

# **Zellfreie Protein-Produktion zur *Target*- und Substrat-Evaluation**

## **Dissertation**

**zur Erlangung des Doktorgrades**

**der Mathematischen-Naturwissenschaftlichen Fakultät**

**der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel**

**vorgelegt von**

**Bastian Thomas Höger**

Kiel, 2023



**Erster Gutachter: Professor Dr. Eric Beitz**

**Zweiter Gutachter: Professor Dr. Christian Peifer**

**Tag der mündlichen Prüfung: 23.05.2023**

**Zum Druck genehmigt: 23.05.2023**



„Was ist wichtiger?“, fragte der große Panda, „der Weg oder das Ziel?“ „Die Weggefährten“, sagte der kleine Drache.

Aus „Großer Panda und Kleiner Drache“ von James Norbury



# Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>v</b>
<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>VIII</b>
<b>Abstract .....</b>	<b>IX</b>
<b>1 Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1 Entwicklung von antibakteriellen Wirkstoffen.....	1
1.2 Struktur und Aufbau von Ribosomen.....	2
1.3 Die Proteinbiosynthese als <i>Target</i> für Antibiotika .....	4
1.4 Resistenzen im Kontext der Proteinbiosynthese und deren Entstehung .....	6
1.5 Assays mit dem <i>Target</i> der ribosomalen Proteinbiosynthese .....	7
1.6 Zellfreie Proteinsynthese.....	8
1.7 Lösliche Fluoreszenzproteine wie GFP und mNeongreen.....	10
1.8 Membranproteine: Aquaglyceroporine .....	12
1.9 <i>Bio-Layer-Interferometrie</i> .....	14
1.10 Zielsetzung der Arbeit .....	16
<b>2 Material.....</b>	<b>17</b>
2.1 Plasmide .....	17
2.2 Oligonukleotide .....	18
2.3 Kodierende DNA-Sequenzen .....	19
2.4 Bakterien-Stämme.....	19
2.5 Enzyme, Antikörper, Kits, Chemikalien und Verbrauchsmaterialien .....	19
2.6 Nährmedien, Lösungen & Puffer.....	23
2.7 Geräte & Software.....	26
<b>3 Methoden.....</b>	<b>29</b>
3.1 Molekularbiologische Methoden .....	29
3.1.1 Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> .....	29
3.1.2 Transformation chemisch kompetenter <i>E. coli</i> .....	29
3.1.3 Dauerkulturen von Bakterien .....	30
3.1.4 DNA-Isolierung aus <i>E. coli</i> .....	30
3.1.5 DNA-Konzentrationsbestimmung.....	30
3.1.6 Restriktionsverdau.....	31
3.1.7 Ligation .....	31
3.1.8 Ortsspezifische Mutagenese .....	31
3.1.9 <i>Touchdown-PCR</i> .....	32

3.1.10	Sanger-Sequenzierung.....	32
3.1.11	Agarosegelektrophorese .....	33
3.1.12	Extraktion und Reinigung von DNA aus Agarosegelen.....	33
3.1.13	Erstellung einer Ribosomenbindestellen-Datenbank.....	33
3.2	Allgemeine proteinchemische Methoden.....	34
3.2.1	Proteinquantifizierung nach Bradford.....	34
3.2.2	SDS-Polyacrylamid-Gelektrophorese (SDS-PAGE) .....	34
3.2.3	Western Blot-Analyse .....	34
3.2.4	Coomassie-Färbung von Proteinen .....	35
3.2.5	In-Gel-Fluoreszenz .....	35
3.2.6	Entfernung von Imidazol vom Membranprotein über <i>PD-MidiTrap G-25</i> -Säulen.....	35
3.2.7	Protein-Konzentrierung.....	35
3.2.8	TCA-Fällung.....	36
3.2.9	Gewinnung von S30-Extrakten aus verschiedenen Bakterien.....	36
3.2.10	Gewinnung einer T7-RNA-Polymerase .....	38
3.3	Zellfreie Proteinsynthese.....	38
3.3.1	Zellfreie Proteinsynthese im Zwei-Kompartiment-System .....	39
3.3.2	Zellfreie Proteinsynthese im Ein-Kompartiment-System .....	41
3.3.3	Nickel-Nitrilotriessigsäure- ( $\text{Ni}^{2+}$ -NTA)-Affinitätschromatographie.....	43
3.4	Bestimmung der Minimalen Hemmkonzentration (MHK) .....	43
3.5	Präparation und Charakterisierung von Liposomen .....	44
3.5.1	Herstellung von Liposomen .....	44
3.5.2	Rekonstitution von Proteinen in Liposomen mit der Verdünnungsmethode .....	45
3.5.3	Rekonstitution von Proteinen in Liposomen mit Bio-Beads® SM-2 .....	45
3.5.4	Dichtegradientenzentrifugation .....	45
3.5.5	Lichtstreumessungen mit der <i>stopped-flow</i> -Apparatur .....	46
3.6	<i>Bio-Layer</i> -Interferometrie .....	47
<b>4</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>49</b>
4.1	Zellfreie Produktion von fluoreszierenden Proteinen für die Entdeckung neuer gegen Ribosomen-gerichteter Antibiotika.....	49
4.1.1	Herstellung und Qualität eines ribosomalen Extrakts aus <i>E. coli</i> .....	50
4.1.2	Herstellung und Qualität der T7-RNA-Polymerase aus <i>E. coli</i> .....	51
4.1.3	Optimierung eines auf <i>E. coli</i> basierenden zellfreien Transkriptions-Translationssystems mit einem Ein-Kompartiment-System .....	53

4.1.4 Konzeptnachweis: Reduzierte GFP-Fluoreszenz als Marker für eine Translationshemmung .....	55
4.1.5 Gewinnung eines ribosomalen Extrakts auf Basis aus <i>B. subtilis</i> .....	56
4.1.6 Gewinnung eines S30-Extrakts aus <i>S. enterica</i> und <i>B. megaterium</i> im Erlenmeyerkolben .....	59
4.1.7 Extraktion eines S30-Extrakts aus <i>P. putida</i> im Erlenmeyerkolben.....	60
4.1.8 Gewinnung von S30-Extrakten aus <i>P. putida</i> und <i>S. enterica</i> aus einem Fermenter....	62
4.1.9 Veränderung der Ribosomenbindestelle für einen S30-Extrakt aus <i>P. putida</i> .....	64
4.1.10 Einführung eines heller leuchtenden Fluoreszenzprotein: mNeonGreen.....	66
4.1.11 Optimierung eines zellfreien Translationssystems aus <i>P. putida</i> zur Entwicklung einer Screening-Plattform mit mNeonGreen .....	70
4.1.12 Transfer des Translation-Assays für <i>Pseudomonas</i> - und <i>Salmonella</i> -Spezies.....	72
4.1.13 Evaluierung und Validierung einer fluoreszenz-basierten <i>in vitro</i> -Screening-Plattform für antibakterielle Inhibitoren .....	73
4.2 Entwicklung einer Hochdurchsatzmethode für die Entdeckung neuartiger Substrate für Membranproteine .....	74
4.2.1 Brij 78 eignet sich zur zellfreien Synthese von PfAQP1.....	76
4.2.2 Die Zellfreie Proteinsynthese von PfAQP1 führt zu Ausbeuten im Milligramm-Bereich	
77	
4.2.3 Überprüfung der Funktionalität von zellfrei synthetisiertem PfAQP1 mit Hilfe der <i>stopped flow</i> -Methode .....	78
4.2.4 Bindung von biotinilylierten Liposomen an Streptavidin-Sensoren.....	79
4.2.5 Schrumpf- und Schwellverhalten von beladenen Liposomen-Sensoren .....	80
4.2.6 Brij 78 eignet sich zur zellfreien Synthese von TbAQP2 .....	82
4.2.7 TbAQP2 führt in der zellfreien Proteinsynthese zu Ausbeuten im Milligramm-Bereich	
83	
4.2.8 Durchlässigkeit von TbAQP2-Proteoliposomen und Leerliposomen gegenüber verschiedenen Zuckeralkoholen.....	84
4.2.9 Eine alternative Methode zur Protein-Rekonstitution mit Hilfe von Bio-Beads®SM-2.	87
4.2.10 Permeation von TbAQP2-Proteoliposomen gegenüber verschiedenen Glycerol-Gradienten.....	88
4.2.11 Einsatz von Pentamidin als Inhibitor gegenüber TbAQP2-Proteoliposomen.....	89
<b>5 Diskussion .....</b>	<b>91</b>
5.1 Evaluation der zellfreie Produktion von fluoreszierenden Protein zur <i>Target</i> -Identifizierung	
91	
5.1.1 Unterschiedliche IC <sub>50</sub> -Werte der prokaryotischen Extrakte und Auswahl der Bakterien	
91	

5.1.2	Unterschiedliche Proteinausbeute der eingesetzten, prokaryotischen ribosomalen Extrakte	93
5.1.3	Limitationen des Assays .....	96
5.1.4	Vorteile und Anwendung der fluoreszenzbasierten <i>Screening</i> -Plattform .....	99
5.2	Evaluation der Liposomen-Präparation als Testsystem für ein Substrat- <i>Screening</i> mittels BLI	
	100	
5.2.1	Vergleich von <i>E. coli</i> - mit 4Me 16:0 PC-Lipiden für die Herstellung von Liposomen mit rekonstituierten Aquaporinen.....	100
5.2.2	Funktionelle Charakterisierung von PfAQP1- und TbAQP2-Proteoliposomen.....	104
5.3	Schlussfolgerung.....	107
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>108</b>

## Abkürzungsverzeichnis

4Me 16:0 PC	1,2-Diphytanoyl-sn-glycero-3-phosphocholin
aaRS	<i>Aminoacyl-tRNA Synthetase</i>
AcP	Acetylphosphat
Amp	Ampicillin
A-Stelle	Aminoacyl-Stelle
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
BLI	<i>Bio-Layer-Interferometrie</i>
bp	Basenpaare
CA	Cardiolipin
CECF	<i>Continuous-exchange-cell-free-system</i>
CF	<i>cell-free expression system</i> (zellfreies Expressionssystem)
CMC	<i>critical micelle concentration</i> (kritische Mizellenkonzentration)
CTP	Cytidin-5'-triphosphat
DC	Dekodierungszentrum
ddNTP	Didesoxyribonukleosidtriphosphat
DNA	<i>Desoxyribonucleic acid</i> (Desoxyribonukleinsäure)
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DMPA	1,2-Dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphat
DOPC	1,2-Diphytanoyl-sn-glycero-3-phosphocholin
DOPE	1,2-Dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamin
DOPS	1,2-Dioleoyl-sn-glycero-3-phospho-L-serin
DPC	n-Dodecyl-phosphocholin
DTT	1,4-Dithiothreitol
eBFP	<i>Enhanced blue fluorescent protein</i>
eCFP	<i>Enhanced cyan fluorescent protein</i>
EF-G	Elongationsfaktor G
eGFP	<i>Enhanced green fluorescent protein</i>
EF-Tu	Elongationsfaktor- <i>thermo unstable</i>
ermC	Erythromycin resistance methyltransferase
eYFP	<i>Enhanced yellow fluorescent protein</i>
FM	<i>feeding mixture</i>
GFP	<i>green fluorescent protein</i> (grün fluoreszierendes Protein)

GTP	Guanosin-5'-triphosphat
HEPES	2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]-ethansulfonsäure
His	Histidin
IC <sub>50</sub>	mittlere inhibitorische Konzentration
LB-Medium	Luria-Bertani-Medium
MHK	mittlere Hemmkonzentration
mRNA	Messenger RNA
MRSA	Methicillin resistente Stämme
MTBST	TRIS-buffered saline mit Tween® 20 und Magermilchpulver
NTA	Ni <sup>2+</sup> -NTA Nickel-Nitrilotriessigsäure
NTP	Nukleosidtriphosphat
PAGE	<i>polyacrylamide gel electrophoresis</i> (Polyacrylamidgelektrophorese)
PC	Phosphatidylcholin
PE	Phosphatidylethanolamin
PEG	Polyethylenglykol
PEP	Phosphoenolpyruvat
PfAQP1	Aquaporin 1 aus <i>Plasmodium falciparum</i>
PG	Phosphatidylglycerol
PIT	Phaseninversionstemperatur
P-Stelle	Peptidyl-Stelle
POPC	1-Palmitoyl-2-oleoylphosphatidylcholin
POPG	1-Palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphoglycerol
PTC	Peptidyltransferasezentrum
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RBS	Ribosomen-Bindungsstelle
RCWMDE	L-Arginin, L-Cystein, L-Tryptophan, L-Methionin, L-Asparaginsäure, L- Glutaminsäure
RM	<i>reaction mixture</i>
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	<i>revolutions per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
rRNA	Ribosomale RNA
S.E.M.	<i>standard error of the mean</i> (Standardfehler des Mittelwerts)
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i> (Natriumdodecylsulfat)
TAE	TRIS-Acetat-EDTA
TbAQP2	Aquaporin 2 aus <i>Trypanosoma brucei</i>
TBST	Tris-buffered saline mit Tween® 20

TEMED	<i>N,N,N',N'</i> -Tetramethylethylendiamin
tRNA	Transfer RNA
UTP	Uridin-5'-triphosphat
VRE	Vancomycinresistente Enterokokken

## Zusammenfassung

Verschiedene Probleme, darunter der übermäßige Einsatz von Antibiotika, haben zur Entwicklung von bedrohlichen multiresistenten Bakterienstämmen geführt, die die Entwicklung neuer Antibiotika erforderlich machen. Ein Viertel der aktuellen klinischen Phase-III-Antibiotika-Kandidaten zielen auf die Translation ribosomaler Proteine ab. Für die Entwicklung neuartiger Antibiotika stellt die *Target*-Identifizierung einen besonders kritischen Schritt in der Entdeckung neuartiger Antibiotika dar. Für die *Target*-Identifizierung von Antibiotika, die die Translation inhibieren, steht unter anderem die zellfreie Proteinsynthese zur Verfügung. Weiterhin findet die zellfreie Proteinsynthese breite Anwendung für die Synthese von Membranproteinen. Von besonderem Interesse im Kontext der Membranproteine ist die Identifizierung neuer Substrate. Eine neuartige Hochdurchsatz-Methode, welche wenig störanfällig ist, stellt die *Bio-Layer-Interferometrie* (BLI) dar, welche vor allem zur Messung von Affinitäten genutzt wird. Eine Nutzung der BLI zum Substrat-*Screening* für Membranproteine würde eine neue Anwendung schaffen. In dieser Arbeit werden zwei verschiedene Fragestellungen angegangen.

Einerseits wird ein effektives zellfreies *in vitro* *Screening*-System für Inhibitoren der bakteriellen Ribosomenaktivität mit direkter Fluoreszenzmessung beschrieben. Unter Verwendung von ribosomalen S30-Extrakten aus *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* und *Pseudomonas putida* wird eine Validierung dieses Systems durch konzentrationsabhängige Hemmung der Translation durch eine Reihe verschiedener Klassen von Inhibitoren, die auf die Translation abzielen, demonstriert. Die zellfreie Ein-Kompartimenten-Translation Reaktion ist mit *multi-well*-Formaten kompatibel. Die Fluorophorbildung des grün fluoreszierenden Proteins oder des monomeren NeonGreen erfolgt innerhalb einer Stunde und benötigt ein geringes Volumen. Als markierungsfreies *Readout* ermöglicht die Dosisreaktion außerdem die  $IC_{50}$ -Bestimmung im gleichen Aufbau. Diese Arbeit zeigt, dass die zellfreie Produktion von fluoreszierenden Proteinen für die Entdeckung von Antibiotika, die auf Ribosomen abzielen, durchführbar ist und sich für Hochdurchsatz-Anwendungen eignet.

Zum Zweiten wird in dieser Arbeit für die Etablierung der BLI als Substrat-*Screening*-Methode ein Testsystem eingeführt. Hier wurden die beiden Aquaglyceroporine *Plasmodium falciparum* (PfAQP1) sowie die Isoform 2 aus *Trypanosoma brucei* (TbAQP2) zellfrei synthetisiert und in Liposomen rekonstituiert. Die Funktionalität der Liposomen wurde anhand einer Charakterisierung des Schrumpf- und Schwellverhalten gegenüber verschiedenen hyperosmotischen Zuckeralkoholen an der *stopped flow*-Methode gezeigt. Es wurden die initiale Leitfähigkeit von Glycerol für PfAQP1 und von verschiedenen Zuckeralkoholen sowie in Abhängigkeit verschiedener Glycerol-Konzentrationen für TbAQP2 ermittelt. Weiterhin wurden erste Daten bezüglich der Bindung der Liposomen über eine biotinylierung an Streptavidin-Sensoren der BLI sowie des Verhaltens gegenüber verschiedenen isosomatischen Gradienten von Glycerol für PfAQP1-Liposomen gezeigt. Dabei wurden erste kritische Parameter wie die Dichtigkeit der Liposomen-Membran für die Entwicklung der Methode aufgezeigt. Zur Erhöhung der Membran-Dichtigkeit wurden neben biologischen *E. coli*-Lipiden chemisch, synthetisierte Lipide zur Herstellung der Liposomen eingeführt. Somit liefert diese Arbeit erste Erkenntnisse zur Etablierung eines Testsystems, welches für die BLI verwendet werden kann.

## Abstract

Various problems, including the overuse of antibiotics, have led to the development of threatening multidrug-resistant bacterial strains that require the development of new antibiotics. A quarter of current phase III clinical antibiotic candidates target the translation of ribosomal proteins. For the development of novel antibiotics, target identification is a particularly critical step in the discovery of novel antibiotics. For target identification of antibiotics that inhibit translation, cell-free protein synthesis is one of the methods available. Furthermore, cell-free protein synthesis is widely used for the synthesis of membrane proteins. Of particular interest in the context of membrane proteins is the identification of new substrates. Bio-layer interferometry (BLI) is a novel high-throughput method that is less susceptible to interference and is mainly used to measure affinities. Using BLI for substrate screening of membrane proteins would create a new application. In this work, two different questions are addressed.

On the one hand, an effective cell-free in vitro screening system for inhibitors of bacterial ribosome activity with direct fluorescence measurement is described. Using ribosomal S30 extracts from *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* and *Pseudomonas putida*, a validation of this system is demonstrated by concentration-dependent inhibition of translation by a number of different classes of translation-targeting inhibitors. The cell-free one-compartment translation reaction is compatible with multi-well formats. Fluorophore formation of the green fluorescent protein or monomeric NeonGreen occurs within one hour and requires a small volume. As a label-free readout, the dose response also allows  $IC_{50}$  determination in the same setup. This work demonstrates that cell-free production of fluorescent proteins for antibiotic discovery targeting ribosomes is feasible and suitable for high-throughput applications.

Secondly, for the establishment of BLI as a substrate screening method, a test system is introduced in this work. Here, the two aquaglyceroporins *Plasmodium falciparum* (PfAQP1) and isoform 2 from *Trypanosoma brucei* (TbAQP2) were synthesised cell-free and reconstituted in liposomes. The functionality of the liposomes was demonstrated by characterising the shrinkage and swelling behaviour towards different hyperosmotic sugar alcohols using the stopped flow method. The initial conductivity of glycerol for PfAQP1 and of different sugar alcohols as well as in dependence of different glycerol concentrations for TbAQP2 were determined. Furthermore, first data concerning the binding of liposomes via biotinylation to streptavidin sensors of BLI as well as the behaviour towards different isosomal gradients of glycerol for PfAQP1 liposomes were shown. This revealed the first critical parameters such as liposome membrane tightness for the development of the method. To increase membrane tightness, chemically synthesised lipids were introduced to produce the liposomes, in addition to biological *E. coli* lipids. Thus, this work provides the first insights into the establishment of a test system that can be used for BLI.

## 1 Einleitung

### 1.1 Entwicklung von antibakteriellen Wirkstoffen

Die Entwicklung neuartiger Antibiotika stellt eine herausfordernde Arbeit dar (Brown *et al.* 2016). In allen anderen therapeutischen Gebieten besteht üblicherweise eine positive Korrelation zwischen dem Kenntnisgewinn und der Fähigkeit zur Entdeckung neuer Wirkstoffkandidaten. Im Kontext der Antibiotika erscheint dieser Zusammenhang paradoxyerweise umgekehrt. Trotz steigendem Kenntnisgewinn führt die gleichzeitig zunehmende Resistenzentwicklung von Bakterien gegenüber den Antibiotika zu einem Mangel an therapeutisch wirksamen Antibiotika (Lewis 2020).

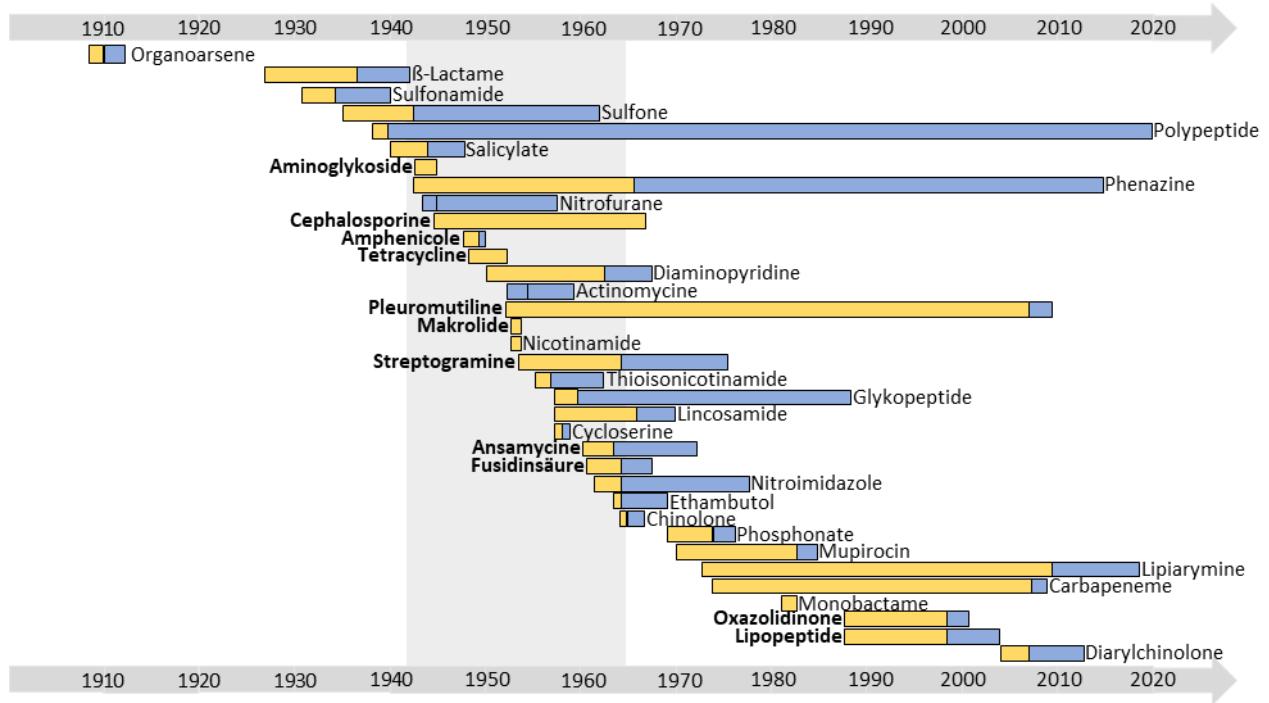
1928 entdeckte Alexander Fleming das Antibiotikum Penicillin, indem er eine Agarplatte mit Staphylokokken beimpfte und über die Sommerferien inkubieren ließ. Als er am 28. September 1928 wieder zurück kehrte, stellte er fest, dass in der Nachbarschaft der Schimmelpilze der Gattung *Penicillium*, welche in die Staphylokokken-Kulturen hineingeraten, die Bakterien in ihrem Wachstum gehemmt wurden (Fleming 1929). 1944 wurde das Antibiotikum Streptomycin entdeckt, indem Albert Schatz Boden-Aktinomyzeten hinsichtlich ihrer Fähigkeit das Wachstum von Testpathogenen in einer Zone auf einer Petrischale zu inhibieren, untersuchte (Schatz *et al.* 1944). Die goldene Ära der Entdeckung antibakterieller Hemmstoffe begann und zahlreiche Wirkstoffklassen wurden mit Hilfe der von Schatz geschaffenen *Screening*-Plattform in kurzer Zeit entdeckt (**Abbildung 1.1**).

Nichtsdestotrotz endete diese Ära in den 1960ern abrupt, nachdem aufkommende Resistenzen und das akkumulierte Wissen über Antibiotika sich aufhoben (Lewis 2020). Antibiotische Resistenzen entstehen, wenn es beispielweise zu Zielmutationen oder posttranskriptionale Modifikationen kommt. Ein weiterer Grund kann in der Veränderung der Zellmembran liegen aufgrund derer das Antibiotikum nicht mehr aufgenommen werden kann. (Dabour *et al.* 2016; Nikolic *et al.* 2023). In der Folge ist die Wirkung der Antibiotika gegenüber dem Bakterium abgeschwächt oder sogar ganz neutralisiert. Resistente Bakterien produzieren resistente Sporen, deren einzige Aufgabe es ist, zu überleben. Sobald das Antibiotikum abgesetzt wird, beginnt das Bakterium erneut zu wachsen, sodass es zu einer Reinfektion kommt (Alekshun *et al.* 2007). Aus diesem Grund wurden fortan vor allem bestehende Wirkstoffklassen wie Aminoglykoside, Makrolide, Tetracycline,  $\beta$ -Laktame und Chloramphenicol weiter optimiert, um eine bessere Gewebe-Penetration und damit Wirksamkeit gegenüber weiteren Bakterienarten zu erzielen. Die einfach zu entdeckenden Antibiotika vor allem aus der Gattung der *Actinomyces* waren ausreichend erforscht (Lewis 2020). Anfang der 2000er Jahren verschärfte sich die weltweite Resistenz-Krise weiter. Es fehlten Antibiotika, die gegen multiresistente Keime wirksam sind. Entwickelt wurden vor allem Antibiotika, welche zuvor technisch zu anspruchsvoll in der Optimierung waren oder zurückgestellt wurden (Bergen *et al.* 2012; Novak 2011; Theuretzbacher *et al.* 2015). Nur fünf neue Wirkstoffklassen wurden in diesem Jahrtausend entwickelt, wobei die Lipiarmycine aus dem Jahr 2011 die zuletzt entwickelte Klasse darstellen (**Abbildung 1.1**).

Schätzungen gehen davon aus, dass 700.000 Menschen weltweit jedes Jahr an einer Infektion mit multiresistenten Keimen sterben und diese Zahl bis 2050 bis auf 10 Millionen Menschen steigen könnte, sofern die antimikrobielle Resistenz nicht adressiert wird (AMR Industry Alliance 2020).

## Einleitung

Insbesondere im Kontext der Infektion mit einem multiresistenten Keim wären teure Medikamente, eine längere Krankheits- und Behandlungsdauer sowie gesteigerte Gesundheitskosten die Folge. Zudem könnten Organtransplantationen oder auch Chemotherapien für den Patienten auf Grund möglicher Infektionen gefährlicher werden (World Health Organization 2020). Aus diesem Grund stellt die Entwicklung neuer Antibiotika eine hohe Priorität dar.



**Abbildung 1.1:** Zeitlicher Überblick über die Entwicklung von antibakteriellen Wirkstoffen und Resistenzentwicklung. Modifiziert nach Stennet *et al.* (2022). Gelbe Balken stellen den Zeitraum von der Entdeckung einer neuen Wirkstoffklasse bis hin zur Markteinführung dar. Blaue Balken kennzeichnen den Zeitraum, in welchem keine Resistenzen in der Literatur beschrieben sind. Der graue Hintergrund zwischen 1942 bis 1963 markiert die goldene Ära der Entdeckung neuartiger Antibiotika. Fett geschrieben sind alle Wirkstoffklassen mit dem *Target* der ribosomalen Proteinbiosynthese. Hinweis: Der Zeitpunkt der Resistenzentwicklung gegenüber Aminoglykosiden, Cephalosporinen, Tetracyclinen, Makroliden und Nicotinamiden ist der Literatur nicht eindeutig zu entnehmen, weswegen kein Resistenzfenster angegeben ist.

Zur Entdeckung neuartiger Antibiotika stellen die Ribosomen infektiöser Bakterien besonders wertvolle Angriffspunkte für antibakterielle Wirkstoffe dar, da sie in die prokaryotische Proteintranslation eingreifen. Da sich die Struktur der prokaryotischen Ribosomen der Bakterien von denen des Menschen unterscheiden, zeigen Antibiotika eine geringe Toxizität. 33 % der entwickelten Wirkstoffklassen sowie 25 % der derzeitigen Antibiotika in klinischen Studien der Phase III zielen auf die ribosomale Proteinbiosynthese ab (World Health Organization 2022).

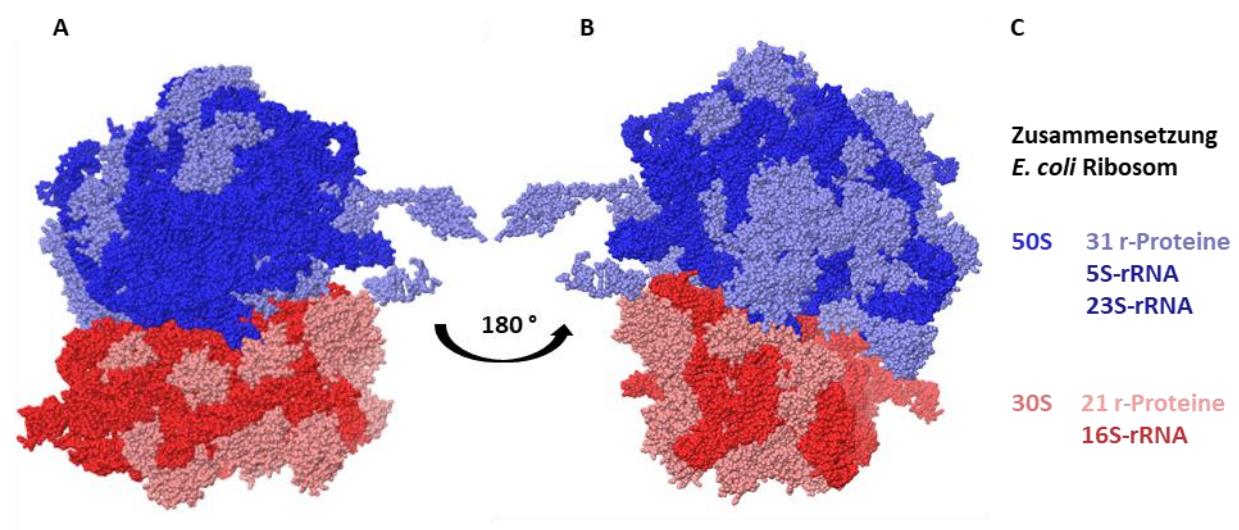
## 1.2 Struktur und Aufbau von Ribosomen

Die Biosynthese an ribosomalen Proteinen ist eine Grundlage des Lebens. Die Übersetzung von Boten-RNA-Transkripten in naszierende Proteinketten findet im Zytosoma aller lebenden Zellen statt, von

## Einleitung

den Archaea und Prokaryota bis zu den Eukaryota. Ribosomen haben eine Größe von ungefähr 20 nm und bestehen zu etwa einem Drittel aus ribosomalen Proteinen (r-Proteinen) und zu etwa zwei Dritteln aus ribosomaler RNA, der rRNA (Kurland 1960). Während die r-Proteine hauptsächlich als stabilisierendes Gerüst dienen, ist die Aufgabe der rRNA, die Bildung von Peptidbindungen während der Translation und Translokation zu katalysieren (Green *et al.* 1997; Khaitovich *et al.* 1999; Nissen *et al.* 2000). Die *messenger-RNA* (mRNA), welche Sequenzinformationen zur Synthese von Proteinen überträgt, sowie die für den Transport von Aminosäuren verantwortlichen *transfer-RNA* (tRNA) spielen eine entscheidende Rolle in der Proteinbiosynthese ((Green *et al.* 1997; Klein *et al.* 2001; Ogle *et al.* 2005)).

Anhand der Svedberg-Einheit, die als ein Maß für die Sedimentationsrate bei der Zentrifugation gilt, konnte gezeigt werden, dass Prokaryonten aus einer 50S- und einer 30S-Untereinheit ein 70S-Ribosom bilden, das sich in seiner Struktur grundlegend von dem eukaryotischen 80S-Ribosom unterscheidet, die aus einer 60S- und 40S-Untereinheit aufgebaut ist (**Abbildung 1.2**). In *Escherichia coli* ist die kleine 30S-Untereinheit aus 21 r-Proteinen sowie einer 16S-rRNA mit 1541 Nukleotiden aufgebaut und die große Untereinheit aus 31 r-Proteinen sowie 2 rRNAs, der 5S-rRNA aus 115 Nukleotiden und der 23S-rRNA aus 2904 Nukleotiden (Schuwirth *et al.* 2005a; Schuwirth *et al.* 2005b).



**Abbildung 1.2:** Struktur eines 70S *E. coli* Ribosoms **A.** sowie **B.** um 180° um die eigene Achse gedreht. **C** Zusammensetzung eines *E. coli* Ribosoms. Rot: kleinere 30 S Untereinheit. Blau: größere 50 S Untereinheit. Hell: Proteine, Dunkel: rRNA; PDB 2AVY, 2AW4 (Schuwirth *et al.* 2005a; Schuwirth *et al.* 2005b). Erstellt mit Maestro.

Ribosomen enthalten an jeder Untereinheit jeweils drei Bindestellen für tRNAs: Eine A-Stelle (aminoacyl), welche eine ankommende aminoacylierte tRNA bindet, eine P-Stelle (peptidyl), an welcher die tRNA mit einer wachsenden Peptidkette lokalisiert ist sowie eine E-Stelle (exit), welche die deacetylierte tRNA hält, bevor diese das Ribosom verlässt (Ramakrishnan 2002). Während der Proteinbiosynthese durchlaufen die tRNAs nacheinander die A-, P- und E-Stelle, bevor diese das Ribosom verlassen. Weiterhin liegen auf den Ribosomen mit dem Dekodierungszentrum (DC) sowie dem Peptidyltransferasezentrum (PTC) die zwei Hauptfunktionszentren des Ribosoms. Das DC liegt auf der kleinen Untereinheit des Ribosoms und ist für die korrekte Paarung des Codons der mRNA mit dem Anticodon der tRNA mit der passenden Aminosäure verantwortlich. Durch das PTC auf der großen Untereinheit wird die Peptidbindungsbildung katalysiert (Arenz *et al.* 2016).

Die 16S-rRNA wird auf Grund der hohen Konservierung zur Bestimmung der Taxonomie von Bakterien genutzt (Woese *et al.* 1977). Obwohl das 16S-rRNA hoch konserviert ist und die meisten Bakterien-Stämme 97 % Sequenzähnlichkeit aufweisen (Konstantinidis *et al.* 2005), enthält die 16S-rRNA neun hypervariable Regionen, welche zur Differenzierung der unterschiedlichen Bakterien genutzt werden können (Nguyen *et al.* 2016).

### 1.3 Die Proteinbiosynthese als *Target* für Antibiotika

Die Translation stellt ein wichtiges *Target* für Antibiotika dar. Dabei interagieren die antibakteriellen Hemmstoffe der ribosomalen Proteinbiosynthese vor allem mit der ribosomalen RNA (Fourmy *et al.* 1996; Moazed *et al.* 1987). Interaktionen mit den ribosomalen Proteinen spielen eine untergeordnete Rolle. Inhibitoren, die auf die Translation abzielen, können entweder direkt auf das Ribosom selbst oder indirekt auf assoziierte enzymatische Proteine wirken, z. B. auf den Elongationsfaktor G, der für die Translokation der mRNA und tRNAs durch das Ribosom erforderlich ist (Bodley *et al.* 1969). Es wurden spezifische Aminosäure- und Ribonukleotid-Positionen im prokaryotischen Ribosom identifiziert, die die Selektivität von Inhibitoren bestimmen.

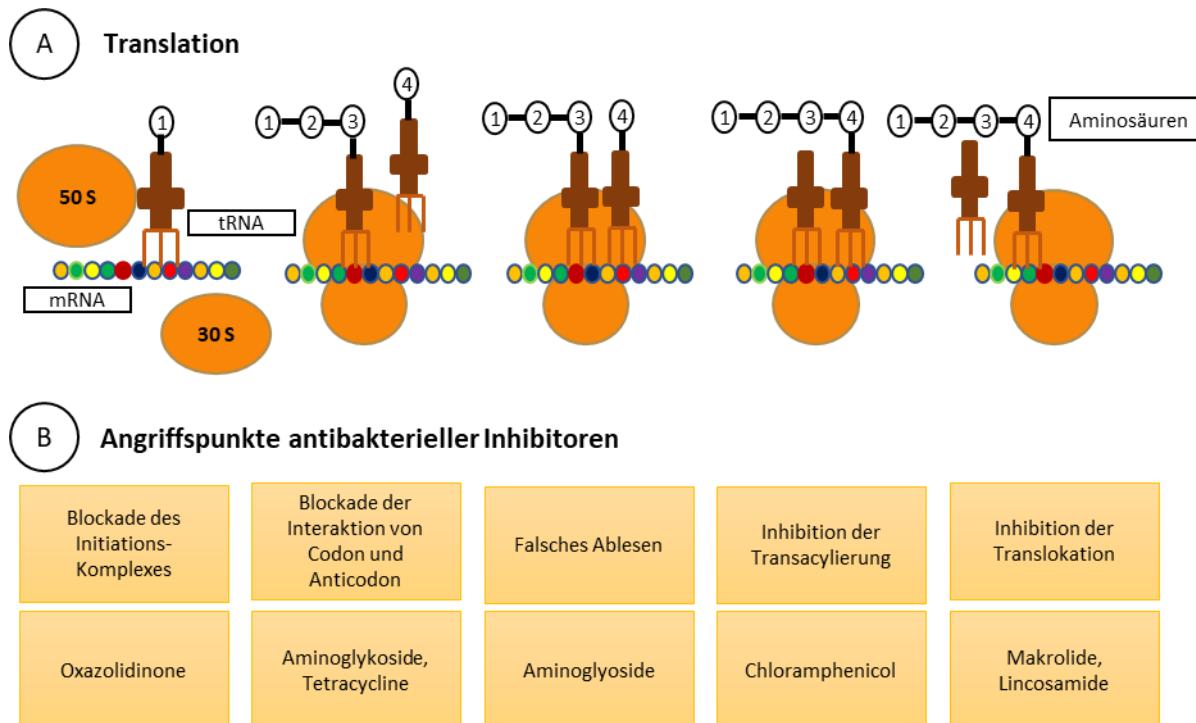
Während der Initialphase der Translation bindet ein Ribosomen an die ribosomale Bindungsstelle (RBS) auf der mRNA, welche komplementär zur 16S-rRNA ist. Anschließend wandert das Ribosom unter Einfluss von Initiationsfaktoren so lange an der mRNA entlang, bis es auf das Startcodon stößt, welches vor allem das Basentriplett AUG darstellt. Die Initiator-tRNA (N-Formylmethionyl-tRNA) bindet an das komplementäre Anticodon der mRNA, sodass der 30S-Initiationskomplex entsteht (**Abbildung 1.3**). Aus der Assoziation der 50S-Untereinheit resultiert der 70S-Initiationskomplex. Dabei ist zu Beginn die Initiator-tRNA an das Startcodon AUG der Peptidyl-Stelle (P-Stelle) der mRNA gebunden, während die Aminoacyl-Stelle (A-Stelle) unbesetzt ist (Arenz *et al.* 2016; Nakamoto 2011).

Ein Beispiel für eine Wirkstoffklasse, die am Initiationskomplex angreifen sind die Oxazolidinone mit dem synthetischen Vertreter Linezolid. Oxazolidinone binden an die 23S-rRNA der 50S-Untereinheit und blockieren damit die Bildung des 70S-Initiationskomplexes (Lambert 2012). Oxazolidinone wirken bakteriostatisch gegenüber Enterokokken und Staphylokokken sowie bakterizid gegenüber Streptokokken. Von besonderer Bedeutung ist die Wirksamkeit gegenüber Methicillin- und Glykopeptid-resistenten Stämmen (MRSA, VRE) (Pontefract *et al.* 2020; Wunderink *et al.* 2012).

Während der Elongation bindet eine weitere aminoacylierte tRNA an der A-Stelle auf der mRNA (Arenz *et al.* 2016). Aminoglykoside, wie Kanamycin oder Neomycin, und Tetracycline inhibieren dabei die Interaktion des Codons mit dem Anticodon, indem diese an der 30S-Untereinheit die Akzeptorstelle der Aminoacyl-tRNA blockieren (Doi *et al.* 2007). Weiterhin binden Aminoglykoside irreversibel an die Aminoglykosid-Stelle der 16S-rRNA der 30S-Untereinheit, welche eine intramolekulare Schleife der rRNA bildet. Es kommt zu Lesefehlern, sodass falsche Aminosäuren eingebaut werden und *nonsense* Proteine gebildet werden. Diese nicht funktionalen Proteine lagern sich in der Membran ein und verändern die Permeabilität der Zelle, sodass es zum Zelltod kommt (Mingeot-Leclercq *et al.* 1999). Während Aminoglykoside ein breites Wirkungsspektrum gegen vor allem gramnegativen Bakterien wie Enterobakterien und Vertreter der Kanamycin-Gentamicin Gruppe gegen Pseudomonaden wirksam sind (Umezawa *et al.* 1971), sind Enterobacter-Arten und Pseudomonaden gegenüber Tetracyclin

## Einleitung

weitestgehend resistent. Klinisch relevant ist die Wirkung von Tetracyclin vor allem gegen intrazelluläre Keime wie Legionellen und Mykoplasmien (Duggar 1948).



**Abbildung 1.3:** Angriffspunkte von Antibiotika mit dem *Target* der Proteinbiosynthese. **A.** zeigt den normalen Ablauf der Translation. **B.** stellt die verschiedenen Angriffspunkte der ribosomalen Proteinbiosynthese dar.

Im nächsten Schritt der Elongation katalysiert die Peptidyltransferase im PTC die Peptidbindung zwischen der  $\alpha$ -Aminogruppe des N-Terminus der Aminoacyl-tRNA an der A-Stelle mit der Carboxylgruppe am C-Terminus der Peptidyl-tRNA an der P-Stelle. Die P-Stelle ist deacetyliert und die A-Stelle um eine Aminosäure verlängert. Über den Translokationskanal der großen Untereinheit tritt die wachsende Peptidkette aus (Kapp *et al.* 2004; Lin *et al.* 2015).

Makrolide, wie Erythromycin, binden an die 23S-rRNA der 50S-Untereinheit und blockieren damit den Peptidkanal, aus dem die wachsende Peptidkette austritt. Eingesetzt werden Makrolide gegen grampositive Bakterien wie beispielweise Mykoplasmen (Kannan *et al.* 2011). Lincosamide, wie Chloramphenicol, binden an 23S-rRNA der 50S-Untereinheit der Peptidyltransferase, sodass die Verlängerung der Peptidkette auf Grund sterischer Ansprüche inhibiert wird (Tenson *et al.* 2003). Wirksam sind Lincosamide ausschließlich gegenüber grampositiven Bakterien, da sie die Porine der gramnegativen Bakterien nicht überwinden können (Brisson-Noël *et al.* 1988).

Anschließend kommt es während der Proteinbiosynthese zur Translokation, sodass die Peptidyl-tRNA um ein Basentriplett von der A-Stelle zur P-Stelle wandert und die deacylierte tRNA von der A-Stelle dissoziiert. Diese Schritte werden so lange wiederholt bis die mRNA auf eins der drei Stopcodons UAG, UGA, UAA gelangt, da für diese keine passenden tRNA-Moleküle vorhanden sind. Stattdessen gelangen Terminations- oder Freisetzungsfaktoren an die A-Stelle und verändern die

Substratspezifität der Peptidyltransferase, sodass Wasser die Bindung zwischen der Peptidkette und der tRNA spaltet und das synthetisierte Protein freisetzt (Kapp *et al.* 2004).

### 1.4 Resistenzen im Kontext der Proteinbiosynthese und deren Entstehung

In den letzten Jahrzehnten hat der übermäßige Einsatz von Antibiotika im Gesundheitswesen und der Landwirtschaft sowie die unsachgemäße Entsorgung der Antibiotika zur Entstehung von Multiresistenzen von Bakterien geführt, die die Entwicklung neuer Antibiotika erforderlich machen (Conlon *et al.* 2016; Harms *et al.* 2016; Miethke *et al.* 2021). In Bezug auf die Translation ribosomaler Proteine entsteht die Resistenz durch Mutationen von Bestandteilen der Ribosomen oder Translationsfaktoren sowie durch die Aktivität von ribosomalen Schutzproteinen. Weiterhin kann das fehlerhafte Ablesen zur Resistenzentwicklung führen (Hurtado-Rios *et al.* 2022).

Modifikationen der Ribosomen wie z.B. die Methylierung durch Methyltransferasen an der großen Untereinheit der 23S-rRNA oder der kleinen Untereinheit an der 16S-rRNA führen dazu, dass antibakterielle Wirkstoffe nicht mehr binden können und somit unwirksam sind. Modifikationen der Ribosomen sind zwar effektiv gegenüber Antibiotika, resultieren gleichzeitig in einer zu geringen Effizienz in der Proteinbiosynthese und damit zu einem verminderten Überleben des Bakteriums. Deswegen werden Modifikationen an Ribosomen durch Antibiotika nur bei einer geringeren Überlebensfähigkeit der Bakterien induziert (Gupta *et al.* 2013).

Ein Beispiel für die Induktion von Methyltransferasen stellt der Einsatz des Antibiotikums Erythromycin dar. Erythromycin inhibiert die Translation sodass es zu einer Pausierung des Leitpeptids kommt. Durch die Pausierung des Leitpeptids formt sich das Transkript in einer Weise, dass die Shine-Dalgarno-Sequenz für *ermC* frei zugänglich wird, sodass *ermC* exprimiert werden kann (Weisblum 1995). *ErmC* methyliert anschließend den Peptid-Exit-Tunnel und verhindert eine weitere Bindung von Erythromycin. Das Bakterium *S. aureus* exprimiert *ermC* konstitutiv (Gupta *et al.* 2013). Auch Methylierungen der rRNA können zu Resistzenzen führen. *Mycobacterium tuberculosis* enthält nur eine Kopie jedes rRNA-Gens. Es wurde gezeigt, dass eine Punktmutation A1408G in der 16S-rRNA dazu führt, dass Aminoglykoside schlechter binden. Auf Grund der reduzierten Effizienz der ribosomalen Proteinbiosynthese reguliert *M. tuberculosis* die Methyltransferase *tlyA* hoch, welche das neben der A1408G liegende C1409 in der 16S-rRNA methyliert, was gleichzeitig die Resistenzentwicklung mindert. Somit stellt *M. tuberculosis* einen Mittelweg zwischen optimaler Fitness und effektiver Resistenz dar (Freihofer *et al.* 2016).

Weiterhin kann es auf Grund von Mutationen an den ribosomalen Proteinen zu einer verringerten Aktivität der Translation kommen. Beispielweise wurde in *M. tuberculosis* und *in vivo* beobachtet, dass Mutationen im S12-Protein der kleinen Untereinheit zur Resistenzentwicklung von Antibiotika führen, da es zu Ablesefehlern kommt (Gregory *et al.* 2001). Das S12-Protein ist für die korrekte Paarung des Codons mit dem Anticodon während der Translation verantwortlich. Mutationen führen zu einer verringerten ribosomalen Genauigkeit und wirken einer Antibiotika-Aktivität entgegen (Sharma *et al.* 2007). Mutationen am Translationsfaktor bzw. dem Elongationsfaktor G (EF-G) führen dazu, dass Antibiotika wie Fusidinsäure nicht mehr binden können. Derartige Mutationen wurden in klinischen Isolaten wie *S. aureus* identifiziert (Besier *et al.* 2003).

## Einleitung

Viele Bakterien exprimieren ribosomale Schutzproteine, welche die Aktivität von Antibiotika durch reversibles Binden an die 50S- oder 30S-Untereinheit des Ribosoms oder Verdrängung der Antibiotika am Ribosom verhindern. Dabei wird die ribosomale Effizienz nicht beeinflusst (Wilson 2016). Die Bindung von *TetM* oder *TetO* führt zu einer Konformationsänderung der Ribosomen, sodass wichtige Wechselwirkungen zwischen Tetracyclin und dem Ribosom nicht mehr vorliegen und Tetracyclin verdrängt wird (Brodersen *et al.* 2000). Da Tetracyclin nicht mehr binden kann, kommt es zu einer Wirkungsverstärkung der Resistenz (Li *et al.* 2013).

Auch das fehlerhafte Ablesen am Ribosom kann zur Resistenz gegenüber antibakteriellen Wirkstoffen führen. Während der Translation muss jedes Codon sich mit der korrespondierenden aminoacylierten tRNA paaren. Dabei kommt es bei jedem 10000. Codon zu einem Ablesefehler (Kramer *et al.* 2007). Beispielweise kann es zur fehlerhaften Ablesung während der Aminoacylierung der tRNAs kommen. Mutationen in der Aminoacyl-tRNA-Synthetase (aaRS) führen zu falsch acetylierten tRNAs, welche auf Grund der nicht verfügbaren Aminosäuren deacetyliert verbleiben. Die Akkumulierung der deacetylierten tRNAs aktiviert in der Zelle Efflux-Pumpen, welche Antibiotika ausschleusen. Klinische Isolate von *E. coli* mit Mutationen der aaRS wurden bereits identifiziert (Clark *et al.* 2012).

Auf Grund des breiten Einsatzes der Antibiotika mit dem *Target* der ribosomalen Proteinbiosynthese ist mittlerweile für nahezu jedes Antibiotikum ein Mechanismus zur Resistenzentwicklung bekannt (Stennett *et al.* 2022; Ventola 2015). Weiterhin unterscheiden sich trotz starker Sequenzkonservierung der Bakterien die Antibiotikabindung und die Resistenzbildung zwischen verschiedenen Bakterienklassen deutlich (Lin *et al.* 2018; Polacek *et al.* 2005), was die Entwicklung rationaler Arzneimittel erschwert und neue Screening-Ansätze erforderlich macht (Payne *et al.* 2007; Tommasi *et al.* 2015).

## 1.5 Assays mit dem *Target* der ribosomalen Proteinbiosynthese

Die Entwicklung von neuartigen antibakteriellen Wirkstoffen besteht neben der Testung der antibakteriellen Aktivität vor allem aus dem deutlich herausfordernden Schritt der *Target*-Identifizierung (Osterman *et al.* 2016). Zur Testung der antibakteriellen Aktivität werden als primäres *Screening* vor allem Agar-Diffusions-Methoden, welche von Fleming entwickelt wurden (Fleming 1929), oder Dünnschichtchromatographie-Bioautographie genutzt. Bei letzterer werden antibakterielle Pflanzenextrakte chromatographisch getrennt und anschließend mikrobiellen Suspensionen ausgesetzt (Kagan *et al.* 2014).

Zur Identifizierung von Inhibitoren der ribosomalen Proteinbiosynthese stehen zahlreiche Methoden zur Verfügung (Lowell *et al.* 2015; Ramadoss *et al.* 2013; Raneri *et al.* 2015; Rütten *et al.* 2022). Üblicherweise werden zunächst Hochdurchsatzmethoden auf Basis von Biosensoren zur Identifizierung des *Targets* für Inhibitoren der Translation genutzt. Anschließend erfolgt die Bestätigung der *Hits* durch *in vitro*-Translations-Assays und letztendlich einer Untersuchung des Wirkmechanismus (Osterman *et al.* 2016). Für letzteres hat sich unter anderem die SPARK-sensitive Methode bewährt. Dabei wird ein Reaktionspartner der Peptidyltransferase-Reaktion über radioaktives Wasser markiert und der andere Reaktionspartner biotinilyiert, sodass die Effizienz der Peptidbindungsbildung messbar ist (Polacek *et al.* 2002). Weiterhin kann das *toe-printing* zum

## Einleitung

Nachweis des Reaktionsmechanismus genutzt werden. Hierbei wird der mRNA-Ribosomenkomplex mit einem stromaufwärts gebundenen Oligonukleotid blockiert, sodass es zu einem spezifischen Stopp der Translation kommt, der Aufschluss auf das Antibiotikum ermöglicht (Orelle *et al.* 2013). So wird überprüft, ob das Antibiotikum während der Initiation, der Elongation oder der Termination Einfluss auf die Translation ausübt.

Assays auf Basis von Biosensoren basieren unter anderem auf Stressreaktion-Assays (Bianchi *et al.* 1999), spezifischen Antibiotika-Detektion-Assay oder auch Transkriptionssensoren auf der Grundlage von Promotor-Bibliotheken (Goh *et al.* 2002). Stressreaktion-Assays zielen darauf ab, dass die Anwendung eines Antibiotikums auf die Zelle Stress induziert (Bianchi *et al.* 1999). Das Antibiotikum Chloramphenicol induziert *cold shock proteins* wie z.B. *CspA*, während die Antibiotika Streptomycin und Neomycin zur Induktion von *heat shock proteins* wie z.B. *IbpA* führen. Durch ein *luc*-Reportergen, welches stromaufwärts von *IbpA* und *CspA* liegt, kann die veränderte Chemilumineszenz-Reaktion anhand der Synthese einer Luciferase nachgewiesen werden (Goldstein *et al.* 1990; VanBogelen *et al.* 1990). Weiterhin steht für Tetracyclin ein spezifischer Assay zur Verfügung. Hier wird ein Tetracyclinsensitiver-Promotor und ein Tetracyclin-Repressorgen stromaufwärts von einem Reportergen eingesetzt. Bei Abwesenheit von Tetracyclinen bindet der Repressor an den Promotor und inhibiert die Expression. Bei Anwesenheit von Tetracyclinen dissoziert der Komplex und aktiviert die Expression. Diese Methode ist sehr sensitiv für die Detektion von Tetracyclinen (Kurittu *et al.* 2000). *Screenings* auf dem Prinzip der Transkriptionssensoren beruhen auf dem Prinzip, dass Antibiotika wie Erythromycin und Rifampicin in niedrigen Konzentrationen die bakteriellen Transkriptionsmuster verändern. Durch Hemmung oder Stimulierung von einem Reportergen werden *Hits* identifiziert (Goh *et al.* 2002).

Als *in vitro*-Methoden stehen unter anderem die zellfreie Proteinsynthese (Svetlov *et al.* 2006) sowie die Bindung von Antibiotika, welche mit Fluoreszenz-markierten Ribosomen interagieren, zur Verfügung. Mikroskopische Analysen der markierten Ribosomen ermöglichen nach einer Dichtegradientenzentrifugation Rückschlüsse auf potenzielle *Hits* (Llano-Sotelo *et al.* 2009). Weiterhin besteht die Möglichkeit *in vivo* Methoden in die Entwicklung von Inhibitoren mit dem *Target* der Proteinbiosynthese mit einzubeziehen. Diese beruhen unter anderem auf der Fluoreszenzmikroskopie, der Proteom-Analytik sowie resistenz-basierten-Assays zur Erfassung der Wirkmechanismen (Rütten *et al.* 2022).

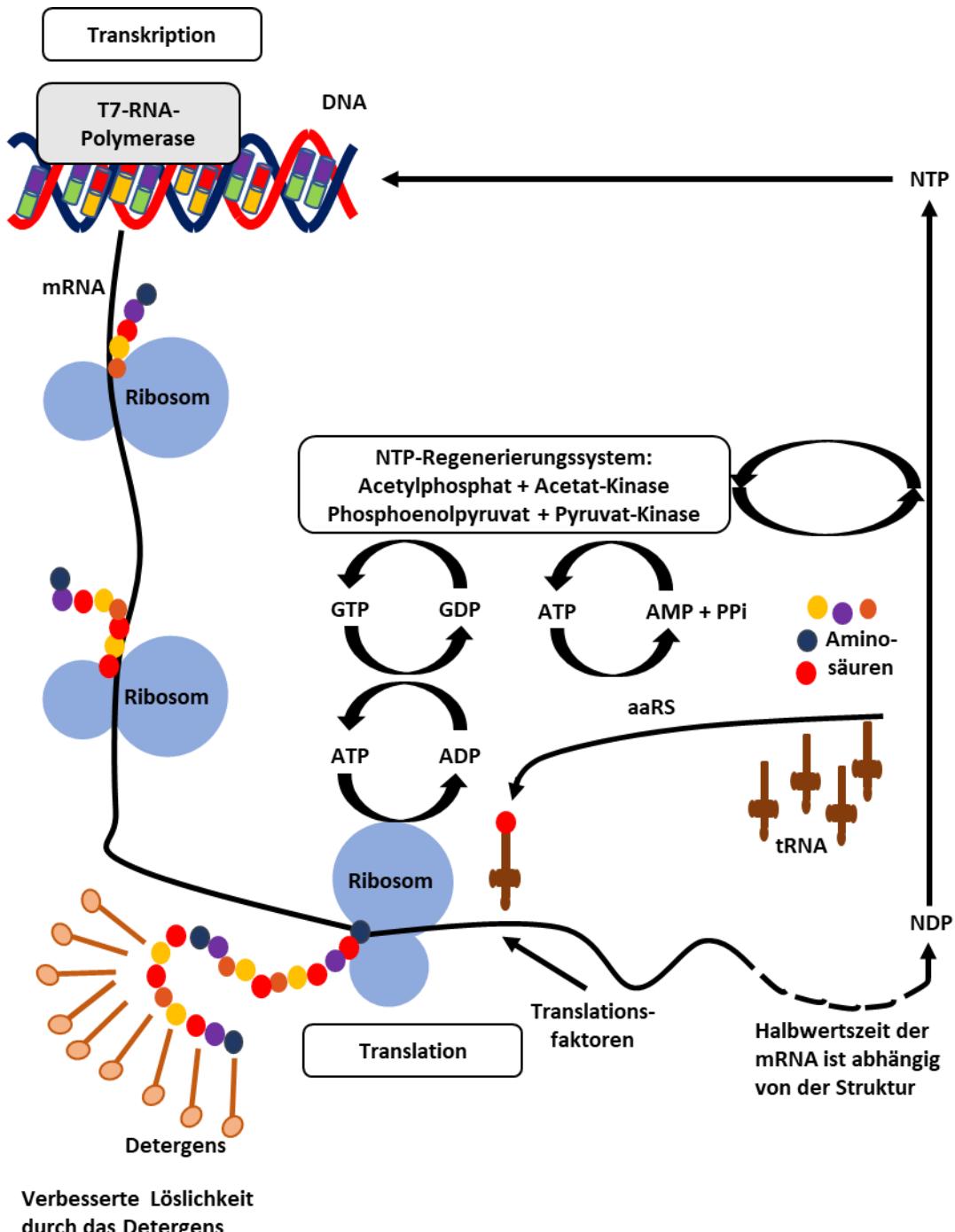
## 1.6 Zellfreie Proteinsynthese

Für die Identifizierung von Inhibitoren der Proteinbiosynthese kann die zellfreie Proteinsynthese eingesetzt werden. Die zellfreie Proteinsynthese stellt ein gekoppeltes *in vitro*-Transkriptions-/Translationssystem für die Herstellung von Proteinen auf Basis einer T7-RNA-Polymerase und bakterieller S30-Extrakte, die Ribosomen einschließlich ihrer assoziierten Proteine enthalten, dar (Schwarz *et al.* 2007a).

Bei der zellfreien Proteinsynthese wird *template*-DNA eingesetzt, welche eine unter der Kontrolle eines T7-Promotors stehende proteincodierende Sequenz enthält, über die T7-RNA-Polymerase in mRNA transkribiert wird (**Abbildung 1.4**). Anschließend erfolgt die Translation der mRNA in eine Proteinsequenz an extrahierten Ribosomen. Hierzu werden proteinogenen Aminosäuren und tRNA aus

## Einleitung

*E. coli* sowie Folinsäure, die zur Bildung des initialen Formyl-Methionins notwendig ist, zugegeben. Da es während der mRNA-Synthese zum Verbrauch von Nukleosidtriphosphaten (NTPs) kommt, wird ein Energieregenerierungssystem benötigt. Dies kann durch den Zusatz von ATP und GTP sowie als sekundäre Energiequelle Acetyl-Phosphat (AcP) sowie Phosphoenolpyruvat (PeP) in Kombination mit der zugehörigen Acetat-Kinase und Pyruvat-Kinase erzielt werden. Dabei ist die Acetat-Kinase ein Bestandteil des gewonnenen S30-Extrakts. Als Oxidationsschutz diente DTT. Um die Viskosität des Cytoplasmas zu imitieren, wird Polyethylenglykol verwendet (Schwarz *et al.* 2007a).



**Abbildung 1.4:** Gekoppeltes Transkriptions-/Translationssystem der zellfreien Proteinsynthese. Angelehnt an Schwarz *et al.* (2007b).

Im Kontext der Identifizierung von Inhibitoren der Translation kann mittels der zellfreien Proteinsynthese eine Luciferase hergestellt werden. Im nächsten Schritt wird nach Zugabe von Luciferin die Chemielumineszenz-Reaktion detektiert. Bei Anwesenheit von Inhibitoren der Proteinbiosynthese wird die Synthese der Luciferase inhibiert, sodass es zu einer Abnahme des Chemilumineszenz-Signals kommt (Fyfe *et al.* 2012; Wang *et al.* 2018). Der *Screening*-Ansatz der zellfreien Proteinsynthese bietet attraktive Eigenschaften: a) Das System ist offen für Manipulationen, z. B. für die Verwendung von Ribosomen aus verschiedenen Bakterienarten, einschließlich *E. coli* (Caschera *et al.* 2014) oder *P. putida* (Wang *et al.* 2018) und für die Optimierung der Zusammensetzung und der Konzentrationen der Reaktionskomponenten. b) Die von den *Screening*-Substanzen ausgelösten hemmenden Wirkungen können spezifisch auf die Interferenz mit der Protein-Translationsmaschinerie zurückgeführt werden, was eine robuste Identifizierung der Zielmoleküle ermöglicht. c) Die Herstellung löslicher Proteine ist technisch unkritisch und ermöglicht ein direktes funktionelles Auslesen schneller als bei zellbasierten Systemen.

Neben dem Einsatz der zellfreien Proteinsynthese zur Identifizierung von Inhibitoren der Proteinbiosynthese, stellt die zellfreie Proteinsynthese eine etablierte und weithin akzeptierte Methode für die Proteomik-Analytik (Yokoyama 2003) sowie für die Herstellung löslicher Proteine und Membranproteinen dar (Schwarz *et al.* 2007a).

