(6): 1224-1230.
- McCaig, W. D., A. Koller and D. G. Thanassi (2013). "Production of outer membrane vesicles and outer membrane tubes by Francisella novicida." J Bacteriol **195**(6): 1120-1132.
- McCoy, A. J., R. W. Grosse-Kunstleve, P. D. Adams, M. D. Winn, L. C. Storoni and R. J. Read (2007). "Phaser crystallographic software." J Appl Crystallogr **40**(Pt 4): 658-674.
- McGovern, K. J., T. G. Blanchard, J. A. Gutierrez, S. J. Czinn, S. Krakowka and P. Youngman (2001). "gamma-Glutamyltransferase is a Helicobacter pylori virulence factor but is not essential for colonization." Infect Immun **69**(6): 4168-4173.
- Meister, A., S. S. Tate and O. W. Griffith (1981). "Gamma-glutamyl transpeptidase." Methods Enzymol **77**: 237-253.
- Miethke, M. and M. A. Marahiel (2007). "Siderophore-based iron acquisition and pathogen control." Microbiol Mol Biol Rev **71**(3): 413-451.
- Mohapatra, N. P., A. Balagopal, S. Soni, L. S. Schlesinger and J. S. Gunn (2007). "AcpA is a Francisella acid phosphatase that affects intramacrophage survival and virulence." Infect Immun **75**(1): 390-396.
- Mohapatra, N. P., S. Soni, T. J. Reilly, J. Liu, K. E. Klose and J. S. Gunn (2008). "Combined deletion of four Francisella novicida acid phosphatases attenuates virulence and macrophage vacuolar escape." Infect Immun **76**(8): 3690-3699.
- Norqvist, A., K. Kuoppa and G. Sandstrom (1996). "Construction of a shuttle vector for use in Francisella tularensis." FEMS Immunol Med Microbiol **13**(3): 257-260.
- Olsufiev, N. G., O. S. Emelyanova and T. N. Dunayeva (1959). "Comparative study of strains of B. tularensis in the old and new world and their taxonomy." J Hyg Epidemiol Microbiol Immunol **3**: 138-149.
- Oyston, P. C., A. Sjostedt and R. W. Titball (2004). "Tularaemia: bioterrorism defence renews interest in Francisella tularensis." Nat Rev Microbiol **2**(12): 967-978.
- Pace, C. N., F. Vajdos, L. Fee, G. Grimsley and T. Gray (1995). "How to measure and predict the molar absorption coefficient of a protein." Protein Sci **4**(11): 2411-2423.
- Pechous, R. D., T. R. McCarthy and T. C. Zahrt (2009). "Working toward the future: insights into Francisella tularensis pathogenesis and vaccine development." Microbiol Mol Biol Rev **73**(4): 684-711.
- Phillips, K. and A. H. de la Pena (2011). "The combined use of the ThermoFluor assay and ThermoQ analytical software for the determination of protein stability and buffer optimization as an aid in protein crystallization." Curr Protoc Mol Biol **Chapter 10**: Unit10 28.
- Pompella, A., V. De Tata, A. Paolicchi and F. Zunino (2006). "Expression of gamma-glutamyltransferase in cancer cells and its significance in drug resistance." Biochem Pharmacol **71**(3): 231-238.
- Pugsley, A. P. (1993). "The complete general secretory pathway in gram-negative bacteria." Microbiol Rev **57**(1): 50-108.
- Rajaram, M. V., J. P. Butchar, K. V. Parsa, T. J. Cremer, A. Amer, L. S. Schlesinger and S. Tridandapani (2009). "Akt and SHIP modulate Francisella escape from the phagosome and induction of the Fas-mediated death pathway." PLoS One **4**(11): e7919.
- Reintjes, R., I. Dedushaj, A. Gjini, T. R. Jorgensen, B. Cotter, A. Lieftucht, F. D'Ancona, D. T. Dennis, M. A. Kosoy, G. Mulliqi-Osmani, R. Grunow, A. Kalaveshi, L. Gashi and I. Humolli (2002). "Tularemia outbreak investigation in Kosovo: case control and environmental studies." Emerg Infect Dis **8**(1): 69-73.

- Riesco-Eizaguirre, G., P. Gutierrez-Martinez, M. A. Garcia-Cabezas, M. Nistal and P. Santisteban (2006). "The oncogene BRAF V600E is associated with a high risk of recurrence and less differentiated papillary thyroid carcinoma due to the impairment of Na<sup>+</sup>/I<sup>-</sup> targeting to the membrane." *Endocr Relat Cancer* **13**(1): 257-269.
- Ritter, D. B. and R. K. Gerloff (1966). "Deoxyribonucleic acid hybridization among some species of the genus *Pasteurella*." *J Bacteriol* **92**(6): 1838-1839.
- Robert-Koch-Institut (2007). "Tularämie - Zum Vorkommen in Deutschland." *Epidemiologisches Bulletin* **Nr. 7**: 51-56.
- Robert-Koch-Institut (2015). "Neuer Tularämie-Ausbruch im Kosovo- auch Deutschland kann durch Einreisende betroffen sein" *Epidemiologisches Bulletin* **Nr. 9**: 63-68.
- Samowitz, W. S., C. Sweeney, J. Herrick, H. Albertsen, T. R. Levin, M. A. Murtaugh, R. K. Wolff and M. L. Slattery (2005). "Poor survival associated with the BRAF V600E mutation in microsatellite-stable colon cancers." *Cancer Res* **65**(14): 6063-6069.
- Sandberg, E. M., X. Ma, K. He, S. J. Frank, D. A. Ostrov and P. P. Sayeski (2005). "Identification of 1,2,3,4,5,6-hexabromocyclohexane as a small molecule inhibitor of jak2 tyrosine kinase autophosphorylation [correction of autophosphorylation]." *J Med Chem* **48**(7): 2526-2533.
- Sanger, F., S. Nicklen and A. R. Coulson (1977). "DNA sequencing with chain-terminating inhibitors." *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**(12): 5463-5467.
- Santic, M., C. Akimana, R. Asare, J. C. Kouokam, S. Atay and Y. A. Kwaik (2009). "Intracellular fate of *Francisella tularensis* within arthropod-derived cells." *Environ Microbiol* **11**(6): 1473-1481.
- Santic, M., R. Asare, I. Skrobonja, S. Jones and Y. Abu Kwaik (2008). "Acquisition of the vacuolar ATPase proton pump and phagosome acidification are essential for escape of *Francisella tularensis* into the macrophage cytosol." *Infect Immun* **76**(6): 2671-2677.
- Santic, M., M. Molmeret, J. R. Barker, K. E. Klose, A. Dekanic, M. Doric and Y. Abu Kwaik (2007). "A *Francisella tularensis* pathogenicity island protein essential for bacterial proliferation within the host cell cytosol." *Cell Microbiol* **9**(10): 2391-2403.
- Santic, M., G. Pavokovic, S. Jones, R. Asare and Y. A. Kwaik (2010). "Regulation of apoptosis and anti-apoptosis signalling by *Francisella tularensis*." *Microbes Infect* **12**(2): 126-134.
- Schmees, C., C. Prinz, T. Treptau, R. Rad, L. Hengst, P. Volland, S. Bauer, L. Brenner, R. M. Schmid and M. Gerhard (2007). "Inhibition of T-cell proliferation by *Helicobacter pylori* gamma-glutamyl transpeptidase." *Gastroenterology* **132**(5): 1820-1833.
- Schmerk, C. L., B. N. Duplantis, P. L. Howard and F. E. Nano (2009). "A *Francisella novicida* pdpA mutant exhibits limited intracellular replication and remains associated with the lysosomal marker LAMP-1." *Microbiology* **155**(Pt 5): 1498-1504.
- Schmitt, P., W. Splettstosser, M. Porsch-Ozcurumez, E. J. Finke and R. Grunow (2005). "A novel screening ELISA and a confirmatory Western blot useful for diagnosis and epidemiological studies of tularemia." *Epidemiol Infect* **133**(4): 759-766.
- Schulert, G. S. and L. A. Allen (2006). "Differential infection of mononuclear phagocytes by *Francisella tularensis*: role of the macrophage mannose receptor." *J Leukoc Biol* **80**(3): 563-571.
- Shibayama, K., K. Kamachi, N. Nagata, T. Yagi, T. Nada, Y. Doi, N. Shibata, K. Yokoyama, K. Yamane, H. Kato, Y. Iinuma and Y. Arakawa (2003). "A novel apoptosis-inducing protein from *Helicobacter pylori*." *Mol Microbiol* **47**(2): 443-451.
- Sjostedt, A. (2005). "In: Garrity G., Brenner, D.J., Krieg, N.R., Staley, J-R., eds. The Proteobacteria, Part B, Bergey's Manual of Systematic Bacteriology " *New York, NY, Springer*: 200-210.

- Sjostedt, A. (2007). "Tularemia: history, epidemiology, pathogen physiology, and clinical manifestations." *Ann N Y Acad Sci* **1105**: 1-29.
- Spletstoeser, W. D., I. Piechotowski, A. Buckendahl, D. Frangoulidis, P. Kaysser, W. Kratzer, P. Kimmig, E. Seibold and S. O. Brockmann (2009). "Tularemia in Germany: the tip of the iceberg?" *Epidemiol Infect* **137**(5): 736-743.
- Steele, S., J. Brunton, B. Ziehr, S. Taft-Benz, N. Moorman and T. Kawula (2013). "Francisella tularensis harvests nutrients derived via ATG5-independent autophagy to support intracellular growth." *PLoS Pathog* **9**(8): e1003562.
- Stein, R. L., C. DeCicco, D. Nelson and B. Thomas (2001). "Slow-binding inhibition of gamma-glutamyl transpeptidase by gamma-boroGlu." *Biochemistry* **40**(19): 5804-5811.
- Stenmark, S., H. Lindgren, A. Tarnvik and A. Sjostedt (2003). "Specific antibodies contribute to the host protection against strains of Francisella tularensis subspecies holarctica." *Microb Pathog* **35**(2): 73-80.
- Suzuki, H., H. Kumagai and T. Tochikura (1986). "gamma-Glutamyltranspeptidase from Escherichia coli K-12: purification and properties." *J Bacteriol* **168**(3): 1325-1331.
- Tarnvik, A., G. Sandstrom and A. Sjostedt (1996). "Epidemiological analysis of tularemia in Sweden 1931-1993." *FEMS Immunol Med Microbiol* **13**(3): 201-204.
- Telepnev, M., I. Golovliov and A. Sjostedt (2005). "Francisella tularensis LVS initially activates but subsequently down-regulates intracellular signaling and cytokine secretion in mouse monocytic and human peripheral blood mononuclear cells." *Microb Pathog* **38**(5-6): 239-247.
- Tjalsma, H., A. Bolhuis, J. D. Jongbloed, S. Bron and J. M. van Dijl (2000). "Signal peptide-dependent protein transport in Bacillus subtilis: a genome-based survey of the secretome." *Microbiol Mol Biol Rev* **64**(3): 515-547.
- Towbin, H., T. Staehelin and J. Gordon (1979). "Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications." *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**(9): 4350-4354.
- Tsai, J., J. T. Lee, W. Wang, J. Zhang, H. Cho, S. Mamo, R. Bremer, S. Gillette, J. Kong, N. K. Haass, K. Sproesser, L. Li, K. S. Smalley, D. Fong, Y. L. Zhu, A. Marimuthu, H. Nguyen, B. Lam, J. Liu, I. Cheung, J. Rice, Y. Suzuki, C. Luu, C. Settachatgul, R. Shellooe, J. Cantwell, S. H. Kim, J. Schlessinger, K. Y. Zhang, B. L. West, B. Powell, G. Habets, C. Zhang, P. N. Ibrahim, P. Hirth, D. R. Artis, M. Herlyn and G. Bollag (2008). "Discovery of a selective inhibitor of oncogenic B-Raf kinase with potent antimelanoma activity." *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**(8): 3041-3046.
- Ulland, T. K., B. W. Buchan, M. R. Ketterer, T. Fernandes-Alnemri, D. K. Meyerholz, M. A. Apicella, E. S. Alnemri, B. D. Jones, W. M. Nauseef and F. S. Sutterwala (2010). "Cutting edge: mutation of Francisella tularensis mviN leads to increased macrophage absent in melanoma 2 inflammasome activation and a loss of virulence." *J Immunol* **185**(5): 2670-2674.
- Vergauwen, B., K. Verstraete, D. B. Senadheera, A. Dansercoer, D. G. Cvitkovitch, E. Guedon and S. N. Savvides (2013). "Molecular and structural basis of glutathione import in Gram-positive bacteria via GshT and the cystine ABC importer TcyBC of Streptococcus mutans." *Mol Microbiol* **89**(2): 288-303.
- Weber, G. and N. Prajda (1994). "Targeted and non-targeted actions of anti-cancer drugs." *Adv Enzyme Regul* **34**: 71-89.
- Weiss, D. S., A. Brotcke, T. Henry, J. J. Margolis, K. Chan and D. M. Monack (2007). "In vivo negative selection screen identifies genes required for Francisella virulence." *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**(14): 6037-6042.
- WHO (2007). *WHO Guidelines for Tularaemia*, WHO Press.

- Wickham, S., N. Regan, M. B. West, V. P. Kumar, J. Thai, P. K. Li, P. F. Cook and M. H. Hanigan (2012). "Divergent effects of compounds on the hydrolysis and transpeptidation reactions of gamma-glutamyl transpeptidase." *J Enzyme Inhib Med Chem* **27**(4): 476-489.
- Wickham, S., N. Regan, M. B. West, J. Thai, P. F. Cook, S. S. Terzyan, P. K. Li and M. H. Hanigan (2013). "Inhibition of human gamma-glutamyl transpeptidase: development of more potent, physiologically relevant, uncompetitive inhibitors." *Biochem J* **450**(3): 547-557.
- Wilson, J. E., B. Katkere and J. R. Drake (2009). "Francisella tularensis induces ubiquitin-dependent major histocompatibility complex class II degradation in activated macrophages." *Infect Immun* **77**(11): 4953-4965.
- Wu, G., Y. Z. Fang, S. Yang, J. R. Lupton and N. D. Turner (2004). "Glutathione metabolism and its implications for health." *J Nutr* **134**(3): 489-492.
- Xu, K. and M. A. Strauch (1996). "Identification, sequence, and expression of the gene encoding gamma-glutamyltranspeptidase in Bacillus subtilis." *J Bacteriol* **178**(14): 4319-4322.
- Zhang, J. H., T. D. Chung and K. R. Oldenburg (1999). "A Simple Statistical Parameter for Use in Evaluation and Validation of High Throughput Screening Assays." *J Biomol Screen* **4**(2): 67-73.

## 6 Anhang

### 6.1 Signalsequenz der klonierten und gereinigten *Francisella* gGTs

Im Folgenden wurden sowohl die Nukleotidsequenzen als auch die Proteinsequenzen der klonierten und gereinigten *Francisella* gGTs angegeben:

#### *Francisella tularensis* subsp. *holarctica* gGT Sequenz aus NCBI:

Hydrophobe Signalsequenz (nicht in der klonierten Sequenz enthalten)

Forward-Primer FgGT hol (Primer Name: FgGT SUMO for)

Reverse-Primer FgGT hol (Primer Name: FgGT tul R)

>gi|89255449:755198-757003 *Francisella tularensis* subsp. *holarctica* LVS chromosome, complete genome

```
ATGCGTCGTTTTTTGTTATCTTATACTTATTCTGTTTTTAAAAATACACTGAGGTTATTAGTGAAAAAAT
TATTTGTAAACTTAATGTCATTGTTAATACTGCTACCAAGTTAACTCTAATTGCTGCACCAGTCCCTAC
AGGTTATGGTTTTATTCCCTATTCAAGAAGAGATGCAAATTGCTCAACCTTTTACTGCAACACATGGTATG
GTTTCTTCTCAAGAAGCTCTGGCAAGTAAAGTAGGCTTAGATATCCTAAAGCAAGGTGGTAATGCTGTAG
ATGCAGCTGTAGCTGTTGGTTTTGCTTTAGCTGTCACGCTACCAAGAGCTGGTAATCTCGCTGGTGGTGG
ATTTATGATTATACATCTACAAGATGGCAATAAGAATATAGCTATAAACTATCGTGAAAAAGCTCCAGCG
AAAGCATCTCGTGATATGTTTCTAAATGATAAAGGTGATATTGATTATGCTAAAGTTTTCTGGTTCATATA
GCGCATCTGGTGTTCCTGGTACTGTTGCATGCTTAATCGATGCACAACAAAAATATGGCAAATTAAACT
ATCACAAGTTATGAACCTGCTATCAAACCTGCTGAAGATGGTATTCCTGTAAGCTATGATCTTCACCAG
TCACTTGTAACTGCAAAACCATGGCTACAAAAATCTCCAGATGCGATGAAAATCTTTTATAAAAAAAGATG
GATCAGCCTATGAGGTAGGAGAAAATCCTAAAAACAGCCTGAACCTGCTAATAGTTTTAAAGCTAATTGCAAA
ACAAGGCAAAAAAGCTTTCTATGAAGGAGAAAATAGCTCATAAGATAGCCGATAGTATGGCTAAAAATGGT
GGTTTAATAACATTGCAAGATTTGAAAAATTATAATATTGAGGAGATGAAGCCAGTTAAGGGAACCTTATA
GAGGTTATACTATATATTCTATGCCGCCGCAAGTTCTGGTGGTGTGATTCTAATAGAATTATTAATAT
TCTGGAGAATTTTCCATTGCTGACTATGGTAACAATAGTGCTAAGACTATTAATCTTATGAGTAATGCG
ATGAGCTATGCTTATAATGATAGGAATCTGACTTAGGAGATCCAGATTTTGTCAAAATGGATTTAGCTA
AGTTTTTATCTAAGAAGTATGCAAAACAGATTGCTCAAAAGATAACTACAGATAAGCATATCCCTAGTAA
AGATATTAGTACTATAGATCCGGATGATCATGAAAAATTACAACTACACATTTTAGTATTATTGATAAA
GATGGTAATATGGTATCAAATACTTATACCTTAAATTATTCTTATGGAAGTGGTATTGTAGTACCAGGAA
CGGGAATTTTTTTAAATAACGAAATGGATGATTTGCTGCTAAAGTTGGCGAGGCAAATGTCTTTGGTTT
GGTTC AAGGTGAAGTAAATAC TGTGCGACCGAATAAACGACCATTAAGTTCAATGACTCCAACGATAGTA
TTAGATAATGATGGTAAACCATTTTAGCTACAGGTTCTCCTGGAGGAAGTCGTATTATTACAACAACGT
TACAAGTGATTCTAAATATCATTGATTTTAAATATGAATCTTCAAGCAGCAGTTAATAATCCTCGTATACA
TAGTCAATTATGGCCAGAAGAGATTGGTGTAGAGCAGGGTATATCTGTAGATACAATTAATCTACTTAAG
AAGATGGGTAACACTGTCACACCTTATGCTGCTATGGGAGCTGCTGAATCTGTAATGTCAGATGGACAAT
ATGTCATATGGAGCTGCAGATCCACGCAGAGCTA GCGCATTAGCTATAGGTTATTAA
```

Proteinsequenz:

>gi|89256149|ref|YP\_513511.1| gamma-glutamyltranspeptidase [*Francisella tularensis* subsp. *holarctica* LVS]

```
MRRFLLSYTYSVFNKTLRLLLVKLFVNLMSLLILLPSLTLIAAPVPTGYGFIPIQEEMQIAQPFTATHGM
VSSQEALASKVGLDILKQGGNAVDAAVAVGFALAVTLPRAGNLAGGGFMI IHLQDGNKNIAINYREKAPA
KASRDMFLNDKGDIDYAKVSGSYSASGVPGTVACLIDAQQKYGKLLKSQVIEPAIKLAEDGIPVSYDLHQ
SLVTAKPWLQKSPDAMKIFYKKDGSAYEVGEILKQPELANSLKLIKQKKAFFEIEIAHKIADSMKNG
GLITLQDLKNYNIEMKPVKGYTYRGTIYSMPSSGGVILIELLNILENPLSDYGNNSAKTINLMSNA
MSYAYNDRNSDLGDPDFVKMDLAKFLSKKYAKQIAQKITTDKHIPSKDISTIDPDDHEKLQTTFFSIIDK
DGNMVSNTYTLNYSYSGSIVVPGTGI FLNNEMDDFAAKVGEANVFGLVQGEVNTVAPNKRPLSSMPTIV
LDNDGKPFATGSPGGSRIITTTLQVILNIIDFNMNLQAAVNNPRIHSQLWPEEIGVEQGISVDTINLLK
KMGNTVTPYAAMGAAESVMSDQYVYGAADPRRASALAIGY
```

**Francisella tularensis subsp. tularensis gGT Sequenz aus NCBI:**

Hydrophobe Signalsequenz (nicht in der klonierten Sequenz enthalten)

Forward-Primer FgGT hol (Primer Name: FgGT SUMO for)

Reverse-Primer FgGT hol (Primer Name: FgGT tul R)

>gi|255961454:c1198904-1197099 Francisella tularensis subsp. tularensis  
SCHU S4 chromosome, complete genome

