

Wirkung von Acyldepsipeptid Antibiotika auf die Clp-Protease von Mykobakterien und *Staphylococcus aureus*

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Kirsten Famulla

Aus Hilden

Düsseldorf, Juli 2014

aus dem Institut für pharmazeutische Biologie und Biotechnologie
der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf

Gedruckt mit der Genehmigung der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Hauptgutachter: Prof. Dr. Heike Brötz-Oesterhelt

2. Gutachter: Prof. Dr. Matthias Kassack

Tag der mündlichen Prüfung: 31.10.2014

Erklärung

Ich versichere an Eides Statt, dass die Dissertation von mir selbständig und ohne unzulässige fremde Hilfe unter Beachtung der „Grundsätze zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf“ erstellt worden ist. Zitate sind im Text kenntlich gemacht. Diese Dissertation wurde weder in gleicher noch in abgewandelter Form in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegt.

Düsseldorf, den 22.07. 2014

Kirsten Famulla

Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit gliedert sich in zwei Teile, in denen der Wirkmechanismus von Acyldepsipeptid Antibiotika (ADEPs) gegen verschiedene pathogene Bakterien genauer untersucht wird. Der erste Teil befasst sich dabei mit der Wirkung gegen Mykobakterien und der zweite Teil mit der Wirkung gegen *Staphylococcus aureus*. Das Target von ADEPs ist die proteolytische Untereinheit der caseinolytischen Protease, ClpP. In Anwesenheit von ADEPs bildet sich im Modellorganismus *Bacillus subtilis* ein tetradekamerer ClpP Komplex, mit vergrößerter Eintrittspore zum katalytischen Zentrum, so dass es zu einem unkontrollierten Verdau von Proteinen kommt. Ein besonders sensibles Target für den ADEP-ClpP Komplex ist dabei das Zellteilungsprotein FtsZ. Eine zweite Konsequenz von ADEP Bindung an ClpP ist, dass Clp-ATPasen, die normalerweise die natürlichen Substrate von ClpP entfalten und dem aktiven Zentrum zuführen, nicht mehr an ClpP binden können, wodurch zusätzlich alle natürlichen Funktionen von ClpP durch ADEPs inhibiert werden. Trotz dieses innovativen dualen Wirkmechanismus und einer vielversprechenden Wirksamkeit gegen verschiedene Grampositive Bakterien, konnten ADEPs bisher nicht klinisch weiterentwickelt werden, da es aufgrund von Mutationen im Target, zu einer zu schnellen Resistenzentwicklung in den untersuchten Bakterien kam. Der Grund für diese hohe Mutationsrate ist, dass ClpP in diesen Organismen nicht essentiell für das Wachstum benötigt wird.

In Mykobakterien ist jedoch eine der vielen Besonderheiten, dass sie zwei ClpP Homologe exprimieren (ClpP1 und ClpP2), die in einem Operon kodiert werden und beide essentiell für das Wachstum der Bakterien sind. Daher wurde zu Beginn dieser Arbeit die Hypothese aufgestellt, dass die Resistenzproblematik von ADEPs in Mykobakterien weniger stark ausgeprägt sein könnte. Eine genaue Resistenzrate konnte jedoch nicht bestimmt werden, da bei langsam wachsenden Mykobakterien eine lange Inkubationszeit nötig ist und ADEPs, wie in dieser Arbeit nachgewiesen wurde, in wässriger Lösung eine geringe Stabilität besitzen. Kolonien, die von ADEP haltigen Agarplatten isoliert wurden, waren in anschließenden Untersuchungen nicht ADEP resistent. Da gegen den Erreger der Tuberkulose, *Mycobacterium tuberculosis*, aufgrund der begrenzten Anzahl wirksamer Antibiotika und der dramatischen Entwicklung multiresistenter Keime, dringend neue Antibiotika benötigt werden, wurde die Untersuchung der Wirkung von ADEPs gegen diese Bakterien dennoch weiter verfolgt. Die Minimale Hemmkonzentration von ADEPs gegen *M. tuberculosis* und den Modellorganismus *Mycobacterium bovis* BCG wurde ermittelt, und liegt unter anderem bei ADEP2 mit 8 – 16 µg/ml in einem moderaten Wirkungsbereich. Außerdem sollte in dieser Arbeit die Frage geklärt werden, ob ADEPs weiterhin den oben beschriebenen dualen Wirkmechanismus haben, wenn es zwei potentielle Targets in der Zelle gibt, die beide essentiell sind. Um diese Frage zu beantworten, wurde ein *M. bovis* BCG Stamm konstruiert, dessen *clpP1P2* Expression in Abhängigkeit von Anhydrotetrazyklin (ATc) herunterreguliert werden kann. Je geringer die *clpP1P2* Expression in diesem Stamm war, umso besser wurde die Wirksamkeit von ADEPs. Vergleichsweise wurde dieser Versuch auch mit einem *B. subtilis* Stamm durchgeführt, dessen *clpP* Expressionsmenge sich durch die

Xylosekonzentration regulieren lässt. Hier wurde das umgekehrte Ergebnis erzielt. Umso geringer die *clpP* Expression in *B. subtilis* war, umso schlechter wurde die Wirksamkeit von ADEPs. Dies lässt die Schlussfolgerung zu, dass ADEPs in *B. subtilis* hauptsächlich über die Aktivierung von ClpP zum unkontrollierten Proteinverdau wirkt, wohingegen die Wirkung gegen Mykobakterien hauptsächlich auf die Inhibierung der natürlichen Funktionen der essentiellen Clp-Protease zurückzuführen ist. Weiterhin wurden in dieser Arbeit *in vitro* Studien am isolierten ClpP1P2 Komplex aus *M. tuberculosis* durchgeführt, welcher zunächst durch das Aktivatorpeptid Z-LL aktiviert werden muss. Es wurde gezeigt, dass ADEPs nicht alleine dazu in der Lage sind ClpP1P2 zu aktivieren, Z-LL also nicht ersetzen können. In Anwesenheit von Z-LL kam es aber zu einer 4-5 fachen Stimulierung der Proteaseaktivität durch einige der getesteten ADEP Derivate. Für das Derivat, welches gegen Mykobakterien die höchste MHK zeigte (ADEP2) konnte allerdings nur eine 2 fache Überaktivierung der Proteaseaktivität von ClpP1P2 gemessen werden. Außerdem zeigte sich, dass das Zellteilungsprotein FtsZ in Mykobakterien in Anwesenheit von ADEPs nicht von ClpP1P2 abgebaut wird. Dies deutet daraufhin, dass in Mykobakterien entweder ein anderes Substratspektrum der Protease vorliegt oder dass die Inhibierung der natürlichen Funktionen von ClpP1 und ClpP2 tatsächlich die alleinige Wirkung ist und das der unkontrollierten Abbau von Proteinen, wie FtsZ für die antibakterielle Wirkung nicht relevant ist.

Der zweite Teil dieser Arbeit beschäftigt sich mit der Wirkung von ADEPs an isoliertem ClpP aus *Staphylococcus aureus*. Obwohl verschiedene ADEP Derivate gegen *S. aureus* eine gute Wirksamkeit zeigen, ist die Wirkung doch 4 – 8 fach schlechter als gegen andere Grampositive Bakterien. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass der Grund hierfür ist, dass ADEPs zu isolierten ClpP aus *S. aureus* eine geringere Affinität aufweisen, als zu ClpP aus *B. subtilis*. Durch zielgerichtete Mutagenese und Charakterisierung der mutierten ClpP Versionen, konnte die dafür verantwortliche Aminosäureposition in der ADEP Bindetasche identifiziert werden. Allerdings führte diese Mutation nicht nur zu einer höheren Affinität von ADEPs zu ClpP, sondern auch zu einem Oligomerisierungsdefekt der zum Auftreten von Heptameren führte, während das wt ClpP ausschließlich als Tetradekamer isoliert wurde. Dieser Defekt ließ sich durch Anwesenheit von ADEPs ausgleichen, was beweist dass ADEPs nicht nur die Oligomerisierung von monomeren ClpP Molekülen, sondern auch den Zusammenhalt der beiden Heptamere bewirken. Bindung von ADEP muss somit eine Konformationsänderung bewirken, welche Einfluss auf die „handle region“ der ClpP Ringe hat und somit über den bekannten Effekt der Öffnung der Eintrittspore für Substrate hinausgeht. Diese Erkenntnis bildete die Grundlage für weitere mechanistische Studien an ClpP aus *S. aureus*, in denen letzteres bewiesen werden konnte.

Abstract

In the present work the mode of action of acyldepsipeptide antibiotics (ADEPs) in different pathogens was investigated. The work is divided in two parts. In the first part the activity against mycobacteria and in the second part the activity against *Staphylococcus aureus* was studied. The target of ADEPs is the proteolytic subunit of the caseinolytic protease, ClpP. In the model organism *Bacillus subtilis*, the presence of ADEPs leads to the formation of a tetradecameric ClpP complex with an enlarged entrance pore to the catalytic center. This leads to an uncontrolled degradation of nascent proteins and of the essential cell cycle protein FtsZ. In addition, the Clp-ATPases which normally unfold the natural substrates of ClpP and direct them to the active sites in the center of the complex, can no longer bind to ClpP. This causes the inhibition of all natural functions of ClpP. Despite this innovative dual mode of action and a promising activity against various Gram-positive bacteria, ADEPs could not be clinically developed so far, due to a variety of mutations in the target, which lead to a rapid development of resistance in the so far studied bacteria, where ClpP is not essential for growth.

However in mycobacteria one of the many particularities is that they encode two versions of ClpP (ClpP1 and ClpP2) in one operon and both are essential for growth. Therefore, at the beginning of the present study, one hypothesis was that the resistance of mycobacteria against ADEPs might result in a lower resistance frequency. Due to the long incubation time, which is needed for slow growing mycobacteria, and the low stability of ADEPs in aqueous solution, which was shown in the present study, no clear resistance rate could be determined. Colonies which were isolated from ADEP containing agar-plates, were not resistant against ADEPs in subsequent investigations. Since new antibiotics against the causative agent of tuberculosis, *Mycobacterium tuberculosis*, are urgently needed, due to the limited number of effective antibiotics and the dramatic development of multi-resistant mycobacteria, the studies on the effect of ADEPs against these bacteria were pursued. The minimal inhibitory concentration (MIC) of ADEPs against *M. tuberculosis* and the closely related model organism *Mycobacterium bovis* BCG was determined and showed for example for ADEP2 with 8 - 16 µg/ml a moderate activity. Additionally we wanted to investigate whether ADEPs still have a dual mode of action, in the special case where two potential targets exist in the cell and both are essential for growth. To answer this question, a *M. bovis* BCG strain was constructed, in which *clpP1P2* expression can be down-regulated in the presence of ATc. The lower the *clpP1P2* expression was in this strain, the better was the efficacy of ADEPs. For comparative reasons, this experiment was carried out with a *Bacillus subtilis* strain, in which the *clpP* expression level could be regulated by the xylose concentration. Here, the opposite result was obtained. A low *clpP* expression led to a decrease in ADEP activity. This allows the conclusion that in *B. subtilis* ADEPs act mainly via activation of ClpP, which then leads to an uncontrolled protein degradation. In contrast in mycobacteria the ADEP activity is mainly caused by the inhibition of the natural functions of the essential Clp-Protease. Furthermore, *in vitro* studies on the isolated ClpP1P2 protein complex from *M. tuberculosis* were

performed. This complex needs to be activated with the activator peptide Z-LL. It was shown that ADEPs alone cannot activate ClpP1P2, which means that they cannot replace Z-LL. Nevertheless the presence of ADEPs led to a 4-5 fold stimulation of protease activity. However, only a 2 fold over-activation of the ClpP1P2 protease activity could be measured for the derivative, which showed the best effect against mycobacterial cells (ADEP2). Furthermore we observed, that the cell division protein FtsZ is not degraded by mycobacterial ClpP1P2 in the presence of ADEPs. This suggests that in mycobacteria either another substrate spectrum of the protease exists, or that the inhibition of the natural functions of ClpP1 and ClpP2 is indeed the only antibiotic effect and an uncontrolled degradation of proteins, such as FtsZ, has no particular impact in mycobacteria.

The second part of this thesis focuses on the effect of ADEPs on isolated ClpP from *Staphylococcus aureus*. Although different ADEP derivatives show a good activity against *S. aureus*, with MIC values in the range of 0.5 – 8 µg/ml, the effect is 4-8 times lower than against other Gram-positive bacteria. We were able to show, that this is due to a lower affinity of ADEPs for isolated ClpP from *S. aureus* than for ClpP from *B. subtilis*. By site-directed mutagenesis and characterization of these mutant ClpP versions, the position in the ADEP binding pocket, which is responsible for this lower affinity, could be identified. However, this mutation did not only lead to a higher affinity to ADEPs, but also to an oligomerisation defect towards heptamers, whereas the wild type (wt) ClpP was always isolated as a tetradecamer. This defect could be compensated by ADEPs, which proves that ADEPs do not only cause the oligomerization of ClpP monomer molecules to a single ring but also the cohesion of the two heptamers. Therefore binding of ADEPs must cause a conformational change that affects the "handle region" of ClpP, going beyond the known effects of the opening the entrance pore for substrates. These findings formed the basis for further mechanistic studies on ClpP of *S. aureus*, in which the above mentioned hypothesis could be proven.

Inhaltsverzeichnis

Erklärung	I
Zusammenfassung	II
Abstract	IV
1. Einleitung	- 1 -
1.1. Antibiotika und Resistenzentwicklung	- 1 -
1.2. Mykobakterien.....	- 2 -
1.3. Antibiotikatherapie gegen Tuberkulose	- 4 -
1.4. Modellorganismen für die Tuberkuloseforschung	- 7 -
1.5. Die Clp-Protease	- 8 -
1.6. Acyldepsipeptid Antibiotika (ADEPs).....	- 10 -
1.7. ClpP in Mykobakterien	- 14 -
1.8. ClpP in Staphylococcus aureus	- 17 -
1.9. Zielsetzung.....	- 19 -
2. Materialien	- 21 -
2.1. Chemikalien	- 21 -
2.2. Antibiotika	- 22 -
2.3. Antikörper.....	- 23 -
2.4. Kits	- 23 -
2.5. Enzyme.....	- 23 -
2.6. Bakterienstämme und Zelllinien.....	- 24 -
2.7. Vektoren	- 25 -
2.8. Primer	- 25 -
2.9. Marker	- 26 -
2.10. Säulen	- 27 -
2.11. Geräte	- 27 -
2.12. Programme	- 28 -
2.14. Puffer und Lösungen.....	- 32 -
2.14.1. Puffer und Lösungen für molekularbiologische Methoden.....	- 32 -
2.14.2. Puffer und Lösungen für proteinbiochemische Methoden	- 34 -
2.14.3. Puffer und Lösungen für zellbiologische Methoden.....	- 37 -
3. Methoden	- 38 -
3.1. Mikrobiologische Methoden	- 38 -
3.1.1. Kultivierung und Lagerung von Bakterien	- 38 -
3.1.2. Bestimmung der Minimalen Hemmkonzentration (MHK)	- 38 -
3.1.3. Messung von Wachstumskurven	- 39 -
3.1.4. Bestimmung der spontanen Resistenzrate von <i>M. bovis</i> BCG gegen ADEP2	- 40 -
3.2. Molekularbiologische Methoden	- 40 -

3.2.1. Gelelektrophorese	- 40 -
3.2.2. Isolation von DNA aus Mykobakterien	- 40 -
3.2.3. Isolation von DNA aus anderen Bakterien	- 41 -
3.2.4. Restriktionsanalyse von DNA	- 41 -
3.2.5. PCR	- 42 -
3.2.6. Zielgerichtete Mutagenese	- 42 -
3.2.7. Gelextraktion	- 43 -
3.2.8. Dephosphorylierung von Vektoren.....	- 43 -
3.2.9. Ligation.....	- 43 -
3.2.10. Transformation von <i>E. coli</i> über Elektroporation	- 44 -
3.2.11. Transformation von Mykobakterien.....	- 44 -
3.2.12. Herstellung von Hochtiterphagenlysaten	- 44 -
3.2.13. Transduktion von <i>M. bovis</i> BCG.....	- 45 -
3.2.14. Southern Blot	- 45 -
3.2.15. Konstruktion von <i>knock-in</i> Mutanten in <i>M. bovis</i> BCG.....	- 46 -
3.2.16. Isolation von RNA aus Mykobakterien.....	- 46 -
3.2.17. Synthese von cDNA	- 47 -
3.2.18. qPCR	- 48 -
3.3. Proteinbiochemische Methoden	- 49 -
3.3.1. Expression von Proteinen	- 49 -
3.3.2. Aufreinigung von His-tag Proteinen.....	- 49 -
3.3.3. Aufreinigung von StrepII-tag Proteinen	- 50 -
3.3.4. Aktivieren des MTB ClpP1P2 Komplexes	- 50 -
3.3.5. Größenausschlusschromatographie	- 50 -
3.3.6. Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford	- 51 -
3.3.7. SDS-PAGE	- 51 -
3.3.8. Native PAGE	- 51 -
3.3.9. Gewinnung von Proteinlysaten aus <i>M. bovis</i> BCG.....	- 51 -
3.3.10. Western Blot	- 52 -
3.3.11. Bestimmung der Peptidase- und Proteaseaktivität.....	- 52 -
3.4. Zellbiologische Methoden	- 53 -
3.4.1. Kultivierung und Lagerung von J744.A1 Makrophagen	- 53 -
3.4.2. Infektion von J744.A1 Makrophagen mit <i>M. bovis</i> BCG	- 53 -
3.4.3. Fluoreszenzmikroskopie	- 54 -
3.4.4. Zytotoxizitätsassays	- 54 -
3.5. Analytische Methoden.....	- 55 -
3.5.1. Erstellung von ADEP Eichgeraden mittels HPLC	- 55 -
3.5.2. Untersuchung der ADEP Stabilität mittels HPLC.....	- 55 -
3.5.3. Semipräparative HPLC zur Isolierung der ADEP3 Komponenten	- 56 -
3.5.4. LC-MS Messungen.....	- 56 -
3.6. Bioinformatische Kalkulation der Aufnahmewahrscheinlichkeit von ADEPs in die mykobakterielle Zelle.....	- 56 -
4. Ergebnisse.....	- 58 -
4.1. Wirksamkeit von ADEPs gegen Mykobakterien	- 58 -

4.1.1. Wirksamkeit gegen verschiedene Mykobakterien außerhalb eukaryontischer Zellen.....	58 -
4.1.2. Untersuchung der Stabilität von ADEPs im Medium	61 -
4.1.3 Intrazelluläre Wirksamkeit gegen <i>M. bovis</i> BCG.....	66 -
4.1.4. Untersuchungen zur Resistenzentwicklung von <i>M. bovis</i> BCG gegen ADEPs	72 -
4.2. Regulation der ClpP1P2 Expression in <i>M. bovis</i> BCG	74 -
4.2.1. Konstruktion von <i>M. bovis</i> BCG <i>clpP1-tetoff</i>	74 -
4.2.2. Charakterisierung von <i>M. bovis</i> BCG <i>clpP1-tetoff</i>	81 -
4.3. Wirkung von ADEPs am isolierten ClpP1P2 Komplex aus <i>M. tuberculosis</i>	86 -
4.3.1. Einfluss auf die Peptidase-Aktivität	86 -
4.3.2. Einfluss auf den Verdau von Casein	90 -
4.3.3. Einfluss von ADEPs auf den Verdau anderer Proteine.....	94 -
4.4. Wirkung von ADEPs gegen ClpP aus <i>S. aureus</i>	98 -
4.4.1. Expression und Aufreinigung von ClpP aus <i>S. aureus</i>	98 -
4.4.2. Einfluss von ADEPs auf die Peptidase- und Protease-Aktivität von ClpP aus <i>S. aureus</i>	99 -
4.4.3. Konstruktion von ClpP Mutanten in verschiedenen ADEP-Bindestellen.....	104 -
4.4.4. Charakterisierung der ClpP Mutanten mit veränderter ADEP-Bindetasche	106 -
5. Diskussion.....	111 -
5.1. Wirkmechanismus von ADEPs in Mykobakterien	111 -
5.2. ADEP als Antibiotikum gegen Tuberkulose	118 -
5.3. Untersuchungen zur Affinität von ADEPs zu ClpP aus <i>S. aureus</i>	122 -
6. Ausblick	126 -
7. Anhang	128 -
7.1. Abkürzungsverzeichnis	128 -
7.2. Abbildungsverzeichnis	131 -
7.3. Tabellenverzeichnis	137 -
7.4. Plasmidkarten	139 -
7.5. Chromatogramme	143 -
7.6. Literaturverzeichnis	149 -
7.9. Danksagung.....	162 -

1. Einleitung

1.1. Antibiotika und Resistenzentwicklung

Der ursprünglichen Definition zufolge sind Antibiotika niedermolekulare Stoffwechselprodukte von Mikroorganismen, die in geringer Konzentration andere Mikroorganismen in ihrem Wachstum hemmen oder sie abtöten (WAKSMAN, 1947). Mittlerweile werden aber auch semisynthetische- oder vollsynthetische Substanzen in diese Arzneigruppe mit einbezogen. Antibiotika werden zur Therapie von verschiedensten bakteriellen Infektionskrankheiten verwendet. Als erstes Antibiotikum wurde 1893 von Bartolomeo Gosio die Mycophenolsäure aus einem *Penicillium* Stamm isoliert (Bentley, 2001). Allerdings wurde diese Entdeckung nicht weltweit bekannt. Als Begründer der Antibiotika gilt Sir Alexander Fleming, der 1928 zufällig eine Kontamination seiner Bakterienkultur entdeckte, die die Bakterien zu töten schien. Bei dieser Kontamination handelte es sich um den Pilz *Penicillium notatum*, woraus er daraufhin das Penicillin isolierte (Ligon, 2004). Auch Flemings Entdeckung wurde zunächst ignoriert, aber ab 1939 setzte sich Penicillin als Antibiotikum durch und rettete im Laufe des zweiten Weltkrieges tausende Menschenleben (Henderson, 1997). In den darauffolgenden Jahren 1940-1960 wurden viele neue Antibiotikaklassen entdeckt, die auch heute noch den Großteil der angewendeten Antibiotika ausmachen. Man bezeichnet diesen Zeitraum als das „Goldene Zeitalter der Antibiotika“ (Butler *et al.*, 2013). Abb. 1 zeigt den zeitlichen Verlauf der Zulassungen verschiedener Antibiotikaklassen auf den amerikanischen Markt.

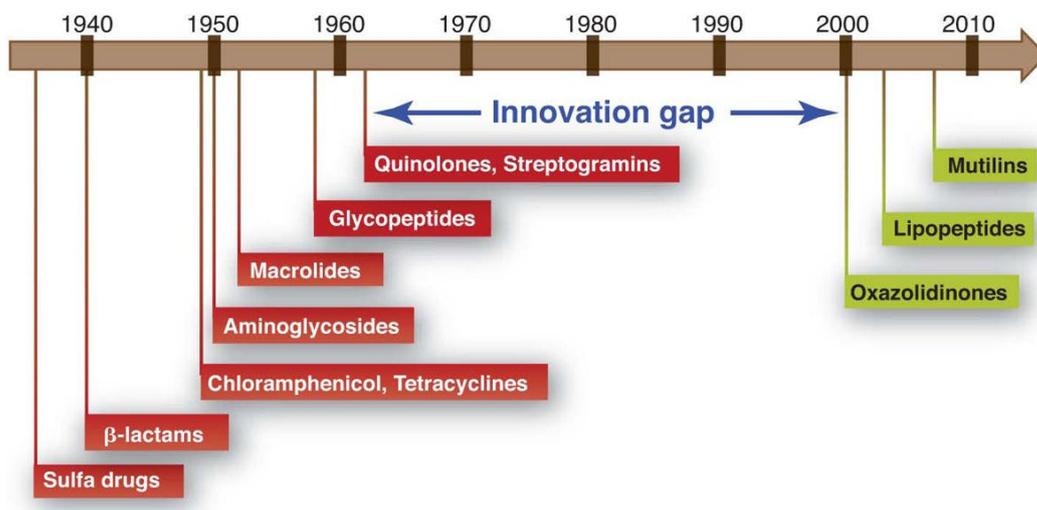


Abbildung 1: Zeitlicher Verlauf der Zulassungen verschiedener Antibiotikaklassen auf den amerikanischen Markt (Fischbach und Walsh, 2009).