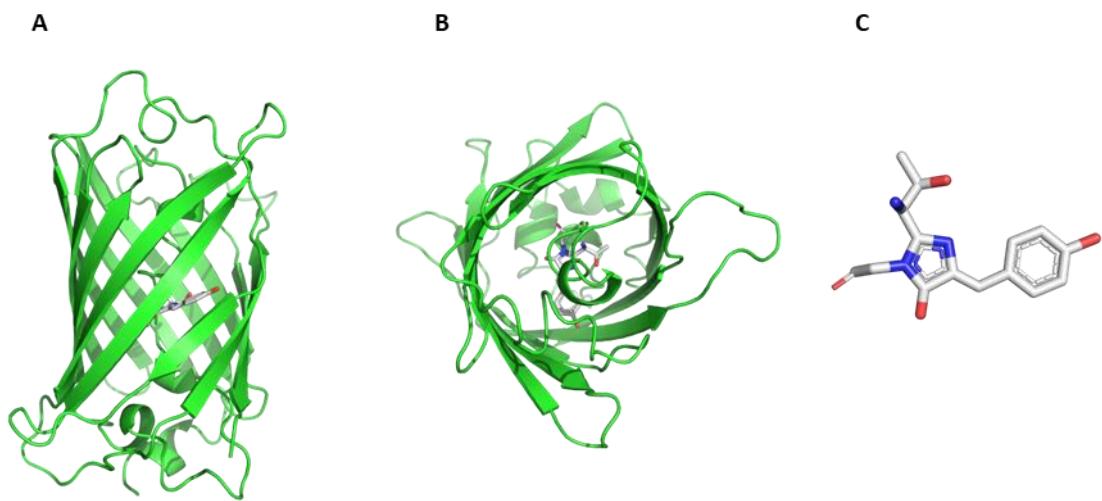
## 1.7 Lösliche Fluoreszenzproteine wie GFP und mNeongreen

Mit Hilfe der zellfreien Proteinsynthese können lösliche Fluoreszenz-Proteine wie beispielweise das grün fluoreszierende Protein (GFP) hergestellt werden. GFP ist ein endogenes Protein aus der biolumineszenten Quelle *Aequorea victoria* (Shiomura *et al.* 1962) und findet eine weit verbreitete Anwendung, da die heterologe Expression des Gens in anderen Organismen zu einer grünen Fluoreszenz führt (Inouye *et al.* 1994). GFP wird als Fluoreszenz-Marker in der Gen-Expression, zur Protein-Lokalisierung sowie für nicht-invasiven Biosensoren eingesetzt (Zimmer 2002). Da zuvor angeregtes GFP als Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer- (FRET)-Akzeptor Energie auf einen zweiten in räumlicher Nähe befindenden Farbstoff übertragen kann, wird GFP weiterhin für Protein-Protein-Interaktionen eingesetzt (Kikuchi 2010). Im Kontext der zellfreien Proteinsynthese findet GFP für die Untersuchung von Fusionsprotein mit C-terminalen GFP-tag zur Faltungskontrolle Anwendung (Müller-Lucks *et al.* 2012).

Die Kristallstruktur von GFP zeigt eine  $\beta$ -Faltblattstruktur, welche von elf  $\beta$ -Strängen durchzogen werden (**Abbildung 1.5 A-C**). Die Struktur ermöglicht die Ausbildung und Stabilisierung des Fluorophors durch zahlreiche Wasserstoffbrückenbindungen der umgebenden Aminosäuren aus der  $\beta$ -Faltblattstruktur und schützt es vor dem umgebenem Bulk-Wasser (Bokman *et al.* 1981; Stavrov *et al.* 2006). Weiterhin scheinen die Wasserstoffbrückenbindungen des Fluorophors vor Sauerstoff zu schützen, sodass das *Quench*-Vorgänge reduziert werden und eine erhöhte Quantenausbeute resultiert (Ormö *et al.* 1996). Die Proteininfaltung ist maßgeblich für die Fluoreszenz, weswegen denaturiertes GFP nicht fluoresziert (Heim *et al.* 1994; Zimmer 2002). Weiterhin führt die Tertiärstruktur zu verminderten intramolekularen Bewegungen des Fluorophors, sodass eine strahlungslose Inaktivierung minimiert wird (Cody *et al.* 1993; Remington 2011). Zur Ausbildung der grünen Fluoreszenz muss das Fluorophor-

## Einleitung

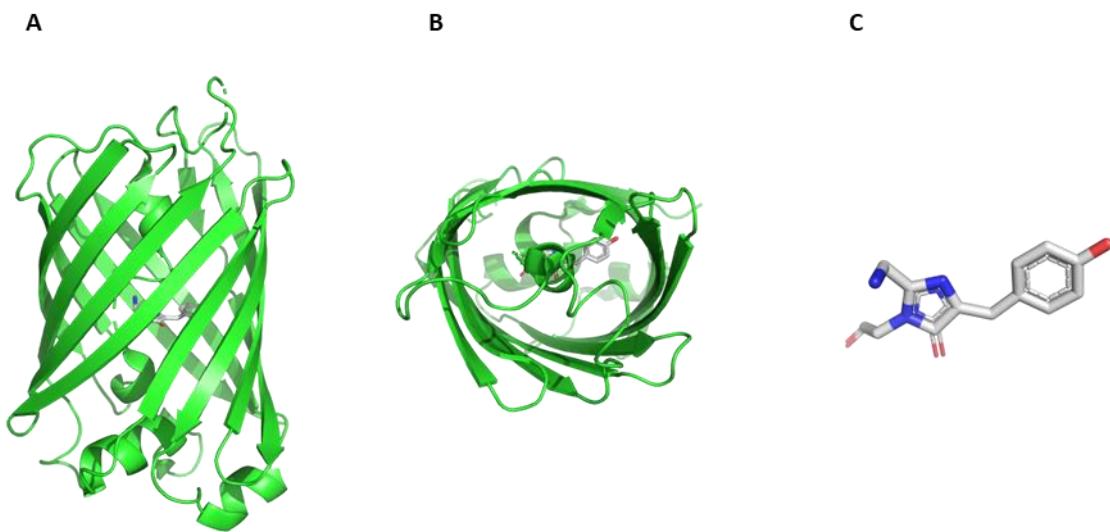
Rückgrat, welches aus dem Tripeptid Ser<sub>65</sub>-Tyr<sub>66</sub>-Gly<sub>67</sub> besteht, gefaltet, zyklisiert, oxidiert und dehydriert werden (Rosenow *et al.* 2004).



**Abbildung 1.5:** Kristallstruktur von eGFP als Monomer (PDB 1EMA) **A.** Ansicht von vorne und **B.** oben. **C.** Zykliisiertes Fluorophor der Tripeptidsequenz Ser<sub>65</sub>-Tyr<sub>66</sub>-Gly<sub>67</sub>. Die Abbildung wurde mit PyMOL erstellt. Alle Wassermoleküle wurden aus der Abbildung entfernt.

Nach der Entdeckung des Wildtyp-GFPs wurden dessen pH-Empfindlichkeit, Chlorid-Ionen-Empfindlichkeit und schlechte Photostabilität durch GFP-Varianten, welche nach einer ortsspezifischen Mutagenese erhalten wurden, verbessert. Weiterhin wurde die Quantenausbeute, der molare Absorptionskoeffizient und daraus resultierend die Helligkeit optimiert (Soleja *et al.* 2018). Zudem wurde das Farbspektrum unter anderem durch blaue, cyan-farbende und gelbe GFP-Varianten erweitert (Heim *et al.* 1996; Rodriguez *et al.* 2017).

Im Genom des Lanzettfisch *Branchiostoma lanceolatum* konnten 21 Gene identifiziert werden, deren resultierende Proteine eine große Ähnlichkeit mit GFP aufweisen. Dazu gehört beispielsweise *lanYFP*. Ein Monomerisierungsschritt von *lanYFP* wurde durch Mutationen anhand eines Vergleiches mit TurboGFP, welches ein lösungs-optimiertes GFP darstellt, realisiert und führte zu einem hell leuchtenden gelben oder grünen fluoreszierenden Protein mNeonGreen (Evdokimov *et al.* 2006; Shaner *et al.* 2013). Das Fluoreszenzprotein mNeonGreen weist eine nahezu ideale Quantenausbeute ( $Q > 0,95$ ) und einen hohen molaren Absorptionskoeffizienten ( $\epsilon = 150.000 \text{ l mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) auf, sodass es als das vermutlich am hellsten leuchtende grün-gelbe monomere Fluoreszenzprotein gilt. Eingesetzt wird mNeonGreen als Fusions-tag zur Bildgebung sowie als FRET-Akzeptor für cyan-fluoreszierende Proteine (Shaner *et al.* 2013). Das Fluorophor von mNeongreen wird in analoger Weise wie das von GFP in einer Kavität der β-Faltblattstruktur sowie durch zwei kurze α-Helices stabilisiert (**Abbildung 1.6 A-C**).



**Abbildung 1.6:** Kristallstruktur von mNeonGreen (PDB 5LTR) **A.** Ansicht von vorne und **B.** oben. **C.** Fluorophor. Die Abbildung wurde mit PyMOL erstellt.

## 1.8 Membranproteine: Aquaglyceroporine

Die zellfreie Proteinsynthese wird ebenfalls zur Produktion von Membranproteinen genutzt. Auf Grund des hydrophoben Charakters müssen die Membranproteine über Detergenzien stabilisiert werden, um die Entstehung von Präzipitaten zu verhindern. Zwar können die Präzipitate resolubilisiert werden, jedoch resultiert die Resolubilisierung in einer verminderten Ausbeute. Weiterhin kann die zwischenzeitliche Denaturierung der Proteine deren Funktionalität negativ beeinflussen (Kai *et al.* 2010; Schwarz *et al.* 2007b).

Zu den Membranproteinen gehören unter anderem die Aquaporine (AQP), welche Mitglieder der *major intrinsic protein* Familie (MIP) sind (Agre *et al.* 1998). Die ubiquitären Kanalproteine sorgen für die Permeation von Wasser und gelösten Stoffen über die Zellmembran hinweg. AQPs formen Tetramere, wobei jedes Protomer einen schmalen Kanal von 25 Å in der Länge bildet (Abbildung 1.7). Im Kanal treffen sich die positiven Enden von zwei kurzen Helices aufeinander. Diese tragen das NPA-Motiv (Asn-Ala-Pro), welches auf Grund des positiven elektrostatischen Feldes Kationen abweist. Während das Asn fast invariant ist, erscheint die Position vom Pro und Ala variabel zu sein (Beitz *et al.* 2006; Eriksson *et al.* 2013; Wu *et al.* 2015). Weiterhin verengt die NPA-Region den Kanal auf 3- 4 Å im Durchmesser (Murata *et al.* 2000). Eine weitere Verengung - der Aromaten/Arginin-Selektivitätsfilter (ar/R) - befindet sich an der extrazellulären Kanalmündung und führt ebenfalls zum Ausschluss von Kationen über einen positiv-geladenen Arginin-Rest (Beitz *et al.* 2006; Eriksson *et al.* 2013; Fu *et al.* 2000). Dessen Aminosäurezusammensetzung entscheidet über den Durchmesser des ar/R-Filters und führt zur Differenzierung zwischen einerseits den wasserselektiven, orthodoxen Aquaporinen ( $\approx 2,8$  Å) und andererseits den Aquaglyceroporinen ( $>3,4$  Å) (Schmidt *et al.* 2021). Aquaglyceroporine leiten kleine, ungeladene Moleküle (Wu *et al.* 2007), wie Glycerol (Heller *et al.* 1980), Harnstoff (Stroud *et al.* 2003), Ammoniak (Jahn *et al.* 2004), Carbonyl-Komponenten (Pavlovic-Djuranovic *et al.* 2006), Arsen (Wu *et al.* 2010) und Wasser, wobei die Wasserleitfähigkeit der Aquaglyceroporine geringer als die der orthodoxen Aquaporine ist (Newby *et al.* 2008). Zu den Aquaglyceroporinen gehören unter

## Einleitung

anderem das Aquaporin aus *Plasmodium falciparum* (PfAQP1) sowie die Isoform 2 aus *Trypanosoma brucei* (TbAQP2).



**Abbildung 1.7:** Kristallstruktur von PfAQP1. Die Abbildung wurde aus der RCSB Protein Data Bank (3C02) entnommen (Newby *et al.* 2008).

PfAQP1 gehört zu den vermutlich am besten charakterisierten Solut-leitenden Aquaporinen (Song *et al.* 2012). Die beiden NPA-Motive sind zu einem NLA (Asn-Leu-Ala) im N-terminalen Teil sowie NPS (Asn-Pro-Ser) im C-terminalen Teil mutiert, wobei sich die Funktion nicht beeinträchtigt (Newby *et al.* 2008). Weiterhin zeigt PfAQP1 eine ungewöhnlich hohe Leitfähigkeit von Glycerol und Wasser und ist dabei so effizient wie Glycerol- oder Wasser-Kanäle. Weiterhin ist es für die Permeation von Zuckerkoholen bis zu einer Kettenlänge von fünf Kohlenstoffatomen verantwortlich, wobei die Leitfähigkeit mit steigendem sterischen Anspruch abnimmt (Hansen *et al.* 2002). Sorbitol dringt zwar in die Pore ein, blockiert diese aber, sodass es zu einer Hemmung jeglicher Solute kommt (Song *et al.* 2012).

PfAQP1 spielt eine entscheidende Rolle in der Vermehrung und im Überleben des Parasiten. Einerseits schützt es den Parasiten vor harschen osmotischen Bedingungen in der Niere des Wirts. Andererseits ist PfAQP1 an der Synthese von Lipiden beteiligt, indem es notwendige Substrate wie Glycerol zur Verfügung stellt (Newby *et al.* 2008). Die Lipide werden im intraerythrozytären Stadium auf Grund der schnellen Vermehrung des Parasiten benötigt (Vial HJ, Ancelin M L 1992). Weiterhin sorgt PfAQP1 für den Efflux von Ammoniak, welcher während der Vermehrung im Erythrozyten durch Abbau von Aminosäuren entsteht, sodass eine Akkumulierung von Ammoniak im Parasiten und daraus resultierend dessen Tod verhindert wird. Nach dem Efflux von Ammoniak wird Ammoniak protoniert, sodass der Gradient aufrechterhalten wird (Zeuthen *et al.* 2006).

Im Genom von *Trypanosoma brucei* finden sich drei für Aquaglyceroporine kodierende Sequenzen. Die Isoformen 1 bis 3, welche eine Sequenzähnlichkeit von 77 % untereinander aufweisen. (Uzcategui *et al.* 2004). Während TbAQP1 und TbAQP3 eine hochkonservierte NPA-Region aufweisen, zeigt TbAQP2 ein unkonventionelles Asn-Ser-Ala sowie Asp-Pro-Ser (NSA/NPS)-Motiv. Zudem weist TbAQP2 statt einem Arginin ein neutrales Leucin im ar/R-Selektivitätsfilter auf (Baker *et al.* 2011). Trotz Fehlen des natürlichen ar/R-Filters sowie den Abweichungen in der NPA-Region wurde die Funktionalität des

Kationenfilters gezeigt. Weiterhin stellte sich Pentamidin als nanomolarer Inhibitor für TbAQP2 heraus (Song *et al.* 2016). Besondere Bedeutung findet TbAQP2 in der Behandlung der Schlafkrankheit, welche durch Trypanosomen ausgelöst wird und durch den Stich der Tsetsefliege *Glossina morsitans* auf den Menschen übertragen wird (Brun *et al.* 2010). Eine Behandlungsmöglichkeit gegen die Schlafkrankheit stellt Pentamidin dar. Gleichzeitig führt ein Genknockout von TbAQP2 zur Resistenzentwicklung gegenüber Pentamidin (Alsford *et al.* 2012)

Neben Wasser und Glycerol leitet TbAQP2 in analoger Weise zu PfAQP1 Zuckeralkohole mit geringem sterischen Anspruch wie Erythritol, Ribitol und Sorbitol. Die diastereomere Zuckeralkohol Xylitol, Arabitol und Mannitol werden nicht geleitet (Uzcategui *et al.* 2004).

### 1.9 Bio-Layer-Interferometrie

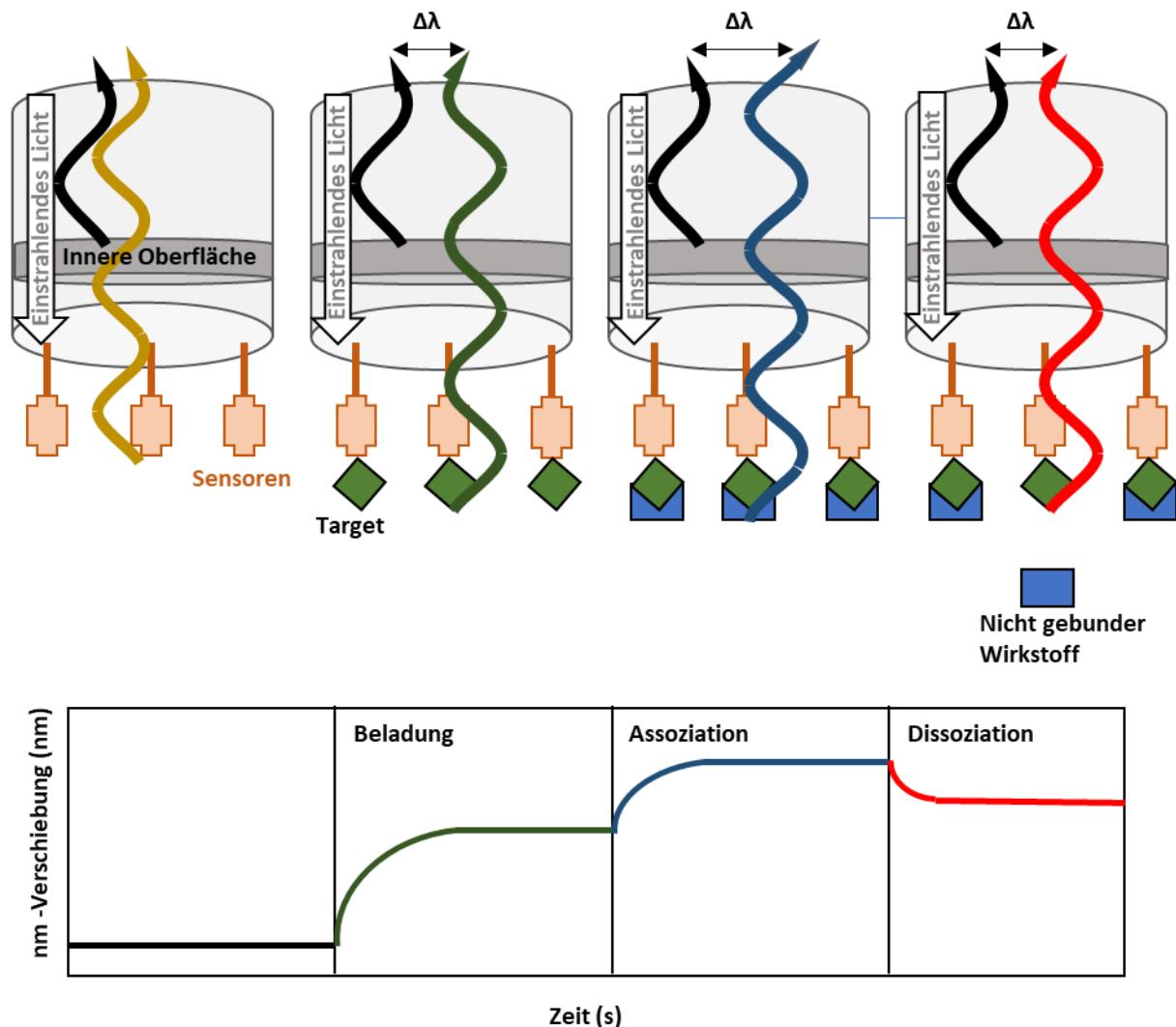
Zur funktionellen Charakterisierung von Membranproteinen stehen verschiedene Methoden zur Verfügung. Unter anderem wird mit Hilfe der *stopped flow*-Methode das Schrumpf- und Schwellverhalten von Liposomen, welche mit dem zellfrei synthetisierten Membranprotein rekonstituiert wurden, gegenüber einem hyperosmotischen Gradienten gemessen (Helmstetter *et al.* 2019). Diese Methode eignet sich allerdings nicht zum Hochdurchsatz, sodass ein *Screening* zur Entdeckung neuer Substrate von Membranproteinen nicht durchführbar ist. Eine alternative Methode, welche zum Hochdurchsatz geeignet ist, stellt die *Bio-Layer-Interferometrie* (BLI) dar. Die BLI wird genutzt, um Interaktionen in Echtzeit durch Bindung eines Analyten an eine biokompatible Sensoroberfläche wie beispielweise Streptavidin zu beobachten (Dysinger *et al.* 2012) und wurde bereits für die funktionelle Charakterisierung von zellfrei synthetisierten Membranproteinen genutzt (Hajek *et al.* 2019).

Die BLI gehört zu den optischen Analysemethoden, wobei weißes Licht entlang eines Biosensors auf zwei Oberflächen trifft (**Abbildung 1.8**). Eine innere Oberfläche, welche konstant ist und sich nicht verändert, sowie eine äußere biokompatible Sensoroberfläche, welche variabel ist. Von beiden Oberflächen wird ein Teil des weißen Lichts reflektiert und es kommt zur konstruktiven oder destruktiven Interferenz der beiden Teilstrahlen am Detektor. Wenn die biokompatible Sensoroberfläche, welche mit einem *Target* immobilisiert wurde, in eine Lösung mit Analyten getaucht wird, kann es zur Bindung des Analyten an den Liganden kommen. Die Zunahme der Schichtdicke des gebunden Sensors der äußeren Oberfläche führt zu einer Veränderung des Interferenzmusters, sodass es zu einer Verschiebung der Wellenlänge  $\lambda$  bzw. einer nm-Verschiebung kommt. Neben der Schichtdicke korreliert die nm-Verschiebung mit der Schichtdichte. Ungebundene Moleküle in der Lösung haben keinen Einfluss auf die nm-Verschiebung, sodass Messungen in Zell-Lysaten möglich sind (Kumaraswamy *et al.* 2015; Müller-Esparza *et al.* 2020).

Die Beladung von Liganden an die biokompatible Sensoroberfläche stellt einen wichtigen Schritt in der BLI dar und kann kovalent über Lysin-Reste des Zielproteins mit Carboxylgruppen auf dem Biosensor sowie durch Bindung eines biotinilylierten Restes mit Streptavidin-beschichteten Sensoren erfolgen. Hierfür muss das Protein gereinigt vorliegen. Ein weitere nicht-kovalente Alternative stellen *site-directed* oder *capture*-basierte Biosensoren dar, welche mit einem hochaffinen Antikörper oder Protein vorimmobilisiert wurden und an den Proteinliganden über einen *tag* binden. Auf Grund der hohen Spezifität erfolgt eine Bindung ebenfalls mit ungereinigten Proben (Kumaraswamy *et al.* 2015).

## Einleitung

Herkömmliche Methoden, welche auf einer Endpunktbestimmung oder Gleichgewicht-Bindungstests beruhen, liefern keine vollständigen Informationen über die Bindung. Andere Technologien wie ELISAs, HPLC, native PAGE-Gele, Kapillarelektrophorese weisen längere Testzeiten oder einen geringen Durchsatz auf oder benötigen Enzym- oder Fluoreszenz-Markierung (Petersen 2017; Rich *et al.* 2010). Die BLI ermöglicht die Hochdurchsatzmessungen im 96-well bis hin zum 384-well-Format und ist wenig störanfällig (Concepcion *et al.* 2009; Shah *et al.* 2014). Weiterhin ist eine Markierung von Biomolekülen, welche zeitaufwendig und teuer ist sowie zu einer Veränderung der Proteinaktivität oder einer sterischen Blockade der Bindestelle führen kann, nicht notwendig (Kumaraswamy *et al.* 2015; Petersen 2017).



**Abbildung 1.8:** Prinzip der Bio-Layer-Interferometrie. Ein Sensor wird in verschiedene Lösungen nacheinander getaucht (Oben). Dabei kommt es zu einer nm-Verschiebung in Abhängigkeit der Zeit (unten).

Mit Hilfe der BLI werden wichtige pharmazeutische Parameter wie Informationen über molekulare Interaktionen, kinetische Geschwindigkeitskonstanten, Affinitätsbindungskonstanten und die Quantifizierung spezifischer Moleküle gemessen (Petersen 2017). Im Arbeitskreis kam die Idee auf, ob mit Hilfe der BLI neben Interaktionsmessungen auch Transportvorgänge oder Diffusionsvorgänge bei der Nutzung von Proteoliposomen gemessen werden können. Dies würde eine völlig neue Anwendung

## Einleitung

der BLI und neuartige *Screening*-Möglichkeit für Membranproteine darstellen. Somit ergaben sich zwei Fragestellungen, die im Rahmen dieser Arbeit angegangen wurden.

### **1.10 Zielsetzung der Arbeit**

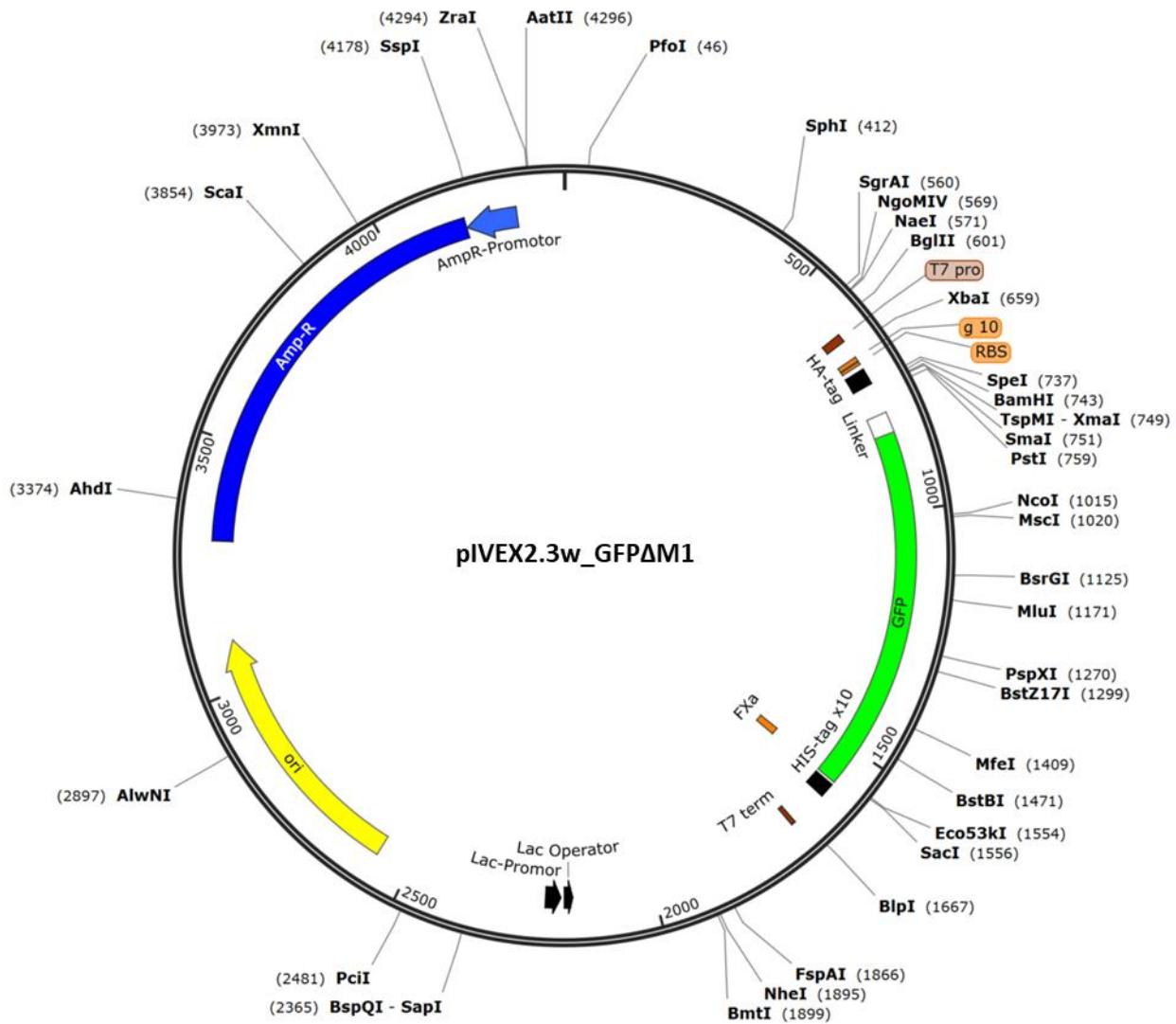
Ziel der Arbeit war es einerseits zu untersuchen, ob mit Hilfe der BLI ein neues *Screening*-Verfahren möglich ist, welches geeignet ist, unbekannte Substrate von Membranproteinen zu identifizieren.

Zum zweiten war das Ziel der Arbeit die Entwicklung einer schnellen, zellfreien *in-vitro-Screening*-Plattform zur Entdeckung arzneistoffähnlicher Moleküle, die die Funktionalität von Ribosomen hemmen, um neue *Hit-Lead-Drug*-Entwicklungen im Bereich der Antibiotika zu initiieren.

## 2 Material

### 2.1 Plasmide

Für die zellfreie Proteinsynthese wurden das Plasmid pIVEX2.3w\_GFPΔM1 eingesetzt. Die Vektorkarte wurden mit SnapGene (2.7, Software) erstellt.



**Abbildung 2.1:** Das Plasmid pIVEX2.3w\_GFPΔM1 für die zellfreie Proteinsynthese von GFP-Fusionsproteinen mit einem C-terminalen His<sub>10</sub>-tag.

## 2.2 Oligonukleotide

Zur Erstellung der RBS-Datenbank wurden die folgenden Oligonukleotid-Sequenzen eingesetzt. Weiterhin sind die Oligonukleotid-Sequenzen zur Sequenzierung bzw. einer ortsspezifischen Mutagenese dargestellt (**Tabelle 2.1**).

**Tabelle 2.1:** Oligonukleotid-Sequenzen für die Erstellung unterschiedlicher RBS, einer ortsspezifischen Mutagenese sowie zur Sequenzierung. Fett geschrieben sind diejenigen Schnittstellen, welche identisch mit den Nukleotiden, welche einem Restriktionsverdau mit *Xba* I bzw. *Sgs* I erhalten werden. Unterstrichen sind die Abweichungen zur Referenz-Sequenz.

Name	Sequenz
RBS1_fw	<b>CTAGAT</b> CATAAATTGAATATCAGGAGGCTCGAGG
RBS1_rv	<b>CGCGCCT</b> CGAGCCTCTGATATTCAATTATGAT
RBS2_fw	<b>CTAGAT</b> CAGAAATTGAATATCAGGAGGTTCTGAGG
RBS2_rv	<b>CGCGCC</b> ACGAACCTCCTGATATTCAATTCTGAT
RBS3_fw	<b>CTAGAT</b> CAGAAATTGAATATAAGGAGGTTCTGAGG
RBS3_rv	<b>CGCGCCT</b> CGAACCTCCTTATATTCAATTCTGAT
RBS4_fw	<b>CTAGAG</b> TTGACATGACAATCAAGGCGGTTCTGAGG
RBS4_rv	<b>CGCGCCT</b> CGAACCTCCTGATTGTATGTCAACT
RBS5_fw	<b>CTAGAG</b> TTTACCGTGTATAACAAGGAGGTTCTGAGG
RBS5_rv	<b>CGCGCCT</b> CGAACCTCCTTGTATCACGGTAAACT
RBS6_fw	<b>CTAGA</b> TTTACATTGAATAAAAGGAGGCTTCGA
RBS6_rv	<b>CGCGCCT</b> CGAACCTCCTTTATTCAATGTAAATT
RBS7_fw	<b>CTAGAG</b> TTGACCGGACATACAAGGAGGTTCTGAGG
RBS7_rv	<b>CGCGCCT</b> CGAACCTCCTTGTATGTCCGGTCAACT
RBS8_fw	<b>CTAGAG</b> CTGACATGACAATCAAGGCGGTTAGG
RBS8_rv	<b>CGCGCCT</b> AAACCGCCTGATTGTATGTCACT
RBS9_fw	<b>CTAGAG</b> TTGACATGACATACAAGGAGGTTCTGAGG
RBS9_rv	<b>CGCGCCT</b> CGAACCTCCTTGTATGTCAACT
RBS10_fw	<b>CTAGAG</b> TTGACATGACAATTAGCGCGGTTAAGG
RBS10_rv	<b>CGCGCCT</b> AAACCGCGTAATTGTATGTCAACT
RBS11_fw	<b>CTAGAC</b> GGGGCAGGTTGCCCTTGCAAGATAACATTAAAGGTAGGTTTTT
RBS11_rv	<b>CGCGCC</b> AAAAAACCTACCTAAAATGTTATCTGCAAAGGGCACCTGCCCG
RBS_E.coli_fw	<b>CTAGAA</b> ATAATTGTTAACTTAAGAAGGGAGATAACATATGG
RBS_E. coli_rv	<b>CGCGCC</b> CATATGTATATCTCCTTCTAAAGTTAACAAAATTATTT
GCA_fw	TATTTCTTCCACACGC <u>AAGCTT</u> ATCG
GCA_rv	GCTT <u>TCG</u> TGTGGAAGAAAATTGTAC
Seq_1_GFP	CAG GTA GTT TTC CAG TAG TG
Seq_2_GFP	TAG TGA CAA GTG TTG GCC ATG
Xhol_fw	GAATGGATGA <u>ACTCTATAAAGGAGGTCTCGAGAAA</u>
Xhol_rv	TTT <u>CTCGAG</u> ACCTCCTTATAGAGTTATCCATT
Spel_fw	TTTACT <u>AGTATGGCGTCGAAGGGCGAAGAGGATAATATG</u>
Spel_rv	CATATTATCCTCTCGCCCTCGACGCC <u>ACTAGTAAA</u>
pIVEX2.3w-(GFP) T7_fw	TAATACGACTCACTATAGGG
pIVEX2.3w-(GFP) T7_rv	GCTAGTTATTGCTCAGCGG

## 2.3 Kodierende DNA-Sequenzen

Die während dieser Arbeit zellfrei exprimierten Proteine sind in **Tabelle 2.2** aufgeführt.

**Tabelle 2.2:** Kodierende DNA-Sequenzen (GenBank, (Clavel *et al.* 2016; Pédelacq *et al.* 2006)).

Name	Beschreibung	Gen-Bank Accession Number	PDB
mNeonGreen	Fluoreszenzprotein aus <i>Branchiostoma lanceolatum</i>	KC295282	5LTP
TbAQP2	Aquaglyceroporin 2 aus <i>Trypanosoma brucei</i>	CAG27021.1	
PfAQP1	Aquaporin aus <i>Plasmodium falciparum</i>	XP_001348009.1	3C02
Folding reporter GFP	Grün fluoreszierendes Protein aus <i>Aequorea victoria</i>		2B3Q

## 2.4 Bakterien-Stämme

Die verwendeten Bakterien-Stämme sind der **Tabelle 2.3** zu entnehmen.

**Tabelle 2.3:** verwendete Bakterien-Stämme. (DSM; DSZM, German Collection of Microorganisms, Braunschweig, Deutschland).

Bakterium	Genotyp	Herkunft/Referenz
<i>E. coli</i> DH5α	F <sup>-</sup> Φ80lacZΔM15 δ ( <i>lacZYA-argF</i> ) U169 <i>recA1</i> <i>endA1 hsdR17</i> (r <sub>K</sub> -, m <sub>K</sub> +) <i>phoA supE44</i> λ- <i>thi-1 gyrA96 relA1</i>	ThermoFisherScientific, Schwerte
<i>E. coli</i> BL21(DE3)	F <sup>-</sup> <i>ompT hsdSB(r<sub>B</sub>-, m<sub>B</sub>-)</i> <i>gal dcm</i> (DE3)	Schwarz <i>et al.</i> (2007a)
<i>P. putida</i> mt-2 KT2440		DSM-6125
<i>S. enterica</i> subsp. Enterica		DSM-11320
<i>B. megaterium</i>		DSM-32
<i>B. subtilis</i> CU1050		DSM-5545

## 2.5 Enzyme, Antikörper, Kits, Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Der S30-Extrakt und die T7-RNA-Polymerase für die zellfreie Proteinproduktion wurden in Anlehnung an das Protokoll von Schwarz *et al.* (2007a) hergestellt. Dabei erfolgte die Extraktion der *E. coli* basierten S30-Extrakte nach einem Fermentationsprozess aus einem Fermenter in Zusammenarbeit

## Material

mit weiteren Arbeitsgruppenmitgliedern oder aus einem Erlenmeyerkolben (3.2.9). Die über weite Teile der Arbeit verwendete T7-RNA-Polymerase (3.2.10) wurde freundlicherweise von Dr. Folknand Helmstetter zur Verfügung gestellt. Eine weitere, verwendete Charge der T7-RNA-Polymerase wurde in Zusammenarbeit mit Christian Hansen hergestellt.

Das eingesetzte Pentamidin wurde von Björn Henke synthetisiert und zur Verfügung gestellt.

Am Pharmazeutischen Institut der Christian-Albrechts-Universität (CAU) in Kiel verwendete Antikörper, Enzyme, Kits und Chemikalien sind im Folgenden nach ihrem Hersteller alphabetisch sortiert gelistet.

### Enzyme

---

Agilent Technologies, Waldbronn

*PfuTurbo* DNA-Polymerase (2,5 U  $\mu\text{l}^{-1}$ ), *Pfu reaction buffer* (10x)

Roche, Mannheim

Pyruvatkinaise *from rabbit muscle* (10 mg  $\text{ml}^{-1}$ , ca. 200 U  $\text{mg}^{-1}$ )

Thermo Fisher Scientific, Schwerte

Restriktionsendonukleasen und Puffer, T4-DNA-Ligase (5 U  $\mu\text{l}^{-1}$ ) und Puffer

### Antikörper

---

Jackson ImmunoResearch, Suffolk, UK

*Peroxidase AffiniPure IgG Goat Anti-Mouse, light chain specific* (0,2 mg  $\text{ml}^{-1}$ , 1:5000)

Qiagen, Hilden

Anti-Penta-His, *mouse, monoclonal* (0,2 mg  $\text{ml}^{-1}$ , 1:5000)

Roche, Mannheim

Anti-Hämagglutin (Anti-HA), *mouse, monoclonal* (0,2 mg  $\text{ml}^{-1}$ , 1:5000)

Anti-GFP, *mouse, monoclonal* Antikörper (0,4 mg  $\text{ml}^{-1}$ , 1:10000)

### Kits

---

Bio-Rad, München

*Clarity™ Western ECL Substrate, Quick Start™ Bradford Protein Assay*

Jena Bioscience, Jena

*Membrane HTS96™*

Machery-Nagel, Düren

*NucleoBond® PC 500*

Promega, Mannheim

*Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System*

Süd-Laborbedarf, Gauting

*HiYield® PCR Clean-up/Gel Extraction*

## Chemikalien

---

Anatrace, Maumee, USA

n-Dodecyl- $\beta$ -D-maltopyranosid (DDM) ANAGRADE, n-Decyl- $\beta$ -D-maltopyranosid (DM) ANAGRADE

AppliChem, Darmstadt

Natriumdodecylsulfat (SDS), Phosphoenolpyruvat (Kaliumsalz), Tween® 20

Avanti Polar lipids, Alabaster, USA

*E. coli* Polar Lipid Extract powder, 4ME 16:0 PC 1,2-Diphytanoyl-sn-glycerol-3-phosphocholin, DSPE-PEG(2000) Biotin 1,2-Distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamin-N-[biotinyl(polyethylene glycol)-2000] (Ammonium-Salz)

Becton Dickinson, Heidelberg

*Bacto*™ Peptone

Carl Roth, Karlsruhe

Ammoniumperoxodisulfat (APS,  $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$ ), Bromphenolblau (Natriumsalz), Ammoniumsulfat ( $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ,  $\geq 99,5\%$ ), Calciumchlorid ( $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ ), Chloramphenicol ( $\geq 98,5\%$ ), Dithiothreitol (DTT), Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA), Ethanol ( $\geq 99,8\%$ ), Glycerol ROTIPURAN® ( $\geq 99,5\%$ , wasserfrei), Glycin, 2-[4-(2-Hydroxyethyl)piperazin-1-yl]ethansulfonsäure (HEPES), Isopropanol ( $\geq 99,8\%$ ), Kaliumacetat, Kaliumchlorid (KCl), Kaliumdihydrogenphosphat ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ), Kaliumhydrogenphosphat ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ), Kaliumhydroxid (KOH), Kieselgel 60, LB-Agar (Lennox), LB-Medium (Lennox), L-Leucin, Lithiumacetat, 2-Mercaptoethanol, 2-(N-Morpholin)ethansulfonsäure (MES), Milchpulver (*blotting grade*, fettarm), 3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure (MOPS, PUFFERAN®,  $\geq 99,5\%$ ), Natriumazid ( $\text{NaN}_3$ ), Natriumchlorid (NaCl), Natriumhydrogenphosphat ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ), Natriumhydroxid (NaOH), Neomycin, Orange G, L-Prolin, Rotiphorese® Gel 40 (40 %, 29:1), Rotiphorese® Blau R (Konzentrat), D(+)-Saccharose ( $\geq 99,5\%$ ), Tetracyclin Hydrochlorid, Triton™ X-100, Tris- (hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS)

Fluka Chemie, Buchs, Schweiz

L-Alanin, L-Glutamat (Kalium-Monohydratsalz), L-Serin

Genaxxon bioscience, Ulm

Ampicillin (Natriumsalz), Agarose LE, *Bovine Albumin Fraktion V* (pH 7,0) (*bovine serum albumin*, BSA), *N,N,N',N'*-Tetramethylethan-1,2-diamin (TEMED)

GE Healthcare, Freiburg

*Q-Sepharose Fast Flow*

J.T. Baker, München

Essigsäure, Methanol (*HPLC grade*), Salzsäure

MP Biomedicals, Illkirch, Frankreich

Ethidiumbromid

Oxoid, Basingstoke, UK

Bakteriologischer Agar

Peqlab, Erlangen

peqGOLD Protein Marker III (*prestained*)

Qiagen, Hilden

Nickel-Nitrilotriessigsäure-Agarose ( $\text{Ni}^{2+}$ -NTA)

Roche, Mannheim

cOMPlete™-Proteaseinhibitor-Cocktail (EDTA-frei), tRNA aus *E. coli* MRE600

Sigma Aldrich, München

Acetylphosphat (Lithium-Kaliumsalz), Adenosin-5'-triphosphat (ATP, Dinatriumsalz), Clindamycin-Hydrochlorid, L-Arginin (Hydrochloridsalz), L-Asparagin (Monohydrat), L-Aspartat (Natrium-Monohydratsalz), Brij® 78, L-Cystein, Cytidin-5'-triphosphat (CTP, Dinatriumsalz), Dimethylsulfoxid (DMSO,  $\geq 99,8\%$ ), Erythromycin-Hydrat (96 %) Folinsäure

## Material

(Calciumsalz), L-Glutamin, Guanosin-5'-triphosphat (GTP, Natriumsalz), L-Histidin (Hydrochlorid-Monohydratsalz), Imidazol, L-Isoleucin, L-Lysin (Hydrochloridsalz), Magnesiumacetat (Tetrahydratsalz), L-Methionin, L-Phenylalanin, Pentamidin (Isethionatsalz), Polyethylenglykol 3350, Polyethylenglykol 8000, Polypropylenglykol 2000, L-Threonin, L-Tryptophan, L-Tyrosin, Uridin-5'-triphosphat (UTP, Trinatriumsalz), L-Valin Thermo Fisher Scientific, Schwerste 2'-Desoxyadenosin-5'-triphosphat (dATP, 100 mM), 2'-Desoxycytidin-5'-triphosphat (dCTP, 100 mM), 2'-Desoxyguanosin-5'-triphosphat (dGTP, 100 mM), 2'-Desoxythimidin-5'-triphosphat (dTTP, 100 mM), Iso-Sensitest-Bouillon, Lambda-DNA, Linezolid 98%, *RiboLock RNase-Inhibitor* (40 U  $\mu$ l<sup>-1</sup>), *Soybean-Casein Digest Medium*

## Verbrauchsmaterialien

---

Beckmann Coulter, Krefeld  
Ultrazentrifugengefäß (1,5 ml, PP)

Bemis, Neenah, USA  
*Parafilm® M*

Bio-Rad, München  
Bio-Beads®SM-2, *Poly-Prep® Chromatography Columns* (2 ml Säulenvolumen, 10 ml Reservoir)

Carl Roth, Karlsruhe  
Dialyseschlauch *Visking®* (14k MWCO)

Eydam, Kiel  
Einmalspritzen *NORM-JECT®*

Fisher Scientific, Schwerste  
*Slide-A-Lyzer® Dialysis Cassettes* (10k MWCO, 3 ml)

GE Healthcare, Freiburg  
*AmershamTM HybondTM 0.45 PVDF, Whatman® Grade 3 MM Chr Blotting Paper*

Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen  
Microplatte, 96 Well, PP, F-Boden (Kaminform)

Hellma, Jena  
Quarzküvette (10 mm)

Henke-Sass Wolf, Tuttlingen  
Einmalkanülen (21G, 0,8 x 40 mm)

Merck, Darmstadt  
Zentrifugierfiltereinheiten *Amicon® Ultra-4, Ultra-15 (je Ultracel-100 und Ultracel-30)*

Pall FortéBio, Portsmouth  
*Dip and Read™ Streptavidin (SA) Biosenseoren, Super-Streptavidin-Sensoren, Penta-His-Sensoren*

Sarstedt, Nümbrecht  
96-well-Platten (halbflächig, konisch mit klarem Boden), Mikroreagiergefäße, PCR-Reagiergefäß *Multiply®-Pro* (0,2 ml, PP), PCR-Streifen (8-strip opt. clear flat caps), Pipettenspitzen, Polystyrol-Küvetten (10 x 4 x 45 mm), Reagenz- und Zentrifugenröhren, Serologische Pipetten, Sterilfilter Filtropur S ( $\varnothing$  0,2  $\mu$ m)

Schott Instruments, Mainz  
Glasbehälter und -kolben

Sigma Aldrich, München  
Fleischextrakt, Glaskügelchen, (säuregewaschen,  $\varnothing$  425-600  $\mu$ m)

## 2.6 Nährmedien, Lösungen & Puffer

Nährmedien für *E. coli*, *P. putida*, *S. enterica*, *B. megaterium*, *B. subtilis*

Alle Nährmedien wurden nach der Herstellung autoklaviert. Zugesetzte Antibiotika zur Selektion wurden erst nach dem Abkühlen der Autoklavierung hinzugefügt.

Nährmedien für *E. coli*:

**LB**  
20 g LB-Medium  
1 l *Aqua bidest.*

**LB-Agarplatten**  
35 g LB-Agar  
1 l *Aqua bidest.*  
Als Selektionsmarker wurden ggf. 100 µg ml<sup>-1</sup> Ampicillin oder Kanamycin hinzugegeben.

Nährmedium für *B. subtilis*, *B. megaterium*, *P. putida*:

**Medium 1**  
5,0 g Pepton  
3,0 g Fleischextrakt  
10 mg MnSO<sub>4</sub>  
1 l *Aqua bidest.*; pH 7,0

**Agar-Medium 1**  
5,0 g Pepton  
3,0 g Fleischextrakt  
15,0 g Agar  
10 mg MnSO<sub>4</sub>  
1 l *Aqua bidest.*; pH 7,0

Bei der Herstellung von Nährmedium für *P. putida* wurde kein MnSO<sub>4</sub> hinzugegeben

Nährmedium für *S. enterica*:

**Medium 92**  
30,0 g Soybean-Casein-Digest-Medium  
3,0 g Hefeextrakt  
1 l *Aqua bidest.*

**Agar-Medium 92**  
30,0 g Soybean-Casein-Digest-Medium  
3,0 g Hefeextrakt  
7,5 g Agar  
1 l *Aqua bidest.*

## Lösungen für die Molekularbiologie und Proteinbiochemie

Agarosegelektrophorese von DNA:

**TAE-Puffer**  
40 mM TRIS-Acetat, pH 8,0  
1 mM EDTA

**Probenpuffer (10x)**  
0,4 % Orange G  
30 % Glycerol

**Ethidiumbromid (10 mg ml<sup>-1</sup>)**  
1 Tabl. Ethidiumbromid  
10 ml *Aqua bidest.*

SDS-Polyacrylamidgelektrophorese (SDS-PAGE):

**Trenngel (12 %)**  
2625 µl *Aqua bidest.*  
1500 µl Trenngelpuffer (4x)  
1875 µl Rotiphorese® 40  
5 µl TEMED  
40 µl APS (10 %)

**Sammelgel (5 %)**  
1200 µl *Aqua bidest.*  
500 µl Sammelgelpuffer (4x)  
300 µl Rotiphorese® 40  
3 µl TEMED  
12,5 µl APS (10 %)

## Material

<b>Trenngelpuffer (4x)</b> 1,5 M TRIS 0,4 % SDS pH 8,8 mit HCl	<b>APS (10 %)</b> 5 g $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$ Ad 50 ml <i>Aqua bidest.</i>
<b>Sammelgelpuffer (4x)</b> 0,5 M TRIS 0,4 % SDS pH 6,8 mit HCl	<b>Kathodenpuffer</b> 2,5 mM TRIS 19,2 mM Glycin 0,1 % SDS pH 8,2-8,6 mit HCl
<b>SDS-Ladepuffer (4x)</b> 250 mM TRIS 40 % Glycerol 0,02 % Bromphenolblau 8 % SDS 400 mM DTT pH 6,8 mit HCl	

## Western Blot:

<b>Transferpuffer (5x)</b> 12,5 mM TRIS 96 mM Glycin 0,2 % SDS pH 8,3 mit HCl	<b>Transferpuffer</b> 10 ml Transferpuffer (5x) 10 ml Methanol Ad 50 ml <i>Aqua bidest.</i>
<b>TBS (10x)</b> 0,2 M TRIS 1,35 M NaCl Ad 1 l <i>Aqua bidest.</i> pH 7,6 mit HCl	<b>TBST</b> 100 ml TBS (10x) 1 ml Tween® 20
	<b>MTBST</b> 1,2 g Milchpulver Ad 40 ml TBST

## Medien, Lösungen und Puffer für die Produktion und Reinigung zellfreier Proteine

### Nährmedien und Puffer für die S30-Extrakt-Herstellung:

Bis auf die Aminosäurelösung und den Phosphatpuffers für das YPTG-Medium, die während der S30-Extrakt-Herstellung zusammen mit dem Bioreaktor autoklaviert wurden, wurden die nachfolgenden Lösungen filtriert ( $\emptyset$  2  $\mu\text{m}$ ).

<b>YPTG-Aminosäuren</b> 80 g Bactotrypton 25 g NaCl 50 g <i>Bacto-Yeast-Extract</i> Ad 4,5 l <i>Aqua bidest.</i>	<b>YPTG-Glukose</b> 99 g Glukose-Monohydrat Ad 200 ml <i>Aqua bidest.</i>
	<b>YPTG-Phosphatpuffer, pH 7,6</b> 14,95 g $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 45,65 g $\text{K}_2\text{HPO}_4$ Ad 250 ml <i>Aqua bidest.</i>

## Material

Die S30-Puffer A, B und C (50x) wurden durch Verdünnen mit *Aqua bidest.* um den Faktor 50 erhalten. Weitherin wurden 0,042 % 2-Mercaptoethanol (Puffer A), 0,05 % DDT (2 M) (Puffer B) beziehungsweise 0,025 % DTT (2 M) (Puffer C) vor der Verwendung hinzugefügt.

### **S30-Puffer A/B (50x)**

500 mM TRIS  
30 mM KCl  
700 mM Magnesiumacetat  
pH 8,2 mit Essigsäure

### **S30-Puffer C (50x)**

500 mM TRIS  
30 mM Kaliumacetat  
700 mM Magnesiumacetat  
pH 8,2 mit Essigsäure

Puffer für die Bestimmung der MHK:

### **McFarland-Standard**

0,1791 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>  
0,24 mM BaCl<sub>2</sub>

Lösungen für die zellfreie Proteinsynthese:

### **S30-Puffer**

10 mM TRIS  
14 mM Magnesiumacetat  
0,6 mM KCl  
Filtrieren Ø 2 µm  
Bei 4 °C lagern

### **HEPES/EDTA-Puffer (24x)**

2,4 M HEPES, pH 8,0  
20 mM EDTA  
Filtrieren Ø 2 µm  
Bei -20 °C lagern

### **cComplete™ (50x)**

1 Minitablette cComplete™  
1 ml *Aqua bidest.*  
Bei -20 °C lagern

### **RCWMDE**

Je 16,7 mM: L-Arginin, L-Cystein,  
L-Tryptophan, L-Methionin,  
L-Asparaginsäure,  
L-Glutaminsäure

Bei -20 °C lagern

### **NTP-Mix (75x)**

90 mM ATP  
Je 60 mM GTP, CTP, UTP  
Filtrieren Ø 2 µm  
Bei -20 °C lagern

### **Aminosäure-Mix (50x)**

Je 4 mM:

L-Arginin, L-Asparagin, L-Alanin, L-Aspartat, L-Cystein, L-Glutamat, L-Glutamin, Glycin, L-Histidin, L-Isoleucin, L-Leucin, L-Lysin, L-Methionin, L-Phenylalanin, L-Prolin, L-Serin, L-Threonin, L-Tryptophan, L-Tyrosin, L-Valin

Bei -20 °C lagern

Proteinreinigung an Ni<sup>2+</sup>-NTA-Agarose:

### **Reinigungspuffer**

20 mM TRIS  
150 mM NaCl  
0-500 mM Imidazol  
+ Detergens (i.d.R. Brij 78 0,05%)  
auf pH 8,0 eingestellt

## Material

### T7-RNA-Polymerase

**T7-Puffer I**  
30 mM TRIS-HCl  
10 mM EDTA  
50 mM Natriumchlorid  
5 % Glycerol  
10 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol  
auf pH 8,0 eingestellt

**T7-Puffer II**  
30 mM TRIS-HCl  
10 mM EDTA  
20 mM Natriumchlorid  
5 % Glycerol  
10 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol  
auf pH 8,0 eingestellt

### T7-Dialysepuffer

10 mM TRIS-HCl  
1 mM EDTA  
10 mM Natriumchlorid  
1 mM DTT  
auf pH 8,0 eingestellt

### Puffer für die funktionelle Proteincharakterisierung

Assaypuffer für Stopped-Flow-Lichtstreuungsmessungen:

**Liposomenpuffer**  
50 mM HEPS  
50 mM MES  
200 – 1000 mM Saccharose  
auf pH 6,8 eingestellt

**Gradientenlösung**  
50 mM HEPS  
50 mM MES  
200 – 1000 mM Saccharose  
100-400 mM Glycerol, Erythritol, Ribitol, Sorbitol  
auf pH 6,8 eingestellt

Assaypuffer für BLI-Messungen:

**Isoosmotischer Puffer**  
50 mM HEPS  
50 mM MES  
100-190 mM Saccharose  
10-100 mM Sorbitol oder Glycerol  
mit oder ohne 0,5 % BSA  
auf pH 6,8 eingestellt

## 2.7 Geräte & Software

### Geräte

Agarosegelektrophorese und Dokumentation:

IDA <i>Image Documentation &amp; Analysis</i>	Raytest, Straubenhardt
Mikrowelle NN-E245W	Panasonic, Wiesbaden
Netzgerät EPS 300	Pharmacia Biotech, Dübendorf, Schweiz
UV-Transilluminator	Herolab, Wiesloch

## Material

### *Bio-Layer-Interferometrie*

Octet RED96e System

### Brutschränke & temperierbare Geräte:

Brutschrank Kelvitron® T

Brutschrank Minitron

Heizblock DRI-BLOCK DB-20

Thermozykler Primus

### Mischer und Schüttler:

Kolben-Orbitalschüttler Certomat®

Rotationsmischer für Reagenzgläser TC-7

Rotator-Mixer Grant-bio PTR-30 Grant

Vortex-Genie 2

Wippschüttler WS 10

### S30-Extrakt-Produktion:

BIOSTAT® A plus

French Press cell disrupter FA-078

Wasserbad 183

### SDS-PAGE & Western Blot:

Gelgießstand und Laufkammer

Trans-Blot® SD Semi-Dry Transfer Cell

Lumi ImagerTM F1

ECL Chemostar

Gelgießstand und Laufkammer

### Stopped-Flow-Apparatur:

Küvette FC-15/7.5, Mischeinheit SFM-2000, Monochromator BH-10-61 UV, MPS 70/2

Mikrokompressor Einheit, PCI Verbindungs Einheit 6221, Photomultiplier PMS 250,

Spannungsquelle ALX 250, UV/Vis- und Fluoreszenzspektrometer MOS-200

### Zentrifugen:

Ultrazentrifuge Optima™ XL-80K

Beckman Coulter, Krefeld

Ultrazentrifugen-Rotor 50.2 Ti

Beckman Coulter, Krefeld

Multifuge 1S-R Centrifuge

Heraeus, Hanau

PerfectSpin 24 Plus

Peqlab, Erlangen

Perfect Spin 24 R *refrigerated*

Peqlab, Erlangen

*micocentrifuge*

Peqlab, Erlangen

### Sonstiges:

BioPhotometer

Eppendorf, Hamburg

Digital-pH-Meter Lab 850 Schott

Instruments, Mainz

## Software

Bio-Kine Version 4.74.2

BioLogic, Claix, Frankreich

BioPAT® MCFS/DA Version 3.0

Sartorius, Göttingen

ChemDraw Professional V. 15.1.0.144

Perkin Elmer, Waltham, MA, US

GrahPad Prism 9.5.

GraphPadPrism Boston, USA

Maestro Version 2021-02

Schrödinger, Inc., New York, USA

Microsoft Office Version 2008

Microsoft Corporation, Redmond, WA, US

## Material

Octet System Data Analyses	Pall FortéBio, Portsmouth
PyMOL Molecular Graphics System Version 1.7.4.1	Schrödinger, Inc., New York, USA
SigmaPlot for Windows Version 11.0	Systat Software, Erkrath
SnapGene Viewer Version 6.2.1	Insightful Sciene, GSL Biotech, San Diego, CA, US
Unicorn Version 5.2	GE Healthcare, Freiburg

## 3 Methoden

### 3.1 Molekularbiologische Methoden

#### 3.1.1 Herstellung kompetenter *E. coli*

Zur Herstellung kompetenter *E. coli* vom Stamm DH5 $\alpha$  wurde die Calciumchlorid-Methode verwendet (Cohen *et al.* 1972). Zunächst wurden die Bakterien-Suspension auf einer LB-Agarplatte ausgestrichen und bei 37 °C über Nacht kultiviert. Anschließend wurde aus einer einzelnen Kolonie ein 5 ml Inokulum hergestellt und für 8 bis 9 h bei 37 °C bei 200 rpm inkubiert. Am Abend wurde mit dieser Vorkultur 100 ml LB-Medium angeimpft und über Nacht bei 200 rpm und 20 °C bis zum Erreichen einer OD<sub>600</sub> von 0,4- 0,6 inkubiert. Anschließend wurden die Zellen 10 min lang auf Eis gekühlt und zur Zellernte 10 min lang bei 2.000 g und 4 °C zentrifugiert. Nach Zugabe von 30 ml kalter 0,1 M Calciumchlorid-Lösung wurde 10 min lang auf Eis inkubiert. Im Anschluss wurde das Pellet resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation bei 2000 g für 10 min und 4 °C wurde mit 10 ml kalter 0,1 M Calciumchlorid-Lösung nach der 10-minütigen Inkubation auf Eis resuspendiert. Die Zellen wurden für 10 min lang bei 2.000 g und 4 °C pelletiert und mit 20 % Glycerol versetzter Calciumchlorid-Lösung (0,1 M) aufgenommen und für 4 h auf Eis inkubiert. Die kompetenten *E. coli* wurden zu 100 µl aliquotiert und bei – 80 °C gelagert. Es wurden nur diejenigen kompetenten Zellen verwendet, die nach einer Transformation von 1 ng Plasmid-DNA ein Wachstum von mindestens 10<sup>6</sup> KBE/µg zeigten.

#### 3.1.2 Transformation chemisch kompetenter *E. coli*

Ein bei – 80 °C gelagertes Aliquot mit kompetenten *E. coli* (3.1.1) wurden für 3 min auf Eis gelagert, sodass diese gerade angetaut waren. Anschließend wurde 10 µl vom Ligationsansatz (3.1.7) oder 5 µl vom PCR-Produkt (3.1.8) hinzugegeben und für 30 min auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock bei 42 °C für 45 s, wurde der Ansatz 2 min auf Eis inkubiert und anschließend mit 900 µl LB-Medium versetzt. Daraufhin wurde im Schüttelrad (6 rpm) bei 37 °C für 45 – 60 min lang inkubiert. Die Zellen wurden bei 30.000 g für 10 s zentrifugiert und 900 µl des Überstands verworfen. Das Pellet wurde in den verbliebenen 100 µl des Überstands resuspendiert. Zur Selektion wurden die transformierten Klone auf einer LB-Agarplatte mit Ampicillin als Selektionsantibiotikum ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

Zur Schnelltransformation chemisch kompetenter *E. coli* wurde ein bei – 80 °C gelagertes Aliquot mit kompetenten *E. coli* (3.1.1) wurden für 3 min auf Eis gelagert, sodass diese gerade angetaut waren. Es wurden 100–200 ng DNA aus einer *Miniprep* (3.1.4) hinzugegeben und für 15 min auf Eis inkubiert. Zur Selektion wurden 40 µl der Zellen auf LB-Agarplatten mit Ampicillin als Selektionsantibiotikum ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert.

### 3.1.3 Dauerkulturen von Bakterien

Um Bakterienkulturen über einen längeren Zeitraum lagern zu können, wurde eine einzelne Kolonie über Nacht in 5 ml LB-Medium mit einem geeigneten Selektionsantibiotikum bei einer geeigneten Temperatur unter Rotation (6 rpm) inkuliert. Am nächsten Morgen wurden 1000 µl der frischen Bakterien-Übernachtkultur mit 500 µl Glycerol 80 % vermischt und sorgfältig gevortext. Die Lagerung erfolgte bei – 80 °C.

### 3.1.4 DNA-Isolierung aus *E. coli*

Die DNA-Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* wurde mit Hilfe von kommerziell verfügbaren Kits durchgeführt. Für eine Minipräparation wurde das *Wizard® Plus SV Miniprep DNA Purification System* verwendet. Abweichend von den Herstellerangaben wurde keine alkalische Protease-Lösung nach der Zellyse hinzugegeben. Weiterhin wurde die Plasmid-DNA mit 20 - 50 µl autoklaviertem *Aqua bidest.* statt mit den vorgeschriebenen 100 µl eluiert.

Für die Maxipräparation wurde das *NucleoBond® PC 500 Plasmid DNA Purification Kit* genutzt. Dafür wurde zunächst eine Vorkultur angesetzt, indem ein Inokulum in 5 ml LB-Amp-Medium bei 37 °C für 6 - 8 h im Schüttelrad (6 rpm) inkubiert wurde. Anschließend wurde 250 oder 500 ml LB-Amp-Medium in einem 1 l Erlenmeyerkolben mit der Vorkultur angeimpft. Es wurde über Nacht bei 37 °C bei 200 rpm auf einem Kippschüttler inkubiert. Am folgenden Tag wurde das Kit nach Herstellerangaben benutzt mit der Abweichung, dass bei der Alkoholfällung bei 4 °C statt bei Raumtemperatur zentrifugiert wurde. Das DNA-Pellet wurde für 1 h bis 3 d getrocknet. Das trockene Pellet wurde mit 50 - 100 µl autoklaviertem *Aqua bidest.* resuspendiert.

### 3.1.5 DNA-Konzentrationsbestimmung

Zur Bestimmung der Konzentration sowie zur Überprüfung der Reinheit von Plasmid-DNA wurde eine mit autoklaviertem *Aqua bidest.* verdünnte Plasmid-DNA Lösung photometrisch bestimmt. Als Referenz diente autoklaviertes *Aqua bidest.* Die Konzentration wurde mit Hilfe folgender Gleichung bei einer Wellenlänge von 260 nm vom Gerät bestimmt.

$$c \left( \mu\text{g ml}^{-1} \right) = A_{260 \text{ nm}} \cdot 50 \cdot f \quad (\text{Gleichung 3.1})$$

c: Konzentration der Plasmid-DNA

A<sub>260</sub>: Absorption bei λ = 260 nm

f: Verdünnungsfaktor

Die Reinheit wurde über das Verhältnis der Absorption von 260 nm und 280 nm berechnet. Es wurde ein Verhältnis von A<sub>260</sub> zu A<sub>280</sub> von 1,8 – 2,0 angestrebt.