ATGCGTCGTTTTTTGTTATCTTATACTTATTCTGTTTTTAAAAATACACTGAGGTTATTAGTGAAAAAAT  
TATTTGTAACTTAATGTCATTGTTAATACTGCTACCAAGTTTAACTCTAATTGCTGCACCAGTCCCGAC  
AGGTTATGGTTTTATTCCCTATCCAAGAAGAGATGCAAATTGCTCAACCTGTTACTGCAACACATGGTATG  
GTTTCTTCTCAAGAAGCTCTGGCAAGTAAAGTAGGCTTAGATATCCTAAAGCAAGGTGGTAATGCTGTAG  
ATGCAGCTGTAGCTGTTGGTTTTGCTTTAGCTGTCACGCTACCAAGAGCTGGTAATCTCGCTGGTGGTGG  
ATTTATGATTATACATTTACAAGATGGCAATAAGAATATAGCTATAAACTATCGTGAAAAAGCTCCAGCA  
AAAGCATCTCGTGATATGTTTCTAAATGATAAAGGTGATATTGATTATGCTAAAGTTTCTGGTTCATATA  
GCGCATCTGGTGTTCCTGGTACTGTTGCAGGCTTAATCGATGCACAACAAAAATATGGCAAATTTAAACT  
ATCACAAGTTATTAACCTGCTATCAAACCTGCTGAAGATGGTATTCCTGTAAGCTATGATCTTCACCAG  
TCACTTGTAACTGCAAACCGTGGCTACAAAAATCTCCAGATGCGATGAAAATCTTTTATAAAAAAGATG  
GATCAGCCTATGAGGTAGGAGAAATCCTAAAACAGCCTGAACTTGCTAATAGTTTTAAAGCTAATTGCAAA  
ACAAGGCAAAAAAGCTTTCTATGAAGGAGAAATAGCTCATAAGATAGCCGATAGTATGGCTAAAAATGGT  
GGTTTAATAACATTGCAAGATTTGAAAAATTATAATATTGAGGAGATGAAGACAGTTAAGGGAACCTATA  
GAGTTTATACTATATATTCTATGCTGCCGCCAAGTTCTGGTGGTGTGATTCTAATAGAATTATTAATAT  
TCTGGAGAATTTTCCATTGTCTGACTATGGTAACAATAGTGCTAAGACTATTAATCTTATGAGTAATGCG  
ATGAGCTATGCTTATAATGATAGGAATTCTGACTTAGGAGATCCAGATTTTGTCAAAATGGATTTAGCTA  
AGTTTTTATCTAAGAAGTATGCAAACAGATTGCTCAAAGATAACTACAGATAAGCATATCCCTAGTAA  
AGATATTAGTACTATAGATCCGGATGATCATGAAAAATTACAACTACACATTTTAGTATTATTGATAAA  
GATGGTAATATGGTATCAAATACTTATACCTTAAATTATTCTTATGGAAGTGGTATTGTAGTACCAGGAA  
CGGGAATTTTTTTAAATAACGAAATGGATGATTTTCGCTGCTAAAGTTGGCGAGGCAAATGTCTTTGGTTT  
GGTTCAAGGTGAAGCAAATACTGTGCGACCGAATAAACGACCATTAAGTTCAATGACTCCAACGATAGTA  
TTAGATAAGGATGGTAAACCATTTTGTAGCTACAGGTTCTCCTGGAGGAAGTCGTATTATTACAACAACGT  
TACAAGTGATTCTAAATATCATTGATTTTAAATATGAATCTTCAAGCAGCAGTTAATAATCCTCGTATACA  
TAGTCAATTATGGCCAGAAGAGATTGGTGTAGAGCAGGGTATATCTGTAGATACAATTAATCTACTTAAG  
AAGATGGGTAACACTGTCACACCTTATGCTGCTATGGGAGCTGCTGAATCTGTAATGTCAGATGGACAAT  
ATGTCTATGGAGCTGCAGATCCACGCAGAGCTAGCGCATTAGCTATAGGTTATTAA

**Proteinsequenz:**

>gi|56708248|ref|YP\_170144.1| gamma-glutamyltranspeptidase [Francisella  
tularensis subsp. tularensis SCHU S4]

MRRFLLSYTYSVFNKTLRLLVKKLFFVNLMSLLILLPSLTLIAAPVPTGYGFIFIQEEMQIAQPVTATHGM  
VSSQEALASKVGLDILKQGGNAVDAAVAVGFALAVTLPRAGNLAGGGFMI IHLQDGNKNIAINYREKAPA  
KASRDMFLNDKGDIDYAKVSGSYSASGVPVGLVAGLIDAQQKYGKLLKSQVIKPAIKLAEDGIPVSYDLHQ  
SLVTAKPWLQKSPDAMKIFYKKDGSAYEVGEILKQPELANSLKLIKQKKAFFEYEGEIAHKIADSMKNG  
GLITLQDLKNYIEEMKTVKGTYRGYTIYSMLPPSSGGVILIELLNILENFPLSDYGNNNAKTINLMSNA  
MSYAYNDRNSDLGDPDFVKMDLAKFLSKYAKQIAQKITTDKHIPSKDISTIDPDDHEKLQTHFSIIDK  
DGNMVSNTYTLNYSYSGSIVVPGTGIFLNNEMDDFAAKVGEANVFGLVQGEANTVAPNKRPLSSMTP TIV

LDKDGPFLATGSPGGSRIITTTLQVILNIIDFNMNLQAAVNNPRIHSQLWPPEEIGVEQGISVDTINLLK  
KMGNTVTPYAAMGAAESVMSDGGQYVYGAADPRRASALAIGY

***Francisella tularensis subsp. novicida* gGT Sequenz aus NCBI:**

Hydrophobe Signalsequenz (nicht in der klonierten Sequenz enthalten)

Forward-Primer FgGT novi (Primer Name: FgGT SUMO for)

Reverse-Primer FgGT novi (Primer Name: FgGT nov R)

>gi|118496615:c1231642-1229837 Francisella novicida U112  
chromosome, complete genome

ATGCGTCGTTTTTTGTTATCTTATACTTATTCTGTTTTTAAAAATACACTGAGGTTATTAGTGAAAAAAT  
TATTTGTAACCTAATGTCATTGTTAATACTGCTACCAAGTTAACTCTAATTGCTGCACCAGTCCCGAC  
AGGTTATGGTTTTATTCCCTATCCAAGAAGAGATGCAAATTGCTCAACCTGTTACTGCGACACATGGTATG  
GTTTCTTCTCAAGAAGCTCTGGCAAGTAAAGTAGGCTTAGATATTCTAAAGCAAGGTGGTAATGCTGTAG  
ATGCAGCTGTAGCTGTTGGTTTTGCTTTAGCTGTACGCTACCAAGAGCTGGTAATCTCGCTGGTGGTGG  
ATTTATGATTATACATCTACAAGATGGCAATAAGAATATAGCTATAAACTATCGTGAAAAAGCTCCAGCA  
AAAGCATCTCGTGATATGTTTCTAAATGATAAAGGTGATATTAATTATGCTAAAGTTTCTGGTTCATATA  
GCGCATCTGGTGTTCCTGGTACTGTTGCAGGCTTAATCGATGCACAACAAAAATATGGCAAATTAAAACT  
ATCACAAGTTATTGAACCTGCTATCAAACCTGCTGAAGATGGTATTCCTGTAAGCTATGATCTTCACCAG  
TCACTTGTAAC TGCAAACCGTGGCTACAAAAATCTCCAGATGCGATGAAAATCTTTTATAAAAAAGATG  
GATCAGCCTATGAGGTAGGAGAAATCCTAAAACAGCCTGAACTTGCTAATAGTTTAAAGCTAATTGCAAA  
ACAAGGCAAAAAAGCTTCTATGAAGGAGAAATAGCTCATAAGATAGCCGATAGTATGGCTAAAAATGGT  
GGTTTAATAACATTGCAAGATTTGAAAAATTATAATATTGAGGAGATGAAACCAGTTAAGGGAACCTTATA  
GAGGTTATACTATTTATTCTATGCCGCCCAAGTTCTGGTGGTGTGATTCTAATAGAATTATTAATAT  
TCTAGAGAATTTCCATTGTCTGACTATGGTAACAATAGTGCTAAGACTATTAATCTTATGAGTAATGCG  
ATGAGCTATGCTTATAATGATAGGAATTCTGACTTAGGAGATCCAGATTTTGTCAAAATGGATTTAGCTA  
AGTTTTTATCTAAGAAGTATGCAAACAGATTGCTCAAAGATAACTACAGATAAGCATATCCCTAGTAA  
AGATATTAGTACTATAGATCCGGATGATCATGAAAAATTACAACTACACATTTTAGTATTATTGATAAA  
GATGGTAATATGGTATCAAATACTTATACCTTAAATTATTCTTATGGAAGTGGTATTGTAGTACCAGGAA  
CGGGAATTTTTTTAAATAACGAAATGGATGATTTGCTGCTAAAGTTGGCGAGGCAAATGTCTTTGGTTT  
GGTTCAAGGTGAAGCAAATACTGTGCGACCGAACAACGACCATTAAGTTCAATGACTCCAACGATAGTA  
TTAGATAAGGATGGTAAACCATTTTAGCTACAGGTTCTCCTGGAGGAAGTCGTATTATTACAACAACGT  
TACAAGTGATTCTAAATATCATTGATTTTAATATGAATCTTCAAGCAGCAGTTAATAATCCTCGCATA  
TAGTCAATTATGGCCAGAAGAGATTGGTGTAGAGCAGGGTATATCTGTAGATACAATTAATCTACTTAAG  
AAGATGGGTAACACTGTACACCTTATGCTGCTATGGGGGCTGCTGAGTCTGTAATGTCAGATGGACAAT  
ATGCTATGGAGCTGCAGATCCGCGCAGAGCTAGCGCATTAGCTATTGGTTATTAA

**Proteinsequenz:**

>gi|118497749|ref|YP\_898799.1| gamma-glutamyltranspeptidase [Francisella  
novicida U112]

MRRFLLSYTYSVFKNTRLRLLVKKL FVNLMSLLILLPSLTLIAAPVPTGYGFIPIQEEMQIAQPVTATHGM  
VSSQEALASKVGLDILKQGGNAVDAAVAVGFALAVTLPRAGNLAGGGFMI IHLQDGNKNIAINYREKAPA  
KASRDMFLNDKGDINYAKVSGSYSASGVPGTVAGLIDAQQKYGKLLKSQVIEPAIKLAEDGIPVSYDLHQ  
SLVTAKPWLQKSPDAMKIFYKKDGSAYEVEGIELKQPELANSLKLIKQKKAFFEIEIAHKIADSMKNG  
GLITLQDLKNYNIEMKPKVGTIRGYTIYSMPPPSSGGVILIELLNILENFPLSDYGNNSAKTINLMSNA

MSYAYNDRNSDLGDPDFVKMDLAKFLSKKYAKQIAQKITTDKHIPSKDISTIDPDDHEKLQTTTHFSIIDK  
 DGMVSNNTYTLNYSYSGSIVVPGTGIFLNNEMDDFAAKVGEANVFGLVQGEANTVAPNKRPLSSMPTIV  
 LDKDGGKFLATGSPGGSRITTTTLQVILNIIDFNMLQAAVNNPRIHSQWPEEIGVEQGISVDTINLLK  
 KMGNTVTPYAAMGAAESVMSDQYVYGAADPRRASALAIGY

### ***Francisella philomiragia* gGT Sequenz aus NCBI:**

Hydrophobe Signalsequenz (nicht in der klonierten Sequenz enthalten)

**Forward-Primer FgGT phil** (Primer Name: FgGT phil F2)

**Reverse-Primer FgGT phil** (Primer Name: FgGT phil R2)

>gi|167626225:c49091-47346 *Francisella philomiragia* subsp. *philomiragia*  
 ATCC 25017 chromosome, complete genome

GTGAAAAAATATTTGTAAGTTTAATGTGTTTGGTAATTTTTTTACCAAATTTAGCTTTGGTTGCTGCTC  
 CAATACCAACA**GGTTATGATTTTCATCCCTATCC**AGGAAGAGATGCAAATTTGCTCAACCAGTTGTTGCAAC  
 TCATGGTATGGTTTCTCTCAAGAGGCTTTAGCAAGTCAAGTCCGGTTTAGATATATATAAAACAAGGTGGT  
 AATGCTGTAGATGCAGCTGTTGCAGTTGGCTTTGCTTTGGCTGTTACATTACCTAGAGCTGGAAATATCG  
 GTGGTGGTGGTTTTATGATTGTCCATTTACAAGATGGCAATAAGAATATAGCAATAAACTACCGTGAAAA  
 AGCTCCTGCAAAGCATCTAAAGATATGTTCTTAAACGATAAAGGAGATGTCGATTATGCTAAAGTTTCT  
 GGTTCATAACAGTGCTTCAGGTGTGCCAGGTAAGTGTAGCAGGTTTAGTTGATGCGCAACAAAAATATGGTA  
 AATTGAAATTATCACAAGTTATTGCTCCAGCTATCAAGCTTGCTGAAGATGGTATCCCAGTAAGCTATGA  
 CCTAAATCAGTCGCTTATAACTGCAAACCATGGTTACAAAAATCACCAGAGGCTATGAAGATTTTTTAT  
 CATAAAGATGGTTCTGCTTATGCTGTTGGAGAAATCTTAAACAGCCTGAACTTGCTAATAGTCTGAAGC  
 TAATAGCAAACAAGGTAAGGCTTTTTATGAAGGAGAGATCGCGCAAAGATAGCAGATAGTATGGC  
 TAAAAATGGTGGTCTAATAACATTACAAGATTTGAAAAATTATAATGTTGAAGAGATGAAGCCACTTAAA  
 GGTACATATCGAGGTTATACAATATATTCTATGCCGCCGCAAGCTCTGGTGGTGAATTTCTGATAGAGT  
 TATTAATATTCTAGAGAATTTCCATTAGCTGATTATGGTAACAATAGTGCTAAAATTTAATCTTAT  
 GAGTAATGCAATGAGCTATGCTTATAATGATAGAAATTTCTGATTTAGGAGATCCTGATTTTTGTTAAGATG  
 GATTTGGCTAAATTTCTGTCTAAAAAATATGCAAACAGATTGCTCAAAAAATCACTACAGATAAGCATA  
 TTCCAAGTAAAGATATAAGTACAGTTGATCCAGAAGATCGTGAAAAACTTCAGACTACTCAGTTTAGTGT  
 AGTTGATAAAGATGGCAATATGGTATCAAATACCTATACGCTTAATTATTCTTATGGGAATGGTATTGTT  
 GTACCAGGAAGTGGTATCTTGTTAATAATGAAATGGATGATTTTGCAGCAAAGTAGGCGTGCCAAATG  
 TTTTTGGTTTTAGTTCAAGGTGAAGCTAATACAGTTGCTCCAAATAAGCGACCATTAAGCTCAATGACTCC  
 AACAATTGTTCTTGATAAAGATGGTAAGCCGTTTTTAGCTACAGGCTCACCAGGTGGAAGTCGTATTATT  
 ACAACAACATTGCAAGTGATTTTTAAATATCATAGACTATAATATGAATCTACAATCAGCAGTTAACAATC  
 CTCGTATGCATAGTCAACTATGGCCAGAAGAGATTGGTGTAGAGCAGGGTATATCTGTGGATACTATCAA  
 TCTACTTAAGAAAATGGGTAACACTGTAACCTTATGCTGCTATGGGTGCTGCAGAGTCTGTAATGTCT  
 GATGGACAGTATGTCTATGGTGCAGCAGATCCACGTAGAGGTA**ATGCTTTAGCTATAGGCTATTGA**

### **Proteinsequenz:**

>gi|167626271|ref|YP\_001676771.1| gamma-glutamyltransferase [*Francisella*  
*philomiragia* subsp. *philomiragia* ATCC 25017]  
 MKKLFVSLMCLVIFLPNLALVAAPIPTGYDFIPIQEEMQIAQPVVATHGMVSSQEALASQVGLDILKQGG  
 NAVDAAVAVGFALAVTLPRAGNIGGGGFMIVHLQDGNKNIAINYREKAPAKASKDMFLNDKGDVDYAKVS  
 GSYSASGVPGTVAGLVDAQQKYGKLSQVIAPAIIKLAEDGIPVSYDLNQLITAKPWLQKSPEAMKIFY

HKDGSAYAVGEILKQPELANSLKLIKQKAFYEGEIAQKIADSMKNGGLITLQDLKYNVEEMKPLK  
 GTYRGYTIYSMPSSGGVILIELLNILENFPLADYGNNSAKTINLMSNAMSAYNDRNSDLGDPDFVKM  
 DLAKFLSKKYAKQIAQKITTDKHIPSKDISTVDPEDREKLQTTQFSVVDKDGNMVSNTYTLNYSYNGIV  
 VPGTGILLNEMDDFAAKVGVANVFLVQGEANTVAPNKRPLSSMTPTIVLDKDGKPFPLATGSPGGSRII  
 TTTLQVILNIIDYMNMLQSAVNNPRMHSQWLWPEEIGVEQGISVDTINLLKMGNTVTPYAAMGAAESVMS  
 DGQYVYGAADPRRGNALAIGY

### **Francisella noatunensis gGT Sequenz aus NCBI:**

Hydrophobe Signalsequenz (nicht in der klonierten Sequenz enthalten)

Forward-Primer FgGT noat (Primer Name: FgGT noat F2)

Reverse-Primer FgGT noat (Primer Name: FgGT noat R2)

**BamHI** Schnittstelle innerhalb der Nukleotidsequenz

>gi|387885754:1686872-1688617 Francisella noatunensis subsp. orientalis  
 str. Toba 04 chromosome, complete genome

ATGAAAAAATATTTGTAAGTTAATGTGTTTGGTAATTTTTTACCAAATTTAGCTTTGGTTGCTACAC  
 CAGTACCAACAGGTTATGATTTTATCCCTATTCAAGAAAGAGATGCAAATTGCTCAACCAGTTGTTGCAAC  
 TCATGGTATGGTTTCTCTCAAGAGGCTTTAGCAAGTCAAGTCGGTTTAGATATATTTAAAACAAGGTGGT  
 AATGCTGTAGATGCTGCAGTTGCGGTTGGCTTTGCTTTGGCTGTTACACTACCTAGAGCTGGTAATATCG  
 GTGGTGGTGGTTTTATGATTGTCCATTTACAAGATGGTAATAAGAATATAGCAATAAACTACCGTGAAAA  
 AGCTCCTGCAAAGCATCTAAAGATATGTTCTTAAACGATAAAGGAGATGTTGATTATGCTAAAGTTTCT  
 GGTTCCATACAGTGCTTCAGGTGCGCCAGGTAAGTGTAGCAGGTTTGGTTGATGCACAACAAAATATGGTA  
 AATTGAAATTATCACAAGTTATTGCTCCAGCTATCAAGCTTGCTGAAGATGGTATTCCAGTTAGCTATGA  
 CCTAAATCAGTCGCTTATAACTGCAAACCATGGCTTAAAAAATCACCAGAGGCTATGAAAATCTTTTAC  
 AAGAAAGATGGCGCTGCTTATGCTGTTGGAGAAATCTTAAACAGCCTGAACTTGCTAATAGCCTGAAGC  
 TAATAGCAAACAAGGTAAAAAGCTTTCTATGAAGGAGATATTGCTCATAAGATAGCAGATAGTATGGC  
 GAAAAATGGTGGTCTAATAACATTACAAGACTTGAAAAATTACAATGTTGAAGAGATAAAGCCACTTAAA  
 GGGACATATCGCGGTTATAACAATATATCCATGCCTCCACCAAGCTCAGGTGGTGTGATTCTGATAGAGT  
 TATTAATATTTCTTGAATTTCCATTAGCTAATTATGGTAACAATAGTGCTAAAACCTATTAATCTTAT  
 GAGTAATGCAATGAGCTATGCTTATAATGATAGAAATTTCTGACTTAGGGGATCCGGTTTTGTTAAGATG  
 GATTTGGCTAAGTTCTTATCTAAAAAATATGTAACAGATTGCACAAAAAATCACTACGGATAAGCATA  
 TTCCAAGTAAAGATATAAGTACAGTTAATCCAGAAGATCGTGAGAACTTCAGACTACTCAGTTTAGTGT  
 AGTTGATAAAGATGGCAATATGGTATCAAATACTTATACGCTTAATTATTCTTATGGGAATGGTATTGTT  
 GTACCAGGAACAGGCATCTTGTTAAATAACGAAATGGATGATTTTGCAGCAAAAGTGGGTGTGGCAAATG  
 TGTTTGGTTTTAGTTCAAGGTGAAGCTAATACAGTTGCTCCAAATAAGCGACCATTAAGTTCAATGACTCC  
 AACAATTGTTCTTGATAAAGATGGTAAGCCGTTTTTAGCTACGGGCTCACCAGGAGGAAGTTGTATTATT  
 ACAACAACATTACAGGTGATTTTAAATATCATAGACTATAATATGAATTTGCAATCTGCGGTTAATAATC  
 CTCGTATGCATAGTCAGCTATGGCCAGAAGAGATAGGTGTAGAGCAAGGTATATCTGTAGATACTATCAA  
 TTTACTTAAGAAAATGGGTAATACTGTAACCTTATGTCTATGGGTGCTGCTGAGTCTGTAATGTCT  
 GATGGACAGTATGTCTATGGTGTGCTGCAGATCCACGTAGAGGTAATGCTTTAGCGATAGGTTATTGA

## Proteinsequenz:

```
>gi|387887222|ref|YP_006317521.1| gamma-glutamyltransferase [Francisella
noatunensis subsp. orientalis str. Toba 04]
MKKLFVSLMCLVIFLPNLALVATPVPTGYDFIPIQEEMQIAQPVVATHGMVSSQEALASQVGLDILKQGG
NAVDAAVAVGFALAVTLPRAGNIGGGGFMIVHLQDGNKNIAINYREKAPAKASKDMFLNDKGDVDYAKVS
GSYSASGAPGTVAGLVDAQQKYGKLLKSQVIAPAIKLAEDGIPVSYDLNQSLITAKPWLKKSPEAMKIFY
KKDGAAYAVGEILKQPELANSLKLIQKQKAFYEGDIAHKIADSMKNGGLITLQDLKYNVVEEIKPLK
GTYRGYTIYSMPSSGGVILIELLNILENFPLANYGNNSAKTINLMSNAMSAYANDRNSDLGDPGFVKM
DLAKFLSKKYVKQIAQKITTDDKHIPSKDISTVNPEDREKLQTTQFSVVDKDGNMVSNNTYTLNYSYNGNIV
VPGTGILLNEMDDFAAKVGVANVFGLVQGEANTVAPNKRPLSSMTPTIVLDKDKGKPFPLATGSPGGSCII
TTTLQVILNIIDYMNMLQSAVNNPRMHSQLWPEEIGVEQGISVDTINLLKMGNTVTPYAAMGAAESVMS
DGQYVYGAADPRRGNALAIQY
```

6.1.1 Sequenzierungsanalyse der klonierten *F. philomiragia*

Die Sequenzierungsanalyse der klonierten *F. philomiragia* ergab, wie bereits im Ergebnisteil erwähnt, 30 Basenaustausche auf Nukleotidebene, was auf Proteinebene zur 5 Aminosäureaustausche als Konsequenz hatte. Die Sequenzierungsanalyse wurde auf der Seite [www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/) durchgeführt. Nachfolgend sind die Analysen der Nukleotidsequenz und der Proteinsequenz der klonierten *F. philomiragia* (Klon) im Vergleich zu der Referenzsequenz *F. p. subsp. philomiragia* ATCC25017 (Referenz) dargestellt, wobei in rot die Austausche hinterlegt sind:

## Vergleich auf Nukleotidebene: 30 Basenaustausche

Der Vektor mit der FgGT Sequenz wurde sowohl einmal mit dem T7 Primer und PCR-Forward Primer als auch mit dem T7term Primer sequenziert, um das komplette FgGT-Gen zu sequenzieren. Aus der jeweiligen Sequenzierung wurde ein Teil der FgGT-DNA sequenziert. Somit ergibt die in grau hinterlegt DNA-Sequenz von allen Sequenzierungsausschnitten zusammen, die komplette FgGT DNA-Sequenz.