Das oben erwähnte Penicillin gehört zu den β-Lactamen, die die Zellwandbiosynthese der Bakterien hemmen. Einige Jahre später folgte die Zulassung von Chloramphenicol, Tetrazyklin, Makroliden und Aminoglykosiden, die alle an verschiedenen Targets die

Proteinbiosynthese hemmen. Weiterhin folgte die Entdeckung der Glykopeptide, die ebenfalls die bakterielle Zellwandbiosynthese hemmen sowie der Chinolone, die die bakterielle Gyrase und somit die Replikation der DNA hemmen. Diese Welle der Antibiotika-Entdeckungen hielt bis zum Ende der 60er Jahre an. Im Jahr 1969 verkündete der damalige Leiter der US-Gesundheitsbehörde William McFarlane, dass das Buch der Infektionskrankheiten nun endgültig geschlossen werden kann (Holzgrave und Schmitz, 2009). Schon kurze Zeit später wurden aber vermehrt antibiotikaresistente Bakterienstämme, wie beispielsweise Vancomycin resistente Enterokokken (VRE) im Jahr 1986 und Fluorchinolone resistente Bakterien in den 1990er Jahren (Brötz-Oesterhelt und Sass, 2010) isoliert. Zu Beginn der 1990er Jahre wurden auch vermehrt multiresistente Tuberkulosebakterien isoliert (Frieden *et al.*, 1996), auf welche im folgenden Kapitel genauer eingegangen wird. Während eines langen Zeitraums von fast 40 Jahren wurde keine neue Antibiotikaklasse für den Markt zugelassen, sondern nur die bekannten Klassen derivatisiert. Erst im Jahr 2000 kam es zur Zulassung von Linezolid, einem Oxazolidinon, welches die bakterielle Proteinbiosynthese hemmt. Kurz darauf folgte auch die Zulassung des Lipopeptids Daptomycin, dessen Wirkmechanismus noch nicht vollständig verstanden ist. Da aber zunehmend multiresistente Erreger, wie z. B. Methicillin resistente *Staphylococcus aureus* (MRSA) oder multiresistente *Pseudomonas aeruginosa* Stämme weltweit isoliert werden, werden dringend mehr neue Antibiotikaklassen benötigt, die wirksam gegen diese oft lebensbedrohlichen Infektionen sind (Fischbach und Walsh, 2009). Zur Zeit sind einige neue Antibiotika in den Pipelines, die sich allerdings weiterhin hauptsächlich auf neue Derivate bisher bekannter Klassen beschränken (Butler *et al.*, 2013). Ein Beispiel hierfür ist das, in 2013 zugelassene Fidaxomicin, bei dem es sich um ein neues Makrolid-Antibiotikum handelt. Dringend benötigt werden jedoch Antibiotika die komplett neue Targets in der Bakterienzelle angreifen, um die aktuelle Resistenzproblematik zu durchbrechen (Rodriguez-Rojas *et al.*, 2013). Bisher wird generell nur eine sehr geringe Auswahl an Targets in den Bakterienzellen angegriffen, wenn man bedenkt wie viele essentielle Stoffwechselwege in Bakterien vorkommen.

1.2. Mykobakterien

Mykobakterien sind Gram-positive, obligat aerobe Stäbchenbakterien, die zu der Ordnung der Actinomycetales gehören und den einzigen Genus in der Familie der Mycobacteriaceae darstellen.

Mykobakterien lassen sich in den *Mycobacterium tuberculosis*-, den *Mycobacterium leprae*- und den nichttuberkulösen Mykobakterien- („*Mycobacterium other than tuberculosis*“ = MOTT) Komplex einteilen. Zu allen Gruppen gehören sowohl langsam wachsende Arten, wie *Mycobacterium tuberculosis* oder *Mycobacterium bovis* mit einer Verdopplungszeit von 18 - 24 h, als auch schnell wachsende Mykobakterien, wie *Mycobacterium smegmatis* oder *Mycobacterium abscessus* mit einer Verdopplungszeit von 1 – 2 h .

Eine besondere Rolle in Hinblick auf Antibiotikaforschung spielt *M. tuberculosis*, der Erreger der Tuberkulose. Diese Bakterien besitzen die Möglichkeit in den Alveolarmakrophagen der Lunge für lange Zeit zu persistieren. Im ersten Schritt nach der Infektion durch Aerosole gelangen die Bakterien in die Lunge und werden über verschiedene „pattern recognition receptors“ (PRRs) von Alveolarmakrophagen erkannt und über Phagozytose aufgenommen (Hossain und Norazmi, 2013). Innerhalb der Makrophagen hat *M. tuberculosis* eine Reihe verschiedener Strategien entwickelt, um unter den normalerweise toxischen Bedingungen zu überleben und die Immunantwort zu umgehen (Meena und Rajni, 2010). Beispiele für solche Strategien sind die Inhibierung der Fusion des Phagosoms mit dem Lysosom (Crowle *et al.*, 1991) oder die Hemmung der Ansäuerung des Phagosoms (Malik *et al.*, 2001). Vollständig verstanden sind die genauen Mechanismen aber noch nicht (Meena und Rajni, 2010). Da die Bakterien vom Immunsystem nicht bekämpft werden können, bilden mehrere Makrophagen, zusammen mit Lymphozyten, neutrophilen Granulozyten, dendritischen Zellen und Bestandteilen des Bindegewebes, wie beispielsweise Fibroblasten und Kollagen, ein sogenanntes Granulom (Huynh *et al.*, 2011). In diesem Granulom kann *M. tuberculosis* persistieren, indem es den Stoffwechsel auf ein Minimum herunterfährt und sich nicht mehr teilt, aber weiterhin vital ist. Dies geschieht, indem die Bakterien unter den im Granulom herrschenden hypoxischen Bedingungen Stickstoffmonoxid und Kohlenstoffmonoxid erkennen (Honaker *et al.*, 2010; Shiloh *et al.*, 2008) und dadurch den Transkriptionsfaktor „Dormancy regulator Protein“ (DosR) stärker exprimieren (Boon und Dick, 2012; Boon und Dick, 2002). DosR wiederum aktiviert die verstärkte Expression verschiedener Gene, die essentiell für das Überleben unter den hypoxischen Bedingungen sind, die im Granulom herrschen (Boon *et al.*, 2001). Gleichzeitig inhibiert DosR die Expression verschiedener Gene, dessen Genprodukte für Wachstum oder andere Stoffwechselwege verantwortlich sind, welche in diesem Status nicht benötigt werden (Voskuil *et al.*, 2003; Schnappinger *et al.*, 2003). In diesem ruhenden Status können die Bakterien über Jahre hinweg persistieren. Bei vielen latent infizierten Menschen kommt es das ganze Leben lang niemals zum Ausbruch der Krankheit. Kommt es aber zum Ausbruch von Tuberkulose, so vermehren sich die Bakterien in der Lunge und zerstören das Lungengewebe. Symptomatisch treten Fieber, starker Husten mit Auswurf von Blut und Atemnot auf. Im weiteren Verlauf kann sich *M. tuberculosis* über den Blutkreislauf verteilen und verschiedene andere Organe, wie die Lymphknoten, den Darm oder die Nieren schädigen (Lawn und Zumla, 2011). In jedem Fall handelt es sich um eine schwere und oft tödliche Erkrankung, die durch die Übertragung der Bakterien über Aerosole hoch ansteckend ist. In den letzten Jahren haben sich vermehrt „multiple drug resistant“ (MDR) Tuberkulosebakterien entwickelt, die mindestens gegen die beiden wichtigsten first-line Antituberkulotika, Isoniazid und Rifampicin, resistent sind (Collins, 1993). Darüber hinaus wurden mittlerweile auch vermehrt „extensively drug resistant“ (XDR) *M. tuberculosis* Stämme isoliert (Goldman *et al.*, 2007), die zusätzlich auch Resistenzen gegenüber mindestens einem Fluorchinolon und mindestens einem weiteren injizierbaren second-line Antibiotikum zeigen (Definition des „WHO report on MDR and XDR

TB“, 2010) Im Jahr 2012 wurden erstmals „totally drug resistant“ (TDR) *M. tuberculosis* Stämme isoliert (Udwadia *et al.*, 2012;Slomski, 2013), die gegen alle Antibiotika resistent sind, die zur Behandlung von Tuberkulose (Tb) zur Verfügung stehen (Calligaro *et al.*, 2014). Patienten, die mit diesen Stämmen infiziert wurden, haben derzeit keine Möglichkeit geheilt zu werden. Nach dem Jahresreport der Weltgesundheitsorganisation (WHO) von 2011 ist ein Drittel der Weltbevölkerung mit *M. tuberculosis* infiziert und bei 5 – 10 % dieser Träger tritt die Krankheit im Laufe ihres Lebens auf (Mukhopadhyay *et al.*, 2012). Abb. 2 zeigt die Häufigkeit und Verteilung von 2012 neu aufgetretenen Tuberkulosefällen in der Weltkarte.

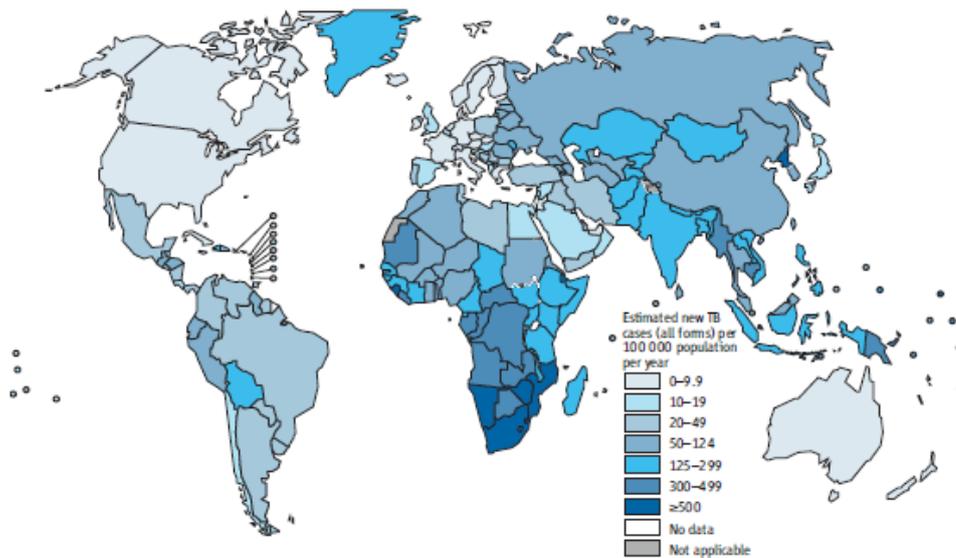


Abbildung 2: Verteilung von 2012 neu aufgetretenen Tuberkulosefällen laut WHO Tuberkulose Report 2013.

Am dramatischsten ist die Situation demnach in Südafrika und im asiatischen Raum. Aber auch in Europa und den USA steigt die Anzahl der Neuinfektionen mit Tuberkulose an. Besonders gefährdet Tuberkulose zu entwickeln, sind HIV infizierte Personen mit geschwächtem Immunsystem. Tatsächlich ist Tuberkulose eine der häufigsten Todesursachen bei AIDS Patienten (Raghavan *et al.*, 2011).

1.3. Antibiotikatherapie gegen Tuberkulose

Neue Antibiotika gegen Mykobakterien werden dringend benötigt, um den Kampf gegen Tuberkulose weiterzubringen. Dieser wird momentan, sowohl durch intrinsische Resistenzen, also generelle Unempfindlichkeiten, als auch durch vermehrte Entwicklung extrinsischer, also neu erworbener Resistenzen, stark beeinträchtigt. Ein prominentes intrinsisches Resistenzmerkmal ist die sehr spezielle, dicke und hydrophobe Zellwand von Mykobakterien (Daffe und Draper, 1998), bei der oberhalb der Mureinschichten zusätzlich Arabinogalaktansäureschichten, Mykolsäureschichten und Phthiocerol-Lipide aufgelagert sind (Ouellet *et al.*, 2010) (Abb.3).

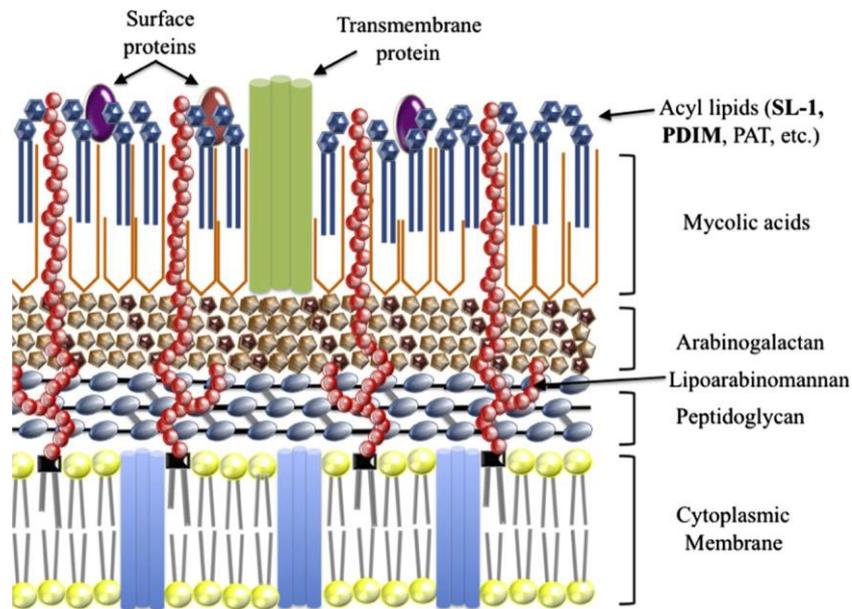


Abbildung 3: Aufbau der mykobakteriellen Zellhülle (Ouellet *et al.*, 2010)

Diese spezielle Zellwand stellt eine Barriere dar, die sowohl für lipophile, als auch hydrophile Substanzen nur schwer zu überwinden ist (Koul *et al.*, 2011). Weiterhin kodieren Mykobakterien für eine Vielzahl von Efflux-Pumpen (Li und Nikaido, 2009), die Antibiotika aktiv aus der Zelle herauspumpen. Eines von zahlreichen Beispielen ist die Efflux-Pumpe P55, die Resistenz gegen Tetrazykline und einige Aminoglykoside verleiht (Silva *et al.*, 2001). Außerdem exprimieren sie verschiedene Enzyme, die Antibiotika und deren Targets modifizieren können. Beispiele hierfür sind β -Lactamasen und ribosomale Methyltransferasen (Louw *et al.*, 2009). Die β -Lactamasen verleihen Resistenz gegen β -Lactam Antibiotika, indem sie den β -Lactamring der Antibiotika spalten. Obwohl in *M. tuberculosis* mindestens drei Penicillin Bindeproteine (PBPs) vorhanden sind, die von verschiedenen β -Lactam Antibiotika als Target gebunden werden (Chambers *et al.*, 1995) sind β -Lactame dadurch unwirksam. Außerdem verleiht die im Genom kodierte Methyltransferase ErmMT *M. tuberculosis* Resistenz gegen Makrolide, indem sie die 23s rRNA methyliert. Dies führt dazu, dass die Makrolide nicht mehr am Target binden können (Buriankova *et al.*, 2004). Die derzeitige Therapie von mykobakteriellen Erkrankungen ist also stark limitiert und auch die Entdeckung neuartiger Antibiotika, die gegen Mykobakterien wirksam sind, ist sehr selten (Balganesh *et al.*, 2008). Besonders wichtig ist die Suche nach neuen Antituberkulotika, die gegen *M. tuberculosis* wirksam sind. Abb. 4 zeigt eine Übersicht über die begrenzte Zahl von bisher zugelassenen Antituberkulotika.

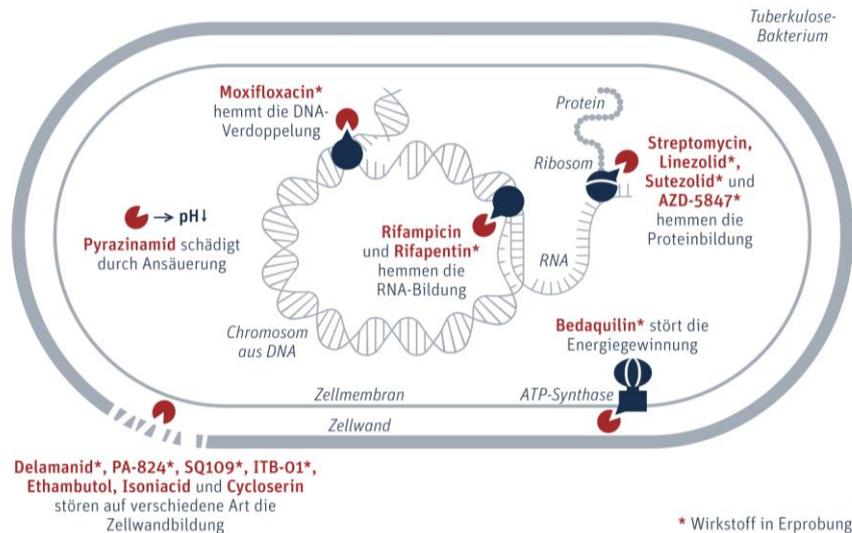


Abbildung 4: Derzeitige zugelassene Antituberkulotika und Substanzen, die sich in der Antituberkulose Forschungspipeline befinden (mit * markiert) zusammen mit ihren Wirkungsorten (Quelle: vfa, Mai 2012). Mittlerweile ist auch Bedaquilin sowohl auf dem amerikanischen, als auch auf dem europäischen Markt zugelassen worden.

Bei der klassischen first-line Tuberkulose Therapie werden Isoniazid, Rifampicin, Ethambutol und Pyrazinamid zunächst alle zusammen für 2 Monate verabreicht. Weiterhin werden Isoniazid und Rifampicin für weitere 4 - 7 Monate eingenommen (Pfeffer, 2009). Isoniazid ist mit einer minimalen Hemmkonzentration (MHK) von 0,02 – 0,2 µg/ml hochwirksam gegen *M. tuberculosis* und wirkt bakterizid. Es wird als Prodrug eingenommen und muss durch die Katalase-Peroxidase (KatG) in der Bakterienzelle aktiviert werden (Bardou *et al.*, 1998). Das Target des aktivierten Isoniazid ist die Enoyl-Acyl-Carrier-Protein-Reduktase (InhA), welche in die Mykolsäuresynthese involviert ist (Banerjee *et al.*, 1994). Eine Resistenz gegen Isoniazid kann sowohl durch Mutationen in *katG* als auch durch Mutationen in *inhA* entstehen (Zhang und Young, 1994). Rifampicin ist mit einem MHK-Wert von 0,05 - 0,5 µg/ml ebenfalls hochwirksam gegen *M. tuberculosis*. Es wirkt bakterizid, hat als Target die β-Untereinheit der DNA abhängigen RNA-Polymerase (RpoB) (Bass *et al.*, 1979) und hemmt somit die Transkription. Resistenzen gegen Rifampicin können durch Mutationen in *rpoB* auftreten (Telenti *et al.*, 1993). Ethambutol ist mit einem MHK-Wert von 1 - 5 µg/ml immer noch relativ gut wirksam gegen *M. tuberculosis* und ist bakteriostatisch. Ethambutol inhibiert die Arabinosyltransferase (EmbB), welche die Polymerisierung von Arabinose zu Arabinogalaktan katalysiert (Belanger *et al.*, 1996). Dadurch wird die Biosynthese von Arabinogalactan, einem wichtigen Zellwandbestandteil, gehemmt. Mutationen im Target *embB* sind auch hier bekannt und führen zu Resistenz (Telenti *et al.*, 1997). Pyrazinamid wirkt nur im sauren pH-Milieu, hat eine MHK von 6,25 – 50 µg/ml gegen *M. tuberculosis* und ist bakterizid (Zhang, 2005). Bei Pyrazinamid handelt es sich auch um eine Prodrug, die in der Bakterienzelle von der Pyrazinamidase (PncA) zu Pyrazinsäure hydrolysiert wird. Die Anreicherung der Pyrazinsäure führt in der Zelle zu einem niedrigen pH-Wert, welcher wiederum zu einer Desenergetisierung der Membran (Zhang *et al.*, 2003) und zur

Inaktivierung von Enzymen verschiedener Stoffwechselwege führt (Arbex *et al.*, 2010a). Der genaue Wirkmechanismus von Pyrazinamid ist noch nicht vollständig aufgeklärt, eine Resistenzbildung ist bisher aber nur durch Mutationen in *pncA* bekannt (Scorpio und Zhang, 1996).

Als second-line Therapie werden außerdem Fluorochinolone, welche die DNA-Synthese hemmen und Para-Aminosalicylsäure, was die Folsäuresynthese inhibiert, verwendet. Darüber hinaus können die Aminoglykoside Kanamycin, Streptomycin und Amikacin, die die Proteinbiosynthese hemmen oder Cycloserin und Ethionamid, die den Aufbau der mykobakteriellen Zellwand hemmen, verwendet werden (Arbex *et al.*, 2010b).

Eine weitere Problematik ist auch, dass mit allen bisher bekannten Antibiotika nur Mykobakterien bekämpft werden können, die sich im aktiven Status befinden, also solche die replizieren und sich verdoppeln. Mykobakterien im ruhenden Status, die nicht replizieren und unter hypoxischen Bedingungen mit heruntergefahrenen Stoffwechsel überleben, ohne sich zu verdoppeln werden bisher nicht angegriffen (Robertson *et al.*, 2012; Fattorini *et al.*, 2013).

Mittlerweile befinden sich weitere Substanzen in der Anti-Tuberkulose Pipeline, welche die Zellwandsynthese oder die Translation hemmen. Im Jahr 2013 wurde sogar erstmals seit mehr als 40 Jahren ein neues Antibiotikum zur Therapie von Tuberkulose von der federal drug administration (FDA) für den amerikanischen Markt zugelassen (Cohen, 2013). Hierbei handelt es sich um Bedaquillin, ein hochwirksames Antibiotikum mit einem MHK-Wert von 0,003 - 0,06 µg/ml gegen verschiedene *M. tuberculosis* Stämme. Bedaquillin hat einen innovativen Wirkmechanismus, da es die ATP-Synthase und somit die Energiegewinnung der Bakterien inhibiert (Andries *et al.*, 2005). Im März 2014 wurde Bedaquilin nun auch im Rahmen eines beschleunigten Verfahrens von der europäischen Arzneimittelagentur (EMA) auf dem europäischen Markt für die Therapie von resistenten *M. tuberculosis* Infektionen zugelassen (Quelle: EPAR Report der EMA). Trotz dieses Fortschritts werden dringend weitere Antituberkulotika benötigt.

1.4. Modellorganismen für die Tuberkuloseforschung

Um neue Antibiotika gegen Tuberkulose zu entdecken, wird auf diesem Gebiet vermehrt Grundlagenforschung betrieben. Da es nicht immer möglich ist an *M. tuberculosis* selber zu forschen, weil es sich hierbei um einen Organismus der Sicherheitsstufe BSL 3 handelt, werden Grundlagen oft an Modellorganismen erforscht. Gängig hierfür sind das schnell wachsende Mykobakterium *M. smegmatis* und das langsam wachsende Mykobakterium *M. bovis* BCG. Bei letzterem handelt es sich um den Impfstamm gegen Tuberkulose, der von den beiden Wissenschaftlern Albert Calmette und Camille Guérin zu Beginn des 20. Jahrhunderts entwickelt wurde, indem ein virulenter *M. bovis* Stamm solange passagiert und kultiviert wurde, bis avirulente Bakterien gewonnen werden konnten. Diese avirulenten Bakterien wurden nach ihren Entdeckern Bacillus-Calmette-Guérin (BCG) benannt. Als Impfstoff wird dieser Stamm heutzutage kritisch betrachtet und die Impfung wird in Deutschland nicht

mehr durchgeführt, da sie nicht immer zu einer Immunisierung führte und in der Vergangenheit zahlreiche Nebenwirkungen auftraten (Quelle: ständige Impfkommision des Robert-Koch Institutes). Als Modellorganismus zur Wirkstoffsuche ist *M. bovis* BCG aber sehr gut geeignet, da der Stamm eine ca. 95 - 99 %ige Homologie zu *M. tuberculosis* aufweist (Behr *et al.*, 1999). Die in dieser Arbeit untersuchten Gene *clpP1*, *clpP2* und *ftsZ* sind sogar zu 100 % identisch mit den entsprechenden Genen in *M. tuberculosis*. *M. smegmatis* zeigt dagegen eine deutlich geringere Homologie zu *M. tuberculosis* (Reyrat und Kahn, 2001) und auch die hier untersuchten Gene weisen nur eine 84 – 88 %ige Identität mit den Genen aus *M. tuberculosis* auf. Weiterhin führte der Vergleich von Screening-Ergebnissen mit *M. tuberculosis*, *M. bovis* BCG und *M. smegmatis* zu dem eindeutigen Befund, dass die mit *M. bovis* BCG erzielten Ergebnisse, deutlich repräsentativer für *M. tuberculosis* waren, als die Ergebnisse, die mit *M. smegmatis* erzielt wurden (Altaf *et al.*, 2010). In dieser Arbeit wurde daher *M. bovis* BCG als Modellorganismus für *M. tuberculosis* verwendet.