### 3.1.6 Restriktionsverdau

Es wurden 1000 ng DNA mit den entsprechenden Restriktionsenzymen in einem geeigneten Restriktionspuffer in einem Gesamtvolumen von 10 µl verdaut. Die Dauer, die Temperatur, die Menge des Restriktionsenzyms und die Wahl des Restriktionspuffers erfolgten nach der Empfehlung des Herstellers.

### 3.1.7 Ligation

Für die Ligation wurden kompatible Enden mit Hilfe einer T4-DNA-Ligase zusammengefügt. Dabei wurde ein Insert mit einem Plasmid-Vektor im Verhältnis 5 + 3 oder 7 + 1 gemischt und mit 1 µl T4-DNA-Ligase-Puffer sowie 1 µl T4-DNA-Ligase gemischt und für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert.

### 3.1.8 Ortsspezifische Mutagenese

Zum Einfügen oder Austausch einzelner DNA-Basen in einem Gen-Abschnitt wurde in Anlehnung nach dem *QuikChange® Site Directed Mutagenesis* Protokoll von Stratagene genutzt. Dabei wurden ungefähr 100 ng *template*-DNA eingesetzt (**Tabelle 3.1**). Der *forward*-Primer enthielt in der Mitte seiner Sequenz einen Basenaustausch für die gewünschte Mutation. Der *reversed*-Primer setzte direkt nach der Mutationsstelle komplementär zur *template*-DNA ein. Beim *Design* der Primer wurde weiterhin auf die Schmelztemperatur, den GC-Gehalt und auf mögliche Dimer- und Sekundärstrukturen geachtet, sodass es zu Abweichungen kommen konnte. Die Länge der Primer lag bei ungefähr 30 bp. Für die Amplifizierung wurde die *PfuTurbo*-DNA-Polymerase eingesetzt. Das Temperaturprogramm während der PCR wurde durch einen Thermocycler gesteuert (Tabelle 3.2). Die Zeit der Elongation wurde dabei in Abhängigkeit der Größe des PCR-Produkts angepasst, da die *Pfu*-Polymerase 500 bis 1000 bp pro Minute amplifizierte. Die Annealing-Temperatur richtete sich nach den Primern und wurde über folgende Formel berechnet:

$$T_{Annealing} = 60 + 0,41 * GC (\%) - \frac{600}{bp (primer)} \quad (\text{Gleichung 3.2})$$

GC (%): GC-Gehalt des Primers in %

bp (Primer): Anzahl der Basenpaare des Primers

**Tabelle 3.1 Pipettierschema eines PCR-Ansatzes**

Komponente	Menge
Template-DNA (200-500 $\mu\text{g ml}^{-1}$ , 1:100 verdünnt)	1,0 $\mu\text{l}$
Pfu-Reaktionspuffer (10 x)	5,0 $\mu\text{l}$
dNTPs (2,5 mM)	4,0 $\mu\text{l}$
Forward-Primer	1,5 $\mu\text{l}$
Reverse-Primer	1,5 $\mu\text{l}$
PfuTurbo-DNA-Polymerase (2,5 U $\mu\text{l}^{-1}$ )	0,8 $\mu\text{l}$
Autoklaviertes <i>Aqua bidest.</i>	ad 50 $\mu\text{l}$

**Tabelle 3.2 Temperaturprogramm eines PCR-Ansatzes**

Schritt	Temperatur/ °C	Zeit/ s
Initiale Denaturierung	95	30
Denaturierung	95	30
Annealing	55–70	60
Elongation	72	120 –1200
Finale Elongation	72	1200
Lagerung	8	$\infty$

Anschließend wurde das PCR-Produkt mit 1 U bzw. 1  $\mu\text{l}$  des Restriktionsenzyms *Dpn* I für mindestens 3 h bei 37°C verdaut. *Dpn* I ist in der Lage methylierte DNA zu schneiden. So wurde die template-DNA von dem PCR-Produkt entfernt. 10  $\mu\text{l}$  des PCR-Produkts wurden daraufhin nach dem *PCR-Clean-Up*-Protokoll (3.1.12) gereinigt und für die Transformation von *E. coli* verwendet (3.1.2). Nach der DNA-Isolierung (3.1.4) wurde die Mutation durch eine Sanger-Sequenzierung (3.1.10) überprüft.

### 3.1.9 Touchdown-PCR

Die *Touchdown-PCR* wurde genutzt, um zwei komplementäre einzelsträngige Oligonukleotide zu hybridisieren. Hierfür wurden beide Oligonukleotide mit autoklavierten *Aqua bidest.* zu einer Konzentration von 2  $\mu\text{M}$  verdünnt. Je 25  $\mu\text{l}$  der Oligomere wurden im äquivalenten Verhältnis gemischt und zur Zerstörung sekundärer Strukturen im Thermocycler bei 95 °C für 2 min erhitzt. Anschließend wurde die Temperatur schrittweise bis 8 °C erniedrigt (-0,5 °C  $\text{s}^{-1}$ ). Da die Annealing-Temperatur durch den Gradienten nur kurz unterhalb der Denaturierungstemperatur lag, war die Primer-Bindung und damit das Amplifikat höchst spezifisch.

### 3.1.10 Sanger-Sequenzierung

Um die Sequenz von DNA hinsichtlich eingefügter gewollter oder ungewollter Mutationen zu überprüfen, wurde der externe Service der Sanger-Sequenzierung des Instituts für Klinische Molekularbiologie der CAU in Kiel genutzt. Dafür wurden 300 ng DNA mit 1  $\mu\text{l}$  eines geeigneten

## Methoden

Sequenzierungsprimers (4,8  $\mu$ M) zu einer Gesamtmenge von 4  $\mu$ l autoklavierten *Aqua bidest.* gemischt.

Bei der Sanger-Sequenzierung bzw. der Kettenabbruch-Synthese hybridisiert sich ein fluoreszenzmarkiertes 2,3-Didesoxyribonukleosid-5'-triphosphat an die schon bekannte zu sequenzierende DNA. Durch die fehlende 3'-OH Gruppe kann es zu keiner weiteren Kettenverlängerung kommen, sodass es zum Kettenabbruch kommt. Über eine folgende Kapillarelektrophorese können die Größe und damit die Position der DNA-Base bestimmt werden (Sanger *et al.* 1977).

### 3.1.11 Agarosegelelektrophorese

Linearisierte DNA wurde durch ein Agarosegel elektrophoretisch nach ihrer Größe getrennt. Dafür wurde ein 1-2 % (m/V) Agarosegel hergestellt. Zur Herstellung eines 1%-igen Agarosegels wurden 0,5 g Agarose in 50 ml TAE-Puffer unter Aufkochen in einer Mikrowelle gelöst und Verdunstungsverluste mit Wasser ergänzt. Anschließend wurde 1  $\mu$ l DNA-interkalierendes Ethidiumbromid (10 mg ml<sup>-1</sup>) hinzugegeben und die Flüssigkeit wurde zum Aushärten in einen Gelgießstand für eine Flachbett-Elektrophorese gegossen. Nach dem Aushärten des Gels wurde dieses in eine mit TAE gefüllte Elektrophorese-Kammer überführt. Die Proben wurden 1:10 mit Orange G Puffer (10 x) versetzt. Es wurden bis zu 20  $\mu$ l aufgetragen. Als Größenmarker diente *Pst* I verdaute  $\lambda$ -DNA (5  $\mu$ l). Die DNA wurde bei 120 V für 30 - 60 min elektrophoretisch getrennt. Zur Visualisierung wurde das Gel auf einem UV-Tisch bei  $\lambda$  = 366 nm untersucht.

### 3.1.12 Extraktion und Reinigung von DNA aus Agarosegelen

Zur Extraktion und Reinigung von Agarosegelen diente das *HiYield® PCR Clean-up/Gel Extraction Kit*. Nach der elektrophoretischen Trennung (3.1.11) wurde mit Hilfe eines Skalpells die gewünschten DNA-Fragmente unter UV-Licht ( $\lambda$  = 366 nm) aus dem Agarosegel herausgeschnitten. Die DNA wurde unter Verwendung des *Gel-Extraction*-Protokolls isoliert und gereinigt. Die Elution erfolgte mit 10–20  $\mu$ l autoklavierten *Aqua bidest*. Zur Reinigung von PCR-Produkten wurde dasselbe Kit nach dem *PCR-Clean-Up*-Protokoll befolgt. Dabei wurde mit 50  $\mu$ l autoklavierten *Aqua bidest* eluiert.

### 3.1.13 Erstellung einer Ribosomenbindestellen-Datenbank

Zur Erstellung einer Ribosomen-Bindestelle (RBS)-Datenbank wurde der RBS-Rechner nach Salis *et al.* (2009) verwendet. Hierzu wurde zunächst ein Organismus gewählt, die minimale Translations-Initiations-Rate wurde auf 100 und die maximale Translations-Initiations-Rate auf den Maximalwert von 1.000.000 festgelegt. Der RBS-Rechner erstellte im Anschluss eine RBS-Datenbank mit unterschiedlichen Oligonukleotid-Sequenzen. Dafür wurde ein thermodynamisches Model, welches die Initiierung der Translation über die Änderung der Gibbs-Energie der Ribosomen-Bindung an das mRNA-Transkript in Abhängigkeit der Proteinsequenz berechnete, genutzt (Salis 2011)

## 3.2 Allgemeine proteinchemische Methoden

### 3.2.1 Proteinquantifizierung nach Bradford

Um die Konzentration von Proteinen zu bestimmen, wurde der *Bio-Rad Protein-Assay* verwendet. Dafür wurden 2–10 µl der Proteinlösung mit autoklaviertem *Aqua bidest.* zu 800 µl verdünnt und anschließend mit 200 µl des Rotiquant®-Reagenzes gemischt. Die Mischung wurde nach einer 5–60-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur am BioPhotometer bei  $\lambda = 595$  nm in Plastikküvetten vermessen. Als Referenz diente eine Mischung aus 800 µl autoklaviertem *Aqua bidest.* mit einer repräsentativen Menge an Reinigungspuffer und 200 µl des Rotiquant®-Reagenzes. Zuvor wurde eine Kalibrierung mit unterschiedlichen Konzentrationen von Rinderserum-Albumin (BSA) erstellt und vermessen.

### 3.2.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur elektrophoretischen Trennung von Proteinen anhand ihrer Größe wurde die diskontinuierliche SDS-PAGE eingesetzt. Das zugesetzte Natriumdodecylsulfat (*sodium dodecylsulfat*, SDS) diente dabei der Denaturierung der Proteine und der Überladung der Proteine mit einer negativen Ladung.

Es wurde ein Trenngel in die Auftrennungsapparatur gegossen. Anschließend wurde das Gel mit Isopropanol überschichtet. Nach dem Aushärten des Gels wurde der Isopropanol entfernt und das Sammelgel in gleicher Weise hinzugegeben. Es wurde ein Kamm mit zehn bis zwölf Taschen in das noch flüssige Sammelgel gesteckt.

Die Proteinproben wurden 3:1 mit 4x SDS-Ladepuffer versetzt und für 30 min bei 37 °C inkubiert. Neben den Proben wurde 3–5 µl des Größenmarkers *peqGOLD Protein Marker III* in eine Tasche des Gels aufgetragen und elektrophoretisch bei 160–200 V getrennt. Das abgetrennte Trenngel wurde zur Immundetektion (3.2.3), für eine Coomassie-Färbung (3.2.4) oder eine In-Gel-Fluoreszenz (3.2.5) verwendet.

### 3.2.3 Western Blot-Analyse

Der *Trans-Blot SD semi-dry Transfer* von Bio-Rad wurde genutzt, um mit der SDS-PAGE (3.2.2) getrennte Proteine von einem Trenngel auf eine PVDF-Membran zu übertragen, um die Proteine anschließend immunologisch nachzuweisen. Die PVDF-Membran wurde dafür in Methanol für 20–60 s aktiviert. Anschließend wurde die Membran sowie sechs Whatman®-Papieren für mindestens 5 min mit 1x-Transferpuffer benetzt. Es wurde ein Western Blot-Sandwich gebildet, indem drei Whatman®-Papiere, die PVDF-Membran, ein SDS-Trenngel und erneut drei Whatman®-Papiere übereinandergelegt wurden. Der Proteintransfer erfolgte für 1 h bei 17 V.

Die Membran wurde im Anschluss für 1 h bei Raumtemperatur in MTBST-Puffer zum Blockieren unspezifischer Bindungen inkubiert. Dieser Schritt sowie alle weiteren wurden auf einem Wippschüttler oder auf einem Flachbettschüttler durchgeführt. Nach Zugabe eines in 10 ml MTBST

## Methoden

gelösten Primärantikörpers wurde entweder über Nacht bei 4 °C oder für 1,5 h bei Raumtemperatur inkubiert. Als Sekundärantikörper wurde entweder ein *goat anti-mouse* oder ein *goat anti-rabbit* Antikörper für 1–2 h bei Raumtemperatur eingesetzt, welcher mit einer Meerrettich-Peroxidase gekoppelt war. Die Verdünnung der Antikörper erfolgte nach Herstellerangaben zwischen 1:2.000 oder 1:10.000. Nach dem Entfernen der jeweiligen Antikörper wurde jeweils dreimal mit ungefähr 15 ml TBST für 10–15 min bei Raumtemperatur gewaschen. Die Entwicklung erfolgte mit dem *Clarity™ Western ECL Substrate Kit*. Die Chemilumineszenz wurde über den Intas-Chemostar detektiert.

### 3.2.4 Coomassie-Färbung von Proteinen

Zum unspezifischen Nachweis von Proteinen wurde eine Trengel mit der Farbstoff-Lösung Rotiphorese®-Blau-R-Lösung für 1–2 h bei Raumtemperatur auf einem Wippschüttler gefärbt. Der Hintergrund wurde mit Entfärb-Lösung (essigsaurer Ethanol 30 % (V/V)) und *Aqua bidest.* so lange entfärbt, bis spezifische Proteinbanden zu erkennen waren.

### 3.2.5 In-Gel-Fluoreszenz

Zur Visualisierung von In-Gel Floreszenzen wurden die mit der SDS-PAGE (3.2.2) getrennten Proteine auf einen dunklen Hintergrund überführt. Die Detektion erfolgte über den Intas-Chemostar. Die Anregungs- und Emmisionswellenlänge wurde durch einen blauen Filter festgelegt.

### 3.2.6 Entfernung von Imidazol vom Membranprotein über *PD-MidiTrap G-25*-Säulen

Durch die Nickel-Affinitätschromatographie (3.3.3) enthielt das solubilisierte Membranprotein größere Mengen an Imidazol. Zur Abtrennung wurden die Größenausschlusschromatographie-Säulen *PD-MidiTrap G-25* mit einem 5 kDa *cut-off* nach Herstellerangaben benutzt.

### 3.2.7 Protein-Konzentrierung

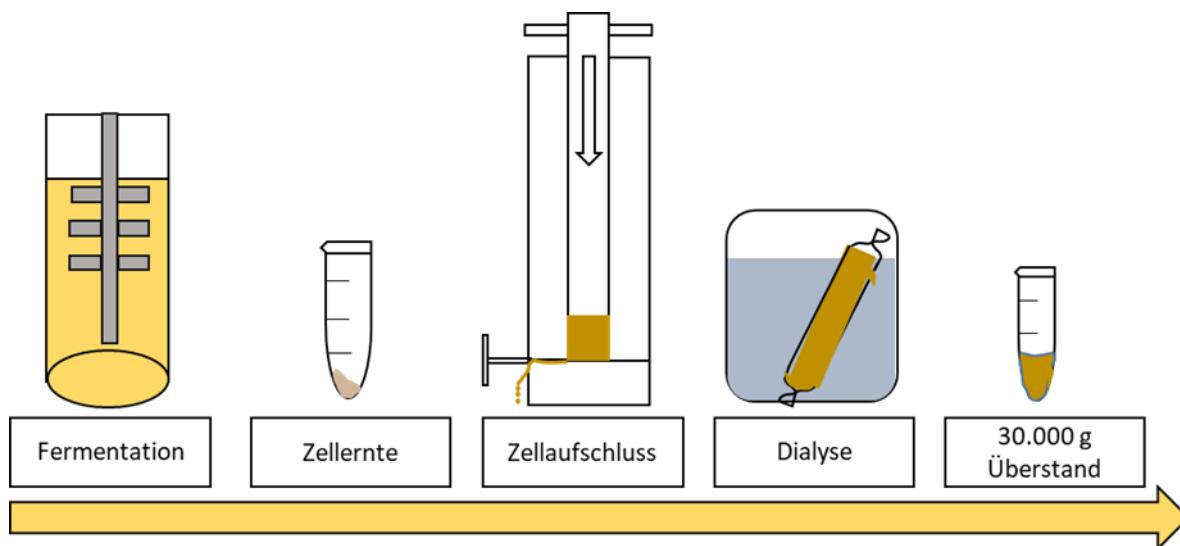
Zellfrei hergestellte Membranproteine wurden mit den Amicon Ultra-4 *Centrifugal Filter Devices* mit einem 30 kDa oder 100 kDa *cut-off* nach Herstellerangaben konzentriert. Um die Integrität des Filters zu gewähren, wurde die Proteinlösung vor der Zentrifugation so verdünnt, dass eine Imidazolkonzentration unter 100 mM erreicht wurde. Wenn das zellfrei hergestellte Protein zur Rekonstitution in Liposomen (3.5.1) verwendet werden sollte, wurde durch weiteres Verdünnen des Proteins mit Detergenshaltigen Reinigungspuffer so lange aufkonzentriert, bis die Imidazolkonzentration unterhalb von 1 mM lag.

### 3.2.8 TCA-Fällung

Stark verdünnte Proteinlösungen wurden durch eine Protein-Präzipitation mit Trichloressigsäure (TCA) aufkonzentriert. Dafür wurden 4 Teile Proteinlösung mit 1 Teil TCA (100 % m/V) gemischt und für 30 min bei 4 °C inkubiert. Im Anschluss wurde 10 min lang bei 4 °C bei 13.000 g zentrifugiert und der Überstand entfernt. Das Pellet wurde dreimal mit 875 µl Aceton gewaschen. Dabei wurde jeweils für 5 min bei 4 °C inkubiert und der Überstand nach einer Zentrifugation bei 4 °C für 5 min und 13.000 g abpipettiert. Um das Aceton vollständig zu entfernen, wurde das offene Reaktionsgefäß für 5 min in einen auf 70 °C temperierten Heizblock getrocknet. Das trockene Pellet wurde in 20 µl PBS-Puffer resuspendiert.

### 3.2.9 Gewinnung von S30-Extrakten aus verschiedenen Bakterien

Für die zellfreie Proteinsynthese sind einige essentielle Komponenten wie Ribosomen, die Aminoacyl-tRNA-Synthethase sowie Transkriptions- und Translationsfaktoren notwendig, die unter anderem durch die Herstellung eines S30-Extrakts gewonnen werden (Schwarz *et al.* 2007a). Bei der Herstellung wurden die Zellen anfangs bis zu einer bestimmten OD<sub>600</sub> vermehrt, durch Zentrifugation geerntet, mit Hilfe von Ultraschall oder eines Hochdruckhomogenisators aufgeschlossen, dialysiert und anschließend zur Gewinnung des Überstands bei 30.000 g zentrifugiert (**Abbildung 3.1**).



**Abbildung 3.1:** Schematische Darstellung der Gewinnung eines S30-Extrakts.

Die S30-Extrakte wurden nach bekannten Protokollen hergestellt (Helmstetter *et al.* 2019; Schwarz *et al.* 2007a). Dafür wurde der gewünschte Bakterien-Stamm auf einem geeigneten Medium bei einer geeigneten Inkubationstemperatur gezüchtet (**Tabelle 3.3**). Einzelne Kolonien wurden in 5 ml flüssiges LB-Medium übertragen und 6–8 h bei den angegebenen Temperaturen und 200 rpm schüttelnd bebrütet. Die Kulturen wurden auf 50 ml LB expandiert und über Nacht bei 200 rpm herangezogen.

Anschließend wurde entweder im kleinen Maßstab aus einer 500 ml Bakterienkultur im 2,5 l Erlenmeyerkolben oder aus einer 5000 ml Bakterienkultur in einem 5-l-Fermenter ein S30-Extrakt

## Methoden

gewonnen. Zur Herstellung des Extrakts im kleinen Maßstab wurde in einem Erlenmeyerkolben 450 ml YTPG-Aminosäuren, 25 ml YTPG-Phosphatpuffer sowie 20 ml YTPG-Glucose-Lösung mit 5 ml der Übernachtkultur kultiviert. Bei Verwendung eines 5-l-Fermenters erfolgte die Fermentation mit 5 l Wachstumsmedium, welches 4,5 l YTPG-Aminosäuren, 0,025 mM Polypropylenglykol 2000, 250 ml YTPG-Phosphatpuffer, 200 ml YTPG-Glucose-Lösung sowie die Übernachtkultur enthielt. Als Inprozesskontrollen wurden während des Fermentationsprozesses der pH-Wert, die Temperatur, die Luftzufuhr sowie die OD<sub>600</sub> gemessen. Die Einstellungsparameter während der Fermentation im Bioreaktor und nach Beendigung der Fermentation sind der Tabelle 3.4 zu entnehmen.

**Tabelle 3.3:** Nährmedien und Inkubationstemperaturen für die Herstellung eines S30-Extrakts aus ausgewählten Bakterien.

Bakterium	Nährmedium	Inkubationstemperatur
<i>Bacillus megaterium</i>	Medium 1	30 °C
<i>Bacillus subtilis</i>	Medium 1	30 °C
<i>E. coli</i> BL21(DE3)	LB-Medium	37 °C
<i>Pseudomonas putida</i> mTK 2240	Medium 1	28 °C
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i>	Medium 92	37 °C

**Tabelle 3.4** Gewählte Parameter für den Fermentationsprozess.

Parameter	Kennwert	
Software	BioPAT® MCFS/DA 3.0	
Kontrolleinheit	Biostat® A plus	
Fermentation	Temperatur	Wachstumsoptimum
	Rotorgeschwindigkeit	900 rpm
	Druck der Luftzufuhr	1,5 bar
	Belüftungsrate	10 vvm
Stopp des Fermentationsprozesses	Temperatur	12 °C
	Rotorgeschwindigkeit	5 rpm
	Druck der Luftzufuhr	1,5 bar
	Belüftungsrate	5 vvm

Das Zellwachstum wurde in der exponentiellen Phase durch 45-minütiges Kühlen in einer Eis-Wasser-NaCl-Mischung gestoppt. Die Zellen wurden durch Zentrifugation bei 4.500 g, 4 °C für 15 min geerntet und dreimal mit Puffer A gewaschen. Die Pellets wurden gewogen und bei -80 °C gelagert. Für den Zellaufschluss wurden die Pellets durch Zugabe von 110 % des Pelletgewichts von Puffer B resuspendiert. Die Lyse erfolgte mit einem French Press Zellaufschlussgerät bei 20.000 psi. Bei Volumina, welche kleiner als 5 ml waren, wurde eine Sonotrode mit zwölf Zyklen (60 s on/off) bei einer Amplitude von 50 % verwendet, wobei die Proben bei dem off-Zyklus auf Eis gelagert wurden. Die S30-Überstände wurden durch Ultrazentrifugation bei 30.000 g, 4 °C für 30 Minuten erzeugt, gefolgt von der Zugabe von NaCl bis zu einer Endkonzentration von 400 mM und Inkubation bei 42 °C für

## Methoden

45 min. Die Suspension wurde bei 4 °C gegen Puffer C dialysiert (14 kDa Cut-off) und bei 30.000 g, 4 °C für 30 min zentrifugiert. Aliquots wurden bei –80 °C gelagert.

### 3.2.10 Gewinnung einer T7-RNA-Polymerase

Für die Transkription bei der zellfreien Proteinsynthese wurde die T7-RNA-Polymerase eingesetzt. Zur Gewinnung der T7-RNA-Polymerase wurde eine Dauerkultur der BL21(DE3) pAR12129 auf einem LB-Amp-Agarplatte kultiviert. Vier einzelne Kolonien wurden je in einem 5 ml LB-Amp-Medium über Nacht bei 37 °C unter Schütteln bei 200 rpm inkubiert. Anschließend wurden 500 ml LB-Amp-Medium mit je einer Vorkultur angeimpft und bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,6-0,8 bei 37 °C und 200 rpm auf einem Wippschüttler kultiviert. Die Expression wurde durch Zugabe von 500 µl 1 M IPTG induziert und für weitere 5 h bei 37 °C und 200 rpm geschüttelt. Die Zellen wurden bei 4 °C für 15 min bei 4500 g geerntet und in 60 ml T7-Puffer resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation unter den vorherigen Bedingungen wurde das Zellpellet bei -80 °C gelagert. Die Zellen wurden auf Eis aufgetaut und mit 30 ml T7-Puffer II resuspendiert. Der Zellaufschluss erfolgte durch dreifache Passage eines *French-Press* bei ungefähr 20.000 psi. Nach Zentrifugation für 30 min bei 4 °C bei 20.000 g wurde der Überstand entnommen und tropfenweise mit Streptomycin-Sulfat zu einer finalen Konzentration von 2 % versetzt. Die DNA wurde durch Zentrifugation bei 30.000 g für 30 min bei 4 °C präzipitiert. Anschließend wurde die DNA mit einer Sepharose Q-Säule über eine Anionenaustauschchromatographie gereinigt. Dafür wurde die Säule erst mit 2 Säulenvolumen T7-Puffer äquilibriert und dann die Probe aufgetragen. Es wurde mit steigendem NaCl-Gradienten von 20-500 mM in T7-Puffer mit dem 21-fachen Säulenvolumen eluiert. Anschließend wurde mit dem dreifachen Säulenvolumen 1 M NaCl-haltigen T7 Puffer und dem dreifachen Säulenvolumen 20 % ethanolhaltigen-haltigen T7 Puffer nachgespült. Es wurden je Elutionsfraktion 15 ml aufgefangen und die einzelnen Fraktionen bei 280 nm mit photometrisch untersucht unter einer Western-Blot-Analytik (3.2.3) unterzogen, indem als Primärantikörper ein T7-RNA-Polymerase-Antikörper eingesetzt wurde. Die Fraktionen mit den höchsten Konzentrationen an T7-RNA-Polymerase wurden vereinigt und mit einem Amicon Ultra-4 *Centrifugal Filter Devices* mit einem 30-kDa-cut-off konzentriert. Die Dialyse erfolgte über Nacht mit 1 l T7-Dialysepuffer durch eine Membran mit 14 kDa cut-off bei 4 °C. Anschließend wurde die T7-RNA-Polymerase mit Glycerol so versetzt dass eine Endkonzentration von 50 % Glycerol erhalten wurde. Nach der Aliquotierung wurde die T7-RNA-Polymerase bei –80 °C gelagert. Die Aktivität der T7-RNA-Polymerase wurde durch den Vergleich mit einer alten Charge über die Synthese von zellfrei hergestelltem mNeonGreen im Ein-Kompartiment-System (3.3.2) überprüft.

## 3.3 Zellfreie Proteinsynthese

Zur *in-vitro*-Herstellung von Proteinen wurde die zellfreie Proteinsynthese verwendet. Die zellfreie Proteinsynthese erfolgte entweder im Ein-Kompartiment- oder im Zwei-Kompartiment System.

### 3.3.1 Zellfreie Proteinsynthese im Zwei-Kompartiment-System

Um größere Mengen an Protein zellfrei zu synthetisieren, wurde das *continuous-exchange-cell-free*-System (CECF) genutzt. Dies ermöglichte den Austausch niedermolekularer Komponenten entlang ihres Konzentrationsgradienten über zwei Kompartimente, die durch eine semipermeable Membran voneinander getrennt waren.

In dem Kompartiment mit dem *reaction mixture* (RM) fand die Transkription und Translation statt. Das zweite Kompartiment enthielt den *feeding mixture* (FM) mit allen niedermolekularen Stoffen. Durch das deutlich höhere Volumen des zweiten Kompartiments (RM:FM = 1:15-17) wurden frische Edukte zur Proteinbiosynthese zur Verfügung gestellt. Inhibierende Nebenprodukte wie Pyrophosphat wurden in gleicher Weise stark verdünnt. Sofern Membranproteine synthetisiert wurden, wurde ein geeignetes Detergens bei der Synthese hinzugefügt. Das zugesetzte Detergens diente der Stabilisierung des Membranproteins. Nachdem alle benötigten Stammlösungen mit Ausnahme der Enzyme auf Eis aufgetaut wurden, wurde ein Mastermix (MM) pipettiert (Tabelle 3.5). Durch Zugabe weiterer Komponenten entstanden der FM und RM.

## Methoden

**Tabelle 3.5:** Pipettierschema für die zellfreie Proteinsynthese.

Komponente	Konzentration der Stammlösung	MM (µl)	FM (µl)	RM (µl)
NaN <sub>3</sub>	10 %	90,0		
PEG 8000	40 %	900		
Kaliumacetat	4,0 M	678,6		
Magnesiumacetat	1,0 M	Variabel		
HEPES/EDTA-Puffer	24x	660		
cComplete™	50x	360		
Folinsäure	10 mg ml <sup>-1</sup>	180	2338	
DTT	0,5 M	72,0		
NTP-Mix	75x	240		
PEP	1,0 M	360		
AcP	1,0 M	360		
Aminosäure-Mix	4,0 mM	2250		
RCWMDE	17 mM	1080		
Brij® 78		960		
Mastermix			variabel	Variabel
S30-Puffer	1x		5950	
Pyruvatkinase	10 mg ml <sup>-1</sup>			8,0
<i>E.coli</i> -tRNA	40 mg ml <sup>-1</sup>			17,5
T7-RNA-Polymerase	350 U µl <sup>-1</sup>			42,9
<i>RiboLock</i> RNase Inhibitor	40 U µl <sup>-1</sup>			7,5
Plasmid-DNA	variabel			Variabel
S30-Extrakt	1x			350,0
<i>Aqua bidest.</i>			ad 17000	ad 1000
Total (µl)		Σ variabel	Σ 17000	Σ 1000

Anmerkung: Das Volumen der Plasmid-DNA war abhängig von der jeweiligen Konzentration der Maxipräparation. Die Zielkonzentration betrug 0,03 mg ml<sup>-1</sup>. Die Mg<sup>2+</sup>-Konzentration betrug je nach Optimum der S30-Extrakt-Charge zwischen 10-14 mM Mg<sup>2+</sup>. MM = Mastermix; FM = *feeding mixture*; RM = *reaction mixture*.

### 3.3.1.1 Zellfreie Proteinsynthese im präparativen Maßstab

Der FM wurde in eine Reaktionskammer, die in der Werkstatt des Pharmazeutischen Instituts hergestellt wurde, vorgelegt. Der RM wurde in eine Dialysekette (10 kDa *cut-off*) mit Hilfe von einer 1- ml Spritze und Kanülen überführt. Anschließend wurde die Dialysekassette in der Reaktionskammer so positioniert, dass die Flüssigkeitsspiegel des FM und des RM in Kontakt zueinander traten.

Die Kammer wurde mit zwei Schrauben verschlossen und für 20–24 h in einem bewegten Wasserbad bei 30 °C inkubiert. Der RM wurde der Dialysekammer entnommen und die Kammer zum Spülen mit 1 ml 1x Reinigungspuffer mit Detergens nachgespült. Nach Vereinigung des RM und der Spülflüssigkeit wurde die Mischung zur abschließenden Proteinfaltung für 1 h auf Eis inkubiert. Das zellfrei

## Methoden

hergestellte Protein wurde entweder direkt weiteren funktionellen Untersuchungen unterzogen oder durch eine Nickel-Affinitätschromatographie (3.3.3) gereinigt.

### 3.3.1.2 Zellfreie Proteinsynthese im analytischen Maßstab

Um die Qualität eines neu hergestellten S30-Extrakts zu überprüfen, wurde die zellfreie Proteinsynthese im kleineren Maßstab (RM = 55 µl, FM = 850 µl) durchgeführt. Weiterhin wurde mit Hilfe der analytischen Testung überprüft, ob verschiedene Detergenzen für die CECF als Zusatz zur Synthese von Membranproteinen geeignet waren (**Tabelle 3.6**).

**Tabelle 3.6:** Verwendete Detergenzen sowie deren kritische Mizell-Konzentration (CMC) und eingesetzte Endkonzentration.

Detergens	CMC (%)	Endkonzentration (%)
Brij 35	0,011	0,2
Brij 58	0,0086	1,5
Brij 78	0,005	1,0
Brij 98	0,0029	0,2
DDM	0,087	0,4

Hierfür wurden selbstgebaute Reaktionsgefäß aus der Werkstatt des Pharmazeutischen Instituts in Anlehnung an das Protokoll von Schneider *et al.* (2010) verwendet (Schneider *et al.* 2010). Es wurde eine mit *Aqua bidest.* benetzte Dialsyemembran (14-kDa-cut-off) auf einen Stempel gespannt und mit einem Teflonring fixiert. Nachdem in eine 24-well-Zellkulturplatte der FM vorgelegt wurde, wurden die Stempel in den FM eingetaucht. Auf die Dialysemembran wurde der RM hinzugegeben. Die Platte wurde mit Parafilm und dem Deckel der Zellkulturplatte verschlossen. Die weiteren Inkubationsschritte erfolgten analog zur Herstellung im präparativen Ansatz.

### 3.3.2 Zellfreie Proteinsynthese im Ein-Kompartiment-System

Die Standardproteinproduktion erfolgte aus 30 ng µl<sup>-1</sup> Plasmid-DNA in 120 mM HEPES-Puffer, pH 8,0, der außerdem 160,7 mM Kaliumacetat, 26,19 mM Lithiumkaliumacetylphosphat, 9,9 mM Magnesiumacetat, 23,96 mM EDTA, 2,62 mM Dithiothreitol und 2,62 % Polyethylenglykol 8000 sowie 15 % (V/V) S30-Extrakt enthielt. Weitere Bestandteile waren Transkriptionsreagenzien (5 U µl<sup>-1</sup> T7 RNA-Polymerase, 0,39 U µl<sup>-1</sup> RiboLock; Nukleotide (9,6 mM ATP, je 6,4 mM von GTP, UTP, CTP), ein Energierückgewinnungssystem (26,19 mM Phosphoenolpyruvat, 0,10 mg ml<sup>-1</sup> Pyruvatkinase), Translationsreagenzien (0,92 mg ml<sup>-1</sup> *E. coli* tRNA-Mischung, 0,13 mg/ml<sup>-1</sup> Folinsäure, 0,50 mM jeder der 20 proteinogenen Aminosäuren sowie 1,31 mM von Arg, Cys, Trp, Met, Asp, Glu), Proteaseinhibitoren (0,07 % Natriumazid und cComplete<sup>TM</sup>). Variationen der zellfreien Standardreaktionsbedingungen während des Optimierungsprozesses sind im Ergebnis-Teil beschrieben. 20 µl der Reaktionsmischung wurden in die Vertiefungen einer 96-well-Platte

## Methoden

(halbflächig, konisch, klarer Boden) mit oder ohne Zugabe von 1  $\mu$ l der Inhibitorlösung gegeben. Kontrollen ohne Zugabe des Inhibitors wurden mit 1  $\mu$ l autoklavierten *Aqua bidest.* versetzt. In Abhängigkeit der Löslichkeit des Inhibitors wurde dieser in autoklaviertem *Aqua bidest.* oder in 21% (V/V) DMSO gelöst, sodass eine Endkonzentration des Inhibitors von 1% (V/V) DMSO erzielt wurde. Die Reaktionen wurden bei 32 °C für 2 h gehalten.

Mit S30-Extrakten aus *S. enterica* und *P. putida* wurden die Reaktionen in 40  $\mu$ l mit 2  $\mu$ l Inhibitor Lösung oder 2  $\mu$ l autoklavierten *Aqua bidest.* (Gesamtvolumen 42  $\mu$ l) für 4 h bei 26 °C (*P. putida*) oder 32 °C (*S. enterica*) durchgeführt. Die Fluoreszenzintensität wurde ( $\lambda_{ex} = 480$  nm,  $\lambda_{em} = 517$  nm) mit einem Fluoreszenz-Imager (ChemoStarIntas) oder einem Plattenlesegerät (TecanReader) gemessen. Die Hintergrundfluoreszenz wurde für jeden Versuch aus Vertiefungen bestimmt, die die vollständige Reaktionsmischung mit Ausnahme der Plasmid-DNA enthielten.

### 3.3.2.1 Datenauswertung und statistische Analyse im Ein-Kompartiment-System

Zur Optimierung der zellfreien Ein-Kompartiment-Reaktionsbedingungen wurde jeder Datenpunkt für einen S30-Extrakt aus *E. coli* aus drei biologischen Präparationen ermittelt und auf die GFP-Fluoreszenzintensität (auf 1 gesetzt) normalisiert, die mit den zuvor etablierten kontinuierlichen Zwei-Kompartiment-Austauschreaktionsbedingungen erhalten wurde.

Für die Berechnung IC<sub>50</sub>-Werte (n = 3) wurden die Fluoreszenzintensitäten als Prozentskala ausgedrückt, wobei die Fluoreszenzintensität der nicht gehemmten Reaktion auf 100 % und die der vollständig gehemmten Reaktion auf 0 % gesetzt wurde (Waloch *et al.* 2020). Zuvor wurde der Hintergrund, welche alle Bestandteile des RM mit Ausnahme der Plasmid-DNA enthielt, von allen Messwerten abgezogen. Die sich ergebenden sigmoidalen Kurven wurden an die Hill-Gleichung mit variabler Steigung mit GraphPad Prism angepasst, um die IC<sub>50</sub>-Werte zu erhalten. Die Fehlerbalken geben den Standardfehler des Mittelwertes (S.E.M.) an.

Zur Evaluierung der Screening-Qualität wurde der z-Faktor nach Zhang *et al.* (1999) berechnet. Dazu wurde folgende Formel verwendet:

$$z = 1 - \frac{3SD(\text{Protein}) - 3SD(\text{Hintergrund})}{\text{Mittelwert}(\text{Protein}) - \text{Mittelwert}(\text{Hintergrund})} \quad (\text{Gleichung 3.3}).$$

SD (Protein) = Standardabweichung des ungehemmten Protein

SD (Hintergrund) = Standardabweichung aus wells ohne codierende Plasmid-DNA

Mittelwert (Protein) = Mittelwert des ungehemmten Protein

Mittelwert (Hintergrund) = Mittelwert aus wells ohne codierende Plasmid-DNA

### 3.3.3 Nickel-Nitrilotriessigsäure- ( $\text{Ni}^{2+}$ -NTA)-Affinitätschromatographie

Die zellfrei synthetisierten Proteine wurden über ihren terminalen  $\text{His}_{10}$ -tag mit Hilfe einer Affinitätschromatographie über eine Nickel-Nitrilotriessigsäure ( $\text{Ni}^{2+}$ -NTA) enthaltende Matrix gereinigt. Das Protein bildete mit dem zweiwertigen Nickel Chelatkomplexe, welche mit steigenden Konzentrationen von Imidazol eluiert wurde (Hengen 1995). Proteinverunreinigungen mit fehlendem poly-His-Tag wurden so abgetrennt. Für die Reinigung wurde bei Membranproteinen ein Reinigungspuffer eingesetzt, der zusätzlich ein Detergens enthielt. Bei löslichen Proteinen wurde auf diesen Zusatz verzichtet.

Für die Reinigung analytischer Ansätze wurden pro 55  $\mu\text{l}$  RM 7,5  $\mu\text{l}$  einer  $\text{Ni}^{2+}$ -NTA-Agarose Matrix als 50%-ige Suspension mit Reinigungspuffer gewaschen und anschließend mit dem RM vereinigt. Die Mischung wurde bei 4 °C rotiert und am nächsten Tag auf Fritten überführt. Es wurde mit dem fünffachen Säulenvolumen an Reinigungspuffer mit 20 mM Imidazol und nach 15 minütiger Inkubation mit dem zehnfachen Säulenvolumen vom Reinigungspuffer, der 300 mM Imidazol enthielt, bei Raumtemperatur eluiert.

Für die Reinigung präparativer Ansätze wurden pro Milliliter RM 150  $\mu\text{l}$  einer  $\text{Ni}^{2+}$ -NTA-Agarose Matrix als 50%-ige Suspension auf eine Fritte gegeben. Die Matrix wurde mehrfach mit dem Reinigungspuffer gewaschen und mit dem RM vereint. Das Gesamtvolumen betrug dabei das Achtfache des RM. Die Mischung wurde über Nacht bei 4 °C rotiert und am nächsten Tag auf eine Fritte überführt. Der Durchfluss sowie alle weiteren Fraktionen wurden bei 4 °C gelagert. Zum Waschen wurde mit dem zwanzigfachen Säulenvolumen und zum Eluieren mit dem fünffachen Säulenvolumen mit Reinigungspuffer bei 4 °C gespült. Der Imidazol-Gradient wurde bei der Reinigung von 20 mM auf bis zu 500 mM schrittweise erhöht. Die Matrix wurde in einem Volumen Reinigungspuffer aufgenommen, das dem fünffachen Säulenvolumen entsprach.

## 3.4 Bestimmung der Minimalen Hemmkonzentration (MHK)

Die MHK wurde mit der Inokulum-Methode wie zuvor beschrieben bestimmt (Andrews 2001). Es wurden die Bakterien über Nacht auf LB-Agarplatten bei 37 °C (*E. coli* und *S. enterica*) oder 28 °C (*P. putida*) gezüchtet. Einzelne Kolonien wurden in 5 ml Iso-Sensitest-Bouillon überführt und bei 37 °C für 6-8 h bei 6 *rpm* bebrütet. Die Trübung der Zellsuspension wurde auf den McFarland-Standard eingestellt. 75  $\mu\text{l}$  der Kultur wurden mit 75  $\mu\text{l}$  der Lösungen der Prüfsubstanz (Endkonzentrationen: 64, 32, 16, 8, 4, 2, 1, 0,5, 0,25 und 0,125  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ) gemischt und bei 37 °C über Nacht in 96-Well-Platten bebrütet (**Abbildung 3.2**). Unbehandelte Kulturen dienten als Kontrollen für ungehemmtes Wachstum. Vertiefungen mit Medien ohne Inokulum wurden zur Überprüfung der Sterilität verwendet.

	Konzentration Antibiotikum/ $\mu\text{g ml}^{-1}$											
	64	32	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125	K	-
Amp	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
Lin	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
Tet	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
Kan	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
Cli	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
Ery	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
Chlo	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○

**Abbildung 3.2:** Pipetierschema zur Bestimmung der MHK. Amp = Ampicillin; Lin = Linezolid; Tet = Tetracyclin; Kan = Kanamycin; Cli = Clindamycin; Ery = Erythromycin; Chlo = Chloramphenicol; K = reines Inokulum; - = well ohne Inokulum.

### 3.5 Präparation und Charakterisierung von Liposomen

Die Präparation von Liposomen diente der funktionellen Charakterisierung von zellfrei synthetisierten Proteinen wie TbAQP2 und PfAQP1. Liposomen, die mit diesem Protein rekonstituiert wurden, werden im Folgenden als Proteoliposomen bezeichnet, während Liposomen ohne Membranprotein die Bezeichnung Leerliposomen tragen.

#### 3.5.1 Herstellung von Liposomen

Es wurde einerseits mit biologischen Lipiden und andererseits mit chemisch, synthetisierten Lipiden gearbeitet. Im weiteren Verlauf der Arbeit werden die Lipide Avanti *E. coli*-Lipidextrakt als *E. coli*-Lipide und die 2-diphytanoyl-sn-glycero-3-phosphocholine als 4Me 16:0 PC-Lipide bezeichnet.

Zur Herstellung von Liposomen wurden 25 mg Lipide Avanti *E. coli*-Lipide oder 4Me 16:0 PC-Lipide bezeichnet werden, in 1 ml Chloroform auf Eis gelöst. Sofern die Lipide biotinilyiert werden sollten, wurden 902  $\mu\text{l}$  der Lipid-Chloroform-Mischung mit 98  $\mu\text{l}$  DSPE-Biotin ( $10 \mu\text{g } \mu\text{l}^{-1}$ ) versetzt, sodass 1% biotinilyierte Lipide erhalten wurden. Die gelösten Lipide wurden mit Stickstoff begast und parallel die Reagenzgläser auf Eis so gedreht, dass sich ein Lipidfilm an der Glasinnenwand bilden konnte. Um Lösungsmittellrückstände vollständig zu entfernen, wurde der Lipidfilm unter Anlegen eines Hausvakuum von – 450 bis – 600 mbar für mindestens 4 h getrocknet. Der getrocknete Lipidfilm wurde nach Zugabe mit 1 ml 20 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol im Liposomenpuffer für 1 h bei Raumtemperatur

## Methoden

inkubiert. Der Lipidfilm wurde danach unter vorsichtigem Vortexen resuspendiert. Die Lipidsuspension wurde aliquotiert (5 mg 200  $\mu$ l<sup>-1</sup>), in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei – 80 °C gelagert.

### 3.5.2 Rekonstitution von Proteinen in Liposomen mit der Verdünnungsmethode

Es wurde ein Aliquot der Liposomen (3.5.1) auf Eis aufgetaut und 20  $\mu$ l Liposomenpuffer (50 mM MES, 50 mM HEPES, 200 mM Saccharose, pH 6,8) hinzugegeben. Die Mischung wurde in Glasgefäß überführt, mit Stickstoff begast und für 90 min im Hot-Spot eines Ultraschallbads (20-25 °C) gestellt. Zur Herstellung von Proteoliposomen wurde 3,3  $\mu$ l 15 % Brij® 78 sowie 100  $\mu$ g des Proteins hinzugegeben. Anschließend wurde der Ansatz mit dem Liposomenpuffer auf 1000  $\mu$ l aufgefüllt und gemischt. Bei den Leerliposomen wurde mit Ausnahme der Zugabe des Proteins in gleicher Weise verfahren. Nach einer 30-minütigen Inkubation wurde die Liposomen-Mischung in ein mit 25 ml Liposomenpuffer befülltes Ultrazentrifugationsrörchen mit einer 21 Gauge-Kanüle injiziert. Dabei wurde die CMC von Brij 78 (0,0005 %) unterschritten, wodurch das Protein aus Detergentsmizelle oder der Detergents-Lipid-Mischmizelle in die Liposomen rekonstituiert wurde. Nachdem für 45-60 min bei 140.000 g bei 4 °C zentrifugiert wurde, wurde das Pellet mit 600  $\mu$ l Liposomenpuffer durch vorsichtiges Vortexen resuspendiert. Um unilammelare Liposomen zu erzeugen, wurden die Liposomen mit dem liposoFast® Extruder durch 21-fache Passage einer 200-nm-Membran extrudiert. Die verschiedenen Präparationen wurden durch Zugabe des Liposomenpuffers auf die gleiche OD<sub>600</sub> eingestellt.

### 3.5.3 Rekonstitution von Proteinen in Liposomen mit Bio-Beads® SM-2

Die Rekonstitution erfolgte in Anlehnung an das Protokoll von Dr. Annika Müller-Lucks, welches eine Abwandlung verschiedener Protokolle darstellte (Kai *et al.* 2010; Verdoucq *et al.* 2008). Die Liposomen-Mischung (3.5.1) wurde auf Eis aufgetaut und zur Destabilisierung der Liposomen mit 0,5 % Triton™ X-100 versetzt, sodass die Mischung klar wurde. Es wurden 250  $\mu$ g Protein hinzugegeben und für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Detergenzen wurden durch Zugabe von 2-mal 200 mg zuvor aktiverter Bio-Beads® SM-2 entfernt. Es wurde über Nacht und anschließend für wenige Stunden bei 4 °C inkubiert. Die Liposomen wurden durch eine 200 nm Membran extrudiert.

### 3.5.4 Dichtegradientenzentrifugation

Um zu überprüfen, dass die Proteine in den Liposomen rekonstituiert wurden, wurden mit Hilfe von verschiedenen Saccharose-Gradienten die Proteoliposomen einer Zentrifugation unterzogen.

Zunächst wurden 350  $\mu$ l 60 % Saccharose in Zentrifugationsrörchen (*Seton open-top centrifuge tubes polyclear®*, 11 x 60 mm) vorgelegt und mit 350  $\mu$ l Liposomen gemischt. Anschließend wurde durch ein auf der Oberfläche platziertes Korkstück je 700  $\mu$ l Saccharose-Lösung mit absteigender Konzentration (25 %, 20 %, 15 %, 5 % und 0 %) aufeinander geschichtet. Das Korkstück wurde entfernt und die Gefäße mit 0 % Saccharose-Lösung untereinander austariert. Nach der Zentrifugation bei 164.000 g für 6 h bei 4 °C in einem Swinging-Rotor (Beckmann™ SW60Ti, Serie E16601) wurden die einzelnen Schichten in 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Nach der Dichtegradientenzentrifugation wurde die

## Methoden

einzelnen Schichten einer TCA-Fällung (3.2.8) sowie der SDS-PAGE (3.2.2) und einem Western-Blot (3.2.3) unterzogen.

### 3.5.5 Lichtstremessungen mit der *stopped-flow*-Apparatur

Die *stopped-flow*-Methode bzw. flussunterbrechende Analyse diente der Bestimmung der Transportrate und -kapazität von Proteoliposomen. Dabei wurde das Schrumpf- und Schwellverhalten von Liposomen gegenüber einem hyperosmotischen Gradienten über die 90°-Streulichtänderung untersucht.

Die Liposomenpräparation (3.5.2, 3.5.3) wurde mit einer Gradientenmischung, die neben den Pufferbestandteilen zusätzlich ein Substrat für die Kanalproteine enthielt, im Verhältnis 1:1 gemischt und unter den beschriebenen Messbedingungen in **Tabelle 3.7** vermessen. Der Gradient bestand aus 20mM bis 200 mM Glycerol, Erythritol, Ribitol oder Sorbitol. Die Lichtstreuung verhielt sich dabei antiproportional zur Größe der Liposomen.

**Tabelle 3.7:** Einstellungsparamater der *stopped flow*-Apparatur.

Parameter	Kennwert
Xe/Hg-Bogenlampe	100 W
Monochromator	524 nm
Output-Filter	300 µs
Photomultiplier	400 x V
Temperatur der Messküvette	20 °C
Injectivolumen	100–150 µl
Mischungsverhältnis	1:1
Injectionsgeschwindigkeit	14–16 ml s <sup>-1</sup>
Erwartete Totzeit	1 ms
Anzahl Datenpunkt	8000
Messdauer	10-80 s

### Auswertung der Kurven

Mit Hilfe der *stopped-flow*-Methode wurde das Streulichtsignal in Abhängigkeit der Zeit gemessen. Die aufgenommenen Kurven wurden mit Hilfe der Software Bio-Kine32® V4.74.2 ausgewertet, indem 4–9 Kurven gemittelt und anschließend normiert wurden. Für die Normierung wurde der Startpunkt auf den Koordinatenursprung verschoben und die Kurve durch Multiplikation eines Faktors auf den Maximalwert von 1 gestaucht oder gestreckt. Der Verlauf der aufgenommenen Kurven wurde nach folgender Kurve beschrieben:

$$y = at + b - c_w e^{d_w t} + c_{sol} e^{-d_{sol} t} \quad (\text{Gleichung 3.4}).$$

## Methoden

a: Steigung der Geraden

t: Messzeit

b: Streulichtsintensitätswert nach unendlicher Messzeit

$c_w$ : Amplitude des Wasserausstroms

$d_w$ : Ratenkonstante des Wasserausstroms

$C_{sol}$ : Amplitude des Soluteinstroms

$d_{sol}$ : Ratenkonstante des Soluteinstroms

Der Soluteinstrom wurde durch die 1. Ableitung des zweiten Terms isoliert betrachtet:

$$y = c_{sol} * e^{-d_{sol}t} \quad (\text{Gleichung 3.5}),$$

$$y' = -d_{sol} * c_{sol} * e^{-d_{sol}t} \quad (\text{Gleichung 3.6}).$$

Bei  $t=0$  entsprach der Wert der initialen Ratenkonstante des Soluteinstroms  $k_{sol}$ :

$$k_{sol} = |-d_{sol} * c_{sol}| \quad (\text{Gleichung 3.7}).$$

Die Werte für  $c_{sol}$  und  $d_{sol}$  wurden über die Fittingfunktion entnommen.

Die Differenz aus der Transportrate der Proteoliposomen mit den Leerliposomen beschrieb die Transportrate des Soluts:

$$k_{solut} = k_{sol}(\text{Proteoliposomen}) - k_{sol}(\text{Leerliposomen}) \quad (\text{Gleichung 3.8}).$$

## 3.6 Bio-Layer-Interferometrie

Die Bio-Layer-Interferometrie (BLI) wurde genutzt, um das hyperosmotische Schwellverhalten von Proteoliposomen und Leerliposomen zu untersuchen. Es wurde mit Streptavidin- und, Super-Streptavidin-Sensoren, welche eine starke nicht kovalente Interaktion zu Biotin ausbilden (Livnah *et al.* 1993), sowie Penta-His-Sensoren gearbeitet.

Die Sensoren wurden zur Entfernung der Saccharose-Schicht vor der Nutzung 30 min lang im Liposomenpuffer gelagert. In die Vertiefungen der 96-well-Plate wurden 200  $\mu\text{l}$  Puffer oder Probe hinzugegeben. Die Sensoren wurden mit Liposomenpuffer für 1200 s gewaschen. Es folgte die Beladung der Sensoren für 1000 s sowie die Equilibrierung der beladenen Sensoren für 1400 s. Die Beladung erfolgte mit biotinilylierten Proteo- und Leerliposomen (3.5.1-3.5.2). Die beladenen Sensoren wurden in unterschiedlichen Messpuffern eingetaucht und die nm-Verschiebung gegen die Zeit detektiert. Die Messung erfolgte bei Raumtemperatur. Die Platten wurden durchgängig bei 1000 rpm geschüttelt.

## Methoden

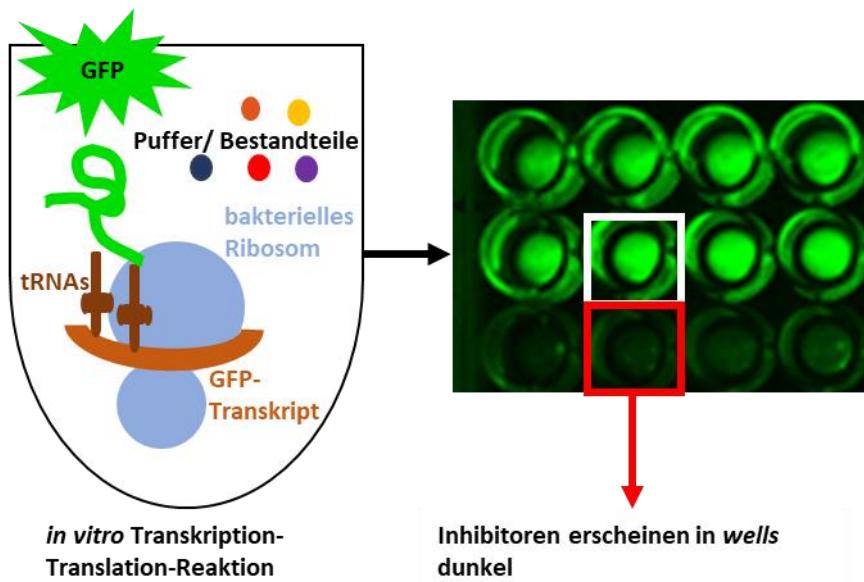
Für die Auswertung der aufgenommenen Kurven wurden vor jedem Beladungs-Schritt oder der Interaktion der beladenen Liposomen-Sensoren mit einem Messpuffer eine Basislinie aufgenommen. Die dargestellten Kurven wurden anschließend auf den letzten Messpunkt der Basislinie normiert, indem der letzte Datenpunkt von allen Messwerten subtrahiert wurde. Da es zu einem Anstieg der nm-Verschiebung kam, wenn der Sensor von einem *well* zum nächsten *well* überführt wurde, wurde diese nm-Verschiebung ebenfalls subtrahiert.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Zellfreie Produktion von fluoreszierenden Proteinen für die Entdeckung neuer gegen Ribosomen-gerichteter Antibiotika

Die zunehmende Resistenzentwicklung von Bakterien gegenüber Antibiotika führt zu einem Mangel an therapeutisch wirksamen Antibiotika. Aus diesem Grund hat die Entwicklung neuer *Screening*-Methoden zur Entdeckung neuer antibakterieller Wirkstoffe eine hohe Priorität. (Lewis 2020; Osterman *et al.* 2016).

In der Arbeitsgruppe war ein Zwei-Kompartiment-System für die zellfreie Proteinsynthese unter Verwendung eines ribosomalen S30-Extrakts aus *E. coli* gut etabliert (Florio *et al.* 2022; Hajek *et al.* 2019; Helmstetter *et al.* 2019; Holm-Bertelsen *et al.* 2016; Müller-Lucks *et al.* 2012; Pfeifer *et al.* 2021). Dieses System war auf längere Reaktionszeiten und damit eine höhere Proteinausbeute ausgelegt. Für *Screening*-Zwecke ist jedoch keine Maximierung der Ausbeute notwendig. Stattdessen stehen ein einfacherer Aufbau und kürzere Reaktionszeiten im Vordergrund. Daher war ein Ziel dieser Arbeit, das etablierte System an ein Ein-Kompartiment-System für die Verwendung in einer Multi-well-Platte anzupassen. Da bei erfolgreicher zellfreier Produktion von GFP die Fluoreszenz bereits innerhalb von 0,5–2 h nachweisbar ist (Schwarz *et al.* 2007a), wurde dies als Grundlage für ein Ribosomen-Inhibitor-*Screening* verwendet. Bei Inhibition der ribosomalen Proteinbiosynthese sollte eine reduzierte bis keine GFP-Fluoreszenz messbar sein (**Abbildung 4.1**).

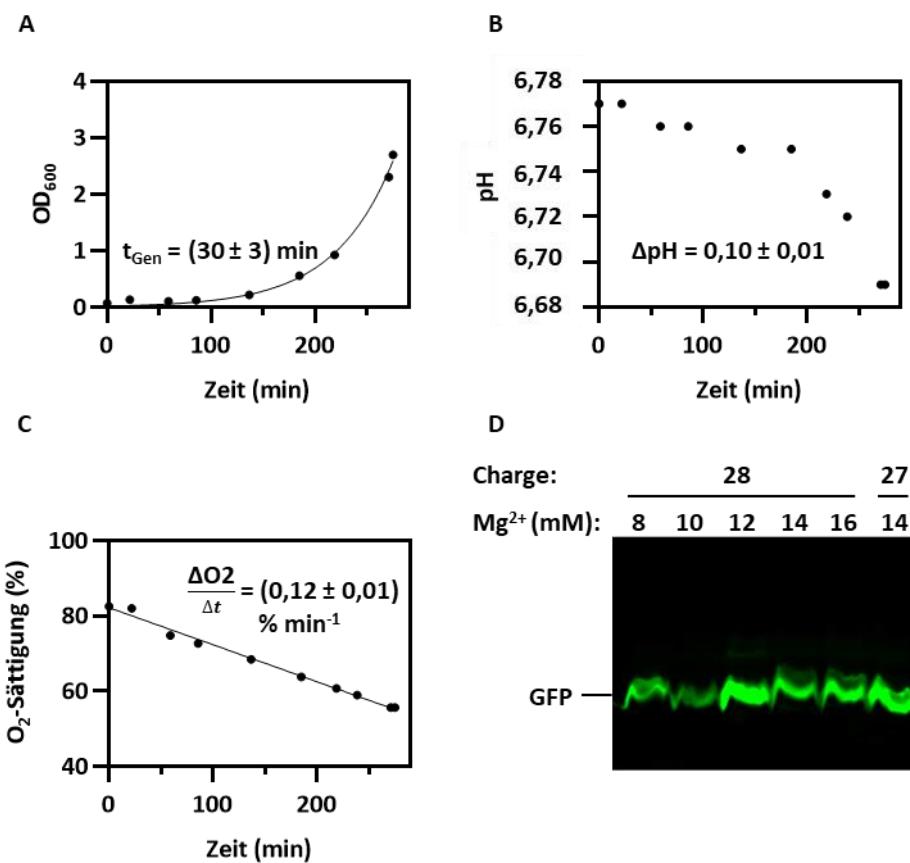


**Abbildung 4.1:** Prinzip einer *in vitro*-*Screening*-Plattform unter Verwendung eines bakteriellen S30-Ribosomenextrakts für die Translation von fluoreszierenden Proteinen, z. B. GFP. Die Reaktion wird in einem Ein-Kompartiment-System durchgeführt, das alle Komponenten für eine gekoppelte Transkription und Translation enthält (links). Die Fluoreszenz wird innerhalb von zwei Stunde im *Multi-well*-Format nachgewiesen (rechts). Substanzen, die zielgerichtet die Translation inhibieren, führen zu einer reduzierten Fluoreszenz (dunkle wells).

#### 4.1.1 Herstellung und Qualität eines ribosomalen Extrakts aus *E. coli*

Zunächst wurde ein S30-Extrakt aus einer 5-l-Kultur von *E. coli* des Stammes BL21(DE3) gewonnen (3.2.9). Die Fermentation wurde anhand von Inprozesskontrollen überwacht (**Abbildung 4.2 A-C**). Dabei wurde über fünf unabhängige Fermentationsprozessen unter Mitarbeit von verschiedenen Personen eine Generationszeit in der exponentiellen Phase von  $30 \pm 3$  min gemessen.

Weiterhin säuerte sich das Medium um  $0,10 \pm 0,01$  pH-Einheiten leicht an. Während der Fermentation nahm die  $O_2$ -Sättigung kontinuierlich um  $0,12 \pm 0,01$  % min $^{-1}$  ab. Der Fermentationsprozess wurde in der exponentiellen Wachstumsphase durch Kühlen auf Eis gestoppt. Anschließend wurden die Zellen geerntet und gewaschen. Es wurden feuchte Pellets von  $28,0 \pm 2,0$  g erhalten, aus denen final ungefähr 15 ml S30-Extrakt gewonnen wurden.



**Abbildung 4.2:** In-Prozess Kontrollen bei der Herstellung eines S30-Extrakts aus *E. coli*. **A.** In der exponentiellen Wachstumsphase verdoppelten sich die BL21(DE3) Zellen alle 30 min. **B.** Das Medium wurde während der Fermentation angesäuert. **C.** Die O<sub>2</sub>-Sättigung sank kontinuierlich während des Prozesses. Die dargestellten Daten stammen aus der Charge mit der Nummer 26. Die Generationszeit, die Änderung des pH-Werts sowie der O<sub>2</sub>-Sättigung wurden als arithmetisches Mittel  $\pm$  S.E.M. aus fünf unterschiedlichen Fermentationsprozessen berechnet. **D.** In-Gel Fluoreszenz von GFP (Belichtungsdauer 2,7 s) zur Überprüfung der Qualität einer neu hergestellten S30-Extrakt-Charge sowie zur Bestimmung der optimalen Mg<sup>2+</sup>-Konzentration.