## Ausschnitt aus der T7 Primer Sequenzierung:

Referenz	1	GGTTATGATTTTCATCCCTATCCA	GAAGAGATGCAAATTGCTCAACCAGTTGTTGCAACT	60
Klon	416	GGTTATGATTTTCATCCCTATCCA	GAAGAGATGCAAATTGCTCAACCAGTTGTTGCAACT	475
Referenz	61	CATGGTATGGTTTCCTCTCAAGAGGCTTTAGCAAGTCA	GTCGGTTTAGATATATTTAAA	120
Klon	476	CATGGTATGGTTTCCTCTCAAGAGGCTTTAGCAAGTCA	GTCGGTTTAGATATATTTAAA	535
Referenz	121	CAAGGTGGTAATGCTGTAGATGCAGCTGTTGC	GTTGGCTTTGCTTTGGCTGTTACATTA	180
Klon	536	CAAGGTGGTAATGCTGTAGATGCAGCTGTTGC	GTTGGCTTTGCTTTGGCTGTTACATTA	595
Referenz	181	CCTAGAGCTGC	AATATCGGTGGTGGTGGTTTTATGATTGTCCATTTACAAGATGGCAAT	240
Klon	596	CCTAGAGCTGC	AATATCGGTGGTGGTGGTTTTATGATTGTCCATTTACAAGATGGCAAT	655
Referenz	241	AAGAATATAGCAATAAACTACCGTGAAAAGCTCCTGCAAAGCATCTAAAGATATGTTC		300
Klon	656	AAGAATATAGCAATAAACTACCGTGAAAAGCTCCTGCAAAGCATCTAAAGATATGTTC		715
Referenz	301	TTAAACGATAAAGGAGATGTCGATTATGCTAAAGTTTCTGGTTCATACAGTGCTTCAGGT		360

Klon	716	 TTAAACGATAAAGGAGATGTCGATTATGCTAAAGTTCTGGTTCATACAGTCTTCAGGT	775
Referenz	361	GTGCCAGGTACTGTAGCAGGTTTAGTTGATGCGCAACAAAAATATGGTAAATTGAAATTA	420
Klon	776	 GTGCCAGGTACTGTAGCAGGTTTAGTTGATGCGCAACAAAAATATGGTAAATTGAAATTA	835
Referenz	421	TCACAAGTTATTGCTCCAGCTATCAAGCTTGCTGAAGATGGATCCAGTAGCTATGAC	480
Klon	836	 TCACAAGTTATTGCTCCAGCTATCAAGCTTGCTGAAGATGGATCCAGTAGCTATGAC	895

Ausschnitt aus der PCR-Forward Primer Sequenzierung (grau hinterlegte Sequenz knüpft an der grau hinterlegten FgGT-Sequenz aus der T7 Primer Sequenzierung an):

Referenz	449	TTGCTGAAGATGGTATCCCAGTAAGCTATGACCTAAATCAGTCGCTTATAACTGCAAAAC	508
Klon	430	 TTGCTGAAGATGGAATCCAGTTAGCTATGACCTAAATCAGTCGCTTATAACTGCAAAAC	489
Referenz	509	CATGGTTACAAAAATCACCAGAGGCTATGAAGATTTTTATCATAAAGATGGTTCTGCTT	568
Klon	490	 CATGGTTACAAAAATCACCAGAGGCTATGAAGATTTTTATCATAAAGATGGTTCTGCTT	549
Referenz	569	ATCCGTTGGAGAAATCTTAAACAGCCTGAACTTGCTAATAGTCTGAAGCTAATAGCAA	628
Klon	550	 ATCAGTTGGAGAAATCTTAAACAGCCTGAACTTGCTAATAGTCTGAAGCTAATAGCAA	609
Referenz	629	AACAAGGTAAAAAGCTTTTTATGAGGAGAGATCGCGCAAAAGATAGCAGATAGTATGG	688
Klon	610	 AACAAGGTAAAAAGCTTTTTATGAGGAGAGATCGCGCAAAAGATAGCAGATAGTATGG	669
Referenz	689	CTAAAAATGGTGGTCTAATAACATTACAAGATTTGAAAAATATAATGTTGAAGAGATGA	748
Klon	670	 CTAAAAATGGTGGTCTAATAACATTACAAGATTTGAAAAATATAATGTTGAAGAGATGA	729
Referenz	749	AGCCACTTAAAGGACATATCGAGGTTATACAATATATTCTATGCCGCCCCAAGCTCTG	808
Klon	730	 AGCCACTTAAAGGACATATCGAGGTTATACAATATATTCTATGCCGCCCCAAGCTCTG	789
Referenz	809	CTGGTGAATTTCTGATAGAGTTATTAATATTTCTAGAGAATTTCCCATAGCTGATATG	868
Klon	790	 CTGGTGAATTTCTGATAGAGTTATTAATATTTCTAGAGAATTTCCCATAGCTGATATG	849
Referenz	869	GTAACAATAGTGCTAAAACATTAATCTTATGAGTAATGCAATGAGCTATGCTTATAATG	928
Klon	850	 GTAACAATAGTGCTAAAACATTAATCTTATGAGTAATGCAATGAGCTATGCTTATAATG	909

Ausschnitt aus der T7term Primer Sequenzierung (grau hinterlegte Sequenz knüpft an der grau hinterlegten FgGT-Sequenz aus der PCR-Forward Primer Sequenzierung an):

Referenz	871	AACAATAGTGCTAAAACATTAATCTTATGAGTAATGCAATGAGCTATGCTTATAATGAT	930
Klon	864	 AACAATAGTGCTAAAACATTAATCTTATGAGTAATGCAATGAGCTATGCTTATAATGAT	805
Referenz	931	AGAAATTTCTGATTTAGGAGATCCTGATTTTGTTAAGATGGATTTGGCTAAATTTCTGTCT	990
Klon	804	 AGAAATTTCTGATTTAGGAGATCCTGATTTTGTTAAGATGGATTTGGCTAAATTTCTGTCT	745
Referenz	991	AAAAAATATGCAAAACAGATTGCAAAAAATCACTACGATAAGCATATTTCCAAGTAAA	1050
Klon	744	 AAAAAATATGCAAAACAGATTGCAAAAAATCACTACGATAAGCATATTTCCAAGTAAA	685
Referenz	1051	GATATAAGTACAGTTATCCAGAAGATCGTGAAAACTTCAGACTACTCAGTTTAGTGTA	1110
Klon	684	 GATATAAGTACAGTTATCCAGAAGATCGTGAAAACTTCAGACTACTCAGTTTAGTGTA	625
Referenz	1111	GTTGATAAAGATGGCAATATGGTATCAAATACATATACGCTTAATTATTCTTATGGGAA	1170
Klon	624	 GTTGATAAAGATGGCAATATGGTATCAAATACATATACGCTTAATTATTCTTATGGGAA	565
Referenz	1171	GGTATTGTTGTACCAGGAACGGTATCTTGTTAAATAATGAAATGGATGATTTGCGACA	1230

Klon	564	GGTATTGTTGTACCAGGAAGCTGGTATCTTGTTAAATAATGAAATGGATGATTTTGCAGCA	505
Referenz	1231	AAAGTAGG GTGGCAAATGT TTTGGTTTAGTTCAAGGTGAAGCTAATACAGTTGCTCCA	1290
Klon	504	AAAGTAGG GTGGCAAATGT TTTGGTTTAGTTCAAGGTGAAGCTAATACAGTTGCTCCA	445
Referenz	1291	AA AAGCGACCATTAAGCTCAATGACTCCAACAATTGTTCTTGATAAAGATGGTAAGCCG	1350
Klon	444	AA AAGCGACCATTAAGCTCAATGACTCCAACAATTGTTCTTGATAAAGATGGTAAGCCG	385
Referenz	1351	TTTTTA CTACAGGCTC CC GGTGGAAGTCGTATTATTACAACAACATTGCAAGTGATT	1410
Klon	384	TTTTTA CTACAGGCTC CC GGTGGAAGTCGTATTATTACAACAACATTGCAAGTGATT	325
Referenz	1411	TTAAATATCATAGACTATAATATGAATCTACAATCAGCAGTTAACAATCCTCGTATGCAT	1470
Klon	324	TTAAATATCATAGACTATAATATGAATCTACAATCAGCAGTTAACAATCCTCGTATGCAT	265
Referenz	1471	AGTCAACTATGGCCAGAAGAGATTGGTGTAGAGCAGGTATATCTGTGGATACTATCAAT	1530
Klon	264	AGTCAACTATGGCCAGAAGAGATTGGTGTAGAGCAGGTATATCTGTGGATACTATCAAT	205
Referenz	1531	CTACTTAAGAAAATGGGTAACACTGTAACCTCTTATGCTGCTATGGGTGCTGCAGAGTCT	1590
Klon	204	CTACTTAAGAAAATGGGTAACACTGTAACCTCTTATGCTGCTATGGGTGCTGCAGAGTCT	145
Referenz	1591	GTAATGTCTGATGGACAGTATGTCTATGGTGCGGCAGATCCACGTAGAGGTAATGCTTTA	1650
Klon	144	GTAATGTCTGATGGACAGTATGTCTATGGTGCGGCAGATCCACGTAGAGGTAATGCTTTA	85
Referenz	1651	GCTATAGGCTATTGA	1665
Klon	84	GCTATAGGCTATTGA	70

### Vergleich auf Proteinebene: 4AS-Austausche, (A210K, G289A, D375N, A472T)

Referenz	1	MCLVIFLPNLALVAAPIPTGYDFIPIQEEMQIAQPVVATHGMVSSQEALASQVGLDILKQ	60
Klon	1	MCLVIFLPNLALVAAPIPTGYDFIPIQEEMQIAQPVVATHGMVSSQEALASQVGLDILKQ	60
Referenz	61	GGNAVDAAVAVGFALAVTLPRAGNIGGGGFMIVHLQDGNKNIAINYREKAPAKASKDMFL	120
Klon	61	GGNAVDAAVAVGFALAVTLPRAGNIGGGGFMIVHLQDGNKNIAINYREKAPAKASKDMFL	120
Referenz	121	NDKGDVDYAKVSGSYSASGVPPTVAGLVDAQQKYGKLLKSQVIAPAIKLAEDGIPVSYDL	180
Klon	121	NDKGDVDYAKVSGSYSASGVPPTVAGLVDAQQKYGKLLKSQVIAPAIKLAEDGIPVSYDL	180
Referenz	181	NQSLITAKPWLQKSPEAMKIFYHKDGSAY VGEILKQPELANSKLIKQKKAIFYEGEI	240
Klon	181	NQSLITAKPWLQKSPEAMKIFYHKDGSAY VGEILKQPELANSKLIKQKKAIFYEGEI	240
Referenz	241	AQKIADSMKNGGLITLQDLKYNVEEMKPLKGTIRGYTIYSMPPPSS GVILIELLNIL	300
Klon	241	AQKIADSMKNGGLITLQDLKYNVEEMKPLKGTIRGYTIYSMPPPSS GVILIELLNIL	300
Referenz	301	ENFPLADYGNNSAKTINLMSNAMSAYANDRNSDLGDPDFVKMDLAKFLSKKYAKQIAQKI	360
Klon	301	ENFPLADYGNNSAKTINLMSNAMSAYANDRNSDLGDPDFVKMDLAKFLSKKYAKQIAQKI	360
Referenz	361	TTDKHIPSKDISTV PEDREKLQTTQFSVVDKDGNMVSNNTYTLNYSYNGIVVPGTGILL	420
Klon	361	TTDKHIPSKDISTV PEDREKLQTTQFSVVDKDGNMVSNNTYTLNYSYNGIVVPGTGILL	420
Referenz	421	NNEMDDFAAKVGVANVFLVQGEANTVAPNKRPLSSMTPTIVLDKDGKPFLLTSGPPGSR	480
Klon	421	NNEMDDFAAKVGVANVFLVQGEANTVAPNKRPLSSMTPTIVLDKDGKPFLLTSGPPGSR	480
Referenz	481	IITTTLQVILNIIDYNNMLQSAVNPRMHSQWLWPEEIGVEQGISVDTINLLKMGNTVTP	540
Klon	481	IITTTLQVILNIIDYNNMLQSAVNPRMHSQWLWPEEIGVEQGISVDTINLLKMGNTVTP	540
Referenz	541	YAAMGAAESVMSDGYVYGAADPRRGNALAIGY	573
Klon	541	YAAMGAAESVMSDGYVYGAADPRRGNALAIGY	573

## 6.2 Screening der verschiedenen Substanzen im Aktivitätsassay

### 6.2.1 Ergebnisse der Priaxon Substanzbibliothek

Hier wurden die Ergebnisse von den 405 Substanzen aus der Priaxon-Bibliothek, die im FgGT Aktivitätsassay getestet wurden, dargestellt.

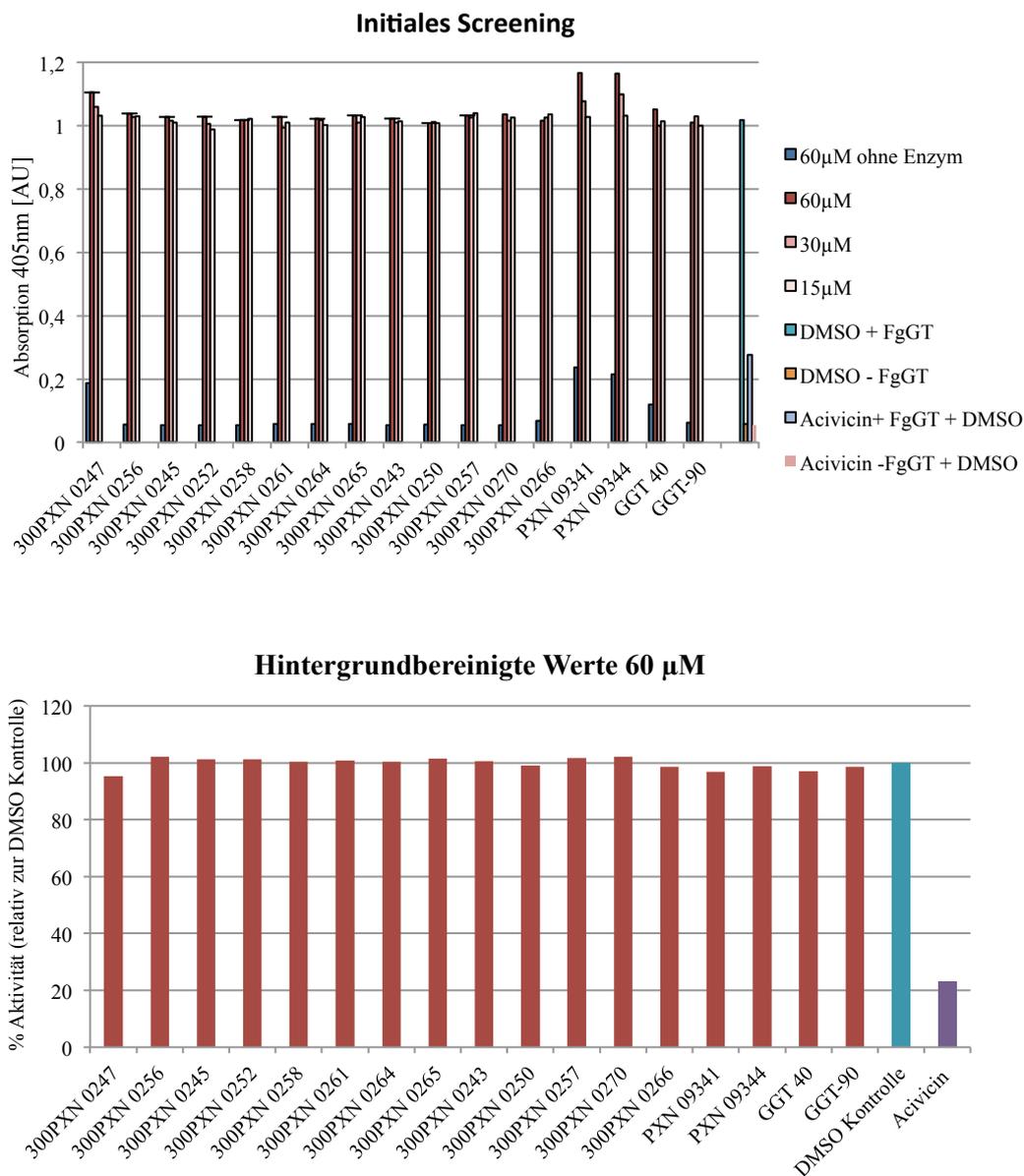
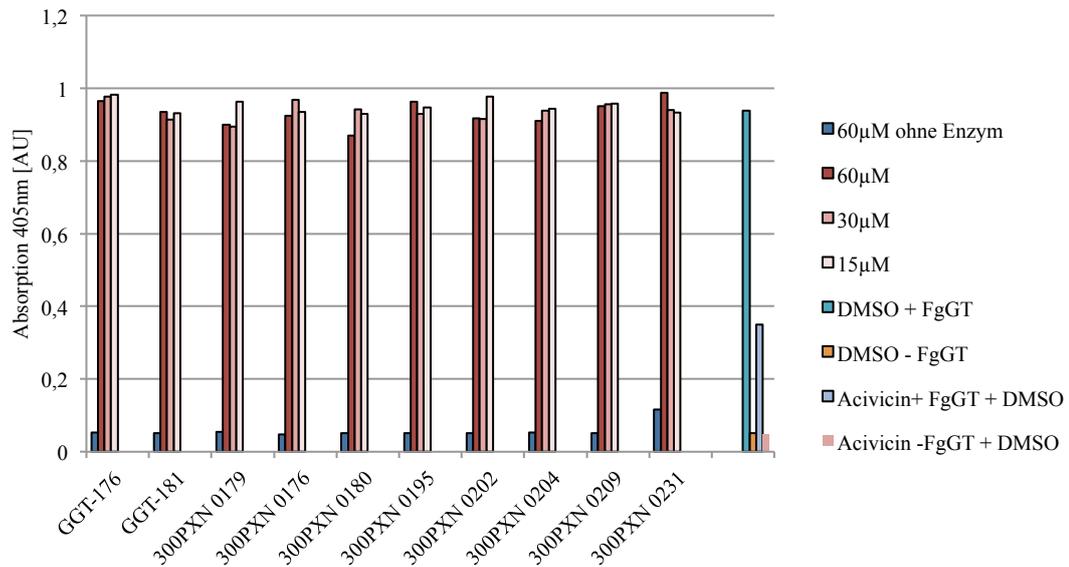


Abbildung 46 Screening der Priaxon Substanzbibliothek im FgGT Aktivitätsassay (Substanzen 1-17).

Oberer Graph: Einzelmessung von je 15 µM, 30 µM, 60 µM und 60 µM ohne Enzym als Hintergrundkontrolle der Substanzen. Als Kontrollen liefen je eine Probe mit 4 % DMSO mit und ohne Enzym (Substanzen in DMSO gelöst) und 100 mM Acivicin mit und ohne Enzym (Inhibitorkontrolle). Unterer Graph: relative FgGT Aktivität der hintergrundbereinigten Werte 60 µM. Der gemessene Hintergrund mit 60 µM Substanz ohne Enzym wurde vom gemessenen Wert 60 µM Substanz mit Enzym abgezogen und relativ zur DMSO Kontrolle (=100%ige Aktivität) dargestellt. Assaybedingungen: 18 nM FgGT, 20 mM GlyGly, 250 µM L-gGpNA, 0,1 % BSA, 100 mM Tris pH 8,0, 4 h Inkubation bei 37 °C, Endpunktmessung.