1.5. Die Clp-Protease

In allen eukaryotischen und prokaryotischen Zellen gibt es komplexe Protease-Chaperon-Netzwerke, die sowohl für Qualitätskontrolle von Proteinen als auch für regulatorische Prozesse und Reaktionen der Zellen auf äußere Einflüsse von entscheidender Bedeutung sind. In Bakterien nehmen die caseinolytischen Protease (Clp-) Komplexe dabei eine zentrale Rolle ein. Sie sind sowohl zuständig für Qualitätskontrolle von neu synthetisierten Proteinen, als auch für die Reaktion auf Hitzeschock und andere Stressfaktoren, sowie für die Regulation wichtiger Entwicklungsprozesse (Frees *et al.*, 2007). Im Modellorganismus *Bacillus subtilis* reguliert die ClpCP Protease beispielsweise die Entwicklung der natürlichen Kompetenz durch den Abbau von ComK, was der entscheidende Transkriptionsfaktor für die Expression der Kompetenz bildenden Gene ist (Turgay *et al.*, 1998). Weiterhin ist die ClpXP Protease für den Abbau des globalen Transkriptionsfaktors Spx, welcher für die Reaktion auf oxidativen Stress benötigt wird, zuständig (Nakano *et al.*, 2002). In der Qualitätskontrolle von neu synthetisierten Proteinen spielt ClpP insofern eine Rolle, dass *ssrA*-getaggte Proteine, ClpXP zum Abbau von fehlsynthetisierten Proteinen zugeführt wird. Der *ssrA* tag ist eine Polypeptidkette aus 11 Aminosäuren die von der tmRNA direkt am Ribosom, C-terminal an falsch synthetisierte Polypeptide angeknüpft wird (Wiegert und Schumann, 2001; Keiler *et al.*, 1996). Auch für die Virulenz scheint ClpP von essentieller Bedeutung zu sein, da eine Inaktivierung von ClpP in *Staphylococcus aureus* (Frees *et al.*, 2003), *Streptococcus pneumoniae* (Ibrahim *et al.*, 2005), *Chlamydia pneumoniae* (Mukhopadhyay *et al.*, 2006) und *Listeria monocytogenes* (Gaillet *et al.*, 2000) zu einer deutlichen Reduktion oder sogar zum kompletten Verlust der Virulenz führt. Der Abbau der unterschiedlichen Substrate erfolgt durch das Zusammenspiel von ClpP mit einer der Clp-ATPasen. Abb. 5 zeigt den Aufbau und die Funktionsweise der Clp-Protease im Modellorganismus *B. subtilis*.

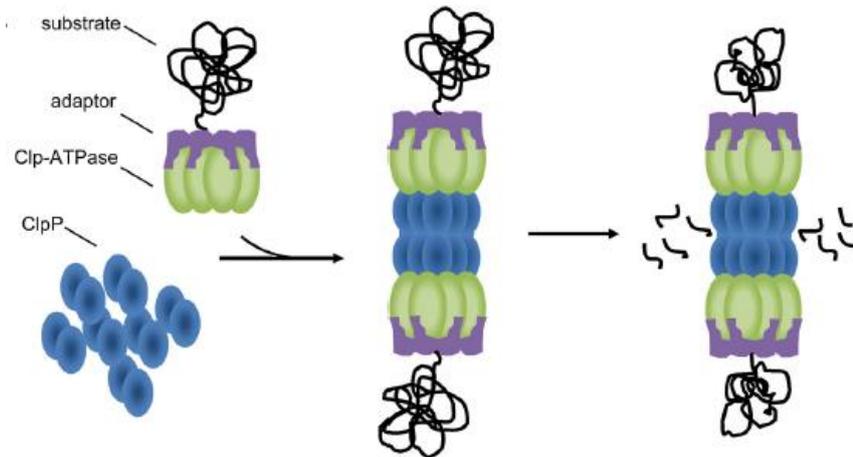


Abbildung 5: Funktion der Clp-Protease im Modellorganismus *B. subtilis* (Brötz-Oesterhelt und Sass, 2014).

Das katalytische Zentrum des Clp-Protease Komplexes bildet ClpP, welches aus zwei heptameren Ringstrukturen, also insgesamt 14 Untereinheiten zusammengesetzt ist. Im Zentrum dieses tetradekameren Komplexes befinden sich 14 katalytische Zentren, die in der Regel aus einer katalytischen Triade aus Serin, Histidin und Aspartat bestehen. Am oberen und unteren Ende des ClpP Komplexes befinden sich Poren mit einem Durchmesser von ca. 1,5 nm (Lee *et al.*, 2010), die den Zugang zu den katalytischen Zentren des Protease-Komplexes regulieren. Aufgrund des geringen Porendurchmessers ist ClpP alleine in verschiedenen bakteriellen Spezies entweder komplett inaktiv oder nur zur Proteolyse von kleinen Peptiden mit weniger als zehn Aminosäuren fähig (Yu und Houry, 2007; Kress *et al.*, 2009; Molière und Turgay, 2009). Um größere Proteine abzubauen müssen diese Eintrittsporen geöffnet werden. Dies geschieht durch Clp-ATPasen, wie ClpX oder ClpC, wobei verschiedene bakterielle Spezies verschiedene Clp-ATPasen besitzen. Diese Clp-ATPasen bilden hexamere Ringstrukturen aus und einige von ihnen können verschiedene Proteine unter ATP Verbrauch entfalten. Zur Erkennung der Proteine, die entfaltet werden sollen, interagieren Clp-ATPasen teilweise mit bestimmten Adapterproteinen, wie beispielsweise MecA oder ClpS (Kirstein *et al.*, 2009b). ClpS erkennt beispielsweise destabilisierende Elemente am N-terminus von Proteinen mit geringer Halbwertszeit und führt diese ClpAP zum Abbau zu. Für den oben beschriebenen Abbau von *ssrA*-getaggten Proteinen werden keine Adapterproteine benötigt, da ClpXP und ClpAP diesen tag direkt erkennen. Durch Bindung der Clp-ATPase mit dem [LIVMP]-G-[FL]-loop an die N-terminale hydrophobe Bindetasche von ClpP können die ATPasen die entfaltenen Proteine durch die Eintrittspore von ClpP einfädern (Kim *et al.*, 2001) und somit dafür sorgen, dass ClpP die Proteine hydrolysiert, wobei Peptide, mit einer Größe von 6-8 Aminosäuren entstehen (Choi und Licht, 2005). Wie genau die asymmetrische Bindung der hexameren Clp-ATPase an einen der heptameren ClpP Ringe abläuft ist noch nicht vollständig verstanden (Bewley *et al.*, 2006). Auch wie die, bei der Proteolyse entstandenen Peptidprodukte die Clp-Protease wieder verlassen ist Bestandteil der aktuellen Forschung und bleibt noch zu klären. Eine gängige Hypothese ist, dass die Peptide die Protease möglicherweise durch seitliche Poren

verlassen, die sich nach der Hydrolyse des Substrates am aktiven Zentrum durch eine Konformationsänderung des ClpP Komplexes bilden (Sprangers *et al.*, 2005). Bei dieser Konformation von ClpP spricht man auch vom „compressed state“, der dadurch charakterisiert ist, dass die katalytische Triade eine inaktive Ausrichtung aufweist, die α E-Helix der „handle region“ eingeknickt ist und somit die Heptamere nur in losem Kontakt stehen, wobei seitliche kleine Poren entstehen (Zhang *et al.*, 2011; Geiger *et al.*, 2011). Eine weitere Konformation die für ClpP entdeckt wurde, ist der „extended state“, bei dem die seitlichen Poren nicht vorhanden sind, die α E-Helix lang ausgestreckt ist und die katalytische Triade eine aktive Ausrichtung aufweist (Zhang *et al.*, 2011; Geiger *et al.*, 2011). Diese zwei Konformationen wurden bereits für *Escherichia coli* (Wang *et al.*, 1997; Sprangers *et al.*, 2005; Kimber *et al.*, 2010), *B. subtilis* (Lee *et al.*, 2011), *S. aureus* (Gersch *et al.*, 2012) und *Listeria monocytogenes* (Zeiler *et al.*, 2013) beschrieben. Außerdem wurde eine Konformation des ClpP Komplexes aus *S. aureus* beschrieben, die im Wesentlichen die gleichen Eigenschaften aufweist, wie der „compressed state“ wobei die seitlichen Poren etwas kleiner und der gesamte ClpP Komplex etwas höher ist. Diese Konformation wird als „compact state“ bezeichnet (Zhang *et al.*, 2011). Einer Theorie nach, könnte es eine dynamische Bewegung des ClpP Komplexes vom „extended state“ über den „compact state“ hin zum „compressed state“ geben, die gekoppelt an den Proteinverdau stattfindet. Diese Dynamik ist allerdings bisher noch nicht bewiesen worden.

Zusammenfassend lässt sich also sagen, dass es sich bei den Clp-Proteasen um sehr komplexe und dynamische Strukturen handelt, die in der Zelle durch verschiedenste Wege streng reguliert sind, da sie diverse wichtige Funktionen haben. Auch wenn ClpP in den meisten Bakterien nicht essentiell für das Wachstum benötigt wird, zeigen ClpP Mutanten doch auffällige Phänotypen, wie z.B. die Filamentierung von *B. subtilis* mit abnormalen Zellwandstrukturen (Gerth *et al.*, 1998) oder irreguläre Zellteilung und abnormale Zellwandstrukturen in *S. pneumoniae* (Nair *et al.*, 2003). Daraus lässt sich schlussfolgern, dass es sich bei Clp-Proteasen um die hauptverantwortlichen Proteasen für Qualitätskontrolle und regulatorische Prozesse in Bakterien handelt (Frees *et al.*, 2007).

1.6. Acyldepsipeptid Antibiotika (ADEPs)

Acyldepsipeptid Antibiotika (ADEPs) sind eine neue Antibiotikaklasse, dessen Vertreter einen innovativen Wirkmechanismus haben und sehr effektiv gegen eine Reihe Gram-positiver, pathogener Bakterien wirksam sind. Erstmals wurde der Naturstoff ADEP1 (Faktor A) als Fermentationsprodukt von *Streptomyces hawaiiensis* isoliert und zeigte bereits vielversprechende Aktivität gegen verschiedene Gram-positive Bakterien (Michel und Kastner, 1982). Um den Naturstoff zu optimieren, wurden durch chemische Vollsynthese neue Derivate mit veränderten Seitenketten entwickelt, welche zum Teil weniger lichtempfindlich, stabiler oder potenter waren (Hinzen *et al.*, 2006; Brötz-Oesterhelt *et al.*, 2005). Die in dieser Arbeit verwendeten Derivate sind in Abb. 6 dargestellt.

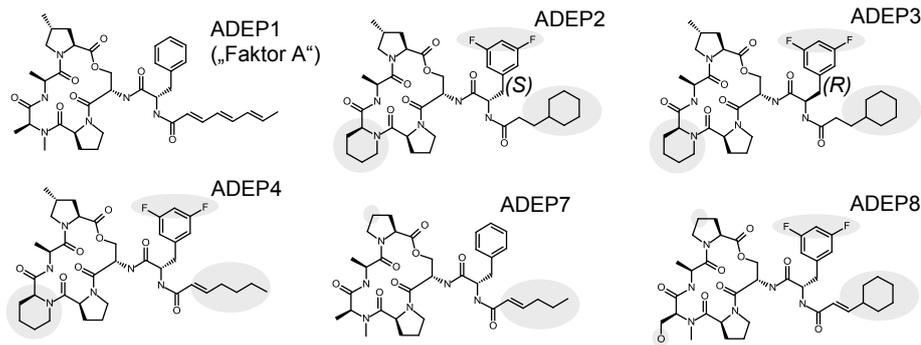


Abbildung 6: Chemische Struktur des Naturstoffes ADEP1 sowie der in dieser Arbeit verwendeten ADEP-Derivate. Strukturelle Unterschiede sind grau hervorgehoben.

Die hier dargestellte Derivate ADEP2, 3, 4 und 7 wurden bereits veröffentlicht (Hinzen *et al.*, 2006; Brötz-Oesterhelt *et al.*, 2005), und das Derivat ADEP 8 wurde im gleichen Zuge hergestellt, ist aber bisher nicht veröffentlicht worden. Das Target von ADEPs ist das proteolytische Zentrum der Clp-Protease, ClpP (Brötz-Oesterhelt *et al.*, 2005). Der Wirkmechanismus von ADEPs an ClpP ist in Abb. 7 schematisch dargestellt.

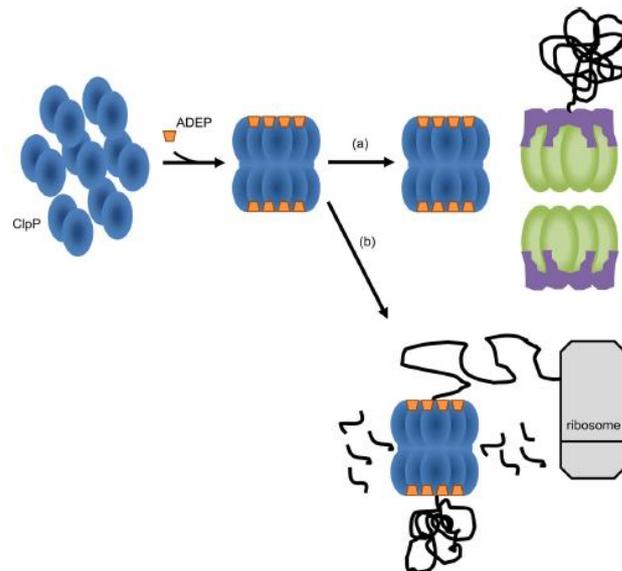


Abbildung 7: Wirkung von ADEPs an ClpP im Modellorganismus *B. subtilis* (Brötz-Oesterhelt und Sass, 2014).

Im Modellorganismus *B. subtilis* liegen normalerweise zunächst ClpP Monomere vor, welche in Anwesenheit von Clp-ATPasen zu einem fassförmigen, proteolytisch aktiven Tetradekamer assoziieren. Auch Anwesenheit von ADEPs führt zur Bildung des Tetradekamers (Kirstein *et al.*, 2009a). Die Entstehung dieses ADEP-ClpP Komplexes hat daraufhin zwei Konsequenzen für die Zellen. Zum einen wird die Bindung von Clp-ATPasen an ClpP verhindert, da ADEPs die Bindetasche, in der normalerweise die Clp-ATPase bindet, blockieren (Lee *et al.*, 2010). Auch die Kristallstruktur von *E. coli* ClpP mit ADEP1 bestätigte diese Bindungsposition von ADEPs (Li *et al.*, 2010). Die Bindung von ADEP führt somit dazu, dass alle oben beschriebenen natürlichen Funktionen von ClpP inhibiert werden. Zum anderen führt die Bindung von ADEPs zu einer Konformationsänderung von ClpP, durch die der Durchmesser der

Eintrittsporen zum katalytischen Zentrum im Fall von ClpP aus *B. subtilis*, von 1,5 nm auf 3 nm vergrößert wird (Lee *et al.*, 2010). Somit führt ADEP zu einer unregulierten Überaktivierung von ClpP, wobei naszierende Proteine, die noch nicht komplex gefaltet und somit schmal genug sind um durch die vergrößerte Eintrittspore zu den aktiven Zentren von ClpP zu gelangen, direkt am Ribosom vom ADEP-ClpP Komplex abgebaut werden können (Kirstein *et al.*, 2009a). Dieser duale Wirkmechanismus ist als Besonderheit hervorzuheben, da alle bisher bekannten Antibiotikaklassen immer nur zur Inhibierung des Targets führen und im Falle von ADEPs zum ersten mal Antibiotika beschrieben wurden, welche ein Target unkontrolliert überaktivieren. Auch die bisher beschriebene vergleichbar geringe Zytotoxizität von ADEPs (Brötz-Oesterhelt *et al.*, 2005) macht diese Substanzen zu einem interessanten Antibiotikum. Kürzlich wurde eine Inhibierung des eukaryotischen Zellzyklus mit ADEP1 beschrieben (Xu *et al.*, 2013). Diese Wirkung wurde jedoch nur bei sehr hohen ADEP Konzentrationen von 50 - 100 μ M erzielt.

Mittlerweile wurden mit Hilfe von Proteomstudien zahlreiche Proteinsubstrate des ADEP-ClpP Komplexes in *S. aureus* identifiziert (Conlon *et al.*, 2013). Als erstes natürliches Substrat für den ADEP-ClpP Komplex wurde das Zellzyklusprotein FtsZ in *B. subtilis* und *S. aureus* entdeckt (Sass *et al.*, 2011). FtsZ ist in diesen Organismen essentiell für die bakterielle Zellteilung (Beall und Lutkenhaus, 1991), da es die Z-Ringe ausbildet, die den ersten Schritt der Septenbildung darstellen (Wang und Lutkenhaus, 1993). In Anwesenheit von ADEPs wird FtsZ abgebaut und es kann kein Z-Ring gebildet werden. Dies führt in *B. subtilis* zunächst zum Filamentieren der stäbchenförmigen Bakterien und in *S. aureus* zum Anschwellen der Kokken, bis die Zellen schließlich absterben (Abb. 8) (Sass *et al.*, 2011).

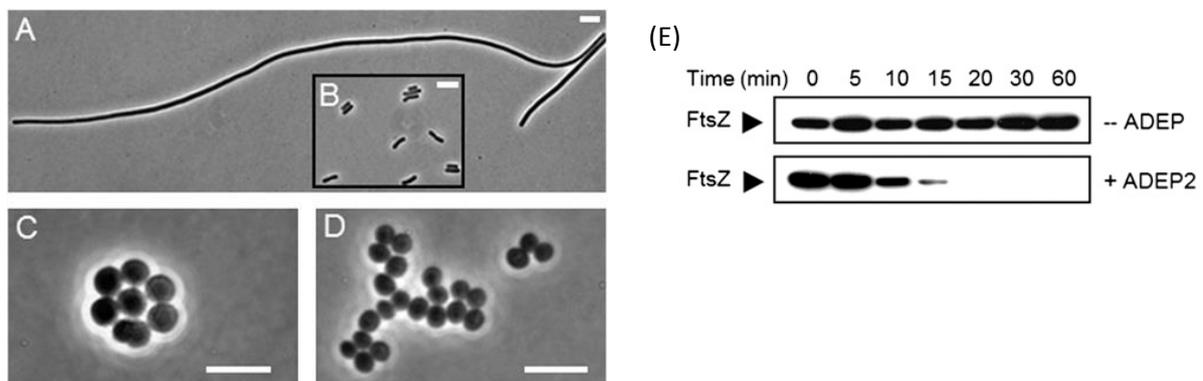


Abbildung 8: ADEP behandelte *B. subtilis* Stäbchen filamentieren (A) im Gegensatz zu unbehandelten Zellen (B). ADEP behandelte *S. aureus* Kokken schwellen (C) im Vergleich zu unbehandelten Zellen (D) an. Dies ist begründet durch den Abbau des Zellzyklusproteins FtsZ durch den ADEP-ClpP Komplex (E), was hier mit Hilfe von Western Blots gegen Zelllysate von behandeltem und unbehandeltem *B. subtilis* gezeigt wurde (Sass *et al.*, 2011).

Diese Daten zeigen, dass Bindung von ADEPs an ClpP sogar eine dritte Konsequenz für die Bakterien hat, nämlich die Inhibierung der Zellteilung durch den Abbau von FtsZ durch den ADEP-ClpP Komplex. Die Inhibierung von FtsZ als Angriffspunkt für neue Antibiotika gegen verschiedenste Bakterien (Sass und Brötz-Oesterhelt, 2013; Awasthi *et al.*, 2011), aber auch speziell gegen *M. tuberculosis* (Kumar *et al.*, 2010), wurde bereits in der Literatur als

vielversprechend diskutiert. Ein Beispiel ist der Naturstoff Curcumin, welcher eine erhöhte GTPase-Aktivität von FtsZ bewirkt und somit die Filamentierung von FtsZ inhibiert (Rai *et al.*, 2008). Vielversprechend ist auch das Benzamid Derivat PC190723, welches hochwirksam gegen *S. aureus* ist (Haydon *et al.*, 2008), indem es die Formation von FtsZ Protofilamenten stimuliert und dadurch die Bildung des Z-Ringes verhindert (Elsen *et al.*, 2012; Andreu *et al.*, 2010). Ein weiteres Beispiel sind verschiedene synthetisierte trisubstituierte Benzimidazole, die durch Steigerung der GTPase-Aktivität und Inhibierung der Filamentierung von FtsZ eine sehr gute Wirkung gegen *M. tuberculosis* haben (Kumar *et al.*, 2011; Knudson *et al.*, 2014). Auch das Taxan SB-RA-2001 zeigt eine vielversprechende Wirksamkeit gegen *M. tuberculosis*, indem es die Formation der FtsZ Protofilamente stabilisiert und somit die Depolymerisierung des Z-Ringes im Zuge der Zellteilung inhibiert (Singh *et al.*, 2014). Trotz der auffälligen Ähnlichkeit zu dem Anti Krebsmedikament Paclitaxel, hat dieses Taxan eine dreifach geringere zytotoxische Wirkung auf humane Krebszelllinien und kommt somit grundsätzlich für die Weiterentwicklung als Antibiotikum in Frage (Singh *et al.*, 2014).

Außerdem wurde vor kurzem ein neuer Ansatz verfolgt, um neue ADEP Derivate zu synthetisieren. Indem bestimmte Aminosäuren des Peptidolacton-Ringes von ADEP4 ausgetauscht wurden, konnten die neuen ADEP Derivate in eine Konformation versetzt werden, die eine bessere Kompatibilität mit der Bindung an ClpP aufweist. Sowohl die MHK gegen *S. aureus*, *Enterococcus faecalis* und *S. pneumoniae*, als auch die *in vitro* Aktivierung von *E. coli* ClpP konnte somit verbessert werden (Carney *et al.*, 2014). Eine Übersicht über diese neuen ADEP-Derivate ist in Abb. 9 dargestellt.

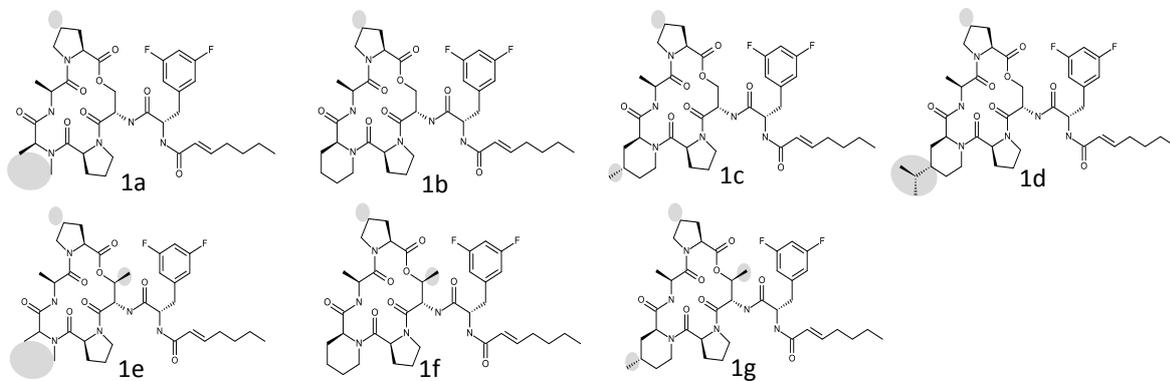


Abbildung 9: Neue ADEP-Derivate (Carney *et al.*, 2014). Unterschiede zu ADEP4 sind grau unterlegt.

Diese neuen ADEP-Derivate unterscheiden sich von allen bisherigen ADEP-Vertretern hauptsächlich durch Methylierungen bzw. Isopropylierung an Position 4 des Piperidin-Rings des Pipecolats, sowie durch eine zusätzliche Methylgruppe am alkoholischen Teil des Lactons, direkt neben der Esterbindung. Trotzdem konnte durch diese geringen Veränderungen die Bioverfügbarkeit der Substanz verbessert werden. Das große Problem, weshalb die Entwicklung von ADEPs in der Pharmaindustrie nicht weiter verfolgt wurde, ist aber die schnelle Bildung von Resistenzen (Brötz-Oesterhelt *et al.*, 2005). Da ClpP in den untersuchten Bakterien nicht essentiell für deren Wachstum ist, erfolgt die Resistenzbildung

in *B. subtilis*, *S. aureus*, *S. pneumoniae* und *E. faecalis* durch Mutationen in *clpP* (Brötz-Oesterhelt, unveröffentlichte Daten). Die Resistenzrate von ADEPs lag in den verschiedenen Organismen hierbei zwischen 1×10^5 und 1×10^6 Cfu/ml (Brötz-Oesterhelt, unveröffentlichte Daten). Sogar im Vergleich zu Rifampicin, einem Antibiotikum, das mit einer Resistenzrate von 1×10^7 Cfu/ml für eine schnelle Resistenzentwicklung bekannt ist, schneidet ADEP in diesem Zusammenhang schlecht ab.

Da der Wirkmechanismus der neuen ADEP-Derivate sich nicht unterscheidet, wird diese Problematik höchstwahrscheinlich auch auf diese Substanzen zutreffen, so dass, trotz Optimierung von ADEPs, für die meisten Spezies keine Vermarktung als Monotherapie in Frage kommen wird.