## Ergebnisse

Die Qualität und Eignung einer neuen S30-Extrakt Charge wurde unter Verwendung des Fluoreszenzproteins GFP im Vergleich zu einer älteren Charge bestimmt. (**Abbildung 4.2 D**) Dabei wurden verschiedene  $Mg^{2+}$ -Konzentrationen getestet, da der optimale Konzentrationsbereich einerseits sehr eng ist und andererseits besonders kritisch ist (Schwarz *et al.* 2007a). Die fünf hergestellten Chargen zeigten dabei jeweils ihr Optimum in dem von Schwarz *et al.* (2007) beschriebenen Konzentrationsbereich bei 10–14 mM  $Mg^{2+}$ . Weiterhin wurde eine kontinuierliche Abnahme älterer Chargen hinsichtlich ihrer Aktivität über die Lagerungszeit festgestellt. Es wurde festgestellt, dass die Gewinnung eines S30 Extrakts aus *E. coli* robust und gut kontrollierbar ist.

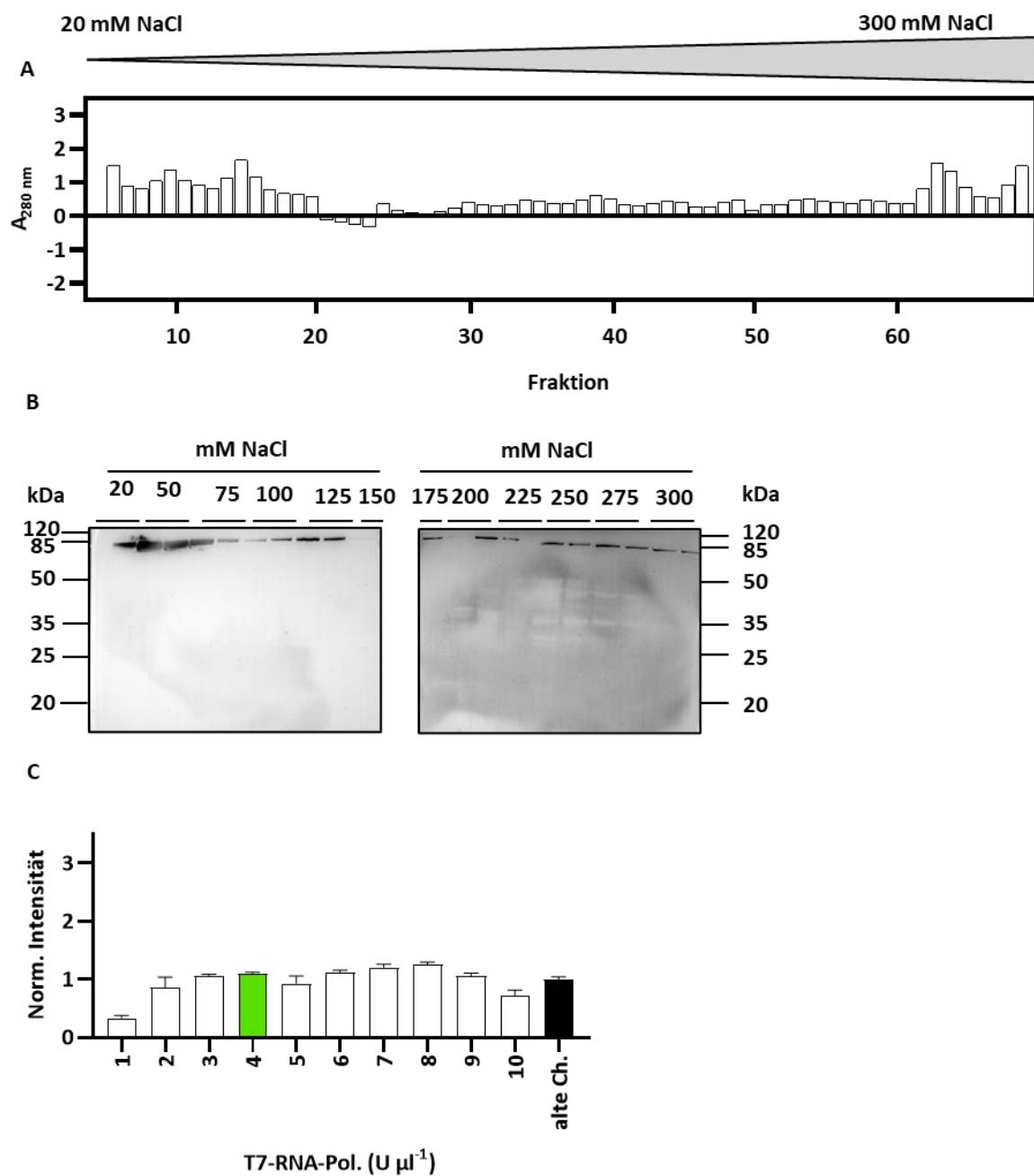
### 4.1.2 Herstellung und Qualität der T7-RNA-Polymerase aus *E. coli*

Die T7-RNA-Polymerase wurde in Anlehnung an Schwarz *et al.* (2007a), wie in Kapitel 3.2.10. beschrieben, hergestellt. Die Fraktionen der Anionenaustauschchromatographie wurden hinsichtlich ihres Proteingehalts durch Messung der Absorption bei 280 nm untersucht (**Abbildung 4.3.A**). Dabei wurde zu Beginn der Reinigung zwischen den Fraktionen 6 bis 15 ein besonders hoher Proteingehalt nachgewiesen, was auf mögliche Verunreinigungen, welche zuerst eluieren, hindeuten könnte. Weiterhin wurde ein hoher Proteingehalt von  $A = 0,2\text{--}1,0$  über fast alle Fraktionen beobachtet.

Die Elution der T7-RNA-Polymerase wurde bei einem Gradienten zwischen 150 bis 250 mM NaCl erwartet (Schwarz *et al.* 2007a), was den Fraktionen 26 bis 50 entsprach. Zur Überprüfung der Elution der T7-RNA-Polymerase wurden die Proteinbestandteile der einzelnen Fraktionen mit Hilfe einer SDS-PAGE (3.2.2) voneinander getrennt und mit Hilfe eines Western-Blots mit anschließender Chemilumineszenz-Reaktion (3.2.3) untersucht (**Abbildung 4.3.B**). Die erfolgreiche Herstellung der T7-RNA-Polymerase, welche eine theoretische Größe von 99 kDa aufweist (Tsuji *et al.* 2021) wurde unter Verwendung eines  $\alpha$ -T7-RNA-Polymerase-Antikörpers auf einer Höhe von ungefähr 85 bis 120 kDa nachgewiesen. Weiterhin wurde die T7-RNA-Polymerase in fast allen Fraktionen nachgewiesen. Es wurden die Fraktionen 33 bis 53 vereinigt, sodass ein finales Volumen von ungefähr 15 ml (V/V) erhalten wurde. Das gewonnene Volumen reicht für ungefähr 200 RM-Ansätze der zellfreien Proteinsynthese im präparativen Ansatz (3.3) aus.

Weiterhin wurde die Aktivität der T7-RNA-Polymerase im Ein-Kompartiment-System untersucht, indem das Fluoreszenzprotein GFP nach zellfreier Herstellung quantifiziert wurde. Als Vergleich diente eine ältere Charge, welche von Dr. Folknand Helmstetter hergestellt wurde und über weite Teile dieser Arbeit ebenfalls genutzt wurde (**Abbildung 4.3.C**). Trotz mehrjähriger Lagerung der älteren Vergleichscharge wurden keine großen Unterschiede in der Aktivität der Polymerase im Vergleich zur neu hergestellten Charge festgestellt. Weiterhin wurden über einen weiten Konzentrationsbereich von 2–9 U  $\mu\text{l}^{-1}$  keine großen Unterschiede in der Aktivität der T7-RNA-Polymerase festgestellt. Dies deckt sich auch gut damit, dass auch unter Schwarz *et al.* (2007a) kein enger Konzentrationsbereich angegeben ist. Um für weitere Untersuchungen ressourcen-schonend die T7-RNA-Polymerase einzusetzen, wurde bei Verwendung der neu hergestellten Charge mit einer Aktivität von 4 U  $\cdot \mu\text{l}^{-1}$  gearbeitet.

## Ergebnisse



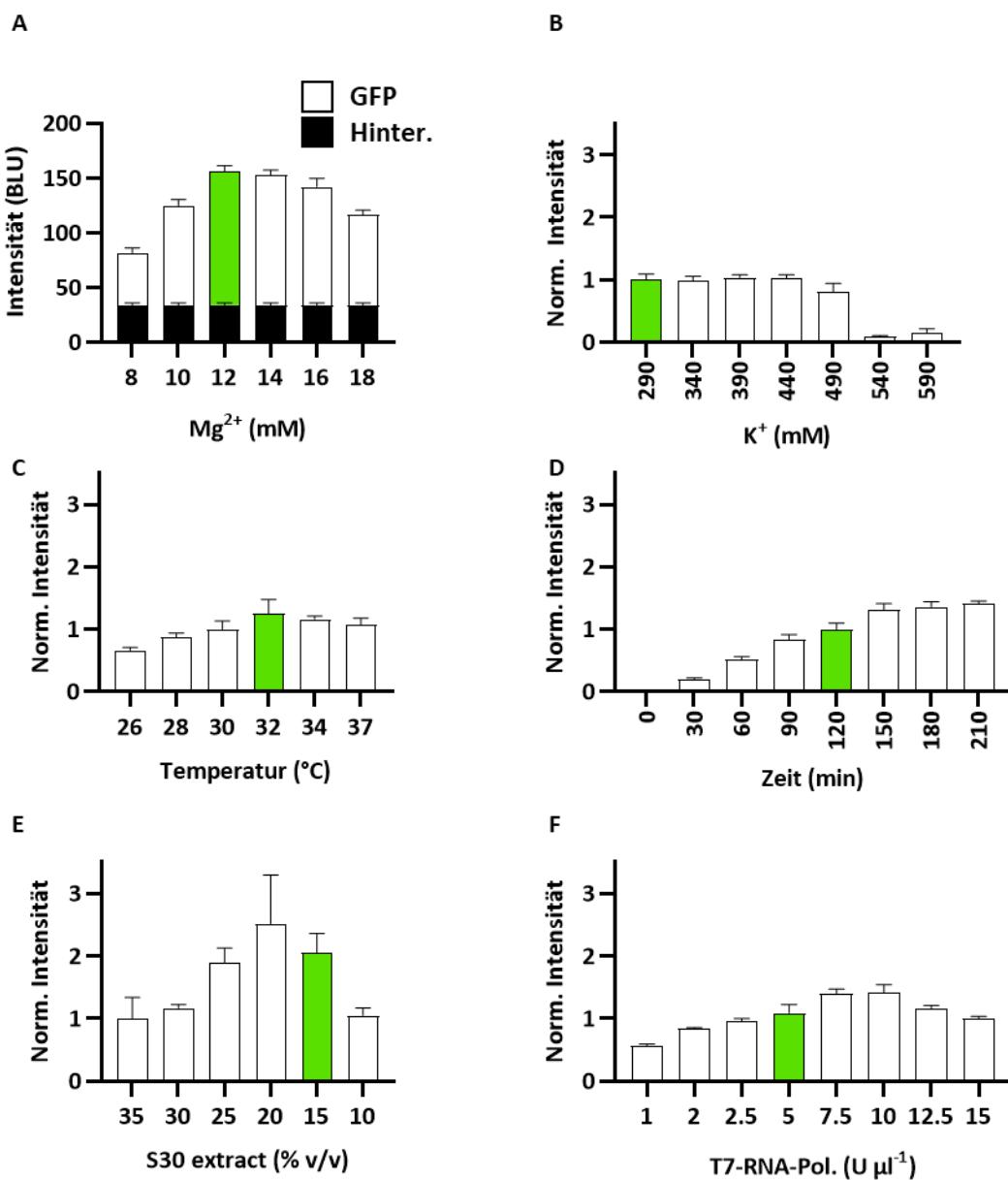
**Abbildung 4.3:** Herstellung einer T7-RNA-Polymerase aus *E. coli*. **A.** Absorption bei 280 nm der einzelnen Elutionsfraktionen mit steigendem NaCl-Gradienten. **B.** Western Blot einzelner Elutionsfraktionen unter Verwendung eines Anti-T7-RNA-Polymerase-Antikörpers. **C.** Screening unterschiedlicher T7-RNA-Polymerase Aktivitäten mit Hilfe von GFP im Vergleich zu einer älteren Charge (schwarz), welche eine optimale Aktivität bei  $4 \text{ U } \mu\text{l}^{-1}$  zeigte. Die optimale Aktivität der neuen Charge ist in hellgrün dargestellt. Die normalisierte Intensität wurde als arithmetisches Mittel  $\pm$  S.E.M. aus drei technischen Replikaten berechnet.

#### **4.1.3 Optimierung eines auf *E. coli* basierenden zellfreien Transkriptions-Translationssystems mit einem Ein-Kompartiment-System**

Zur Erhöhung der Proteinausbeute und Optimierung des Ein-Kompartiment-Systems wurden die Konzentrationen der kritischen Reaktionskomponenten variiert, wobei die etablierten Bedingungen des Zwei-Kompartimenten-Systems mit kontinuierlichem Austausch als Ausgangspunkt verwendet wurden (12 mM Mg<sup>2+</sup>, 290 mM K<sup>+</sup>, 30 °C, 15 U  $\mu$ l<sup>-1</sup> T7-Polymerase, 35 % S30-Extrakt). Zum Auslesen wurde GFP in 96-well-Platten mit 20  $\mu$ l Reaktionsvolumen über 2 Stunden produziert.

Die hintergrundkorrigierten Fluoreszenzintensitäten wurden auf die Intensität normalisiert, die mit den Standardreaktionsbedingungen für kontinuierlichen Austausch erhalten wurde. Zunächst wurde die Mg<sup>2+</sup>-Konzentration angepasst, da ihr optimaler Arbeitsbereich besonders eng ist (Schwarz *et al.* 2007b). Hier erreichte die GFP-Fluoreszenz ihren Höhepunkt bei 12 mM Mg<sup>2+</sup>, was ein Signal-zu-Hintergrundverhältnis von 4,8 ergab (**Abbildung 4.4 A**). Es wurde die Mg<sup>2+</sup>-Konzentration konstant bei 12 mM gehalten und die K<sup>+</sup>-Konzentration variiert (**Abbildung 4.4 B**). Da die Fluoreszenzintensität bis zu 440 mM konstant blieb, wurde die ursprüngliche K<sup>+</sup>-Konzentration von 290 mM beibehalten. Eine Reaktionstemperatur von 32 °C erwies sich als am besten geeignet (**Abbildung 4.4 C**). Es wurde bereits früher beobachtet, dass die Proteinproduktion in einem einzelnen Kompartiment in der Regel innerhalb von 30-120 min endet, da der Nährstoffaustausch und die Abfallproduktion als limitierende Faktoren fehlen (Schwarz *et al.* 2007a). Unter den beschriebenen Bedingungen wurde die Produktion von GFP und die Bildung des Fluorophors über 150 Minuten aufrechterhalten (**Abbildung 4.4 D**). Um die Versuchsdauer so kurz wie möglich zu halten, wurde entschieden die Inkubation nach 120 Minuten zu beenden, da bereits eine ausreichende Fluoreszenzintensität vorlag. Schließlich wurden die Konzentrationen des S30-Extrakts und der T7-RNA-Polymerase in der Reaktion angepasst (**Abbildung 4.4 E-F**). Um den Verbrauch dieser wertvollen Komponenten so gering wie möglich zu halten, wurden für die folgenden Assays Konzentrationen von 15 % (V/V) S30-Extrakt und 5 U  $\mu$ l<sup>-1</sup> T7-RNA-Polymerase gewählt.

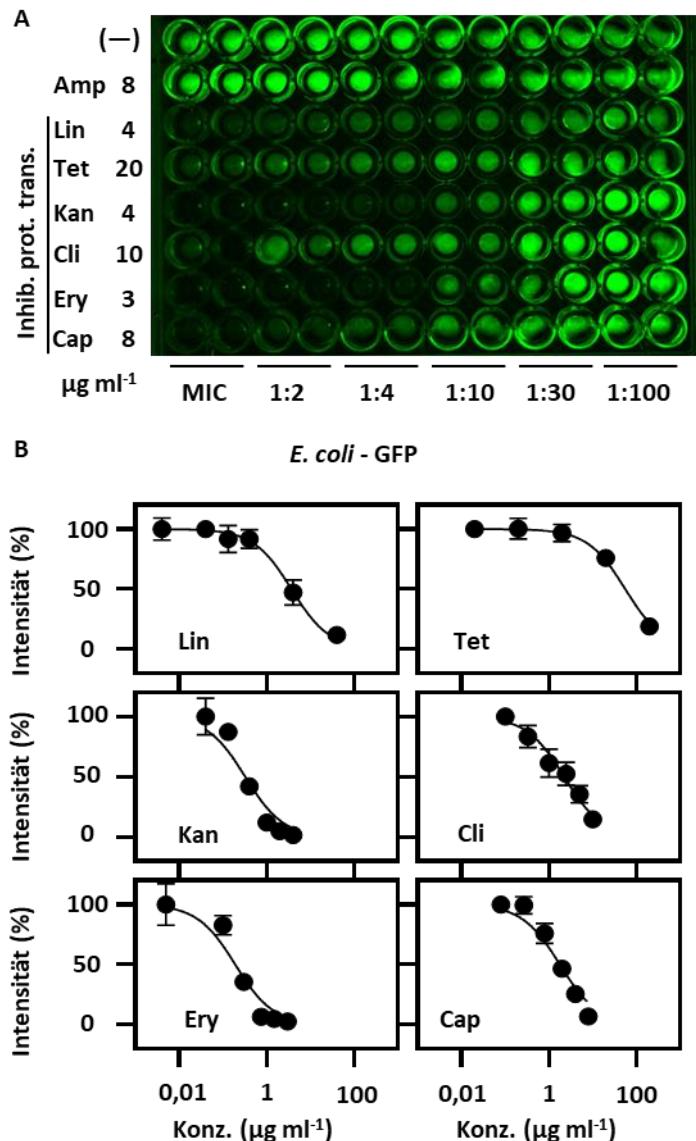
## Ergebnisse



**Abbildung 4.4:** Optimierung der zellfreien GFP-Produktion für die Verwendung in einem Ein-Kompartiment-System. Angepasste Parameter waren: **A.** Mg<sup>2+</sup>-Konzentration, **B.** K<sup>+</sup>-Konzentration, **C.** Reaktionstemperatur, **D.** Inkubationszeit, **E.** Menge des S30-Ribosomenextrakts und **F.** Menge der T7-Polymerase. Die Fluoreszenzintensität wird als beliebige bildgebende Lichteinheiten (BLU) (**A**) oder als relative, hintergrundkorrigierte Intensität angegeben, die auf die mit den ursprünglichen Reaktionsbedingungen erreichte, Intensität normalisiert ist (**B-F**). Die Hintergrundfluoreszenz wurde aus *wells* ohne GFP-kodierende Plasmid-DNA ermittelt und (**B-F**) abgezogen. Die grünen Balken zeigen die für die Inhibitor-*Screening*-Experimente gewählten Bedingungen an. Die dargestellten Daten wurden als arithmetisches Mittel  $\pm$  S.E.M. aus drei unter Verwendung von drei unterschiedlichen S30-Extrakt-Chargen.

#### 4.1.4 Konzeptnachweis: Reduzierte GFP-Fluoreszenz als Marker für eine Translationshemmung

Unter Verwendung der optimierten Reaktionsbedingungen für die zellfreie GFP-Synthese (**Abbildung 4.4**, grüne Balken) wurde die Dosis-Wirkungsbeziehung bekannter Antibiotika auf die erzielte Fluoreszenzintensität untersucht (**Abbildung 4.5 A**).



**Abbildung 4.5:** Hemmung der Translation von *E. coli*-Ribosomen mit GFP-Fluoreszenz-Auslesung im Multi-well-Format. **A.** Wirkung von Antibiotika auf die zellfreie GFP-Produktion. Die Verbindungen (Amp, Ampicillin; Lin, Linezolid; Tet, Tetracyclin; Kan, Kanamycin; Cli, Clindamycin; Ery, Erythromycin; Cap, Chloramphenicol) wurden den Reaktionen in seriellen Verdünnungen ab der MHK zugesetzt. Unbehandelte Vertiefungen (—) dienten als Kontrollen für nicht gehemmtes Wachstum. **B.** Konzentrationsabhängige Dosis-Wirkungsbeziehung der Fluoreszenzintensität. Die Daten wurden an sigmoidale Hill-Gleichungen angepasst, um die IC<sub>50</sub>-Werte zu bestimmen (siehe **Tabelle 4.3**). Die Kurven stammen aus drei unabhängigen biologischen Experimenten. Die dargestellten Kurven wurden als arithmetisches Mittel  $\pm$  S.E.M. aus drei unterschiedlichen Fermentationsprozessen berechnet.

## Ergebnisse

Der S30-Extrakt aus *E. coli* ist repräsentativ für die Bakterienklasse der *Enterobacteriaceae* und bietet daher einen Wert, der über den reinen Nachweis des Konzepts hinausgeht. Zu den Reaktionen wurden serielle Verdünnungen der Antibiotika zugegeben, beginnend mit der minimalen Hemmkonzentration (MHK), die klassisch durch Vergleich der Trübung von flüssigen Bakterienkulturen bestimmt wurde (3.4). Die erhaltenen MHKs stimmten mit früher veröffentlichten Daten überein (Fyfe *et al.* 2012). Die Inkubation mit Ampicillin, einem  $\beta$ -Lactam-Antibiotikum, das unabhängig von den Ribosomen auf die bakterielle Zellwandbiosynthese wirkt, diente als Kontrolle. Ampicillin zeigte erwartungsgemäß über den gesamten getesteten Konzentrationsbereich keine Auswirkung auf das Fluoreszenzsignal und lieferte die gleichen Intensitäten wie die ungehemmten Reaktionsgefäß (Abbildung 4.5 A). Die verschiedenen verbleibenden translational wirkenden Antibiotika unterdrückten jedoch die GFP-Fluoreszenz bei der MHK vollständig (Abbildung 4.5 A). Dies zeigt, dass der Assay prinzipiell für das Screening geeignet ist. Außerdem folgte die Dosis-Wirkungsbeziehung der getesteten Antibiotika auf die Fluoreszenzintensität einer sigmoidalen Hill-Funktionen (Abbildung 4.5 B), so dass aus den angepassten Kurven  $IC_{50}$ -Werte bestimmen wurden. Die erhaltenen Daten sind in Tabelle 4.3 zusammengefasst.

### 4.1.5 Gewinnung eines ribosomalen Extrakts auf Basis aus *B. subtilis*

Im nächsten Schritt sollten Spezies wichtiger multiresistenter Bakteriengattungen mit einbezogen werden. Zu Beginn wurde versucht das grampositive Bakterium *Bacillus subtilis* aus der Familie der Bacillaceae mit einzubeziehen. Zur Extraktion eines S30-Extrakt aus *B. subtilis* wurde das Protokoll nach Kelwick *et al.* (2016) gewählt, bei welchem eine 500 ml *B. subtilis*-Bakterienkultur im Erlenmeyerkolben bei 30 °C bis zu einer  $OD_{600}$  von 3 inkubiert wurde. Erlenmeyerkolben bieten eine Alternative zu Bioreaktoren und finden auch eine breite Anwendung bei der Gewinnung von S30-Extrakten aus *E. coli* (Caschera *et al.* 2014; Kim *et al.* 2006; Sun *et al.* 2013; Yang *et al.* 2012).

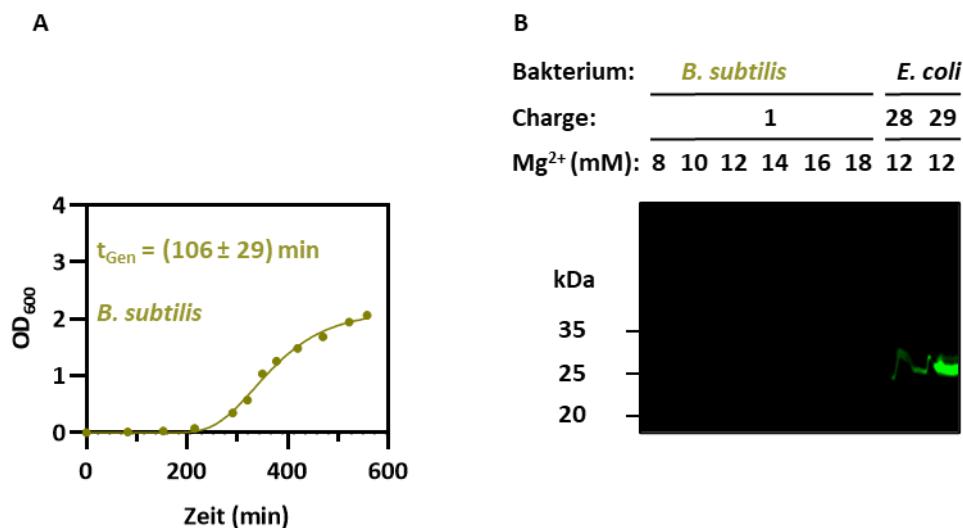
Unter den zuvor genannten Wachstumsbedingungen befanden sich die Zellen bei einer  $OD_{600}$  von 2 im Erlenmeyerkolben bereits in der spät-exponentiellen Phase (Abbildung 4.6 A). Während die Generationszeit unter optimalen Bedingungen von *B. subtilis* zwischen 30 bis 35 min liegt (Zeigler *et al.* 2017), wurde bei zwei unabhängigen Präparationen im Erlenmeyerkolben eine Generationszeit von  $106 \pm 29$  min gemessen. Da die Ribosomen-Konzentration mit der Wachstumsrate korreliert (Bremer *et al.* 2008; Zawada *et al.* 2006), deutete die hohe Generationszeit auf eine geringe Ribosomen-Ausbeute und damit eine geringere Ausbeute bei der zellfreien Proteinsynthese hin. Aus diesem Grund sollte die als besonders kritisch geltende Gewinnung eines ribosomalen Extrakts in der mittel-exponentiellen Phase erfolgen, da so eine besonders hohe Ribosomendichte und somit eine hohe Ribosomen-Konzentration erhalten werden (Bremer *et al.* 2008; Schwarz *et al.* 2007a; Sun *et al.* 2013).

Deswegen wurde der Wachstumsprozess der Zellen statt bei einer  $OD_{600}$  von 3 bei einer  $OD_{600}$  von 2 durch Kühlen auf einer Eis/Wasser-Mischung gestoppt und die Zellen anschließend geerntet. Nachdem die Zellen geerntet und gewaschen wurden, wurde ein feuchtes Pellet-Gewicht von ca. 1,9 g erhalten. Der folgende Zellaufschluss mit anschließender Zentrifugation bei 30.000 g und Dialyse lieferte 2 ml S30-Extrakt.

Anschließend wurde die Qualität und Funktionalität des S30-Extrakts aus *B. subtilis* im Vergleich zu zwei funktionalen S30-Extrakten aus *E. coli* untersucht. Da die Wachstumsdaten auf eine geringe

## Ergebnisse

Ausbeute an Ribosomen hindeuteten, wurde für die zellfreie Testproduktion von GFP das Zwei-Kompartimenten-System gewählt, da dieses System (3.3.1) in der Regel höhere Proteinausbeuten liefert (Schwarz *et al.* 2007a). Trotz einer langen Belichtungszeit von 9,5 s wurde bei verschiedenen  $Mg^{2+}$ -Konzentrationen keine zufriedenstellende In-Gel-Fluoreszenz von GFP für den S30-Extrakt aus *B. subtilis* im Vergleich zu den S30-Extrakten aus *E. coli* detektiert (**Abbildung 4.6. B**).

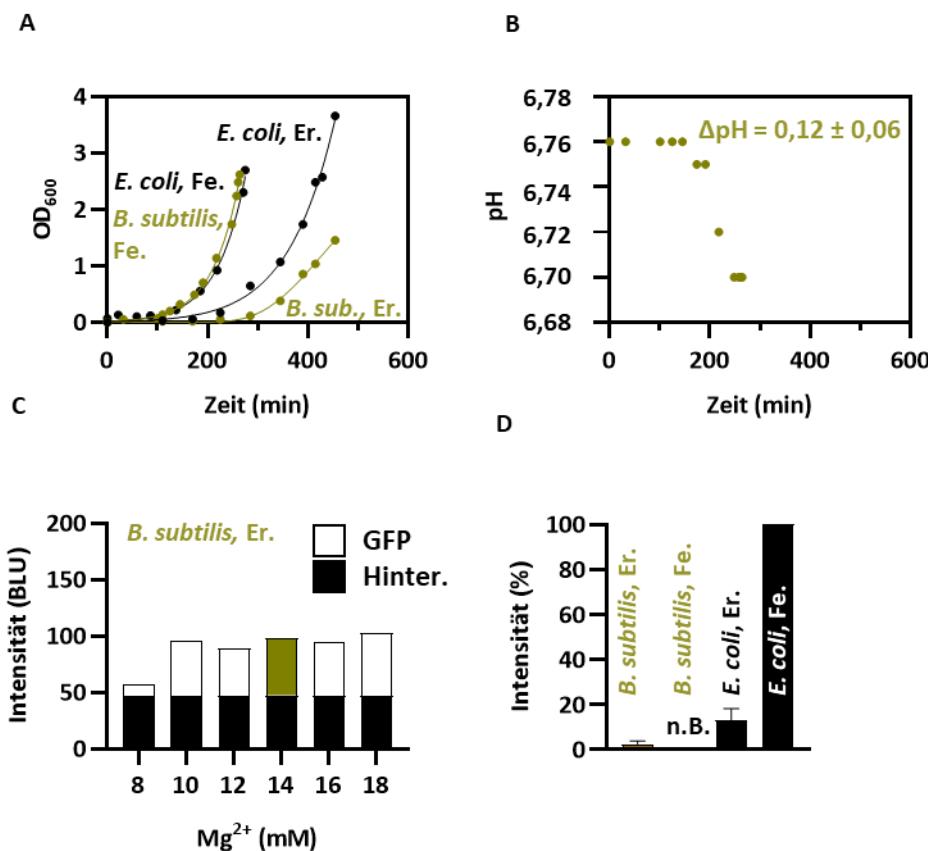


**Abbildung 4.6:** Gewinnung eines S30-Extrakts aus *B. subtilis*. **A.** Wachstum einer *B. subtilis*-Kultur im Erlenmeyerkolben **B.** In-Gel-Fluoreszenz von GFP zur Testung der Qualität und Funktionalität eines S30-Extrakts aus *B. subtilis* im Vergleich zu zwei S30-Extrakten aus *E. coli* bei einer Belichtungszeit von 9,5 s und unterschiedlichen  $Mg^{2+}$ -Konzentrationen.

Da keine zufriedenstellende Proteinausbeute erzielt wurde, wurde im nächsten Schritt untersucht, ob die Wachstumsbedingungen im Erlenmeyerkolben bei einem S30-Extrakt aus *E. coli* zu ausreichender Fluoreszenzausbeute in einem Ein-Kompartiment-System zum *Screening* neuartiger Antibiotika führt. Weiterhin wurde dem Nährmedium in gleicher Weise wie bei der *E. coli* 5-l-Kultur (3.2.9) Glucose hinzugefügt, da sowohl *E. coli* als auch *B. subtilis* fakultativ anaerobe Bakterien sind (Jacobs N. J. *et al.* 1964; Walker *et al.* 1934), und sich so ein schnelleres Wachstumsverhalten für die beiden Bakterien versprochen wurde. Weiterhin wird in nährstoffreichen Medien die Anzahl an verfügbaren Ribosomen erhöht, da die Bakterien eine schnellere Proteinproduktion und Selbstvermehrung unterstützen (Salis 2011). In nährstoffarmen Medien reduzieren die Bakterien ihre Produktionsrate, um Ressourcen zu sparen, was zu verringerten Ribosomen-Konzentrationen führt (Bremer *et al.* 2008).

*E. coli* zeigte im Erlenmeyerkolben mit einer Generationszeit von  $t_{\text{gen}} = 69 \pm 7$  min im Vergleich zu *B. subtilis* ( $t_{\text{Gen}} = 65 \pm 6$  min) ein vergleichbares Wachstum in der exponentiellen Phase (**Abbildung 4.7 A**). Weiterhin wurde eine deutlich höhere OD<sub>600</sub> für *E. coli* erreicht, sodass nach der Zellernte eine höhere Ausbeute von ca. 2 g an feuchtem Pellet sowie ca. 2 ml an S30-Extrakt aus *E. coli* im Vergleich zu einem S30-Extrakt aus *B. subtilis* von ca. 0,9 g feuchtem Pellet bzw. ca. 1 ml erzielt wurde. Gleichzeitig wurde für *E. coli* wie erwartet eine langsamere Verdopplungszeit der Bakterien im Vergleich zu einer Fermenter-Kultur beobachtet, da im Fermenter aktiv Sauerstoff zugeführt wird (**Abbildung 4.7 A**, **Abbildung 4.2 A**).

## Ergebnisse



**Abbildung 4.7:** Gewinnung eines S30-Extrakts aus *B. subtilis* und *E. coli* im Erlenmeyerkolben und im Fermenter. **A.** Wachstum von *B. subtilis* im Erlenmeyerkolben ( $t_{Gen} = 65 \pm 6$  min; N = 2) und Fermenter ( $t_{Gen} = 34 \pm 5$  min; N = 2) sowie *E. coli* ( $t_{Gen} = 69 \pm 7$  min; N = 4) im Erlenmeyerkolben. **B.** Während des Fermentationsprozesses säuerte sich das Medium von *B. subtilis* leicht an (N = 2). **C.** Mg<sup>2+</sup>-Screening von *B. subtilis* im Erlenmeyerkolben. Die schwarzen Balken stellen die Hintergrundfluoreszenz aus wells ohne GFP-kodierende Plasmid-DNA dar. Die weißen Balken repräsentieren die Eigenfluoreszenz von GFP. Die optimale Mg<sup>2+</sup>-Konzentration lag bei 14 mM (braun-grüner Balken). **D.** Überprüfung der Qualität und Funktionalität eines S30-Extrakts von *B. subtilis* im Erlenmeyerkolben und Fermenter sowie *E. coli* im Erlenmeyerkolben im Bezug zu einem S30-Extrakt aus *E. coli* im Fermenter bei ihrer optimalen Mg<sup>2+</sup>-Konzentration. Der Hintergrund wurde bereits abgezogen.

Da der hergestellte S30-Extrakt aus *B. subtilis* später im *Screening* im Ein-Kompartiment-System genutzt werden sollte, wurde dieses System direkt zur Überprüfung der Qualität des hergestellten S30-Extrakts genutzt, indem GFP zellfrei synthetisiert wurde (**Abbildung 4.7 A-C**). Es wurde eine Fluoreszenz von GFP mit einem Signal-Hintergrund-Verhältnis von 1,9 festgestellt. Die erzielte Fluoreszenzausbeute war im Vergleich zu einem S30-Extrakt aus *E. coli*, der aus einem Erlenmeyerkolben und einem Fermenter gewonnen wurde, deutlich schwächer (**Abbildung 4.7 A, D**). Dies bestätigt, dass Bakterienkulturen mit einer geringeren Wachstumsrate, wie im Erlenmeyerkolben, zu einer geringeren Ribosomen-Konzentration und somit einer geringeren Ausbeute von Fluoreszenzproteinen nach der zellfreien Proteinsynthese führen (Bremer *et al.* 2008; Zawada *et al.* 2005).

Zur weiteren Erhöhung der Ribosomen-Ausbeute bzw. Verbesserung des Wachstumsverhaltens wurde ein S30-Extrakt aus einem 5-l-Kultur im Fermenter aus *B. subtilis* gewonnen. Es wurde eine Ausbeute an feuchtem Pellet von  $m = 13,2 \pm 1,6$  g sowie ungefähr 9 ml am S30-Extrakt bei zwei unabhängigen Fermentationen gewonnen. Trotz vielversprechender Fermentationsdaten und Ausbeuten wurde

## Ergebnisse

keine Fluoreszenz von GFP im Vergleich zu einer Fermenter-Kultur von *E. coli* nachgewiesen (**Abbildung 4.7 A-D**).

Zellfreie Transkriptions-/Translationssysteme aus *B. subtilis* wurden über lange Zeit auf Grund der langen Reaktionsdynamiken und geringen Ausbeuten an zellfreien Proteinausbeuten abgelehnt (Leventhal *et al.* 1979; Nes *et al.* 1983; Okamoto *et al.* 1985; Stallcup *et al.* 1976; Tominaga *et al.* 1978; Villafane *et al.* 1987; Zaghloul *et al.* 1987). Trotz weiterer Optimierungen wurde mit Plattformen aus *B. subtilis* im Vergleich zu *E. coli* ca. 100-fach geringere Proteinausbeuten erreicht (Caschera *et al.* 2014; Gregorio *et al.* 2019; Kelwick *et al.* 2016). Dies ähnelt den hier gezeigten experimentellen Daten beim Vergleich von *B. subtilis* mit *E. coli* (**Abbildung 4.7 D**). Aus diesem Grund wurde die weitere Arbeit auf Grundlage eines S30-Extrakts aus *B. subtilis* zur Entwicklung einer Hochdurchsatzmethode für die Entdeckung neuer Inhibitoren der ribosomalen Proteinbiosynthese verworfen.

### 4.1.6 Gewinnung eines S30-Extrakts aus *S. enterica* und *B. megaterium* im Erlenmeyerkolben

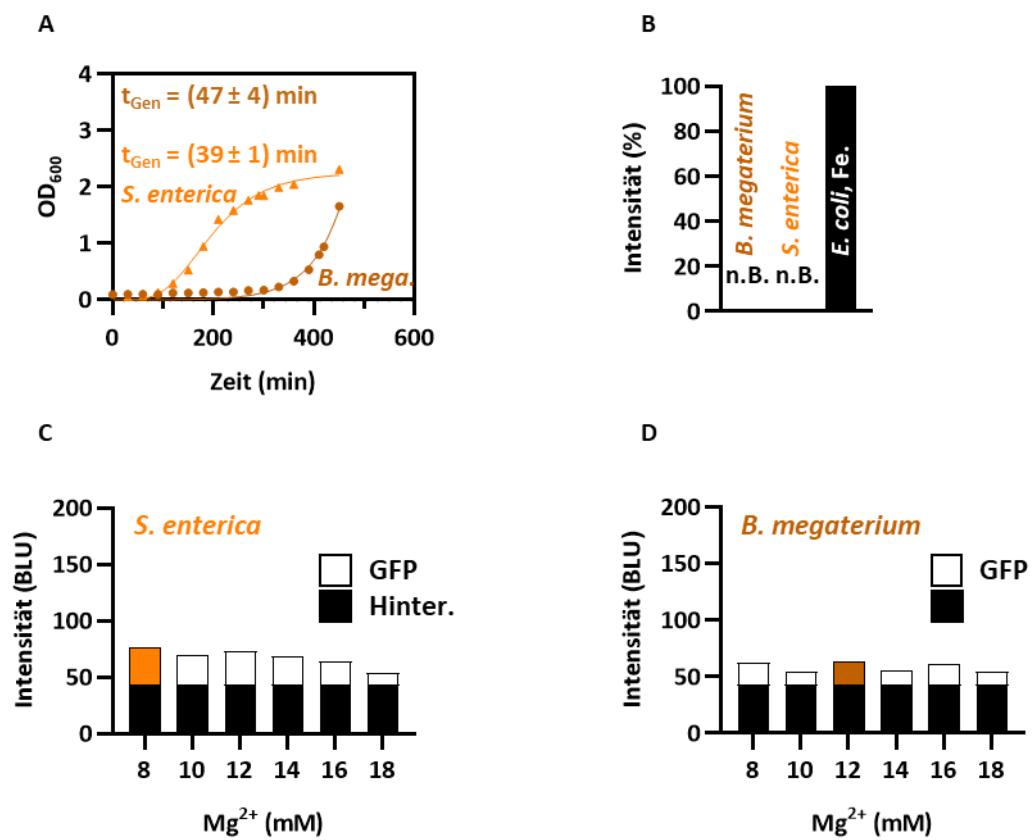
Es wurde ein S30-Extrakt aus *Bacillus megaterium*, welches als grampositives Bakterium ebenfalls wie *B. subtilis* zur Familie der Bacillaceae gehört, sowie *S. enterica* subsp. Enterica als gramnegatives Bakterium aus der Familie der Enterobacteriaceae mit einbezogen. Beide Bakterien entstammen Familien wie z. B. *B. anthracis* sowie *S. enterica*. Während *B. anthracis* als Erreger für den Milzbrand eine besondere Gefahr für den Menschen darstellt, priorisiert die WHO (2022) die Entwicklung neuer Antibiotika gegen *S. enterica*, welcher eine Resistenz gegen Fluorchinolone entwickelt hat. Aus diesem Grund wurden die Bakterien *B. megaterium* sowie *S. enterica* subsp. Enterica in die Entwicklung eines Screenings für Inhibitoren der ribosomalen Proteinbiosynthese mit einbezogen.

Da für beide Bakterien keine Protokolle bezüglich der Extraktion eines S30-Extrakts in der Literatur beschrieben waren, wurde das für einen S30-Extrakt aus *E. coli* nach Schwarz *et al.* (2007a) herangezogen (3.2.9). Zunächst wurde der S30-Extrakt aus *E. coli* im kleinen Maßstab aus einer 500 ml Bakterienkultur gewonnen, um zu überprüfen, ob weitere Optimierungen in der Extraktion vielversprechend erschienen.

Es wurden aussichtsreiche Wachstumskurven für *S. enterica* mit einer Generationszeit von  $39 \pm 1$  min beobachtet, womit fast ideale Wachstumsbedingungen mit einer idealen Verdopplungszeit von 30 min erreicht wurden (Gibson *et al.* 2018). Für *B. megaterium* wurde eine Generationszeit von  $47 \pm 4$  min bestimmt (**Abbildung 4.8 A**). Trotzdem wurde für beide gewonnenen Extrakte im Vergleich zu *E. coli* keine Fluoreszenz von GFP nach zellfreier Synthese im Ein-Kompartiment-System nachgewiesen (**Abbildung 4.8 B**).

Bei isolierter Betrachtung der einzelnen ribosomalen Extrakte wurde eine schwache Fluoreszenz bei der optimalen  $Mg^{2+}$ -Konzentration von 8 mM für *S. enterica* mit einem Signal-Hintergrund-Verhältnis von 1,8 sowie für *B. megaterium* bei 12 mM  $Mg^{2+}$  ein Signal-Hintergrund-Verhältnis von 1,5 festgestellt (**Abbildung 4.8 C und D**).

## Ergebnisse



**Abbildung 4.8:** Gewinnung eines S30-Extrakts aus *S. enterica* und *B. megaterium* im Erlenmeyerkolben. **A.** Wachstum von *S. enterica* im Erlenmeyerkolben ( $t_{\text{Gen}} = 39 \pm 1 \text{ min}$ ;  $N = 2$ ) und *B. megaterium* ( $t_{\text{Gen}} = 47 \pm 4 \text{ min}$ ;  $N = 2$ ) **B.** Relative GFP-Fluoreszenzintensität, die mit S30-Extrakten aus *S. enterica* und *B. megaterium* im Vergleich zu *E. coli* erzielt wurde (n.B. = nicht Bestimmbar). Zellfreie Produktion von GFP zur Überprüfung der Qualität eines S30-Extrakts bei unterschiedlichen Mg<sup>2+</sup>-Konzentrationen. **C.** S30-Extrakt aus *S. enterica* **D.** S30-Extrakt aus *B. megaterium*. Die Hintergrundfluoreszenz (schwarz) wurde aus wells ohne GFP-kodierende Plasmid-DNA ermittelt. Die orangenen bzw. braunen Balken zeigen die optimale Mg<sup>2+</sup>-Konzentration an.

Da analog zu einem S30-Extrakt aus *B. subtilis* die erzielten Proteinausbeuten nicht ausreichend genug für die Entwicklung einer Screening-Plattform zur Entdeckung ribosomaler Inhibitoren erschienen, wurde auf ein in der Literatur beschriebenes Transkriptions-/Translationssystem auf Basis von *Pseudomonas putida* zurückgegriffen, für welches in der Literatur eine erhöhte Translationseffizienz im Vergleich zu *B. subtilis* gezeigt beschrieben ist (Caschera *et al.* 2014; Gregorio *et al.* 2019; Kelwick *et al.* 2016; Wang *et al.* 2018).

### 4.1.7 Extraktion eines S30-Extrakts aus *P. putida* im Erlenmeyerkolben

Da aus den vorherigen Untersuchungen die Wachstumsrate als besonders kritisch für den Prozess evaluiert wurde, wurde der Erntezeitpunkt für die weiteren Extraktionen einen S30-Extrakts untersucht. Da ein 5-l-Fermenterkultur zu deutlich höherem Aufwand und Verbrauch an Ressourcen führt, wurde zunächst ein ribosomaler Extrakt im kleinen Maßstab aus einem Erlenmeyerkolben

## Ergebnisse

gewonnen. Dabei wurde der Extrakt zu drei verschiedenen Zeitpunkten geerntet: zu Beginn, in der Mitte und am Ende der exponentiellen Phase (**Abbildung 4.9 A**). Als weitere Kontrolle wurde in gleicher Weise für einen ribosomalen Extrakt aus *E. coli* verfahren. *P. putida* zeigte ein deutlich langsameres Wachstumsverhalten bezüglich der Generationszeit im Erlenmeyerkolben als *E. coli*.

Für eine 500 ml Bakterienkultur wurde nach der Zellernte für *P. putida* und *E. coli* das feuchte Pellet-Gewicht bestimmt (**Tabelle 4.1**). Das Pellet-Gewicht erhöhte sich, wie erwartet, zu einem späteren Erntezeitpunkt. Die Lockerheit der Pellets von *P. putida* führte zu einem gewissen Verlust im Vergleich zu den festeren *E. coli*-Zellpellets. Das Volumen am S30-Extrakt aus *P. putida* schwankte zwischen 0,7 ml bis 2 ml bzw. 2 bis 4 ml für einen S30-Extrakt aus *E. coli*.

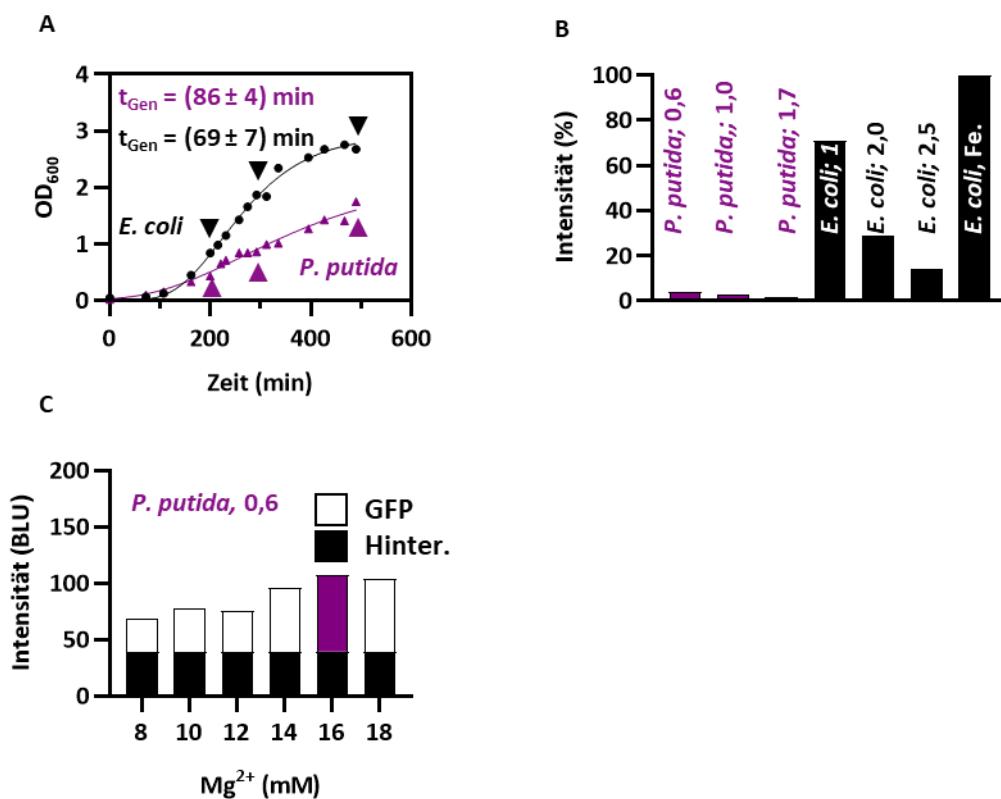
**Tabelle 4.1:** Pellet-Gewicht (g) von S30-Extrakten aus *E. coli* und *P. putida* bei verschiedenen Erntezeitpunkten ( $OD_{600}$ ).

S30-Extrakt aus <i>E. coli</i>	S30-Extrakt aus <i>P. putida</i>
2,03 g ( $OD_{600} = 1,0$ )	0,4 g ( $OD_{600} = 0,6$ )
3,59 g ( $OD_{600} = 2,0$ )	1,58 g ( $OD_{600} = 1,0$ )
4,03 g ( $OD_{600} = 2,5$ )	2,43 g ( $OD_{600} = 1,7$ )

Ein früher Erntezeitpunkt führt somit zu einem geringeren Endvolumen an S30-Extrakt und ermöglicht eine geringere Anzahl an Reaktion für die zellfreie Proteinsynthese. Gleichzeitig spielt die Qualität des gewonnenen S30-Extrakts eine größere Rolle. Zur Testung dieser wurde mit 40  $\mu$ l Reaktionsvolumen GFP im Ein-Kompartiment-System produziert (3.3.2). Sowohl S30-Extrakte auf Grundlage von *P. putida* als auch *E. coli* zeigten, wie erwartet, in Abhängigkeit ihrer Wachstumsrate eine unterschiedliche hohe Fluoreszenzausbeute (**Abbildung 4.9 B**). *E. coli* Extrakte zeigten zwischen der früh-exponentiellen Phase zu der spät-exponentiellen Phase eine um den Faktor 5 höhere Fluoreszenzausbeute, während für *P. putida* Extrakte der Faktor 2,2 bestimmt wurde. Die Wachstumsrate war dabei für *E. coli* zwischen den beiden Erntezeitpunkten deutlich höher im Vergleich zu *P. putida* (**Abbildung 4.9 A**). *P. putida* zeigte zwischen den beiden Erntezeitpunkten einen fast linearen Wachstums-Verlauf. Frühere Untersuchungen haben für *P. putida* ebenfalls gezeigt, dass ein früherer Erntezeitpunkt der Zellen zu einer Erhöhung der Ausbeute von einem schnell faltendem GFP bei einem S30-Extrakt aus *P. putida* um den Faktor 4 führte (Wang *et al.* 2018).

Für den Extrakt, der aus *P. putida* in der früh-exponentiellen Phase gewonnen wurde und der zu der höchsten GFP-Ausbeute beim Vergleich der Erntezeitpunkte führte, wurde ein  $Mg^{2+}$ -Screening durchgeführt. Für diese wurde ein Fluoreszenzmaximum bei 16 mM  $Mg^{2+}$  festgestellt (**Abbildung 4.9 C**). Weiterhin lag ein Signal-Hintergrund-Verhältnis von 2,7 vor.

## Ergebnisse



**Abbildung 4.9:** Gewinnung eines S30-Extrakts aus *P. putida* und *E. coli* im Erlenmeyerkolben. **A.** Wachstumsverhalten von *P. putida* ( $t_{\text{Gen}} = 86 \pm 4 \text{ min}$ ;  $N = 3$ ) sowie *E. coli* ( $t_{\text{Gen}} = 69 \pm 7 \text{ min}$ ;  $N = 4$ ) im Erlenmeyerkolben. Die Pfeile in schwarz und lila deuten die drei verschiedenen Erntezeitpunkte an. **B.** Fluoreszenz-Intensität von GFP in einem Ein-Kompartiment-System von S30-Extrakten aus *P. putida* und *E. coli* bei unterschiedlichen Erntezeitpunkten. Die Intensität des Fluoreszenzsignals des ribosomalen Extrakts aus *E. coli* aus einem Fermenter diente als 100 % Kontrolle. **C.** Mg<sup>2+</sup>-Screening eines S30-Extrakts aus *P. putida*. Die schwarzen Balken stellen die Hintergrundfluoreszenz aus wells ohne GFP-kodierende Plasmid-DNA dar. Die weißen Balken repräsentieren die Eigenfluoreszenz von GFP. Die optimale Mg<sup>2+</sup>-Konzentration lag bei 16 mM (violetter Balken).

### 4.1.8 Gewinnung von S30-Extrakten aus *P. putida* und *S. enterica* aus einem Fermenter

Auf Grund der GFP-Proteinausbeuten eines Extrakts aus *P. putida* sowie des Signal-Hintergrund-Verhältnisses eines Extrakts aus *S. enterica* aus einem Erlenmeyerkolben, wurde ein ribosomaler Extrakt aus einer 5-l-Bakterienkultur mit einem Fermenter gewonnen (3.2.9).

Die im Erlenmeyerkolben beobachtete Verdopplungszeit wurde für *S. enterica* auf 27 min und vor allem für *P. putida* auf 40 min deutlich verkürzt (**Abbildung 4.10 A**). Für *S. enterica* wurde in der Literatur eine Generationszeit von 31 min (Gibson *et al.* 2018) und für *P. putida* von 31 min beschrieben (Bator *et al.* 2020), sodass das Wachstumsverhalten im Fermenter im Vergleich zum Erlenmeyerkolben deutlich optimiert wurde. Weiterhin wiesen die Kulturen im Fermenter eine deutlich geringere *lag*-Phase von ungefähr 80 min im Vergleich zu 100 min im Erlenmeyerkolben auf (**Abbildung 4.10 A**, **Abbildung 4.9 A**, **Abbildung 4.8 A**). Somit wurden im Fermenter die Wachstumszeiten bis zur Zellernte deutlich verkürzt. Auf Grund der verbesserten Wachstumsbedingungen wurde weiterhin eine höhere

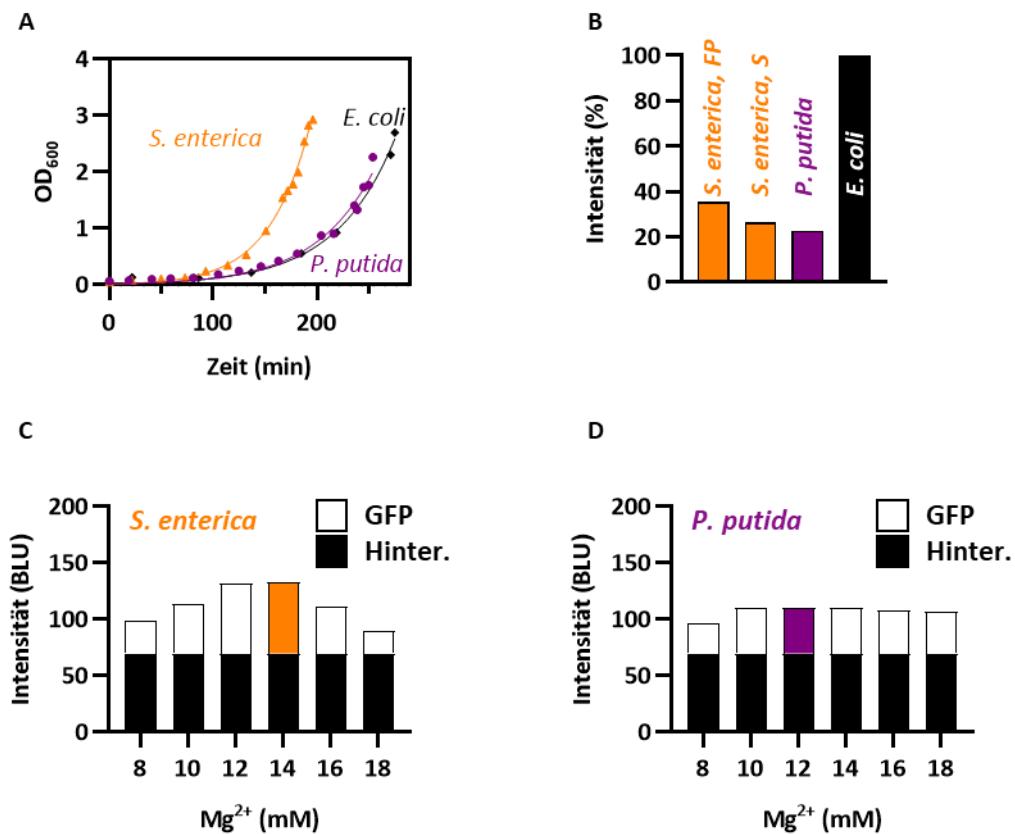
## Ergebnisse

OD<sub>600</sub> in der exponentiellen Phase erreicht, sodass nach der anschließenden Zellernte ein höheres Gewicht der Zellpellets von 18,7 g (*S. enterica*) und 14,3 g (*P. putida*) gewonnen wurde. Die Lockerheit der Pellets führte zu einem gewissen Verlust im Vergleich zu den festeren *E. coli*-Zellpellets (28,0 ± 2,0 g).

Im Anschluss mussten die resuspendierten Pellets aufgeschlossen werden. Zuvor wurde beim Unterschreiten eines Mindestvolumens von 5 ml, welches für die *French-Press* notwendig ist, eine Sonotrode zum Zellaufschluss verwendet. Auf Grund der hohen Pellet-Ausbeute der 5-l-Fermenterkultur wurde zur Untersuchung der Effizienz der beiden verschiedenen Methoden ein Teil des S30-Extrakts aus *S. enterica* mit einer *French-Press* und ein äquivalenter Teil mit einer Sonotrode aufgeschlossen. Mit Hilfe von zellfrei-produziertem GFP im Ein-Kompartiment-System zeigte sich die *French-Press* als effektivere Methode mit höheren Fluoreszenzausbeuten (**Abbildung 4.10 B**). Die durch einen Sonotrode eingebrachte Energie stellt einen kritischen Parameter für aktive Zellextrakte dar (Kwon *et al.* 2015). Aus diesem Grund wurden die resuspendierten Zellpellets von *P. putida* mit der *French-Press* aufgeschlossen und zeigten ebenfalls eine deutliche Fluoreszenz im Vergleich zu einer älteren Charge aus *E. coli* (**Abbildung 4.10 B**).

Im Mg<sup>2+</sup>-*Screening* wurde ein Signal-Hintergrund-Verhältnis von 1,6 bei einer Mg<sup>2+</sup>-Konzentration von 12 mM für einen S30-Extrakt aus *P. putida* und ein Signal-Hintergrund-Verhältnis von 1,9 bei 14 mM für einen S30-Extrakt aus *S. enterica* erzielt. Beide Extrakte wurden somit in ihrer Funktionalität verifiziert.

## Ergebnisse



**Abbildung 4.10:** Gewinnung eines S30-Extrakts aus *S. enterica* und *P. putida* im Fermenter. **A.** Wachstum von *S. enterica* ( $t_{\text{Gen}} = 27 \text{ min}$ ;  $N = 1$ ) und *P. putida* ( $t_{\text{Gen}} = 40 \text{ min}$ ;  $N = 1$ ) **B.** Relative GFP-Fluoreszenzintensität, die mit S30-Extrakten aus *S. enterica* und *P. putida* im Vergleich zu *E. coli* erzielt wurde. Zellfreie Produktion von GFP zur Überprüfung der Qualität eines S30-Extrakts bei unterschiedlichen Mg<sup>2+</sup>-Konzentrationen. **C.** S30-Extrakt aus *S. enterica* **D.** S30-Extrakt aus *P. putida*. Die Hintergrundfluoreszenz (schwarz) wurde aus wells ohne GFP-kodierende Plasmid-DNA ermittelt. Die orangenen bzw. violetten Balken zeigen die optimale Mg<sup>2+</sup>-Konzentration an.

### 4.1.9 Veränderung der Ribosomenbindestelle für einen S30-Extrakt aus *P. putida*

Die Ribosomen-Aktivität des S30-Extrakts aus *P. putida* wurde als Startpunkt der Entwicklung einer Screening-Plattform genutzt. In den nächsten Schritten sollte die Fluoreszenzausbeute weiter erhöht werden. Begonnen wurde dabei mit der Ribosomen-Bindestelle (RBS), welche sich stromaufwärts des ATG-Startcodons des mRNA-Transkripts befindet und hauptverantwortlich für die Initiation der Translation ist. Dabei beeinflusst die RBS maßgeblich die Rate, mit der ein Ribosom zur RBS rekrutiert wird und die Rate nachdem ein rekrutiertes Ribosom fähig ist, die Translation zu initiieren. Die Initiierung der Translation gilt als der am stärksten regulierte Schritt der Translation von Prokaryoten (Laursen *et al.* 2005) Abweichend von der klassischen *E. coli* Shine-Dalgarno-Sequenz, AGGAGGUATG (Shine *et al.* 1974), tragen die in dieser Arbeit eingesetzten Expressionskonstrukte die Sequenz TACTAGATG, die sich als optimal für die Translationsinitiierung an *E. coli*-Ribosomen erwiesen haben.

Mit Hilfe des RBS-Rechners nach Salis *et al.* (2009) wurden elf verschiedene RBS für *Pseudomonas putida* KT2440 erhalten (**Tabelle 4.2**) (3.1.13).

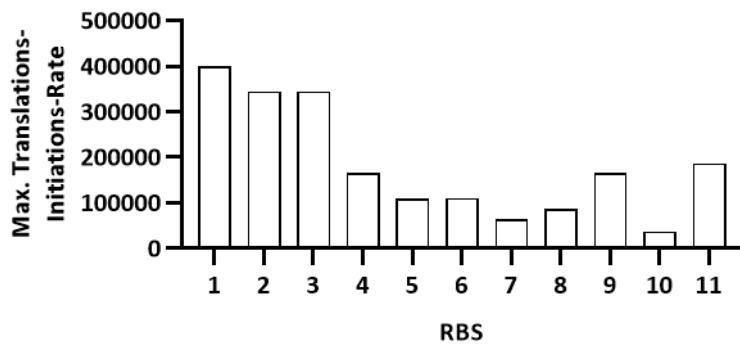
## Ergebnisse

**Tabelle 4.2:** RBS für *P. putida* nach Salis *et al.* (2009)

RBS-Nummer	Oligonukleotid-Sequenz
RBS 1	TCATAAATTGAATATCAGGAGGCTCGA
RBS 2	TCAGAAATTGAATATCAGGAGGTTCGT
RBS 3	TCAGAAATTGAATATAAGGAGGTTCGA
RBS 4	GTTGACATGACAATCAAGGCGGTTCGA
RBS 5	GTTTACCGTGATAACAAGGAGGTTCGA
RBS 6	ATTACATTGAATAAAAGGAGCTTCGA
RBS 7	GTTGACCGGACATACAAGGAGGTTCGA
RBS 8	GCTGACATGACAATCAAGGCGGTTA
RBS 9	GTTGACATGACATACAAGGAGGTTCGA
RBS 10	GTTGACATGACAATTAGCGCGGTTAA
RBS 11	CGGGGCAGGTTGCCTTGCAAGATAACATTTAAGGTAGGTTTTT

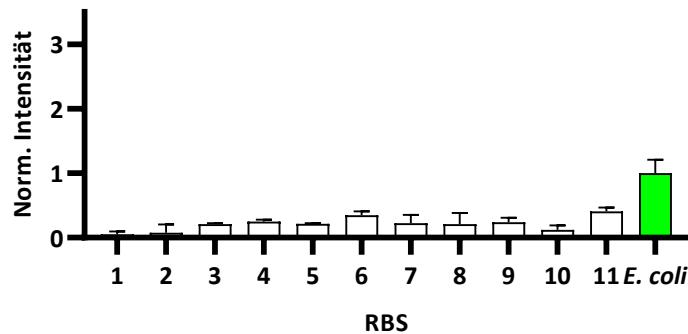
Die RBS zeigten eine theoretische unterschiedliche maximale Translations-Initiations-Rate (**Abbildung 4.11**). Die Synthese der RBS sowie der komplementären Oligonukleotid-Sequenzen wurden bei ThermoFisherScientific in Auftrag gegeben. Dabei erfolgte die Oligonukleotid-Synthese so, dass am 5' Ende des sense-Strangs der komplementären Oligonukleotid-Sequenz CTAGA und am 3' Ende des sense-Strangs der komplementären Oligonukleotid-Sequenz CGCGCC vorhanden waren, welche nach einem Verdau mit den Restriktionsenzymen *Xba*I und *Sgs*I entstehen würde. Die zwei komplementären Oligonukleotid-Sequenzen wurden mit Hilfe einer *Touchdown-PCR* (3.1.9) aneinander hybridisiert. Weiterhin wurde in dem Konstrukt pIVEX2.3w\_GFP eine Schnittstelle für *Sgs*I stromaufwärts der RBS eingefügt, indem eine Punktmutation erstellt wurde (3.1.8). Anschließend wurde das mutierte Konstrukt mit *Sgs*I und *Xba*I verdaut (3.1.6). Es folgte die Ligation (3.1.7) der verschiedenen RBS-Sequenzen mit dem Konstrukt, sodass die vorherige RBS, die für *E. coli* optimiert war, gegen eine neue RBS für *P. putida* ausgetauscht wurde. Die Sequenz aller Konstrukte wurde über eine Sanger-Sequenzierung (3.1.10) verifiziert.