### Initiales Screening



### Hintergrundbereinigte Werte 60µM

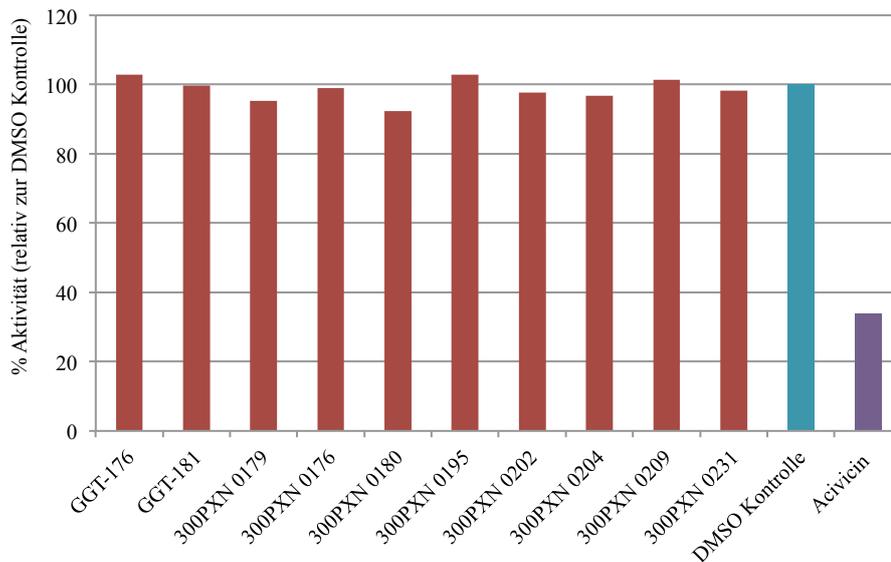


Abbildung 47 Screening der Priaxon Substanzbibliothek im FgGT Aktivitätsassay (Substanzen 18-27). Oberer Graph: Einzelmessung von je 15 µM, 30 µM, 60 µM und 60 µM ohne Enzym als Hintergrundkontrolle der Substanzen. Als Kontrollen liefen je eine Probe mit 4 % DMSO mit und ohne Enzym (Substanzen in DMSO gelöst) und 100 mM Acivicin mit und ohne Enzym (Inhibitorkontrolle). Unterer Graph: relative FgGT Aktivität der hintergrundbereinigten Werte 60 µM. Der gemessene Hintergrund mit 60 µM Substanz ohne Enzym wurde vom gemessenen Wert 60 µM Substanz mit Enzym abgezogen und relativ zur DMSO Kontrolle (=100%ige Aktivität) dargestellt. Assaybedingungen: 18 nM FgGT, 20 mM GlyGly, 250 µM L-gPpNA, 0,1 % BSA, 100 mM Tris pH 8,0, 4 h Inkubation bei 37 °C, Endpunktmessung.

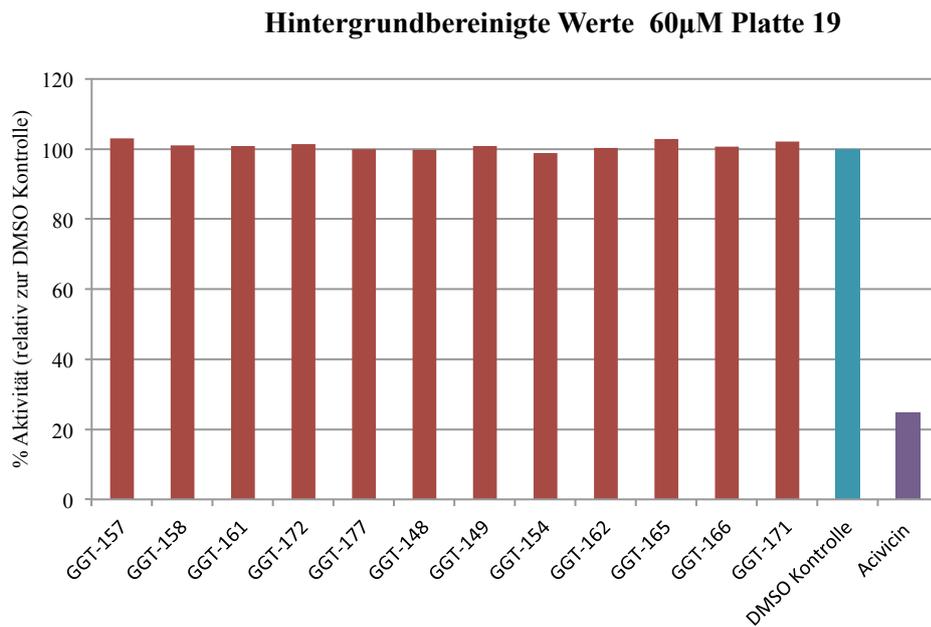
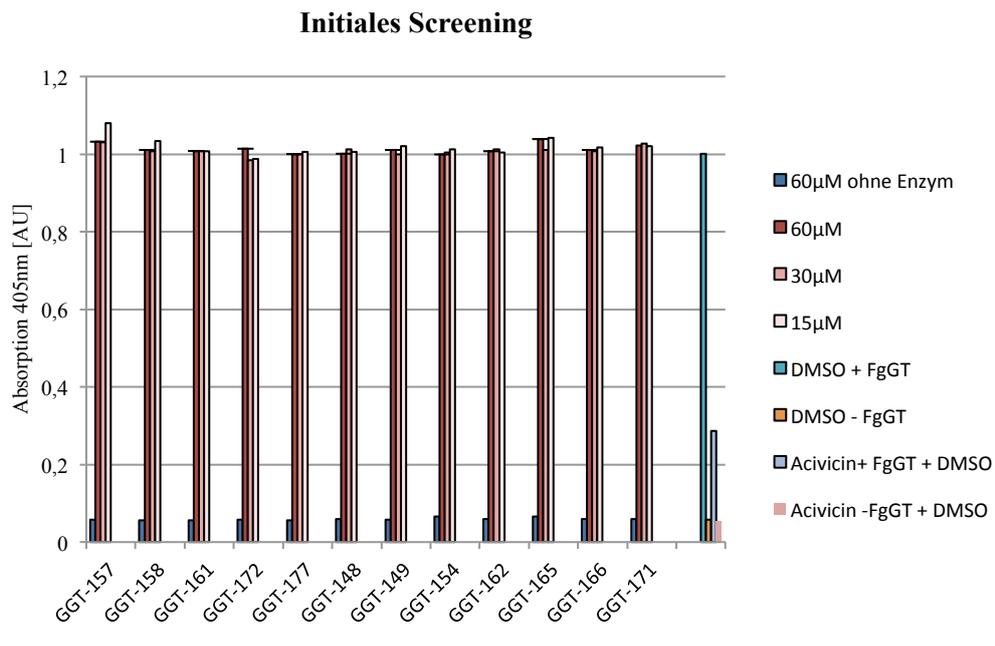
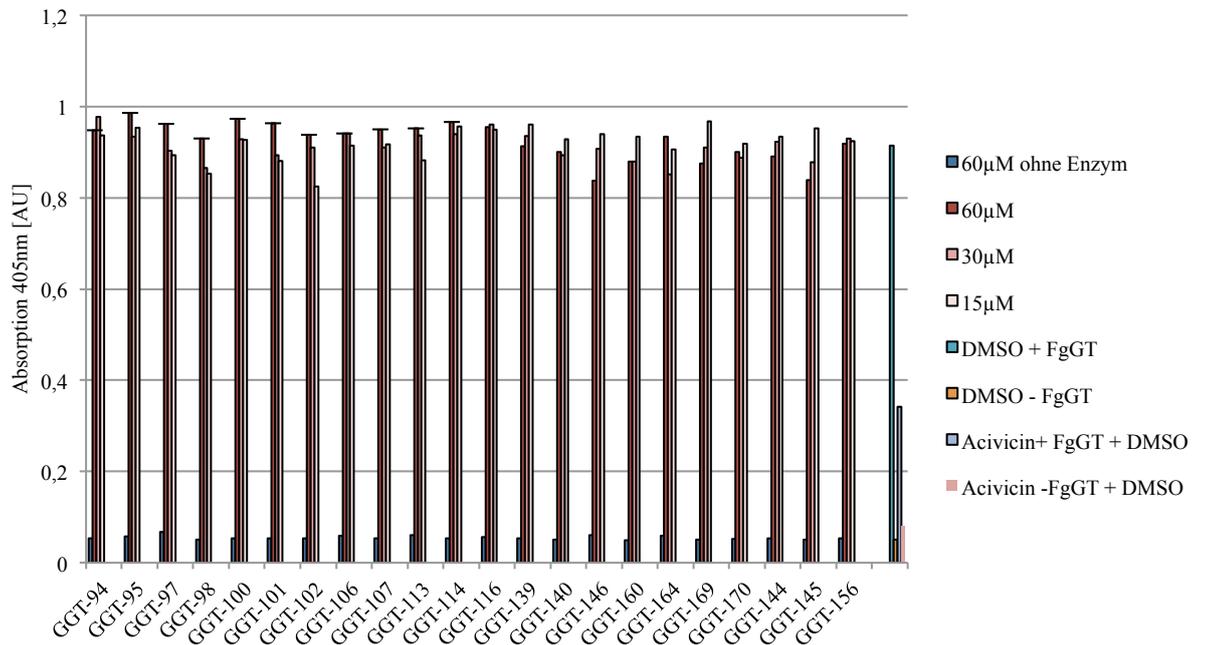


Abbildung 48 Screening der Priaxon Substanzbibliothek im FgGT Aktivitätsassay (Substanzen 28-39).

Oberer Graph: Einzelmessung von je 15 µM, 30 µM, 60 µM und 60 µM ohne Enzym als Hintergrundkontrolle der Substanzen. Als Kontrollen liefen je eine Probe mit 4 % DMSO mit und ohne Enzym (Substanzen in DMSO gelöst) und 100 mM Acivicin mit und ohne Enzym (Inhibitorkontrolle). Unterer Graph: relative FgGT Aktivität der hintergrundbereinigten Werte 60 µM. Der gemessene Hintergrund mit 60 µM Substanz ohne Enzym wurde vom gemessenen Wert 60 µM Substanz mit Enzym abgezogen und relativ zur DMSO Kontrolle (=100%ige Aktivität) dargestellt. Assaybedingungen: 18 nM FgGT, 20 mM GlyGly, 250 µM L-gGpNA, 0,1 % BSA, 100 mM Tris pH 8,0, 4 h Inkubation bei 37 °C, Endpunktmessung

### Initiales Screening



### Hintergrundbereinigte Werte 60µM

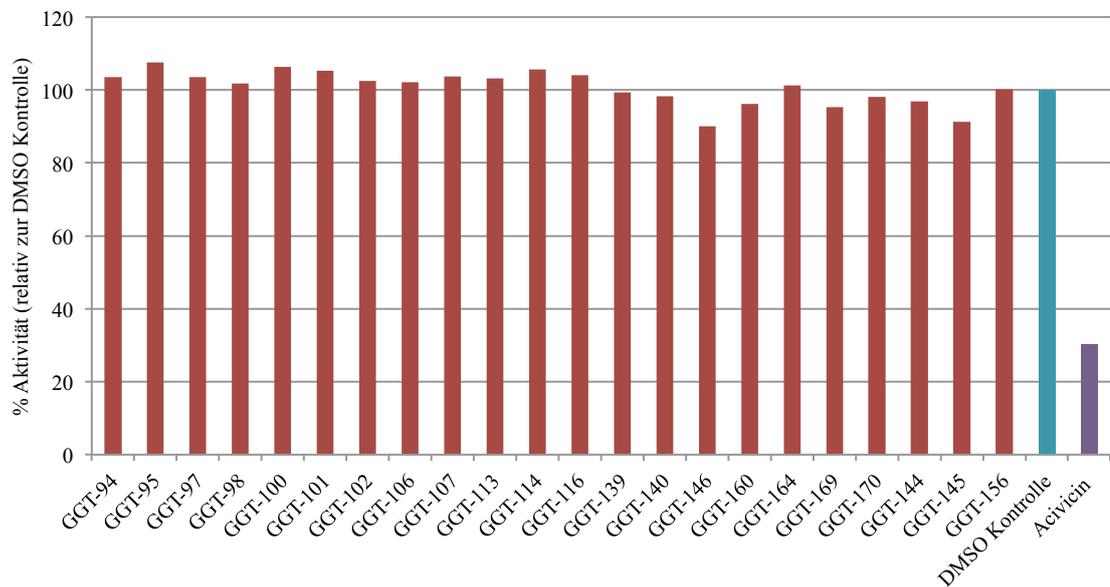


Abbildung 49 Screening der Priaxon Substanzbibliothek im FgGT Aktivitätsassay (Substanzen 40-61).

Oberer Graph: Einzelmessung von je 15 µM, 30 µM, 60 µM und 60 µM ohne Enzym als Hintergrundkontrolle der Substanzen. Als Kontrollen liefen je eine Probe mit 4 % DMSO mit und ohne Enzym (Substanzen in DMSO gelöst) und 100 mM Acivicin mit und ohne Enzym (Inhibitorkontrolle). Unterer Graph: relative FgGT Aktivität der hintergrundbereinigten Werte 60 µM. Der gemessene Hintergrund mit 60 µM Substanz ohne Enzym wurde vom gemessenen Wert 60 µM Substanz mit Enzym abgezogen und relativ zur DMSO Kontrolle (=100%ige Aktivität) dargestellt. Assaybedingungen: 18 nM FgGT, 20 mM Gly, 250 µM L-gPpNA, 0,1 % BSA, 100 mM Tris pH 8,0, 4 h Inkubation bei 37 °C, Endpunktmessung

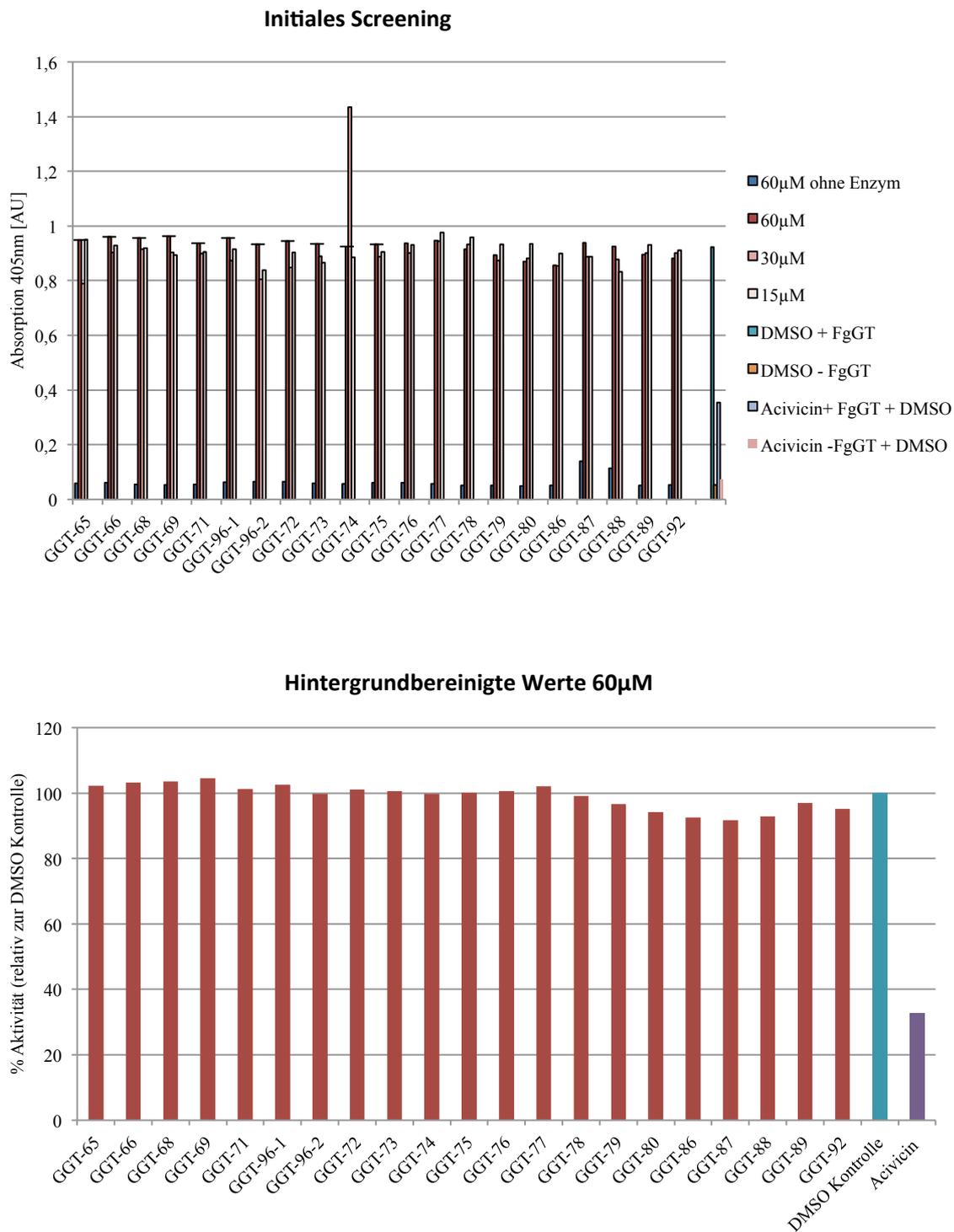


Abbildung 50 Screening der Priaxon Substanzbibliothek im FgGT Aktivitätsassay (Substanzen 62-82).

Oberer Graph: Einzelmessung von je 15 µM, 30 µM, 60 µM und 60 µM ohne Enzym als Hintergrundkontrolle der Substanzen. Als Kontrollen liefen je eine Probe mit 4 % DMSO mit und ohne Enzym (Substanzen in DMSO gelöst) und 100 mM Acivicin mit und ohne Enzym (Inhibitorkontrolle). Unterer Graph: relative FgGT Aktivität der hintergrundbereinigten Werte 60 µM. Der gemessene Hintergrund mit 60 µM Substanz ohne Enzym wurde vom gemessenen Wert 60 µM Substanz mit Enzym abgezogen und relativ zur DMSO Kontrolle (=100%ige Aktivität) dargestellt. Assaybedingungen: 18 nM FgGT, 20 mM GlyGly, 250 µM L-gGpNA, 0,1 % BSA, 100 mM Tris pH 8,0, 4 h Inkubation bei 37 °C, Endpunktmessung

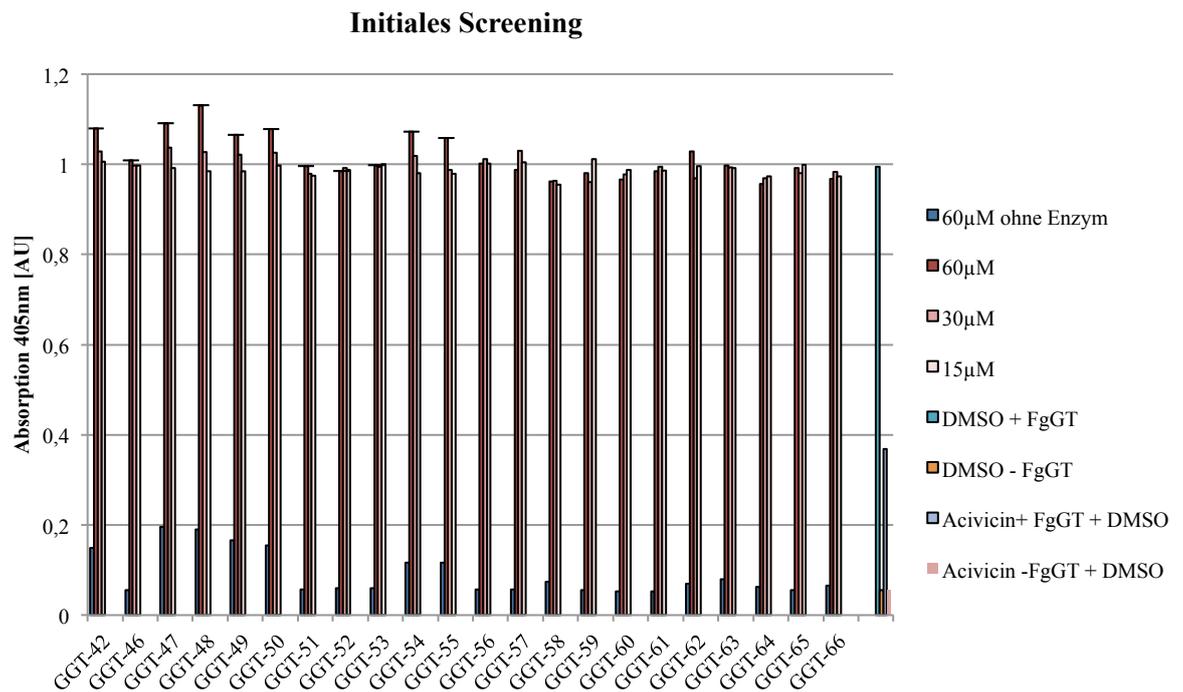


Abbildung 51 Screening der Priaxon Substanzbibliothek im FgGT Aktivitätsassay (Substanzen 83-104).