1.7. ClpP in Mykobakterien

Mykobakterien haben die Besonderheit, dass sie zwei ClpP Homologe exprimieren. Die zugehörigen Gene *clpP1* und *clpP2* sind im *clpP1P2* Operon angeordnet (Cole *et al.*, 1998) und werden co-transkribiert (Personne *et al.*, 2013). Beide Proteine sind essentiell für das Wachstum von Mykobakterien *in vitro* und *in vivo* während der Infektion (Sasseti *et al.*, 2003; Raju *et al.*, 2011; Ollinger *et al.*, 2011; Raju *et al.*, 2014), weshalb ClpP1 und ClpP2 als vielversprechende Targets für neue Antituberkulotika diskutiert werden (Roberts *et al.*, 2013; Raju *et al.*, 2012). Bisher ist nur für ein anderes ClpP, nämlich das aus *Caulobacter crescentus*, eine essentielle Funktion beschrieben worden, da ClpXP hier CtsA abbaut, was für die Zellzyklus Inhibierung während der Replikation zuständig ist (Quon *et al.*, 1996).

Die Funktion und das Zusammenspiel der beiden ClpP Homologe waren lange Zeit unklar. Zunächst wurde eine Kristallstruktur eines inaktiven Tetradekamer Komplexes veröffentlicht, der nur aus ClpP1 bestand (Ingvarsson *et al.*, 2007) und sich später der „compressed state“ Konformation von ClpP zuweisen ließ (Kimber *et al.*, 2010). Etwas später wurde erneut veröffentlicht, dass weder ClpP1 noch ClpP2, noch eine Mischung aus beiden *in vitro* eine Peptidaseaktivität aufweisen, aber sich selber prozessieren (Benaroudj *et al.*, 2011). Kurz darauf fand man heraus, dass ClpP1 und ClpP2 zwar alleine inaktiv sind, eine Mischung aus beiden ClpP Versionen aber zusammen mit bestimmten Aktivatorpeptiden, wie Benzyloxycarbonyl-Leucyl-Leucin (Z-LL), *in vitro* Peptidase- und Proteaseaktivität aufweisen (Akopian *et al.*, 2012). Im Zuge dieses Aktivierungsprozesses führt Z-LL zunächst dazu, dass die beiden Heptamere des inaktiven ClpP1 und ClpP2 Komplexe auseinander diffundieren und im nächsten Schritt sich jeweils ein ClpP1 Heptamer an ein ClpP2 Heptamer anlagert (Abb. 10).

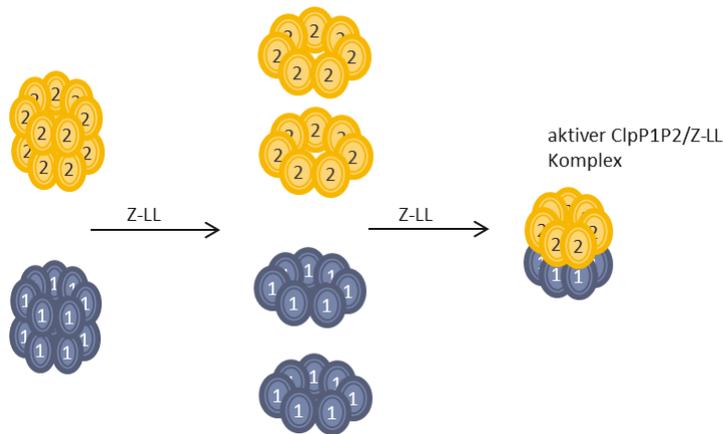


Abbildung 10: Schema der Aktivierung des MTB ClpP1P2 Komplexes mit Z-LL (Akopian *et al.*, 2012).

Dieser gemischte Komplex bleibt aber nur in Anwesenheit von Z-LL aktiv. Wird Z-LL herausgewaschen, so geht die Aktivität der Protease wieder verloren (Akopian *et al.*, 2012). Der ClpP1P2 Komplex konnte auch aus Zelllysaten von *M. smegmatis* kopräzipitiert werden (Raju *et al.*, 2011). Es handelt sich beim ClpP1P2 Komplex also tatsächlich um einen physiologisch in dieser Form vorkommenden Proteinkomplex. Was in der mykobakteriellen Zelle bei der Aktivierung des Komplexes genau vor sich geht und ob es dort auch bestimmte Aktivatoren gibt, ist bisher aber nicht vollständig verstanden. Kürzlich wurde gezeigt, dass das Modellsubstrat GFP-ssrA in Anwesenheit von ClpX oder ClpC1 und ATP auch ohne ein Aktivatorpeptid von ClpP1P2 abgebaut werden kann und dass Anwesenheit aller dieser Komponenten sogar die Peptidaseaktivität von ClpP1P2 in Abwesenheit von Z-LL stimuliert (Schmitz und Sauer, 2014). Auf Grundlage dieser Studien wurde die Hypothese aufgestellt, dass in Mykobakterien nur die Anwesenheit von Clp-ATPase, ATP und eines gefalteten Proteinsubstrates zu der Stabilisierung des aktiven ClpP1P2 Komplexes führt und das Fehlen von einem dieser Komponenten zur Entstehung von inaktiven ClpP Komplexen führt (Schmitz und Sauer, 2014). Die Funktion von Clp-Proteasen in Mykobakterien ist noch nicht vollständig verstanden. ClpP1 und ClpP2 scheinen verschiedene Substratspezifitäten zu haben (Personne *et al.*, 2013; Akopian *et al.*, 2012). Es wurde aber gezeigt, dass sie beide unter der Kontrolle eines von ClgR regulierten Promotors stehen (Estorninho *et al.*, 2010) und unter den gleichen Konditionen co-transkribiert werden (Personne *et al.*, 2013). Außerdem scheinen weder *clpP1* noch *clpP2* als Reaktion auf einen Hitzeschock, anders als es bei vielen anderen Bakterien der Fall ist, vermehrt exprimiert zu werden (Personne *et al.*, 2013; Stewart *et al.*, 2002). Als Reaktion auf oxidativen Stress, der durch den Sigma-Faktor H (σ^H) vermittelt wird, wurde aber eine leichte Hochregulation von *clpP1P2* beobachtet (Mehra und Kaushal, 2009). Clp-Proteasen werden in *M. tuberculosis* außerdem unter hypoxischen Bedingungen (Muttucumaru *et al.*, 2004) und während der Wiederaanpassung an sauerstoffreichere Umgebung (Sherrid *et al.*, 2010), die als Modell für den Übergang von persistierenden zu aktiven *M. tuberculosis* Bakterien genutzt wird, vermehrt exprimiert.

Bekannt ist, dass ClpP1 und ClpP2 eine Rolle in der Qualitätskontrolle von Proteinen spielen, indem sie *ssrA*-getaggte Proteine abbauen (Triccas *et al.*, 2002). Vermutet wird, dass vor allem ClpP1 hierfür zuständig ist, während ClpP2 zusätzlich andere tagfreie Proteine degradieren kann (Personne *et al.*, 2013). Das lange Zeit einzige beschriebene mykobakterielle Substrat der ClpC1P2-Protease, ist der anti-Sigma-Faktor RseA (Barik *et al.*, 2010). In dieser Studie wurde gezeigt, dass ClpC1P2 ohne die Anwesenheit von Z-LL oder anderer Aktivatoren, RseA innerhalb von 2 h vollständig abbaut. Da die Beobachtung dieser Aktivator-unabhängige Aktivität den oben beschriebenen anderen Studien widerspricht, die unabhängig voneinander durchgeführt wurden, wird dieser Befund in der Literatur kritisch diskutiert. Beispielsweise kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Proteaseaktivität auf verunreinigendes *E. coli* ClpP zurückzuführen sein könnte (Akopian *et al.*, 2012). Dass ClpC1 und somit vermutlich auch eine oder beide Clp-Proteasen aber tatsächlich eine Rolle für den Stress-induzierten Abbau von RseA in *M. tuberculosis* spielt, konnte dennoch gezeigt werden, da es in *clpC1* knock-down Stämmen nicht zum Abbau von RseA kam (Barik *et al.*, 2010). Weitere Substrate der beiden Clp-Proteasen sind kürzlich im Zuge einer Proteomstudie beschrieben worden. Besonders die Transkriptionsfaktoren WhiB1 und CarD wurden hierbei als Substrate identifiziert (Raju *et al.*, 2014). Dennoch ist die Rolle von ClpP1 und ClpP2 in Mykobakterien noch lange nicht vollständig verstanden und die Frage weshalb diese Proteasen in Mykobakterien essentiell sind kann noch nicht beantwortet werden. Dass diese beiden Proteasen in Mykobakterien eine andere Rolle spielen könnten als es in anderen Bakterien der Fall ist, könnte auch damit zusammenhängen, dass Mykobakterien besonders viele andere Proteasen besitzen. Beispielsweise sind sie eine der wenigen Eubakterienarten, die über ein Proteasom verfügen (Lin *et al.*, 2006).

Während die Arbeiten zu dieser Promotion im Gange waren, erschien eine Publikation, die eine moderate antibakterielle Aktivität von ADEPs gegen *M. tuberculosis* bereits beschrieb und auch demonstrierte, dass ADEPs ein Substrat für Efflux-Pumpen in *M. tuberculosis* zu sein scheinen (Ollinger *et al.*, 2012). Allerdings wurde der Wirkmechanismus von ADEPs in Mykobakterien nicht nachgewiesen und es wurden bisher keine *in vitro* Studien durchgeführt, um die Wirkung von ADEPs am isolierten ClpP1P2 zu charakterisieren.

Die einzigen anderen in der Literatur beschriebenen Substanzen, die direkt an ClpP1P2 angreifen, sind β -Lactone, die in hohen Konzentrationen toxisch gegen *M. tuberculosis* wirken und die Peptidase-Aktivität von Z-LL aktiviertem ClpP1P2 hemmen (Compton *et al.*, 2013).

Außerdem sind Substanzen bekannt, die an MTB ClpC1 binden und somit gegen Mykobakterien wirken. Eine dieser Substanzen ist der Naturstoff Cyclomarin A, welcher aus einer marinen *Streptomyces* Spezies isoliert wurde (Renner *et al.*, 1999). Cyclomarin A zeigte *in vitro* und in Makrophagen eine sehr gute bakterizide Aktivität gegen *M. tuberculosis* und eine vielversprechend geringe Resistenzrate von $< 10^9$ Cfu/ml (Schmitt *et al.*, 2011). Cyclomarin A bindet an die N-terminale Domäne von MTB ClpC1, die für die Substraterkennung zuständig ist (Vasudevan *et al.*, 2013) und scheint dadurch indirekt zu

einer höheren Proteolyserate der Clp-Protease zu führen (Schmitt *et al.*, 2011). Als eine Hypothese wurde vorgeschlagen, dass die Cyclomarin A Bindung in ClpC1 zu einer Konformationsänderung führen könnte, die die ClpC1 Eingangspore öffnet, ClpC1 dann an ClpP1 oder ClpP2 bindet, wodurch auch dort die Eingangspore geöffnet wird und es dadurch zu unkontrollierter Proteolyse in der mykobakteriellen Zellen kommt (Vasudevan *et al.*, 2013). Eine weitere Substanz die an MTB ClpC1 wirkt ist das Lassozeptid Lassomycin. Bei Lassomycin handelt es sich um einen Naturstoff aus *Lentzea kentuckyensis*, der eine sehr gute und spezifische bakterizide Wirkung gegen Mykobakterien hat (Gavriš *et al.*, 2014). Lassomycin bindet an ClpC1, aktiviert dadurch die ATPase Aktivität, inhibiert aber gleichzeitig die proteolytische Aktivität von ClpC1P1P2 (Gavriš *et al.*, 2014). Der genaue molekulare Mechanismus der Inhibierung durch Lassomycin ist bisher noch nicht untersucht worden. Spekuliert wird, dass die Bindung in ClpC1 eine Konformationsänderung bewirkt, die verhindert, dass es noch an den ClpP1P2 Komplex binden kann (Gavriš *et al.*, 2014). Hierbei handelt es sich allerdings um eine bisher nicht experimentell bestätigte Hypothese. In jedem Fall konnte mit verschiedenen Modulatoren, die alle unterschiedliche Wirkmechanismen haben, gezeigt werden, dass sowohl Clp-ATPasen als auch ClpP1P2 wirklich vielversprechende Targets für neue Antituberkulotika sind.

1.8. ClpP in *Staphylococcus aureus*

S. aureus ist ein fakultativ pathogener Keim, der Bestandteil der natürlichen menschlichen Flora in Mund- und Nasenraum sowie auf der Haut ist. *S. aureus* kann aber auch zu leichten bis schwerwiegenden Erkrankungen wie Hautentzündungen, Herzzinnenhautentzündung, Lungenentzündung oder Sepsis führen (Lowy, 1998). Besondere Aufmerksamkeit bekommt dieses Pathogen wegen der starken Resistenzentwicklung gegen verschiedenste Antibiotika-Klassen und dem Auftreten von Methicillin resistenten *S. aureus* (MRSA) sowie Vancomycin resistenten *S. aureus* (VISA/VRSA) Stämmen. Diese entstehen sowohl in der Gesellschaft („community associated“) als auch in Krankenhäusern („hospital associated“) (Otto, 2012;Gould, 2013). Gegen *S. aureus* werden also dringend neue Antibiotika benötigt (Bassetti *et al.*, 2013).

Ein mögliches Target für neue Antibiotika gegen *S. aureus* könnte ClpP darstellen, da es eine wichtige Rolle in der Proteinqualitätskontrolle spielt, sowie der Kontrolle von zentralen Regulatorproteinen, die Einfluss auf die Reaktion auf oxidativen Stress, DNA-Schäden, Nährstoffmangelbedingungen oder Anwesenheit von Antibiotika haben (Frees *et al.*, 2014). Außerdem wurden in *S. aureus* viele Substrate der Clp-Protease identifiziert, bei denen es sich unter anderem um Zellzyklusproteine oder um Proteine des Zellwandmetabolismus handelt (Feng *et al.*, 2013).

ClpP ist in *S. aureus* nicht essentiell für das Wachstum, aber essentiell für die Virulenz. Es ist verantwortlich für die Aktivitätskontrolle der hauptsächlichen Virulenzfaktoren, wie α -Haemolysin und anderen extrazellulären Virulenzproteinen (Frees *et al.*, 2003). Jedoch

konnte bisher noch kein Virulenzregulatorprotein als Substrat der Clp-Protease identifiziert werden (Feng *et al.*, 2013; Michalik *et al.*, 2012; Frees *et al.*, 2014).

Die Inhibierung von ClpP würde somit nicht das Wachstum der Bakterien verhindern oder sie gar töten, es würde aber zu Avirulenz führen. Bei solchen Substanzen spricht man von antivirulenten Substanzen, die als Alternative zu Antibiotika diskutiert werden. Ein sehr gutes Beispiel für einen solchen Ansatz sind verschiedene β -Lactone, die in hydrophoben Taschen nahe des aktiven Zentrums von ClpP binden (Gersch *et al.*, 2013) und somit die Proteolyse komplett inhibieren. Die Anwendung dieser β -Lactone gegen *S. aureus* führt zu einem Phänotyp, der keine Hämolyse mehr betreiben kann und verringerte extrazelluläre Lipase- und DNase-Aktivität aufweist (Böttcher und Sieber, 2008). Dieser Phänotyp entspricht genau dem, der auch für einen *clpP* knock-out Stamm berichtet wurde (Frees *et al.*, 2003). Die β -Lactone wurden in verschiedenen weiteren Ansätzen immer weiter chemisch optimiert, bis sie hochpotente ClpP-Inhibitoren darstellten (Böttcher und Sieber, 2009; Zeiler *et al.*, 2012).

Als weitere ClpP-Inhibitoren wurden auch Substanzen (β -lactone + β -sultame) beschrieben, die einen Zerfall der ClpP-Tetradekamere zu inaktiven Heptameren auslösen oder mit dem Serin der katalytischen Triade reagieren, wodurch dort ein Dehydroalanin entsteht, was ClpP ebenfalls inaktiviert (Gersch *et al.*, 2014).

Allerdings bleiben all diese Ansätze immer darauf beschränkt, die Virulenz von *S. aureus* zu verhindern und sie zielen nicht darauf ab, die Pathogene abzutöten. Als Vorteil eines solchen Ansatzes wird diskutiert, dass der Selektionsdruck für eine Resistenzmutation geringer sein könnte, als bei einer klassischen Wachstumshemmung. Außerdem könnten Nebenwirkungen verringert werden, da die Bakterien der natürlichen menschlichen Flora nicht angegriffen werden (Zeiler *et al.*, 2013). Allerdings muss man auch bedenken, dass die Bakterien in diesem Fall im Menschen zurückbleiben und die Infektion somit im Falle eines geschwächten Immunsystems wieder ausbrechen könnte. Eine denkbare Möglichkeit wäre aber auch der Einsatz von antivirulenten Substanzen wie den β -Lactonen in Kombination mit Antibiotika, um deren Wirkung zu verstärken.

Auch ADEPs inhibieren die natürlichen Funktionen der Clp-Protease. Allerdings wirken sie darüber hinaus auch durch die unkontrollierte Überaktivierung der Protease (Brötz-Oesterhelt *et al.*, 2005). Ein solcher Ansatz kann *S. aureus* Zellen töten und nicht nur ihre Virulenz verhindern. Auch dass ADEPs sogar gegen persistierende *S. aureus* wirken, wurde mittlerweile gezeigt. Die Verwendung von ADEP4 alleine führte allerdings erneut zu einer zu schnellen Resistenzbildung. Die Kombination von ADEP4 mit Ciprofloxacin oder Rifampicin konnte dies aber verhindern und sogar einen *S. aureus* Biofilm *in vitro* und im Mausmodell abtöten (Conlon *et al.*, 2013). ADEPs in Kombination mit anderen Antibiotika gegen *S. aureus* Infektionen einzusetzen könnte also durchaus eine vielversprechende neue Therapieoption sein.

Um weitere Substanzen zu identifizieren, die analog zu ADEPs wirken, wurden im Rahmen eines Screenings verschiedener Substanz-Bibliotheken weitere ClpP-Aktivatoren identifiziert.

Die dabei entdeckten ACP's („Activators of Self-Compartmentalizing Proteases“) können die Proteaseaktivität von *E. coli* ClpP aktivieren, indem sie das Tetradekamer durch einen bisher unbekanntem Mechanismus stabilisieren. Sie zeigten eine moderate, noch unspezifische Wirksamkeit gegen einige getestete Pathogene, waren allerdings inaktiv gegen *S. aureus* (Leung *et al.*, 2011). Ob diese Aktivatoren *in vitro* an ClpP von *S. aureus* wirken, ist nicht bekannt.

1.9. Zielsetzung

Die vorliegende Arbeit gliedert sich in zwei Teilprojekte, in denen der Wirkmechanismus von Acyldepsipeptid-Antibiotika (ADEPs) gegen zwei besonders problematische pathogene Keime genauer charakterisiert werden soll. Das Target von ADEPs ist ClpP, das proteolytische Zentrum der caseinolytischen Protease (Brötz-Oesterhelt *et al.*, 2005). Für ADEPs wurde bereits ein dualer Wirkmechanismus beschrieben, da sie zum einen die natürlichen Funktionen von ClpP inhibieren, während sie zum anderen aber auch den unkontrollierten Verdau von Proteinen bewirken (Kirstein *et al.*, 2009a; Lee *et al.*, 2010). Die klinische Entwicklung von ADEPs wurde bisher nicht verfolgt, da alle bisher untersuchten Bakterien eine zu hohe Resistenzrate aufwiesen (Brötz-Oesterhelt *et al.*, 2005). Dies ist dadurch bedingt, dass ClpP in diesen Bakterien nicht essentiell für das Wachstum benötigt wird und es somit schnell zu Mutationen in *clpP* kommt, die Resistenz gegen ADEPs verleihen (Brötz-Oesterhelt *et al.*, unveröffentlichte Daten).

Im ersten Teilprojekt dieser Arbeit sollte der Wirkmechanismus von ADEPs gegen Mykobakterien charakterisiert werden. Mykobakterien haben die Besonderheit, dass sie zwei ClpP Homologe exprimieren, *clpP1* und *clpP2*, die beide essentiell für das Wachstum sind (Sasseti *et al.*, 2003; Ollinger *et al.*, 2012; Raju *et al.*, 2011). Sowohl das Vorhandensein von zwei potentiellen Targets, als auch die Tatsache, dass diese essentiell für das Wachstum der Bakterien sind, ließen die Annahme zu, dass es in Mykobakterien zu einer weniger schnellen Resistenzbildung kommen könnte. Da außerdem dringend neue Antituberkulotika benötigt werden, sollte untersucht werden, inwiefern sich ADEPs als Antibiotika zum Einsatz gegen Tuberkulose eignen. Um diesen Fragestellungen nachzugehen, sollte sowohl die Wirkung von ADEPs gegen extrazelluläre- als auch gegen intrazellulär persistierende Mykobakterien, anhand des Modelorganismus *M. bovis* BCG untersucht werden. Außerdem sollte die Resistenzrate von *M. bovis* BCG bestimmt werden und nachgewiesen werden, dass ADEPs auch in Mykobakterien an ClpP wirken. Wobei vor allem geklärt werden sollte, ob ADEPs in Mycobakterien auch über einen dualen Wirkmechanismus verfügen, oder ob sie hier vorrangig über die unkontrollierte Überaktivierung oder über die Inhibierung der essentiellen Clp-Protease wirken. Hierzu wurde mit Hilfe eines knock-ins ein Stamm mit regulierbarer *clpP1P2*-Expression hergestellt und untersucht, inwiefern sich der MHK-Wert von ADEPs gegen *M. bovis* BCG durch die Herunterregulierung der *clpP1P2*-Expression beeinflussen lässt. Darüber hinaus wurde die Wirkung von ADEPs am isolierten ClpP1P2 Komplex von *M. tuberculosis* mit Hilfe von Enzymassays, bei Verwendung unterschiedlicher

Substrate, charakterisiert. Da bereits bekannt war, dass mykobakterielles ClpP scheinbar ein anderes Substratspektrum hat als ClpP aus den meisten anderen, bisher untersuchten Bakterien (Akopian *et al.*, 2012), wurde weiterhin untersucht, ob dies auch der Fall für ADEP aktiviertes MTB ClpP1P2 ist. Hierzu wurde analysiert ob das bisher am genauesten untersuchte Substrat für den ADEP-ClpP Komplex, FtsZ, auch durch ADEP aktiviertes MTB ClpP1P2 abgebaut wird.

Das zweite Teilprojekt dieser Arbeit beschäftigt sich mit *in vitro* Studien der Wirkung von ADEPs am isolierten ClpP aus *S. aureus*. Bereits in den ersten Untersuchungen der Aktivität von ADEPs fiel auf, dass sie eine geringere Wirkung gegen *S. aureus* haben, als gegen andere Gram-positive Bakterien (Brötz-Oesterhelt *et al.*, 2005). Deshalb sollte untersucht werden, ob dies an der Affinität von ADEPs zu ClpP liegen könnte. Durch Alignment der Aminosäuresequenzen von ClpP aus verschiedenen Bakterien, fielen drei Positionen in der ADEP-Bindetasche auf, die in *S. aureus* anders sind als in den bisher untersuchten Modellorganismen *B. subtilis* und *E. coli*. Diese Aminosäuren wurden mutiert und es wurde mit Hilfe von Enzymassays untersucht, ob sich die Affinität zu ADEPs dadurch verbessern lässt. Außerdem stellt die genauere Charakterisierung der Wirkung von ADEPs an ClpP aus *S. aureus* die Vorarbeit zu weitergehenden Untersuchungen dar, in denen geklärt werden soll, ob die Bindung von ADEPs in der N-terminalen hydrophoben Tasche des Enzyms Einfluss auf die Bindung von β -Laktonen im aktiven Zentrums von ClpP haben könnte.