## Ergebnisse



**Abbildung 4.11:** Maximale Translations-Initiations-Rate elf unterschiedlicher RBS-Sequenzen, berechnet nach Salis *et al.* (2009).

Anschließend erfolgte die Testung der unterschiedlichen RBS-Konstrukten im Ein-Kompartiment-System, indem GFP in einem finalen Volumen von 40  $\mu$ l zellfrei produziert wurde. Entgegen der Erwartung wurde keine Verbesserung der Fluoreszenzausbeute einer *E. coli* RBS im Vergleich zu elf unterschiedlich erstellten RBS-Sequenzen beobachtet (**Abbildung 4.12**).



**Abbildung 4.12:** Ribosomenbindestelle (RBS) für einen S30-Extrakt aus *P. putida*. Dargestellt ist eine für *P. putida* optimierte Datenbank mit unterschiedlichen RBS, nummeriert von 1 bis 11, im Vergleich zu der vorherigen RBS, welche für *E. coli* optimiert wurde. Die optimale Bedingung ist in hellgrün dargestellt. Dargestellt ist das arithmetische Mittel  $\pm$  S.E.M. aus drei technischen Replikaten. Der Hintergrund wurde durch einzelne wells, welche kein für GFP codierendes Plasmid enthielten, bestimmt und abgezogen.

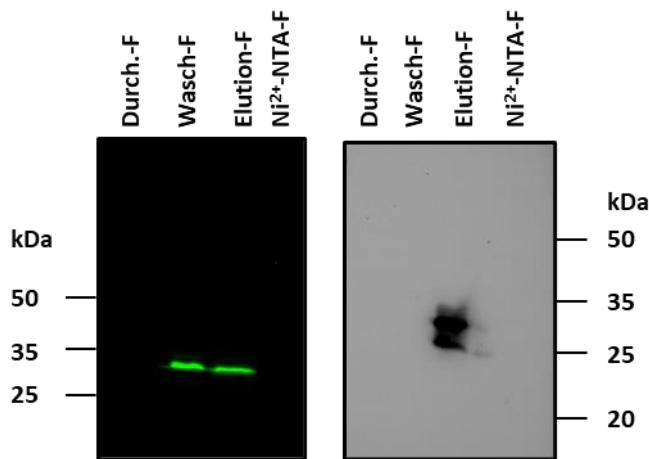
### 4.1.10 Einführung eines heller leuchtenden Fluoreszenzprotein: mNeonGreen

Trotz der Fermentationsdaten und Ausbeuten der S30-Extrakte war die Intensität der GFP-Fluoreszenz von S30-Extrakten aus *S. enterica*- und *P. putida* anfangs zu gering für einen *Screening*-Ansatz. Um dieses Problem zu überwinden, wurde zur zellfreien Produktion von schnell faltendem monomerem NeonGreen übergegangen (Shaner *et al.* 2013). Das Fluorophor von mNeonGreen bildet sich nachweislich drei-mal schneller als GFP (Cranfill *et al.* 2016).

Dafür wurde mNeongreen codierendes Plasmid mit *SpeI* und *XbaI* verdaut (**3.1.6**) und an die entsprechenden Stellen von pIVEX2.3w ligiert (**3.1.7**), um den offenen Leserahmen für GFP zu ersetzen. Das Konstrukt wurde durch DNA-Sequenzierung überprüft (**3.1.10**). Das Protein mNeongreen weist eine theoretische Größe von 26,6 kDa auf. Bei Verwendung des etablierten S30-Extrakts aus *E. coli* im

## Ergebnisse

Ein-Kompartiment-System wurde die erfolgreiche Synthese von gereinigtem mNeonGreen mit Hilfe einer In-Gel-Fluoreszenz sowie eines Western-Blots unter Verwendung eines Anti-Penta-His-Antikörpers in der Elutions-Fraktion bei einer Höhe von ungefähr 30 kDa nachgewiesen (**Abbildung 4.13**). Im Western Blot wurde eine Doppelbande von mNeonGreen nachgewiesen, wobei die obere Bande in der In-Gel-Fluoreszenz ebenfalls auftrat und somit für die Fluoreszenz verantwortlich ist. Bei dieser Bande handelte es sich vermutlich um das korrekt gefaltete Protein.

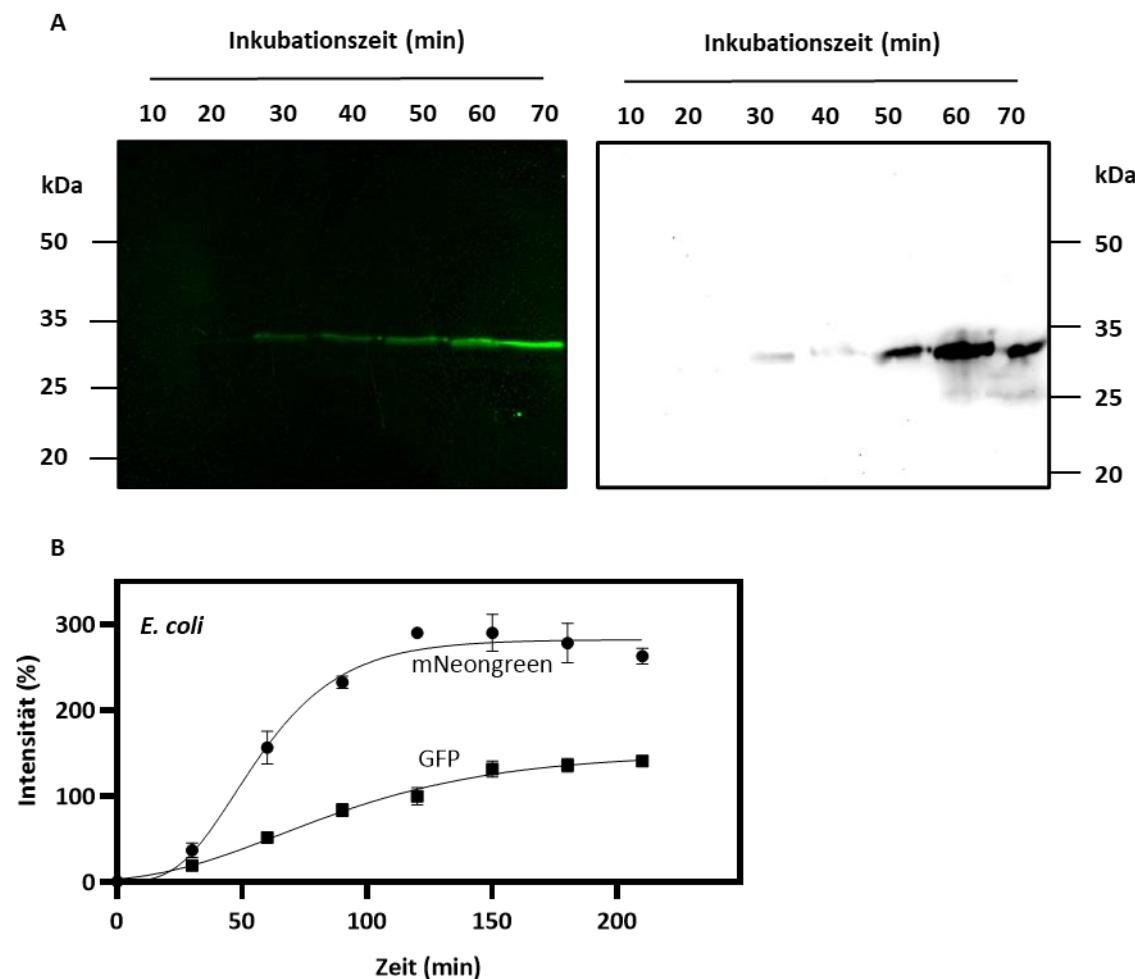


**Abbildung 4.13:** Zellfreie Proteinsynthese von mNeonGreen im Ein-Kompartiment-System. In-Gel Fluoreszenz (links) sowie Western-Blot mit Anti-Penta-His-Antikörper (rechts) der Ni<sup>2+</sup>-NTA-Reinigungsfraktionen von mNeonGreen.

Anschließend wurde überprüft, ob mNeonGreen als schnell faltendes Fluoreszenzprotein für den Einsatz in der zellfreien Proteinsynthese geeignet ist. Mit Hilfe einer In-Gel-Fluoreszenz sowie eines Western Blots wurde die Proteinsynthese nach einer Inkubationszeit von 30 min über eine Fluoreszenz durch mNeonGreen nachgewiesen (**Abbildung 4.14 A**). Weiterhin wurden im Western-Blot nach einer Inkubationszeit von 60 min potenzielle Abbruch-Fragmente nachgewiesen. Weiterhin wurde, wie erwartet, über die steigende Inkubationszeit eine Steigerung der Proteinausbeute erreicht (**Abbildung 4.14 A**). Im Vergleich zu GFP wurde eine erhebliche Zunahme der Helligkeit um ungefähr den Faktor 2,7 nach 120 min Inkubationszeit erzielt (**Abbildung 4.14 B**), was in dem modifizierten Assay zu einem Signal-Hintergrund-Verhältnis von  $37,8 \pm 5,5$  führte (**Abbildung 4.18**).

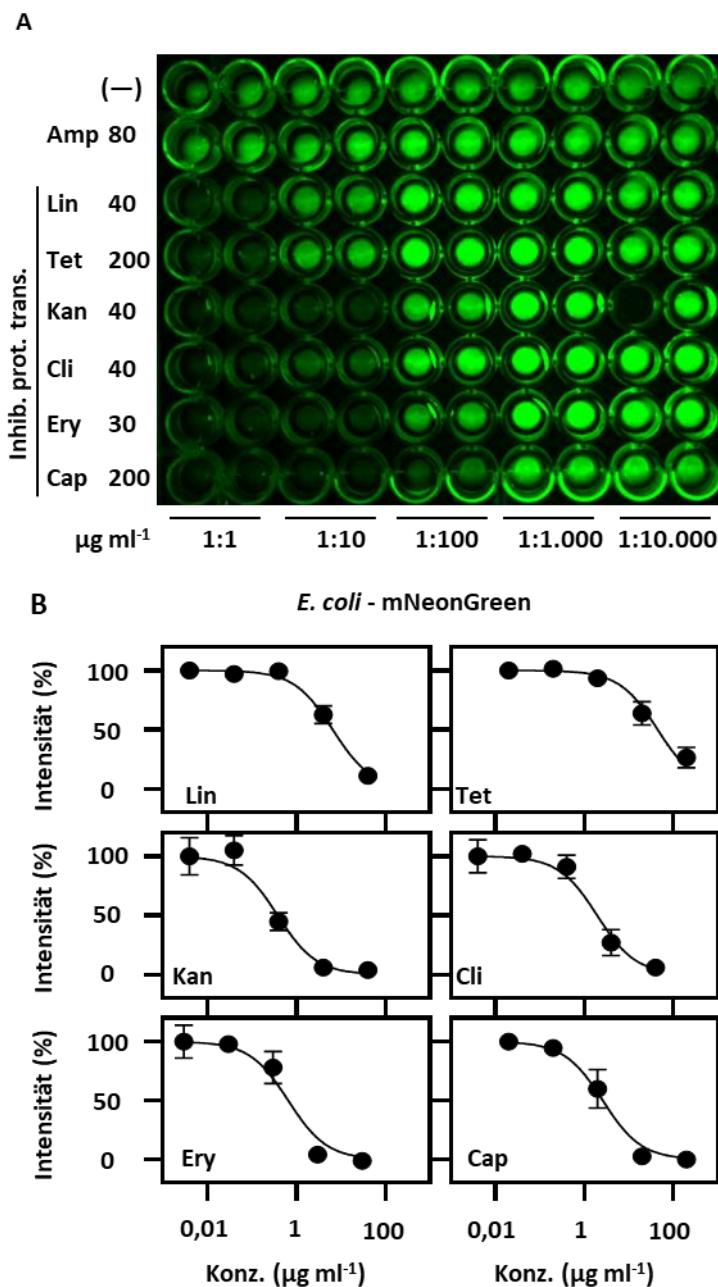
Die IC<sub>50</sub>-Werte für die Hemmung der Translation mit mNeonGreen an Ribosomen aus *E. coli* (**Abbildung 4.15 A und B**) stimmten mit denen überein, die mit GFP ermittelt wurden (**Tabelle 4.3**). Dies macht mNeonGreen zu einem geeigneten Reporter für den Translationsassay.

## Ergebnisse



**Abbildung 4.14:** Zelfreie Proteinsynthese von mNeonGreen im Ein-Kompartiment-System. **A.** In-Gel Fluoreszenz (links) sowie Western-Blot mit Anti-Penta-His-Antikörper (rechts) der Elutions-Fraktion aus der  $\text{Ni}^{2+}$ -NTA-Reinigung von mNeonGreen im Vergleich zu GFP bei unterschiedlichen Inkubationszeiten. **B.** Relative Fluoreszenzintensität aus der zelfreien Produktion von mNeonGreen im Vergleich zu GFP unter Verwendung von Ribosomen aus *E. coli*.

## Ergebnisse



**Abbildung 4.15:** Hemmung der Translation von *E. coli*-Ribosomen mit mNeonGreen-Fluoreszenz-Auslesung im Multi-Well-Format. **A.** Wirkung von Antibiotika auf die zellfreie mNeonGreen-Produktion. Die Verbindungen (Amp, Ampicillin; Lin, Linezolid; Tet, Tetracyclin; Kan, Kanamycin; Cli, Clindamycin; Ery, Erythromycin; Cap, Chloramphenicol) wurden den Reaktionen in seriellen Verdünnungen zugesetzt. Unbehandelte Vertiefungen (—) dienten als Kontrollen für nicht gehemmte Translation. **B.** Konzentrationsabhängige Dosis-Wirkungsbeziehung anhand der Fluoreszenzintensität. Die Daten wurden an sigmoidalen Hill-Gleichungen angepasst und die  $\text{IC}_{50}$ -Werte bestimmt (siehe Tabelle 4.3). Die Kurven stammen aus drei unabhängigen biologischen Experimenten. Die dargestellten Kurven stellen das arithmetische Mittel  $\pm$  S.E.M. aus drei unterschiedlichen Fermentationsprozessen dar.

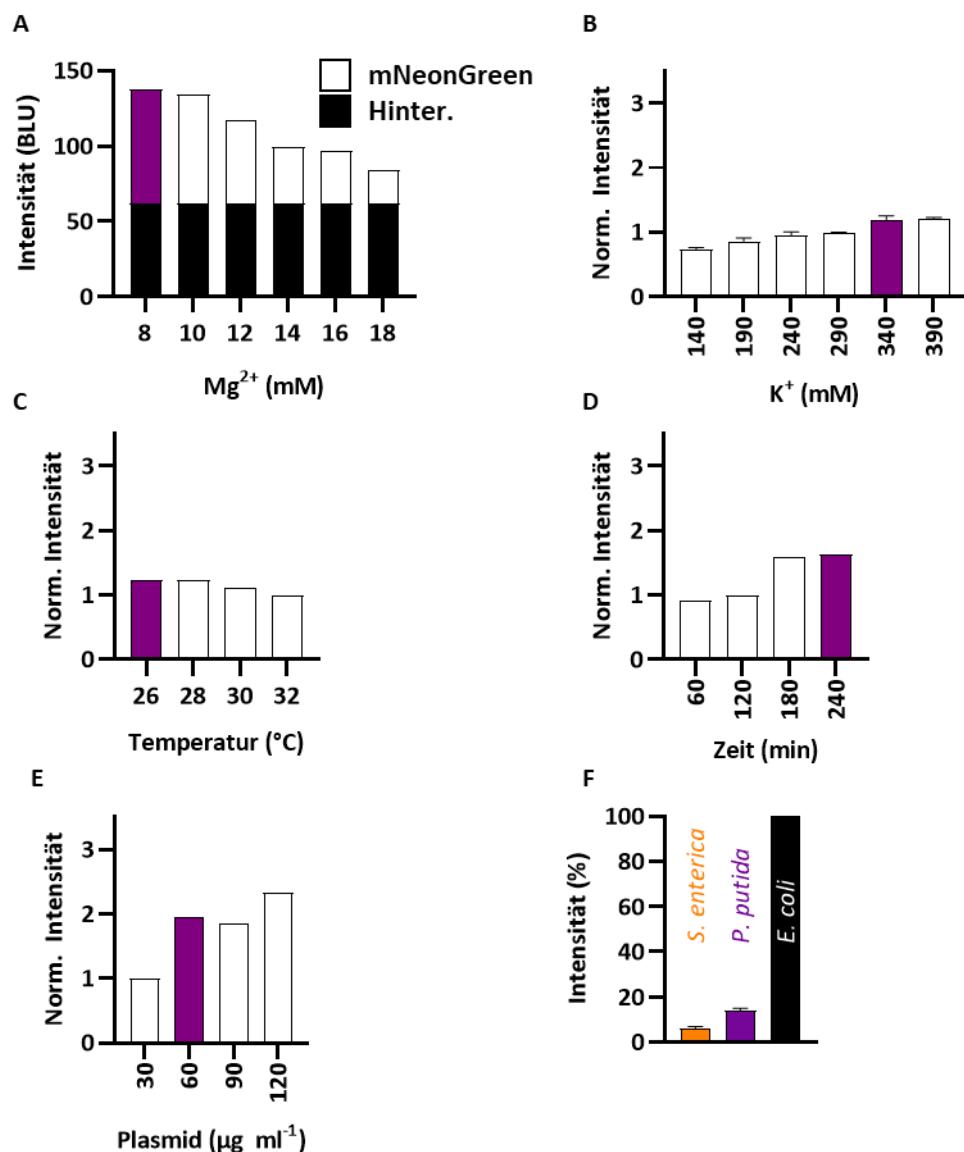
#### 4.1.11 Optimierung eines zellfreien Translationssystems aus *P. putida* zur Entwicklung einer *Screening*-Plattform mit mNeonGreen

Zur weiteren Erhöhung des Fluoreszenzsignals und Verbesserung des Signal-Hintergrund-Verhältnisses wurden, wie in Abschnitt 4.1.3. für einen S30-Extrakt aus *E. coli* beschrieben, die kritischen Reaktionskomponenten variiert. Als Ausgangspunkt wurde das auf einen S30-Extrakt aus *E. coli* optimierte System verwendet (12 mM Mg<sup>2+</sup>, 290 mM K<sup>+</sup>, 32 °C, Inkubation für 120 min, 30 µg ml<sup>-1</sup> Plasmid-DNA). Als Fluoreszenzprotein wurde mNeonGreen in einem Reaktionsvolumen von 40 µl für 2 Stunden zellfrei synthetisiert.

Begonnen wurde mit der Mg<sup>2+</sup>-Konzentration. Für S30-Extrakte aus *P. putida* wurden niedrigere Maxima bei 6 mM Mg<sup>2+</sup> (Yim *et al.* 2019) bzw. 9 mM Mg<sup>2+</sup> (Wang *et al.* 2018) beschrieben. Die mNeonGreen-Fluoreszenz zeigte mit 8 mM Mg<sup>2+</sup> ein niedriges Maximum (**Abbildung 4.4 A**). Das Signal-Hintergrund-Verhältnis lag bei 2,2 (**Abbildung 4.16 A**). Die K<sup>+</sup>-Konzentration zeigte ein Optimum bei 340 mM (**Abbildung 4.16 B**) und liegt somit ebenfalls in dem für einen S30-Extrakt aus *E. coli* beschriebenen Arbeitsbereich von 250 – 350 mM. Während Bakterien von *P. putida* KT2440 ihr Temperaturoptimum bei 30 °C aufweisen (Fonseca *et al.* 2011), führte eine Reaktionstemperatur von 26 °C zur höchsten Fluoreszenzintensität (**Abbildung 4.16 C**). Um die größtmögliche Fluoreszenz-Ausbeute zu erzielen, wurde die Inkubationszeit von 120 min auf 240 min verlängert (**Abbildung 4.16 D**). Final wurde die Plasmid-Konzentration von pVEX2.3w\_mNeongreen optimiert. Da die RBS für ein System aus *E. coli* optimiert wurde, wurde erwartet, dass eine höhere Plasmid-Konzentration zu einer besseren Translations-Effizienz führen würde (**Abbildung 4.9 E**). Da die Präparation großer DNA-Mengen zeit- und kostenintensiv ist, wurde aus wirtschaftlichen Gründen entschieden, für die weiteren zellfreien Assays eine Plasmid-DNA-Konzentration von 60 µg ml<sup>-1</sup> zu nutzen (**Abbildung 4.9 E**).

Nachdem die optimalen Bedingungen für den S30-Extrakt aus *P. putida* mit dem Fluoreszenzprotein mNeonGreen bestimmt wurde, wurde erneut das erzielte Fluoreszenzsignal im Vergleich zu *S. enterica* und *P. putida* bestimmt (**Abbildung 4.16 F**). Ribosomen, die aus *P. putida* und *S. enterica* hergestellt wurden, erzeugten vergleichsweise geringe, aber quantifizierbare mNeonGreen-Fluoreszenzintensitäten.

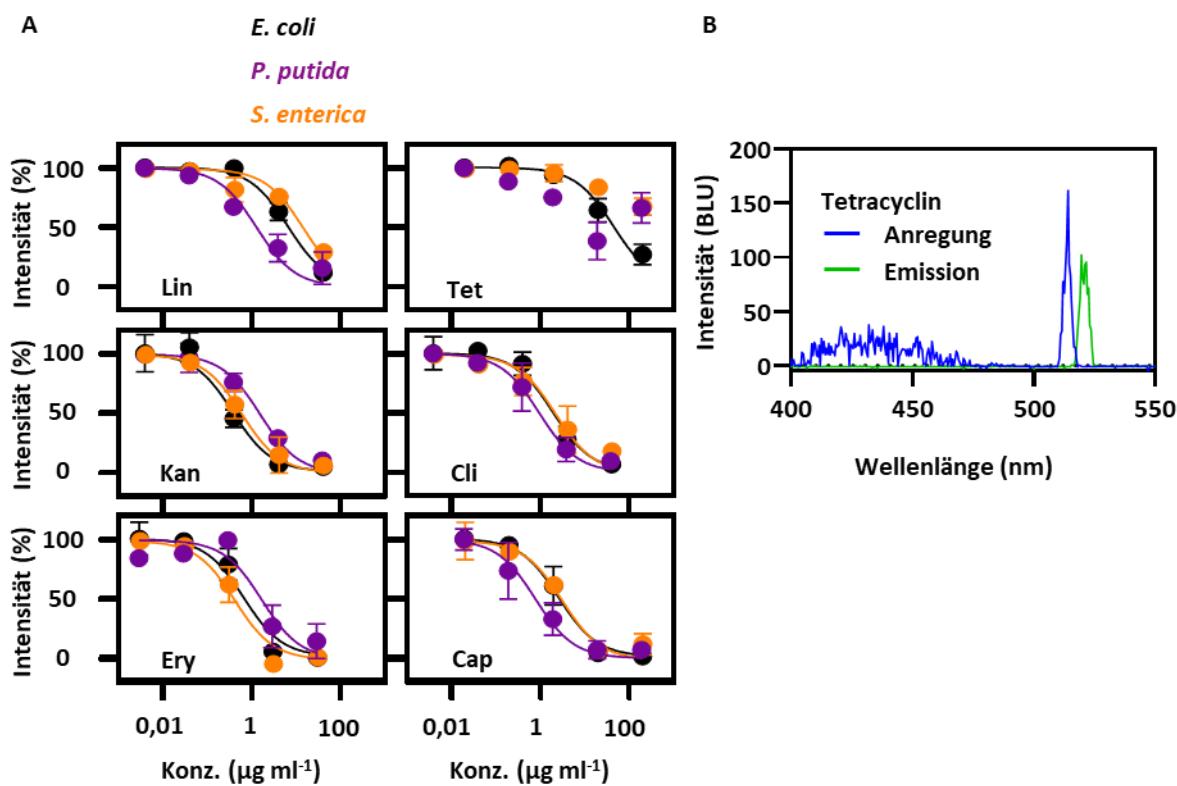
## Ergebnisse



**Abbildung 4.16:** Optimierung der zellfreien mNeonGreen-Produktion unter Verwendung eines S30-Extrakts aus *P. putida* für die Verwendung in einem Ein-Kompartiment-System. Angepasste Parameter waren: **A.**  $Mg^{2+}$ -Konzentration, **B.**  $K^+$ -Konzentration, **C.** Reaktionstemperatur, **D.** Inkubationszeit, **E.** Menge des Plasmids. Die Fluoreszenzintensität wird als beliebige bildgebende Lichteinheiten (BLU) (**A**) oder als relative, hintergrundkorrigierte Intensität angegeben, die auf die mit den ursprünglichen Reaktionsbedingungen erreichte Intensität normalisiert ist (**B.-E.**). Die Hintergrundfluoreszenz wurde aus *wells* ohne GFP-kodierende Plasmid-DNA ermittelt. Die violetten Balken zeigen die für die nachfolgenden Screening-Experimente gewählten Bedingungen an. Die dargestellten Daten in **B.**, **C.** und **D.** wurden als arithmetisches Mittel  $\pm$  S.E.M. aus zwei technischen Replikaten berechnet. **F.** Relative mNeonGreen-Fluoreszenzintensität, die mit S30-Extrakten aus *S. enterica* und *P. putida* im Vergleich zu *E. coli* erzielt wurde.

#### 4.1.12 Transfer des Translation-Assays für *Pseudomonas*- und *Salmonella*-Spezies

Die Antibiotika mit dem *Target* der ribosomalen Proteinbiosynthese wie Linezolid, Kanamycin, Clindamycin, Erythromycin und Chloramphenicol hemmten dosisabhängig die mNeonGreen-Translation an Ribosomen von *P. putida* und *S. enterica* (Abbildung 4.17 A; Tabelle 4.3). Bei Tetracyclin war die Hemmungskurve jedoch nicht sigmoidal (Abbildung 4.17 B). Dieser Effekt wurde bereits früher beobachtet (Fyfe *et al.* 2012). Bei einer Messung der intrinsischen Fluoreszenz von Tetracyclin wurde festgestellt, dass diese ähnliche Anregungs- und Emissionswellenlängen wie bei den mNeonGreen- oder GFP-Fluorophoren aufweisen (Abbildung 4.17 B). Dies erklärt, dass die intrinsische Fluoreszenz von Tetracyclin oder anderen fluoreszierenden Molekülen mit zunehmender Substanzkonzentration interferieren kann, wenn das Auslesesignal in Richtung einer starken Hemmung der Translation schwächer wird.



**Abbildung 4.17:** Dosis-Wirkungsbeziehung von translationshemmenden Arzneistoffen auf die mNeonGreen-Fluoreszenz von S30-Extrakten aus *S. enterica*-, *P. putida*- und *E. coli* (A.) und das Fluoreszenz-Emissions-/Erregungsspektrum von Tetracyclin (B.). Abkürzungen der Verbindungen: Lin, Linezolid; Tet, Tetracyclin; Kan, Kanamycin; Cli, Clindamycin; Ery, Erythromycin; Cap, Chloramphenicol.

## Ergebnisse

**Tabelle 4.3:** Inhibitoren-Konzentrationen (MHK,  $IC_{50}$ ;  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ; n.b. = nicht bestimmbar) von *E. coli*, *P. putida* und *S. enterica*.

	<i>E. coli</i>			<i>S. enterica</i>		<i>P. putida</i>	
	MHK	$IC_{50, GFP}$	$IC_{50, mNeon}$	MHK	$IC_{50, mNeon}$	MHK	$IC_{50, mNeon}$
Linezolid	64	$3,7 \pm 0,4$	$4,1 \pm 0,3$	0,25	$14,3 \pm 4,2$	0,25	$1,3 \pm 0,5$
Tetracyclin	4	$56 \pm 4$	$45 \pm 9$	$< 0,125$	n.b.	4	n.b.
Kanamycin	8	$0,3 \pm 0,1$	$0,4 \pm 0,1$	$> 64$	$0,6 \pm 0,1$	$< 0,125$	$1,6 \pm 0,2$
Clindamycin	64	$2,2 \pm 0,3$	$2,0 \pm 0,4$	$< 0,125$	$2,2 \pm 0,7$	0,25	$1,0 \pm 0,2$
Erythromycin	8	$0,2 \pm 0,1$	$0,7 \pm 0,2$	16	$0,4 \pm 0,1$	$< 0,125$	$1,7 \pm 0,9$
Chloramph.	0,125	$1,8 \pm 0,4$	$2,6 \pm 0,5$	0,25	$3,0 \pm 0,7$	$< 0,125$	$0,8 \pm 0,2$

### 4.1.13 Evaluierung und Validierung einer fluoreszenz-basierten *in vitro*-Screening-Plattform für antibakterielle Inhibitoren

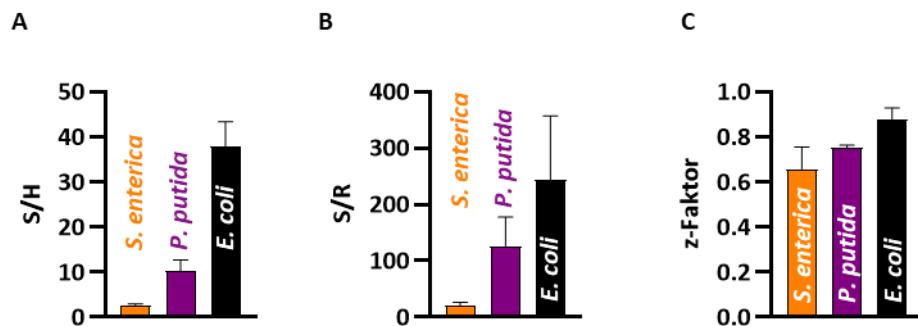
Beim Einsatz von Hochdurchsatzmethoden werden häufig bis zu 50.000 Substanzen hinsichtlich eines möglichen *Hits* untersucht (Caraus *et al.* 2015). Ein *Hit* ist eine Substanz, welche das Signal im Vergleich zu einer Kontrolle oberhalb einer festgelegten Schwelle inhibiert oder aktiviert. Zur Überprüfung der Qualität einer Hochdurchsatzmethode können verschiedene statistische Parameter wie das Signal-Hintergrund-Verhältnis, das Signal-Rausch-Verhältnis oder der z-Faktor herangezogen werden (Zhang *et al.* 1999).

Als erste Schritte zur Evaluierung einer Hochdurchsatzmethode wurden die Signal-Hintergrund- und Signal-Rausch-Verhältnisse ermittelt. Das Signal wurde im Assay als dasjenige Signal definiert, welches GFP bzw. mNeonGreen in Abwesenheit eines Inhibitors erzielte. Der Hintergrund wurde aus *wells* bestimmt, welche keine codierende Plasmid-DNA für GFP oder mNeonGreen enthielten. Das Rauschen wurde bestimmt, indem die Standard-Abweichung des Hintergrunds berechnet wurde. Je höher die Verhältnisse sind, desto eher eignet sich die Methode zur Identifizierung neuer *Hits* (Zhang *et al.* 1999). Im Verlauf der Arbeit wurde das Signal- zu Hintergrund-Verhältnis verbessert. Für einen S30-Extrakt aus *S. enterica* wurde das Signal von 2,1 auf  $2,6 \pm 0,4$ , für *P. putida* von 2,7 auf  $10,3 \pm 2,4$  und für *E. coli* von 4,8 auf  $37,8 \pm 5,5$  optimiert (4.1.3, 4.1.8, 4.1.11) (**Abbildung 4.18 A**). Das Signal-Rausch-Verhältnis lag im optimierten Assay bei einem S30-Extrakt aus *S. enterica* bei  $20,7 \pm 5,6$ , aus *P. putida* bei  $126 \pm 51$  und aus *E. coli* bei  $244 \pm 112$  (**Abbildung 4.18 B**).

Ein weiteres, mittlerweile als Goldstandard anerkanntes Kriterium, stellt der z-Faktor dar, welcher von Zhang *et al.* (1999) entwickelt wurde. Der z-Faktor hat sich zur Evaluierung und Validierung von Hochdurchsatzmethoden etabliert, da hierbei neben dem dynamischen Bereich des Signals auch die Variabilität der Probe und des Hintergrunds mit einbezogen werden. Ein, theoretisch betrachtet, idealer Assay liegt dann vor, wenn der z-Faktor bei 1 liegt. Exzellente Assays weisen einen z-Faktor von

## Ergebnisse

mindestens 0,5 auf. Im Zusammenhang der *in vitro*-Screening Plattform auf Grundlage eines ribosomalen Extrakts wurde in drei unabhängigen biologischen Experimenten aus *E. coli* ein z-Faktor von  $z = 0,88 \pm 0,05$  gemessen, aus *P. putida*  $z = 0,75 \pm 0,05$  und aus *S. enterica*  $z = 0,66 \pm 0,10$  berechnet (3.3.2.1) (Abbildung 4.18 C).



**Abbildung 4.18:** Statistische Evaluierung der entwickelten, optimierten Hochdurchsatzmethoden auf Grundlage ribosomaler Extrakte von *S. enterica*, *P. putida* und *E. coli*. **A.** Signal-Hintergrund-Verhältnis **B.** Signal-Rausch-Verhältnis **C.** z-Faktor. Gezeigt ist das arithmetische Mittel  $\pm$  S.E.M. aus drei unterschiedlichen Fermentationsprozessen (*E. coli*) bzw. drei Replikaten (*S. enterica*, *P. putida*).

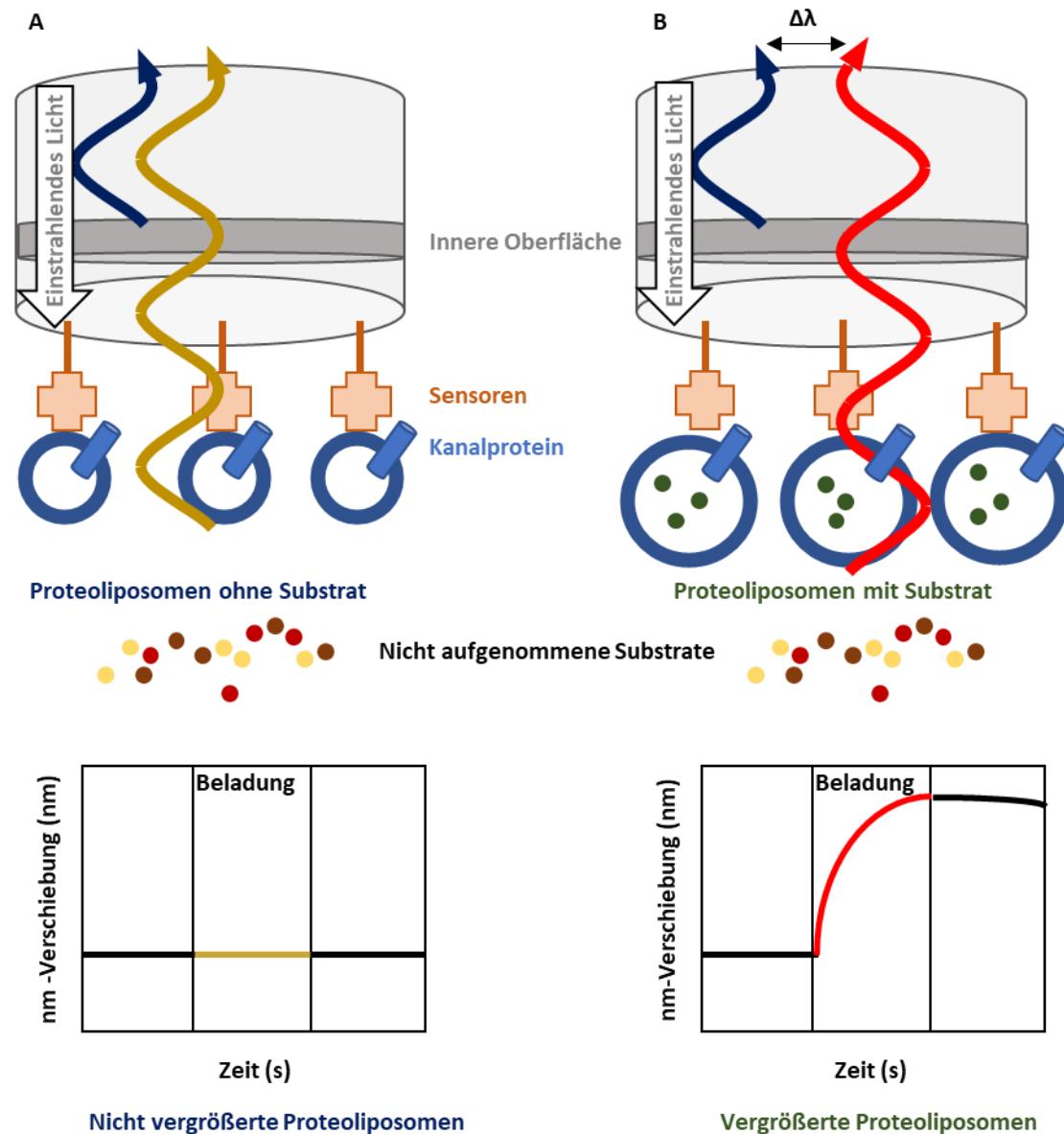
## 4.2 Entwicklung einer Hochdurchsatzmethode für die Entdeckung neuartiger Substrate für Membranproteine

Im Zweiten Teil der Arbeit war das Ziel ein *Screening*-Verfahren zur Entdeckung neuer Substrate für Transporter oder Kanäle auf Grundlage der BLI zu entwickeln. Die BLI wurde bisher vor allem für Affinitätsuntersuchungen eines Wirkstoffs zu seinem *Target* eingesetzt. Da die BLI für Hochdurchsatzmethoden im 96-well-Format geeignet ist und das System wenig störanfällig ist (Concepcion *et al.* 2009; Shah *et al.* 2014), sollte überprüft werden, ob Transportvorgänge oder Diffusionsvorgänge bei Nutzung von Proteoliposomen mit der BLI messbar sind. Dies würde eine neue Anwendung der BLI darstellen. Weiterhin stünde eine neues Substrat-*Screening*-Verfahren für Membranproteine zur Verfügung. Bei der BLI wird das Prinzip genutzt, dass wenn ein Analyt an einen Sensor bindet, es zu einer Änderung der Schichtdichte und -dicke kommt, sodass eine nm-Verschiebung resultiert.

Dafür werden Proteoliposomen, welche ein rekonstituiertes Membranprotein enthielten, an Sensoren für die BLI gebunden. Für die Bindung an den Sensor kann beispielweise der His<sub>10</sub>-tag des zellfrei synthetisierten Membranproteins an einen Anti-His-Sensor wie auch biotinilyierte Lipide an Streptavidin- (SA)-Sensoren binden. Im nächsten Schritt werden die gebundenen Proteoliposomen unterschiedlichen Messpuffern mit möglichen Substraten ausgesetzt. Die Abbildung 4.19 A verdeutlicht das Messprinzip und zeigt den zu erwartenden Kurvenverlauf. Wenn kein Substrat durch das Membranprotein der Proteoliposomen diffundieren sollte, sollte es zu keiner Veränderung des Signals kommen. Ungebundene Moleküle haben keinen Einfluss auf die nm-Verschiebung. Wenn sich ein mögliches Substrat in Lösung befindet, sollte es zum Anschwellen der Proteoliposomen kommen,

## Ergebnisse

da das Substrat entlang seines Konzentrationsgradienten in die Proteoliposomen penetrieren kann oder transportiert wird. Als Folge wird erwartet, dass es zu einer nm-Verschiebung kommt (**Abbildung 4.19 B**). Wenn die nun gebundenen Proteoliposomen wieder in den Puffer ohne Substrat überführt werden, wurde erwartet, dass auf Grund des veränderten Gradienten das Substrat wieder ausgeschleust werden sollte oder penetriert. Folglich sollten die Proteoliposomen wieder schrumpfen und nm-Verschiebung sinken.



**Abbildung 4.19:** Prinzip des *Screening*-Verfahren zur Entdeckung neuer Substrate für Transporter oder Kanäle auf Grundlage der BLI mit Hilfe von Proteoliposomen. **A.** Gebundene Proteoliposomen, welche kein Substrat transportieren, führen zu keiner nm-Verschiebung. **B.** Gebundene Proteoliposomen, welche ein Substrat transportieren und anschwellen. Es kommt zu einer nm-Verschiebung.

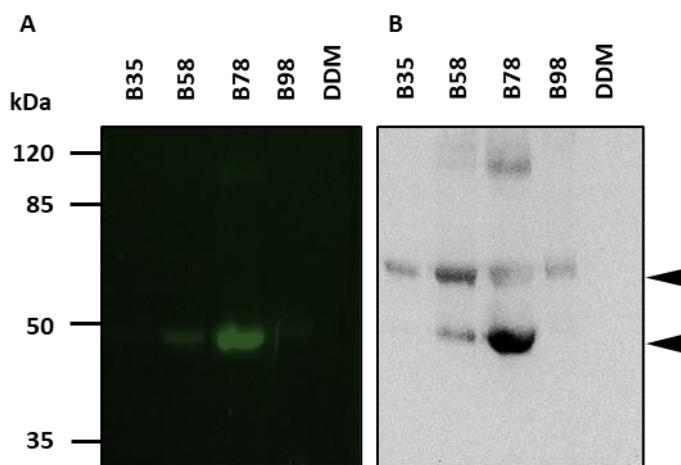
#### 4.2.1 Brij 78 eignet sich zur zellfreien Synthese von PfAQP1

Zur Etablierung der Methode wurde mit dem Aquaglyceroporin aus dem Malaria-Erreger und erythrozytären Parasiten *Plasmodium falciparum* (PfAQP1) begonnen, da PfAQP1 zu den vermutlich am besten charakterisierten Solut-leitenden Aquaporinen (Song *et al.* 2012) gehört. Aquaporine bieten im Vergleich zu Cotransportern den Vorteil, dass die Leitgeschwindigkeit der Solute deutlich erhöht ist. So passieren  $10^6$ – $10^7$  Moleküle pro Sekunde Aquaporine, während Cotransporter nur  $10^2$ – $10^4$  Moleküle pro Sekunde transportieren (Chrispeels *et al.* 1999). Für PfAQP1 sind sowohl Solute wie Wasser, Glycerol und Zuckeralkohole bis zu einer Länge von fünf Kohlenstoffatomen (Hansen *et al.* 2002) als auch Nicht-Solute wie Sorbitol bekannt (Song *et al.* 2012). Weiterhin bietet PfAQP1 den Vorteil, dass ungeladene Moleküle im Vergleich zu geladenen Molekülen geleitet werden (Song *et al.* 2012). Dies vereinfacht die Etablierung der BLI als neuartige Methode für Transport- und Diffusionsvorgänge. Aus der Literatur ist zudem bekannt, dass PfAQP1 sich mit dem Detergens Brij 78 zellfrei herstellen lässt. (Müller-Lucks *et al.* 2012). Nach der zellfreien Proteinsynthese wurde das Membranprotein in Liposomen rekonstituiert. Bevor weitere Untersuchungen am BLI durchgeführt wurden, wurde die Funktionalität des Aquaporins mit Hilfe der *stopped-flow*-Methode nachgewiesen. Die *stopped flow*-Methode stellt eine etablierte Verfahren zum Nachweis der Funktionalität von Aquaporinen anhand des Schrumpf- und Schwellverhalten in Liposomen dar (Florio *et al.* 2022).

PfAQP1 wurde mittels der Detergens-basierten zellfreien Proteinsynthese hergestellt. Um größere Mengen an Protein zellfrei zu synthetisieren, wurde das *continuous-exchange-cell-free*-System (CECF) genutzt (3.3.1). Da aus der Literatur bereits bekannt war, dass Brij 78 zur Stabilisierung des Membranproteins für die zellfreie Synthese von PfAQP1 geeignet ist, wurde überprüft, ob sich dieses Ergebnis reproduzieren lässt. Dazu wurde auf ein Fusionskonstrukt von PfAQP1 mit einem C-terminalen GFP zurückgegriffen. Eine Ausbildung des Fluorophors von GFP indiziert, dass sich das Membranprotein lange genug in Lösung befand und solubilisiert wurde. Detektiert werden kann die GFP-vermittelte Fluoreszenz nach milder Probenbehandlung mit SDS mit Hilfe einer elektrophoretischen Trennung mit anschließender In-Gel-Fluoreszenz (Drew *et al.* 2005; Geertsma *et al.* 2008; Müller-Lucks *et al.* 2012).

Es wurde PfAQP1-ΔGFP-M1-His<sub>10</sub> zellfrei im analytischen Ansatz unter Verwendung der Detergenzien Brij 35, Brij 58, Brij 78, Brij 98 und DDM hergestellt (3.3.1.2). Über eine Ni<sup>2+</sup>-NTA-Affinitätschromatographie wurde das Protein gereinigt (3.3.3), über eine SDS-PAGE (3.2.2) elektrophoretisch getrennt und anschließend mit einer In-Gel-Fluoreszenz (3.2.5) und einem Western Blot (3.2.3) detektiert. PfAQP1-ΔGFP-M1 weist eine theoretische Größe von 54,9 kDa auf. In der In-Gel-Fluoreszenz erscheint dieses Protein als fluoreszierende Bande bei einer scheinbaren Größe von ungefähr 48 kDa und im Western Blot als Doppelbande bei ungefähr 48 kDa und 55 kDa (**Abbildung 4.20 A-B**). Mit Brij 78 wurde dabei, wie erwartet, das höchste Fluoreszenzsignal erzielt. Die untere Bande deutet vermutlich auf das korrekt gefaltete Protein hin. Die obere Bande deutet auf ein fehlgefaltetes, weniger kompaktes Protein hin (Geertsma *et al.* 2008; Müller-Lucks *et al.* 2012). Der Anteil zwischen vermutlich fehl- und korrekt-gefaltetem Protein erwies sich bei Brij 78 insbesondere im Vergleich zu Brij 58 als am besten. Weiterhin wurde eine Bande, welche auf eine Dimerisierung des Fusionsproteins hindeutet, bei ungefähr 100 kDa beobachtet.

## Ergebnisse



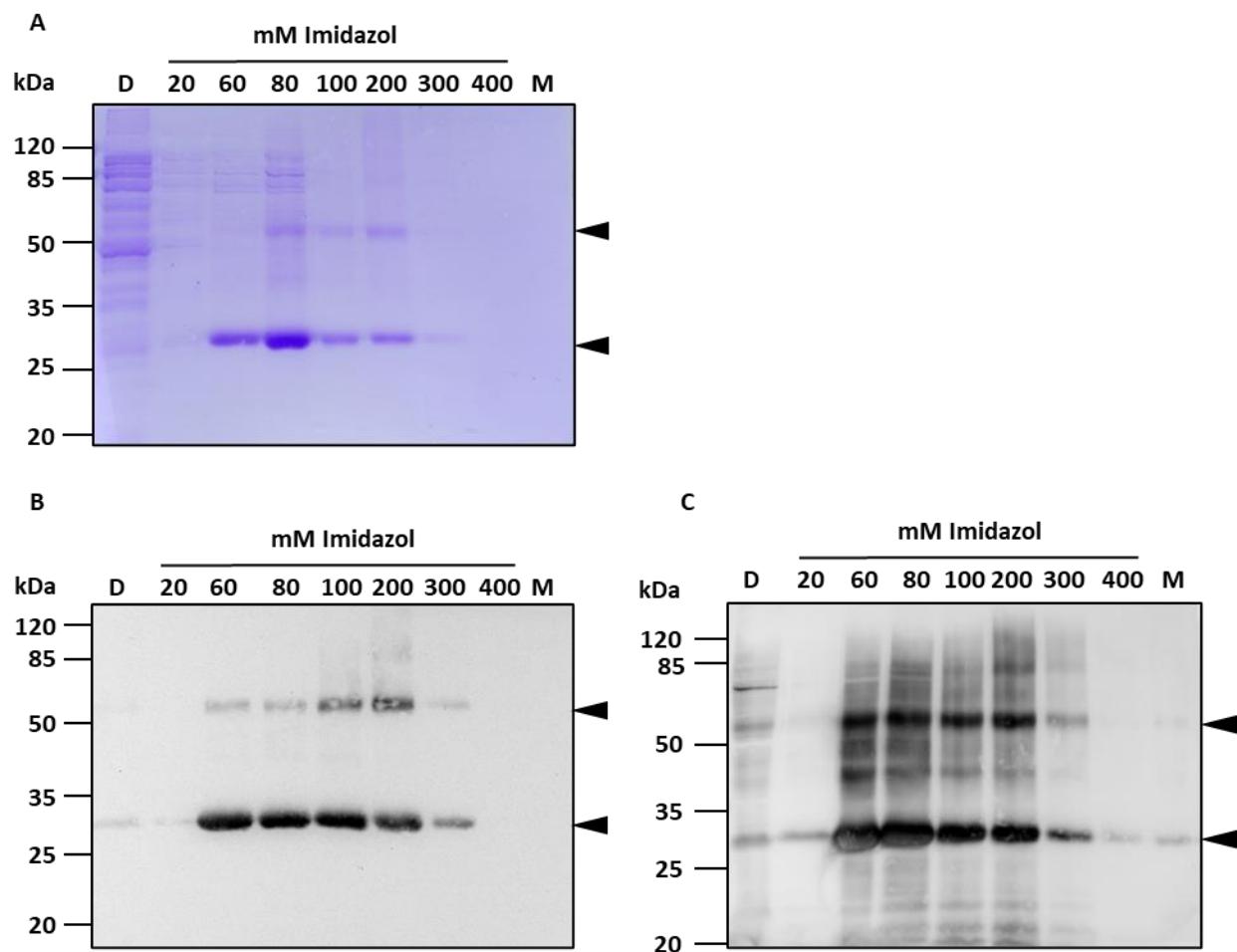
**Abbildung 4.20:** Detergenzien-Screening für PfAQP1-ΔGFP M1. **A.** In-Gel-Fluoreszenz und **B.** Western Blot mit einem Anti-Penta-His-Antikörper B: Brij.

### 4.2.2 Die Zellfreie Proteinsynthese von PfAQP1 führt zu Ausbeuten im Milligramm-Bereich

Nachdem PfAQP1-ΔGFP M1-His<sub>10</sub> sich im analytischen Maßstab zellfrei produzieren ließ, wurde PfAQP1 im nächsten Schritt im präparativen Ansatz (3.3.1.1) synthetisiert und gereinigt (3.3.3). Da der Faltungsindikator nur für die Überprüfung der geeigneten Bedingungen für die zellfreie Proteinsynthese genutzt wurde, wurde im Weiteren auf diesen verzichtet. Die zellfreie Synthese und Reinigung wurden nach einer SDS-PAGE (3.2.2) mit einer Coomassie-Färbung (3.2.4) überprüft. Die erfolgreiche Synthese und Reinigung von PfAQP1, welches eine theoretische Größe von 28 kDa aufweist, wurde gezeigt (Abbildung 4.21 A). Das Protein eluierte zum größten Teil bei einer Imidazol-Konzentration zwischen 60 mM bis 300 mM und wurde vollständig von der Ni<sup>2+</sup>-NTA-Agarose-Matrix entfernt. Weiterhin wurde ein Western-Blot mit einem gegen den N-terminalen HA-tag und den C-terminalen His<sub>10</sub>-tag gerichteten Antikörper durchgeführt (3.2.3) (Abbildung 4.21 B-C). Im Western-Blot migrierte PfAQP1 als Monomer bei einer scheinbaren Größe von ungefähr 28 kDa. Die Ergebnisse der erfolgreichen Reinigung von PfAQP1 wurden sowohl mit Hilfe der Western-Blot-Analytik als auch der Coomassie-Färbung gezeigt und deckten sich untereinander. Im Western-Blot und in der Coomassie-Färbung wurden mögliche Dimere von PfAQP1, welche resistent gegenüber dem ionischen Detergens SDS waren, bei ungefähr 55 kDa nachgewiesen (Abbildung 4.21 A-C).

Es wurden die Elutionsfraktionen mit 80 mM, 100 mM und 200 mM Imidazol für die Rekonstitution in Liposomen (3.5.1) ausgewählt und konzentriert (3.2.7). Dabei wurde ebenfalls das Imidazol auf eine Konzentration von unter 1 mM verdünnt, um die Dichtigkeit der Liposomen zu erhöhen. Es wurde eine Ausbeute zwischen 800 µg bis 2000 µg des gereinigten Gesamtproteins erhalten.

## Ergebnisse



**Abbildung 4.21:** Zellfreie Synthese im präparativen Ansatz und Reinigung von PfAQP1. **A.** Coomassie-Färbung **B.** Western Blot mit Anti-Penta-His-Antikörper und **C.** Anti-HA-Antikörper. D: Durchfluss, M:  $\text{Ni}^{2+}$ -NTA-Agarose-Matrix.

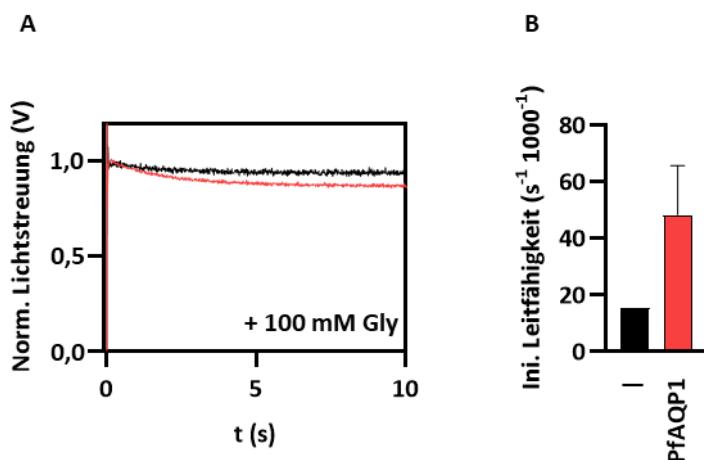
### 4.2.3 Überprüfung der Funktionalität von zellfrei synthetisiertem PfAQP1 mit Hilfe der *stopped flow*-Methode

Nachdem PfAQP1 qualitativ und quantitativ zellfrei synthetisiert wurde, erfolgte die Rekonstitution von 100  $\mu\text{g}$  Protein in die Liposomen (3.5.2), welche aus *E. coli*-Lipiden gewonnen wurden. Im Anschluss wurden die Liposomen extrudiert und mittels einer *stopped flow*-Messung (3.5.5) über einen hyperosmotischen Gradienten von 100 mM Glycerol funktionell charakterisiert. Bei der *stopped flow*-Methode wird die Änderung des Lichtstreuung in Abhängigkeit der Zeit detektiert.

Es wurde sowohl für die Proteo- als auch Leerliposomen ein biphasischer Kurvenverlauf aufgezeichnet (Abbildung 4.22 A). Zu Beginn kam es zum Schrumpfen der Liposomen, indem Wasser als Neutralteilchen durch passive Diffusion austrat. Dies führte zu einem initialen, exponentiellen Anstieg des Streulichtsignals. Anschließend wurde, sofern ein Aquaporin wie PfAQP1 in den Liposomen rekonstituiert war, der chemische Gradient von Glycerol durch passive Diffusion ausgeglichen. Dabei kam es zu einem Kurvenabfall. Leerliposomen, die kein Kanalprotein enthielten, waren nicht in der

## Ergebnisse

Lage den chemischen Gradienten auszugleichen. Allerdings wurde eine gewisse Undichtigkeit der Leerliposomen gegenüber Glycerol beobachtet (**Abbildung 4.22 A**). Die Proteoliposomen zeigten eine höhere initiale Leitfähigkeit für Glycerol als die Leerliposomen (**Abbildung 4.22 B**), sodass nach Abzug der Leerliposomen-Durchlässigkeit eine initiale Leitfähigkeit von  $32,9 \pm 11,7 \text{ s}^{-1} 1000^{-1}$  für PfAQP1 in Proteoliposomen gemessen wurde.



**Abbildung 4.22:** hyperosmotisches Schwellverhalten von PfAQP1-Proteoliposomen und Leerliposomen gegenüber einem Gradienten von 100 mM Glycerol (Gly). **A.** Normierte Lichtstreuungsmessung von Proteo- (rot) und Leerliposomen (schwarz). **B.** Initiale Leitfähigkeit von Glycerol ( $N = 2$ ). Abweichungen sind als S.E.M. dargestellt.

### 4.2.4 Bindung von biotinilylierten Liposomen an Streptavidin-Sensoren

Nachdem sich die Funktionalität von zellfreiem PfAQP1 in Proteoliposomen bestätigt hatte (4.2.3), wurde im nächsten Schritt eine neu produzierte Charge an PfAQP1-Proteo- und Leerliposomen mit Hilfe der BLI näher charakterisiert. Um die Methode hinsichtlich der Entwicklung neuer Substrate für Transporter und Kanäle zu etablieren, war es zuerst notwendig, eine ausreichende Beladung der Sensoren mit Liposomen zu erreichen. Da das Signal der BLI mit der Schichtdicke und -dichte der beladenen Sensoren korreliert, wurde in Hinblick auf eine gleichmäßige Beladung zur Homogenisierung die Liposomen-Charge mit einem 200 nm Filter extrudiert (3.5.2). Da der Brechungsindex das Signal der BLI nur minimal beeinflusst, können Puffer mit hohen Konzentrationen an Glycerol oder Saccharose eingesetzt werden (Kumaraswamy *et al.* 2015), sodass die Pufferzusammensetzung des Liposomenpuffers für die BLI-Methode nicht verändert wurde.

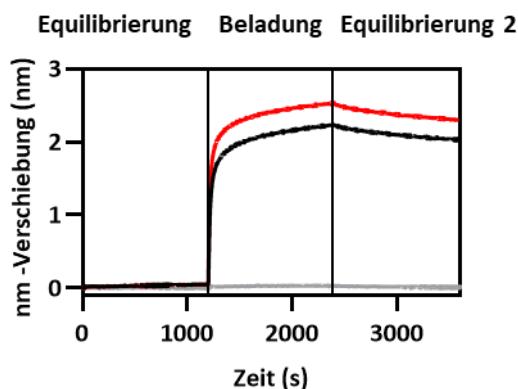
Die Beladung der Liposomen an die Sensoren wurde in drei Schritte unterteilt: Equilibrierung der Sensoren im Liposomenpuffer, Beladung der Liposomen an den Sensor sowie einer Equilibrierung der beladenen Sensoren im Liposomenpuffer. Letzteres diente zur Überprüfung der Bindungsdauer im Hinblick auf weitere Untersuchungen (3.6). Beim Equilibrieren der SA-Sensoren für 1200 s im Liposomenpuffer lag das Rauschen der Baseline bei nur 0,04 nm (**Abbildung 4.23**).

Für die Beladung von Liposomen stehen drei verschiedene Strategien zur Verfügung. Einerseits können die Liposomen über ihre lipophile Struktur an die Oberfläche gebunden werden. Hierfür stehen Kits zur Verfügung, welche die kovalente Bindung von Alkyl-Gruppen an den Sensor ausnutzen (Wallner *et*

## Ergebnisse

al. 2014). Jedoch kann es dabei zum Bruch der Liposomen-Struktur, unvollständiger Oberflächen-Regenerierung sowie unspezifischen Bindungen kommen (Cooper *et al.* 2000; Tanaka *et al.* 2013). Als weitere Strategie können *tag*-beladene Lipide, wie biotinilyierte Lipide, eingesetzt werden, welche bereits zur Herstellung der Liposomen eingesetzt werden. Diese können an SA-Sensoren über eine starke nicht kovalente Bindung binden (Besenicar *et al.* 2006). Diese Strategie hat den Nachteil, dass ein optimales Biotin-Lipid-Verhältnis gefunden werden. Außerdem muss ein *Spacer*-Biotin an die funktionellen Gruppen der Lipide angepasst werden und es kann zur einer Beeinflussung der Lipid-Membran durch das Biotin kommen (Kuhn *et al.* 2012). Als weitere Strategie können die Proteoliposomen über den His<sub>10</sub>-*tag* des Proteins mit Anti-His-Sensoren beladen werden. Diese Strategie hat jedoch den Nachteil, dass Leerliposomen, welche kein rekonstituiertes Protein und somit keinen Protein-*tag* aufweisen, nicht als Kontrolle eingesetzt werden können. Da durch den Autor (Höger, 2018) sowie weitere Arbeitsgruppen die Bindung von biotinilylierten Proteoliposomen an SA-Sensoren bereits gezeigt wurde, wurde sich für die Strategie der Biotinilylierung mit einer Biotin-Lipid-Konzentration von 1 % sowie SA-Sensoren entschieden (Wallner *et al.* 2014; Wallner *et al.* 2013). Es wurden biotinilyierte PfAQP1-Proteoliposomen eingesetzt (3.5.1).

Es wurden sowohl die PfAPQ1-Proteoliposomen als auch die Leerliposomen an die SA-Sensoren mit einem nm-Verschiebung von 2,5 nm bzw. 2,2 nm erfolgreich gebunden (**Abbildung 4.23**). Beim Equilibrieren der beladenen Sensoren wurde nach 1400 s noch eine nm-Verschiebung von 2,3 nm bzw. 2,0 nm für die PfAQP1-Proteoliposomen bzw. Leerliposomen detektiert. Ein Sensor, welcher während der gesamten Messdauer in Kontakt mit dem Liposomenpuffer stand, zeigte keine Veränderung des Signals. Die Beladung der Sensoren mit biotinilylierten Liposomen war folglich stabil und hielt über einen längeren Zeitraum an.