Oberer Graph: Einzelmessung von je 15 µM, 30 µM, 60 µM und 60 µM ohne Enzym als Hintergrundkontrolle der Substanzen. Als Kontrollen liefen je eine Probe mit 4 % DMSO mit und ohne Enzym (Substanzen in DMSO gelöst) und 100 mM Acivicin mit und ohne Enzym (Inhibitorkontrolle). Unterer Graph: relative FtgGT Aktivität der hintergrundbereinigten Werte 60 µM. Der gemessene Hintergrund mit 60 µM Substanz ohne Enzym wurde vom gemessenen Wert 60 µM Substanz mit Enzym abgezogen und relativ zur DMSO Kontrolle (=100%ige Aktivität) dargestellt. Assaybedingungen: 18 nM FtgGT, 20 mM GlyGly, 250 µM L-gpNA, 0,1 % BSA, 100 mM Tris pH 8,0, 4 h Inkubation bei 37 °C, Endpunktmessung

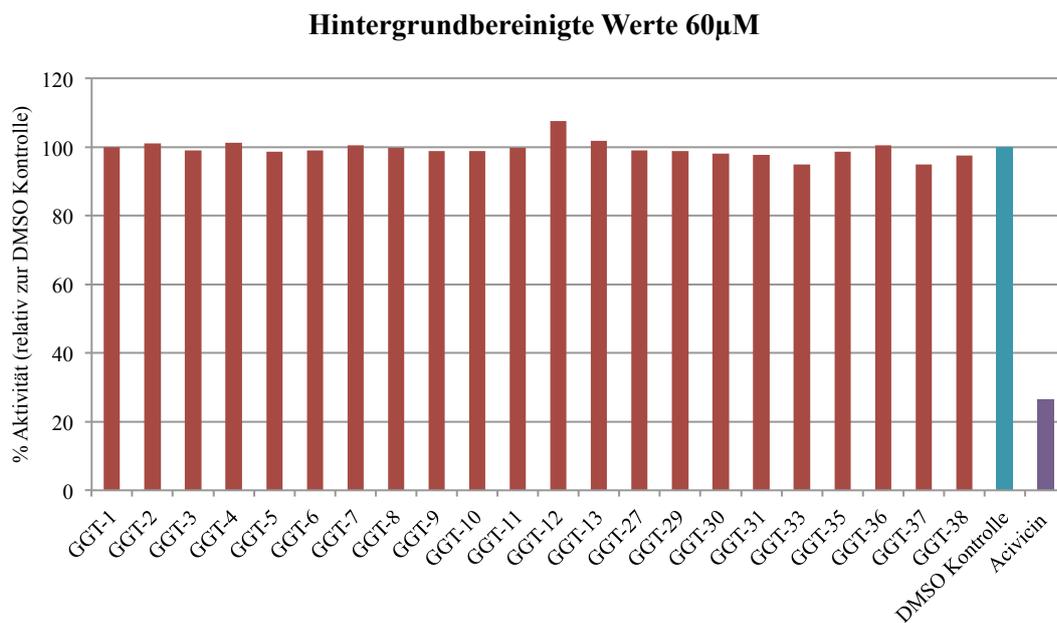
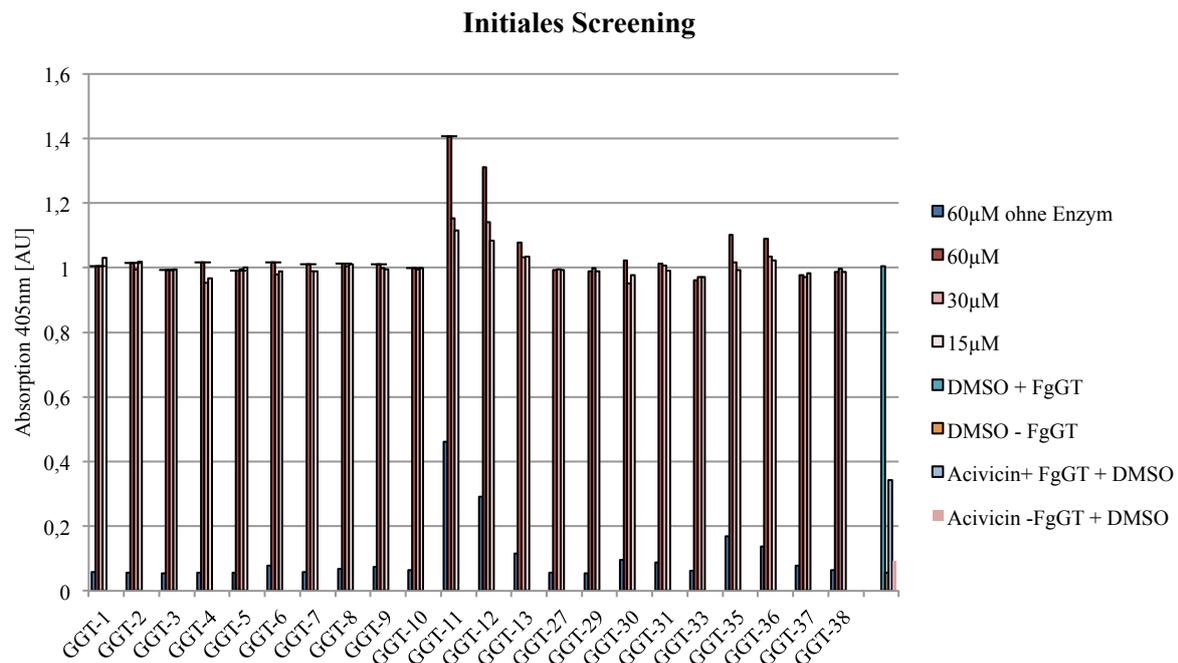
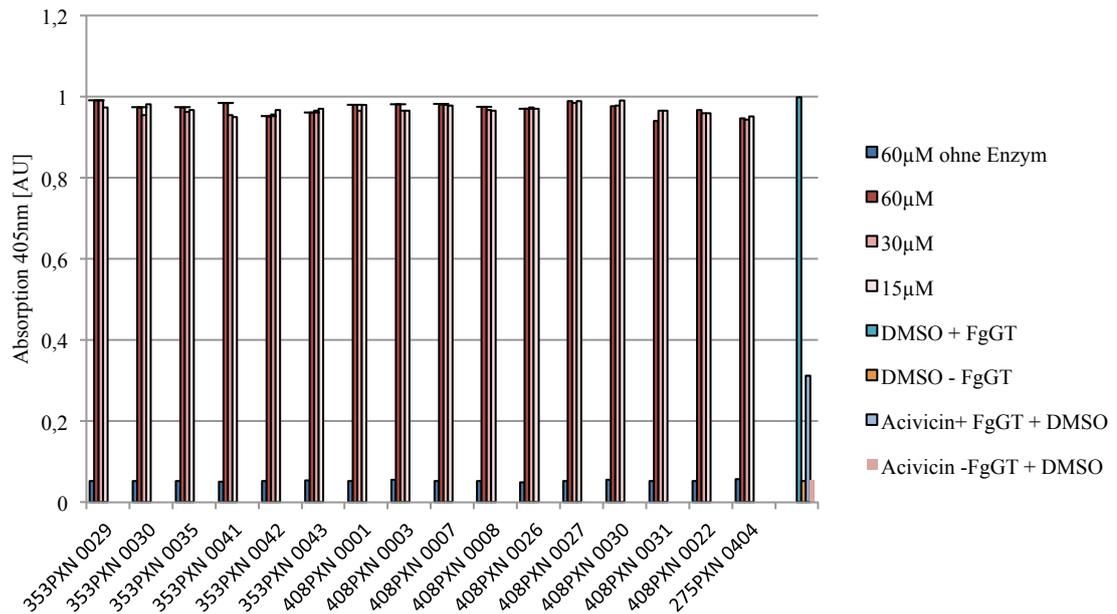


Abbildung 52 Screening der Priaxon Substanzbibliothek im FgGT Aktivitätsassay (Substanzen 105-126).

Oberer Graph: Einzelmessung von je 15 µM, 30 µM, 60 µM und 60 µM ohne Enzym als Hintergrundkontrolle der Substanzen. Als Kontrollen liefen je eine Probe mit 4 % DMSO mit und ohne Enzym (Substanzen in DMSO gelöst) und 100 mM Acivicin mit und ohne Enzym (Inhibitorkontrolle). Unterer Graph: relative FgGT Aktivität der hintergrundbereinigten Werte 60 µM. Der gemessene Hintergrund mit 60 µM Substanz ohne Enzym wurde vom gemessenen Wert 60 µM Substanz mit Enzym abgezogen und relativ zur DMSO Kontrolle (=100%ige Aktivität) dargestellt. Assaybedingungen: 18 nM FgGT, 20 mM GlyGly, 250 µM L-gGpNA, 0,1 % BSA, 100 mM Tris pH 8,0, 4 h Inkubation bei 37 °C, Endpunktmessung

### Initiales Screening



### Hintergrundbereinigte Werte 60µM

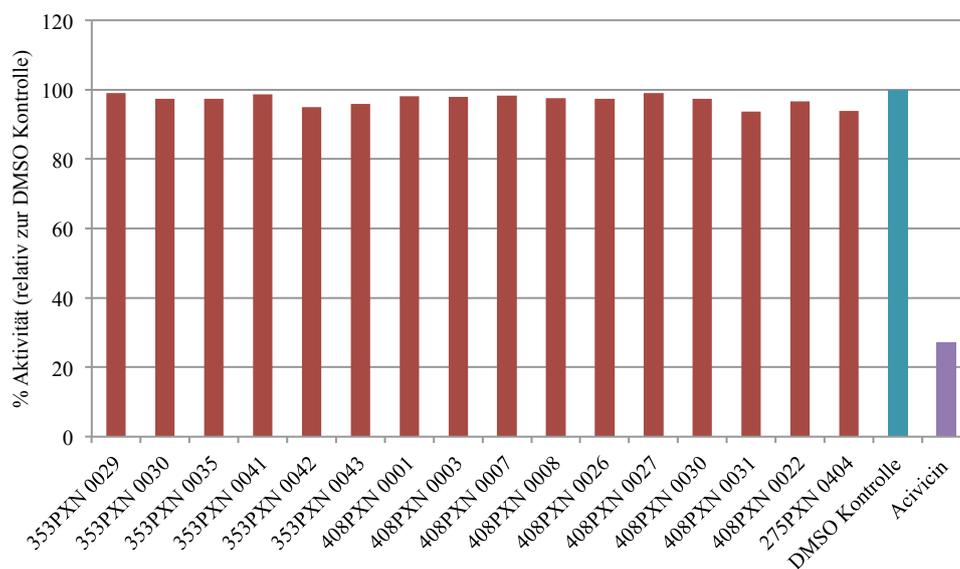


Abbildung 53 Screening der Priaxon Substanzbibliothek im FgGT Aktivitätsassay (Substanzen 127-142).

Oberer Graph: Einzelmessung von je 15 µM, 30 µM, 60 µM und 60 µM ohne Enzym als Hintergrundkontrolle der Substanzen. Als Kontrollen liefen je eine Probe mit 4 % DMSO mit und ohne Enzym (Substanzen in DMSO gelöst) und 100 mM Acivicin mit und ohne Enzym (Inhibitorkontrolle). Unterer Graph: relative FgGT Aktivität der hintergrundbereinigten Werte 60 µM. Der gemessene Hintergrund mit 60 µM Substanz ohne Enzym wurde vom gemessenen Wert 60 µM Substanz mit Enzym abgezogen und relativ zur DMSO Kontrolle (=100%ige Aktivität) dargestellt. Assaybedingungen: 18 nM FgGT, 20 mM GlyGly, 250 µM L-gGpNA, 0,1 % BSA, 100 mM Tris pH 8,0, 4 h Inkubation bei 37 °C, Endpunktmessung

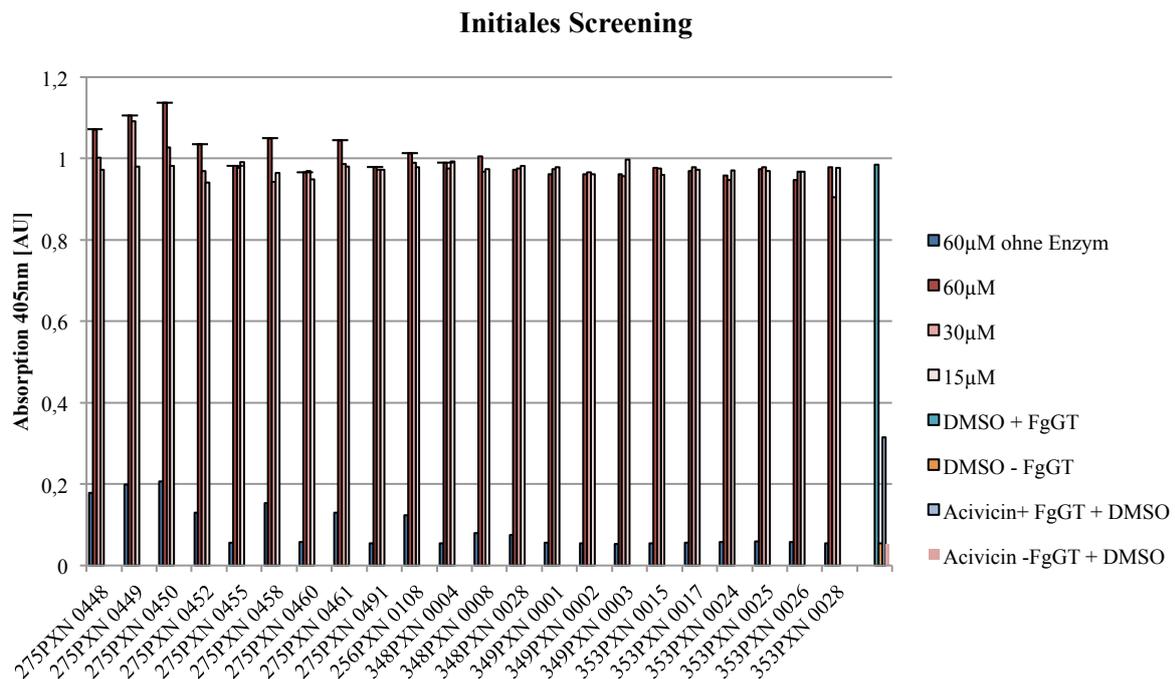


Abbildung 54 Screening der Priaxon Substanzbibliothek im FgGT Aktivitätsassay (Substanzen 143-164).

Oberer Graph: Einzelmessung von je 15 µM, 30 µM, 60 µM und 60 µM ohne Enzym als Hintergrundkontrolle der Substanzen. Als Kontrollen liefen je eine Probe mit 4 % DMSO mit und ohne Enzym (Substanzen in DMSO gelöst) und 100 mM Acivicin mit und ohne Enzym (Inhibitorkontrolle). Unterer Graph: relative FgGT Aktivität der hintergrundbereinigten Werte 60 µM. Der gemessene Hintergrund mit 60 µM Substanz ohne Enzym wurde vom gemessenen Wert 60 µM Substanz mit Enzym abgezogen und relativ zur DMSO Kontrolle (=100%ige Aktivität) dargestellt. Assaybedingungen: 18 nM FgGT, 20 mM GlyGly, 250 µM L-gGpNA, 0,1 % BSA, 100 mM Tris pH 8,0, 4 h Inkubation bei 37 °C, Endpunktmessung

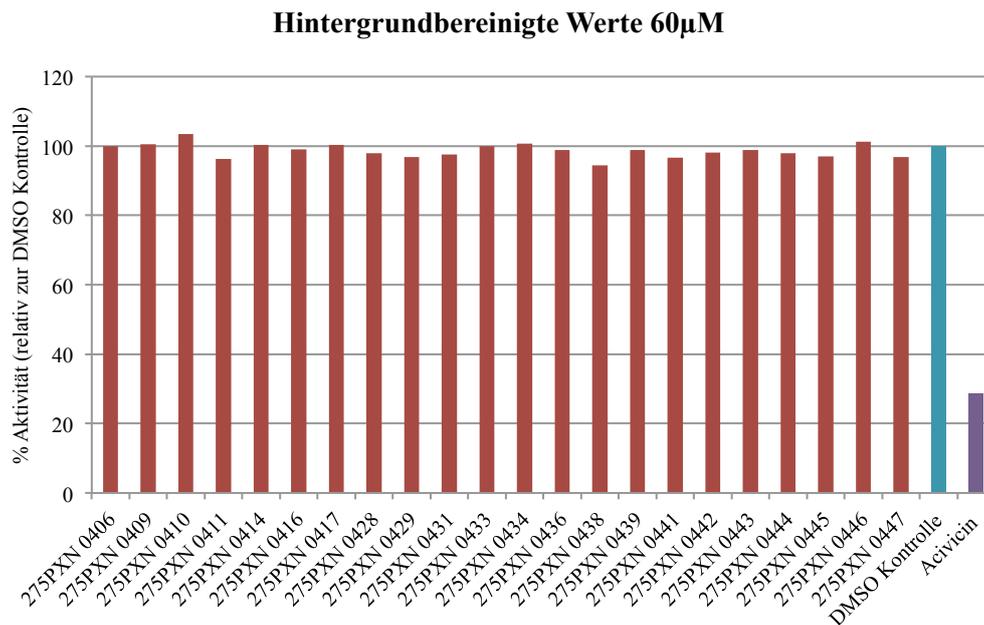
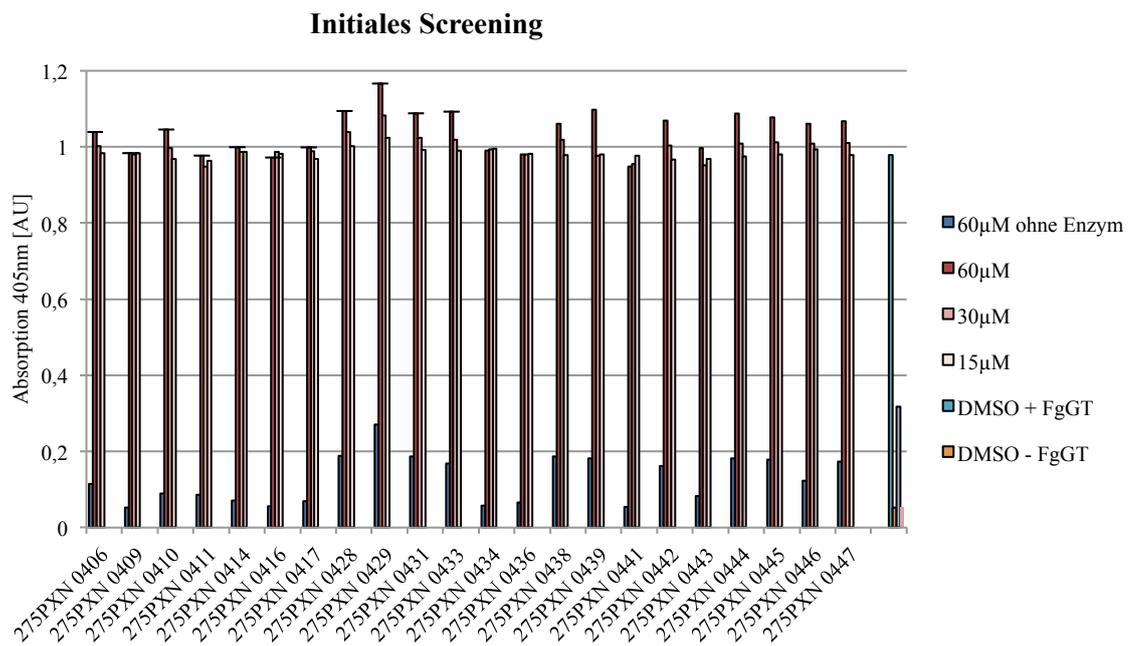


Abbildung 55 Screening der Priaxon Substanzbibliothek im FgGT Aktivitätsassay (Substanzen 165-186).