2. Materialien

2.1. Chemikalien

4% - 20% precise Tris-Glycin Gele	Thermo Scientific
Agarose, für die Elektrophorese	AppliChem
Ameisensäure, p.a.	AppliChem
Amersham ECL Prime western blotting detection reagent	GE Healthcare
Amersham Gene Image AlkPhos Direct Labelling and Detection System	GE Healthcare
Amersham Hybond-ECL membrane	GE Healthcare
Ammonium-Eisen-Citrat	Sigma-Aldrich
Bacto-Agar, für die Mikrobiologie	BD
Benzyloxycarbonyl- L-Leucyl- L-Leucin (Z-LL)	Sigma-Aldrich
Z-Gly-Gly-Leu-7-amido-4-methylcoumarin (Z-GGL-AMC)	Enzo life science
Bromphenolblau	Roth
β-Mercaptoethanol	Roth
BSA Fraktion V	AppliChem
Casein fluorescein isothiocyanate from bovine milk typell	Sigma-Aldrich
Calciumchlorid x H ₂ O	Grüssing
Citronensäure	Grüssing
Desthiobiotin	Sigma-Aldrich
D(+)-Glucose Monohydrat	Caelo
Di-Kaliumhydrogenphosphat	Grüssing
Di-Natriumhydrogenphosphat	Grüssing
Dimethylsulfoxid (DMSO)	VWR
Ethylendiamin-Tetraessigsäure (EDTA)	Merck
Essentielle Aminosäuren	Pan Biotech
Ethanol, p.a.	VWR
Fluorescent stain Kit for Mycobacteria	Sigma-Aldrich
FRET Substrates 25Xaa Series	Peptides international
Fetales Kälberserum	Pan Biotech
Glassbeads, acid washed (150-212 µm Durchmesser)	Sigma-Aldrich
Glutamin	Pan Biotech
Glycerin	Roth
Hefe-Extrakt	BD
4-(2-Hydroxyethyl)- 1-piperazinethansulfonsäure (HEPES)	Roth
Hexadecyltrimethylammonium bromid	Sigma-Aldrich
Imidazol	Sigma-Aldrich
Isopropanol	VWR
Kalium-dihydrogenphosphat	Grüssing
Lane marker reducing sample buffer (5x)	Thermo Scientific
L-Asparagin	AppliChem
LDS sample buffer (4x)	Thermo Scientific
Magnesiumchlorid Hexahydrat	Grüssing
Magnesiumsulfat	AppliChem

2-(N-Morpholino)-Ethansulfonsäure (MES)-Monohydrat	AppliChem
Methanol, HPLC Qualität	VWR
Middlebrook 7H10	BD
Middlebrook 7H9	Sigma-Aldrich
Milchpulver	Roth
Milli-Q Wasser (aus Milli-Q® Reference System)	Merck-Millipore
NuPAGE® MOPS SDS Running Buffer (20X)	life technologies
Müller-Hinton-broth	Difco
Mycobacteria staining Kit	Sigma-Aldrich
Natriumchlorid, p.a.	VWR
Natriumdodecylsulfat	Roth
Natriumhydrogenphosphat	Grüssing
Natriumhydroxid	Grüssing
Nicht essentielle Aminosäuren	Pan Biotech
Ni-NTA Agarose	Qiagen
OADC Anreicherung	BD
Panexin NTA Serumersatz	Pan Biotech
PAGE Blue	Thermo Scientific
Pepton, tryptisch verdaut	Roth
Protein assay dye reagent concentrates	BioRad
Resazurin	Applichem
RhodamineB	Sigma-Aldrich
RNase away	molecular Bioproducts
RNA protect	Qiagen
Sacharose	Sigma-Aldrich
Salzsäure	Applichem
NuPAGE® Bis-Tris Precast Gels	life technologies
Succinyl-Leu-Tyr-7-amido-4-methylcoumarin(Suc-LY-AMC)	Enzo life science
Tris	Roth
Turboblotter Rapid Downward transfer system	Whatman
Tween20	Sigma-Aldrich
Tween80	AppliChem
Wasser, HPLC Grad	VWR

2.2. Antibiotika

Acyldepsipeptidderivate (ADEP 2, 3, 4, 7, 8)	AiCuris
Ampicillin Natriumsalz (99% f.d. Molekularbiologie)	Roth
Anhydrotetrazyklin hydrochlorid	Cayman chemical company
Apramycinsulfat (Biochemika)	AppliChem
Ciprofloxacin Hydrochlorid (Biochemika)	AppliChem
Gentamycin	Pan Biotech
Hygromycin B (f.d. Biochemie)	Roth
Isonicotinic acid hydrazid (Isoniazid, 98%)	Alfa Aesar
Kanamycinsulfat	Roth
Moxifloxacin-Hydrochlorid (HPLC)	Sigma-Aldrich
Rifampicin (>97%, HPLC)	Sigma-Aldrich

2.3. Antikörper

Anti ClpP

Dr. Ulf Gerth, Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald

Polyklonales Antiserum gegen MTB FtsZ

Malini Rajagopalan, University of Texas Health Science Center

Anti rabbit IgG, HRP linked Antibody

cell signalling

2.4. Kits

AffinityScript cDNA Synthesis Kit

Agilent

Brilliant III Ultra-Fast SYBR Green QPCR Master Mix

Agilent

EZNA gelextraction kit

Omega Biotek

EZNA Miniprep Kit

Omega Biotek

GeneJET Plasmid Miniprep Kit

Thermo Scientific

InnuPrep Bacteria DNA Kit

Analytik Jena

Innuprep Double pure Kit

Analytik Jena

Innuprep Miniprep Kit

Analytik Jena

NucleoSpin RNA Clean-up Kit XS

life technologies

Quick Change mutagenesis Kit

Agilent

RNeasy Mini Kit

Qiagen

2.5. Enzyme

BstAPI

NEB

DNase I, RNase free

Qiagen

Dreamtaq Polymerase

Thermo Scientific

Fast digest EcoR1

Thermo Scientific

Fast alkaline phosphatase

Thermo Scientific

Lysozym aus Hühnerei

Thermo Scientific

Pacl

Thermo scientific

Phusion Polymerase

Thermo Scientific

Proteinase K

Analytik Jena

Q5 Polymerase

NEB

T4-Ligase

Thermo Scientific

Turbo DNase

Life technologies

Van91I

NEB

2.6. Bakterienstämme und Zelllinien

Tabelle 1: In dieser Arbeit verwendete Bakterienstämme und Zellkulturlinien

	Genotyp	Stammherkunft	Referenzen
<i>Bacillus subtilis</i> 168 trpC2	<i>trpC2</i>	Dr. Ulf Gerth, Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald	(Anagnostopoulos und Spizizen, 1961)
<i>Bacillus subtilis</i> 168- pX2-clpP	<i>trpC2</i>	Dr. Ulf Gerth, Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald	(Gerth et al., 1998)
<i>Bacillus subtilis</i> 168ΔclpP	<i>trpC2, clpP⁻</i>	Dr. Ulf Gerth, Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald	(Msadek et al., 1998)
<i>Escherichia coli</i> JM109	<i>endA1 glnV44 thi-1 relA1 gyrA96 recA1 mcrB+ Δ(lac-proAB) e14- [F' traD36 proAB+ lacIq lacZΔM15] hsdR17(rK-mK+)</i>	AiCuris GmbH & Co. KG	(Yanisch-Perron et al., 1985)
<i>Escherichia coli</i> BL21 (DE3)	<i>F- ompT gal dcm lon hsdSB(rB- mB-) λ(DE3 [lacI lacUV5-T7 gene 1 ind1 sam7 nin5])</i>	Hans-Georg Sahl, Friedrich-Wilhelm Universität Bonn	(Studier und Moffatt, 1986)
<i>Escherichia coli</i> SG1146a	<i>clpP⁻</i>	Susan Gottesman, national cancer institute, Bethesda	(Gottesman et al., 1985)
<i>Escherichia coli</i> HB101	<i>F- mcrB mrr hsdS20(rB- mB-) recA13 leuB6 ara- 14 proA2 lacY1 galK2 xyl-5 mtl-1 rpsL20(SmR) glnV44 λ-</i>	Rainer Kalscheuer, HHU	(Boyer und Roulland- Dussoix, 1969)
<i>Escherichia coli</i> XL1 blue	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F' proAB lacIqZΔM15 Tn10 (Tetr)]</i>	Agilent GmbH	
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC29212		AiCuris GmbH & Co. KG	
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC29213		AiCuris GmbH & Co. KG	
<i>Mycobacterium</i> <i>abscessus</i>		Eric Rubin, Harvard University	
<i>Mycobacterium bovis</i> BCG Pasteur		Rainer Kalscheuer, HHU	
<i>Mycobacterium bovis</i>		diese Arbeit	

BCG Pasteur <i>clpP1-tetoff</i>			
<i>Mycobacterium smegmatis</i> mc ² 155		Rainer Kalscheuer, HHU	
<i>Mycobakterium tuberculosis</i> H37Rv		Rainer Kalscheuer, HHU	
J744.A1 murine Makrophagen		AiCuris GmbH & Co. KG	

2.7. Vektoren

pClpP BS	Kursad Turgay, Uni Hannover
pET-FtsZ BS	Peter Sass, HHU
pET-FtsZ BCG	Peter Sass, HHU
pET-301 SA ClpP	Stefan Sieber, TU München
pET-SA ClpP H82F	diese Arbeit
pET-SA ClpP Q88S	diese Arbeit
pET-SA ClpP M189L	diese Arbeit
phAE159	Rainer Kalscheuer, HHU
pTetOR-MTB ClpP1	Alfred Goldbegg, Harvard
pTetOR-MTB ClpP2	Alfred Goldberg, Harvard
pKnockin ClpP1MB 4xTetO	diese Arbeit
pMV261	Rainer Kalscheuer, HHU
pTetR-D	Rainer Kalscheuer, HHU,
pTetR-E	Rainer Kalscheuer, HHU
pTetR-F	Rainer Kalscheuer, HHU
pTetR-G	Rainer Kalscheuer, HHU
prevTetR-A	Rainer Kalscheuer, HHU
prevTetR-B	Rainer Kalscheuer, HHU
prevTetR-C	Rainer Kalscheuer, HHU
prevTetR-D	Rainer Kalscheuer, HHU
prevTetR-E	Rainer Kalscheuer, HHU
prevTetR-F	Rainer Kalscheuer, HHU
prevTetR-G	Rainer Kalscheuer, HHU

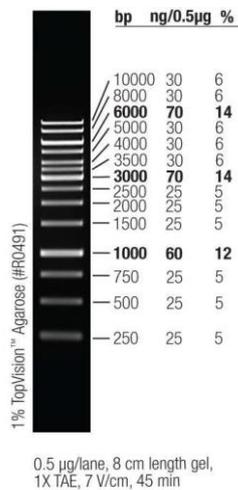
2.8. Primer

ClpP1BCG_F1_fwd_Van91I	TTTTTTTCCATAAATTGGAGCCCGGTTCAATGAGTTGC
ClpP1BCG_F1_rev_Van91I	TTTTTTTCCATTTCTTGGTCAGGGGCACCTGCTTTCC
ClpP1BCG_F2_fwd_BstAPI	TTTTTTTGCATAGATTGCATGAGCCAAGTGACTGACATGC
ClpP1BCG_F2_rev_BstAPI	TTTTTTTGCATCTTTTGCCGAAACCGTATTCCAGGG
qclpP1-fwd	TGAGCCAAGTGACTGACAT
qclpP1-rev	GATGTAGAGGCTGATGTCCT
q16s-fwd	AAGTCGAACGGAAAGGTCTCT (Nde <i>et al.</i> , 2011)
q16s-rev	AAGACATGCATCCCGTGGTCCTAT (Nde <i>et al.</i> , 2011)

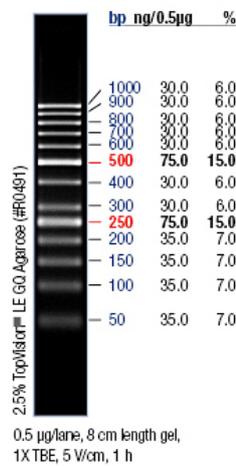
clpP1 BCG-fwd	ACGAAGCGACAACGTGAC
clpP2 BCG-rev	TTAGCGTCACGCCTTATGG
ClpP_SA_H82F_fwd	GATACAATTCATTAACCTGATGTTC
ClpP_SA_H82F_rev	GAACATCAGGTTTAATGAATTGAATTGTATC
ClpP_SA_Q88S_fwd	CATTAACCTGATGTTTCAACAATTTGTATCG
ClpP_SA_Q88S_rev	CCATACCGATACAAATTGTTGTAACATCAGG
ClpP_SA_M189L_fwd	CTTAATTGATGAAGGTGCTGGTACCTGAAAC
ClpP_SA_M189L_rev	GTTTCAGGTACCAGCACTTCATCAATTAAGC

2.9. Marker

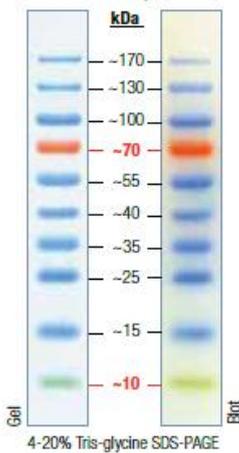
GeneRuler 1kb DNA ladder
(Thermo Scientific)



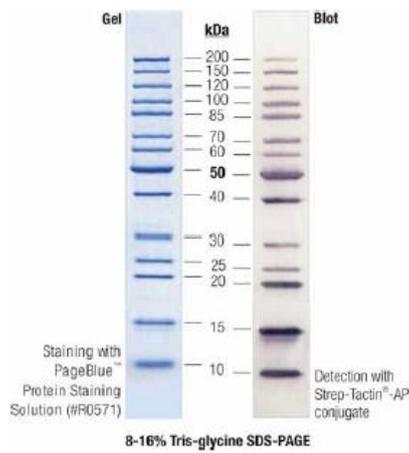
GeneRuler 50 bp DNA Ladder
(Thermo Scientific)



PAGEruler Prestained Protein Ladder
(Thermo Scientific)



PAGEruler Unstained protein ladder
(Thermo Scientific)



native marker
(Serva)



Abbildung 11: In dieser Arbeit verwendete Marker zur Abschätzung von Größe und Konzentration von DNA oder Proteinen.

2.10. Säulen

Tabelle 2: In dieser Arbeit verwendete Säulen.

Säule	Läng; Breite [mm]	Trennprinzip	Hersteller
Column protection system Vorsäulenhalter			Macherey-Nagel
EC 4/3 Nucleodur C18, 5 µm Vorsäule	4; 3	Reverse phase	Macherey-Nagel
EC 250/3 Nucleodur C18 HTec, 5 µm	250; 3	Reverse phase	Macherey-Nagel
VP 250/10 Nucleodur C18 HTec, 5 µm	250; 10	Reverse phase	Macherey-Nagel
100-3 C18 (100 × 2,5 mm) mit integrierter Vorsäule gefüllt mit Eurosphere	100; 2,5	Reverse phase	Knauer
Superdex 200 10/300	300; 10	Analytische Größenausschlusschromatographie	GE Healthcare
Superdex 200 16/600	600; 16	Präperative Größenausschlusschromatographie	GE Healthcare
StrepTrap HP 1 ml		Affinitätschromatographie	GE Healthcare

2.11. Geräte

Agarose Gelelektrophorese Apparatur	PeqLab
Äkta purifier Chromatographieanlage (Niederdruck)	GE Healthcare
Cleanbench Sicherheitswerkbank	Kojair
Cleanbench safe2020 Sicherheitswerkbank	Thermo Scientific
CO 8000 cell density meter	WPA biowave
CO ₂ Inkubator APT. line C150	Binder
CO ₂ Inkubator	Memmert
Mikro pulser Elektroporationsapparat	Biorad
Externe Mikroskoplampe HBO 100	Zeiss
Analysenwaage XA105DU, Dual Range	Mettler
Gefriertrocknung LYOVAC GT2/RC6	Steris
Geldoc Geldokumentationssystem	Biorad
Hochleistungszentrifuge Avanti JE	Beckmann Coulter
HPLC 1100er series	Agilent

C Mag HS7 Magnetrührer	IKA
Infinite M200 Mikrotiterplatten reader	Tecan
Inkubationsschrank Celsius 10.0	Memmert
Inversmikroskop AE31	Motic
LC-MS 1100er series	Agilent
Membranvakuumpumpe	Vakubrand
Mikroskop axio scope A1	Zeiss
MikroWelle	Siemens
Milli-Q Wasser Reference System	Merck-Millipore
Multifuge X1R	Thermo Scientific
MxP 3005 Cycler für qPCR	Agilent
NanoDrop 2000c Spectrophotometer	Peqlab
Orbitalschüttler Polymax 1040	Heidolph
Peqpower 300 Spannungsgeber	Peqlab
Peqstar 2x Gradient Thermocycler	Peqlab
pH-Meter seven easy	Mettler Toledo
Power pack Spannungsgeber	Biorad
Precellys 24 Homogenisator	Peqlab
Schüttelinkubator ecotron	Infors
Schüttelwasserbad 1083	GFL
Schüttler celltron	Infors
Scout Pro Waage	Haus
SDS-PAGE Apparatur	Biorad
SDS-PAGE Apparatur	Invitrogen
Spectramax M5 Mikrotiterplatten reader	Molecular Devices
Thermomixer comfort	Eppendorf
Tischzentrifuge 5414R	Eppendorf
Tischzentrifuge 5418	Eppendorf
Tischzentrifuge Ministar	VWR
TissueLyser LT Homogenisator	Qiagen
Vortex REAX 2000	Heidolph
Wasserbad WNB 7	Memmert

2.12. Programme

Tabelle 3: In dieser Arbeit verwendete Software.

Programm	Anwendung	Firma
ALOGPS 2.1	Berechnung von logP	Virtual Computational Chemistry Laboratory (VCCL)
Chem station	HPLC Auswertung	Agilent
Chromas 2	DNA Sequenzauswertung	Technelysiam
Clone Manager suite 7	DNA Sequenzauswertung	Sci-Ed software
GraphPad Prism 6	Erstellung von Graphen;	GraphPad Software, Inc.

	Berechnung von Enzymkinetiken	
Icontrol	Mikrotiterplattenassays	Tecan
Imige Lab 3.0.1	Geldokumentation	Biorad
imige plus 2.0	Inversmikroskopie	Motic
Mx 3005 P TM	qPCR	Agilent
mycpermcheck	Kalkulation der Aufnahmewahrscheinlichkeit von Substanzen in die mykobakterielle Zelle	Sottriffer Labor, Julius-Maximilians Universität Würzburg
pyMOL	Darstellung von 3D Strukturen	Schrödinger
Qikprop	Konvertieren in 3D Strukturen	Schrödinger
Reference Manager 12	Bibliographiemanagement	Thomson Reuters
Symyx Draw 3.2	Zeichnung von 2D Strukturen	Symyx Technologies
Unicorn 5.31	Größenausschlusschromatographie	GE Healthcare
Xcalibur V6.0	LC-MS Auswertung	Thermo Scientific
ZEN	Phasenkontrast- und Fluoreszenzmikroskopie	Zeiss

2.13. Medien

LB Medium:

Folgende Substanzen wurden eingewogen, in Milli-Q Wasser gelöst und autoklaviert:

- Trypton (10g/l)
- Hefeextrakt (5 g/l)
- Natriumchlorid (10 g/l)
- ggf. Agar (15 g/l)

Für den Fall, dass Agar im Medium enthalten war, wurde es auf 50°C temperiert, ggf. Antibiotika als Selektionsmarker hinzugegeben und in Petrischalen gegossen.

SOC-Medium:

Folgende Substanzen wurden eingewogen, in Milli-Q Wasser gelöst und autoklaviert:

- Hefeextrakt 0,5 % (w/v) (5 g/l)
- Trypton 2 % (w/v) (20 g/l)
- Natriumchlorid 10 mM (0,6 g/l)
- Kaliumchlorid 2,5 mM (0,2 g/l)

Zusätzlich wurde eine Lösung aus 1 M MgCl₂ x 6H₂O und 1 M MgSO₄ x 7H₂O getrennt autoklaviert und dem Medium nachträglich 20 mM dieser Lösung und 20 mM Glucose zugesetzt.

ADS (Larsen *et al.*, 2007a):

Folgende Substanzen wurden eingewogen, in Milli-Q Wasser gelöst und durch einen Filter mit 0,22 µm Porengröße sterilfiltriert:

- BSA (50 g/l)
- Glucose (20 g/l)
- Natriumchlorid (8,1 g/l)

Die Lösung konnte bis zu sechs monate lang bei 4 °C gelagert und verwendet werden.

ADS mit 1 g/l BSA:

Folgende Substanzen wurden eingewogen, in Milli-Q Wasser gelöst und durch einen Filter mit 0,22 µm Porengröße sterilfiltriert:

BSA (10 g/l)

Glucose (20 g/l)

Natriumchlorid (8,1 g/l)

Die Lösung konnte bis zu sechs Monate lang bei 4 °C gelagert und verwendet werden.

Middlebrook 7H9:

2,35 g Middlebrook 7H9 Medium (Zusammensetzung: 0,05 g/l Ammonium sulfate, 2,5 g/l Dinatriumphosphat, 1 g/l Monokaliumphosphat, 0,1 g/l Natriumchlorid, 0,05 g/l Magnesium sulfat, 0,0005 g/l Calciumchlorid, 0,001 g/l Zinksulfat, 0,001 g/l Kupfersulfat, 0,04 g/l Eisenaammoniumcitrat, 0,5 g/l L-Glutaminsäure, 0,001 g/l Pyridoxine, 0,0005 g/l Biotin) wurden in 895 ml Milli-Q Wasser gelöst und 5 ml Glycerin hinzugegeben. Nach Autoklavieren für 10 min bei 121 °C wurde das Medium auf 50 °C temperiert und 100 ml temperiertes ADS wurde hinzugegeben. Das fertige Medium kann bis zu drei Monate bei 4 °C gelagert und verwendet werden.

Middlebrook 7H10:

19 g Middlebrook 7H10 Medium wurden in 895 ml Milli-Q Wasser gelöst und 5 ml Glycerin hinzugegeben. Nach Autoklavieren für 10 min bei 121 °C wurde das Medium auf 50 °C temperiert und 50 ml temperiertes ADS sowie 50 ml temperiertes OADC wurde hinzugegeben. Nach erneutem Rühren wurde der Agar in Petrischalen gegossen.

Mineralmedium (Yam *et al.*, 2009):

Folgende Substanzen wurden eingewogen, in Milli-Q Wasser gelöst und durch einen Filter mit 0,22 µm Porengröße sterilfiltriert.

1 g/l Kaliumdihydrogenphosphat

2,5 g/l Dinatriumhydrogenphosphat

0,5 g/l L-Asparagin

50 mg/l Ammoniumeisencitrat

0,5 g/l Magnesiumsulfat-Heptahydrat

0,5 mg/l Kalziumchlorid

0,1 mg/l Zinksulfat

0,05 %, (v/v) Tween 80

0,1 % (v/v) Glycerin

Das Medium konnte bis zu 1 Monat bei 4 °C gelagert und verwendet werden.

Sauton Liquid Medium:

Folgende Substanzen wurden eingewogen, in Milli-Q Wasser gelöst, der pH Wert wurde mit 1 M Salzsäure auf 7,0 eingestellt und das Medium durch einen Filter mit 0,22 µm Porengröße sterilfiltriert.

0,5 g/l Kaliumdihydrogenphosphat

0,5 g/l Magnesiumsulfat

4,0 g/l L-Asparagin

60 ml/l Glycerin

0,05 g/l Ammoniumeisencitrat
2,0 g/l Citronensäure
0,1 ml/l 1 % Zinksulfat
2,5 ml/l 20 % Tween80.

Das Medium kann bis zu sechs Monate bei 4 °C gelagert und verwendet werden.

Mykobakterien Einfriermedium (Larsen *et al.*, 2007a):

0,47 g Middlebrook 7H9 wurden in 90 ml 50 % Glycerin und 10 ml ADS gelöst. Es wurden 250 µl 20 % Tween 80 hinzugegeben und das Medium wurde durch einen Filter mit 0,22 µm Porengröße sterilfiltriert. Das Medium kann bis zu sechs Monate bei 4 °C gelagert und verwendet werden.

Middlebrook top Agar (Larsen *et al.*, 2007b):

Folgende Substanzen wurden eingewogen, in 100 ml Milli-Q Wasser gelöst und 10 min bei 121 °C autoklaviert:

0,47 g Middlebrook 7H9
0,75 g Agar

1 ml sterilfiltrierte 20 % D-Glucose Lösung wurden nach dem autoklavieren hinzugefügt. Das fertige Medium konnte bis zu sechs Monate lang bei Raumtemperatur gelagert und verwendet werden.

Müller-Hinton-Medium:

21 g des Müller-Hinton-Mediums (Zusammensetzung: 2 g/l Rindfleischauflage, 17,5 g/l hydrolysiertes Casein, 1,5 g/l Stärke) wurden abgewogen und in 1 l Milli-Q Wasser gelöst und autoklaviert. Ggf. wurden zuvor 15 g/l Agar hinzugegeben.

DMEM Medium:

DMEM Medium (Zusammensetzung: 200 mg/l CaCl₂ (wasserfrei), 0,1 mg/l Fe(NO₃)₃ x 9 H₂O, 400 mg/l Kaliumchlorid, 97,67 mg/l Magnesiumsulfat, 6400 mg/l Natriumchlorid, 125 mg/l Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat, 3700 mg/l Natriumhydrogencarbonat, 4500 mg/ml D-Glucose, 15 mg/ml Phenolrot, 110 mg/ml Natriumpyruvat, 84 mg/l L-Arginin, 63 mg/l L-Cystin, 584 mg/l L-Glutamin, 30 mg/l Glycin, 42 mg/ml L-Histidin, 105 mg/ml L-Isoleucin, 105 mg/l L-Leucin, 146 mg/l L-Lysin, 30 mg/l L-Methionin, 66 mg/l L-Phenylalanin, 42mg/l L-Serine, 95 mg/l L-Threonin, 16 mg/l L-Tryptophan, 104,33 mg/l L-Tyrosin, 94 mg/l L-Valin, 4 mg/l D-Calciumpantothenat, 4 mg/l Cholinchlorid, 4 mg/l Folsäure, 7,2 mg/l i-Inositol, 4 mg/l Niacinamid, 0,4 mg/l Riboflavin, 4 mg/l Thiamin) wurde für die Zellkultur von der Firma Pan Biotech bezogen und es wurden 1 % Natriumpyruvat, 1 % Glutamin und 10 % fetales Kälberserum hinzugegeben.