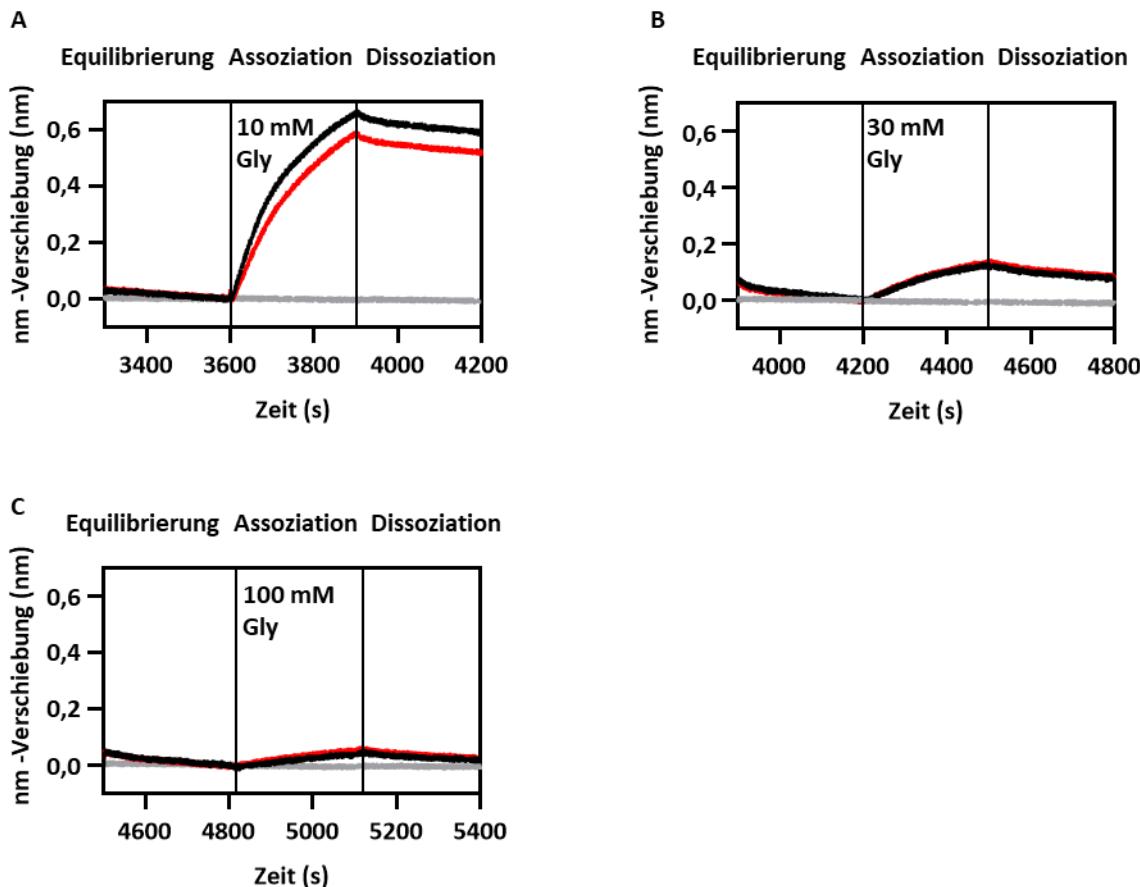
**Abbildung 4.23:** Beladung von biotinilylierten Leerliposomen (schwarz) sowie biotinilylierten Proteoliposomen, welche mit PfAQP1 rekonstituiert wurden (rot) an Streptavidin (SA)-Sensoren. Weiterhin wurde ein Sensor in dem Liposomenpuffer (grau) getaucht.

### 4.2.5 Schrumpf- und Schwellverhalten von beladenen Liposomen-Sensoren

Die zuvor beladenen Sensoren (4.2.4) wurden im Anschluss verschiedenen Messpuffern, die im Vergleich zum Liposomenpuffer anteilig Glycerol statt Saccharose enthielten, ausgesetzt. Sowohl die PfAQP1-Proteoliposomen als auch die Leerliposomen führten zu einem Anstieg der nm-Verschiebung von ungefähr 0,60 nm bzw. 0,65 nm gegenüber einem Messpuffer, der 10 mM Glycerol und 190 mM

## Ergebnisse

Saccharose statt 200 mM Saccharose enthielt (**Abbildung 4.24 A**). Der Anstieg der nm-Verschiebung im Vergleich zur Basislinie könnte auf ein Anschwellen der Liposomen hindeuten. Diese war allerdings nicht spezifisch auf das in die Proteoliposomen integrierte PfAQP1 zurückzuführen, da Proteo- wie Leerliposomen eine vergleichbare nm-Verschiebung zeigten.



**Abbildung 4.24:** Die mit PfAQP1-Proteoliposomen (rot) oder Leerliposomen (schwarz) beladenen SA-Sensoren ( $N = 2$ ) wurden in verschiedene Messpuffer, welche äquimolar gegenüber dem Liposomenpuffer waren und anteilig Glycerol **A.** 10 mM **B.** 30 mM oder **C.** 100 mM Glycerol statt Saccharose enthielten. Ein Referenz-Sensor befand sich über die gesamte Messdauer in dem Liposomenpuffer (grau). Gly = Glycerol.

Im nächsten Schritt wurden die Sensoren wieder in den Liposomenpuffer ohne Glycerol getaucht, um den Dissoziationsvorgang zu messen. Dabei kam es sowohl bei den Proteo- als auch Leerliposomen zu einer leichten Abnahme der nm-Verschiebung (**Abbildung 4.24 A**). Das Signal verließ bei den PfAQP1-Proteoliposomen bei 0,52 nm und bei den Leerliposomen bei 0,59 nm deutlich über der Basislinie.

Die zuvor verwendeten Liposomen wurden anschließend in Messpuffer mit 30 mM Glycerol bzw. 100 mM Glycerol getaucht (**Abbildung 4.24 B-C**). Zur Ermittlung der nm-Verschiebung wurde die zuvor aufgenommene Basislinie manuell auf 0 gesetzt. Dabei kam es beim Assoziations-Vorgang sowohl für die PfAQP1-Proteoliposomen als auch den Leerliposomen zu einem Anstieg der nm-Verschiebung auf 0,13 nm (30 mM Glycerol) bzw. 0,05 nm (100 mM Glycerol). Im nächsten Schritt wurden die Sensoren wieder in den Liposomenpuffer ohne Glycerol getaucht. Es kam zu einer Abnahme beim Dissoziations-Vorgang der nm-Verschiebung auf 0,08 nm (30 mM Glycerol) bzw. 0,04 nm (100 mM Glycerol).

## Ergebnisse

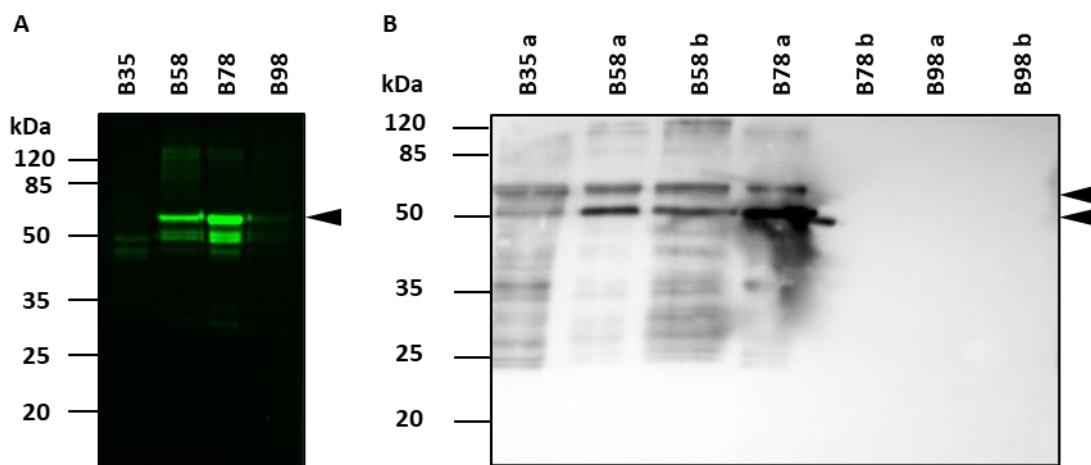
Eine Differenzierung zwischen Leer- und Proteoliposomen war nicht möglich und deutetet daraufhin, dass die Membran der Liposomen durchlässig war. Die Erhöhung der Dichtigkeit der Membran galt somit als besonders kritisch und wichtig für den weiteren Prozess. Die Herstellung neuer Chargen führte zu keiner Verbesserung der Dichtigkeit der Liposomen. Dabei stellte sich weiterhin eine Schwankung neu produzierter Liposomen-Chargen hinsichtlich der funktionellen Charakterisierung bzw. der initialen Transportrate an der *stopped flow* heraus.

Aus diesem Grund wurde auf ein weiteres Kanalprotein, das Aquaporin 2 aus *Trypanosoma brucei* (TbAQP2), zurückgegriffen. TbAQP2 wurde mit Hilfe von Hefe-Protoplasten bereits funktionell charakterisiert. Weiterhin steht mit Pentamidin ein nanomolarer Inhibitor zur Verfügung, welcher mehr Möglichkeiten in der funktionellen Charakterisierung eröffnet (Song *et al.* 2016).

### 4.2.6 Brij 78 eignet sich zur zellfreien Synthese von TbAQP2

TbAQP2 weist in analoger Weise zu PfAQP1 eine hohe initiale Leitfähigkeit für Glycerol und Wasser auf (Song *et al.* 2012), weswegen es als geeignet für die Entwicklung einer neuartigen Methode am BLI erachtet wurde. Zum weiteren Solut-Spektrum zählen Zuckeralkohole mit geringem sterischen Anspruch wie Erythritol und Ribitol, während längere Zuckeralkohole nicht geleitet werden (Uzcategui *et al.* 2004). Da TbAQP2 zuvor nicht zellfrei produziert wurde, wurde mit Hilfe eines Detergenzien-*Screenings* mit dem Fusionskonstrukt TbAQP2-ΔGFP-M1-His<sub>10</sub> (4.2.1) überprüft, ob die zellfreie Produktion geeignet ist und welche Detergenzien für die Stabilisierung des Membranproteins benötigt werden.

TbAQP2-ΔGFP-M1-His<sub>10</sub> wurde mit Hilfe der Detergenzien Brij 35, Brij 58, Brij 78 und Brij 98 produziert (3.3.1.2), gereinigt (3.3.3), über eine SDS-PAGE (3.2.2) elektrophoretisch getrennt und mit Hilfe einer In-Gel-Fluoreszenz (3.2.5) sowie mit Hilfe der Western Blot-Analytik (3.2.3) untersucht. Das Fusionsprotein mit einer theoretischen Größe von 67 kDa erschien in der In-Gel-Fluoreszenz als fluoreszierende Bande bei einer scheinbaren Größe von ungefähr 55 kDa und im Western Blot als Doppelbande bei ungefähr 55 kDa und 60 kDa unter Verwendung der Detergenzien Brij 58 und Brij 78 (**Abbildung 4.25 A-B**). Während die untere Bande vermutlich als korrekt gefaltetes Protein migriert wurde, stellt die obere Bande wahrscheinlich fehlgefaltetes Protein dar (Geertsma *et al.* 2008; Müller-Lucks *et al.* 2012). Der Anteil zwischen vermutlich fehl- und korrekt-gefaltetem Protein erwies sich bei Brij 78 als am besten, weswegen Brij 78 als weiteres Detergens für die zellfreie Proteinsynthese von TbAQP2 genutzt wurde.



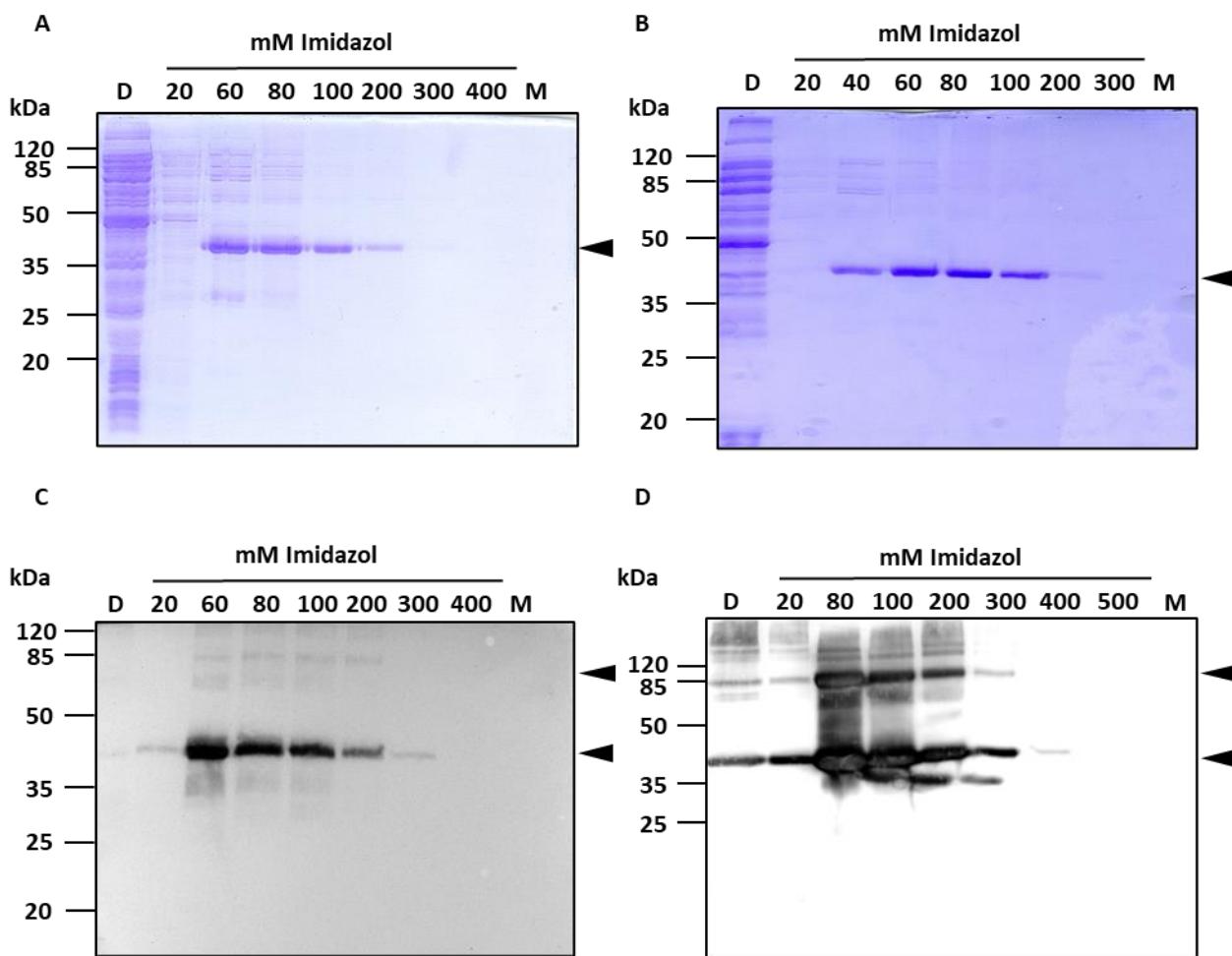
**Abbildung 4.25:** Detergenzien-Screening für TbAQP2- $\Delta$ GFP-M1-His<sub>10</sub>. **A.** In-Gel-Fluoreszenz und **B.** Western-Blot mit einem Anti-HA-Antikörper in einer Doppelbestimmung (a und b). B: Brij wie z.B. Brij 35.

#### 4.2.7 TbAQP2 führt in der zellfreien Proteinsynthese zu Ausbeuten im Milligramm-Bereich

TbAQP2 wurde im präparativen Ansatz mit Brij 78 zellfrei synthetisiert (3.3.1.1) und gereinigt (3.3.3). Zur Kontrolle der Synthese und Reinigung wurde eine SDS-PAGE (3.2.2) mit anschließender Coomassie-Färbung (3.2.4) durchgeführt. TbAQP2 wurde erfolgreich produziert und gereinigt (**Abbildung 4.26 A**). Das gereinigte Aquaporin mit einer theoretischen Größe von 40 kDa eluierte zwischen 60 mM und 200 mM Imidazol und wurde unter den durchgeführten Reinigungsbedingungen vollständig von der Ni<sup>2+</sup>-NTA-Matrix entfernt. Bei den weiteren Reinigungen wurde eine weiterer Waschschritt mit 40 mM Imidazol eingeführt (**Abbildung 4.26 B**). Weiterhin wurde ein Western-Blot mit einem Antikörper, der gegen den N-terminalen HA-Tag und den C-terminalen His<sub>10</sub>-Tag gerichtet war, durchgeführt (**Abbildung 4.26 C-D**). Es wurde das vollständig synthetisierte Protein über seinen N-terminalen HA-Tag und C-terminalen His<sub>10</sub>-Tag nachgewiesen. Mit Hilfe des HA-Tags und His<sub>10</sub>-Tags wurden potenzielle Dimere, welche resistent gegenüber SDS waren, detektiert.

Die Reinigungsfraktionen 80-200 mM bzw. 60-100 mM Imidazol wurden für die Rekonstitution in Liposomen (3.5.1) ausgewählt und aufkonzentriert (3.2.7). Es wurde eine Protein-Ausbeute zwischen 800 µg bis 2000 µg erhalten.

## Ergebnisse



**Abbildung 4.26:** Zellfreie Synthese im präparativen Ansatz und Reinigung von TbAQP2. **A.** und **B.** Coomassie-Färbung **C.** Western-Blot mit Anti-Penta-His-Antikörper und **D.** Anti-HA-Antikörper. D: Durchfluss, M =  $\text{Ni}^{2+}$ -NTA-Agarose-Matrix.

### 4.2.8 Durchlässigkeit von TbAQP2-Proteoliposomen und Leerliposomen gegenüber verschiedenen Zuckeralkoholen

Nach der zellfreien Proteinsynthese erfolgte die Rekonstitution der Proteine in die Liposomen. Zuvor hatte sich ein 200 mM Saccharose-haltiger Puffer (5 mM MES, 5 mM HEPES, 100 mM KCl, 200 mM Saccharose) für die Rekonstitution von Proteinen in Liposomen bewährt (Clement *et al.* 1981; Helmstetter *et al.* 2019). Zu Beginn der Arbeit wurde eine höhere Saccharose-Konzentration im Liposomenpuffer eingesetzt (50 mM MES, 50 mM HEPES, 1000 mM Saccharose, pH 6,8), um die Protein-Rekonstitution in die Liposomen weiter zu verbessern. Allerdings wurde bei einer Saccharose-Konzentration von 1000 mM nach Zentrifugation bei 140.000 g für 45 min, welches zur Entfernung des Detergents sowie zur Rekonstitution des Proteins in die Liposomen genutzt wurde, kein Pellet erhalten. Saccharose beeinflusste vermutlich auf Grund seiner hohen Viskosität die Sedimentationsgeschwindigkeit. Eine Verlängerung der Zentrifugationszeit auf 90 min führte zu unzureichenden Pellet-Ausbeuten. Aus diesem Grund wurde ein 200 mM Saccharose-haltiger Puffer eingesetzt (50 mM MES, 50 mM HEPES, 2000 mM Saccharose, pH 6,8) und das Pellet nach der

## Ergebnisse

Zentrifugation bei 140.000 g für 45 min in einem 1000 mM-haltigen Saccharose-Puffer resuspendiert. Auf Grund der hohen Viskosität des 1000 mM Saccharose-Puffers musste eine erhöhte Kraft zum Extrudieren eingesetzt werden. Dies führte dazu, dass ein recht hohes Probevolumen über die Scharniere aus dem Extruder verloren ging. Im weiteren Verlauf der Arbeit wurde deswegen der gesamte Prozess mit einem 200 mM Saccharose-haltigen Puffer gearbeitet.

Da eine gewisse Durchlässigkeit der vorherigen Liposomen-Präparationen sich als problematisch gezeigt hatte (4.2.3) und insbesondere für eine funktionelle Charakterisierung mit Hilfe der BLI als besonders kritisch bewertet wurde (4.2.5), wurden für die Herstellung von TbAQP2-Proteoliposomen 4Me 16:0 PC-Lipide statt der *E. coli*-Lipide eingesetzt. Für Lipide auf Basis von Diphyanoylphosphatidylcholin wurde keine Phasenübergangstemperatur vom Gel zum Flüssigkristall im Bereich von -120 °C bis +120 °C gemessen (Redwood *et al.* 1971). Somit sind derartige Lipide weniger fluid und führen zu einer höheren Membrandichtigkeit.

Im Vergleich zu den vorher genutzten *E. coli*-Lipiden wurde mit den 4Me 16:0 PC-Lipide nach der Rehydratisierung des Lipidfilms (3.5.1) eine deutlich trübere Lipid-Suspension gewonnen (**Abbildung 4.27**). Auch die hergestellten Liposomen (3.5.2) auf Basis der 4Me 16:0 PC-Lipide zeigten eine höhere OD<sub>600</sub>. Da die Trübung durch Lichtstreuung hervorgerufen wird, ist davon auszugehen, dass die Partikelgröße der 4Me 16:0 PC-Lipide bzw. der hergestellten Liposomen kleiner ist.

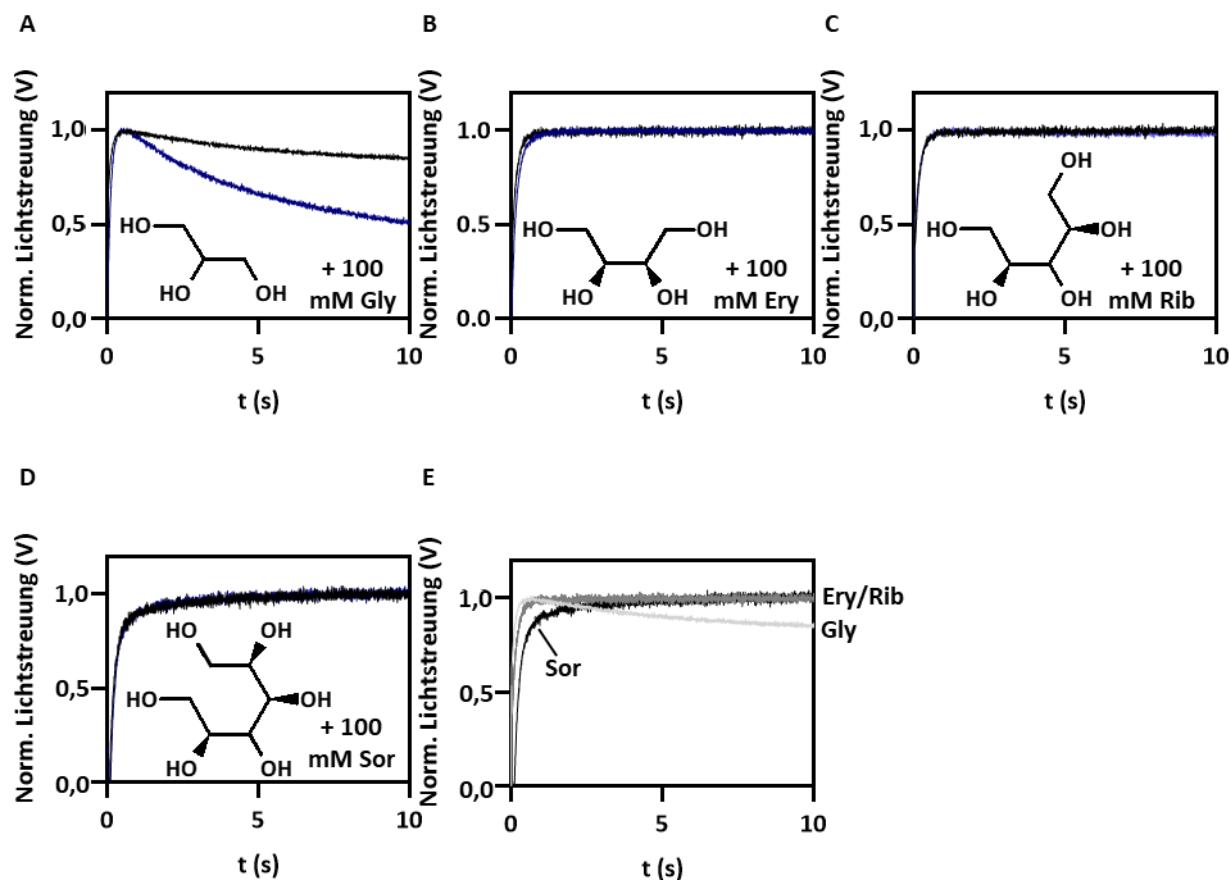


**Abbildung 4.27:** Vergleich der Lipidsuspension von *E. coli*-Lipiden zu 4Me 16:0 PC-Lipiden.

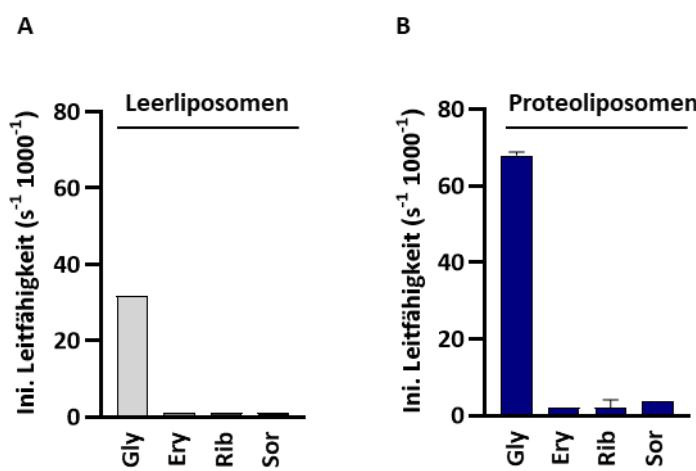
Die TbAQP2-Proteoliposomen wurden zur Überprüfung der Funktionalität einem hyperosmotischen Gradienten von 100 mM Glycerol in einer *stopped flow*-Messung (3.5.5) ausgesetzt. Dabei wurde, ein biphasischer Kurvenverlauf beobachtet (**Abbildung 4.28 A**). Die TbAQP2-Proteoliposomen wiesen eine schnellere Permeation von Glycerol als die Kontrolle auf. Gleichzeitig offenbarten die Leerliposomen eine Durchlässigkeit über ihre Membran. Es wurde eine initiale Leitfähigkeit nach Abzug der Kontrolle für die PfAQP1-Proteoliposomen von  $37 \pm 1 \text{ s}^{-1} 1000^{-1}$  berechnet (**Abbildung 4.29 A-B**).

Um die Dichtigkeit der Liposomen besser zu charakterisieren, wurden weitere Zuckeralkohole mit größer werdendem sterischem Anspruch eingesetzt: Erythritol, Ribitol und Sorbitol (**Abbildung 4.28 B-D**). Bereits ab dem C4-Zuckeralkohol Erythritol wurde keine Durchlässigkeit der Membran mehr beobachtet. Beim Vergleich der Leerliposomen gegenüber den verschiedenen Zuckeralkoholen stellte sich weiterhin heraus, dass das Maximum der initialen Leitfähigkeit des Wasser-Efflux gegenüber Sorbitol nach ungefähr 3,5 s erreicht wurde (**Abbildung 4.28 E**). Für Glycerol wurde das Maximum des Wasser-Efflux nach ungefähr 400 ms am schnellsten gegenüber den verschiedenen Soluten detektiert. Die initiale Permeation von TbAQP2-Proteoliposomen war bei dem kleinsten Zuckeralkohol Glycerol am größten (**Abbildung 4.29 B**). Bei den weiteren Zuckeralkoholen war nur eine geringe initiale Leitfähigkeit messbar. Aus diesem Grund wurde für die weitere funktionelle Charakterisierung Glycerol als hyperosmotisches Solut eingesetzt.

## Ergebnisse



**Abbildung 4.28** Vergleich des hyperosmotischen Schwellverhaltens von TbAQP2-Proteoliposomen (dunkelblau) und Leerliposomen (schwarz) gegenüber 100 mM **A.** Glycerol **B.** Erythritol **C.** Ribitol **D.** Sorbitol. **E.** Vergleich der Leerliposomen gegenüber den Gradienten Glycerol, Erythritol, Ribitol und Sorbitol. Die Liposomen wurden aus 4Me 16:0 PC-Lipiden hergestellt. Die Kurven wurden aus 4 bis 9 Einzelmessungen gemittelt ( $N = 1-2$ ). Die chemischen Strukturen wurden mit ChemSketch erstellt. Gly = Glycerol, Ery = Erythritol, Rib = Ribitol, Sor = Sorbitol.



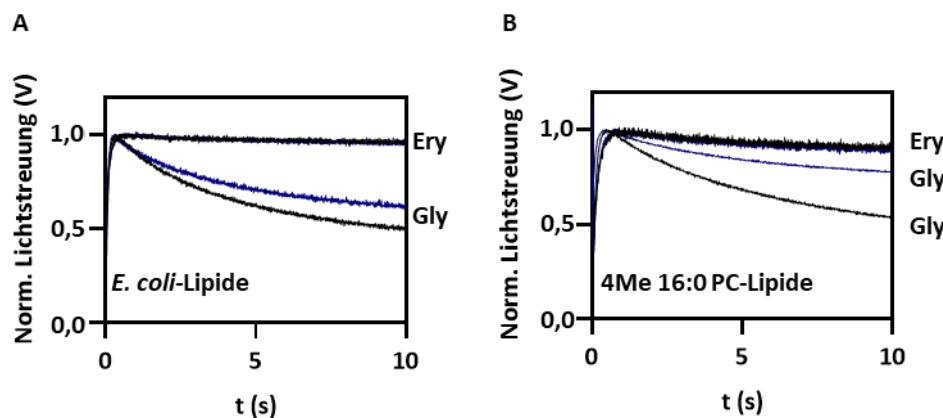
**Abbildung 4.29** Initiale Leitfähigkeit der **A.** Leerliposomen und **B.** Proteoliposomen ( $N = 1-2$ ). Gly = Glycerol, Ery = Erythritol, Rib = Ribitol, Sor = Sorbitol.

#### 4.2.9 Eine alternative Methode zur Protein-Rekonstitution mit Hilfe von Bio-Beads<sup>®</sup>SM-2

Die vorherigen Chargen an Liposomen wiesen eine gewisse Undichtigkeit gegenüber Glycerol auf. Dabei erfolgte die Rekonstitution der Proteine in die Liposomen mit Hilfe der Verdünnungsmethode (3.5.2). Diese Methode ist vor allem für Detergenzien mit hohen CMCs, wie zum Beispiel Brij 78, geeignet. Allerdings führt diese häufig zu undichten Liposomen sowie einer Inhomogenität in der Protein-Verteilung in den Liposomen (Rigaud *et al.* 1995). Eine effiziente Entfernung des Detergens stellt bei der Liposomen-Herstellung einen kritischen Prozessschritt dar, da Detergenzien Einfluss auf die Aktivität des rekonstituierten Proteins sowie die Permeabilität der Liposomen nehmen können (Lévy *et al.* 1990; Rigaud *et al.* 1988).

Aus diesem Grund wurde als Alternative zu der Verdünnungsmethode ein weiteres Protokoll (3.5.3) genutzt, bei dem Detergenzien mit Hilfe von Bio-Beads<sup>®</sup>SM-2 entfernt wurden. Nach diesem Protokoll wurden zunächst die Liposomen mit Hilfe von Triton<sup>TM</sup> X-100 destabilisiert. Anschließend wurden Bio-Beads<sup>®</sup>SM-2 hinzugegeben, um die Detergenzien vollständig zu entfernen. Bio-Beads<sup>®</sup>SM-2 sind makroporöse Adsorbenzien, welche besonders für die Adsorption von Triton<sup>TM</sup> X-100 und anderen Detergenzien geeignet sind (Rigaud *et al.* 1995).

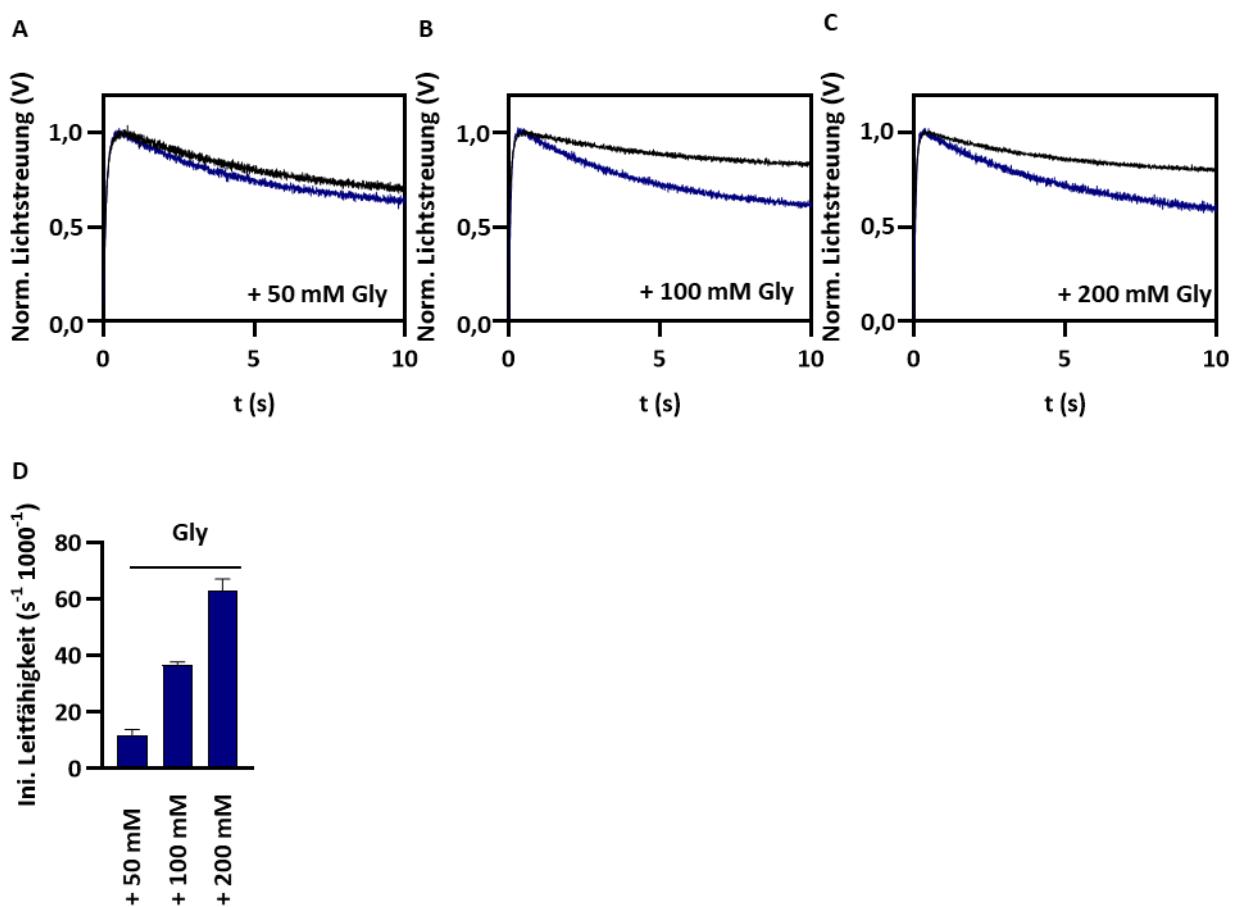
Es wurde TbAQP2-Proteoliposomen auf Basis von *E. coli*-Lipiden und 4Me 16:0 PC-Lipiden hergestellt. Anschließend wurden diese einem hyperosmotischen Gradienten von 100 mM Glycerol oder 100 mM Erythritol ausgesetzt. Entgegen der Erwartung wurde mit für keine der beiden verwendeten Lipid-Sorten eine Verbesserung der Liposomen-Dichtigkeit erreicht (**Abbildung 4.30 A-B**). Weiterhin wurde für die Leerliposomen eine höhere Permeabilität als mit den Proteoliposomen beobachtet, weswegen die Verdünnungsmethode zur Rekonstitution der Liposomen im Weiteren gewählt wurde.



**Abbildung 4.30:** Vergleich des hyperosmotischen Schwellverhaltens von TbAQP2-Proteoliposomen (dunkelblau) und Leerliposomen (schwarz) gegenüber 100 mM Glycerol oder 100 mM Erythritol. Die Liposomen wurden aus **A.** *E. coli*-Lipiden und **B.** 4Me 16:0 PC-Lipiden hergestellt. Die Kurven wurden aus 4 bis 9 Einzelmessungen gemittelt (N = 1-2). Gly = Glycerol, Ery = Erythritol

#### 4.2.10 Permeation von TbAQP2-Proteoliposomen gegenüber verschiedenen Glycerol-Gradienten

Ein weiterer Grund für die Undichtigkeit könnte an der Konzentration des Glycerols im Messpuffer liegen. Aus diesem Grund wurden verschiedenen hyperosmotischen Gradienten von 50–200 mM Glycerol gegenüber den Liposomen getestet. Weiterhin wurde untersucht, ob sich auf diese Weise eine ausreichende initiale Leitfähigkeit bei möglichst geringerer Undichtigkeit der Leerliposomen ergibt. Die Leerliposomen zeigten gegenüber allen hyperosmotischen Messpuffern eine Durchlässigkeit von Glycerol (**Abbildung 4.31 A-C**). Die TbAQP2-Proteoliposomen wiesen im Vergleich zu den Leerliposomen eine erhöhte initiale Leitfähigkeit auf (**Abbildung 4.31 D**). Dabei stieg die initiale Leitfähigkeit mit dem steigenden Glycerol-Gradienten von  $12 \pm 2 \text{ s}^{-1} 1000^{-1}$  (50 mM Glycerol) über  $37 \pm 1 \text{ s}^{-1} 1000^{-1}$  (100 mM Glycerol) auf  $63 \pm 4 \text{ s}^{-1} 1000^{-1}$  (200 mM Glycerol) fast linear an.



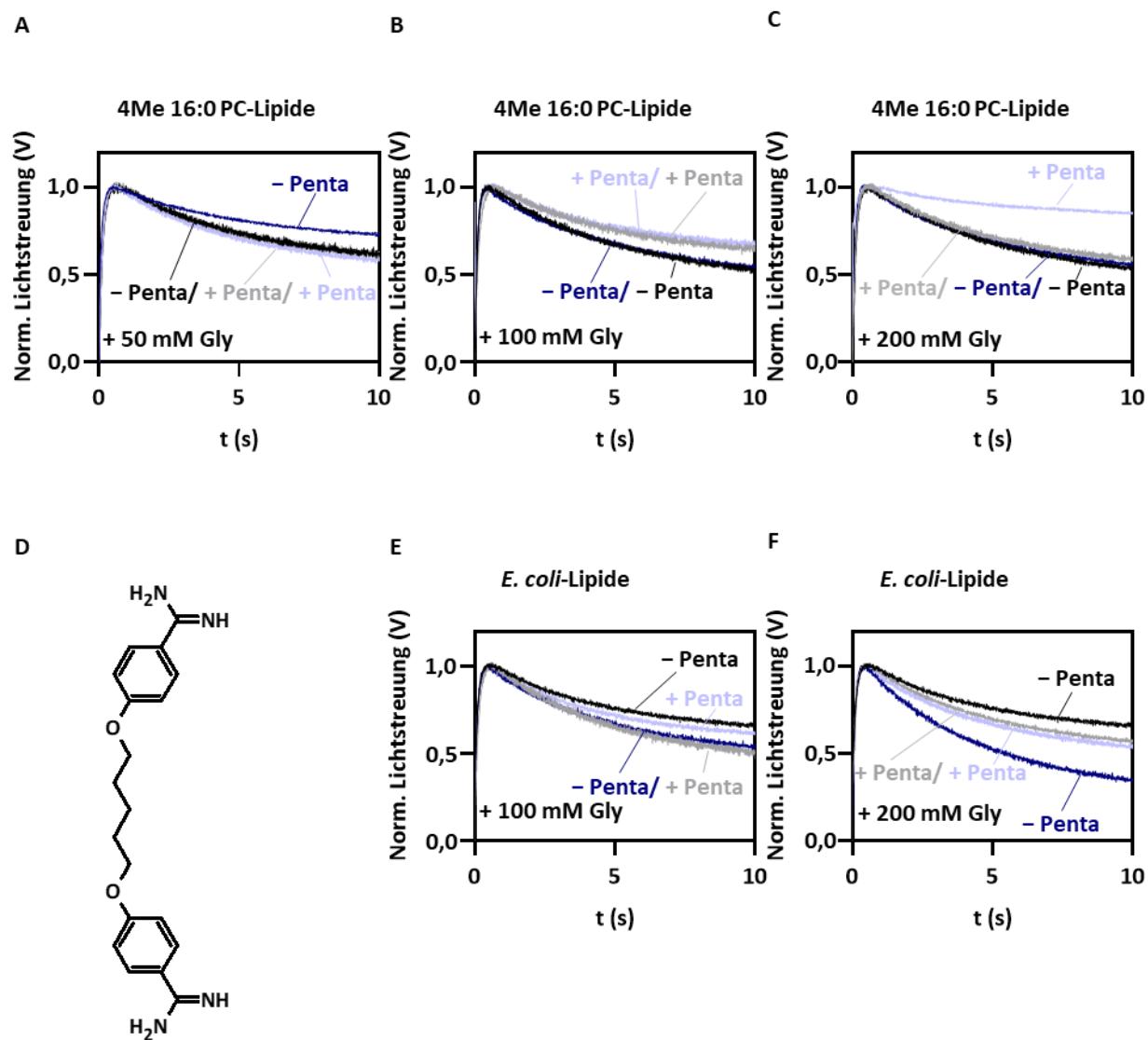
**Abbildung 4.31:** Hyperosmotisches Schwellverhalten von TbAQP2-Proteoliposomen (dunkelblau) und Leerliposomen (schwarz) gegenüber **A.** 50 mM **B.** 100 mM **C.** 200 mM Glycerol. **D.** Initiale Leitfähigkeit TbAQP2-Proteoliposomen. Die Werte der Leerliposomen sind bereits von denen der Proteoliposomen abgezogen. Die Kurven wurden aus 4–9 Einzelmessungen gemittelt ( $N = 1–2$ ). Gly = Glycerol.

#### 4.2.11 Einsatz von Pentamidin als Inhibitor gegenüber TbAQP2-Proteoliposomen

Pentamidin ist ein nanomolarer Inhibitor von TbAQP2 und weist einen  $IC_{50}$ -Wert von 130 nm auf (Song *et al.* 2016). Als weiterer Nachweis für die Funktionalität des in Liposomen rekonstituierten zellfrei synthetisierten TbAQP2 sollte daher eine Inhibition der Glycerol-Leitfähigkeit durch Pentamidin überprüft werden. Dazu wurden TbAQP2-Proteoliposomen und Leerliposomen aus 4Me 16:0 PC-Lipiden hergestellt (3.5.2) und mit Hilfe der *stopped-flow*-Messung (3.5.5) zunächst bei einem hyperosmotischen Gradienten von 100-200 mM Glycerol untersucht. Anschließend wurde die gleiche Charge für 10 min mit 50  $\mu$ M Pentamidin im Überschuss bei Raumtemperatur inkubiert und erneut vermessen. Es wurde sowohl mit den Leerliposomen als auch den TbAQP2-Proteoliposomen eine veränderte initiale Leitfähigkeit gegenüber Glycerol bei Anwesenheit des Inhibitors beobachtet (**Abbildung 4.32 A-C**). Ein möglicher Grund könnte in der Interaktion zwischen Pentamidin und den 4Me 16:0 PC-Lipide begründet sein, sodass die initiale Leitfähigkeit von Glycerol beeinflusst wurde.

Im nächsten Schritt wurde untersucht, ob Pentamidin ebenfalls eine Interaktion gegenüber den *E. coli*-Lipiden zeigt. Dafür wurden TbAQP2-Proteoliposomen und Leerliposomen aus *E. coli*-Lipiden hergestellt (3.5.2) und in gleicher Weise untersucht. Pentamidin beeinflusste sowohl die Glycerol-Permeabilität der Leerliposomen als auch der TbAQP2-Proteoliposomen (**Abbildung 4.32 D-E**). Somit deuten die Daten daraufhin, dass Pentamidin über eine mögliche Bindung an den *E. coli*-Lipiden die initiale Leitfähigkeit der Membranen beeinflusste.

## Ergebnisse



**Abbildung 4.32:** Hyperosmotisches Schwellverhalten ohne Pentamidin von TbAQP2-Proteoliposomen (dunkelblau) und Leerliposomen (schwarz) sowie mit 50  $\mu$ M Pentamidin von TbAQP2-Proteoliposomen (hellblau) und Leerliposomen (hellgrau). **A.** Struktur von Pentamidin. Hyperosmotisches Schwellverhalten auf Basis von 4 Me 16:0 PC-Lipiden gegenüber **B.** 100 mM und **C.** 200 mM Glycerol. Hyperosmotisches Schwellverhalten von Liposomen auf Basis von *E. coli*-Lipiden gegenüber **D.** 100 mM und **E.** 200 mM Glycerol. Die Kurven wurden aus 4 bis 9 Einzelmessungen gemittelt. Gly = Glycerol, Penta = Pentamidin.

Trotz der Funktionalitäts-Nachweise der TbAQP2-Proteoliposomen waren die erhaltenen Daten über verschiedene Chargen wenig reproduzierbar. Da ein großes Probenvolumen für die *stopped flow*-Messungen benötigt wurde, waren mit Chargen, welche sich funktionell an der *stopped flow* charakterisierten ließen, keine weiteren funktionellen Charakterisierungen oder Nachweise hinsichtlich der Partikelgrößenverteilung oder der Rekonstitution des Proteins in den Liposomen möglich. Da mit Hilfe der BLI Liposomen-Chargen untersucht werden sollten, welche sich als dicht und funktionell in der *stopped flow*-Analytik bewährt haben, wurden keine weiteren Untersuchungen mit der BLI durchgeführt.

## 5 Diskussion

### 5.1 Evaluation der zellfreie Produktion von fluoreszierenden Protein zur Target-Identifizierung

#### 5.1.1 Unterschiedliche IC<sub>50</sub>-Werte der prokaryotischen Extrakte und Auswahl der Bakterien

Der übermäßige Einsatz von Antibiotika sowie die unsachgemäße Entsorgung der Antibiotika hat zur Entstehung von Multiresistenzen von Bakterien geführt, die die Entwicklung neuer Antibiotika zwingend erforderlich machen (Conlon *et al.* 2016; Harms *et al.* 2016; Miethke *et al.* 2021).

Hierzu wurde während dieser Arbeit ein Fluoreszenz-Screening-Test mit Hilfe der zellfreien Proteinsynthese entwickelt, bei dem die ribosomale Translation direkt abgelesen wurde. Das Fluoreszenzsignal war dosisabhängig und ermöglichte die Bestimmung von IC<sub>50</sub>-Werten. Es wurden IC<sub>50</sub>-Werte für verschiedene Wirkstoffklassen von Inhibitoren der ribosomalen Proteinbiosynthese bestimmt. Die IC<sub>50</sub>-Werte der Bestimmung aus einem *E. coli*-Extrakt decken sich mit den in der Literatur befindenden Werten, welche mit der zellfreien Proteinsynthese und anschließendem Luciferase-Assay bestimmt wurden (**Tabelle 5.1**) (Fyfe *et al.* 2012; Murray *et al.* 2001; Pratt *et al.* 2004). Die entwickelten Screening-Methode auf Grundlage verschiedener ribosomaler Extrakte bietet darüber hinaus statistisch betrachtet einen exzellenten Assay (4.1.13).

**Tabelle 5.1:** Vergleich der IC<sub>50</sub>-Werte ( $\mu\text{g ml}^{-1}$ ) mit der Literatur mit einem S30-Extrakt aus *E. coli*.

Inhibitor	GFP	mNeonGreen	Luciferase-Assay		
	Eigene Arbeit	Eigene Arbeit	Fyfe <i>et al.</i> (2012)	Murray <i>et al.</i> (2001)	Pratt <i>et al.</i> (2004)
Linezolid	3,7 ± 0,4	4,1 ± 0,3	1,5	0,8	0,75
Erythromycin	0,2 ± 0,1	0,7 ± 0,2	0,5	0,2	0,2
Chloramphenicol	1,8 ± 0,4	2,6 ± 0,5	1,3	1,6	1

Zur Entdeckung neuartiger Antibiotika hat die Weltgesundheitsorganisation (WHO) eine Liste vorrangiger Krankheitserreger zusammengestellt, die Maßnahmen zur Entdeckung neuer Arzneimittel erfordern, da sie aufgrund ihrer erworbenen Multiresistenz eine große aktuelle und künftige Bedrohung darstellen. Drei prominente Einträge sind *Enterobacteriaceae* (Carbapenem-resistant und Cephalosporin-resistant der dritten Generation), *Salmonella spp.* (Fluorchinolon-resistant) und *Pseudomonas aeruginosa* (Carbapenem-resistant) (World Health Organization 2017). Zur Entwicklung eines Screening-Tests zur Identifizierung neuer Ribosomen-Targets, wurde eine direkte und schnelle Visualisierung der Proteintranslation mit Fluoreszenzauslesung für resistenzanfälligen Bakterienklassen angestrebt. Dazu wurden die Bakterien *E. coli* aus der Familie der Enterobacteriaceae, *S. enterica* subsp. Enterica sowie *P. putida* ausgewählt. Diese bieten für das

## Diskussion

Vorhaben zwei entscheidende Vorteile. Einerseits weisen die Bakterien eine hohe Verwandtschaft auf Grund der hohen Sequenzähnlichkeit der 16S rRNA zu den von der WHO veröffentlichten Liste auf (Woese *et al.* 1977). Weiterhin handelt es sich bei diesen um Bakterien aus der biologische Schutzstufe eins, die biologische Sicherheit für die Experimentierenden und die Umwelt ermöglichen.

Im Kontext der Entdeckung neuartiger Antibiotika mit Hilfe der zellfreien Proteinsynthese wurde während dieser Arbeit für S30-Extrakte aus *E. coli*, *P. putida* und *S. enterica* unterschiedliche IC<sub>50</sub>-Werte aufgenommen. Dies deckt sich mit den unterschiedlichen IC<sub>50</sub>-Werten für S30-Extrakten aus *E. coli* und *Streptococcus pneumoniae* (Pratt *et al.* 2004), *E. coli* und *Staphylococcus aureus* (Murray *et al.* 2001) sowie *E. coli* und *Pseudomonas aeruginosa* (Fyfe *et al.* 2012). Da Resorptions-Effekte der Antibiotika auf Grund des offenen Systems auszuschließen sein sollten, deuten die Daten auf eine Heterogenität der Ribosomen hin.

Ursprünglich wurden Ribosomen als ubiquitäre, unveränderbare Struktur betrachtet, dessen Aufgabe es ist, mRNA zu translatieren ohne dabei spezifische Veränderungen oder Funktionen zu übernehmen. Es wurde jedoch eine Heterogenität der Ribosomen nachgewiesen, die zu spezialisierten Funktionen führen (Bulut-Karslioglu *et al.* 2018; Ferretti *et al.* 2017; Locati *et al.* 2017; Shi *et al.* 2017; Simsek *et al.* 2017; Xue *et al.* 2015). Ribosomen-Heterogenität entsteht durch Variationen der rRNA, r-Proteinen, Ribosomen-assoziierten-Proteinen, der subzellulären Lokalisierung sowie der Anordnung der Ribosomen (Li *et al.* 2020).

Die funktionellen Folgen der Heterogenität der rRNA, welche insbesondere für die Funktion der Proteinbiosynthese und die Bindung von Antibiotika eine dominante Rolle spielt, sind noch ungeklärt (Genuth *et al.* 2018). *In silico* Untersuchungen deuten darauf hin, dass maternale und somatische rRNA unterschiedliche mRNA binden und so einen Einfluss auf die Regulierung der Translation nehmen (Locati *et al.* 2017).

Gleichzeitig zeigen Ribosomen eine extrem große Konservierung des Translations-Apparats, da jene Ribosomen für die Zelle lebensnotwendig ist. Antibiotika mit dem Angriffspunkt der Translation, wie vor allem das Peptidyltransferasezentrum (PTC) mit der höchsten Konservierung im gesamten Ribosom (Bashan *et al.* 2008), zeigen aus diesem Grund eine hohe Potenz (Syroegin *et al.* 2022). Wichtige Interaktionen zwischen dem Ribosom und antibakteriellen Wirkstoffen wurden durch Aufklärung der Strukturen über Kryoelektronenmikroskopie und Kristallstrukturanalyse erzielt (Hansen *et al.* 2003; Schroeder *et al.* 2007). Trotz dieser Erkenntnisse, die vor allem für die Aufklärung des Wirkmechanismus der Antibiotika eine entscheidenden Beitrag geleistet haben (Lin *et al.* 2018), erklären die Modelle nicht die selektive Wirkung einiger Antibiotika-Wirkstoffklassen gegenüber verschiedenen Bakterien-Gattungen (Kannan *et al.* 2012; Marks *et al.* 2016; Sothiselvam *et al.* 2014). Dies deutet darauf hin, dass die tatsächlichen Wirkmechanismen komplexer als angenommen sind (Syroegin *et al.* 2022).

Ein Beispiel hierfür stellt Chloramphenicol dar, welches als Inhibitor im PTC die Aufnahme von aa-tRNA in der ribosomalen A-Stelle inhibiert, sodass eine Verlängerung der Peptidkette verhindert wird (Drainas *et al.* 1987). Trotz dieses universellen Einsatzes konnten einige experimentelle Daten nicht erklären, dass wenn das eingehende A-Seiten-Akzeptorsubstrat Glycin ist, es zu keiner Hemmung der Translation kommt. Neuen Daten zeigen, dass wenn die wachsende Polypeptidkette Alanin, Serin oder Threonin trägt, es zu einer gesteigerten Affinität von Chloramphenicol an die Bindestelle kommt, da diese Reste Chloramphenicol im PTC weiter stabilisieren. In der Folge kommt es zum Erliegen der

## Diskussion

Translation. Wenn die wachsende Peptidkette Glycin trägt, wird Glycin auf Grund des geringen sterischen Anspruchs trotz Bindung von Chloramphenicol im PTC untergebracht, sodass es zu einer Transpeptidierungsreaktion kommt (Syroegin *et al.* 2022). Somit zeigt Chloramphenicol, dass neben der Bindung an die hoch-konservierte rRNA weitere Faktoren die Antibiotika-Aktivität beeinflussen.

Linezolid führt wie Chloramphenicol zu einer Hemmung der Peptidyltrasferase, sodass erwartet wurde, dass es sich ebenfalls um einen universellen Inhibitor gegenüber allen Wirkstoffklassen handelt. *In vitro* Ergebnisse zeigten, dass zwischen der naszierenden Peptidkette und dem Antibiotikum es im PTC zu Interaktionen kommt, die die Antibiotika-Aktivität beeinflussen (Marks *et al.* 2016).

Ein weiteres Beispiel für einen komplexeren Wirkmechanismus stellt Erythromycin dar. Üblicherweise führt der Einsatz von Erythromycin aus der Wirkstoffklasse der Makrolide über eine Inhibition der Translation zu einer Expression des Antibiotikaresistenzgens *ErmDL*. Sofern die naszierende Peptidkette nur drei Aminosäuren lang ist und damit zu kurz um eine Interaktion mit dem gebundenem Antibiotikum einzugehen, kommt es zu keiner Expression des Gens *ErmDL*. Für die Wirkung von Erythromycin spielen somit kleine Cofaktoren im Mechanismus eine Rolle (Sothiselvam *et al.* 2014).

Zusammenfassend bleiben die Gründe für die unterschiedlichen IC<sub>50</sub>-Werte der verschiedenen Bakterien-Gattungen offen. Hierzu sind weitere Erkenntnisse notwendig.

### 5.1.2 Unterschiedliche Proteinausbeute der eingesetzten, prokaryotischen ribosomalen Extrakte

Die zellfreie Proteinproduktion auf der Grundlage von S30-Extrakten aus *E. coli* ist besonders gut etabliert und liefert in der Regel höhere Proteinausbeuten als auf anderen aus Pro- oder Eukaryoten gewonnene Extrakte (Gregorio *et al.* 2019).

Dies deckt sich mit den Ergebnissen, die für S30-Extrakte aus *E. coli*, *S. enterica*, *P. putida*, *B. subtilis* und *B. megaterium* während der Arbeit erzielt wurden. So wurde im Vergleich zu einem S30-Extrakt aus *E. coli* mit einem S30-Extrakt aus *P. putida* ein um den Faktor 7 geringere Fluoreszenzausbeute nach der zellfreien Proteinsynthese beobachtet. In der Literatur wurde ein um den Faktor 10 geringere Protein-Ausbeute zwischen einem S30-Extrakt aus *E. coli* mit einem aus *P. putida* erzielt (Caschera *et al.* 2014; Kelwick *et al.* 2016).

Der Grund für die Unterschiede in der Proteinausbeute ist auf optimierte regulatorische Sequenzen im mRNA-Transkript und die Verwendung von aus *E. coli* gewonnenen Reaktionspartnern sowie die bessere Untersuchung der zellfreien Proteinsynthese aus *E. coli* zurückzuführen. Im Folgenden werden diese Gründe ausführlich beschrieben und Optimierungsmöglichkeiten aufgeführt, welche für die S30-Extrakte aus *S. enterica*, *P. putida*, *B. subtilis* und *B. megaterium* zu höheren Proteinausbeuten führen könnten.

Die Proteinbiosynthese beginnt mit der Initiierung der Translation, die die Bindung der mRNA an das komplementäre 3'-Ende der 16S-rRNA der kleinen Ribosomen-Untereinheit erfordert. Die Ribosomen-Bindungsstelle (RBS) befindet sich stromaufwärts des ATG-Startcodons des mRNA-Transkripts und beeinflusst die Genauigkeit und Effizienz der Translation. Abweichend von der klassischen *E. coli* Shine-

## Diskussion

Dalgarno-Sequenz, AGGAGGUATG (Shine *et al.* 1974), trugen die eingesetzten Expressionskonstrukte die Sequenz TACTAGATG, die sich als optimal für die Translationsinitiierung an *E. coli*-Ribosomen erwiesen hat.

Während der Arbeit wurde zur Erhöhung der Fluoreszenzausbeute mit einem S30-Extrakts aus *P. putida* eine Anpassung der RBS durchgeführt, welche entgegen der Erwartung zu einer Erniedrigung der Fluoreszenzausbeute von GFP mit einem S30-Extrakt aus *P. putida* führte (4.1.9). Frühere Studien mit einem zellfreien Translationssystem aus *P. putida* haben gezeigt, dass eine Variation der RBS zu einer bis zu 20-fach höheren Proteinausbeute führte (Wang *et al.* 2018). Die verringerte Fluoreszenzausbeute während der Arbeit könnte darin begründet sein, dass der verwendete RBS-Rechner von Salis (2011) Limitationen aufweist. Das Modell zur Berechnung der RBS bezieht nicht die Interaktion der mRNA mit dem ribosomalen Protein S1 ein. Das ribosomale Protein S1 spielt vermutlich in der Bindung einer *template*-RNA während der Initiation eine entscheidende Rolle (Vasilyev *et al.* 2013). Das Vorhandensein einer anti-Sense-RNA oder von RNase-Bindestellen wird vom RBS-Rechner ebenfalls nicht berücksichtigt. Zudem wird vorausgesetzt, dass die mehrfach vorhandenen Startcodons unabhängig voneinander translatiert werden. Somit wird ignoriert, dass auch eine Kupplung zwischen nah benachbarten Startcodons stattfinden kann. So könnte die naszierende Polypeptidkette eines stromaufwärts liegendem Startcodons mit einem stromabwärts liegendem Startcodon interagieren. In analoger Weise könnten sich stromaufwärts befindende Startcodons aus verschiedenen Operons überschneiden und Einfluss auf die Translation nehmen (Salis 2011).

Ein weiterer Grund für die unterschiedliche Translationseffizienz stellt neben der Optimierung der Initiation eine nicht ideale Elongation dar. Üblicherweise führt eine Codon-Optimierung der codierenden Sequenz zur Erhöhung der Translations-Elongationsrate und daraus resultierend zu erhöhten Proteinausbeuten (Welch *et al.* 2009). Da eine Minimierung der Translation-Initiation in jedem Fall zu einer verringerten Proteinproduktion führt, wurde während der Arbeit eine Optimierung der RBS priorisiert. Eine Codon-Optimierung sollte die Fluoreszenzausbeuten der S30-Extrakte aus *P. putida*, *B. subtilis*, *B. megaterium* und *S. enterica* weiter erhöhen.

Darüber hinaus sind Original-*E. coli*-tRNAs, welche während der Arbeit genutzt wurden, für die Verwendung im zellfreien System im Handel erhältlich. Die *E. coli*-tRNAs sind mit *E. coli*-Ribosomen-extrakten kompatibel. Eine Möglichkeit zur Optimierung der Proteinsyntheseeffizienz wäre die Extraktion von tRNA aus der betreffenden Bakterienart.

Ein weitere Optimierungsmöglichkeit stellt das Energieregenerationssystem dar. Zur Verlängerung der Synthese müssen ATP und GTP wiederhergestellt werden. Hierzu wurde während der Arbeit als sekundäre Energie-Bestandteile in Kombination mit bestimmten Kinasen wie z.B. Acetylphosphat (AcP) und Acetat-Kinase und/oder Phosphoenolpyruvat (PeP) mit Pyruvat-Kinase eingesetzt. Als weiterer energetischer Bestandteil kann ebenfalls eine Pyruvat-Oxidase zusammen mit Thiaminpyrophosphat und Flavin-Adenin-Dinukleotid eingesetzt werden (Kim *et al.* 1999). Die Akkumulation von anorganischem Phosphat wird durch den Einsatz von Maltodextrin, welches zu Glucose gespalten wird, verhindert. Die Glucose wird durch die Maltodextrinphosphorylase in Glucose-1-Phosphat überführt (Luisi *et al.* 2006). In ähnlicher Weise wird Maltose eingesetzt (Caschera *et al.* 2014). Für ein System aus *B. subtilis* hat sich 3-Phosphoglycerat, welches ebenfalls für *E. coli* basierte Systeme genutzt wird, als Energiequelle bewährt (Kelwick *et al.* 2016). Hingegen zeigte sich Creatin-Phosphat mit einer Creatin-Kinase als vorteilhaft in einem eukaryotischen Weizenkeim-System (Ryabova *et al.* 1995; Spirin 2004).

## Diskussion

Es wurde sich jedoch dafür entschieden, die Komponenten der Translationsreaktion für eine universelle Anwendung beizubehalten und stattdessen ein schneller faltendes und heller fluoreszierendes Protein herzustellen. Dieser Ansatz erwies sich als praktikabel und problemlos für die Übertragung auf andere bakterielle Spezies.

Neben den Komponenten, welche zur zellfreien Synthese zugegeben werden, stellt die Herstellung eines S30-Extrakts und damit die Auswahl des Bakterien-Stamms eine entscheidende Rolle für die Proteinausbeute der zellfreien Synthese. Während dieser Arbeit wurde mit dem Bakterien-Stamm BL21(DE3) für die Gewinnung eines ribosomalen Extraks aus *E. coli* gearbeitet (2.4), der hohe Proteinausbeuten erwarten ließ (Schwarz *et al.* 2007a). Für die Herstellung eines S30-Extrakts aus *E. coli* stehen zahlreiche und etablierte Stämme zur Verfügung. Vor allem BL21-Derivate wie CP-Stämme (Kigawa *et al.* 2004), Rosetta- und Rosetta 2-Stämme (Ahn *et al.* 2005; Shin *et al.* 2012; Sitaraman *et al.* 2004), DE3 Stämme (Kim *et al.* 2006; Kwon *et al.* 2015; Levine *et al.* 2019; Yang *et al.* 2012) und Star-Stämme (Ahn *et al.* 2005; Dopp *et al.* 2018) finden für die zellfreie Proteinsynthese Anwendung. Diese Stämme bieten den Vorteil eines schnelleren Bakterium-Wachstums, seltenen tRNAs (Rosetta), verringelter mRNA-Degradierung (Star) sowie einer optimierten Protein-Produktion (BL21) (Cole *et al.* 2020).