Oberer Graph: Einzelmessung von je 15 µM, 30 µM, 60 µM und 60 µM ohne Enzym als Hintergrundkontrolle der Substanzen. Als Kontrollen liefen je eine Probe mit 4 % DMSO mit und ohne Enzym (Substanzen in DMSO gelöst) und 100 mM Acivicin mit und ohne Enzym (Inhibitorkontrolle). Unterer Graph: relative FgGT Aktivität der hintergrundbereinigten Werte 60 µM. Der gemessene Hintergrund mit 60 µM Substanz ohne Enzym wurde vom gemessenen Wert 60 µM Substanz mit Enzym abgezogen und relativ zur DMSO Kontrolle (=100%ige Aktivität) dargestellt. Assaybedingungen: 18 nM FgGT, 20 mM GlyGly, 250 µM L-gpNA, 0,1 % BSA, 100 mM Tris pH 8,0, 4 h Inkubation bei 37 °C, Endpunktmessung

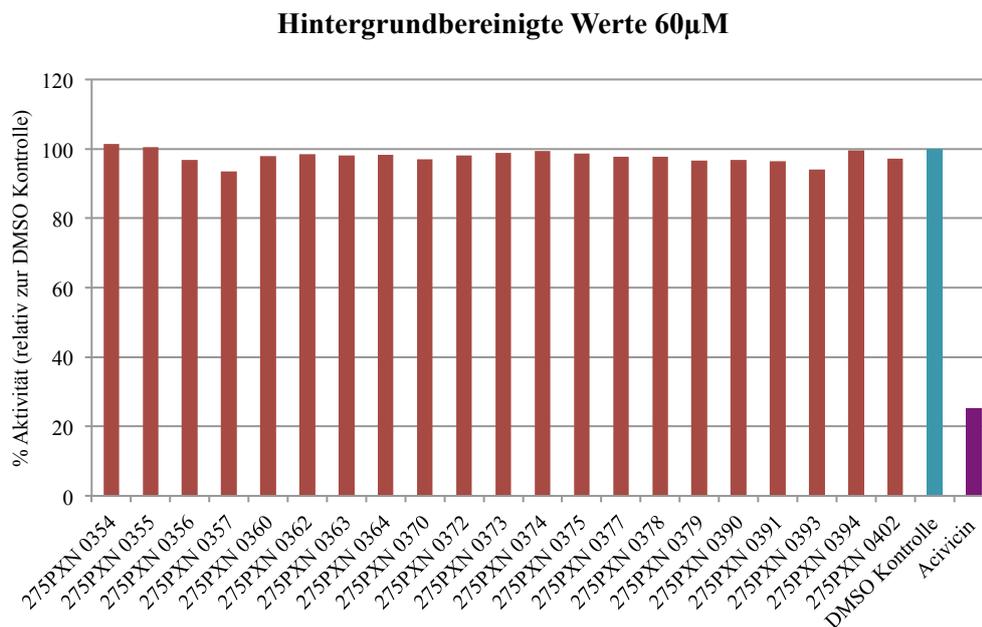
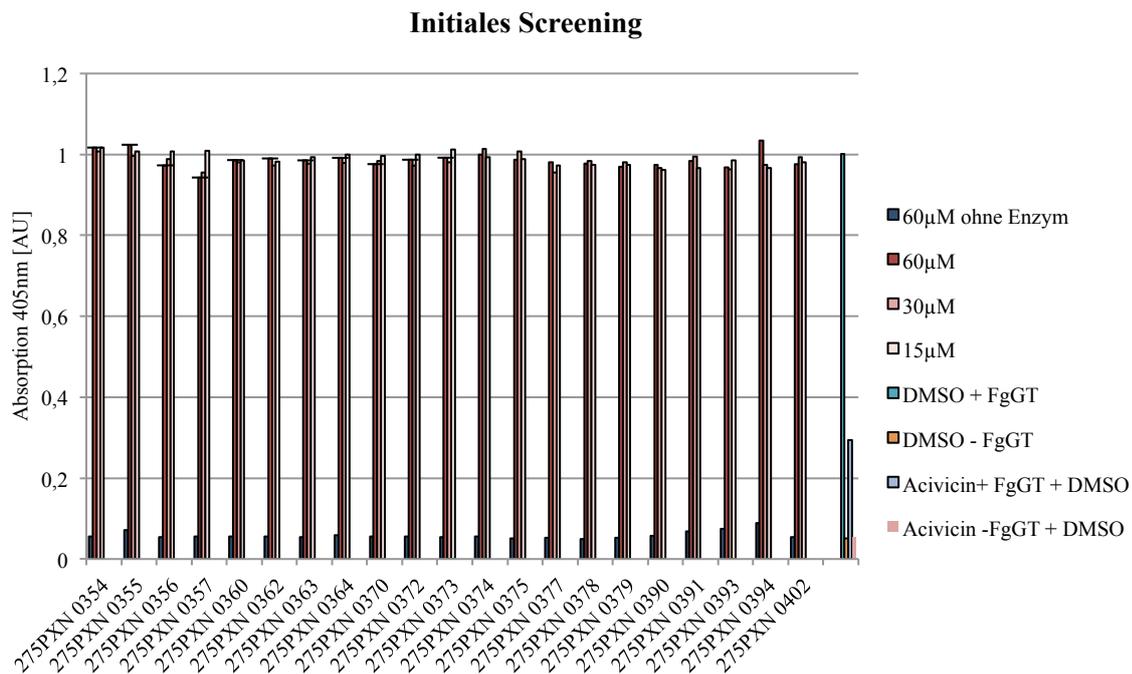


Abbildung 56 Screening der Priaxon Substanzbibliothek im FgGT Aktivitätsassay (Substanzen 187-207).

Oberer Graph: Einzelmessung von je 15 µM, 30 µM, 60 µM und 60 µM ohne Enzym als Hintergrundkontrolle der Substanzen. Als Kontrollen liefen je eine Probe mit 4 % DMSO mit und ohne Enzym (Substanzen in DMSO gelöst) und 100 mM Acivicin mit und ohne Enzym (Inhibitorkontrolle). Unterer Graph: relative FgGT Aktivität der hintergrundbereinigten Werte 60 µM. Der gemessene Hintergrund mit 60 µM Substanz ohne Enzym wurde vom gemessenen Wert 60 µM Substanz mit Enzym abgezogen und relativ zur DMSO Kontrolle (=100%ige Aktivität) dargestellt. Assaybedingungen: 18 nM FgGT, 20 mM GlyGly, 250 µM L-gGpNA, 0,1 % BSA, 100 mM Tris pH 8,0, 4 h Inkubation bei 37 °C, Endpunktmessung

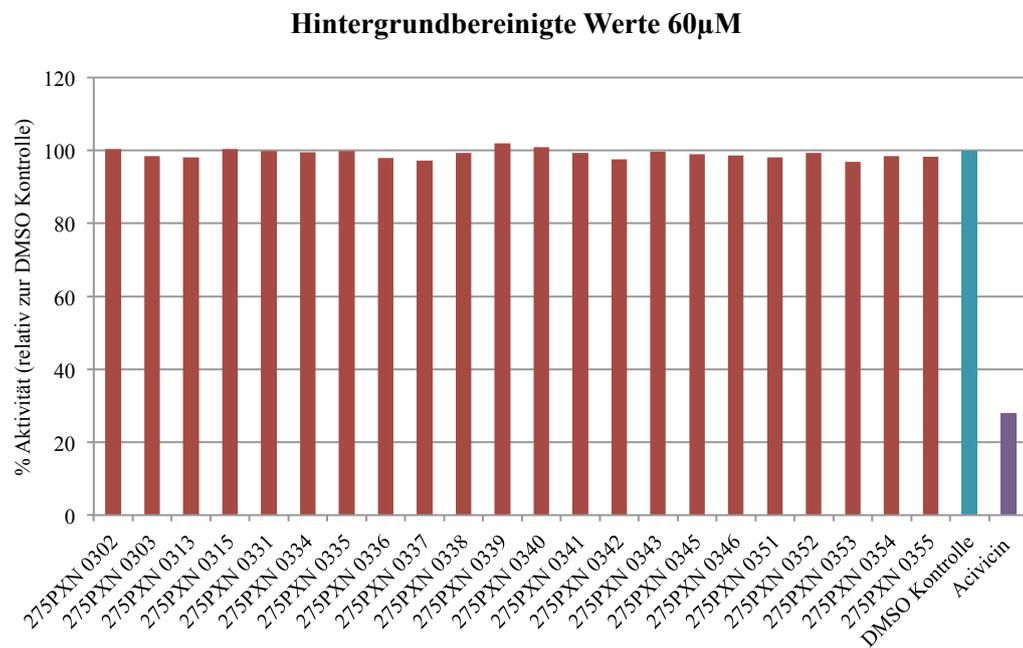
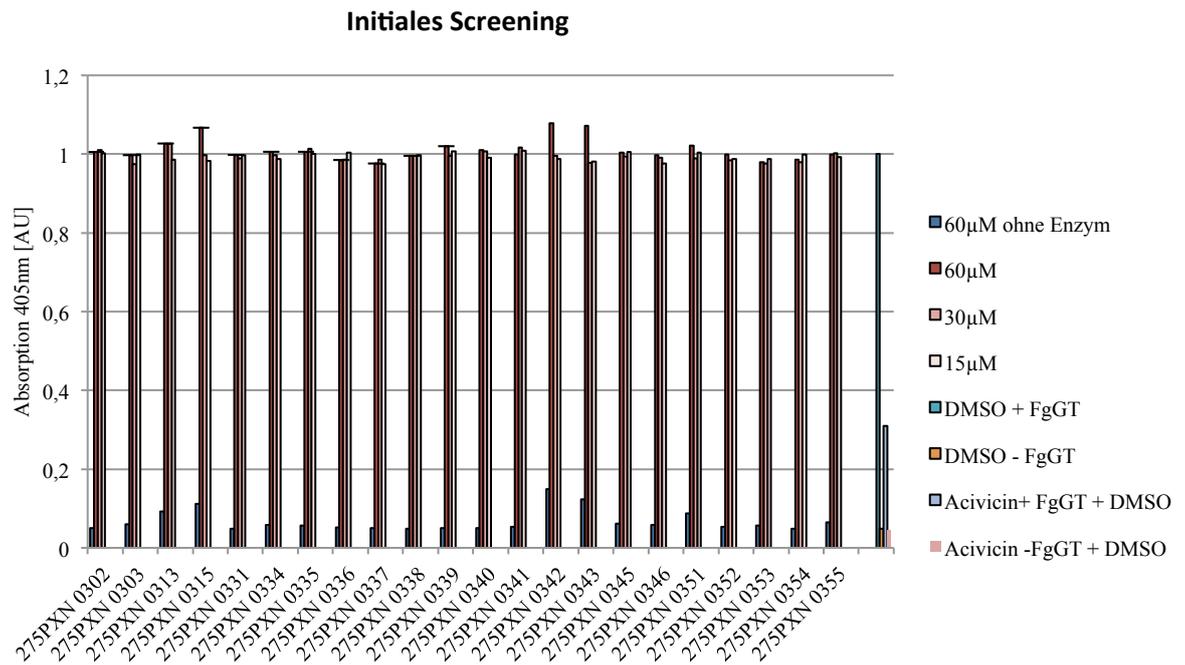


Abbildung 57 Screening der Priaxon Substanzbibliothek im FgGT Aktivitätsassay (Substanzen 208-229).

Oberer Graph: Einzelmessung von je 15 µM, 30 µM, 60 µM und 60 µM ohne Enzym als Hintergrundkontrolle der Substanzen. Als Kontrollen liefen je eine Probe mit 4 % DMSO mit und ohne Enzym (Substanzen in DMSO gelöst) und 100 mM Acivicin mit und ohne Enzym (Inhibitorkontrolle). Unterer Graph: relative FgGT Aktivität der hintergrundbereinigten Werte 60 µM. Der gemessene Hintergrund mit 60 µM Substanz ohne Enzym wurde vom gemessenen Wert 60 µM Substanz mit Enzym abgezogen und relativ zur DMSO Kontrolle (=100%ige Aktivität) dargestellt. Assaybedingungen: 18 nM FgGT, 20 mM GlyGly, 250 µM L-gGpNA, 0,1 % BSA, 100 mM Tris pH 8,0, 4 h Inkubation bei 37 °C, Endpunktmessung

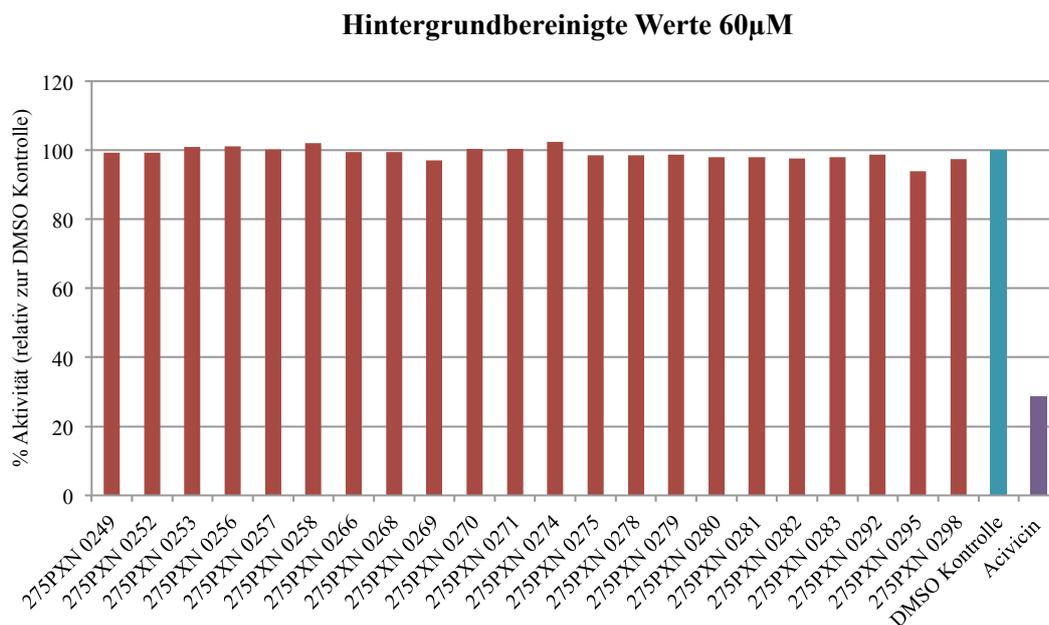
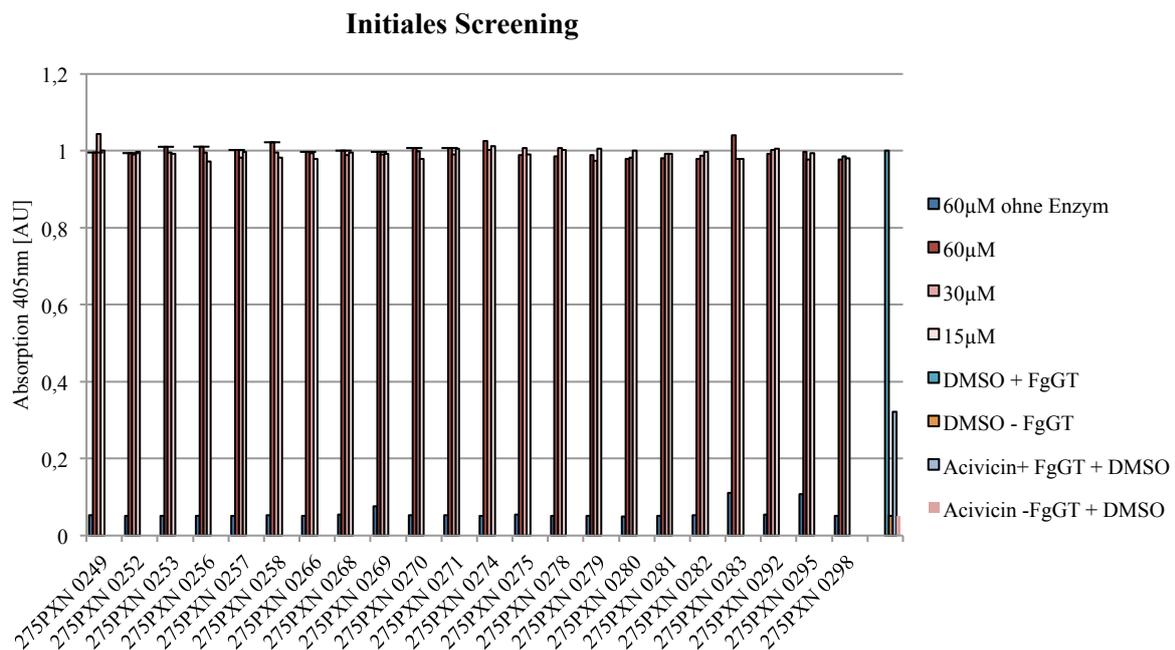
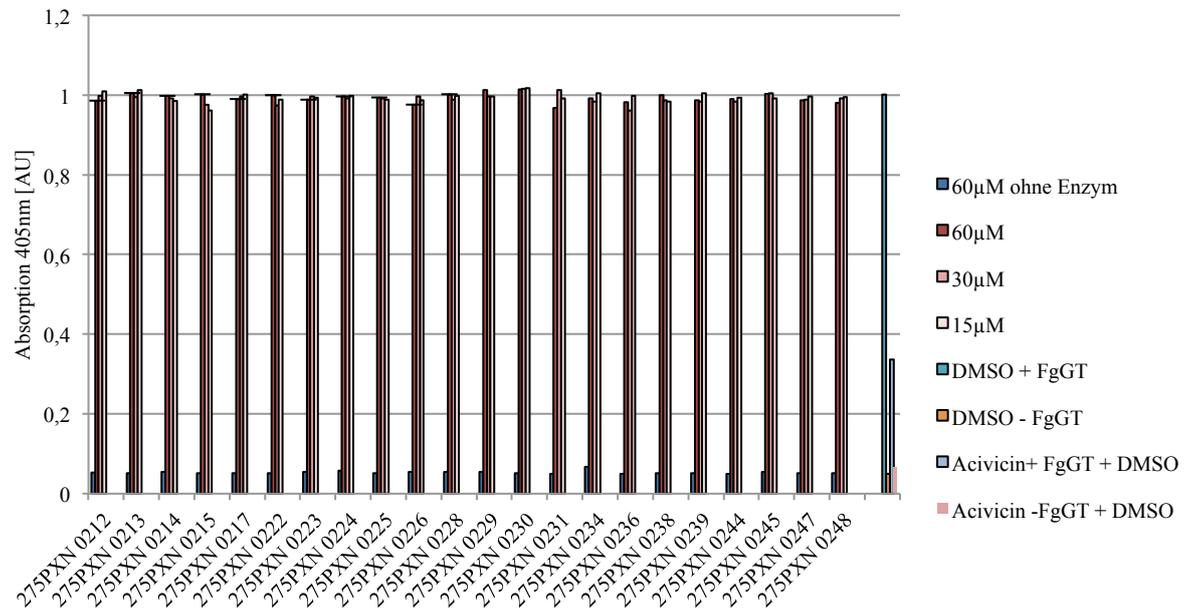


Abbildung 58 Screening der Priaxon Substanzbibliothek im FgGT Aktivitätsassay (Substanzen 230-251). Oberer Graph: Einzelmessung von je 15 µM, 30 µM, 60 µM und 60 µM ohne Enzym als Hintergrundkontrolle der Substanzen. Als Kontrollen liefen je eine Probe mit 4 % DMSO mit und ohne Enzym (Substanzen in DMSO gelöst) und 100 mM Acivicin mit und ohne Enzym (Inhibitorkontrolle). Unterer Graph: relative FgGT Aktivität der hintergrundbereinigten Werte 60 µM. Der gemessene Hintergrund mit 60 µM Substanz ohne Enzym wurde vom gemessenen Wert 60 µM Substanz mit Enzym abgezogen und relativ zur DMSO Kontrolle (=100%ige Aktivität) dargestellt. Assaybedingungen: 18 nM FgGT, 20 mM GlyGly, 250 µM L-gGpNA, 0,1 % BSA, 100 mM Tris pH 8,0, 4 h Inkubation bei 37 °C, Endpunktmessung

### Initiales Screening



### Hintergrundbereinigte Werte 60µM

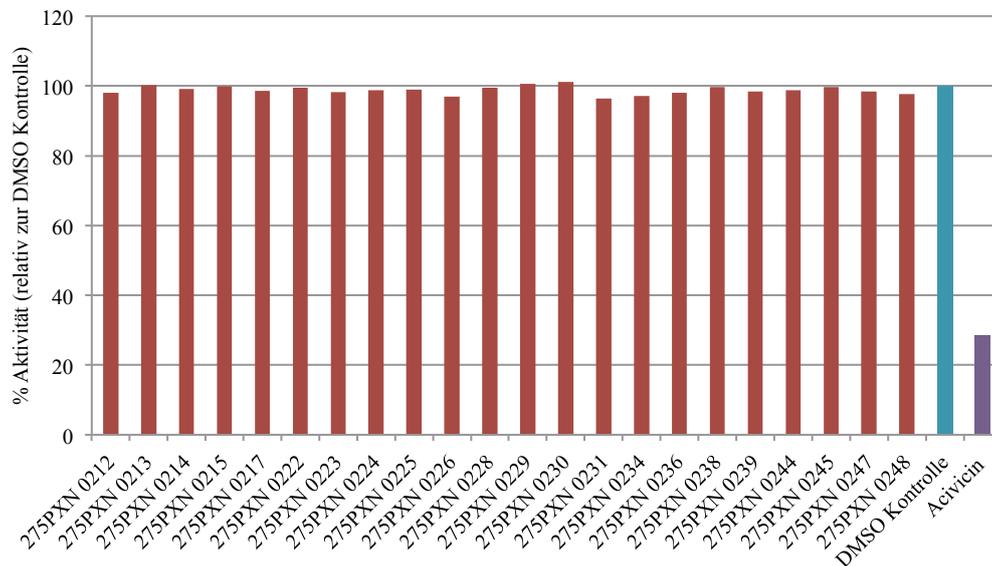


Abbildung 59 Screening der Priaxon Substanzbibliothek im FgGT Aktivitätsassay (Substanzen 252-273).