DMEM-I Medium:

DMEM Medium wurde von der Firma Pan Biotech bezogen und zur Herstellung des Infektionsmediums wurden 1 % Natriumpyruvat, 1 % Glutamin, 0,5 % icht essentielle Aminosäuren, 0,5 % essentielle Aminosäuren, 1 % 1 M HEPES und 3 % fetales Kälberserum hinzugegeben.

DMEM-Einfriermedium:

DMEM Medium wurde von der Firma Pan bezogen und es wurden 1 % Natriumpyruvat, 1 % Glutamin, 20 % fetales Kälberserum und 10 % DMSO hinzugegeben.

2.14. Puffer und Lösungen

2.14.1. Puffer und Lösungen für molekularbiologische Methoden

50 x TAE Puffer:

Folgende Substanzen wurden eingewogen und in 500 ml Milli-Q Wasser gelöst:

- 2 M Tris base
- 100 mM EDTA

Der Puffer wurde mit konzentrierter Essigsäure auf pH 8,0 eingestellt und mit Milli-Q Wasser auf 1 l aufgefüllt. Zum Gebrauch als 1 x Puffer wurde der 50 x Puffer 1:50 verdünnt.

TE-Puffer:

Folgende Substanzen wurden abgewogen und in Milli-Q Wasser gelöst:

- 10 mM Tris base
- 1 mM EDTA

Der pH-Wert wurde mit 1 M Salzsäure auf 8 eingestellt und der Puffer wurde autoklaviert.

CTAB solution (Larsen *et al.*, 2007b):

Folgende Substanzen wurden abgewogen und in 90 ml Milli-Q Wasser bei 65 °C auf dem Magnetprüher gelöst:

- 4,1 g Natriumchlorid
- 10 g Cetrimid (Hexadecyltrimethylammonium bromid)

20 % Tween 80 (w/V)

20 ml Tween80 wurden mit Milli-Q Wasser auf 100 ml aufgefüllt und bei 65 °C auf dem Magnetprüher gelöst. Anschließend wurde die Lösung durch einen Filter mit 0,22 µm Durchmesser sterilfiltriert. Die Lösung kann bis zu zwei Monate bei 4 °C gelagert und verwendet werden.

50 % Glycerin (w/V)

250 g Glycerin wurden in eine Flasche abgewogen und auf 500 ml mit Milli-Q Wasser aufgefüllt und gelöst. Die Lösung wurde anschließend autoklaviert und bei Raumtemperatur gelagert.

10 % Glycerin (w/V)

10 g Glycerin wurden in eine Flasche abgewogen und auf 100 ml mit Milli-Q Wasser aufgefüllt und gelöst. Die Lösung wurde anschließend durch einen Filter mit 0,22 µm Porendurchmesser sterilfiltriert und konnte bis zu einem Jahr lang bei Raumtemperatur gelagert und verwendet werden.

10 % Glycerin (w/V) mit Tween:

50 g Glycerin wurden in eine Flasche abgewogen, 1,25 ml 20 % Tween80 wurden hinzugegeben und alles auf 500 ml mit Milli-Q Wasser aufgefüllt und gelöst. Die Lösung

wurde anschließend durch einen Filter mit 0,22 µm Durchmesser steriltriert und konnte bis zu einem Jahr lang bei Raumtemperatur gelagert und verwendet werden.

20 % Dextrose (w/V):

20 g D-Glucose wurden in 100 ml Milli-Q Wasser gelöst und die Lösung durch einen Filter mit 0,22 µm Durchmesser steriltriert und konnte bis zu einem Jahr lang bei Raumtemperatur gelagert und verwendet werden.

GTE Lösung (Larsen *et al.*, 2007b):

Folgende Substanzen wurden abgewogen und in Milli-Q Wasser gelöst:

25 mM Tris-HCl

10 mM EDTA

50 mM D-Glucose

Anschließend wurde die Lösung autoklaviert und bis zu ein Jahr lang bei bei Raumtemperatur gelagert und verwendet werden.

GTC Lösung (Larsen *et al.*, 2007b):

Folgende Substanzen wurden abgewogen und in Milli-Q Wasser bei 55 °C auf dem Magnetührer gelöst:

4 M Guanidiniumthiocyanat

0,1 M Tris-HCl, pH 7,5

0,5 % Sarcosin

Die Lösung wurde anschließend steriltriert und konnte bis zu einem Jahr lang bei Raumtemperatur gelagert und verwendet werden.

Mykobakteriophagenpuffer (MP Puffer) (Larsen *et al.*, 2007b):

Folgende Substanzen wurden abgewogen und in Milli-Q Wasser gelöst:

50 mM Tris-HCl, pH 7,6

150 mM Natriumchlorid

10 mM Magnesiumchlorid

2 mM Calciumchlorid

Der Puffer wurde autoklaviert und konnte anschließend bis zu ein Jahr lang bei Raumtemperatur gelagert und verwendet werden.

10 % SDS Lösung:

10 g Natriumdodecylsulfat (SDS) wurden in 100 ml Milli-Q Wasser gelöst. Der pH-Wert wurde mit Natriumhydroxid oder Salzsäure auf 7,2 eingestellt. Die fertige Lösung wurde bis zu ein Jahr lang bei Raumtemperatur gelagert.

Southern Denaturierungspuffer:

Folgende Substanzen wurden abgewogen und in Milli-Q Wasser gelöst:

0,5 M Natriumhydroxid

1,5 M Natriumchlorid

20 x SSC Transferpuffer:

Folgende Substanzen wurden abgewogen und in Milli-Q Wasser gelöst:

3 M Natriumchlorid
0,3 M Natriumcitrat

Der pH-Wert wurde mit konzentrierter Salzsäure auf 7,0 eingestellt und das Volumen mit Milli-Q Wasser auf 1 l aufgefüllt.

Southern Neutralisierungspuffer:

Folgende Substanzen wurden abgewogen und in Milli-Q Wasser gelöst:

0,5 M Tris-HCl, pH7
1,5 M Natriumchlorid

Der pH-Wert wurde mit konzentrierter Salzsäure auf 7,0 eingestellt und das Volumen mit Milli-Q Wasser auf 1 l aufgefüllt.

Southern primärer Waschpuffer :

Folgende Substanzen wurden abgewogen und in Milli-Q Wasser gelöst:

2 M Harnstoff
0,1 % (w/v) SDS
50 mM Natriumphosphatpuffer, pH 7,0
150 mM Natriumchlorid
1 mM Magnesiumchlorid
0,2 % (w/v) blocking reagent (aus dem Amersham gene images AlkPhos direct labelling and detection system)

Der pH-Wert wurde mit konzentrierter Salzsäure auf 7,0 eingestellt und das Volumen mit Milli-Q Wasser auf 1 l aufgefüllt. Der Puffer konnte bis zu 1 Woche bei 4 °C gelagert werden.

Southern sekundärer Waschpuffer (20x):

Folgende Substanzen wurden abgewogen und in Milli-Q Wasser gelöst:

1 M Tris base
2 M Natriumchlorid

Der pH-Wert wurde mit konzentrierter Salzsäure auf 10,0 eingestellt und das Volumen mit Milli-Q Wasser auf 1l aufgefüllt. Der Puffer konnte bis zu 4 Monaten bei 4 °C gelagert werden. Der Puffer wurde vor Benutzung im Verhältnis 1:20 verdünnt und es wurden 2 ml einer 1 M Magnesiumchloridlösung hinzugegeben.

2.14.2. Puffer und Lösungen für proteinbiochemische Methoden

Qia Lysepuffer :

Folgende Substanzen wurden in Milli-Q Wasser gelöst, der pH-Wert wurde mit Natriumhydroxid auf 8,0 eingestellt und der Puffer anschließend autoklaviert.

50 mM Natriumdihydrogenphosphat
300 mM Natriumchlorid
10 mM Imidazol

Qia Waschpuffer :

Folgende Substanzen wurden in Milli-Q Wasser gelöst, der pH-Wert wurde mit Natriumhydroxid auf 8,0 eingestellt und der Puffer anschließend autoklaviert.

50 mM Natriumdihydrogenphosphat
300 mM Natriumchlorid

20 mM Imidazol

Qia Elutionspuffer :

Folgende Substanzen wurden in Milli-Q Wasser gelöst, der pH wurde mit Natriumhydroxid auf 8 eingestellt und der Puffer anschließend autoklaviert.

50 mM Natriumdihydrogenphosphat

300 mM Natriumchlorid

250 mM Imidazol

10 x SDS-Tris-Glycin Puffer :

Folgende Substanzen wurden in 500 ml Milli-Q Wasser gelöst, der pH wurde mit 1 M Natriumhydroxid auf 8,5 eingestellt und der Puffer anschließend autoklaviert.

3 g Tris base

14,4 g Glycin

1 g SDS

Zur Verwendung als 1x Laufpuffer für SDS-PAGEs wurde eine 1:10 Verdünnung hergestellt.

4 x Nativer Probenpuffer:

2 g Saccharose wurden eingewogen und in 2,5 ml 0,5 M Tris mit pH 6,8 gelöst. Es wurden 10 mg Bromphenolblau hinzugegeben und das Volumen auf 5 ml mit Milli-Q Wasser aufgefüllt. Der Probenpuffer wurde bei 4 °C gelagert und konnte im Verhältnis 1:4 eingesetzt werden.

10 x Tris-Glycin Puffer für native PAGE:

Folgende Substanzen wurden in 500 ml Milli-Q Wasser gelöst, der pH-Wert wurde mit 1 M Natriumhydroxid auf 8,5 eingestellt und der Puffer anschließend autoklaviert.

3 g Tris base

14,4 g Glycin

Zur Verwendung als 1 x Laufpuffer für native-PAGEs wurde eine 1:10 Verdünnung hergestellt.

SA Assay Puffer (Gersch *et al.*, 2012) :

Folgende Substanzen wurden in Milli-Q Wasser gelöst, der pH-Wert wurde auf 7,0 eingestellt und der Puffer anschließend autoklaviert.

20 mM HEPES

100 mM Natriumchlorid

10 x BS Activity Puffer (Brötz-Oesterhelt *et al.*, 2005) :

Folgende Substanzen wurden in Milli-Q Wasser gelöst, der pH-Wert wurde auf 8,5 eingestellt und der Puffer anschließend autoklaviert.

500 mM Tris-HCl

250 mM Magnesiumchlorid

1 M Kaliumchlorid

Vor Gebrauch wurden frisch 20 mM DTT hinzugefügt und der Puffer wurde 1:10 verdünnt in die Assays eingesetzt.

MTB Puffer A (Akopian *et al.*, 2012) :

Folgende Substanzen wurden in Milli-Q Wasser gelöst, der pH-Wert wurde auf 7,6 eingestellt und der Puffer anschließend autoklaviert.

50 mM Kaliumphosphat
100 mM Kaliumchlorid
5 mM Magnesiumchlorid
10 % Glycerin

MTB Puffer B (Akopian *et al.*, 2012):

Folgende Substanzen wurden in Milli-Q Wasser gelöst, der pH wurde auf 7,6 eingestellt und der Puffer anschließend autoklaviert.

50 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 7,6
100 mM Kaliumchlorid
5 mM Magnesiumchlorid
5 % Glycerin
0, 25, 50, 100 oder 200 mM Imidazol

MTB Assay Puffer (Akopian *et al.*, 2012):

Folgende Substanzen wurden in Milli-Q Wasser gelöst, der pH wurde auf 7,6 eingestellt und der Puffer anschließend autoklaviert.

50 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7.6
100 mM Kaliumchlorid
5 % Glycerin

Strep binding Puffer :

Folgende Substanzen wurden in 1 l Milli-Q Wasser gelöst, der pH-Wert wurde auf 8,0 eingestellt und der Puffer anschließend autoklaviert.

100 mM Tris-HCl
150 mM Natriumchlorid
1 mM EDTA

Strep Elutionspuffer :

Folgende Substanzen wurden in 1 l Milli-Q Wasser gelöst, der pH-Wert wurde auf 8,0 eingestellt und der Puffer anschließend autoklaviert.

100 mM Tris-HCl
150 mM Natriumchlorid
1 mM EDTA
2,5 mM Desthiobiotin

Transfer Puffer:

Folgende Substanzen wurden eingewogen und in Milli-Q Wasser gelöst :

3 g/l Tris base
14,4 g/l Glycin
150 ml Methanol und 1 ml 10 % SDS wurden hinzugegeben und alles auf 1 l aufgefüllt.

10 x PBS:

Folgende Substanzen wurden in 800 ml Milli-Q Wasser gelöst und der pH-Wert wurde auf 7,6 eingestellt.

80 g Natriumchlorid

2,0 g of Kaliumchlorid

14,4 g of Dinatriumhydrogenphosphat

2,4 g of Kaliumdihydrogenphosphat

Das Volumen wurde auf 1 l aufgefüllt und der Puffer wurde autoklaviert. Zum Gebrauch als 1 x PBS wurde der Puffer 1 :10 verdünnt.

PBST 20 Puffer:

50 ml 10 x PBS wurden direkt vor Gebrauch mit 450 ml Milli-Q Wasser vermischt und 50 µl Tween 20 hinzugegeben.

PBST 80 Puffer:

50 ml 10 x PBS wurden direkt vor Gebrauch mit 450 ml Milli-Q Wasser vermischt und 50 µl Tween 80 hinzugegeben.

2.14.3. Puffer und Lösungen für zellbiologische Methoden

1 x PBS :

Folgende Substanzen wurden in 800 ml Milli-Q Wasser gelöst und der pH-Wert wurde auf 7,4 mit Natriumdicarbonat eingestellt und das Volumen auf 1 l aufgefüllt. Anschließend wurde der Puffer 20 min bei 121 °C autoklaviert.

8 g Natriumchlorid

0,20 g Kaliumchlorid

1,44 g Dinatriumhydrogenphosphat

0,20 g Kaliumdihydrogenphosphat

1M HEPES :

119,15 g HEPES wurden in 400 ml Milli-Q Wasser gelöst, der pH-Wert mit NaOH auf 7,0 eingestellt und das Volumen auf 500 ml aufgefüllt. Anschließend wurde der Puffer durch einen Filter mit 0,2 µm Durchmesser steriltitriert.

Makrophagen-Lysepuffer:

0,05 % SDS wurden in 1 x PBS gelöst und der Puffer wurde anschließend autoklaviert. Vor der Benutzung wurde der Puffer bei 60 °C auf einem Magnetrührer gerührt, bis er wieder vollständig gelöst war.

3. Methoden

3.1. Mikrobiologische Methoden

3.1.1. Kultivierung und Lagerung von Bakterien

Verschiedene *E. coli*, *B. subtilis*, *S. aureus* und *E. faecalis* Stämme wurden auf LB-Agarplatten oder Müller-Hinton-Agarplatten ausgestrichen und bei 37 °C über Nacht inkubiert. Kolonien von diesen Platten konnten in LB-Medium oder Müller-Hinton-Medium bei 37 °C und 200 rpm angezogen werden. Zur Lagerung wurde 1 ml einer solchen Kultur mit 500 µl 50 % Glycerin gemischt und bei -80 °C eingefroren.

M. smegmatis oder *M. abscessum* wurden auf Middlebrook 7H10 Platten ausgestrichen und 2 Tage bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Alternativ konnten diese Stämme in Middlebrook 7H9 oder Mineralmedium (Yam *et al.*, 2009) bei 37 °C und 80 rpm für 2 Tage angezogen werden. Zur Lagerung wurde 1 ml einer solchen Kultur mit 500 µl 50% Glycerin gemischt und bei -80 °C eingefroren.

M. bovis BCG, ein Stamm der zur Gruppe der langsam wachsenden Mykobakterien gehört, wurde auf Middlebrook 7H10 Platten ausgestrichen und 3 – 4 Wochen bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Alternativ wurden diese Stämme in Middlebrook 7H9 oder Mineralmedium (Yam *et al.*, 2009) bei 37 °C und 80 rpm für 7 – 30 Tage in PETG Vierkantflaschen angezogen. Zur Lagerung mussten 10 ml einer dicht bewachsenen Kultur (OD_{600nm} = 0,8 – 1,5) bei 4000 rpm und 4 °C für 10 min abzentrifugiert und das Pellet in 1 ml Mykobakterien Einfriermedium (Larsen *et al.*, 2007a) resuspendiert werden. Diese Kulturen wurden dann bei -80 °C gelagert.

3.1.2. Bestimmung der Minimalen Hemmkonzentration (MHK)

Die Minimalen Hemmkonzentrationen (MHK) von *B. subtilis*, *S. aureus*, *E. faecalis*, *M. smegmatis* und *M. abscessum* wurden analog zu der Microbroth Dilution Methode der CLSI Guidelines durchgeführt. Hierbei wurde aus der Glycerinkultur etwas auf eine Müller-Hinton-Platte ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Von dieser Platte wurden am nächsten Tag mehrere Kolonien in 500 µl einer 0,9 % Natriumchlorid Lösung resuspendiert und die OD_{600nm} dieser Lösung bestimmt. Die Lösung wurde in Müller-Hinton-Medium auf eine OD_{600nm} von 0,1 verdünnt. Je nach Bakterienart geht man bei dieser OD von verschiedenen Zellkonzentrationen, die in „colony forming units“ pro ml (Cfu/ml) angegeben werden, aus (Tab.1). Durch Ausplattieren von Verdünnungen und Zählen der hochgewachsenen Bakterienkolonien wurde diese Annahme bestätigt.

Tabelle 4: Zellkonzentrationen verschiedener Bakterienstämme bei einer OD_{600nm} von 0,1.

Bakterienstamm	Zellkonzentration [Cfu/ml]
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	$6,3 \times 10^7$
<i>B. subtilis</i> 168	2×10^7
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	$1,5 \times 10^8$
<i>M. smegmatis</i> mc ² 155	3×10^8
<i>M. abscessum</i>	3×10^8

Nach weiterer Verdünnung auf 1×10^5 Cfu/ml wurden von der Zellsuspension 50 µl pro Well in eine 96-Well-Platte gegeben, in der zuvor schon in 50 µl Müller-Hinton-Medium eine 1:2 Verdünnungsreihe mit verschiedenen Antibiotika (beginnend mit 64 µg/ml) vorgelegt wurde. Die 96-Well-Platten wurden bei 37 °C inkubiert und nach 18 h wurde ausgelesen bei welcher Konzentration der Antibiotika die Bakterien noch wachsen konnten. Die Minimale Hemmkonzentration entspricht dabei der niedrigsten Antibiotika-Konzentration, bei der mit bloßem Auge kein Wachstum mehr erkennbar ist.

Die MHK von *M. bovis* BCG Pasteur wurde bestimmt, indem eine Vorkultur aus 100 µl einer Glycerinkultur in 10 ml Minimalmedium (Yam *et al.*, 2009) oder Middlebrook 7H9 Medium angeimpft und diese 6 - 10 Tage lang bei 37 °C und 80 rpm inkubiert wurde. Die OD_{600nm} dieser Kultur wurde bestimmt. Bei einer OD_{600nm} von 1 wird von einer Zellkonzentration von 3×10^8 Cfu/ml in der Lösung ausgegangen. Die Kultur wurde auf 2×10^6 , 2×10^5 oder 1×10^5 Cfu/ml verdünnt. Von dieser Lösung wurden 50 µl pro Well zu einer 96-Well Platte gegeben, in die zuvor schon 50 µl Medium und 0,64 µl einer zuvor in DMSO angefertigten Verdünnungsreihe der Antibiotika vorgelegt wurde. Hierbei wurde mit einer Konzentration von 64 µg/ml gestartet. Die 96-Well-Platten wurden bei 37 °C und 5 % CO₂ 9 Tage lang inkubiert. Anschließend erfolgte zum Auswerten ein Alamar Blue assay, indem in alle Wells 10 µl einer Resazurin Lösung [100 ng/ml] hinzugegeben und die Platten einen weiteren Tag bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert wurden. Resazurin wird in Anwesenheit von lebenden Zellen, aufgrund des zur Verfügung stehenden NADH⁺ im Zuge einer Redox-Reaktion zu Resorufin umgesetzt. Diese Stoffwechselaktivität lässt sich durch den Farbumschlag von blau zu pink auslesen. Außerdem kann die Fluoreszenz bei 560 nm Extinktion und 600 nm Emmision im 96-Well plate reader gemessen werden. Da Resorufin im Gegensatz zu Resazurin bei diesen Wellenlängen fluoresziert, konnten die Fluoreszenzdaten als Indikator für die Lebendigkeit der Zellen und somit für das Auslesen der MHK genutzt werden.

3.1.3. Messung von Wachstumskurven

Für die Messung von Wachstumskurven von *M. bovis* BCG wurde zunächst eine Vorkultur aus 100 µl einer Glycerinkultur in 10 ml Minimalmedium (Yam *et al.*, 2009), welches ggf. 50 µg/ml Hygromycin B und 10 µg/ml Kanamycin als Selektionsantibiotika enthielt, angeimpft und 6 - 10 Tage lang bei 37°C und 80 rpm inkubiert. Die OD_{600nm} dieser Kultur wurde bestimmt. Es wird davon ausgegangen, dass eine OD_{600nm} von 1 einer Zellkonzentration von

3×10^8 Cfu/ml entspricht. Die Kultur wurde auf 1×10^5 Cfu/ml verdünnt. Es wurden verschiedene Konzentrationen von Anhydrotetrazyklin und/oder ADEP2 hinzugefügt. Für die Klone des Stammes *M. bovis* BCG *clpP1-tetoff* wurden außerdem wieder 50 µg/ml Hygromycin B und 10 µg/ml Kanamycin als Selektionsantibiotika hinzugefügt. Die Kulturen wurden bei 37 °C und 80 rpm inkubiert und zu verschiedenen Zeitpunkten wurde je eine Probe von 30 – 130 µl entnommen. Von den Proben wurden 1:10 Verdünnungsreihen hergestellt. Von der unverdünnten Probe und den Verdünnungen wurden je 10 µl auf eine halbe Middlebrook 7H10 Agarplatte ausplattiert. Die Agarplatten wurden 3 – 4 Wochen bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert und die Kolonien anschließend gezählt. Aus der Zahl der Kolonien konnten die Cfu/ml zum Probenzeitpunkt berechnet werden.

3.1.4. Bestimmung der spontanen Resistenzrate von *M. bovis* BCG gegen ADEP2

Um die spontane Resistenzrate von *M. bovis* BCG gegen ADEP2 zu bestimmen, wurden 7H10 Agarplatten mit geringerer BSA Konzentration (1 g/l) und 64 µg/ml ADEP2 hergestellt. Eine *M. bovis* BCG Kultur wurde wie oben beschrieben bis zu einer OD_{600nm} von 0,8 angezogen. Die Zellen wurden auf die Konzentrationen 10^7 , 10^6 , 10^5 und 10^4 Cfu/ml verdünnt, wobei davon ausgegangen wurde, dass eine OD_{600nm} von 1 einer Zellkonzentration von 3×10^8 Cfu/ml entspricht. Von den Verdünnungen wurden je 100 µl auf eine halbe ADEP-haltige und vergleichsweise auf eine halbe 7H10 Agarplatte mit 1 g/l BSA aber ohne ADEP aufgebracht. Die Agarplatten wurden drei Wochen lang bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert und die gewachsenen Kolonien der niedrigsten Zellkonzentration wurden gezählt um die spontane Resistenzrate zu bestimmen.

3.2. Molekularbiologische Methoden

3.2.1. Gelelektrophorese

Durch Einwaage von Agarose, Zugabe von TAE-Puffer und Aufkochen in der Mikrowelle wurden 1 %ige oder 3 %ige Agarosegele hergestellt und in eine Gelelektrophoresekammer gegossen. Nach dem Erhärten des Gels konnten Proben in die dafür vorgesehenen Geltaschen geladen werden. Das Gel wurde bei 100 – 120 V 1 -2 Stunden lang laufen gelassen. Anschließend wurde das Gel 20 – 30 Minuten in einem Ethidiumbromidbad gefärbt. Das Sichtbarmachen der Proben erfolgte durch Belichtung mit UV-Licht in einer Geldokumentationsanlage. Hierbei wird Absorption von Ethidiumbromid, welches in der DNA interkaliert, ausgenutzt.

Durch zusätzliches Auftragen von verschiedenen Markern (Abb. 11) war es möglich die Fragmentgröße und die Konzentration des Fragments in etwa bestimmt werden.