Für die Gewinnung von S30-Extrakten aus *B. subtilis* wurde während der Arbeit der Stamm CU1050 eingesetzt. In der Literatur wurden vor allem der Stamm 168 (Kelwick *et al.* 2016; Tominaga *et al.* 1978; Villafane *et al.* 1987) sowie WB800N (Kelwick *et al.* 2016) eingesetzt. *B. subtilis* 168 ist ein weit verbreiteter Labor-Stamm und findet hauptsächlich auf Grund seines effizienten Wachstums und der Fähigkeit der Biofilmbildung Anwendung (Gallegos-Monterrosa *et al.* 2016). WB800N sowie der während der Arbeit eingesetzte CU1050-Bakterienstamm wurden durch Mutationen aus dem Stamm 168 hergestellt (Jeong *et al.* 2018; Johnson *et al.* 2016). Die für CU1050 erzeugten Mutationen dienten dem Zweck, den Phagen SPβ aus *B. subtilis* zu entdecken (Johnson *et al.* 2016). Für eine Gewinnung eines S30-Extrakts wurde CU1050 nicht entwickelt. Da mit S30-Extrakten aus *B. subtilis* CU1050 keine zufriedenstellenden Proteinausbeuten mittels der zellfreien Proteinsynthese erzielt wurden, könnte der Einsatz der Bakterien-Stämme wie WB800N und Stamm 168, welche bereits zur Herstellung von S30-Extrakten genutzt wurden, zu einer Erhöhung der Proteinausbeute führen.

Für die zellfreie Proteinsynthese basierend auf *P. putida* wurde der Stamm KT2440 im Rahmen dieser Arbeit und ebenfalls in der Literatur eingesetzt (Wang *et al.* 2018; Yim *et al.* 2019). Eine systematische Untersuchung der Bakterien-Stämme für die zellfreie Proteinsynthese, wie auch für die verwendeten Bakterien *S. enterica* subsp. *Enterica* sowie *B. megaterium*, wurde durch den Autor nicht durchgeführt. Eine Untersuchung, ob andere Bakterien-Stämme zu einer optimierten Extraktion von Ribosomen und damit zu einer erhöhten Proteinausbeute der zellfreien Synthese führen, ist ebenfalls in der Literatur nicht beschrieben und bietet weiteres Optimierungspotenzial.

Neben dem Bakterien-Stamm spielt der Genotyp des Stamms eine entscheidende Rolle zur Erhöhung der Proteinausbeute für die zellfreie Proteinsynthese (Michel-Reydellet *et al.* 2004). Der während dieser Arbeit eingesetzte BL21(DE3)-Stamm ( $F^- \text{ompT} \text{hsdSB}(r_B-, m_B-) \text{gal} \text{dcm}$  (DE3)) zur Gewinnung eines S30-Extrakts aus *E. coli* enthielt einige Modifizierungen im Genom. In zahlreichen Untersuchungen wurde durch diese Modifikation ein schnelles Wachstumsverhalten sowie insbesondere eine erhöhte Proteinausbeute für die zellfreie Proteinsynthese erzielt (Bremer *et al.* 2008; Dopp *et al.* 2018; Kim *et al.* 2006; Kwon *et al.* 2015; Levine *et al.* 2019; Schwarz *et al.* 2007a; Yang *et al.* 2012; Zawada *et al.* 2006).

## Diskussion

Unter anderem enthält der verwendete BL21(DE3)-Stamm eine Modifizierung im Gen *ompT*. *ompT* codiert für eine Aspartat Protease in der äußeren Membran von *E. coli* (Vandeputte-Rutten *et al.* 2001). Eine Modifizierung des Gens führt zu einer verringerten Proteolyse exprimierter Proteine (Cavard *et al.* 1990; Hui *et al.* 2010; Smith *et al.* 2007). Weiterhin zeigt der Stamm eine Resistenz gegenüber *Lon*, welche als codierendes Gen für eine Protease zu einer verringerten Proteinausbeute nach der zellfreien Proteinsynthese führen würde (Raleigh *et al.* 1988). Weiterhin besitzt der Stamm ein über *hsdSB* (*rB*- *mB*-) inaktiviertes Restriktions-/Methylierungs-System. Dies bedeutet, dass die eingesetzte Plasmid-DNA während der zellfreien Proteinsynthese nicht methyliert oder geschnitten wird und somit höhere Proteinausbeuten zu erwarten sind. Mutationen von *dcm*, wie sie bei dem eingesetzten Stamm auftreten, führen dazu, dass Cytosine nicht methyliert werden und somit die Stabilität der DNA erhöht wird (Palmer *et al.* 1994).

Eine Optimierung zu dem Stamm WB800N von *B. subtilis* durch Kelwick *et al.* (2016) zeigte eine Erhöhung der Proteinausbeute in der zellfreien Proteinsynthese um den Faktor 72. *B. subtilis* enthält Gene für acht extrazelluläre Proteasen. Bei WB800N handelt es sich um eine um eine hinsichtlich der extrazellulären Proteasen achtfach defiziente Mutante, sodass die Stabilität der Proteine während und nach der zellfreien Proteinsynthese erhöht ist (Nguyen *et al.* 2011). Dies unterstreicht die Wichtigkeit der Auswahl eines Bakterien-Stamms sowie dessen stetige Weiterentwicklung hinsichtlich Modifizierungen für eine zielgerichtete Anwendung wie beispielweise die Gewinnung eines ribosomalen Extraks für die zellfreie Proteinsynthese.

Die S30-Extrakte aus *B. megaterium*, *B. subtilis*, *P. putida* sowie *S. enterica* sind im Vergleich zu dem S30-Extrakt aus *E. coli* weniger untersucht. Es liegen weniger Erfahrungswerte vor wie zum Beispiel für die Auswahl des Bakterienstamms oder dessen Modifizierungen. Da für diese Organismen weniger als 25 Paper hinsichtlich der Gewinnung eines ribosomalen Extraks publiziert sind, lässt dies die Annahme zu, dass diese Organismen im generellen wenig optimiert und schlechter verstanden sind (Gregorio *et al.* 2019). Im Vergleich dazu stellen *E. coli* (Caschera *et al.* 2014) sowie Weizenkeime (Harbers 2014) gut untersuchte Systeme dar.

### 5.1.3 Limitationen des Assays

Das System ermöglichte eine schnelle Produktion von GFP oder mNeonGreen in einem Ein-Kompartimenten-System, das eine ausreichende Fluoreszenzintensität für Screening-Zwecke und sogar für die Bestimmung von IC<sub>50</sub>-Werten bietet. Dennoch weist das System einige Limitationen auf, die im Folgenden diskutiert werden.

Bei dem entwickelten System handelt es sich um eine gekoppelte *in vivo* Transkriptions-/Translations-Reaktion. Somit führen Inhibitoren, welche gegen die Transkription gerichtet sind zu falsch-positiven *Hits*. Ein Beispiel von Inhibitoren der Transkription stellen die Ansamycine dar. Ansamycine finden eine breite Anwendung in der Behandlung von bakteriellen Infektion wie vor allem Tuberkulose (Deng *et al.* 2023). Somit würden mit dem beschriebenen Assay auch *Hits* identifiziert, welche ebenfalls zur antibakteriellen Behandlung eingesetzt werden könnten, jedoch nicht die Proteinbiosynthese inhibieren. Um Inhibitoren zu identifizieren, welche zu keiner Hemmung der Transkription führen, müsste statt der Plasmid-DNA mRNA zur Reaktion hinzugegeben werden. Während der Arbeit wurde

## Diskussion

sich entschieden Plasmid-DNA statt mRNA hinzuzugeben, da Plasmid-DNA einfacher zu isolieren ist und eine größere Stabilität aufweist.

Da während der zellfreien Proteinsynthese keine Zellwände überwunden werden müssen, greift der Inhibitor direkt in den Translationsapparat ein. Eine Anwendung des Inhibitors im Organismus könnte jedoch auf Grund der zu überwindenden Zellmembranen dazu führen, dass er nicht am Wirkort angelangt. Eine schlechte Pharmakokinetik von mit der zellfreien Proteinsynthese identifizierten *Hits* könnte zum Ausschluss in der Entwicklung führen. Mit der entwickelten Screening-Methode könnten *Lead*-Strukturen entdeckt werden, die durch weitere Optimierungen zu einem späteren Wirkstoff weiterentwickelt werden.

Eine weitere Möglichkeit bei der Detektion von falsch-positiven *Hits* besteht darin, dass Testsubstanzen das Energieregenerationssystem aus der Acetat- und Pyruvat-Kinase zum Erliegen bringen könnten. Beispielweise inhibieren Phenylalanin (Miller *et al.* 1973) sowie Kinase-Inhibitoren die Pyruvat-Kinase, sodass eine verminderte Fluoreszenzausbeute resultiert.

Weiterhin führen fluoreszierende Moleküle zu falsch-negativen Ergebnissen. Während der Arbeit wurde gezeigt, dass die Eigenfluoreszenz von Tetracyclin dazu führt, dass es zu einer Überlagerung mit den Fluoreszenzsignalen von GFP kommt. Somit würde trotz der inhibitorischen Wirkung von Tetracyclin die Eigenfluoreszenz bei hohen Konzentrationen zu einem falsch-negativen Ergebnis führen. Die fluorimetrische Untersuchung gilt als sehr spezifische Nachweismethode, da nur wenige Stoffe eine Eigenfluoreszenz aufweisen. Im Kontext der Antibiotika zeigen von den 35 verschiedenen Wirkstoffklassen neben den Tetracyclinen nur die Chinolone und Anthrachinone eine Eigenfluoreszenz (Stone *et al.* 2018). Dabei liegt deren Emissionsmaximum ebenfalls bei ungefähr 500 nm und würde so zu einer Überschneidung mit dem GFP-Signal führen (Korah *et al.* 2022). Eine Abhilfe der Überschneidung des Protein-Fluoreszenzsignals mit der Eigenfluoreszenz der eingesetzten Inhibitoren stellt die Anwendung von weiteren Fluoreszenzfarbstoffen mit einem veränderten Farbspektrum dar. So stehen GFP-Varianten von fluoreszierenden Proteinen zur Verfügung, welche blaues, cyan-färbendes, gelbes, orangenes oder rotes Licht nach Anregung emittieren (**Abbildung 5.1**). Für Tetracyclin wurde ein Emissionsmaximum bei 520 nm gemessen (4.1.12). Ein Einsatz von DsRed als Reporterprotein mit einem Emissionsmaximum von 583 nm sollte zu einer verringerten Überlagerung der Signale führen. Während der Arbeit wurde gezeigt, dass eine Veränderung des Fluoreszenzproteins von GFP zu mNeonGreen zu keinen Unterschieden hinsichtlich der  $IC_{50}$ -Werte der verschiedenen Antibiotika-Wirkstoffklassen führte (4.1.10). Dies deutet darauf hin, dass die Inhibitoren an derselben Zielstruktur die Translation inhibieren. Somit stellte sich die Einführung von weiteren Fluoreszenzproteinen als einfach umsetzbar heraus. Weiterhin erfordert der Einsatz einer veränderten Plasmid-DNA, welche für ein verändertes Fluoreszenzprotein codieren, einen geringen molekularbiologischen Aufwand dar. Von besonderer Bedeutung sind neben der Farbe der Fluoreszenzproteine Kenngrößen wie die Quantenausbeute, der molare Absorptionskoeffizient und die daraus resultierende Helligkeit. Während für die zellfreie Proteinsynthese mit S30-Extrakten aus *E. coli* hohe Fluoreszenzausbeuten erzielt wurden, führten die anderen S30-Extrakte aus *P. putida* und *S. enterica* zu niedrigeren Proteinausbeuten. Während der Arbeit wurde gezeigt, dass die Einführung des hell leuchtendem grün-gelben monomeren Fluoreszenzprotein NeonGreen im Vergleich zu GFP zu höheren Fluoreszenzsignalen führte. Da die zu erwartende Helligkeit von dem *enhanced* blau fluoreszierenden Protein (eBFP) um ungefähr den Faktor 15 niedriger ist als diejenige von eGFP ist (Kong *et al.* 2020; Shaner *et al.* 2013), stellt eBFP vermutlich keine Alternative für Systeme mit einer niedrigen Fluoreszenzausbeute dar (**Abbildung 5.1**). Die Helligkeit von DsRed, mORange und eYFP liegt

## Diskussion

ungefähr in dem Bereich von eGFP, sodass der Einsatz insbesondere für Systeme, welche auf *E. coli* basieren, eine Option darstellt.

Protein	Frontal-Ansicht	Aufsicht	Fluorophor	$\lambda_A$ (nm)	$\lambda_E$ (nm)	Q	H ( $\text{J mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$ )
eBFP				383	445	0,31	6
eCFP				439	476	0,40	13
eGFP				484	507	0,60	59
eYFP				514	527	0,61	45
mOrange				548	563	0,60	49
DsRed				558	583	0,79	49
mNeonGreen				506	517	> 0,95	93

**Abbildung 5.1:** Photophysikalisches Verhalten von GFP als Monomer und seinen Varianten sowie mNeonGreen (Kong *et al.* 2020; Shaner *et al.* 2013). Die Darstellung der Protein-Strukturen von eBFP (PDB 1BFP), eCFP (PDB 1OXD), eGFP (PDB 1EMA), eYFP (PDB 1YFP), mOrange (PDB 4Q7T), DsRed (PDB 1GGX), mNeonGreen (PDB 5LTR) wurden mit PyMOL erstellt. Alle Wassermoleküle wurden aus der Abbildung entfernt.  $\lambda_A$ : Anregungsmaximum,  $\lambda_E$ : Emissionsmaximum, Q: Quantenausbeute, H: Helligkeit

#### 5.1.4 Vorteile und Anwendung der fluoreszenzbasierten *Screening*-Plattform

Die zellfreie Translation wurde bereits für Antibiotika-Tests verwendet (Fyfe *et al.* 2012; Murray *et al.* 2001; Pratt *et al.* 2004). Das Auslesen erfolgte über die Produktion des Luciferase-Enzyms und eine anschließende Nachweisreaktion, bei der chemilumineszierendes Luciferin erzeugt wird. Während das Enzym als Verstärker wirkt und möglicherweise die Empfindlichkeit erhöht, erfordert das Nachweisystem zusätzliche Komponenten und Pipettierschritte, die die Inkubations- und Handhabungszeiten erheblich verlängern. Außerdem ist es bei dem indirekteren Luciferase-Ansatz wahrscheinlicher, dass falsch-positive *Hits* erzielt werden, wenn die Verbindungen eher die enzymatische Nachweisreaktion als die eigentliche Übersetzung des ribosomalen Proteins stören. Durch die Herstellung fluoreszierender Proteine als direkte Anzeige der Translation wird dieses Problem umgangen. Die entwickelte *Screening*-Methode ermöglicht weiterhin die Bestimmung von  $IC_{50}$ -Werten und ist übertragbar auf multiresistente Bakterien. Das geringe Volumen im *multi-well*-Format ermöglicht den Einsatz für Hochdurchsatzmethoden. Die während dieser Arbeit entwickelte Methode ermöglicht vor allem einen Einsatz in der *Target*-Identifikation, nachdem durch primäre Hochdurchsatzmethoden eine antibakterielle Aktivität von bestimmten *Hits* bereits gezeigt wurde.

Üblicherweise erfolgt die Entdeckung von Antibiotika neben dem Aspekt der Resistenzentwicklung in Abhängigkeit der Bakterien-Gramfärbung. Gramnegative Bakterien weisen im Vergleich zu grampositiven Bakterien eine dünne Peptidoglykanschicht aus Murein sowie eine weitere äußere Lipidmembran auf (Fisher *et al.* 2020). Die äußere Membran ist eine Permeabilitätsbarriere für viele Antibiotika (Zgurskaya *et al.* 2015). Deswegen zeigen gramnegative Bakterien eine Toleranz gegenüber einigen antibakteriellen Wirkstoffen (Delcour 2009). Da die Gramfärbung ausschließlich auf Unterschieden in der Membran beruht, ist eine Unterscheidung von Ribosomen anhand der Gramfärbung nicht zu erwarten. Die während der Arbeit entwickelte *Screening*-Methode, welche die Translation ohne Zellbarrieren isoliert betrachtet, bietet somit vermutlich einen universellen Einsatz für grampositive und gramnegative Barrieren.

Im Folgenden werden zwei verschiedene Ansätze aufgezeigt, welche ein gewisses Entwicklungspotenzial in der Entdeckung neuartiger Antibiotika aufweisen.

Ungefähr zwei Drittel aller Antibiotika wurden aus Boden-Aktinomyzeten entdeckt (Rütten *et al.* 2022). Da sich nur 1 % der Bakterien im Labor kultivieren lassen, bietet diese Bakterien-Gattung großes Potenzial (Lewis 2013). So wurden bereits einige neuartige Antibiotika von nicht kultivierbaren Organismen identifiziert (Witzky *et al.* 2019).

Eine weitere vielversprechende Wirkstoffklasse stellen die Inhibitoren des Elongationsfaktors-*thermo unstable* (EF-Tu) dar. Über eine Inhibition des Elongationsfaktor G (EF-G) kommt es zu einer Blockade der GTPase, sodass die tRNA-Translokation während der Translation zum Erliegen kommt (Laurberg *et al.* 2000). Es wurden 30 verschiedene EF-Tu-Inhibitoren identifiziert (Prezioso *et al.* 2017), für welche im Klinikalltag keine Resistenzen beschrieben wurden. Da Bakterien nur zwei Kopien des EF-Tu aufweisen, gestaltet sich die Resistenzbildung für Bakterien schwerwiegender. Sofern nur eine der beiden Kopien durch Mutationen eine Resistenzentwicklung aufweist, da das Bakterium die zweite Kopie zum eigenen Überleben benötigt, würde das Antibiotikum an der nicht mutierten Kopie eine dominante Wirkung ausüben. Das Bakterium würde keine Resistenz gegenüber dem Antibiotikum

entwickeln. Somit müssten beide Kopien Mutationen aufweisen, um eine Resistenz gegenüber Antibiotika zu entwickeln (Witzky *et al.* 2019).

Eine Datenbank mit möglichen EF-Tu-Inhibitoren sowie Wirkstoffen aus nicht kultivierbaren Boden-Aktinomyzeten, welche durch die fluoreszenzbasierte zellfreie *Screening*-Plattform näher charakterisiert werden, würde im Kampf gegen bakterielle Infektionen wichtige Inhibitoren weiterentwickeln bzw. schaffen.

## 5.2 Evaluation der Liposomen-Präparation als Testsystem für ein Substrat-*Screening* mittels BLI

### 5.2.1 Vergleich von *E. coli*- mit 4Me 16:0 PC-Lipiden für die Herstellung von Liposomen mit rekonstituierten Aquaporinen

Neben dem Einsatz der zellfreien Proteinsynthese zur Entdeckung von antibakteriellen Inhibitoren, findet diese Anwendung in der Produktion von Membranproteinen. Membranproteine zählen zu den Schlüsselproteinen einer Zelle. Ungefähr ein Viertel aller zellulären Proteine stellen Membranproteine dar (Frick *et al.* 2021). Um diese funktionell charakterisieren zu können, haben sich Liposomen als Testsystem etabliert (Florio *et al.* 2022; Helmstetter *et al.* 2019). Die Auswahl der Lipide für die Herstellung der Liposomen spielt dabei eine entscheidende Rolle (Hovijitra *et al.* 2009). Während der Arbeit wurde einerseits mit biologischen Lipiden aus *E. coli* und andererseits mit chemischen Lipiden, 4Me 16:0 PC-Lipiden, gearbeitet. Die Zusammensetzung und Strukturen der beiden Lipide sind der **Abbildung 5.2 A-B** zu entnehmen. Aus beiden Lipid-Sorten wurden Proteoliposomen produziert und Daten erzielt, welche auf ein funktionelles Protein hindeuten. Gleichzeitig stellte sich eine gewisse Variabilität der verschiedenen Chargen in Bezug auf die initiale Transportrate heraus. Aus diesem Grund werden im Folgenden die beiden Lipid-Sorten miteinander verglichen und anhand dessen Rückschlüsse gezogen, welche Lipide für die Entwicklung einer *Screening*-Methode mit der BLI unter Verwendung von Liposomen besser geeignet erscheinen.

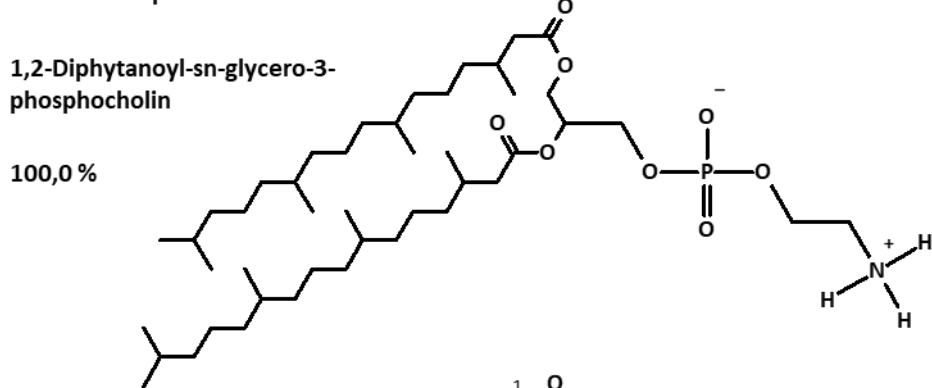
In der Zelle kommen zahlreiche verschiedene Lipide vor (Kimura *et al.* 2016). Vermutlich spielen alle diese Lipide für die Funktion und Stabilität von Membranproteinen eine entscheidende Rolle. Gleichzeitig sind Kristallstrukturen, welche Interaktionen zwischen den Proteinen und der Membran zeigen, sowie Daten bezüglich der Funktion und Stabilität der Lipide für die Membranproteine kaum vorhanden (Musatov *et al.* 2017). Nur wenige Phospholipide wie Phosphatidylethanolamin (PE), Phosphatidylglycerol (PG) und Cardiolipin (CA), welche alle Teil der verwendeten biologischen Lipid-Mischung von *E. coli* waren, zeigten eine strukturelle Funktion zur Stabilisierung der Membranproteine (Alnajjar *et al.* 2015).

Experimentelle Daten deuten darauf hin, dass die Lipide PE, PG und CA auch bei *Trypanosoma brucei* eine entscheidende Rolle spielen (Serricchio *et al.* 2013). Es wurde gezeigt, dass CA an das AqpZ von *E. coli* bindet. Bei Abwesenheit von CA zeigte das rekonstituierte Protein nur noch die Hälfte der Aktivität (Musatov *et al.* 2017). Dies deutet daraufhin, dass die *E. coli*-Lipide im Vergleich zu den synthetischen Lipiden zu einer natürlicheren Umgebung von TbAQP2 in der Liposomen-Membran und

## Diskussion

somit zu einer höheren Aktivität der Proteins führen. Während der Arbeit wurden derartige Unterschiede nicht festgestellt.

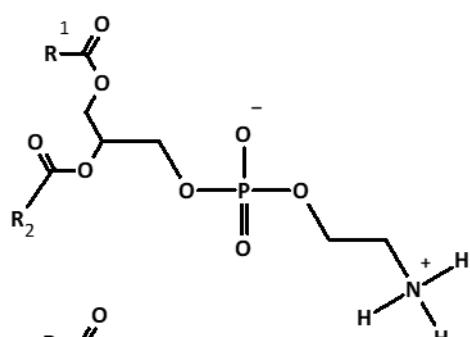
### A 4Me 16:0 PC-Lipide



### B E. coli-Lipide

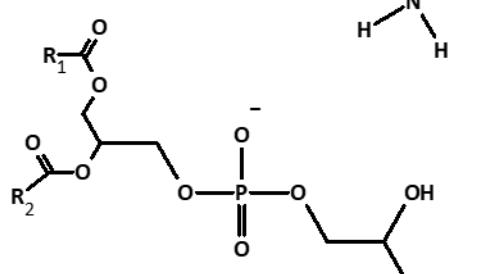
#### Phosphatidylethanolamin

67,0 %



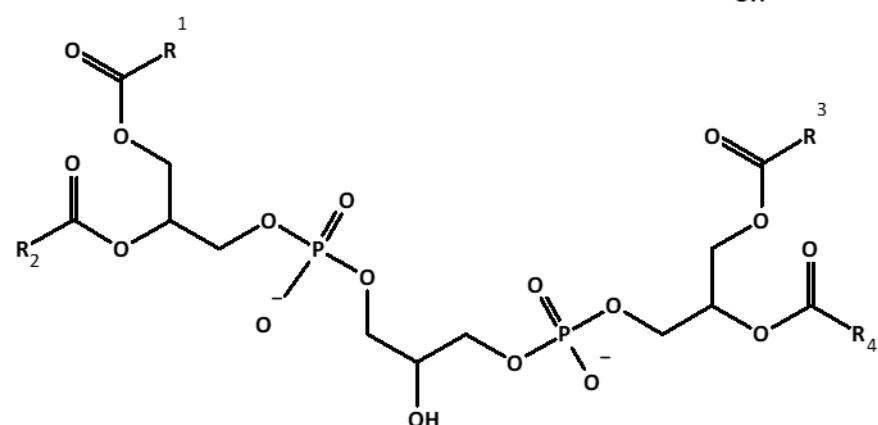
#### Phosphatidylglycerol

23,2 %



#### Cardiolipin

9,8 %



**Abbildung 5.2:** Zusammensetzung der **A.** 4Me 16:0 PC-Lipide und **B.** E. coli-Lipide in % (m/m)

Für die Rekonstitution von Aquaporinen in Liposomen wurden die *E. coli*-Lipide bereits unter anderem für AQP1 (Walz *et al.* 1994), AQP2 (Werten *et al.* 2001), AQP3 (Müller-Lucks *et al.* 2013), AQP4 (Vandebroek *et al.* 2021; Yukutake *et al.* 2008), AQP8 (Liu *et al.* 2006), AQP10 (Hering *et al.* 2020; Missel *et al.* 2021), PfAQP1 (Brändén *et al.* 2010; Müller-Lucks *et al.* 2013) sowie dem Aquaporin Nodulin 26 (Dean *et al.* 1999) eingesetzt. Für das mAQP4 wurden Proteoliposomen mit Hilfe des Gemisches aus

## Diskussion

*E. coli* und L- $\alpha$ -Phosphatidylcholin (Yue *et al.* 2020) und für AqpZ aus L- $\alpha$ -Phosphatidylcholin (Yue *et al.* 2019) genutzt. Aus diesem Grund war es naheliegend die *E. coli*-Lipide für die Rekonstitution von PfAQP1 und TbAQP2 in Liposomen zu nutzen.

2009 wurden erstmalig synthetische Lipide im Kontext der funktionellen Charakterisierung mit Hilfe von Liposomen zur Rekonstitution des AqpZ eingesetzt (Hovijitra *et al.* 2009). Die hierfür genutzten DOPC-Lipide erwiesen sich auch für AQP1 (Patil *et al.* 2016) sowie für AqpZ (Zhao *et al.* 2021) in Mischung mit Cholesterol als geeignet. Während für PfAQP1 bereits POPC-Lipide eingesetzt wurden (Brändén *et al.* 2010), wurde für AQP4 eine Mischung aus den synthetischen Lipiden POPC und POPG verwendet (Steffen *et al.* 2022). Die synthetischen 4Me 16:0 PC-Lipide wurden bereits in einer Mischung mit weiteren synthetischen Lipiden, DOPC, DOPE, DOPS, DMPA sowie Cholesterol zur Herstellung von Proteoliposomen mit zellfrei synthetisierten Kalium-Kanälen eingesetzt (Renauld *et al.* 2017).

Die *E. coli*-Lipide fanden in der Literatur bisher einen breiteren Einsatz im Vergleich zu den synthetischen Lipiden. Das liegt vor allem daran, dass *E. coli*-Lipide länger verfügbar, günstiger und etabliert sind.

Neben der Literaturrecherche, welche Lipide zur Rekonstitution verwandter Proteine bereits genutzt wurden, sowie dem nativen Zustand der Membran, stellen die Phaseninversionstemperatur (PIT), die Stabilität bzw. der Sättigungsgrad, die Ladung der Lipide sowie der Zusatz von Cholesterol wichtige Kriterien zur Auswahl geeigneter Lipide für das Testsystem dar.

Die PIT beschreibt diejenige Temperatur, welche notwendig ist, damit sich der physikalische Zustand der Lipide von einer geordneten Gel-Phase, bei der die Kohlenstoff-Ketten vollständig ausgedehnt und eng gepackt sind, zu einer ungeordneten kristallinen Phase, bei der die Lipide zufällig orientiert und fluid sind, ändert (Schick 1987). Für die 4Me 16:0 PC-Lipide wurde keine PIT vom Gel zum Flüssigkristall von  $-120\text{ }^{\circ}\text{C}$  bis  $+120\text{ }^{\circ}\text{C}$  gemessen (Redwood *et al.* 1971). Für *E. coli*-Lipide wurde eine PIT von ungefähr  $0\text{ }^{\circ}\text{C}$  gemessen (White *et al.* 2000). Je höher der Anteil an gesättigten Fettsäuren ist und je länger die Kohlenstoff-Ketten der Fettsäuren-Reste sind, desto höher sind die van-der-Waals-Kräfte und daraus resultierend die PIT (**Abbildung 5.2 A-B**). Die 4Me 16:0 PC-Lipide weisen weiterhin eine starke intermolekulare Verzahnung über die Methylgruppen in Position 3, 7, 11 und 15 auf. Somit sind die 4Me 16:0 PC-Lipide weniger fluid und weisen eine höhere Dichtigkeit in der Membran auf, sodass für die Herstellung der Liposomen eine geringere Durchlässigkeit zu erwarten ist. In der Arbeit wurden allerdings für beide Lipid-Sorten vergleichbare Durchlässigkeiten beobachtet.

Ein weiterer wichtiger Aspekt stellt die Stabilität bzw. der Sättigungsgrad der Lipide dar. Lipide biologischen Ursprungs, wie zum Beispiel diejenigen von *E. coli*, weisen üblicherweise einen hohen Grad an mehrfach ungesättigten Fettsäuren auf und zeigen somit eine höhere Oxidationsempfindlichkeit. Synthetische Lipide sind somit üblicherweise stabiler. Während der Arbeit mit den *E. coli*-Lipiden stellte sich heraus, dass es in Anwesenheit von Luftsauerstoff zu einer Farbänderung kam, die auf eine Oxidationsempfindlichkeit der Lipide hindeutet. Die synthetischen Lipide änderten ihre Farbe nicht. Aus diesem Grund wurden die Lipide im weiteren Verlauf der Arbeit in Chloroform-Lösung statt als trockenes Pulver gekauft. Dies ermöglichte es, die Lipide nicht mehr in Gegenwart von Luftsauerstoff einzutragen, sodass der Kontakt zum Luftsauerstoff minimiert wurde. In der Folge wurde beobachtet, dass es zu einer verminderten Farbänderung der biologischen *E. coli*-Lipide kam.

## Diskussion

Gleichzeitig könnte für einige Untersuchungen ein gewisser Anteil an ungesättigten Verbindungen notwendig sein, weswegen mono-substituierte Lipide wie DOPC (Patil *et al.* 2016), POPC (Steffen *et al.* 2022) in Kombination mit gesättigten Lipiden Anwendung gefunden haben. Aus diesem Grund könnte es sinnvoll sein, die 4Me 16:0 PC-Lipide mit weiteren synthetischen, monosubstituierten Lipiden zu kombinieren. Dies wurde im Rahmen der Arbeit nicht untersucht. Insbesondere hinsichtlich der Schwankung der hergestellten Liposomen-Chargen in Bezug auf die initiale Leitfähigkeit gegenüber verschiedenen Soluten sowie auf die Membran-Durchlässigkeit könnte dies zu einer verbesserten Reproduzierbarkeit führen. Weiterhin beeinflusst ein hoher Anteil an mehrfach ungesättigten Phospholipiden die Dicke der Membran, sodass es zu einer besseren Anpassung zwischen Proteinen und Lipiden kommen könnte (Cornelius 2008).

Während des Herstellungsprozesses wurden die Lipide in einem wässrigen Puffer rehydratisiert (3.5.1). Dabei kann es in Abhängigkeit vom pH-Wert, der Temperatur, sowie der Acyl-Gruppe bzw. der Kopfgruppe zu einem hydrolytischen Abbau von insbesondere den ungesättigten *E. coli*-Lipiden kommen (Grit *et al.* 1989; Kensil *et al.* 1981). Um den hydrolytischen Abbau möglichst gering zu halten, wurde mit einem Puffer im neutralen pH-Bereich gearbeitet (50 mM HEPES, 50 mM MES, 0,2 M Saccharose, pH 6,8). Ein Zusatz von Cholesterol könnte die Lipid-Membran vor einer möglichen Hydrolyse schützen (Simon *et al.* 1986). Weithin wurden die Lipide mit Stickstoff begast, um sie bestmöglich vor dem Luftsauerstoff zu schützen. Somit wurden Maßnahmen ergriffen, die die Stabilität der Lipide gewährleisten sollten.

Viele biologische Membranen tragen auf ihrer Oberfläche eine negative Ladung. So kann es sich als Vorteil erweisen, dass die Umgebung des zellfrei synthetisierten Proteins möglichst natürlich über die Ladung nachgeahmt wird. Während die 4Me 16:0 PC-Lipide nach außen hin ungeladen sind, weisen die *E. coli*-Lipide über das anionische Phospholipid CA und PG eine negative Ladung auf (**Abbildung 5.2 A-B**). Üblicherweise liegt das Membranpotenzial einer Zelle auf Grund der unterschiedlichen Verteilung der Ionen zwischen -10 bis -100 mV (Abdul Kadir *et al.* 2018). Aus diesem Grund neigen Proteine über ihre positiv-geladenen Aminosäuren auf der zytoplasmatischen Seite auf der extrazellulären Seite vorzukommen (Sipos *et al.* 1993). *T. brucei* weist beispielweise ein stark negatives Membranpotenzial auf (Alghamdi *et al.* 2020), sodass die *E. coli*-Lipide auf Grund ihrer stärkeren, negativen Polarisierung im Vergleich zu 4Me 16:0 PC-Lipiden zu besseren Erfolgen hinsichtlich der Rekonstitution in Liposomen führen könnten.

Weiterhin könnte die zwitterionische Struktur der Lipide die Interaktion von Pentamidin mit den Leerliposomen von *E. coli* und 4Me 16:0 PC-Lipiden erklären (4.2.11). Pentamidin ist im neutralen pH-Bereich über die stark basischen Amidin-Reste protoniert. Somit könnte sowohl eine ionische Wechselwirkung mit den Phosphatresten von CA, PE, PG als auch den synthetischen Lipiden stattfinden. In der Folge würde die Membraninteraktion zu einer erhöhten Durchlässigkeit der Leerliposomen gegenüber einem hyperosmotischen Gradienten von Glycerol führen. Zur weiteren Untersuchung könnten verschiedene Konzentrationen von Pentamidin sowie Inkubationszeiten des Inhibitors mit den Liposomen zu einer besseren Charakterisierung führen. Weiterhin könnte das Lösungsmittel DMSO, welches für Pentamidin verwendet wurde, die Dichtigkeit der Liposomen beeinflussen.

Während der Arbeit wurde eine gewisse Durchlässigkeit der Liposomen-Membran gegenüber Glycerol beobachtet. Ein Zusatz von Cholesterol, welches als typische Komponente natürlicher Membranen, die Membranfluidität, Elastizität, Permeabilität und Krümmung beeinflusst (Yang *et al.* 2016), könnte

## Diskussion

die Dichtigkeit der Liposomen erhöhen und zu besseren Erfolgen hinsichtlich der Rekonstitution führen. Sowohl die *E. coli*-Lipide als auch die 4Me 16:0 PC-Lipide enthielten kein Cholesterol-Zusatz. Somit bietet die Mischung aus Cholesterol mit den Lipiden eine weitere Möglichkeit der Testung und Optimierung an.

Zusammenfassend bleibt die Frage, welche Lipide für die Rekonstitution und funktionelle Charakterisierung der PfAQP1 oder TbAQP2-Proteoliposomen besser geeignet sind, offen. Gleichzeitig stellen die aus *E. coli* extrahierten biologischen Lipide trotz der verminderten Stabilität und deutlich geringeren PIT ein größeres Potenzial hinsichtlich der Rekonstitution-Effizienz dar, da diese zu einer nativen Umgebung für insbesondere TbAQP2 in der Liposomen-Präparation führen.

### 5.2.2 Funktionelle Charakterisierung von PfAQP1- und TbAQP2-Proteoliposomen

Liposomen bieten als Testsystem zur Entdeckung neuer Substrate mittels BLI entscheidende Vorteile. So können Liposomen mit Hilfe eines Extruders homogenisiert werden. Dies bietet insbesondere unter dem Aspekt, dass die nm-Verschiebung der BLI mit der Schichtdicke und -dichte korreliert, im Vergleich zu zellulären Systemen eine größere Standardisier- und Reproduzierbarkeit. Liposomen bieten die Möglichkeit, dass die Beladung der Sensoren über eine Biotinylierung der Lipide oder des Proteins erfolgen kann. Weiterhin kann der Protein-Tag wie z.B. der His<sub>10</sub>-Tag genutzt werden, sodass keine weiteren Modifizierungen der Liposomen oder des rekonstituierten Proteins notwendig sind. Weiterhin wurde die Beladung von biotinylierten Liposomen an Sensoren der BLI bereits demonstriert (Maximova *et al.* 2019; Wallner *et al.* 2014; Wallner *et al.* 2013).

Zur Herstellung der Proteoliposomen musste zunächst das Membranprotein in größeren Mengen produziert werden. Die zellfreie Proteinsynthese für PfAQP1 und TbAQP2 zeigte sich qualitativ und quantitativ erfolgreich. Für TbAQP2 wurde mit der zellfreien Proteinsynthese eine neue Möglichkeit der Protein-Produktion etabliert. Es wurden SDS-resistente Dimere in der Western Blot-Analyse (4.2.2, 4.2.7) mit einem Antikörper gegen am C- und N-Terminus befindliche gerichtete Tags von PfAQP1 und TbAQP2 als auch in der Coomassie-Färbung von PfAQP1 (4.2.2) detektiert. Da Aquaporine strikt Tetramere bilden (Newby *et al.* 2008), erscheint die Dimer-Bildung plausibel. Die Dimere könnten auf eine korrekte Proteinfaltung von PfAQP1 und TbAQP2 hindeuten und erscheinen als weiteres Qualitätsmerkmal der zellfreien Proteinsynthese.

Es wurde die Funktionalität des Proteins der PfAQP1- und TbAQP2-Proteoliposomen mit Hilfe der *stopped flow*-Methode im Vergleich zu Leerliposomen nachgewiesen. Die *stopped flow*-Methode gilt für Aquaporine als etablierte Methode zur Untersuchung des Schrumpf- und Schwelverhaltens gegenüber isoosmotischen Gradienten (Hansen *et al.* 2002) sowie hyperosmotischen Gradienten (Florio *et al.* 2022; Song *et al.* 2012).

PfAQP1-Proteoliposomen zeigten eine initiale Leitfähigkeit von  $33 \pm 12 \text{ s}^{-1} 1000^{-1}$  gegenüber einem hyperosmotischen Gradienten von 100 mM Glycerol (4.2.3). Mit Hilfe von Hefe-Protoplasten wurde von Song *et al.* (2012) eine initiale Leitfähigkeit von ungefähr  $21 \text{ s}^{-1} 1000^{-1}$  für PfAQP1 gegenüber einem hyperosmotischen Gradienten von 300 mM Glycerol gemessen. Da die gemessene Werte der initialen Leitfähigkeit für PfAQP1-Proteoliposomen in der gleichen Größenordnung liegen, erscheinen die Werte plausibel und deuten auf eine Funktionalität der Proteoliposomen hin. Die Unterschiede der

## Diskussion

initialen Transportrate könnte in den unterschiedlichen Expressionssystemen begründet liegen. So beeinflusst die Anzahl an rekonstituierten Membranproteinen in den Liposomen sowie die Anzahl an Membranproteinen in der Hefemembran die initiale Leitfähigkeit. Eine Berücksichtigung der Anzahl an Transporter wurde in beiden Systemen nicht durchgeführt.

Neben der Leitfähigkeit von Glycerol weisen PfAQP1 und TbAQP2 eine hohe Leitfähigkeit gegenüber Wasser auf (Hansen *et al.* 2002; Uzcategui *et al.* 2004). Es wurde gegenüber verschiedenen hyperosmotischen Soluten im TbAQP2- und PfAQP1-Liposomen-Testsystem kein Wasser-Efflux im Vergleich zu den Leerliposomen gemessen. Während Sorbitol zu einer Inhibition von PfAQP1 führt, wurde für Glycerol, welches für die funktionelle Charakterisierung von PfAQP1-Liposomen-System ebenfalls eingesetzt wurde, im Hefe-Protoplasten-Testsystem eine verminderte initiale Leitfähigkeit von Wasser gemessen (Song *et al.* 2012). Erneut könnte das veränderte Testsystem der Liposomen dazu führen, dass ein Wasser-Efflux nicht messbar ist.

Auffällig war weiterhin, dass das Plateau des Wasser-Effluxes für die Präparation an PfAQP1-Proteoliposomen und Leerliposomen bereits nach ungefähr 100 ms erreicht wurde (4.2.3). Im Vergleich dazu erreichten verschiedene Chargen von TbAQP2-Proteoliposomen und Leerliposomen unter den gleichen Messbedingungen das Plateau nach ungefähr 450 ms (4.2.8). Üblicherweise sollte sich die Leerliposomen der verschiedenen Präparationen vergleichbar verhalten. Die Unterschiede deuten darauf hin, dass eine Störanfälligkeit des PfAQP1-Proteoliposomen-Systems vorlag und so vermutlich auch kein Wasser-Efflux gemessen wurde.

Die Beladung der biotinilylierten PfAQP1-Proteoliposomen und Leerliposomen an SA-Sensoren der BLI war vergleichbar zu vorherigen Arbeitsgruppen, welche eine Verschiebung von ungefähr 1,4 nm (Wallner *et al.* 2013), 4 nm (Wallner *et al.* 2014) oder 1,5 nm (Maximova *et al.* 2019) für biotinilylierte Liposomen erzielten. Die Bindung erwies sich über einen längeren Messzeitraum als stabil (4.2.4).

Es wurde kein signifikanter Unterschied zwischen PfAQP1-Proteoliposomen und Leerliposomen mit der BLI gegenüber verschiedenen isoosmotischen Glycerol-Gradienten, welche einen äquimolaren Austausch mit Saccharose enthielten, festgestellt (4.2.5). Dafür könnte es mehrere Gründe geben. Einerseits handelte es sich um eine neue Charge an Liposomen, sodass beispielweise die Rekonstitution des Membranproteins nicht erfolgreich gewesen sein könnte. Weiterhin könnte eine Biotinylierung der Lipide die Funktionalität des Proteins beeinflusst haben. Zuvor wurde die Funktionalität der PfAQP1-Proteoliposomen an der *stopped flow*-Methode nachgewiesen, wobei die eingesetzten Lipide nicht biotinyliert waren. Die Leerliposomen erwiesen sich gegenüber einem hyperosmotischen Gradienten von 100 mM an der *stopped flow*-Methode als dicht. Für die BLI-Messungen wurde ein um den Faktor zehn geringerer Glycerol-Gradient verwendet, sodass eine Durchlässigkeit der Liposomen-Membran minimiert sein sollte. Gleichzeitig könnte jedoch eine geringe Undichtigkeit der Leerliposomen zu einem Schwellverhalten an der BLI führen, sodass eine nm-Verschiebung resultiert. Eine weitere Möglichkeit der nm-Verschiebung ist auf unspezifische Bindungen zurückzuführen, welche gleichermaßen bei den PfAQP1-Proteoliposomen und Leerliposomen auftraten. Da hohe Glycerol- und Saccharose-Konzentrationen das Signal der BLI unwesentlich beeinflussen, ist eine veränderte Viskosität oder ein veränderter Brechungsindex der verschiedenen Mess- und Liposomenpuffer vermutlich auszuschließen (Kumaraswamy *et al.* 2015). Auch wenn die PfAQP1-Proteoliposomen und Leerliposomen sich vergleichbar verhielten, erscheint es so, dass die nm-Verschiebung der Liposomen auf das Glycerol zurückzuführen war. Trotz steigendem Glycerol-Gradienten wurde die größte nm-Verschiebung bei dem niedrigsten Glycerol-Gradienten

## Diskussion

gemessen. Dies könnte dafür sprechen, dass es beispielweise durch unspezifische Bindungen zu einer Sättigung kam, sodass ein größerer Gradient keinen Einfluss mehr nehmen konnte. Eine weitere Untersuchung von Sorbitol, welches die PfAQP1 inhibiert (Song *et al.* 2012), würde zu weiteren Erkenntnissen führen. Da die PfAQP1-Proteoliposomen und Leerliposomen sich vergleichbar verhielten, erscheint eine Deutung, ob mit Hilfe der BLI Schrumpf- und Schwellverhalten von PfAQP1 gemessen wurde, unklar. Es zeigten sich hinsichtlich der Interpretation der aufgenommenen Kurven viele unsichere Variablen für die Charakterisierung der BLI als neuartige Methode zum Substrat-Screening von Membranproteinen. Somit erscheint ein robustes System der Liposomen-Herstellung als besonders kritisch.

Im Unterschied zu der Liposomen-Charge, welche für die Charakterisierung von PfAQP1 mit Hilfe der *stopped flow*-Methode genutzt wurde, stellte sich im weiteren Verlauf der Arbeit eine Durchlässigkeit der Liposomen gegenüber Glycerol in allen Messungen heraus. Eine Veränderung der 4Me 16:0 PC-Lipiden zu den *E. coli*-Lipiden, welche ebenfalls für die Herstellung der PfAQP1-Proteoliposomen genutzt wurden, führte zu vergleichbaren Ergebnissen. Sterisch anspruchsvollere Zuckeralkohole erwiesen sich als impermeabel gegenüber der Liposomen-Membran. Da die TbAQP2-Proteoliposomen im Vergleich zu den Leerliposomen eine größere initiale Leitfähigkeit von Glycerol aufwiesen, führte die Durchlässigkeit bei Untersuchungen mit Hilfe der *stopped flow*-Methode zu keinem Abbruch in der funktionellen Charakterisierung der Proteine.

Im Rahmen der Arbeit wurde die initiale Leitfähigkeit von TbAQP2-Proteoliposomen gegenüber hyperosmotischen Gradienten von Glycerol, Erythritol, Ribitol und Sorbitol, welche alle zum Solut-Spektrum von TbAQP2 gehören (Uzcategui *et al.* 2004), nachgewiesen. Uzcategui *et al.* (2004) wiesen eine initiale Leitfähigkeit für TbAQP2 in einem Expressionssystem aus *Xenopus oocytes* gegenüber einem 130 mM hyperosmotischen Puffer von ungefähr  $2 \text{ s}^{-1} 1000^{-1}$  (Glycerol),  $0,2 \text{ s}^{-1} 1000^{-1}$  (Erythritol),  $0,5 \text{ s}^{-1} 1000^{-1}$  (Ribitol) sowie  $0,4 \text{ s}^{-1} 1000^{-1}$  (Sorbitol) nach. Diese initiale Leitfähigkeit war ungefähr um den Faktor 10 geringer als die während dieser Arbeit gemessenen initialen Transportraten mit einem Testsystem aus Liposomen nach zellfreier Produktion. Gleichzeitig sind die initialen Transportraten mit dem Expressionssystem *Xenopus oocytes* von TbAQP2 mit denen desselben Expressionssystem von PfAQP1 vergleichbar (Hansen *et al.* 2002; Uzcategui *et al.* 2004). In der Folge wird eine vergleichbare initiale Leitfähigkeit zwischen PfAQ1 und TbAQP2 nach zellfreier Produktion und Rekonstitution in Liposomen erwartet. Als weiterer Indikator dienen die gemessenen initialen Leitfähigkeiten von PfAQP1 in Hefeprotoplasten, welche ebenfalls um den Faktor zehn im Vergleich zu dem Expressionssystem aus *Xenopus oocytes* erhöht waren (Song *et al.* 2012). Die während dieser Arbeit gemessene initiale Leitfähigkeit der TbAQP2-Proteoliposomen war mit der initialen Leitfähigkeit der PfAQP1-Proteoliposomen gegenüber 100 mM Glycerol vergleichbar. Weiterhin wurden im System der PfAQP1-Hefeprotoplasten initiale Transportraten gemessen, welche in der gleichen Größenordnung lagen (Song *et al.* 2012). Somit erscheinen die gemessenen Werte plausibel. Analog zu Uzcategui *et al.* (2004) wurde die mit Abstand größte initiale Leitfähigkeit für Glycerol gemessen. Da Glycerol den geringsten sterischen Anspruch der getesteten Zuckeralkohole aufweist, diffundiert es am leichtesten durch die Pore. Bei dem größer werdendem sterisch anspruchsvollerem Erythritol wurde eine drastisch verringerte initiale Leitfähigkeit beobachtet, welche bei weiteren Zuckeralkoholen Ribitol und Sorbitol auf einem konstanten Niveau verblieb. Dies deckt sich ebenfalls mit vorherigen Messwerten (Uzcategui *et al.* 2004).

Aquaporine führen zur Permeation von Soluten entlang eines chemischen Gradienten (King *et al.* 2000). Dementsprechend wurde erwartet und ebenfalls bestätigt, dass die TbAQP2-Proteoliposomen

## Diskussion

eine Steigerung der initialen Leitfähigkeit von Glycerol in Abhängigkeit des hyperosmotischen Gradienten zeigen (4.2.10). Somit deuten die erfolgreichen Schrumpf- und Schwell-Assays auf eine erfolgreiche Rekonstitution des TbAQP2 in den Liposomen sowie einer Funktionalität des TbAQP2 hin.

Trotz der funktionellen Nachweise von TbAQP2 und PfAQP1 in Proteoliposomen wurde zwischen den verschiedenen Präparationen an Proteoliposomen-Chargen eine große Schwankung hinsichtlich ihrer initialen Leitfähigkeit gemessen. Somit zeigte sich die Liposomen-Präparation im Rahmen dieser Arbeit zur Etablierung einer neuen Substrat-Screening-Methode mit Hilfe der BLI als zu wenig reproduzierbar, um weitere Untersuchungen am BLI durchzuführen.

In Zukunft könnten für eine weitere funktionelle Untersuchung der Proteoliposomen Nicht-Solute eingesetzt werden. So stehen für TbAQP2 die Nicht-Solute Xylitol und Arabitol zur Verfügung, welche insbesondere für eine Untersuchung mit Hilfe der BLI zu weiteren Erkenntnissen führen könnten. Weiterhin weisen die beiden anderen Isoformen, TbAQP1 und TbAQP3, ein verändertes Solut-Spektrum sowie veränderte initiale Transportraten auf. Beispielweise zeigt TbAQP1 keine Leitfähigkeit gegenüber Sorbitol, während TbAQP3 im Vergleich zu TbAQP2 ein um den Faktor 4 höhere initiale Leitfähigkeit für Erythritol aufweist (Uzcategui et al. 2004). Dies könnte ebenfalls für die Untersuchung mit der BLI zu weiteren Erkenntnissen führen.

## 5.3 Schlussfolgerung

Während dieser Arbeit wurde ein Fluoreszenz-Screening-Test entwickelt, bei dem die ribosomale Translation direkt abgelesen wird. Das Fluoreszenzsignal ist dosisabhängig und ermöglicht die Bestimmung von  $IC_{50}$ -Werten. Der Assay eignet sich für die Entdeckung von Ribosomen-Inhibitoren, die auf verschiedene Klassen von multiresistenten Bakterien wirken. Das geringe *multi-well*-Format ermöglicht einen hohen Durchsatz für Screening-Kampagnen.

Weiterhin wurde im Rahmen dieser Arbeit ein neues Expression-System für TbAQP2 etabliert. Es wurden funktionelle Nachweise von PfAQP1 und TbAQP2, welche in Liposomen rekonstituiert wurden, erzielt. Zur Erweiterung des Testsystem der Liposomen wurde neben den biologischen *E. coli*-Lipiden chemisch synthetisierte Lipide für die Herstellung von Proteoliposomen etabliert. Eine Untersuchung der Liposomen am BLI zeigte, dass eine Reproduzierbarkeit in der Herstellung von funktionellen Proteoliposomen Voraussetzung für weitere Interaktionsstudien am BLI ist. In Zukunft könnte der Zusatz von Cholesterin die Dichtigkeit der Liposomen-Membran weiter erhöhen und weitere Untersuchungen am BLI ermöglichen.

## 6 Literaturverzeichnis

Abdul Kadir L, Stacey M, Barrett-Jolley R. Emerging roles of the membrane potential: action beyond the action potential. *Front. Physiol.* 2018;9:1661. <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.01661>.

Agre P, Bonhivers M, Borgnia M J. The aquaporins, blueprints for cellular plumbing systems. *J. Biol. Chem.* 1998;273:14659–62. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.24.14659>.

Ahn J-H, Chu H-S, Kim T-W, Oh I-S, Choi C-Y, Hahn G-H *et al.* Cell-free synthesis of recombinant proteins from PCR-amplified genes at a comparable productivity to that of plasmid-based reactions. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2005;338:1346–52. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2005.10.094>.

Alekshun MN, Levy S B. Molecular mechanisms of antibacterial multidrug resistance. *Cell* 2007;128:1037–50. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.03.004>.

Alghamdi AH, Munday J C, Campagnaro G D, Gurvic D, Svensson F, Okpara C E *et al.* Positively selected modifications in the pore of TbAQP2 allow pentamidine to enter *Trypanosoma brucei*. *eLife* 2020;9. <https://doi.org/10.7554/eLife.56416>.

Alnajjar KS, Cvetkov T, Prochaska L. Role of phospholipids of subunit III in the regulation of structural rearrangements in cytochrome c oxidase of *Rhodobacter sphaeroides*. *Biosci.* 2015;54:1053–63. <https://doi.org/10.1021/bi5013657>.

Alsfeld S, Eckert S, Baker N, Glover L, Sanchez-Flores A, Leung K F *et al.* High-throughput decoding of antitrypanosomal drug efficacy and resistance. *Nature* 2012;482:232–6. <https://doi.org/10.1038/nature10771>.

AMR Industry Alliance (2020). 2020 progress report. Online verfügbar unter <https://www.amrindustryalliance.org/wp-content/uploads/2020/01/AMR-2020-Progress-Report.pdf>, [letzter Aufruf: 13.03.2023].

Andrews JM. Determination of minimum inhibitory concentrations. *J. Antimicrob. Chemother.* 2001;48 Suppl 1:5–16. [https://doi.org/10.1093/jac/48.suppl\\_1.5](https://doi.org/10.1093/jac/48.suppl_1.5).

Arenz S, Wilson D N. Bacterial protein synthesis as a target for antibiotic inhibition. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 2016;6. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a025361>.

Baker N, Alsfeld S, Horn D. Genome-wide RNAi screens in african trypanosomes identify the nifurtimox activator NTR and the eflornithine transporter AAT6. *Mol. Biochem. Parasitol.* 2011;176:55–7. <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2010.11.010>.

Bashan A, Yonath A. Correlating ribosome function with high-resolution structures. *Trends Microbiol.* 2008;16:326–35. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2008.05.001>.

Bator I, Karmainski T, Tiso T, Blank L M. Killing two birds with one stone - strain engineering facilitates the development of a unique rhamnolipid production process. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 2020;8:899. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.00899>.

Beitz E, Wu B, Holm L M, Schultz J E, Zeuthen T. Point mutations in the aromatic/arginine region in aquaporin 1 allow passage of urea, glycerol, ammonia, and protons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2006;103:269–74. <https://doi.org/10.1073/pnas.0507225103>.

## Literaturverzeichnis

Bergen PJ, Landersdorfer C B, Lee H J, Li J, Nation R L. 'Old' antibiotics for emerging multidrug-resistant bacteria. *Curr Opin Infect Dis* 2012;25:626–33.

<https://doi.org/10.1097/QCO.0b013e328358afe5>.

Besenicar M, Macek P, Lakey J H, Anderluh G. Surface plasmon resonance in protein-membrane interactions. *Chem. Phys. Lipids* 2006;141:169–78.

<https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2006.02.010>.

Besier S, Ludwig A, Brade V, Wichelhaus T A. Molecular analysis of fusidic acid resistance in *Staphylococcus aureus*. *Mol. Microbiol.* 2003;47:463–9. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2003.03307.x>.

Bianchi AA, Baneyx F. Stress responses as a tool to detect and characterize the mode of action of antibacterial agents. *Appl. Environ. Microbiol.* 1999;65:5023–7.

<https://doi.org/10.1128/aem.65.11.5023-5027.1999>.

Bodley JW, Zieve F J, Lin L, Zieve S T. Formation of the ribosome-G factor-GDP complex in the presence of fusidic acid. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1969;37:437–43.

[https://doi.org/10.1016/0006-291X\(69\)90934-6](https://doi.org/10.1016/0006-291X(69)90934-6).

Bokman SH, Ward W W. Renaturation of aequorea green-fluorescent protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1981;101:1372–80. [https://doi.org/10.1016/0006-291X\(81\)91599-0](https://doi.org/10.1016/0006-291X(81)91599-0).

Brändén M, Tabaei S R, Fischer G, Neutze R, Höök F. Refractive-index-based screening of membrane-protein-mediated transfer across biological membranes. *Biophys. J.* 2010;99:124–33. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2010.03.059>.

Bremer H, Dennis P P. Modulation of chemical composition and other parameters of the cell at different exponential growth rates. *EcoSal Plus* 2008;3. <https://doi.org/10.1128/ecosal.5.2.3>.

Brisson-Noël A, Trieu-Cuot P, Courvalin P. Mechanism of action of spiramycin and other macrolides. *J. Antimicrob. Chemother.* 1988;22 Suppl B:13–23. [https://doi.org/10.1093/jac/22.Supplement\\_B.13](https://doi.org/10.1093/jac/22.Supplement_B.13).

Brodersen DE, Clemons W M, Carter A P, Morgan-Warren R J, Wimberly B T, Ramakrishnan V. The structural basis for the action of the antibiotics tetracycline, pactamycin, and hygromycin B on the 30S ribosomal subunit. *Cell* 2000;103:1143–54. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)00216-6](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)00216-6).

Brown ED, Wright G D. Antibacterial drug discovery in the resistance era. *Nature* 2016;529:336–43. <https://doi.org/10.1038/nature17042>.

Brun R, Blum J, Chappuis F, Burri C. Human African trypanosomiasis. *Lancet* 2010;375:148–59. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(09\)60829-1](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(09)60829-1).

Bulut-Karslioglu A, Macrae T A, Oses-Prieto J A, Covarrubias S, Percharde M, Ku G *et al*. The transcriptionally permissive chromatin state of embryonic stem cells is acutely tuned to translational output. *Cell Stem Cell* 2018;22:369–383.e8. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2018.02.004>.

Caraus I, Alsuwailem A A, Nadon R, Makarenkov V. Detecting and overcoming systematic bias in high-throughput screening technologies: a comprehensive review of practical issues and methodological solutions. *Brief. Bioinform.* 2015;16:974–86. <https://doi.org/10.1093/bib/bbv004>.

Caschera F, Noireaux V. Synthesis of 2.3 mg/ml of protein with an all *Escherichia coli* cell-free transcription-translation system. *Biochimie* 2014;99:162–8.

<https://doi.org/10.1016/j.biochi.2013.11.025>.

## Literaturverzeichnis

- Cavard D, Lazdunski C. Colicin cleavage by OmpT protease during both entry into and release from *Escherichia coli* cells. *J. Bacteriol.* 1990;172:648–52. <https://doi.org/10.1128/jb.172.2.648-652.1990>.
- Chrispeels MJ, Crawford N M, Schroeder J I. Proteins for transport of water and mineral nutrients across the membranes of plant cells. *Plant Cell* 1999;11:661–76. <https://doi.org/10.1105/tpc.11.4.661>.
- Clark G, Paszkiewicz K, Hale J, Weston V, Constantinidou C, Penn C *et al.* Genomic analysis uncovers a phenotypically diverse but genetically homogeneous *Escherichia coli* ST131 clone circulating in unrelated urinary tract infections. *J. Antimicrob. Chemother.* 2012;67:868–77. <https://doi.org/10.1093/jac/dkr585>.
- Clavel D, Gotthard G, Stetten D von, Sanctis D de, Pasquier H, Lambert G G *et al.* Structural analysis of the bright monomeric yellow-green fluorescent protein mNeonGreen obtained by directed evolution. *Acta Crystallogr. D* 2016;72:1298–307. <https://doi.org/10.1107/S2059798316018623>.
- Clement NR, Gould J M. Pyranine (8-hydroxy-1,3,6-pyrenetrisulfonate) as a probe of internal aqueous hydrogen ion concentration in phospholipid vesicles. *Biosci.* 1981;20:1534–8. <https://doi.org/10.1021/BI00509A019>.
- Cody CW, Prasher D C, Westler W M, Prendergast F G, Ward W W. Chemical structure of the hexapeptide chromophore of the Aequorea green-fluorescent protein. *Biosci.* 1993;32:1212–8. <https://doi.org/10.1021/bi00056a003>.
- Cohen SN, Chang A C, Hsu L. Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1972;69:2110–4. <https://doi.org/10.1073/pnas.69.8.2110>.
- Cole SD, Miklos A E, Chiao A C, Sun Z Z, Lux M W. Methodologies for preparation of prokaryotic extracts for cell-free expression systems. *Synth. Syst. Biotechnol.* 2020;5:252–67. <https://doi.org/10.1016/j.synbio.2020.07.006>.
- Concepcion J, Witte K, Wartchow C, Choo S, Yao D, Persson H *et al.* Label-free detection of biomolecular interactions using bioLayer interferometry for kinetic characterization. *Comb. Chem. High Throughput Screen.* 2009;12:791–800. <https://doi.org/10.2174/138620709789104915>.
- Conlon BP, Rowe S E, Gandt A B, Nuxoll A S, Donegan N P, Zalis E A *et al.* Persister formation in *Staphylococcus aureus* is associated with ATP depletion. *Nat. Microbiol.* 2016;1. <https://doi.org/10.1038/nmicrobiol.2016.51>.
- Cooper MA, Hansson A, Löfås S, Williams D H. A vesicle capture sensor chip for kinetic analysis of interactions with membrane-bound receptors. *Anal. Biochem.* 2000;277:196–205. <https://doi.org/10.1006/abio.1999.4389>.
- Cornelius F. Cholesterol-dependent interaction of polyunsaturated phospholipids with Na,K-ATPase. *Biosci.* 2008;47:1652–8. <https://doi.org/10.1021/bi702128x>.
- Cranfill PJ, Sell B R, Baird M A, Allen J R, Lavagnino Z, Gruiter H M de *et al.* Quantitative assessment of fluorescent proteins. *Nat. Methods* 2016;13:557–62. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3891>.
- Dabour R, Meirson T, Samson A O. Global antibiotic resistance is mostly periodic. *J. Glob. Antimicrob. Resist.* 2016;7:132–4. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2016.09.003>.