Oberer Graph: Einzelmessung von je 15 µM, 30 µM, 60 µM und 60 µM ohne Enzym als Hintergrundkontrolle der Substanzen. Als Kontrollen liefen je eine Probe mit 4 % DMSO mit und ohne Enzym (Substanzen in DMSO gelöst) und 100 mM Acivicin mit und ohne Enzym (Inhibitorkontrolle). Unterer Graph: relative FgGT Aktivität der hintergrundbereinigten Werte 60 µM. Der gemessene Hintergrund mit 60 µM Substanz ohne Enzym wurde vom gemessenen Wert 60 µM Substanz mit Enzym abgezogen und relativ zur DMSO Kontrolle (=100%ige Aktivität) dargestellt. Assaybedingungen: 18 nM FgGT, 20 mM GlyGly, 250 µM L-gGpNA, 0,1 % BSA, 100 mM Tris pH 8,0, 4 h Inkubation bei 37 °C, Endpunktmessung

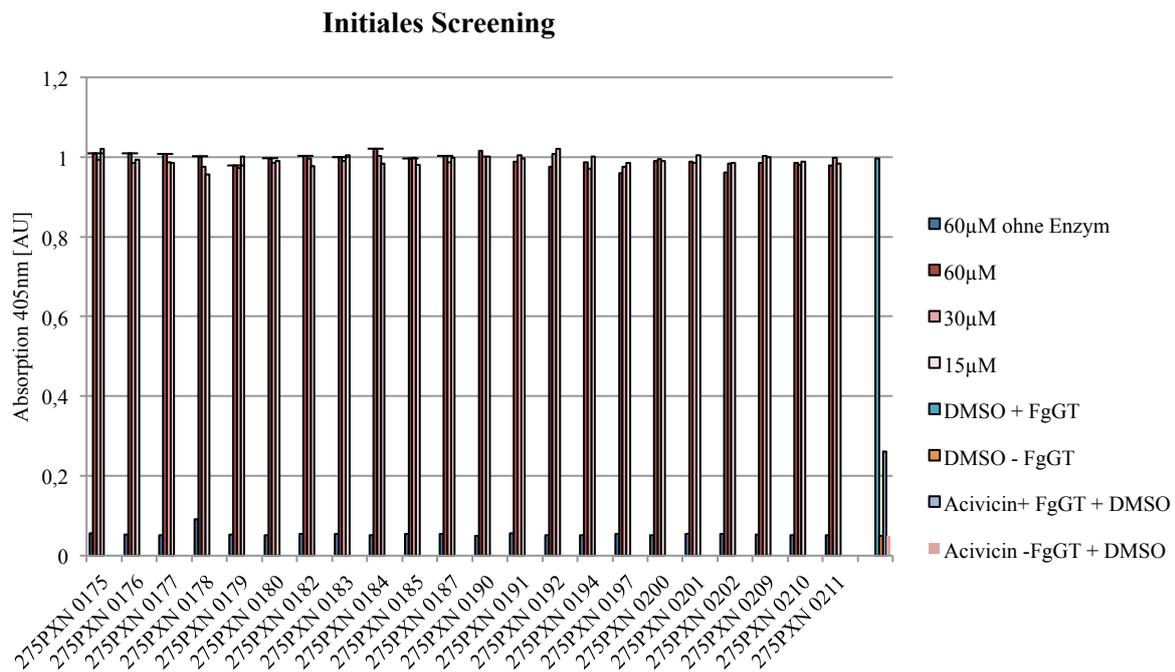


Abbildung 60 Screening der Priaxon Substanzbibliothek im FgGT Aktivitätsassay (Substanzen 274-295). Oberer Graph: Einzelmessung von je 15 µM, 30 µM, 60 µM und 60 µM ohne Enzym als Hintergrundkontrolle der Substanzen. Als Kontrollen liefen je eine Probe mit 4 % DMSO mit und ohne Enzym (Substanzen in DMSO gelöst) und 100 mM Acivicin mit und ohne Enzym (Inhibitorkontrolle). Unterer Graph: relative FgGT Aktivität der hintergrundbereinigten Werte 60 µM. Der gemessene Hintergrund mit 60 µM Substanz ohne Enzym wurde vom gemessenen Wert 60 µM Substanz mit Enzym abgezogen und relativ zur DMSO Kontrolle (=100%ige Aktivität) dargestellt. Assaybedingungen: 18 nM FgGT, 20 mM GlyGly, 250 µM L-gGpNA, 0,1 % BSA, 100 mM Tris pH 8,0, 4 h Inkubation bei 37 °C, Endpunktmessung

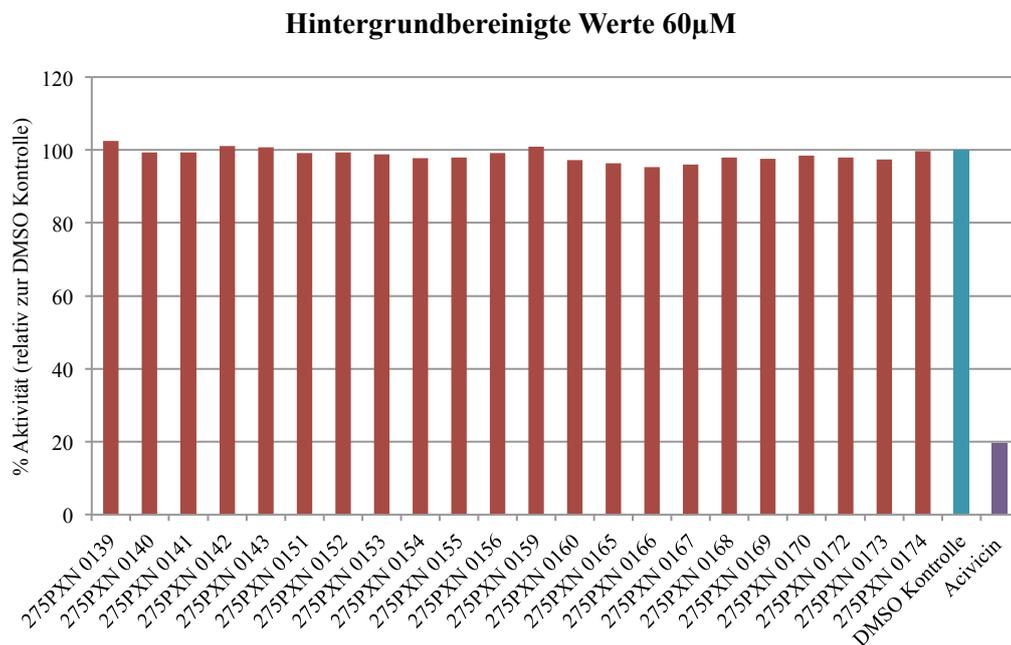
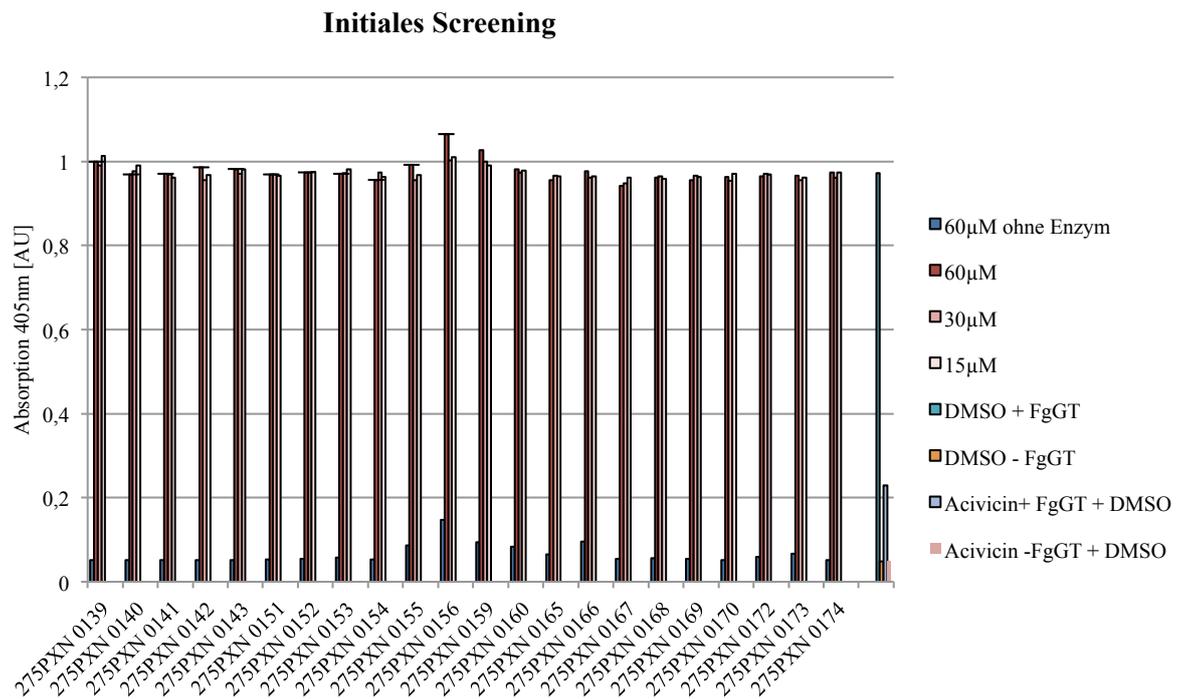


Abbildung 61 Screening der Priaxon Substanzbibliothek im FgGT Aktivitätsassay (Substanzen 296-317).

Oberer Graph: Einzelmessung von je 15 µM, 30 µM, 60 µM und 60 µM ohne Enzym als Hintergrundkontrolle der Substanzen. Als Kontrollen liefen je eine Probe mit 4 % DMSO mit und ohne Enzym (Substanzen in DMSO gelöst) und 100 mM Acivicin mit und ohne Enzym (Inhibitorkontrolle). Unterer Graph: relative FgGT Aktivität der hintergrundbereinigten Werte 60 µM. Der gemessene Hintergrund mit 60 µM Substanz ohne Enzym wurde vom gemessenen Wert 60 µM Substanz mit Enzym abgezogen und relativ zur DMSO Kontrolle (=100%ige Aktivität) dargestellt. Assaybedingungen: 18 nM FgGT, 20 mM GlyGly, 250 µM L-gGpNA, 0,1 % BSA, 100 mM Tris pH 8,0, 4 h Inkubation bei 37 °C, Endpunktmessung

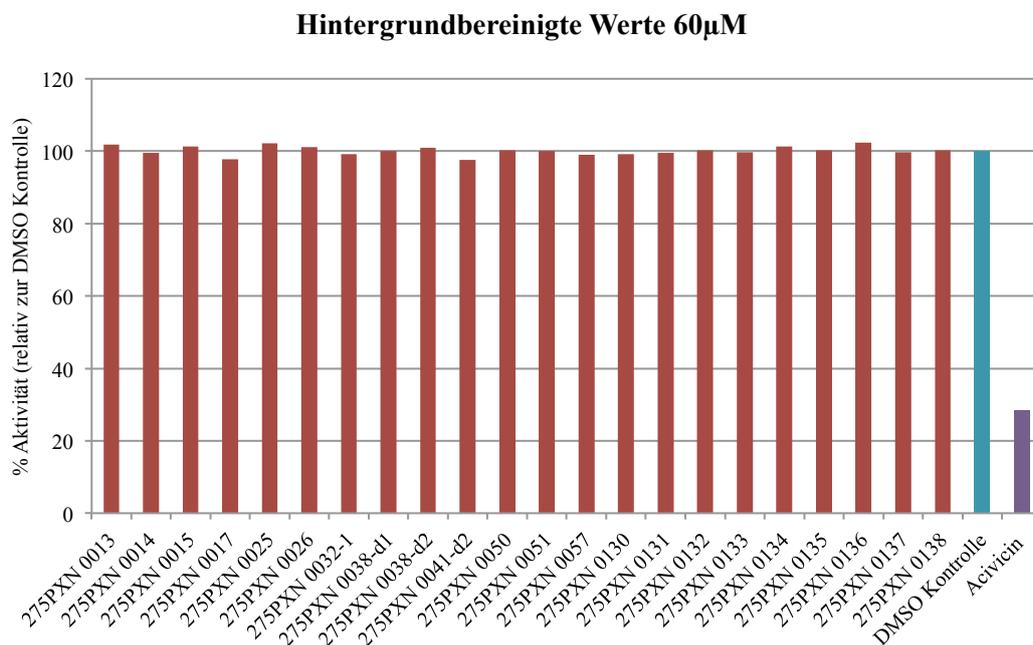
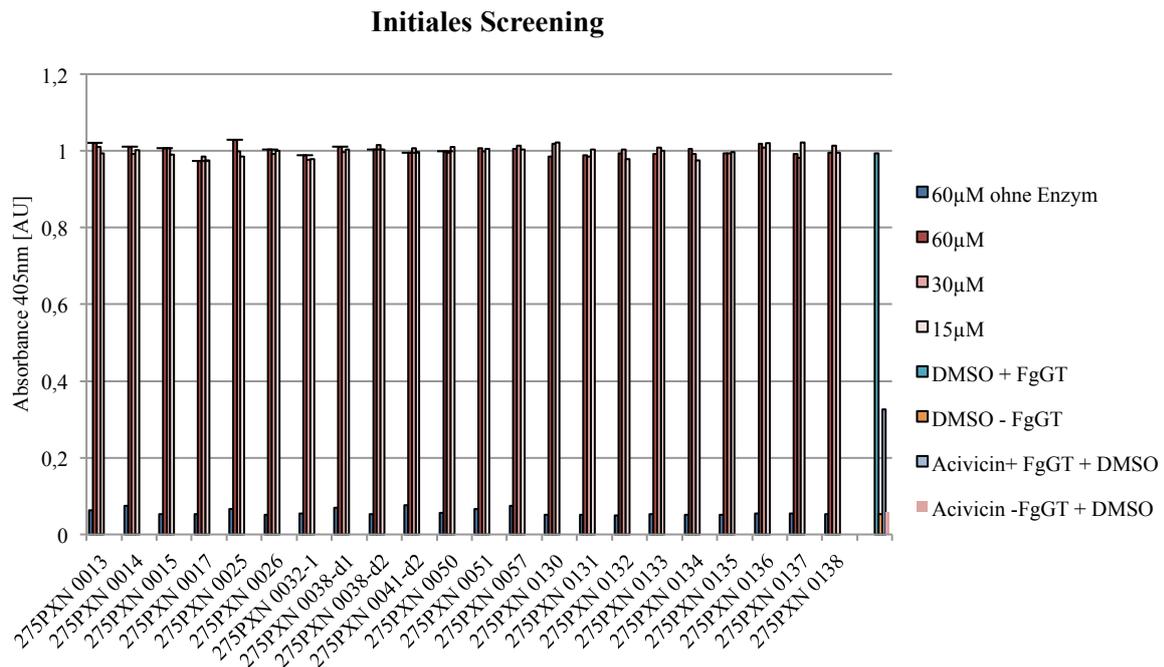
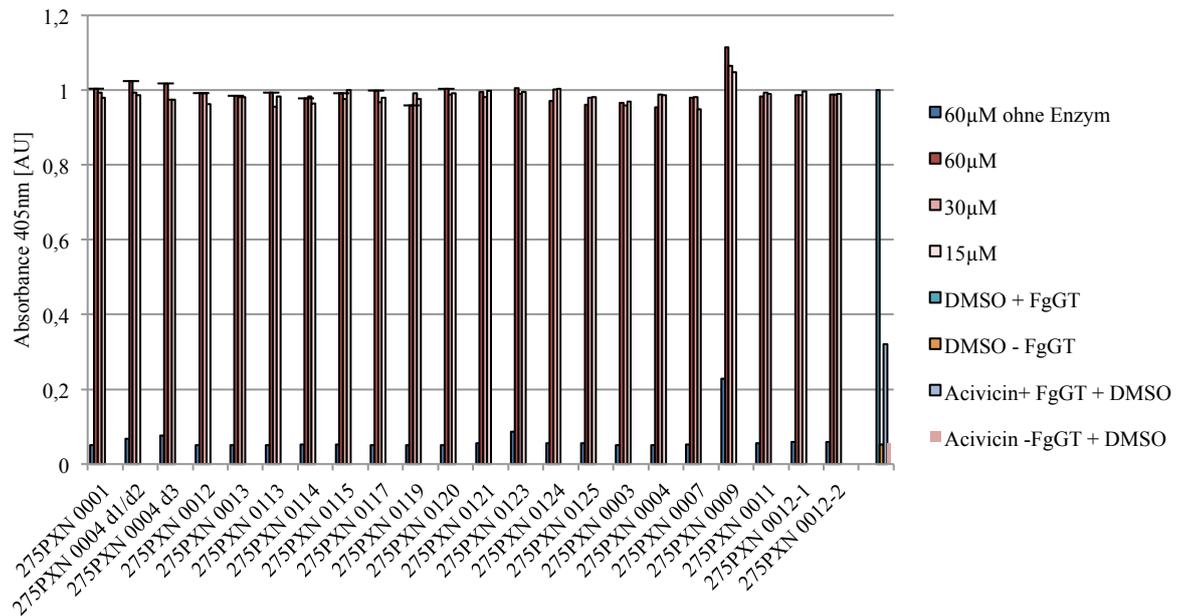


Abbildung 62 Screening der Priaxon Substanzbibliothek im FgGT Aktivitätsassay (Substanzen 318-339). Oberer Graph: Einzelmessung von je 15 µM, 30 µM, 60 µM und 60 µM ohne Enzym als Hintergrundkontrolle der Substanzen. Als Kontrollen liefen je eine Probe mit 4 % DMSO mit und ohne Enzym (Substanzen in DMSO gelöst) und 100 mM Acivicin mit und ohne Enzym (Inhibitorkontrolle). Unterer Graph: relative FgGT Aktivität der hintergrundbereinigten Werte 60 µM. Der gemessene Hintergrund mit 60 µM Substanz ohne Enzym wurde vom gemessenen Wert 60 µM Substanz mit Enzym abgezogen und relativ zur DMSO Kontrolle (=100%ige Aktivität) dargestellt. Assaybedingungen: 18 nM FgGT, 20 mM GlyGly, 250 µM L-gGpNA, 0,1 % BSA, 100 mM Tris pH 8,0, 4 h Inkubation bei 37 °C, Endpunktmessung

## Initiales Screening



## Hintergrundbereinigte Werte 60µM

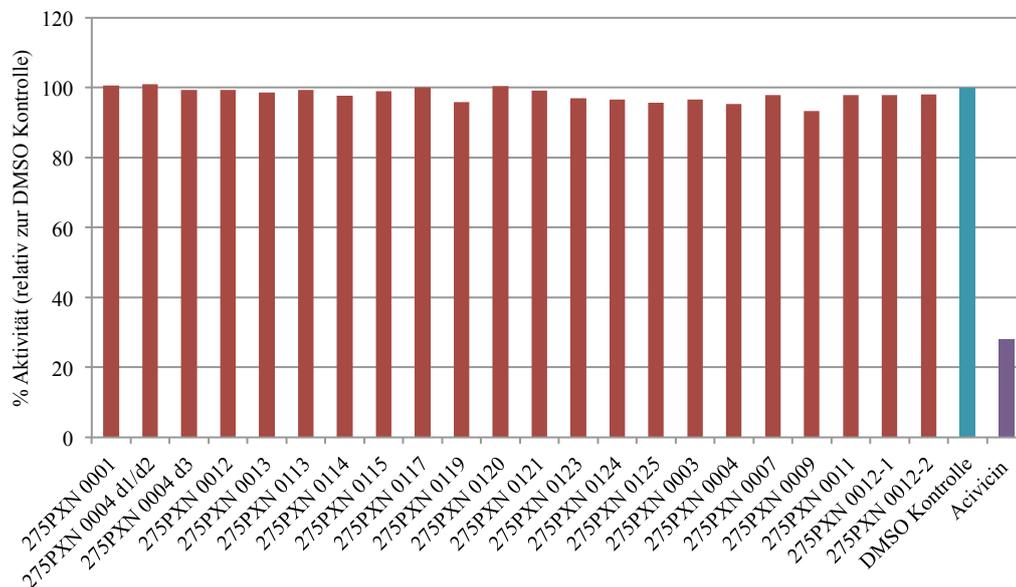


Abbildung 63 Screening der Priaxon Substanzbibliothek im FgGT Aktivitätsassay (Substanzen 340-361).

Oberer Graph: Einzelmessung von je 15 µM, 30 µM, 60 µM und 60 µM ohne Enzym als Hintergrundkontrolle der Substanzen. Als Kontrollen liefen je eine Probe mit 4 % DMSO mit und ohne Enzym (Substanzen in DMSO gelöst) und 100 mM Acivicin mit und ohne Enzym (Inhibitorkontrolle). Unterer Graph: relative FgGT Aktivität der hintergrundbereinigten Werte 60 µM. Der gemessene Hintergrund mit 60 µM Substanz ohne Enzym wurde vom gemessenen Wert 60 µM Substanz mit Enzym abgezogen und relativ zur DMSO Kontrolle (=100%ige Aktivität) dargestellt. Assaybedingungen: 18 nM FgGT, 20 mM GlyGly, 250 µM L-gGpNA, 0,1 % BSA, 100 mM Tris pH 8,0, 4 h Inkubation bei 37 °C, Endpunktmessung