3.2.2. Isolation von DNA aus Mykobakterien

Genomische DNA aus *M. bovis* BCG wurde nach der CTAB-Lysozym Methode isoliert (Larsen *et al.*, 2007b). Hierbei wurden 10 ml *M. bovis* BCG Kultur mit einer OD_{600nm} von 0,8 – 2 für 10

min bei 4000 rpm abzentrifugiert und das Bakterienpellet in 450 µl GTE Lösung resuspendiert. Es wurden 50 µl Lysozym Lösung [10 mg/ml] hinzugefügt und über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert um die Zellen aufzuschließen. Es wurde eine 2:1 Lösung aus einer 10 % SDS-Lösung und einer Proteinase K Lösung [10 mg/ml] hergestellt. 150 µl dieser Lösung wurden zu den aufgeschlossenen Zellen hinzugefügt und für 40 min bei 55 °C inkubiert. Anschließend wurden 200 µl einer 5 M Natriumchlorid Lösung hinzugegeben und alles gut gemischt. Die CTAB Lösung wurde auf 65 °C vorgeheizt und 160 µl zu den Zellen gegeben. Der gesamte Ansatz wurde 10 min bei 65 °C inkubiert. Dann wurde 1 ml einer 24:1 Chlorophorm/Isoamylalkohol Lösung hinzugegeben und vermischt. Die Phasentrennung erfolgte durch 5 minütiges Zentrifugieren bei 13000 rpm. Die obere wässrige Phase, die die DNA enthielt, wurde in ein frisches Reaktionsgefäß überführt. Die Extraktion wurde unter gleichen Bedingungen wiederholt. Zu der neu gewonnenen wässrigen Phase wurde dann das 0,7 fache Volumen Isopropanol hinzugegeben, um die DNA auszufällen. Das Präzipitat wurde durch 10 minütige Zentrifugation bei 13000 rpm pelletiert und der Überstand verworfen. Das DNA Pellet wurde anschließend mit 1 ml 70 % Ethanol gewaschen und die Zentrifugation wiederholt. Das DNA Pellet wurde dann 15 min bei Raumtemperatur getrocknet und zuletzt in 50 µl TE Puffer, dem zuvor 1 µg/ml RNase zugesetzt wurde, gelöst. Die Konzentration der gewonnen DNA wurde am Nano Drop gemessen und die DNA Probe bei -20 °C gelagert werden.

3.2.3. Isolation von DNA aus anderen Bakterien

Die Isolation von Plasmiden aus *E. coli* erfolgte mit dem innuPREP Plasmid Miniprep Kit von Analytik Jena nach Angaben des Herstellerprotokolls. Die Isolation genomischer DNA aus verschiedenen Grampositiven Bakterien erfolgte mit dem innuPREP bacteria DNA Kit von Analytik Jena nach Angaben des Herstellerprotokolls, mit der Abweichung, dass der Schritt zur Lyse der Zellwand ersetzt wurde durch 3 x 15 sec Zellaufschluss im Precellys.

3.2.4. Restriktionsanalyse von DNA

Die Restriktion von isolierter DNA erfolgte durch Zugabe von ausgewählten Restriktionsendonucleasen und entsprechendem Puffer nach folgendem Schema:

17 µl DNA

2 µl Puffer (10x)

1 µl Restriktionsendonuclease

Der Ansatz wurde laut Protokoll des Herstellers, bei 37 °C für eine vorgeschriebene Dauer inkubiert.

Die Restriktion wurde durch Gelelektrophorese überprüft, wobei vorher die theoretisch erwarteten Fragmentgrößen mit Hilfe des Programs Clone manager ermittelt wurden.

3.2.5. PCR

Die Amplifikation bestimmter DNA Bereiche erfolgte über eine Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR=polymerase chain reaction). Eine PCR lässt sich in die Schritte Denaturierung, Annealing und Elongation einteilen. Während der Denaturierung erfolgt die Trennung der doppelsträngigen DNA bei 98 °C. Im anschließenden Annealing-Schritt erfolgt die Anlagerung der Primer an die DNA. Die Annealing-Temperatur ist abhängig von den Schmelztemperaturen der Primer. Zuletzt erfolgt die Elongation, bei der die Polymerase am Template bindet und von den Primern ausgehend komplementäre dNTPs an die einzelsträngige DNA anlagert und zu einem neuen DNA-Strang verknüpft. Dieser Zyklus wird 30 – 40 Mal wiederholt.

In dieser Arbeit wurde die Phusion-Polymerase (mit Proof-reading Funktion) oder Dream-taq Polymerase (ohne Proof-reading Funktion) der Firma Thermo Scientific, sowie die Q5 Polymerase (mit Proof-reading Funktion) der Firma NEB verwendet. Die jeweiligen Konzentrationen sind den Herstellerprotokollen zu entnehmen und variieren bei verschiedenen Polymerasen. Ein Standard PCR Ansatz wurde aus folgenden Bestandteilen zusammengesetzt._

10x Puffer (evtl. extra Puffer für GC reiche Genome im Falle von Mykobakterien)

0,5 – 5 µl Template-DNA (ca. 0,1 – 1 ng)

Je 2,5 µl Primer (forward und reverse) [10 µM]

1 µl dNTP's [100 mM]

0,5 µl hitzestabile Polymerase

evtl. MgCl₂

evtl. DMSO

ad 50 µl Milli-Q Wasser

ein typisches PCR Programm wurde wie folgt inkubiert:

3 min → 98 °C

10 s → 98 °C

30 s → 50 °C – 65 °C

30 s – 2 min → 72 °C

10min → 72 °C

} 30 – 40 x

Hierbei wurde die Annealing Temperatur laut Herstellerprotokoll der verschiedenen Polymerasen an die Schmelztemperatur der jeweiligen Primer angepasst und über Temperaturgradienten optimiert. Die Elongationszeit richtete sich ebenfalls nach Herstellerprotokoll und nach der Länge des zu amplifizierenden DNA Produktes.

3.2.6. Zielgerichtete Mutagenese

Zielgerichtete Mutagenese einiger zusammenhängender Basenpaare erfolgte mit Hilfe des QuickChange Kits von Agilent. Wie im Herstellerprotokoll beschrieben wurden hierfür Primer gelegt, die beide die gewünschte Mutation in der Mitte des Primers tragen. Als Template

wurden Plasmide verwendet, die im Laufe der PCR Reaktion komplett amplifiziert wurden. Im Gegensatz zu den als Template eingesetzten Plasmiden waren die neu synthetisierten Plasmide nicht methyliert. Somit konnte das Ursprungsplasmid im Anschluss mit der Restriktionsendonuclease Dpn1 verdaut werden, wodurch nur noch neue Plasmide vorhanden sein sollen, die alle die gewünschte Mutation tragen. Die Plasmide wurden in ultrakompetente *E. coli* XL10 Zellen laut Herstellerprotokoll transformiert. Aus den gewachsenen Klonen wurden die Plasmide erneut isoliert und die Mutation durch Sanger-Sequenzierung bei der Firma LGC genomics überprüft.

3.2.7. Gelextraktion

Um bestimmte DNA-Fragmente mit bekannter Größe aufzureinigen und von Nebenprodukten zu trennen, wurde die isolierte DNA oder das PCR-Produkt auf ein präparatives 1 %iges-Agarosegel aufgetragen und eine Gelelektrophorese durchgeführt. Das gewünschte Fragment wurde anschließend aus dem Gel ausgeschnitten. Mit Hilfe des Innuprep double pure Kits von Analytik Jena konnte die DNA wieder aus dem Gel isoliert werden.

3.2.8. Dephosphorylierung von Vektoren

Die Dephosphorylierung linearisierter Plasmid-DNA erfolgte mit Hilfe der Fast AP (fast alkaline Phosphatase) nach Protokoll der Firma Thermo Scientific.

X µl	Plasmid-DNA (linearisiert)
1/10 Vol	10 x Dephosphorylierungspuffer
1 µl/µg DNA	Fast AP (1 U/µl)

Die Inkubation erfolgte für 45 min bei 37 °C. Danach wurde die Fast AP durch 15 min Inkubation bei 65 °C inaktiviert.

3.2.9. Ligation

Die Ligation von DNA erfolgte mit Hilfe der T4-Ligase nach Herstellerprotokoll. Das Volumen an DNA, das eingesetzt werden sollte, wurde zunächst mit Hilfe folgender Formel bestimmt:

$$V_{\text{Insert}} = (C_{\text{Vektor}} \times \text{Länge}_{\text{Insert}} \times A) / (\text{Länge}_{\text{Vektor}} \times C_{\text{Insert}} \times B)$$

Das Verhältnis von A/B gibt an, wie viele Moleküle des Inserts auf ein Molekül des Vektors vorhanden sein sollten. Bei der Berechnung war ein dreifacher Überschuss an Insert-DNA zu berücksichtigen. Es wurden folgende Lösungen pro Ansatz verwendet:

X µl	Vektorfragment
Y µl	Insertfragment (3 x Ligationsüberschuss)
2 µl	10 x Ligationspuffer
1 µl	T4 Ligase
ad 20 µl	Milli-Q Wasser (steril)

Der Ligationsansatz wurde bei Raumtemperatur über Nacht inkubiert.

3.2.10. Transformation von *E. coli* über Elektroporation

E. coli ist eine Bakterienart, die nicht über natürliche Kompetenz verfügt. Um Plasmide in *E. coli* transformieren zu können, müssen *E. coli* Zellen zunächst kompetent gemacht werden. Dies erfolgte durch Überimpfen von 500 µl einer Vorkultur in 500 ml LB Medium. Die Kultur wurde bis zu einer OD_{600nm} von 0,5 – 0,8 bei 37 °C und 200 rpm inkubiert. Anschließend wurden die Zellen bei 6000 rpm und 4 °C 15 min lang abzentrifugiert. Die Zellen wurden anschließend in mehreren Schritten, zuerst mit 500 ml, danach mit 250 ml eiskaltem sterilen Wasser und anschließend mit 10 ml 10 % Glycerin gewaschen. Zuletzt wurden die Zellen in 800 µl 10 % Glycerin resuspendiert und in 60 µl aliquotiert. Die Zellen konnten anschließend direkt zur Elektroporation verwendet oder bei -80 °C gelagert werden.

Die eigentliche Transformation erfolgte durch Zugabe von 0,5 - 2 µl Plasmid oder Ligationsansatz zu einem 60 µl Aliquot der kompetenten Zellen. Dieser Ansatz wurde in eine Elektroporationsküvette mit 2 mm Durchmesser überführt und die Elektroporation wurde bei 2,5 V, 1000 Ω und 25 µF im BioRad Elektroporator durchgeführt. Anschließend wurde der Ansatz schnell in 1 ml SOC Medium aufgenommen und zum Regenerieren 1 h bei 37 °C und leichtem Schütteln inkubiert. Zuletzt wurden verschiedene Mengen des Transformationsansatzes auf selektive LB-Agarplatten ausplattiert.

3.2.11. Transformation von Mykobakterien

Transformation von *M. smegmatis* und *M. bovis* BCG erfolgte mittels Elektroporation, nach einer kürzlich beschriebenen Methode (Larsen *et al.*, 2007b). Hierbei wurden 50 ml einer Mykobakterienkultur mit einer OD_{600nm} von 0,8 - 2, 10 min bei 4000 rpm und 4 °C zentrifugiert und das Bakterienpellet zweimal mit 40 ml eiskaltem 10 % Glycerin und 0,05 % Tween 80 gewaschen. Die Zentrifugation wurde wiederholt und die Zellen in 5 ml eiskaltem 10 % Glycerin und 0,05 % Tween80 gelöst. Die Bakterienlösung wurde in 400 µl Aliquots aufgeteilt und je 5 µl des zu transformierenden Plasmides hinzugegeben. Die Mischung wurde 10 min bei Raumtemperatur inkubiert und in 0,2 cm Elektroporationsküvetten mit 2 mm Durchmesser überführt. Die Elektroporation erfolgte bei 2,5 V, 1000 Ω und 25 µF. Die transformierten Ansätze wurden direkt in 1 ml 7H9 Medium aufgenommen, das zuvor auf 37°C vorgewärmt wurde. *M. smegmatis* Zellen wurden anschließend 2h bei 37°C inkubiert und *M. bovis* BCG Ansätze wurden über Nacht bei 37 °C inkubiert. Zuletzt wurden verschiedene Verdünnungen der Ansätze auf 7H10 Agarplatten mit Hygromycin [50 µg/ml] oder Kanamycin [20 µg/ml] als Selektionsantibiotika ausplattiert und Platten von *M. bovis* BCG 4 Wochen bei 37 °C und Platten von *M. smegmatis* 3 Tage bei 37 °C inkubiert. Gewachsene Kolonien konnten darauf hin in Middlebrook 7H9 Medium, welches das entsprechende Selektionsantibiotikum enthielt, angezogen und weiter bearbeitet werden.

3.2.12. Herstellung von Hochtiterphagenlysaten

Für die Herstellung von Phagenlysaten wurde im ersten Schritt ein Plasmid mit dem Plasmid phAE159 über Pac1 Schnittstellen ligiert und in den Klonierungsstamm *E. coli* HB101

transformiert. Nach der Identifizierung des korrekten Phasmides über erneuten Pac1 Verdau und Gelelektrophorese, wurde das Phasmid in *M. smegmatis* mc²155 transformiert. Nach erfolgter Transformation wurden die Agarplatten 3 Tage lang bei 30 °C inkubiert, da es sich um Phagen mit temperatursensitivem ori handelt und somit die Integration ins Genom vergindert wird. Anschließend wurden mit Hilfe von Pipettenspitzen 5 - 10 Plaques von den Agarplatten ausgestochen und in 200 µl MP Medium resuspendiert. Nach 1,5 h Inkubation bei RT wurden 5 µl dieses Phagenlysates mit 300 µl einer dicht bewachsenen Kultur von *M. smegmatis* mc²155 ($OD_{600nm} > 1$) und 3 ml top Agar gemischt und auf 7H10 Agarplatten gegossen. Diese Platten wurden wieder 2 Tage lang bei 30 °C inkubiert und anschließend 10 - 15 Plaques pro Platte ausgestochen und in 5 ml MP Puffer resuspendiert. Das so entstandene Hochtiterphagenlysat wurde über Nacht unter leichtem Schütteln bei RT inkubiert und konnte bis zu 7 Tagen bei 4 °C gelagert werden. Um den Titer des Phagenlysates zu überprüfen, wurden 10 µl einer Verdünnungsreihe der Lösung auf 7H10 Agarplatten aufgetropft, auf die zuvor *M. smegmatis* in Top Agar aufgegossen wurde. Der Titer ist hoch genug für die Verwendung zur Transduktion, wenn nach 2 Tagen Inkubation bei 30 °C mindestens bis zur Verdünnung von 1×10^{-8} noch einzelne Plaques erkennbar sind.

3.2.13. Transduktion von *M. bovis* BCG

Die Transduktion von *M. bovis* BCG mit Mykobakteriophagen erfolgte nach einem Protokoll (Larsen *et al.*, 2007b), angelehnt an die Methode der spezialisierten Transduktion in Mykobakterien (Bardarov *et al.*, 2002).

Hierbei wurden 50 ml einer *M. bovis* BCG Kultur mit einer OD_{600nm} von 0,8 - 1,4 für 15 min bei 4000 rpm und 4 °C zentrifugiert und das Pellet anschließend mit 50 ml MP Puffer gewaschen. Nach erneutem Abzentrifugieren unter den gleichen Bedingungen, wurden die Zellen in 10 ml MP Puffer resuspendiert. 2 ml der Bakterienlösung wurden mit 2 ml einer zuvor hergestellten Hochtiterphagenlösung vermischt und die Mischung wurde über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurden die transduzierten Zellen 5 min bei 6000 rpm und 4 °C abzentrifugiert und das Zellpellet in 1 ml Middlebrook 7H9 Medium resuspendiert. Von diesem Ansatz wurden 4 x 250 µl auf 7H10 Agarplatten mit 50 µg/ml Hygromycin als Selektionsantibiotikum ausplattiert. Die Platten wurden 4 Wochen bei 37 °C inkubiert und Kolonien anschließend in Middlebrook 7H9 Medium mit 50 µg/ml Hygromycin angezogen.

3.2.14. Southern Blot

Genomische DNA Proben aus *M. bovis* BCG wurden mit Restriktionsenzymen verdaut und die Proben auf ein 1 % Agarosegel aufgetragen. Nach Durchführung der Gelelektrophorese wurde das Gel zunächst 30 min in Southern Denaturierungspuffer inkubiert, dann in H₂O gewaschen und weitere 30 min in Southern Neutralisierungspuffer und anschließend 30 min in 20 x SSC Puffer inkubiert. Das Blotten auf eine Nylonmembran erfolgte mit dem Turboblotter System von Whatman, nach dem Prinzip des Kapillarblots, über Nacht. Anschließend wurde die Membran in 2 x SSC Puffer 5 min lang gewaschen und getrocknet.

Parallel wurden DNA Sonden mittels PCR amplifiziert (F1-ClpP1 und F2-ClpP2) und diese über cross-linking mit dem „Amersham gene images AlkPhos direct labeling and detection system“ an Alkaline Phosphatase gebunden. Diese Sonden wurden mit der DNA auf der Nylonmembran hybridisiert und stringent gewaschen. Mit Hilfe des im Kit enthaltenen CDP Star Reagenzes konnte ein Chemilumineszenz Signal von der Alkalinen Phosphatase an den Stellen erzeugt werden, an denen das DNA Signal sich auf der Membran befindet. Durch Entwicklung eines Filmes kann dieses Signal nachgewiesen und somit die Größe der Bande die *clpP* enthält bestimmt werden.

3.2.15. Konstruktion von *knock-in* Mutanten in *M. bovis* BCG

Knock-in Mutanten wurden in Anlehnung an ein kürzlich veröffentlichtes Protokoll zur Erstellung von *Knock-out* Mutanten hergestellt (Larsen *et al.*, 2007b). Im ersten Schritt wurden zunächst Flanken mittels PCR amplifiziert, die homolog zu den angrenzenden Bereichen sind, in die die Tetrazyklinpromotorkassette eingebracht werden soll. Hierfür wurden die Primerpaare ClpP1BCG_F1_fwd_Van91I und ClpP1BCG_F1_rev_Van91I für die eine Flanke, sowie ClpP1BCG_F2_fwd_BstAPI und ClpP1BCG_F2_rev_BstAPI für die andere Flanke verwendet. Diese Flanken wurden zusammen mit einer synthetisch hergestellten Hygromycinresistenzkassette mit *Pmyc1* Promotor und 4 Tet-Operatoren (*hyg-Pmyc1-4XtetO*) in Cosmide kloniert, die wiederum in Phagen verpackt werden konnten. Als Phagen wurden temperatursensitive Mycobacteriophagen phAE159 (J. Kriakov and W. R. Jacobs, Jr., unveröffentlichte Daten) genutzt. Über Transduktion wurden diese Phagen-Konstrukte, wie oben beschrieben, in *M. bovis* BCG überführt, wo der knock-in über homologe Rekombination erfolgen konnte. Mit Hilfe von Southern Blots wurde nach knock-in Mutanten gescreent. In die so gewonnene knock-in Mutante konnten verschiedene Plasmide zur Expression eines synthetischen Tetrazyklin Repressors, nach dem oben beschriebenen Protokoll transformiert werden. Es wurden Kolonien gezählt und ein Plasmid ausgewählt, welches die beste Regulation zeigte. In diesem Fall handelte es sich um ein Plasmid, welches einen Tetrazyklin Repressor mit reverser Bindeaffinität an Tetrazyklin Operatoren (Klotzsche *et al.*, 2009) exprimiert. Von diesem Stamm wurden 3 Klone isoliert und die *clpP* Regionen wurden erneut über PCR amplifiziert und sequenziert. Der entstandene Stamm wurde *M. bovis* BCG *clpP1-tetoff* genannt. Mit diesem System konnte die Expression von *clpP1* über die Anhydrotetrazyklin Konzentration im Medium reguliert werden. Es kann davon ausgegangen werden, dass mit diesem System außerdem die *clpP2* Expression reguliert wird, da *clpP1* und *clpP2* in einem Operon liegen und bereits veröffentlicht wurde, dass beide Gene tatsächlich kotranskribiert werden (Personne *et al.*, 2013).

3.2.16. Isolation von RNA aus Mykobakterien

Zur Isolation von RNA aus *M. bovis* BCG Pasteur wt oder *M. bovis* BCG *clpP1-tetoff* wurden 8-9 ml für mehrere Tage wie oben beschrieben kultiviert bis die OD_{600nm} bei 0,7 – 1 lag. Die Zellen wurden bei 4000 rpm für 5 min zentrifugiert und das Pellet in 1 ml RNA protect

resuspendiert. Nach Inkubation über Nacht bei Raumtemperatur wurden die Proben erneut bei 4000 rpm und 4 °C für 5 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde bei -80 °C gelagert. Zur Verwendung wurden die Zellen auf Eis aufgetaut, in 1 ml RLT Puffer des RNeasy Kits resuspendiert und 10 µl β-Mercaptoethanol hinzugegeben. Der Zellaufschluss erfolgte im TissueLyser 3 x 1 min lang bei 50 Hz, wobei die Proben dazwischen je 1 min auf Eis inkubiert wurden. Die Aufreinigung der RNA folgte anschließend laut Herstellerprotokoll des Kits, wobei auch der optionale DNaseI Verdau auf der Säule durchgeführt wurde. Die gewonnene RNA wurde mit der Turbo DNase nach Herstellerprotokoll behandelt und anschließend über das NucleoSpin RNA Clean-up Kit XS aufgereinigt. Anschließend folgte eine Quantifizierung der RNA mit dem Nano Drop, sowie eine Qualitätskontrolle durch Auftrag von 2 µl der RNA auf ein 3 %iges Agarosegel.

3.2.17. Synthese von cDNA

Um eine qPCR mit den RNA-Proben durchführen zu können, muss die RNA zunächst in cDNA umgeschrieben werden. Dies erfolgte mit Hilfe des AffinityScript cDNA Synthesis Kit, nach Herstellerprotokoll. Für jede RNA Probe wurde eine cDNA Synthese mit Reverser Transkriptase (RT) und eine ohne (no RT) angesetzt. Die no RT Proben sollten in späteren qPCR Messungen nicht zu einem Signal führen, wenn die RNA nicht durch DNA kontaminiert ist. Pro Ansatz wurden folgende Konzentrationen eingesetzt:

- 0,5 µg RNA
- 3 µl 10x RT random Primers
- ad 17,5 µl RNase freies H₂O

Die Proben wurden zur ersten Anlagerung der Primer an die RNA laut Herstellerprotokoll für 3 min bei 65 °C und anschließend für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Folgende Reagenzien wurden hinzugegeben:

- 2 µl 10 x RT buffer
- 0,8 µl dNTPs
- 0,5 µl RNase blocker
- 1 µl RT oder H₂O in no RT Proben
- Ad 20 µl RNase freies H₂O

Die Proben wurden für die cDNA Synthese unter folgenden Bedingungen im Cycler inkubiert:

- 25 °C für 10 min
- 55 °C für 60 min
- 70 °C für 15 min

Es wurde davon ausgegangen, dass die Umschreibung der RNA in cDNA im Verhältnis 1:1 erfolgt. Die cDNA konnte bei -20 °C gelagert oder direkt in der folgenden qPCR verwendet werden.

3.2.18. qPCR

Die qPCR erfolgte mit Hilfe des Brilliant III Ultra-Fast SYBR Green QPCR Master Mix Kit. Bei SYBR Green handelt es sich um einen Fluoreszenzfarbstoff, welcher an doppelsträngige DNA bindet, wodurch die Fluoreszenz der Probe, nach erfolgreicher Amplifikation ansteigt. Dieser Anstieg der Fluoreszenz kann als quantitativer Nachweis der Menge an mRNA des bestimmten Gens verwendet werden. Als Referenz wurde zusätzlich die Menge der 16s rRNA gemessen.

Als Primerpaare wurden *qclpP1-fwd* und *qclpP1-rev* sowie *q16s-fwd* und *q16s-rev* verwendet. Für jedes Primerpaar wurde folgender Mastermix pro Ansatz hergestellt:

- 10 µl 2xBrilliant SYBR Green QPCR Master Mix
- 1 µl Primer fwd [10 µM]
- 1 µl Primer rev [10µM]
- 0,3 µl ROX Referenzfarbstoff (1:500)
- 5,7 µl RNase freies H₂O

Es wurden pro Ansatz je 18 µl Master Mix zu 2 µl der cDNA in eine 98 Well PCR Platte gegeben. Anschließend wurden die Proben 30 sec bei 150 rpm abzentrifugiert und unter folgenden Bedingungen im qPCR Cyclyer inkubiert:

- 95 °C → 3 min
 - 95 °C → 20 sek
 - 60 °C → 20 sek
- } 40x

Nach jedem Zyklus wurde die Fluoreszenz bestimmt, woraus sich am Ende der PCR der Ct-Wert bestimmen lässt. Dieser gibt an, bei welchem Zyklus sich die Fluoreszenz einer Probe zum ersten Mal signifikant von der Hintergrundfluoreszenz abgehoben hat.

Anschließend wurde zusätzlich eine Schmelzkurve der Produkte durch folgenden Temperaturgradienten bestimmt:

- 95°C → 1 min
- 45°C → 30 sek
- 95°C → 30 sek

Hierbei darf nur ein Peak in der Schmelzkurve vorhanden sein, da es sich ja nur um ein spezifisch entstandenes PCR Produkt handeln darf. Um die Spezifität zusätzlich zu kontrollieren, wurden die Proben anschließend auf ein 3 %iges Agarosegel aufgetragen und eine Gelelektrophorese durchgeführt. Um Kontaminationen von DNA in der RNA auszuschließen wurde überprüft, dass die No RT cDNA Proben kein Signal in der qPCR geben, da nur Einzelsträngige RNA in der Probe vorhanden sein sollte, welche nicht amplifiziert werden kann und somit nicht zu einem Signal führt. Sofern in den no RT Proben kein Signal auftrat, wurden die qPCR Messungen mit allen Proben in Duplikaten durchgeführt.