## Literaturverzeichnis

- Dean RM, Rivers R L, Zeidel M L, Roberts D M. Purification and functional reconstitution of soybean nodulin 26. An aquaporin with water and glycerol transport properties. *Biosci.* 1999;38:347–53. <https://doi.org/10.1021/bi982110c>.
- Delcour AH. Outer membrane permeability and antibiotic resistance. *Biochim. Biophys. Acta.* 2009;1794:808–16. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2008.11.005>.
- Deng Y, Ma Z, Su B, Bai G, Pan J, Wang Q *et al.* Accuracy of the innowaveDX MTB/RIF test for detection of *Mycobacterium tuberculosis* and rifampicin resistance: a prospective multicentre study. *Emerg. Microbes Infect.* 2023;12:2151382. <https://doi.org/10.1080/22221751.2022.2151382>.
- Doi Y, Arakawa Y. 16S ribosomal RNA methylation: emerging resistance mechanism against aminoglycosides. *Clin. Infect. Dis.* 2007;45:88–94. <https://doi.org/10.1086/518605>.
- Dopp JL, Reuel N F. Process optimization for scalable *E. coli* extract preparation for cell-free protein synthesis. *Biochem. Eng. J.* 2018;138:21–8. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2018.06.021>.
- Drainas D, Kalpaxis D L, Coutsogeorgopoulos C. Inhibition of ribosomal peptidyltransferase by chloramphenicol. kinetic studies. *Eur. J. Biochem.* 1987;164:53–8. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1987.tb10991.x>.
- Drew D, Slotboom D-J, Friso G, Reda T, Genevaux P, Rapp M *et al.* A scalable, GFP-based pipeline for membrane protein overexpression screening and purification. *Protein Sci.* 2005;14:2011–7. <https://doi.org/10.1110/ps.051466205>.
- Duggar BM. Aureomycin; a product of the continuing search for new antibiotics. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1948;51:177–81. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1948.tb27262.x>.
- Dysinger M, King L E. Practical quantitative and kinetic applications of bio-layer interferometry for toxicokinetic analysis of a monoclonal antibody therapeutic. *J. Immunol. Methods.* 2012;379:30–41. <https://doi.org/10.1016/j.jim.2012.02.017>.
- Eriksson UK, Fischer G, Friemann R, Enkavi G, Tajkhorshid E, Neutze R. Subangstrom resolution X-ray structure details aquaporin-water interactions. *Science* 2013;340:1346–9. <https://doi.org/10.1126/science.1234306>.
- Evdokimov AG, Pokross M E, Egorov N S, Zaraisky A G, Yampolsky I V, Merzlyak E M *et al.* Structural basis for the fast maturation of Arthropoda green fluorescent protein. *EMBO Rep.* 2006;7:1006–12. <https://doi.org/10.1038/sj.embor.7400787>.
- Ferretti MB, Ghalei H, Ward E A, Potts E L, Karbstein K. Rps26 directs mRNA-specific translation by recognition of Kozak sequence elements. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2017;24:700–7. <https://doi.org/10.1038/nsmb.3442>.
- Fisher JF, Mobashery S. Constructing and deconstructing the bacterial cell wall. *Protein Sci.* 2020;29:629–46. <https://doi.org/10.1002/pro.3737>.
- Fleming A. On the antibacterial action of cultures of a penicillium, with special reference to their use in the isolation of *B. influenzae*. *Br. J. Exp. Pathol.* 1929;10:226–36.
- Florio M, Engfors A, Gena P, Larsson J, Massaro A, Timpka S *et al.* Characterization of the aquaporin-9 inhibitor RG100204 In vitro and in mice. *Cells* 2022;11. <https://doi.org/10.3390/cells11193118>.

## Literaturverzeichnis

- Fonseca P, Moreno R, Rojo F. Growth of *Pseudomonas putida* at low temperature: global transcriptomic and proteomic analyses. *Environ. Microbiol. Rep.* 2011;3:329–39. <https://doi.org/10.1111/j.1758-2229.2010.00229.x>.
- Fourmy D, Recht M I, Blanchard S C, Puglisi J D. Structure of the A site of *Escherichia coli* 16S ribosomal RNA complexed with an aminoglycoside antibiotic. *Science* 1996;274:1367–71. <https://doi.org/10.1126/science.274.5291.1367>.
- Freihofer P, Akbergenov R, Teo Y, Juskeviciene R, Andersson D I, Böttger E C. Nonmutational compensation of the fitness cost of antibiotic resistance in mycobacteria by overexpression of *tlyA* rRNA methylase. *RNA* 2016;22:1836–43. <https://doi.org/10.1261/rna.057257.116>.
- Frick M, Schwieger C, Schmidt C. Liposomen als Überträger membranassozierter Proteine und Peptide für die massenspektrometrische Analyse. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2021;133:11624–32. <https://doi.org/10.1002/ange.202101242>.
- Fu D, Libson A, Miercke L J, Weitzman C, Nollert P, Krucinski J *et al.* Structure of a glycerol-conducting channel and the basis for its selectivity. *Science* 2000;290:481–6. <https://doi.org/10.1126/science.290.5491.481>.
- Fyfe C, Sutcliffe J A, Grossman T H. Development and characterization of a *Pseudomonas aeruginosa* in vitro coupled transcription-translation assay system for evaluation of translation inhibitors. *J. Microbiol. Methods*. 2012;90:256–61. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2012.05.018>.
- Gallegos-Monterrosa R, Mhatre E, Kovács Á T. Specific *Bacillus subtilis* 168 variants form biofilms on nutrient-rich medium. *Microbiology (Reading, Engl.)* 2016;162:1922–32. <https://doi.org/10.1099/mic.0.000371>.
- Geertsma ER, Groeneveld M, Slotboom D-J, Poolman B. Quality control of overexpressed membrane proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2008;105:5722–7. <https://doi.org/10.1073/pnas.0802190105>.
- Genuth NR, Barna M. The discovery of ribosome heterogeneity and its implications for gene regulation and organismal life. *Mol. Cell* 2018;71:364–74, [letzter Aufruf: Gleich. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2018.07.018>.
- Gibson B, Wilson D J, Feil E, Eyre-Walker A. The distribution of bacterial doubling times in the wild. *Proc. Royal Soc. B.* 2018;285. <https://doi.org/10.1098/rspb.2018.0789>.
- Goh E-B, Yim G, Tsui W, McClure J, Surette M G, Davies J. Transcriptional modulation of bacterial gene expression by subinhibitory concentrations of antibiotics. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2002;99:17025–30. <https://doi.org/10.1073/pnas.252607699>.
- Goldstein J, Pollitt N S, Inouye M. Major cold shock protein of *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1990;87:283–7. <https://doi.org/10.1073/pnas.87.1.283>.
- Green R, Noller H F. Ribosomes and translation. *Annu. Rev. Biochem.* 1997;66:679–716. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.66.1.679>.
- Gregorio NE, Levine M Z, Oza J P. A user's guide to cell-free protein synthesis. *Methods Protoc.* 2019;2. <https://doi.org/10.3390/mps2010024>.
- Gregory ST, Cate J H, Dahlberg A E. Streptomycin-resistant and streptomycin-dependent mutants of the extreme thermophile *Thermus thermophilus*. *J. Mol. Biol.* 2001;309:333–8. <https://doi.org/10.1006/jmbi.2001.4676>.

## Literaturverzeichnis

- Grit M, Smidt J H de, Struijke A, Crommelin D J. Hydrolysis of phosphatidylcholine in aqueous liposome dispersions. *Int. J. Pharm.* 1989;50:1–6. [https://doi.org/10.1016/0378-5173\(89\)90173-7](https://doi.org/10.1016/0378-5173(89)90173-7).
- Gupta P, Sothiselvam S, Vázquez-Laslop N, Mankin A S. Deregulation of translation due to post-transcriptional modification of rRNA explains why erm genes are inducible. *Nat. Commun.* 2013;4:1984. <https://doi.org/10.1038/ncomms2984>.
- Hajek P, Bader A, Helmstetter F, Henke B, Arnold P, Beitz E. Cell-Free and yeast-based production of the malarial lactate transporter, PfFNT, delivers comparable yield and protein quality. *Front. Pharmacol.* 2019;10:375. <https://doi.org/10.3389/fphar.2019.00375>.
- Hansen JL, Moore P B, Steitz T A. Structures of five antibiotics bound at the peptidyl transferase center of the large ribosomal subunit. *J. Mol. Biol.* 2003;330:1061–75. [https://doi.org/10.1016/s0022-2836\(03\)00668-5](https://doi.org/10.1016/s0022-2836(03)00668-5).
- Hansen M, Kun J FJ, Schultz J E, Beitz E. A single, bi-functional aquaglyceroporin in blood-stage *Plasmodium falciparum* malaria parasites. *J. Biol. Chem.* 2002;277:4874–82. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110683200>.
- Harbers M. Wheat germ systems for cell-free protein expression. *FEBS Lett.* 2014;588:2762–73. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2014.05.061>.
- Harms A, Maisonneuve E, Gerdes K. Mechanisms of bacterial persistence during stress and antibiotic exposure. *Science* 2016;354. <https://doi.org/10.1126/science.aaf4268>.
- Heim R, Prasher D C, Tsien R Y. Wavelength mutations and posttranslational autoxidation of green fluorescent protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1994;91:12501–4. <https://doi.org/10.1073/pnas.91.26.12501>.
- Heim R, Tsien R Y. Engineering green fluorescent protein for improved brightness, longer wavelengths and fluorescence resonance energy transfer. *Curr. Biol.* 1996;6:178–82. [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(02\)00450-5](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(02)00450-5).
- Heller KB, Lin E C, Wilson T H. Substrate specificity and transport properties of the glycerol facilitator of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 1980;144:274–8. <https://doi.org/10.1128/jb.144.1.274-278.1980>.
- Helmstetter F, Arnold P, Höger B, Petersen L M, Beitz E. Formate-nitrite transporters carrying nonprotonatable amide amino acids instead of a central histidine maintain pH-dependent transport. *J. Biol. Chem.* 2019;294:623–31. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA118.006340>.
- Hengen P. Purification of His-tag fusion proteins from *Escherichia coli*. *Trends Biochem. Sci.* 1995;20:285–6. <https://doi.org/10.1016/S0968-0004%2800%2989045-3>.
- Hering J, Missel J W, Zhang L, Gunnarsson A, Castaldo M, Pedersen P A *et al.* The rapid "teabag" method for high-end purification of membrane proteins. *Sci. Rep.* 2020;10:16167. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-73285-9>.
- Holm-Bertelsen J, Bock S, Helmstetter F, Beitz E. High-level cell-free production of the malarial lactate transporter PfFNT as a basis for crystallization trials and directional transport studies. *Protein Expr. Purif.* 2016;126:109–14. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2016.06.008>.
- Hovijitra NT, Wuu J J, Peaker B, Swartz J R. Cell-free synthesis of functional aquaporin Z in synthetic liposomes. *Biotechnol. Bioeng.* 2009;104:40–9. <https://doi.org/10.1002/bit.22385>.

## Literaturverzeichnis

- Hui C-Y, Guo Y, He Q-S, Peng L, Wu S-C, Cao H *et al.* Escherichia coli outer membrane protease OmpT confers resistance to urinary cationic peptides. *Microbiol. Immunol.* 2010;54:452–9.  
<https://doi.org/10.1111/j.1348-0421.2010.00238.x>.
- Hurtado-Rios JJ, Carrasco-Navarro U, Almanza-Pérez J C, Ponce-Alquicira E. Ribosomes: the new role of ribosomal proteins as natural antimicrobials. *Int. J. Mol. Sci.* 2022;23.  
<https://doi.org/10.3390/ijms23169123>.
- Inouye S, Tsuji F I. Aequorea green fluorescent protein. Expression of the gene and fluorescence characteristics of the recombinant protein. *FEBS Lett.* 1994;341:277–80.  
[https://doi.org/10.1016/0014-5793\(94\)80472-9](https://doi.org/10.1016/0014-5793(94)80472-9).
- Jacobs N. J., HEADY R E, Jacobs J. M., CHAN K, Deibel R. H. Effect of hemin and oxygen tension on growth and nitrate reduction by bacteria. *J. Bacteriol.* 1964;87:1406–11.  
<https://doi.org/10.1128/jb.87.6.1406-1411.1964>.
- Jahn TP, Møller A LB, Zeuthen T, Holm L M, Klaerke D A, Mohsin B *et al.* Aquaporin homologues in plants and mammals transport ammonia. *FEBS Lett.* 2004;574:31–6.  
<https://doi.org/10.1016/j.febslet.2004.08.004>.
- Jeong H, Jeong D-E, Park S-H, Kim S J, Choi S-K. Complete genome sequence of *Bacillus subtilis* Strain WB800N, an extracellular protease-deficient derivative of strain 168. *Microbiol. Resour. Announc.* 2018;7. <https://doi.org/10.1128/MRA.01380-18>.
- Johnson CM, Grossman A D. Complete genome sequence of *Bacillus subtilis* strain CU1050, which is sensitive to phage SPβ. *Genome Announc.* 2016;4. <https://doi.org/10.1128/genomeA.00262-16>.
- Kagan IA, Flythe M D. Thin-layer chromatographic (TLC) separations and bioassays of plant extracts to identify antimicrobial compounds. *JoVE* 2014. <https://doi.org/10.3791/51411>.
- Kai L, Kaldenhoff R, Lian J, Zhu X, Dötsch V, Bernhard F *et al.* Preparative scale production of functional mouse aquaporin 4 using different cell-free expression modes. *PLOS ONE* 2010;5:e12972.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0012972>.
- Kannan K, Mankin A S. Macrolide antibiotics in the ribosome exit tunnel: species-specific binding and action. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2011;1241:33–47. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2011.06315.x>.
- Kannan K, Vázquez-Laslop N, Mankin A S. Selective protein synthesis by ribosomes with a drug-obstructed exit tunnel. *Cell* 2012;151:508–20. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.09.018>.
- Kapp LD, Lorsch J R. The molecular mechanics of eukaryotic translation. *Annu. Rev. Biochem.* 2004;73:657–704. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.73.030403.080419>.
- Kelwick R, Webb A J, MacDonald J T, Freemont P S. Development of a *Bacillus subtilis* cell-free transcription-translation system for prototyping regulatory elements. *Metab. Eng.* 2016;38:370–81.  
<https://doi.org/10.1016/j.ymben.2016.09.008>.
- Kensil CR, Dennis E A. Alkaline hydrolysis of phospholipids in model membranes and the dependence on their state of aggregation. *Biosci.* 1981;20:6079–85. <https://doi.org/10.1021/bi00524a025>.
- Khaitovich P, Mankin A S, Green R, Lancaster L, Noller H F. Characterization of functionally active subribosomal particles from *Thermus aquaticus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1999;96:85–90.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.96.1.85>.

## Literaturverzeichnis

- Kigawa T, Yabuki T, Matsuda N, Matsuda T, Nakajima R, Tanaka A *et al.* Preparation of *Escherichia coli* cell extract for highly productive cell-free protein expression. *J. Struct. Funct. Genomics* 2004;5:63–8. <https://doi.org/10.1023/B:JSFG.0000029204.57846.7d>.
- Kikuchi K. Design, synthesis and biological application of chemical probes for bio-imaging. *Chem. Soc. Rev.* 2010;39:2048–53. <https://doi.org/10.1039/B819316A>.
- Kim D-M, Swartz J R. Prolonging cell-free protein synthesis with a novel ATP regeneration system. *Biotechnol. Bioeng.* 1999;66:180–8. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0290\(1999\)66:3<180::AID-BIT6>3.0.CO;2-S](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0290(1999)66:3<180::AID-BIT6>3.0.CO;2-S).
- Kim T-W, Keum J-W, Oh I-S, Choi C-Y, Park C-G, Kim D-M. Simple procedures for the construction of a robust and cost-effective cell-free protein synthesis system. *J. Biotechnol.* 2006;126:554–61. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2006.05.014>.
- Kimura T, Jennings W, Epanet R M. Roles of specific lipid species in the cell and their molecular mechanism. *Prog. Lipid Res.* 2016;62:75–92. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2016.02.001>.
- King LS, Yasui M, Agre P. Aquaporins in health and disease. *Mol. med. today* 2000;6:60–5. [https://doi.org/10.1016/s1357-4310\(99\)01636-6](https://doi.org/10.1016/s1357-4310(99)01636-6).
- Klein DJ, Schmeing T M, Moore P B, Steitz T A. The kink-turn: a new RNA secondary structure motif. *EMBO J.* 2001;20:4214–21. <https://doi.org/10.1093/emboj/20.15.4214>.
- Kong J, Wang Y, Qi W, Huang M, Su R, He Z. Green fluorescent protein inspired fluorophores. *Adv. Colloid Interface Sci.* 2020;285:102286. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2020.102286>.
- Konstantinidis KT, Tiedje J M. Genomic insights that advance the species definition for prokaryotes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2005;102:2567–72. <https://doi.org/10.1073/pnas.0409727102>.
- Korah BK, Chacko A R, Mathew S, John B K, Abraham T, Mathew B. Biomass-derived carbon dots as a sensitive and selective dual detection platform for fluoroquinolones and tetracyclines. *Anal. Bioanal. Chem.* 2022;414:4935–51. <https://doi.org/10.1007/s00216-022-04119-y>.
- Kramer EB, Farabaugh P J. The frequency of translational misreading errors in *E. coli* is largely determined by tRNA competition. *RNA* 2007;13:87–96. <https://doi.org/10.1261/rna.294907>.
- Kuhn P, Eyer K, Robinson T, Schmidt F I, Mercer J, Dittrich P S. A facile protocol for the immobilisation of vesicles, virus particles, bacteria, and yeast cells. *Integr Biol (Camb)* 2012;4:1550–5. <https://doi.org/10.1039/c2ib20181j>.
- Kumaraswamy S, Tobias R. Label-free kinetic analysis of an antibody-antigen interaction using biolayer interferometry. *Methods Mol. Biol.* 2015;1278:165–82. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2425-7\\_10](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2425-7_10).
- Kurittu J, Karp M, Korpela M. Detection of tetracyclines with luminescent bacterial strains. *Luminescence* 2000;15:291–7. [https://doi.org/10.1002/1522-7243\(200009/10\)15:5%3C291::aid-bio596%3E3.0.co;2-b](https://doi.org/10.1002/1522-7243(200009/10)15:5%3C291::aid-bio596%3E3.0.co;2-b).
- Kurland CG. Molecular characterization of ribonucleic acid from *Escherichia coli* ribosomes. *J. Mol. Biol.* 1960;2:83–91. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(60\)80029-0](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(60)80029-0).
- Kwon Y-C, Jewett M C. High-throughput preparation methods of crude extract for robust cell-free protein synthesis. *Sci. Rep.* 2015;5:8663. <https://doi.org/10.1038/srep08663>.

## Literaturverzeichnis

- Lambert T. Antibiotics that affect the ribosome. *Rev. Sci.Tech.* 2012;31:57–64. <https://doi.org/10.20506/rst.31.1.2095>.
- Laurberg M, Kristensen O, Martemyanov K, Gudkov A T, Nagaev I, Hughes D *et al.* Structure of a mutant EF-G reveals domain III and possibly the fusidic acid binding site. *J. Mol. Biol.* 2000;303:593–603. <https://doi.org/10.1006/jmbi.2000.4168>.
- Laursen BS, Sørensen H P, Mortensen K K, Sperling-Petersen H U. Initiation of protein synthesis in bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2005;69:101–23. <https://doi.org/10.1128/MMBR.69.1.101-123.2005>.
- Leventhal JM, Chambliss G H. DNA-directed cell-free protein-synthesizing system of *Bacillus subtilis*. *Biochim. Biophys. Acta.* 1979;564:162–71. [https://doi.org/10.1016/0005-2787\(79\)90197-7](https://doi.org/10.1016/0005-2787(79)90197-7).
- Levine MZ, So B, Mullin A C, Watts K R, Oza J P. Redesigned upstream processing enables a 24-hour workflow from *E. coli* cells to cell-free protein synthesis 2019. <https://doi.org/10.1101/729699>.
- Lévy D, Bluzat A, Seigneuret M, Rigaud J L. A systematic study of liposome and proteoliposome reconstitution involving Bio-Bead-mediated Triton X-100 removal. *Biochim. Biophys. Acta.* 1990;1025:179–90. [https://doi.org/10.1016/0005-2736\(90\)90096-7](https://doi.org/10.1016/0005-2736(90)90096-7).
- Lewis K. Platforms for antibiotic discovery. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2013;12:371–87. <https://doi.org/10.1038/nrd3975>.
- Lewis K. The science of antibiotic discovery. *Cell* 2020;181:29–45. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.02.056>.
- Li D, Wang J. Ribosome heterogeneity in stem cells and development. *J. Cell Biol.* 2020;219. <https://doi.org/10.1083/jcb.202001108>.
- Li W, Atkinson G C, Thakor N S, Allas U, Lu C, Chan K-Y *et al.* Mechanism of tetracycline resistance by ribosomal protection protein Tet(O). *Nat. Commun.* 2013;4:1477. <https://doi.org/10.1038/ncomms2470>.
- Lin J, Gagnon M G, Bulkley D, Steitz T A. Conformational changes of elongation factor G on the ribosome during tRNA translocation. *Cell* 2015;160:219–27. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.11.049>.
- Lin J, Zhou D, Steitz T A, Polikanov Y S, Gagnon M G. Ribosome-targeting antibiotics: modes of action, mechanisms of resistance, and implications for drug design. *Annu. Rev. Biochem.* 2018;87:451–78. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-062917-011942>.
- Liu WM, Iwamoto D K. Asian american men's gender role conflict: the role of asian values, self-esteem, and psychological distress. *Psychol. Men Masculinities* 2006;7:153–64. <https://doi.org/10.1037/1524-9220.7.3.153>.
- Livnah O, Bayer E A, Wilchek M, Sussman J L. Three-dimensional structures of avidin and the avidin-biotin complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1993;90:5076–80. <https://doi.org/10.1073/pnas.90.11.5076>.
- Llano-Sotelo B, Hickerson R P, Lancaster L, Noller H F, Mankin A S. Fluorescently labeled ribosomes as a tool for analyzing antibiotic binding. *RNA* 2009;15:1597–604. <https://doi.org/10.1261/rna.1681609>.

## Literaturverzeichnis

- Locati MD, Pagano J FB, Girard G, Ensink W A, van Olst M, van Leeuwen S *et al.* Expression of distinct maternal and somatic 5.8S, 18S, and 28S rRNA types during zebrafish development. *RNA* 2017;23:1188–99. <https://doi.org/10.1261/rna.061515.117>.
- Lowell AN, Santoro N, Swaney S M, McQuade T J, Schultz P J, Larsen M J *et al.* Microscale adaptation of in vitro transcription/translation for high-throughput screening of natural product extract libraries. *Chem Biol Drug Des* 2015;86:1331–8. <https://doi.org/10.1111/cbdd.12614>.
- Luisi PL, Ferri F, Stano P. Approaches to semi-synthetic minimal cells: a review. *Sci. Nat.* 2006;93:1–13. <https://doi.org/10.1007/s00114-005-0056-z>.
- Marks J, Kannan K, Roncase E J, Klepacki D, Kefi A, Orelle C *et al.* Context-specific inhibition of translation by ribosomal antibiotics targeting the peptidyl transferase center. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2016;113:12150–5. <https://doi.org/10.1073/pnas.1613055113>.
- Maximova K, Reuter N, Trylska J. Peptidomimetic inhibitors targeting the membrane-binding site of the neutrophil proteinase 3. *Biochim. Biophys. Acta* 2019;1861:1502–9. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2019.06.009>.
- Michel-Reydellet N, Calhoun K, Swartz J. Amino acid stabilization for cell-free protein synthesis by modification of the *Escherichia coli* genome. *Metab. Eng.* 2004;6:197–203. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2004.01.003>.
- Miethke M, Pieroni M, Weber T, Brönstrup M, Hammann P, Halby L *et al.* Towards the sustainable discovery and development of new antibiotics. *Nat. Rev. Chem.* 2021;5:726–49. <https://doi.org/10.1038/s41570-021-00313-1>.
- Miller AL, Hawkins R A, Veech R L. Phenylketonuria: phenylalanine inhibits brain pyruvate kinase in vivo. *Science* 1973;179:904–6. <https://doi.org/10.1126/science.179.4076.904>.
- Mingeot-Leclercq MP, Glupczynski Y, Tulkens P M. Aminoglycosides: activity and resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1999;43:727–37. <https://doi.org/10.1128/AAC.43.4.727>.
- Missel JW, Salustros N, Becares E R, Steffen J H, Laursen A G, Garcia A S *et al.* Cyclohexyl- $\alpha$  maltoside as a highly efficient tool for membrane protein studies. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 2021;3:85–94. <https://doi.org/10.1016/j.crstbi.2021.03.002>.
- Moazed D, Noller H F. Interaction of antibiotics with functional sites in 16S ribosomal RNA. *Nature* 1987;327:389–94. <https://doi.org/10.1038/327389a0>.
- Müller-Esparza H, Osorio-Valeriano M, Steube N, Thanbichler M, Randau L. Bio-layer interferometry analysis of the target binding activity of CRISPR-cas effector complexes. *Front. Mol. Biosci.* 2020;7:98. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2020.00098>.
- Müller-Lucks A, Bock S, Wu B, Beitz E. Fluorescent in situ folding control for rapid optimization of cell-free membrane protein synthesis. *PLOS ONE* 2012;7:e42186. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0042186>.
- Müller-Lucks A, Gena P, Frascaria D, Altamura N, Svelto M, Beitz E *et al.* Preparative scale production and functional reconstitution of a human aquaglyceroporin (AQP3) using a cell free expression system. *New Biotechnol.* 2013;30:545–51. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2013.03.007>.
- Murata K, Mitsuoka K, Hirai T, Walz T, Agre P, Heymann J B *et al.* Structural determinants of water permeation through aquaporin-1. *Nature* 2000;407:599–605. <https://doi.org/10.1038/35036519>.

## Literaturverzeichnis

- Murray RW, Melchior E P, Hagadorn J C, Marotti K R. *Staphylococcus aureus* cell extract transcription-translation assay: firefly luciferase reporter system for evaluating protein translation inhibitors. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2001;45:1900–4. <https://doi.org/10.1128/AAC.45.6.1900-1904.2001>.
- Musatov A, Sedlák E. Role of cardiolipin in stability of integral membrane proteins. *Biochimie* 2017;142:102–11. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2017.08.013>.
- Nakamoto T. Mechanisms of the initiation of protein synthesis: in reading frame binding of ribosomes to mRNA. *Mol. Biol. Rep.* 2011;38:847–55. <https://doi.org/10.1007/s11033-010-0176-1>.
- Nes IF, Eklund T. The effect of parabens on DNA, RNA and protein synthesis in *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. *J. Appl. Microbiol.* 1983;54:237–42. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1983.tb02612.x>.
- Newby ZER, O'Connell J, Robles-Colmenares Y, Khademi S, Miercke L J, Stroud R M. Crystal structure of the aquaglyceroporin PfAQP from the malarial parasite *Plasmodium falciparum*. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2008;15:619–25. <https://doi.org/10.1038/nsmb.1431>.
- Nguyen H, Phan T, Schumann W. Analysis and application of *Bacillus subtilis* sortases to anchor recombinant proteins on the cell wall. *AMB Express* 2011;1:22. <https://doi.org/10.1186/2191-0855-1-22>.
- Nguyen N-P, Warnow T, Pop M, White B. A perspective on 16S rRNA operational taxonomic unit clustering using sequence similarity. *NPJ Biofilms Microbiomes* 2016;2:16004. <https://doi.org/10.1038/npjbiofilms.2016.4>;
- Nikolic P, Mudgil P. The cell wall, cell membrane and virulence factors of *Staphylococcus aureus* and their role in antibiotic resistance. *Microorganisms* 2023;11. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11020259>.
- Nissen P, Hansen J, Ban N, Moore P B, Steitz T A. The structural basis of ribosome activity in peptide bond synthesis. *Science* 2000;289:920–30. <https://doi.org/10.1126/science.289.5481.920>.
- Novak R. Are pleuromutilin antibiotics finally fit for human use? *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2011;1241:71–81. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2011.06219.x>.
- Ogle JM, Ramakrishnan V. Structural insights into translational fidelity. *Annu. Rev. Biochem.* 2005;74:129–77. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.74.061903.155440>.
- Okamoto M, Fukui S, Kobayashi Y. In vitro expression of plasmid pUB110 DNA with *Bacillus subtilis* cell-free extracts. *Agric. biol. chem* 1985;49:1077–82. <https://doi.org/10.1080/00021369.1985.10866864>.
- Orelle C, Carlson S, Kaushal B, Almutairi M M, Liu H, Ochabowicz A et al. Tools for characterizing bacterial protein synthesis inhibitors. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2013;57:5994–6004. <https://doi.org/10.1128/AAC.01673-13>.
- Ormö M, Cubitt A B, Kallio K, Gross L A, Tsien R Y, Remington S J. Crystal structure of the *Aequorea victoria* green fluorescent protein. *Science* 1996;273:1392–5. <https://doi.org/10.1126/science.273.5280.1392>.
- Osterman IA, Bogdanov A A, Dontsova O A, Sergiev P V. Techniques for screening translation inhibitors. *Antibiotics* 2016;5. <https://doi.org/10.3390/antibiotics5030022>.

## Literaturverzeichnis

- Palmer BR, Marinus M G. The dam and dcm strains of *Escherichia coli* — a review. *Gene* 1994;143:1–12. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(94\)90597-5](https://doi.org/10.1016/0378-1119(94)90597-5).
- Patil RV, Xu S, van Hoek A N, Rusinko A, Feng Z, May J *et al.* Rapid identification of novel inhibitors of the human aquaporin-1 water channel. *Chem Biol Drug Des* 2016;87:794–805. <https://doi.org/10.1111/cbdd.12713>.
- Pavlovic-Djurjanovic S, Kun J FJ, Schultz J E, Beitz E. Dihydroxyacetone and methylglyoxal as permeants of the *Plasmodium* aquaglyceroporin inhibit parasite proliferation. *Biochim. Biophys. Acta.* 2006;1758:1012–7. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2005.12.002>.
- Payne DJ, Gwynn M N, Holmes D J, Pompliano D L. Drugs for bad bugs: confronting the challenges of antibacterial discovery. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2007;6:29–40. <https://doi.org/10.1038/nrd2201>.
- Pédelacq J-D, Cabantous S, Tran T, Terwilliger T C, Waldo G S. Engineering and characterization of a superfolder green fluorescent protein. *Nat. Biotechnol.* 2006;24:79–88. <https://doi.org/10.1038/nbt1172>.
- Petersen RL. Strategies using bio-layer interferometry biosensor technology for vaccine research and development. *Biosensors*. 2017;7. <https://doi.org/10.3390/bios7040049>.
- Pfeifer L, Baumann A, Petersen L M, Höger B, Beitz E, Classen B. Degraded arabinogalactans and their binding properties to cancer-associated human galectins. *Int. J. Mol. Sci.* 2021;22. <https://doi.org/10.3390/ijms22084058>.
- Polacek N, Mankin A S. The ribosomal peptidyl transferase center: structure, function, evolution, inhibition. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 2005;40:285–311. <https://doi.org/10.1080/10409230500326334>.
- Polacek N, Swaney S, Shinabarger D, Mankin A S. SPARK--a novel method to monitor ribosomal peptidyl transferase activity. *Biosci.* 2002;41:11602–10. <https://doi.org/10.1021/bi026040s>.
- Pontefract BA, Rovelsky S A, Madaras-Kelly K J. Linezolid to treat urinary tract infections caused by vancomycin-resistant *Enterococcus*. *SAGE Open Med.* 2020;8:2050312120970743. <https://doi.org/10.1177/2050312120970743>.
- Pratt SD, David C A, Black-Schaefer C, Dandliker P J, Xuei X, Warrior U *et al.* A strategy for discovery of novel broad-spectrum antibacterials using a high-throughput *Streptococcus pneumoniae* transcription/translation screen. *J Biomol Screen* 2004;9:3–11. <https://doi.org/10.1177/1087057103260876>.
- Prezioso SM, Brown N E, Goldberg J B. Elfamycins: inhibitors of elongation factor-Tu. *Mol. Microbiol.* 2017;106:22–34. <https://doi.org/10.1111/mmi.13750>.
- Raleigh EA, Murray N E, Revel H, Blumenthal R M, Westaway D, Reith A D *et al.* McrA and McrB restriction phenotypes of some *E. coli* strains and implications for gene cloning. *Nucleic Acids Res.* 1988;16:1563–75. <https://doi.org/10.1093/nar/16.4.1563>.
- Ramadoss NS, Alumasa J N, Cheng L, Wang Y, Li S, Chambers B S *et al.* Small molecule inhibitors of trans-translation have broad-spectrum antibiotic activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2013;110:10282–7. <https://doi.org/10.1073/pnas.1302816110>.
- Ramakrishnan V. Ribosome structure and the mechanism of translation. *Cell* 2002;108:557–72. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(02\)00619-0](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(02)00619-0).

## Literaturverzeichnis

- Raneri M, Sciandrone B, Briani F. A whole-cell assay for specific inhibitors of translation initiation in bacteria. *J Biomol Screen* 2015;20:627–33. <https://doi.org/10.1177/1087057114566376>.
- Redwood WR, Pfeiffer F R, Weisbach J A, Thompson T E. Physical properties of bilayer membranes formed from a synthetic saturated phospholipid in n-decane. *Biochim. Biophys. Acta*. 1971;233:1–6. [https://doi.org/10.1016/0005-2736\(71\)90351-8](https://doi.org/10.1016/0005-2736(71)90351-8).
- Remington SJ. Green fluorescent protein: a perspective. *Protein Sci.* 2011;20:1509–19. <https://doi.org/10.1002/pro.684>.
- Renauld S, Cortes S, Bersch B, Henry X, Waard M de, Schaack B. Functional reconstitution of cell-free synthesized purified Kv channels. *Biochim. Biophys. Acta* 2017;1859:2373–80. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2017.09.002>.
- Rich RL, Myszka D G. Grading the commercial optical biosensor literature-Class of 2008: 'the mighty binders'. *J. Mol. Recognit.* 2010;23:1–64. <https://doi.org/10.1002/jmr.1004>.
- Rigaud JL, Paternostre M T, Bluzat A. Mechanisms of membrane protein insertion into liposomes during reconstitution procedures involving the use of detergents. 2. Incorporation of the light-driven proton pump bacteriorhodopsin. *Biosci.* 1988;27:2677–88. <https://doi.org/10.1021/bi00408a007>.
- Rigaud JL, Pitard B, Levy D. Reconstitution of membrane proteins into liposomes: application to energy-transducing membrane proteins. *Biochim. Biophys. Acta*. 1995;1231:223–46. [https://doi.org/10.1016/0005-2728\(95\)00091-V](https://doi.org/10.1016/0005-2728(95)00091-V).
- Rodriguez EA, Campbell R E, Lin J Y, Lin M Z, Miyawaki A, Palmer A E *et al.* The growing and glowing toolbox of fluorescent and photoactive proteins. *Trends Biochem. Sci.* 2017;42:111–29. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2016.09.010>.
- Rosenow MA, Huffman H A, Phail M E, Wachter R M. The crystal structure of the Y66L variant of green fluorescent protein supports a cyclization-oxidation-dehydration mechanism for chromophore maturation. *Biosci.* 2004;43:4464–72. <https://doi.org/10.1021/bi0361315>.
- Rütten A, Kirchner T, Musiol-Kroll E M. Overview on strategies and assays for antibiotic discovery. *Pharmaceuticals* 2022;15. <https://doi.org/10.3390/ph15101302>.
- Ryabova LA, Vinokurov L M, Shekhovtsova E A, Alakhov Y B, Spirin A S. Acetyl phosphate as an energy source for bacterial cell-free translation systems. *Anal. Biochem.* 1995;226:184–6. <https://doi.org/10.1006/abio.1995.1208>.
- Salis HM. The ribosome binding site calculator. *Methods Enzymol.* 2011;498:19–42. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385120-8.00002-4>.
- Sanger F, Nicklen S, Coulson A R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1977;74:5463–7. <https://doi.org/10.1073/pnas.74.12.5463>.
- Schatz A, Bugle E, Waksman S A. Streptomycin, a substance exhibiting antibiotic activity against gram-positive and gram-negative bacteria.\*. *Exp. Biol. Med.* 1944;55:66–9. <https://doi.org/10.3181/00379727-55-14461>.
- Schick MJ. Handbook of lipid research 4—the physical chemistry of lipids. *J. Polym. Sci.* 1987;25:86–7. <https://doi.org/10.1002/pol.1987.140250211>.
- Schmidt JDR, Walloch P, Höger B, Beitz E. Aquaporins with lactate/lactic acid permeability at physiological pH conditions. *Biochimie* 2021;188:7–11. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2021.01.018>.

## Literaturverzeichnis

- Schneider B, Junge F, Shirokov V A, Durst F, Schwarz D, Dötsch V *et al.* Membrane protein expression in cell-free systems. *Methods Mol. Biol.* 2010;601:165–86. [https://doi.org/10.1007/978-1-60761-344-2\\_11](https://doi.org/10.1007/978-1-60761-344-2_11).
- Schroeder SJ, Blaha G, Moore P B. Negamycin binds to the wall of the nascent chain exit tunnel of the 50S ribosomal subunit. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2007;51:4462–5. <https://doi.org/10.1128/aac.00455-07>.
- Schuwirth BS, Borovinskaya M A, Hau C W, Zhang W, Vila-Sanjurjo A, Holton J M *et al.* Crystal structure of the bacterial ribosome from *Escherichia coli* at 3.5 Å resolution 2005a. <https://doi.org/10.2210/pdb2avy/pdb>.
- Schuwirth BS, Borovinskaya M A, Hau C W, Zhang W, Vila-Sanjurjo A, Holton J M *et al.* Structures of the bacterial ribosome at 3.5 Å resolution. *Science* 2005b;310:827–34. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1117230>.
- Schwarz D, Junge F, Durst F, Frölich N, Schneider B, Reckel S *et al.* Preparative scale expression of membrane proteins in *Escherichia coli*-based continuous exchange cell-free systems. *Nat. Protoc.* 2007a;2:2945–57. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.426>.
- Schwarz D, Klammt C, Koglin A, Löhr F, Schneider B, Dötsch V *et al.* Preparative scale cell-free expression systems: new tools for the large scale preparation of integral membrane proteins for functional and structural studies. *Methods* 2007b;41:355–69. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2006.07.001>.
- Serricchio M, Bütkofer P. Phosphatidylglycerophosphate synthase associates with a mitochondrial inner membrane complex and is essential for growth of *Trypanosoma brucei*. *Mol. Microbiol.* 2013;87:569–79. <https://doi.org/10.1111/mmi.12116>.
- Shah NB, Duncan T M. Bio-layer interferometry for measuring kinetics of protein-protein interactions and allosteric ligand effects. *JoVE* 2014:e51383. <https://doi.org/10.3791/51383>.
- Shaner NC, Lambert G G, Chammas A, Ni Y, Cranfill P J, Baird M A *et al.* A bright monomeric green fluorescent protein derived from *Branchiostoma lanceolatum*. *Nat. Methods* 2013;10:407–9. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2413>.
- Sharma D, Cukras A R, Rogers E J, Southworth D R, Green R. Mutational analysis of S12 protein and implications for the accuracy of decoding by the ribosome. *J. Mol. Biol.* 2007;374:1065–76. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2007.10.003>.
- Shi Z, Fujii K, Kovary K M, Genuth N R, Röst H L, Teruel M N *et al.* Heterogeneous ribosomes preferentially translate distinct subpools of mRNAs genome-wide. *Mol. Cell* 2017;67:71-83.e7. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2017.05.021>.
- Shin J, Noireaux V. An *E. coli* cell-free expression toolbox: application to synthetic gene circuits and artificial cells. *ACS Synth. Biol.* 2012;1:29–41. <https://doi.org/10.1021/sb200016s>.
- Shine J, Dalgarno L. The 3'-terminal sequence of *Escherichia coli* 16S ribosomal RNA: complementarity to nonsense triplets and ribosome binding sites. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1974;71:1342–6. <https://doi.org/10.1073/pnas.71.4.1342>.

## Literaturverzeichnis

- Shiomura O, Johnson F H, Saiga Y. Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, *Aequorea*. *J. Cell. Physiol.* 1962;59:223–39. <https://doi.org/10.1002/jcp.1030590302>.
- Simon SA, McIntosh T J. Depth of water penetration into lipid bilayers. *Methods Enzymol.* 1986;127:511–21. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(86\)27041-x](https://doi.org/10.1016/0076-6879(86)27041-x).
- Simsek D, Tiu G C, Flynn R A, Byeon G W, Leppek K, Xu A F *et al.* The mammalian ribo-interactome reveals ribosome functional diversity and heterogeneity. *Cell* 2017;169:1051-1065.e18. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.05.022>.
- Sipos L, Heijne G von. Predicting the topology of eukaryotic membrane proteins. *Eur. J. Biochem.* 1993;213:1333–40. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1993.tb17885.x>.
- Sitaraman K, Esposito D, Klarmann G, Le Grice S F, Hartley J L, Chatterjee D K. A novel cell-free protein synthesis system. *J. Biotechnol.* 2004;110:257–63. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2004.02.014>.
- Smith JL, Fratamico P M, Gunther N W. Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*. *Foodborne Pathog. Dis.* 2007;4:134–63. <https://doi.org/10.1089/fpd.2007.0087>.
- Soleja N, Manzoor O, Khan I, Ahmad A, Mohsin M. Role of green fluorescent proteins and their variants in development of FRET-based sensors. *J. Biosci.* 2018;43:763–84. <https://doi.org/10.1007/s12038-018-9783-0>.
- Song J, Almasalmeh A, Krenc D, Beitz E. Molar concentrations of sorbitol and polyethylene glycol inhibit the *Plasmodium* aquaglyceroporin but not that of *E. coli*: involvement of the channel vestibules. *Biochim. Biophys. Acta.* 2012;1818:1218–24. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2012.01.025>.
- Song J, Baker N, Rothert M, Henke B, Jeacock L, Horn D *et al.* Pentamidine is not a permeant but a nanomolar inhibitor of the *Trypanosoma brucei* aquaglyceroporin-2. *PLOS Pathog.* 2016;12:e1005436. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005436>.
- Sothiselvam S, Liu B, Han W, Ramu H, Klepacki D, Atkinson G C *et al.* Macrolide antibiotics allosterically predispose the ribosome for translation arrest. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2014;111:9804–9. <https://doi.org/10.1073/pnas.1403586111>.
- Spirin AS. High-throughput cell-free systems for synthesis of functionally active proteins. *Trends Biotechnol.* 2004;22:538–45. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2004.08.012>.
- Stallcup MR, Sharrock W J, Rabinowitz J C. Specificity of bacterial ribosomes and messenger ribonucleic acids in protein synthesis reactions in vitro. *J. Biol. Chem.* 1976;251:2499–510. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(17\)33616-5](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(17)33616-5).
- Stavrov SS, Solntsev K M, Tolbert L M, Huppert D. Probing the decay coordinate of the green fluorescent protein: arrest of cis-trans isomerization by the protein significantly narrows the fluorescence spectra. *J. Am. Chem. Soc.* 2006;128:1540–6. <https://doi.org/10.1021/ja0555421>.
- Steffen JH, Missel J W, Al-Jubair T, Kitchen P, Salman M M, Bill R M *et al.* Assessing water permeability of aquaporins in a proteoliposome-based stopped-flow setup. *STAR Protoc.* 2022;3:101312. <https://doi.org/10.1016/j.xpro.2022.101312>.

## Literaturverzeichnis

- Stennett HL, Back C R, Race P R. Derivation of a precise and consistent timeline for antibiotic development. *Antibiotics* 2022;11. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11091237>.
- Stroud RM, Miercke L JW, O'Connell J, Khademi S, Lee J K, Remis J *et al.* Glycerol facilitator GlpF and the associated aquaporin family of channels. *Curr. Opin. Struct* 2003;13:424–31. [https://doi.org/10.1016/S0959-440X\(03\)00114-3](https://doi.org/10.1016/S0959-440X(03)00114-3).
- Sun ZZ, Hayes C A, Shin J, Caschera F, Murray R M, Noireaux V. Protocols for implementing an *Escherichia coli* based TX-TL cell-free expression system for synthetic biology. *JoVE* 2013:e50762. <https://doi.org/10.3791/50762>.
- Svetlov MS, Kommer A, Kolb V A, Spirin A S. Effective cotranslational folding of firefly luciferase without chaperones of the Hsp70 family. *Protein Sci.* 2006;15:242–7. <https://doi.org/10.1110/ps.051752506>.
- Syroegin EA, Aleksandrova E V, Polikanov Y S. Structural basis for the inability of chloramphenicol to inhibit peptide bond formation in the presence of A-site glycine. *Nucleic Acids Res.* 2022;50:7669–79. <https://doi.org/10.1093/nar/gkac548>.
- Tanaka R, Gomi R, Funasaka K, Asakawa D, Nakanishi H, Moriwaki H. Development of a novel evaluation method for air particles using surface plasmon resonance spectroscopy analysis. *Analyst* 2013;138:5437–43. <https://doi.org/10.1039/C3AN00704A>.
- Tenson T, Lovmar M, Ehrenberg M. The mechanism of action of macrolides, lincosamides and streptogramin B reveals the nascent peptide exit path in the ribosome. *J. Mol. Biol.* 2003;330:1005–14. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(03\)00662-4](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(03)00662-4).
- Theuretzbacher U, van Bambeke F, Cantón R, Giske C G, Mouton J W, Nation R L *et al.* Reviving old antibiotics. *J. Antimicrob. Chemother.* 2015;70:2177–81. <https://doi.org/10.1093/jac/dkv157>.
- Tominaga A, Kobayashi Y. Kasugamycin-resistant mutants of *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 1978;135:1149–50. <https://doi.org/10.1128/jb.135.3.1149-1150.1978>.
- Tommasi R, Brown D G, Walkup G K, Manchester J I, Miller A A. ESKAPEing the labyrinth of antibacterial discovery. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2015;14:529–42. <https://doi.org/10.1038/nrd4572>.
- Tsuji G, Sunami T, Oki M, Ichihashi N. Exchange of proteins in liposomes through streptolysin O pores. *Chembiochem* 2021;22:1966–73. <https://doi.org/10.1002/cbic.202100029>.
- Umezawa S, Tsuchiya T, Muto R, Nishimura Y, Umezawa H. Synthesis of 3'-deoxykanamycin effective against kanamycin-resistant *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Antibiot.* 1971;24:274–6. <https://doi.org/10.7164/antibiotics.24.274>.
- Uzcategui NL, Szallies A, Pavlovic-Djuranovic S, Palmada M, Figarella K, Boehmer C *et al.* Cloning, heterologous expression, and characterization of three aquaglyceroporins from *Trypanosoma brucei*. *J. Biol. Chem.* 2004;279:42669–76. <https://doi.org/10.1074/jbc.M404518200>.
- VanBogelen RA, Neidhardt F C. Ribosomes as sensors of heat and cold shock in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1990;87:5589–93. <https://doi.org/10.1073/pnas.87.15.5589>.
- Vandebroek A, Yasui M. Cu<sup>1+</sup>, but not Cu<sup>2+</sup> is capable of inhibition of AQP4 permeability in an *in vitro* CHO cell based model. *Biochem. Biophys. Rep.* 2021;28:101132. <https://doi.org/10.1016/j.bbrep.2021.101132>.

## Literaturverzeichnis

- Vandeputte-Rutten L, Kramer R A, Kroon J, Dekker N, Egmond M R, Gros P. Crystal structure of the outer membrane protease OmpT from *Escherichia coli* suggests a novel catalytic site. *EMBO J.* 2001;20:5033–9. <https://doi.org/10.1093/emboj/20.18.5033>.
- Vasilyev NN, Kutlubaeva Z S, Ugarov V I, Chetverina H V, Chetverin A B. Ribosomal protein S1 functions as a termination factor in RNA synthesis by Q $\beta$  phage replicase. *Nat. Commun.* 2013;4:1781. <https://doi.org/10.1038/ncomms2807>.
- Ventola CL. The antibiotic resistance crisis: part 1: causes and threats. *Pharmacol.* 2015;40:277–83.
- Verdoucq L, Grondin A, Maurel C. Structure-function analysis of plant aquaporin AtPIP2;1 gating by divalent cations and protons. *Biochem. J.* 2008;415:409–16. <https://doi.org/10.1042/BJ20080275>.
- Vial HJ, Ancelin M L (1992). Malarial lipids. In: J. R. Harris, H. J. Hilderson und J. L. Avila (Hg.): *Intracellular parasites*, Bd. 18. Boston, MA: Springer US (Subcellular Biochemistry):259–306.
- Villafane R, Bechhofer D H, Narayanan C S, Dubnau D. Replication control genes of plasmid pE194. *J. Bacteriol.* 1987;169:4822–9. <https://doi.org/10.1128/jb.169.10.4822-4829.1987>.
- Walker HH, Winslow C E, Mooney M G. Bacterial cell metabolism under anaerobic conditions. *J. Gen. Physiol.* 1934;17:349–57. <https://doi.org/10.1085/jgp.17.3.349>.
- Wallner J, Kühleitner M, Brunner N, Lhota G, Vorauer-Uhl K. Application of the log-normal model for long term high affinity antibody/antigen interactions using bio-layer interferometry. *J Math Chem* 2014;52:575–87. <https://doi.org/10.1007/s10910-013-0278-9>.
- Wallner J, Lhota G, Jeschek D, Mader A, Vorauer-Uhl K. Application of bio-layer interferometry for the analysis of protein/liposome interactions. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2013;72:150–4. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2012.10.008>.
- Waloch P, Henke B, Häuer S, Bergmann B, Spielmann T, Beitz E. Introduction of scaffold nitrogen atoms renders inhibitors of the malarial l-lactate transporter, PfFNT, effective against the Gly107Ser resistance mutation. *J. Med. Chem.* 2020;63:9731–41. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.0c00852>.
- Walz T, Smith B L, Agre P, Engel A. The three-dimensional structure of human erythrocyte aquaporin CHIP. *EMBO J.* 1994;13:2985–93. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1994.tb06597.x>.
- Wang H, Li J, Jewett M C. Development of a *Pseudomonas putida* cell-free protein synthesis platform for rapid screening of gene regulatory elements. *Synth. Biol.* 2018;3:ysy003. <https://doi.org/10.1093/synbio/ysy003>.
- Weisblum B. Erythromycin resistance by ribosome modification. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1995;39:577–85. <https://doi.org/10.1128/AAC.39.3.577>.
- Welch M, Villalobos A, Gustafsson C, Minshull J. You're one in a googol: optimizing genes for protein expression. *J. R. Soc. Interface* 2009;6 Suppl 4:S467-76. <https://doi.org/10.1098/rsif.2008.0520.focus>.
- Werten PJ, Hasler L, Koenderink J B, Klaassen C H, Grip W J de, Engel A *et al.* Large-scale purification of functional recombinant human aquaporin-2. *FEBS Lett.* 2001;504:200–5. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(01\)02703-X](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(01)02703-X).
- White GF, Racher K I, Lipski A, Hallett F R, Wood J M. Physical properties of liposomes and proteoliposomes prepared from *Escherichia coli* polar lipids. *Biochim. Biophys. Acta.* 2000;1468:175–86. [https://doi.org/10.1016/S0005-2736\(00\)00255-8](https://doi.org/10.1016/S0005-2736(00)00255-8).

## Literaturverzeichnis

- Wilson DN. The ABC of ribosome-related antibiotic resistance. *mBio* 2016;7. <https://doi.org/10.1128/mBio.00598-16>.
- Witzky A, Tollerson R, Ibba M. Translational control of antibiotic resistance. *Open Biol.* 2019;9:190051. <https://doi.org/10.1098/rsob.190051>.
- Woese CR, Fox G E. Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1977;74:5088–90. <https://doi.org/10.1073/pnas.74.11.5088>.
- World Health Organization (2017). Prioritization of pathogens to guide discovery, research and development of new antibiotics for drug-resistant bacterial infections, including tuberculosis. Online verfügbar unter <https://www.who.int/publications/i/item/WHO-EMP-IAU-2017.12>, [letzter Aufruf: 13.03.2023].
- World Health Organization (2020). Antibiotic resistance. Online verfügbar unter <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antibiotic-resistance>, [letzter Aufruf: 13.03.2023].
- World Health Organization (2022). Antibacterial products in clinical development for priority pathogens. Online verfügbar unter <https://www.who.int/publications/i/item/WHO-EMP-IAU-2019.12>, [letzter Aufruf: 13.03.2023].
- Wu B, Beitz E. Aquaporins with selectivity for unconventional permeants. *Cell. Mol. Life Sci.* 2007;64:2413–21. <https://doi.org/10.1007/s00018-007-7163-2>.
- Wu B, Rambow J, Bock S, Holm-Bertelsen J, Wiechert M, Soares A B *et al.* Identity of a *Plasmodium* lactate/H(+) symporter structurally unrelated to human transporters. *Nat. Commun.* 2015;6:6284. <https://doi.org/10.1038/ncomms7284>.
- Wu B, Song J, Beitz E. Novel channel enzyme fusion proteins confer arsenate resistance. *J. Biol. Chem.* 2010;285:40081–7. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.184457>.
- Wunderink RG, Niederman M S, Kollef M H, Shorr A F, Kunkel M J, Baruch A *et al.* Linezolid in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* nosocomial pneumonia: a randomized, controlled study. *Clin. Infect. Dis.* 2012;54:621–9. <https://doi.org/10.1093/cid/cir895>.
- Xue S, Tian S, Fujii K, Kladwang W, Das R, Barna M. RNA regulons in Hox 5' UTRs confer ribosome specificity to gene regulation. *Nature* 2015;517:33–8. <https://doi.org/10.1038/nature14010>.
- Yang S-T, Kreutzberger A JB, Lee J, Kiessling V, Tamm L K. The role of cholesterol in membrane fusion. *Chem. Phys. Lipids* 2016;199:136–43. <https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2016.05.003>.
- Yang WC, Patel K G, Wong H E, Swartz J R. Simplifying and streamlining *Escherichia coli*-based cell-free protein synthesis. *Biotechnol. Prog.* 2012;28:413–20. <https://doi.org/10.1002/btpr.1509>.
- Yim SS, Johns N I, Park J, Gomes A L, McBee R M, Richardson M *et al.* Multiplex transcriptional characterizations across diverse bacterial species using cell-free systems. *Mol. Syst. Biol.* 2019;15:e8875. <https://doi.org/10.15252/msb.20198875>.
- Yokoyama S. Protein expression systems for structural genomics and proteomics. *Curr Opin Chem Biol* 2003;7:39–43. [https://doi.org/10.1016/s1367-5931\(02\)00019-4](https://doi.org/10.1016/s1367-5931(02)00019-4).
- Yue K, Jiang J, Zhang P, Kai L. Functional analysis of aquaporin water permeability using an *Escherichia coli*-based cell-free protein synthesis system. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 2020;8:1000. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.01000>.

## Literaturverzeichnis

Yue K, Trung T N, Zhu Y, Kaldenhoff R, Kai L. Co-translational insertion of aquaporins into liposome for functional analysis via an *E. coli* based cell-free protein synthesis system. *Cells* 2019;8. <https://doi.org/10.3390/cells8111325>.

Yukutake Y, Tsuji S, Hirano Y, Adachi T, Takahashi T, Fujihara K *et al.* Mercury chloride decreases the water permeability of aquaporin-4-reconstituted proteoliposomes. *Biol. Cell* 2008;100:355–63. <https://doi.org/10.1042/BC20070132>.

Zaghoul TI, Doi R H. In vitro expression of a Tn9-derived chloramphenicol acetyltransferase gene fusion by using a *Bacillus subtilis* system. *J. Bacteriol.* 1987;169:1212–6. <https://doi.org/10.1128/jb.169.3.1212-1216.1987>.

Zawada J, Swartz J. Maintaining rapid growth in moderate-density *Escherichia coli* fermentations. *Biotechnol. Bioeng.* 2005;89:407–15. <https://doi.org/10.1002/bit.20369>.

Zawada J, Swartz J. Effects of growth rate on cell extract performance in cell-free protein synthesis. *Biotechnol. Bioeng.* 2006;94:618–24. <https://doi.org/10.1002/bit.20831>.

Zeigler DR, Nicholson W L. Experimental evolution of *Bacillus subtilis*. *Environ. Microbiol.* 2017;19:3415–22. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.13831>.

Zeuthen T, Wu B, Pavlovic-Djurjanovic S, Holm L M, Uzcategui N L, Duszenko M *et al.* Ammonia permeability of the aquaglyceroporins from *Plasmodium falciparum*, *Toxoplasma gondii* and *Trypanosoma brucei*. *Mol. Microbiol.* 2006;61:1598–608. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2006.05325.x>.

Zgurskaya HI, López C A, Gnanakaran S. Permeability barrier of gram-negative cell envelopes and approaches to bypass it. *ACS Infect. Dis.* 2015;1:512–22. <https://doi.org/10.1021/acsinfecdis.5b00097>.

Zhang JH, Chung T D, Oldenburg K R. A simple statistical parameter for use in evaluation and validation of high throughput screening assays. *J Biomol Screen* 1999;4:67–73. <https://doi.org/10.1177/108705719900400206>.

Zhao Y, Li X, Wei J, Torres J, Fane A G, Wang R *et al.* Optimization of aquaporin loading for performance enhancement of aquaporin-based biomimetic thin-film composite membranes. *Membranes* 2021;12. <https://doi.org/10.3390/membranes12010032>.

Zimmer M. Green fluorescent protein (GFP): applications, structure, and related photophysical behavior. *Chem. Rev.* 2002;102:759–81. <https://doi.org/10.1021/cr010142r>.

## Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere, dass ich die vorliegende Dissertation abgesehen von der Beratung durch den Betreuer nur mit den hier angegebenen Quellen und Hilfsmitteln selbstständig verfasst habe. Die Arbeit ist unter Einhaltung der Regeln der guten wissenschaftlichen Praxis der Deutschen Forschungsgemeinschaft entstanden. Ich versichere des Weiteren, dass mir noch kein akademischer Grad entzogen wurde. Diese Arbeit wurde noch in keinem anderen Prüfungsverfahren vorgelegt und ist in Teilen bereits veröffentlicht worden:

### Publikation:

Schmidt JDR, Walloch P, **Höger B**, Beitz E. Aquaporins with lactate/lactic acid permeability at physiological pH conditions. *Biochimie* 2021;188:7–11. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2021.01.018>.

Helmstetter F, Arnold P, **Höger B**, Petersen L M, Beitz E. Formate-nitrite transporters carrying nonprotonatable amide amino acids instead of a central histidine maintain pH-dependent transport. *J. Biol. Chem.* 2019;294:623–31. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA118.006340>.

Pfeifer L, Baumann A, Petersen L M, **Höger B**, Beitz E, Classen B. Degraded arabinogalactans and their binding properties to cancer-associated human galectins. *Int. J. Mol. Sci.* 2021;22. <https://doi.org/10.3390/ijms22084058>.

Teile dieser Arbeit wurden zur Veröffentlichung eingereicht

**Höger B**, Peifer C, Beitz E. Cell-free production of fluorescent proteins for the discovery of novel ribosome-targeting antibiotics, *J. Microbiol.*

### Posterbeitrag:

**Höger B**, Beitz E. Cell-free transport protein expression. Transporter and Barrier Meeting Bad Herrenalb 2019, Bad Herrenalb, Deutschland.

**Bastian Thomas Höger**

Kiel, den 23.05.2023

## Danksagung

Mein größter Dank gilt Prof. Dr. Eric Beitz. Ich möchte mich ausdrücklich für das spannende Thema und die Unterstützung über die gesamte Promotionszeit bedanken. Deine kritischen Fragen und Anmerkungen haben mich immer wieder neu über mein Thema nachdenken lassen und mir so neue Felder eröffnet. Ich bin dir wahnsinnig dankbar dafür, wie viel ich bei dir lernen durfte und konnte.

Weiterhin möchte ich mich bei Prof. Dr. Christian Peifer bedanken ohne den die Idee dieses Themas nicht entstanden wäre.

Liebe Lea, auch dir gilt ein ganz großes Dankeschön. Du warst und bist für mich immer ein wahnsinnig großes Vorbild. Deine positive, fröhliche Art hat mich immer wieder motiviert. Die zahlreichen Kommentare (ab Tag 1 im AK Beitz bis hin zur finalen Abgabe dieser Arbeit) beeindruckten mich jedes Mal aufs Neue. Weiterhin möchte ich mich bei Jana bedanken. Ich bin sehr froh, dass wir diesen Weg so lange zusammen gegangen sind. Deine ansteckende, positive (und auch laute) Art hat mich immer wieder gerne zur Arbeit gehen lassen. Unvergessen bleibt der Spätzle-Bauch auf der Konferenz in Bad Herrenalb.

Bei der weiteren Biochemiker-Fraktion, vor allem Anna-Lena und Christian, möchte ich mich ebenfalls herzlich bedanken. Euretweenen habe ich auch neben der Arbeit gelernt, was es bedeutet einen Marathon zu absolvieren..... auch wenn es zwei Anläufe benötigt hat. Liebe Anna, danke, dass du mich bei dir im Labor aufgenommen hast und meinen/ deinen Musikgeschmack erweitert hast. Die zahlreichen Abende mit euch beiden fernab der Arbeit habe ich immer sehr genossen. Ohne euer Biochemiker-Wissen wäre vieles nicht möglich gewesen. Danke dafür! Fürs Korrekturlesen der Arbeit danke ich dir ebenfalls, Cristian. Auch wenn es mich zugegebenermaßen nervt, was du für ein Ruder-Talent du bist, so weiß ich, das Kiel der bessere Handball-Verein ist.

Weiterhin möchte ich mich bei der 2. Semester-, 4. Semester- und 5. Semester-Crew in der Lehre bedanken. Ich habe das gemeinsame Arbeiten immer als sehr angenehm und kooperativ empfunden. Nathan, I enjoyed the conversations with you very much. Your technical expertise on my cloning projects was impressive. Bei Timo möchte ich mich für seine verplante, tollpatschige, humorvolle Art bedanken. Cornelius, vielen Dank für die fachlichen Antworten zur IC<sub>50</sub>-Bestimmung und zum Modelling. Deine begeisternde (und auch manchmal ausufernde) Art über deinen Urlaub zu sprechen, hat mich immer sehr unterhalten!

Bei Anna F., Björn und Susanne, den guten Seelen des Instituts, möchte ich mich für die exzellente Unterstützung bedanken. Dem gesamten Sozialraum gilt weiterhin ein großes Dankeschön. Insbesondere möchte ich mich bei Till und Daniel für den *Input* zur Arbeit bedanken. Weiterhin möchte ich mich bei „Jack Grealish“ alias Ole für die zahlreichen Fußballabende bedanken. Das war immer eines der absoluten Wochenhighlights, dank dir!

Beim weiteren AK Beitz und allen, die ich vergessen haben sollte, sage ich ebenfalls Danke!

Ein ganz großes Dankeschön gebührt dir, liebe Moira. Es ist schwer in Worte zu fassen, welche Unterstützung du zu dieser Arbeit geleistet hast. Ohne dich wäre vieles nicht möglich gewesen, danke dafür! Ich bin sehr glücklich dich kennengelernt zu haben. Für deine Unterstützung in der finalen Phase, deine fröhliche motivierende Art und jedes einzelne Gespräch bin ich zu tiefst dankbar. Ich freue mich auf den weiteren gemeinsamen Weg mit dir!

Bei meinen Eltern und meinen Geschwistern, Philipp und Katha, sowie Nina und Sophia, die mich auf diesem langen Weg immer begleitet haben, möchte ich mich bedanken. Ihr seid die Besten! Zuletzt möchte ich mich noch bei einem für mich ganz besonderen Menschen bedanken. Lieber Torben, du wirst immer einen Platz in meinem Herzen haben. Danke, dass es dich gab und immer geben wird.