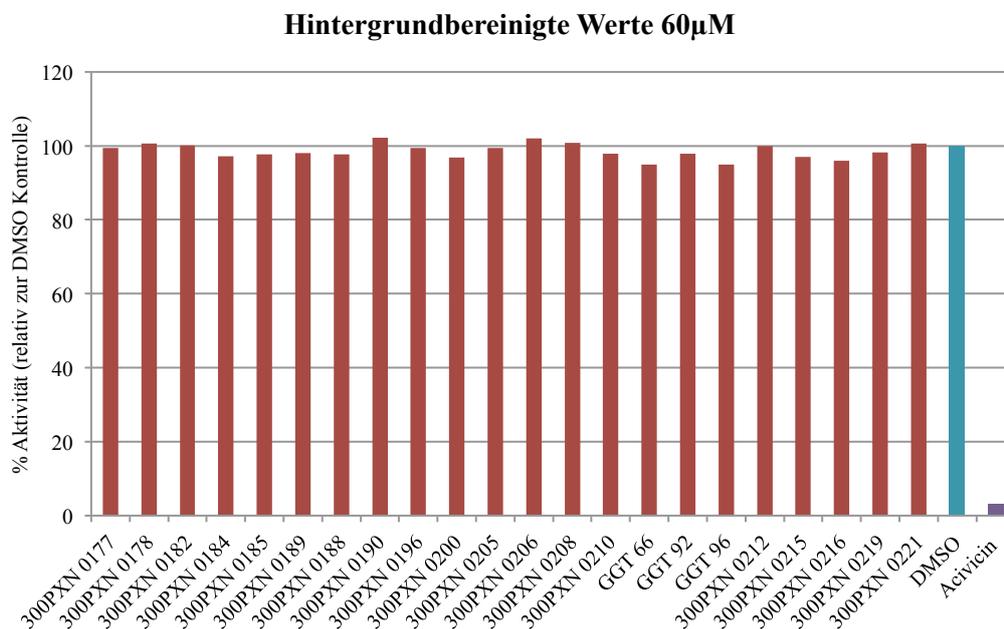
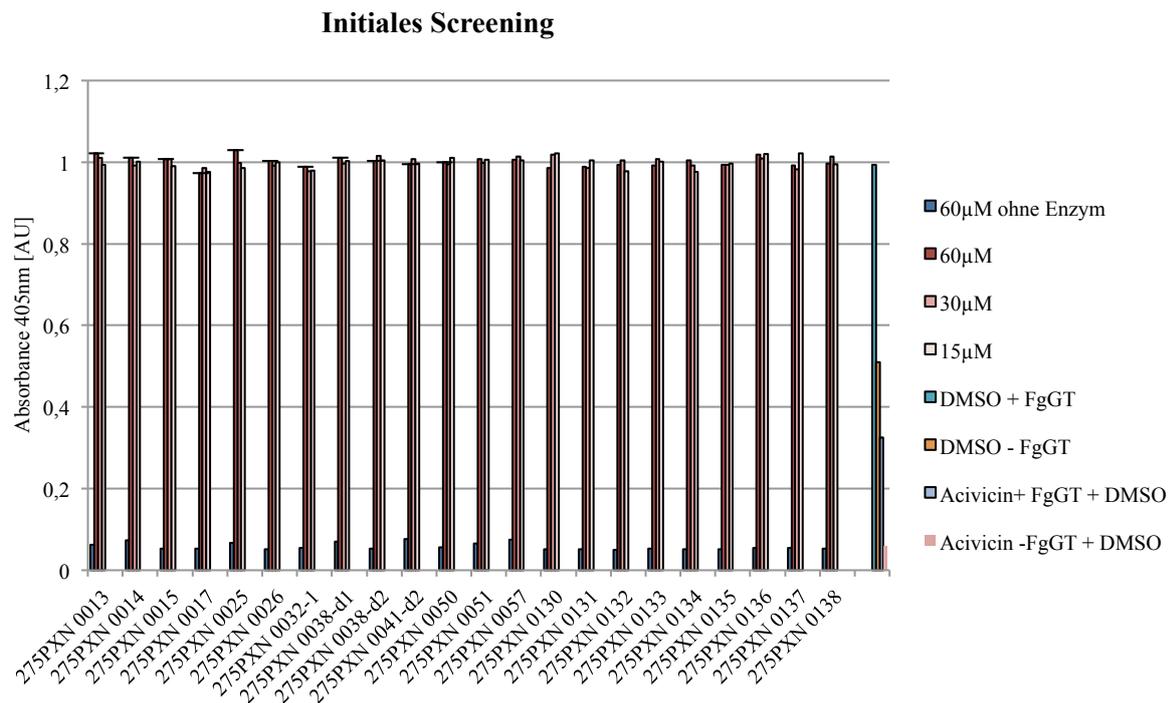
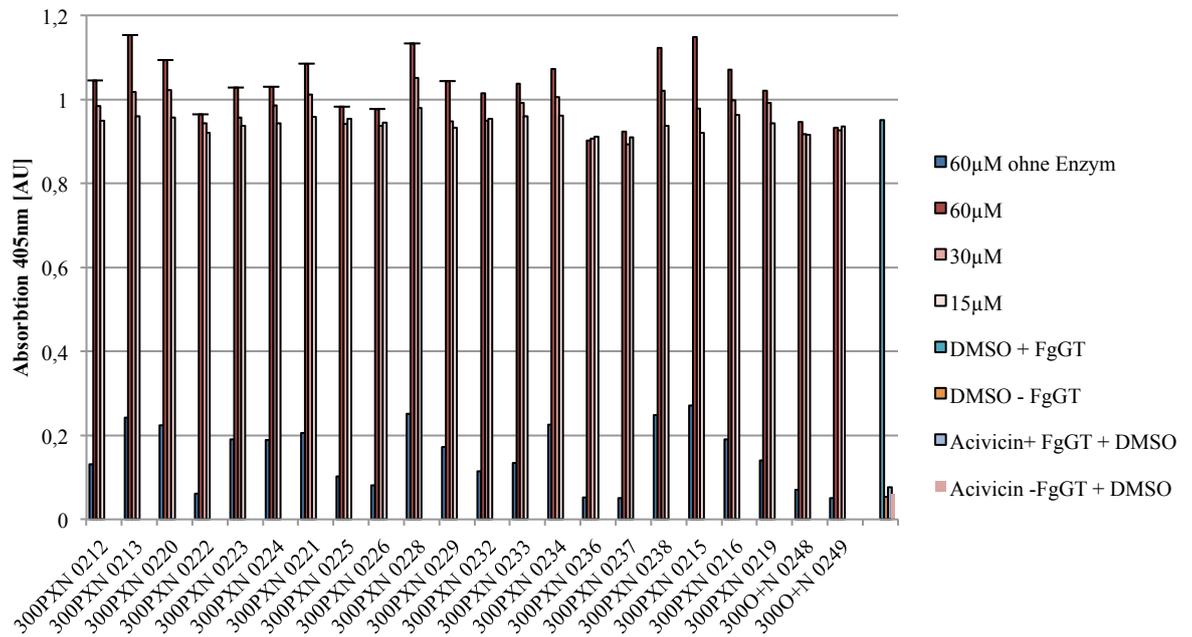


Abbildung 64 Screening der Priaxon Substanzbibliothek im FgGT Aktivitätsassay (Substanzen 362-383)

Oberer Graph: Einzelmessung von je 15 µM, 30 µM, 60 µM und 60 µM ohne Enzym als Hintergrundkontrolle der Substanzen. Als Kontrollen liefen je eine Probe mit 4 % DMSO mit und ohne Enzym (Substanzen in DMSO gelöst) und 100 mM Acivicin mit und ohne Enzym (Inhibitorkontrolle). Unterer Graph: relative FgGT Aktivität der hintergrundbereinigten Werte 60 µM. Der gemessene Hintergrund mit 60 µM Substanz ohne Enzym wurde vom gemessenen Wert 60 µM Substanz mit Enzym abgezogen und relativ zur DMSO Kontrolle (=100%ige Aktivität) dargestellt. Assaybedingungen: 18 nM FgGT, 20 mM GlyGly, 250 µM L-gGpNA, 0,1 % BSA, 100 mM Tris pH 8,0, 4 h Inkubation bei 37 °C, Endpunktmessung

### Initiales Screening



### Hintergrundbereinigte Werte 60µM

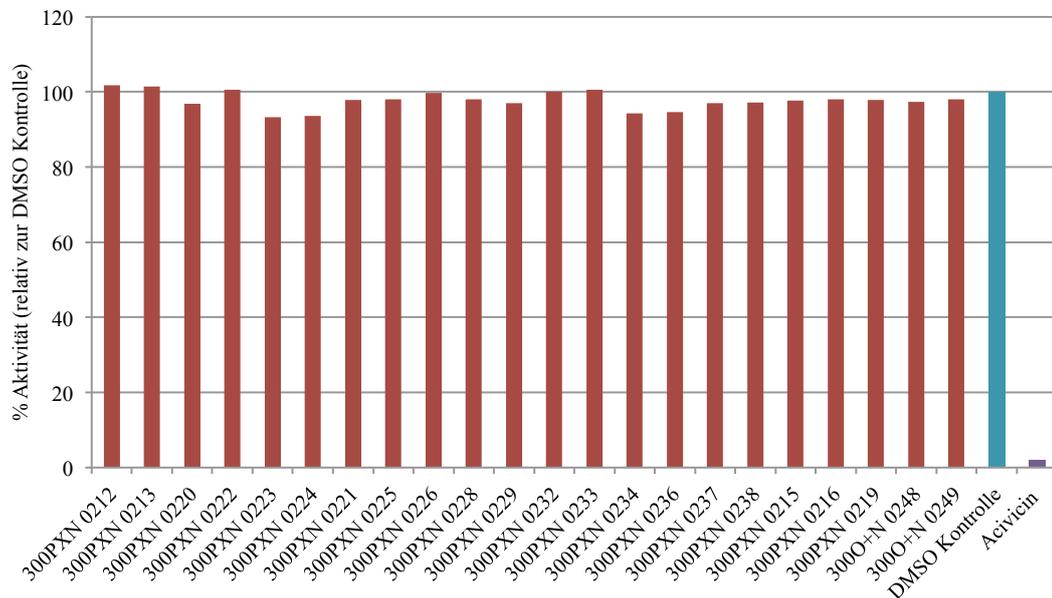


Abbildung 65 Screening der Priaxon Substanzbibliothek im FgGT Aktivitätsassay (Substanzen 384-405).

Oberer Graph: Einzelmessung von je 15 µM, 30 µM, 60 µM und 60 µM ohne Enzym als Hintergrundkontrolle der Substanzen. Als Kontrollen liefen je eine Probe mit 4 % DMSO mit und ohne Enzym (Substanzen in DMSO gelöst) und 100 mM Acivicin mit und ohne Enzym (Inhibitorkontrolle). Unterer Graph: relative FgGT Aktivität der hintergrundbereinigten Werte 60 µM. Der gemessene Hintergrund mit 60 µM Substanz ohne Enzym wurde vom gemessenen Wert 60 µM Substanz mit Enzym abgezogen und relativ zur DMSO Kontrolle (=100%ige Aktivität) dargestellt. Assaybedingungen: 18 nM FgGT, 20 mM GlyGly, 250 µM L-gGpNA, 0,1 % BSA, 100 mM Tris pH 8,0, 4 h Inkubation bei 37 °C, Endpunktmessung

### 6.2.2 Ergebnisse der spezifischen FtgGT Substanzen

Insgesamt wurden die 27 kommerziell erworbenen Substanzen aus dem „*in silico*“ Screen im Aktivitätsassay auf mögliche Inhibition der FtgGT Aktivität getestet. Im Folgenden sind die Ergebnisse dargestellt:

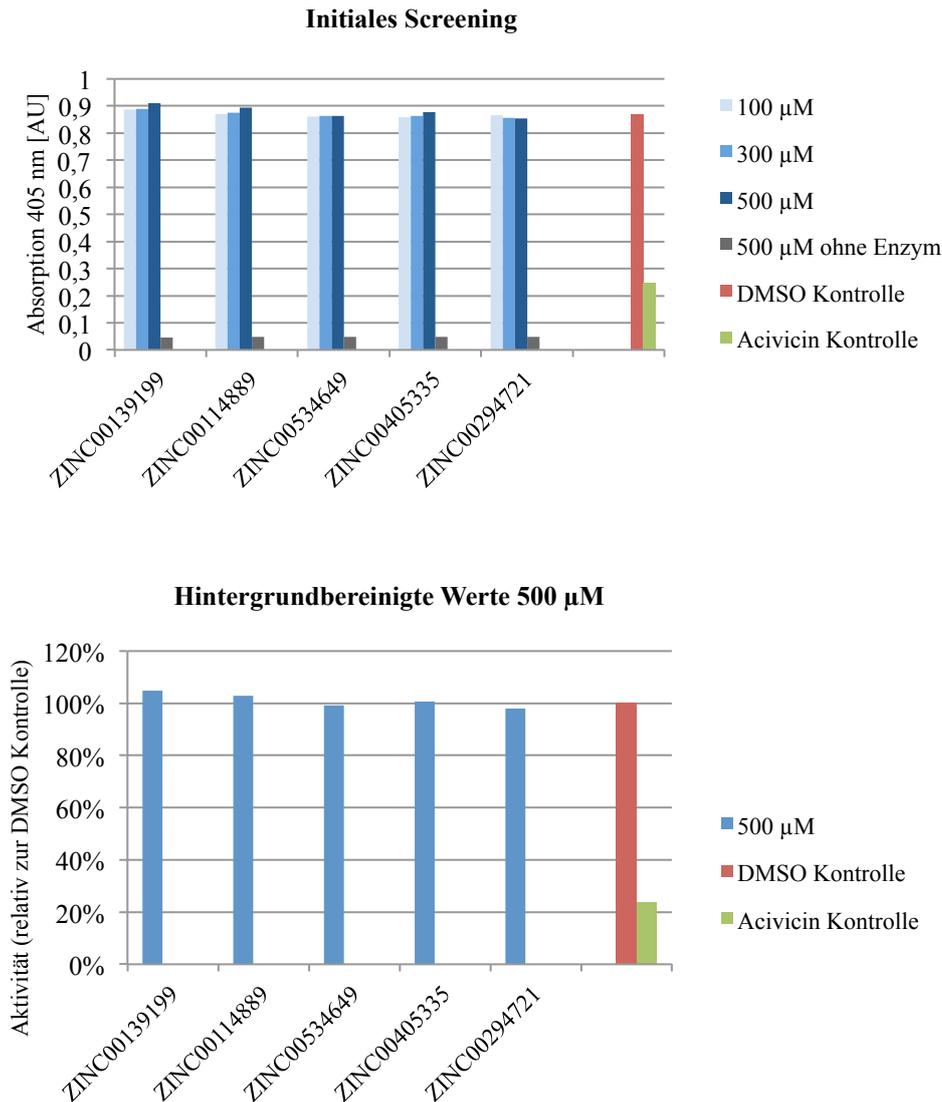


Abbildung 66 Screening der kommerziell erhältlichen Substanzen 1-5 im FtgGT Aktivitätsassay. Initiales Screening: Einzelmessung von je 100 µM, 300 µM, 500 µM und 500 µM ohne Enzym als Hintergrundkontrolle der Substanzen. Als Kontrollen liefen je eine Probe mit 4 % DMSO (Substanzen in DMSO gelöst) und 100 mM Acivicin (Inhibitorkontrolle). Hintergrundbereinigte Werte 500 µM sind in der relativen FtgGT Aktivität angegeben. Der gemessene Hintergrund mit 500 µM Substanz ohne Enzym wurde vom gemessenen Wert 500 µM Substanz mit Enzym abgezogen und relativ zur DMSO Kontrolle (=100 %ige Aktivität) dargestellt. Assaybedingungen: 18 nM FtgGT, 20 mM GlyGly, 250 µM L-gGpNA, 0,1 % BSA, 100 mM Tris pH 8,0, 4 h Inkubation bei 37 °C, Endpunktmessung.

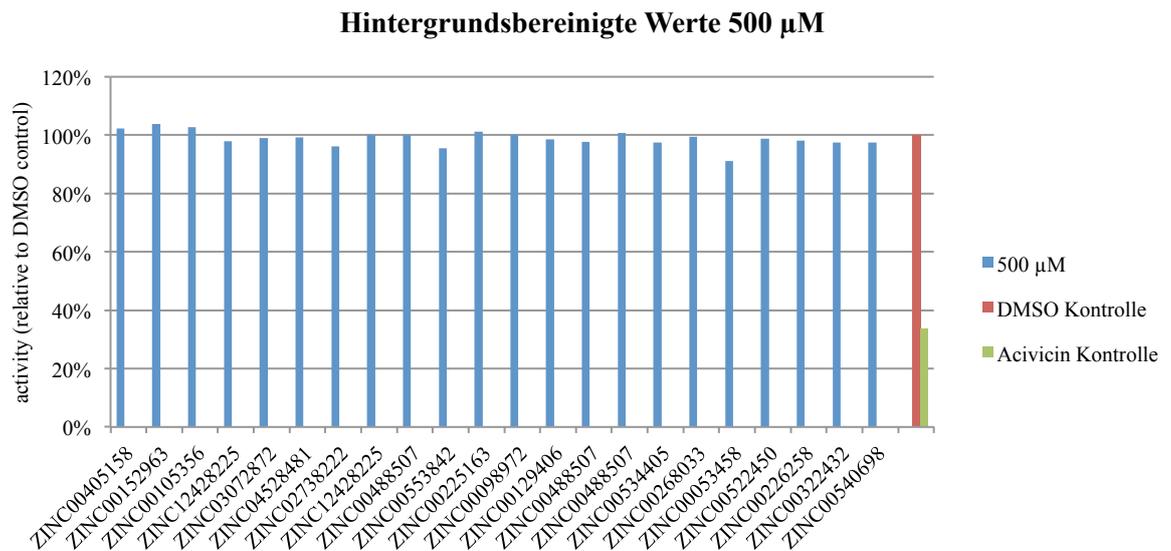
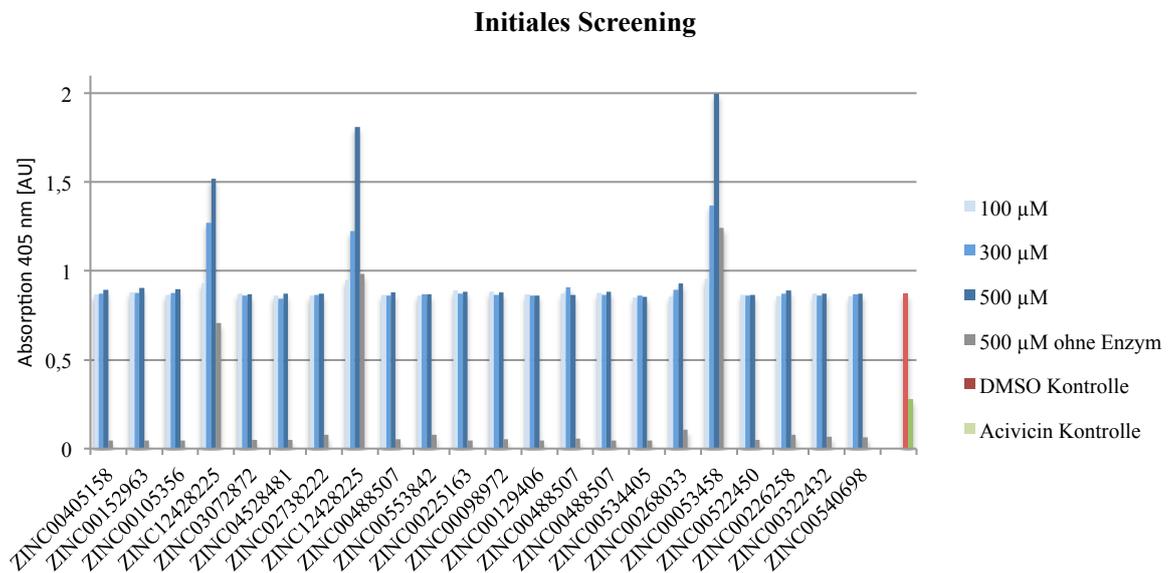


Abbildung 67 Screening der kommerziell erhältlichen Substanzen 6-27 im FgGT Aktivitätsassay.

Initiales Screening: Einzelmessung von je 100 µM, 300 µM, 500 µM und 500 µM ohne Enzym als Hintergrundkontrolle der Substanzen. Als Kontrollen liefen je eine Probe mit 4 % DMSO (Substanzen in DMSO gelöst) und 100 mM Acivicin (Inhibitorkontrolle). Hintergrundbereinigte Werte 500 µM sind in der relativen FgGT Aktivität angegeben. Der gemessene Hintergrund mit 500 µM Substanz ohne Enzym wurde vom gemessenen Wert 500 µM Substanz mit Enzym abgezogen und relativ zur DMSO Kontrolle (=100 %ige Aktivität) dargestellt. Assaybedingungen: 18 nM FgGT, 20 mM GlyGly, 250 µM L-gGpNA, 0,1 % BSA, 100 mM Tris pH 8,0, 4 h Inkubation bei 37 °C, Endpunktmessung.

## **Danksagung**

Herrn Prof. Dr. Markus Gerhard danke ich für die Betreuung, Unterstützung, die Möglichkeit meine Doktorarbeit abzuschließen und sein Vertrauen, das er mir über all die Jahre entgegen gebracht hat.

Ich danke Herrn Prof. Thilo M. Fuchs für die Übernahme mich als externe Doktorandin zu betreuen und für seine herzliche Unterstützung.

Herrn Prof. Dr. Dirk Haller danke ich für die Übernahme des Vorsitzenden der Prüfungskommission.

Frau Dr. Hannelore Meyer gilt ein ganz besonderer Dank sowohl für die hervorragende motivierende Unterstützung und wissenschaftliche, liebenswerte Betreuung als auch das in jeder Hinsicht große Interesse und die stets vorhandene Zeit.

Für die Möglichkeit, meine Doktorarbeit am Institut für Medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Hygiene anfertigen zu dürfen, möchte ich mich herzlich bei Prof. Dr. Dirk Busch bedanken.

Der deutschen Bundeswehr danke ich für die Finanzierung des Projektes. Insbesondere Dr. Markus Antwerpen (Institut der Mikrobiologie der Bundeswehr, München, Leiter: Oberarzt Ptof. Dr. L. Zöller) danke ich für die liebenswerte und kompetente Zusammenarbeit.

Herrn Dr. Grzegorz Popowicz aus der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Michael Sattler (Institute of Structural Biology, Helmholtz Zentrum München) danke ich für die warmherzige Zusammenarbeit und für die hervorragende Kristallstruktur der FtgGT.

Frau Dr. Elisabeth Kremmer (Helmholtz Zentrum München) danke ich für die Bereitstellung der Hybridomaüberstände.

Ganz besonders möchte ich mich bei Frau Dr. Christina Daschkin für die stets anregenden konstruktiven Diskussionen und liebenswerte Unterstützung bedanken.

Dr. Christian Bolz danke ich für die Überlassung des Projektes sowie die Bereitstellung der His-getaggen FtgGT.

Herzlichen Dank an die komplette Arbeitsgruppe Prof. Dr. Gerhard für die tolle Zeit, die regen Diskussionen, der Aufmunterungen und dem harmonischen Arbeitsklima während meiner Promotion.

Für die Durchsicht meiner Arbeit möchte ich mich bei Dr. Hannelore Meyer, Dr. Christina Daschkin, Ramona Nitu und Nina-Anais Nun bedanken.

Bei meinen Freunden, besonders bei Dr. Britta Hoffzimmer und Nina Anis Nun möchte ich mich für die motivierenden Aufmunterungen und Unterstützung ganz herzlich bedanken.

Ich möchte mich bei meinen Eltern, Schwiegereltern und Geschwistern für ihr Vertrauen, Verständnis und ihre Geduld herzlich bedanken.

Bei meinem Ehemann, Nima Sahavi, der mir stets die nötige Ruhe und Kraft gab und mich in jeder Hinsicht unterstützte, gilt ein ganz besonder Dank. Ebenfalls bedanke ich mich für seine Geduld, sein Vertrauen und Verständnis.

Meinen Kindern Elias Kian Sahavi und Yunis Amin Sahavi, die immer eine Aufmunterung für mich waren, danke ich sehr für ihre Geduld.