Die Auswertung erfolgte als relative Quantifizierung nach der $2^{-\Delta\Delta Ct}$ Methode (Livak und Schmittgen, 2001). Zunächst wurden die ΔCt Werte nach folgender Formel berechnet:

$$Ct(\textit{clpP1}) - Ct(\textit{sigA}) = \Delta Ct(\textit{clpP1})$$

Der ΔCt Wert des wt wurde daraufhin vom ΔCt Wert des Stammes *M. bovis* BCG *clpP1-tetoff* abgezogen und aus diesem Wert die Potenz zu 2 gebildet, um die Expression im Stamm *clpP1-tetoff* ins Verhältniss zur Expression im wt zu setzen.

3.3. Proteinbiochemische Methoden

3.3.1. Expression von Proteinen

Zur Expression von Proteinen wurden Zielgene in Expressionsvektoren kloniert und in *E. coli* BL21(DE3) oder *E. coli* SG1146a transformiert. Eine Vorkultur in 20 ml LB Medium mit Selektionsantibiotika wurde über Nacht bei 37 °C und 200 rpm inkubiert. Diese Vorkultur wurde dann in 2 l LB Medium in einem 5 l Kolben mit entsprechenden Selektionsantibiotika überimpft und die Ansätze bei 37 °C und 180 rpm bis zu einer $\text{OD}_{600\text{nm}}$ von 0,3 – 0,6 inkubiert. Beim Erreichen dieser OD wurde je nach Expressionsplasmid mit 1 mM IPTG oder 100 ng/ml Anhydrotetrazyklin (ATc) die Expression des jeweiligen Proteins induziert. Die Expression erfolgte dann während weiterem Inkubieren für 5 h. Anschließend wurden die Zellen bei 8000 rpm und 4 °C 15 min zentrifugiert und das Zellpellet konnte bei -20 °C gelagert werden.

3.3.2. Aufreinigung von His-tag Proteinen

E. coli BL21 (DE3) oder *E. coli* SG1146a Zellen, die das entsprechende Expressionsplasmid tragen, wurden nach der Expression in Lysis Puffer resuspendiert und 10 μl Lysozym [10 mg/ml] wurden hinzugegeben. Die Zellen wurden 30 min auf Eis inkubiert und anschließend mit dem Precellys 3 x 15 sec aufgeschlossen. Das Zelllysat wurde zunächst 15 min bei 8000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Gefäß überführt und das Pellet bei -20 °C gelagert. Der Überstand wurde erneut 1 h bei 10000 rpm zentrifugiert. Um eine Affinitätschromatographie durchzuführen wurde der Überstand dieser Zentrifugation mit 0,5 – 1 ml Ni-NTA Agarose gemischt und 1 h – 16 h bei 4 °C leicht schüttelnd inkubiert. Während dieses Vorgangs binden Histidine und andere metallkomplexierende Gruppen an die in der Matrix enthaltenen Nickel-Ionen. Die Matrix wurde anschließend in eine Säule überführt und der Lysat-Durchlauf aufgesammelt. Die Säule wurde anschließend mit Puffern mit verschiedenen Imidazol Konzentrationen (20 mM, 50 mM, 100 mM, 150 mM, 200 mM) gewaschen und das Protein dadurch eluiert. Die Elution erfolgte hierbei nach dem Prinzip der kompetitiven Verdrängung, da Imidazol mit höherer Affinität an die Nickel-Ionen bindet als der His-tag. Über SDS-PAGE wurde dann überprüft, in welcher Fraktion sich das Protein befand und ob es durch andere Proteine verunreinigt war. Die entsprechenden Fraktionen wurden vereinigt und aliquotiert. Die Lagerung der Proteine erfolgte mit 10 % Glycerin bei -20 °C.

3.3.3. Aufreinigung von StrepII-tag Proteinen

E. coli BL21 (DE3) oder *E. coli* SG1146a Zellen, die das entsprechende Expressionsplasmid tragen, wurden nach der Expression in Lysis Puffer resuspendiert und 10 µl Lysozym [10 mg/ml] wurden hinzugegeben. Die Zellen wurden 30 min auf Eis inkubiert und anschließend mit dem Precellys 3 x 15 sec aufgeschlossen. Das Zelllysate wurde zunächst 15 min bei 8000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Gefäß überführt und das Pellet bei -20 °C gelagert. Der Überstand wurde erneut 1 h bei 10000 rpm zentrifugiert und der neue Überstand wurde durch einen Filter mit 0,4 µm Durchmesser sterilfiltriert.

Eine StrepHP Säule wurde mit 10 ml LM binding buffer equilibriert und der sterilfiltrierte Überstand anschließend mit einer Spritze auf die Säule geladen. Der StrepII-tag des Proteins bindet hierbei an das in der Matrix enthaltene Strep-tactin. Der Lysat-Durchlauf wurde gesammelt. Anschließend wurde die Säule mit 10 ml LM binding buffer gewaschen und der Durchlauf erneut gesammelt. Das Protein wurde dann mit 6 ml LM elution buffer eluiert und der Durchlauf in 12 Fraktionen mit je 500 µl gesammelt. Das Eluieren von der Säule erfolgte nach dem Prinzip, dass das im Elutionspuffer enthaltene Desthiobiotin stärker an die Säulenmatrix bindet, als der StrepII-tag des Proteins und somit das Protein von der Säule verdrängt wird. Mittels SDS-PAGE wurde dann überprüft, in welcher Fraktion sich das Protein befand und ob es frei von anderen verunreinigenden Proteinen war. Die entsprechenden Fraktionen wurden vereinigt und mit Hilfe von Amicon Ultra-4 ml Zentrifugen-Filtereinheiten (10 kDa Ausschlussgröße) aufkonzentriert und in Activity-Puffer umgepuffert. Anschließend wurde eine Größenausschlusschromatographie durchgeführt und der Peak der gewünschten Größe gesammelt und erneut aufkonzentriert. Die Proben wurden aliquotiert und die Lagerung der Proteine erfolgte mit 5 % Glycerin bei -20 °C.

3.3.4. Aktivieren des MTB ClpP1P2 Komplexes

Zum Bilden des mykobakteriellen ClpP1P2 Komplexes wurde MTB ClpP1 und MTB ClpP2 im Verhältnis 1:1 gemischt und 5 mM Z-LL wurden hinzugegeben. Der Ansatz wurde für 4 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert.

3.3.5. Größenausschlusschromatographie

Analytische Größenausschlusschromatographien erfolgten in der Äkta Purifier mit der Superdex 200 10/300 Säule und einer Flussrate von 0,5 ml/min. Präparative Größenausschlusschromatographien erfolgten mit der Superdex 200 16/600 Säule bei einer Flussrate von 0,5 ml/min. Zunächst wurden die Säulen mit 2 Säulenvolumen (cv) des zu verwendenden Laufpuffers equilibriert. Anschließend konnte 1 ml oder 100 µl der Probe über den entsprechenden Probenloop injiziert werden und die Säule mit 1,5 cv des Laufpuffers entleert werden. Bei der präparativen Größenausschlusschromatographie wurden die Fraktionen, in denen mittels Absorptionsmessung bei 280 nm Protein detektiert wurde, gesammelt und bis zur späteren Verwendung bei 4 °C gelagert. Nach wiederholter

Äquilibrierung der Säulen in 1 cv Laufpuffer, wurden die Säulen und das gesamte System zur Lagerung mit 20 % Ethanol gespült.

3.3.6. Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford

Proteinkonzentrationen wurden nach der Bradford Methode bestimmt. Diese Methode beruht auf dem Prinzip, dass der im Bradford Reagenz enthaltene Coomassie Farbstoff Proteine komplexiert, was eine blaue Färbung und eine Verschiebung des Maximums im Absorptionsspektrum von 470 nm auf 595 nm zur Folge hat. Die steigende Absorption bei 595 nm kann photometrisch gemessen und somit relativ quantifiziert werden. Hierzu wurde eine Bradford Gebrauchslösung hergestellt, indem Bradford Reagenz 1:4 mit Wasser gemischt wurde. Eine Standardreihe von BSA wurde in Küvetten angefertigt, indem 1 µl, 2 µl, 5 µl, 10 µl und 20 µl BSA [1 mg/ml] in die Küvette gegeben und diese mit Wasser auf 100 µl aufgefüllt wurde. Darauf wurden 900 µl Bradford Gebrauchslösung gegeben. Die Absorption bei 595 nm wurde in der Küvettenapplikation des Nano Drop gemessen und die Absorption gegen die BSA Konzentration aufgetragen. Durch die Punkte wurde eine Ausgleichgerade gelegt. Die Bradford Messung wurde mit 1 µl, 2 µl oder 5 µl des Proteins wiederholt und die Konzentration konnte durch Vergleich mit der Ausgleichgeraden abgelesen werden.

3.3.7. SDS-PAGE

Mit Hilfe von SDS-PAGE können Proteine ihrer Größe nach aufgetrennt werden. Die Ladung der Proteine wird dabei durch das SDS abgeschirmt und hat somit keinen Einfluss auf das Laufverhalten. Hierfür wurden fertige Gradientengele von Invitrogen oder Thermo Scientific verwendet. Zunächst wurden 6 µl, 9 µl oder 12 µl der Proteinprobe im Verhältnis 1:4 mit SDS Probenpuffer versetzt und 10 min bei 99 °C denaturiert. Anschließend wurden sie auf die SDS-PAGE aufgetragen, in der die Proteine zunächst ein Sammelgel mit 4 % Acrylamid durchlaufen und anschließend die Auftrennung der Proteine im elektrischen Feld nach Größe in einem Gradientengel mit 4 % - 20 % Acrylamid erfolgt. Die Färbung der Proteine im Gel erfolgte anschließend mittels Coomassie Färbung.

3.3.8. Native PAGE

In nativen PAGEs werden Proteine nach ihrer Größe, Ladung und Konformation aufgetrennt. Hierfür wurden fertige Gradientengele von Thermo Scientific verwendet. Zunächst wurden 20 µl im Verhältnis 1:4 mit nativem Probenpuffer versetzt. Anschließend wurden sie auf die PAGE aufgetragen in der zunächst ein Sammelgel mit 4 % Acrylamid durchlaufen werden muss und anschließend die Auftrennung der Proteine im elektrischen Feld in einem Gradientengel mit 4 % - 20 % Acrylamid geschieht. Die Färbung der Proteine im Gel erfolgte anschließend mittels Coomassie Färbung.

3.3.9. Gewinnung von Proteinlysaten aus *M. bovis* BCG

Zur Gewinnung von Proteinlysaten wurde *M. bovis* BCG Pasteur wie oben beschrieben kultiviert bis die OD_{600nm} zwischen 0,7 und 1 lag. Die Zellen wurden dann bei 4000 rpm 10

min abzentrifugiert und das Pellet in 500 µl kaltem PBST80 resuspendiert. Der Aufschluss der Zellen erfolgte anschließend in einem 2 ml Reaktionsgefäß mit 200 µg Glaskugeln (Durchmesser 115 - 212 µm) 3 x 15 sec bei 6500 rpm im Precellys. Die Zelltrümmer wurden abzentrifugiert und der Überstand in ein frisches Gefäß überführt und in 5 % Glycerin bei -20 °C gelagert. Der Proteingehalt des Lysates wurde im Nano Drop durch Absorptionsmessung bei 280 nm bestimmt, wobei davon ausgegangen wurde, dass 1 mg Protein einer Absorption von 1 entspricht. Diese Annahme wurde mit einer BSA Lösung bekannter Konzentration [1 mg/ml] bestätigt. Die Lysate wurden auf die gleiche Konzentration verdünnt und diese nochmals mittels SDS-PAGE und anschließender Coomassie Färbung überprüft. Außerdem konnten die Lysate auf SDS-PAGE aufgetragen werden, die später nicht mit Coomassie gefärbt, sondern für Western Blots verwendet wurden.

3.3.10. Western Blot

Eine SDS-PAGE wurde ungefärbt in Transfer Puffer equilibriert und auf zwei gleich große Stücke Whatman Papier gelegt. Darüber wurde eine gleich große Nitrozellulosemembran und darauf wieder zwei Stücke Whatman Papier gelegt. Papier und Membran wurden zuvor kurz in Transfer Puffer inkubiert. Das zusammengebaute Sandwich wurde in eine Blotting Apparatur gelegt und es erfolgte ein semi-dry Transfer bei einer konstanten Spannung von 50 mA für 90 – 180 min. Danach wurde die Membran in PBST gewaschen und in 25 ml blocking Puffer über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Membran in 10 ml Blocking-Puffer mit 0,5 µl primären anti-ClpP Antikörper oder 5 µl polyklonalem Antiserum gegen MTB FtsZ 1 h inkubiert und anschließend 3 x 10 min in PBST gewaschen. Der Vorgang wurde mit 3 µl anti rabbit IgG als sekundären Antikörper wiederholt. Zuletzt wurde die Membran in ECI Lösung inkubiert und ein Fotofilm in der Dunkelkammer entwickelt.

3.3.11. Bestimmung der Peptidase- und Proteaseaktivität

Zur Bestimmung der Peptidaseaktivität wurden suc-L-Y-AMC, Z-GGL-AMC oder three-generation-peptides als Substrat genutzt. Alle diese Peptide sind über eine Amidbindung an das Fluorophor 7-Amino-4-methylcoumarin (AMC) gekoppelt. Proteolyse durch aktive Peptidasen führt also zu freiem AMC und somit zu einem stärkeren Fluoreszenzsignal bei der gemessenen Wellenlänge als im Fall von gebundenen AMC, da sich das Maximum des Fluoreszenzspektrums verschiebt. Für die Durchführung der Assays wurde 1 µM ClpP verschiedener Bakterienarten in 80 µl Puffer gegeben und 0,1 mM suc-L-Y, 0,1 mM Z-GGL-AMC oder 10 µM three-generation-peptides hinzugefügt. Gegebenenfalls wurden verschiedene Konzentrationen verschiedener ADEP Derivate hinzugegeben. Der Anstieg der Fluoreszenz wurde im Mikrotiterplattenreader bei 380 nm Emission und 460 nm Exikation gemessen.

Die Bestimmung der Proteaseaktivität erfolgte mit FITC-Casein als Substrat. Das relativ ungefaltete Protein Casein ist in diesem Falle mit dem Fluorophor Fluoresceinisothiocyanat (FITC) gelabelt, wobei die Fluoreszenz im intakten Protein stark gequencht ist. Durch

Proteolyse lässt das Quenching nach, da FITC nur noch an Peptide gebunden ist. Für die Durchführung dieser Assays wurde 2 – 6 µg/ml ClpP verschiedener Bakterienarten in 80 µl Puffer mit 4 µg/ml FITC Casein gemischt und gegebenenfalls verschiedene Konzentrationen, verschiedener ADEP Derivate hinzugegeben. Die Zunahme der Fluoreszenz wurde im Mikrotiterplattenreader bei 518 nm Emission und 492 nm Extinktion verfolgt.

Neben den fluoreszenzbasierten Assays, wurden auch ungelabelte Proteine als Substrat genutzt, um die Proteaseaktivität von ClpP zu charakterisieren. Hierzu wurde ebenfalls 2 – 6 µg/ml ClpP von verschiedenen Bakterienarten in 30 µl Puffer gegeben und als Substrat 7,5 µg/ml Casein, 8 µg/ml Tau oder 7,5 µg/ml FtsZ hinzugegeben. Gegebenenfalls wurde außerdem verschiedene Konzentrationen verschiedener ADEP Derivate hinzugegeben. Die Proben wurden 1 – 120 min bei 37 °C inkubiert und die Reaktion durch Zugabe von SDS sample buffer und 10 min Inkubation bei 99 °C gestoppt. Die Proteolyse der Substrate wurde durch SDS-PAGE überprüft.

3.4. Zellbiologische Methoden

3.4.1. Kultivierung und Lagerung von J744.A1 Makrophagen

Zur Anzucht von J744.A1 Makrophagen wurde 1 ml Aliquot der Zellen aufgetaut und in 9 ml DMEM Medium aufgenommen. Zum Verringern der DMSO Konzentration, wurden die Zellen 10 min bei 150 x g zentrifugiert und das Pellet in 25 ml DMEM Medium aufgenommen. Die Zellen wurden in eine Zellkulturflasche überführt und 5 h bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Nach 5 h wurde das Medium durch 25 ml DMEM-I Medium ersetzt und die Zellen weiter bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Alle zwei Tage wurden sie mit PBS gewaschen und in zwei Teile gesplittet.

Zur Lagerung wurde das Medium von den adhären Zellen abgezogen, die Zellen mit PBS gewaschen und anschließend in einer geringeren Menge DMEM Einfriermedium resuspendiert. Aliquots von 1 ml wurden in Cryo-Röhrchen umgefüllt und langsam abgekühlt, bis sie schließlich in flüssigem Stickstoff zur entgültigen Lagerung überführt wurden.

3.4.2. Infektion von J744.A1 Makrophagen mit *M. bovis* BCG

J744.A1 Zellen wurden wie oben beschrieben angezogen. Das Medium wurde abgesaugt, die Zellen mit PBS gewaschen und in 2 ml DMEM-I Medium resuspendiert. 100 µl dieser Zellen wurden mit 100 µl Trypanblau gemischt und die lebenden, nicht blau gefärbten, Zellen wurden unter dem Mikroskop in einer Neubauer Zählkammer gezählt. Der Durchschnitt der vier Großquadrate multipliziert mit 10⁴ entspricht dabei der Zellzahl pro ml in der Probe. Die Zellen wurden auf bestimmte Zellzahlen verdünnt und 200 µl pro Well in eine 96-Well-Platte ausgesäht. Zur Etablierung der Methode wurden 500 Zellen/Well, 1000 Zellen/Well und 10000 Zellen/Well angesetzt. Weitere Versuche wurden mit 1000 Zellen/Well durchgeführt. Die Platten wurden über Nacht bei 37 °C in 5 % CO₂ Atmosphäre inkubiert.

Eine *M. bovis* BCG Kultur wurde in Mineralmedium (Yam *et al.*, 2009) auf eine definierte Zellzahl verdünnt, wobei davon ausgegangen wird, dass eine OD_{600nm} von 1, einer Zellzahl von 3×10^8 Cfu/ml entspricht. Zur Etablierung der Methode wurden Vielfache der infektiösen Dosis (multiples of infection = MOI) von 1:2 und 1:5 verwendet. Spätere Versuche wurden mit einer MOI von 1:2 durchgeführt. Eine weitere 1:10 Verdünnungsreihe der *M. bovis* BCG Kultur wurde angefertigt und auf 7H10 Agarplatten ausplattiert, um die Bakterienkonzentration, die tatsächlich in die Infektion eingesetzt wurde zu überprüfen. 20 µl der verdünnten *M. bovis* BCG Kultur wurde zu 200 µl der J744.A1 Makrophagen in der 96-Well-Platte hinzugegeben und diese wurde 5 h bei 37 °C und 5% CO₂ inkubiert. Anschließend wurden 2 µl Gentamycin [1 mg/ml] in jedes Well hinzugegeben und die Platte weiterhin 1 Tag bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert, um alle extrazellulären Bakterien, die nicht in Makrophagen aufgenommen wurden, zu töten. In einige Wells wurde 2 µl Isoniazid [20 µg/ml] oder 1,76 µl ADEP [20 mg/ml] (für 16 µg/ml Endkonzentration), 1,76 µl ADEP [10mg/ml] (für 8 µg/ml Endkonzentration), 0,88 µl ADEP [10 mg/ml] (für 4 µg/ml Endkonzentration) oder 0,44 µl ADEP [10 mg/ml] (für 2µg/ml Endkonzentration), hinzugefügt. Es wurden hierfür die ADEP-Derivate 2, 3 und 4 verwendet.

Nach 1, 3, 5, 7 und 10 Tagen wurde aus je drei Wells jedes Ansatzes 100 µl Medium abgenommen und 100 µl Lysis-Puffer (0,05 % SDS in PBS Puffer) hinzugegeben. Es wurde 5 min bei RT inkubiert und unter dem Inversmikroskop kontrolliert ob alle Zellen lysiert waren. Von jedem Ansatz wurde eine 1:10 Verdünnungsreihe mit PBS angefertigt und von den Verdünnungen 100 µl auf 7H10 Agarplatten ausplattiert. Die Agarplatten wurden 4 Wochen bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert, anschließend wurden die Kolonien gezählt und die Konzentration der intrazellulären Mykobakterien in Cfu/ml berechnet.

3.4.3. Fluoreszenzmikroskopie

Mit *M. bovis* BCG infizierte Makrophagen wurden durch Auf- und Abpipettieren aus den Wells der 96-Well-Platte gelöst und auf einem sauberen Objektträger 10 min bei 80 °C hitzefixiert. Es wurde eine AuraminO-RhodaminB Färbung mit dem „Fluorescent stain kit for mycobacteria“ laut Herstellerprotokoll durchgeführt, wobei ein zweiter Färbeschritt mit RhodaminB Lösung analog zum AuraminO Färbeschritt eingefügt wurde. Diese Färbung beruht auf dem Prinzip, dass nur säurefeste Bakterien, wie z.B. Mykobakterien, mit diesem Farbstoff auch nach Waschen mit saurem Alkohol gefärbt bleiben. Diese Färbetechnologie findet unter anderem auch in der Diagnostik von Mykobakterien Anwendung. Die Objektträger wurden im Mikroskop mit Phasenkontrast und unter Verwendung von Filtersatz 47HE (für AuraminO) und Filtersatz 43 (für RhodaminB) der Firma Zeiss betrachtet.

3.4.4. Zytotoxizitätsassays

Um die Zytotoxizität von verschiedenen ADEP-Derivaten gegen J744.A1 Makrophagen zu bestimmen, wurde zunächst eine VK wie oben beschrieben angezogen und mindestens fünfmal gesplittet. Die Zellen wurden mit PBS gewaschen und aus mehreren Flaschen in 5 ml

DMEM vereinigt. Mittels einer Neubauer Zählkammer wurde die Zellzahl wie oben beschrieben ermittelt und die Zellen wurden auf 5×10^4 Zellen/ml in DMEM verdünnt. 200 μ l der Zellsuspension wurden in 96-Well-Platten ausgesät, so dass die Zellzahl 1×10^4 Zellen/Well betrug. Parallel wurde eine 1:2 DMSO Verdünnungsreihe der verschiedenen ADEP-Derivate (Startkonzentration 10 mg/ml) und von Cycloheximid (Startkonzentration 0,3125 mg/ml) in einer separaten 96-Well-Platte hergestellt. Aus diesen DMSO Verdünnungen wurden je 0,64 μ l pro Well auf die Zellen gegeben, wodurch sich eine Konzentrationsreihe für ADEPs von 64 μ g/ml – 0,031 μ g/ml und für Cycloheximid von 2 μ g/ml – 0,001 μ g/ml ergab. Die Platten wurden zunächst 48 h bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Anschließend wurden 10 μ l Resazurin [100 μ g/ml] hinzugegeben und die Platten weitere 24 h bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Resazurin wird in Anwesenheit von lebenden Zellen zu Resorufin umgesetzt. Diese Stoffwechselaktivität lässt sich durch den Farbumschlag von Blau zu Pink auslesen. Außerdem wurde die Fluoreszenz bei 560 nm Extinktion und 600 nm Emission im 96-Well-Plate-Reader gemessen. Da Resorufin im Gegensatz zu Resazurin fluoresziert, konnten die Fluoreszenzdaten als Indikator für die Viabilität der Zellen und somit für die Berechnung der IC₅₀ genutzt werden.

3.5. Analytische Methoden

3.5.1. Erstellung von ADEP Eichgeraden mittels HPLC

ADEPs wurden eingewogen, in DMSO gelöst [10 mg/ml] und verschiedene Volumina dieser Lösungen wurden in 200 μ l Mineralmedium (Yam *et al.*, 2009) gegeben. Es wurden 100 μ l dieser Proben in die Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) injiziert. Als stationäre Phase diente eine Umkehrphasen Octadecylsilan-(rp-C18)-Säule (250 \times 3 mm). Als mobile Phase wurde der folgende Methanol-Wasser Gradient mit einer Flussrate von 0,5 ml/min verwendet, wobei beide Lösungsmittel mit 1 % Ameisensäure angesäuert wurden.

<u>Min</u>	<u>MeOH H₂O</u>	
0	0%	100%
5	0%	100%
10	60%	40%
40	100%	0%
50	100%	0%
55	0%	100%
65	0%	100%

Die Detektion erfolgte mit einem Dioden-Array Detektor (DAD) bei 208 nm. Die Flächen der erhaltenen Peaks wurde gegen die ADEP Konzentration aufgetragen und eine Ausgleichsgerade hindurch gelegt. Die erhaltene Geradengleichung konnte zur späteren Bestimmung von unbekanntem ADEP Konzentrationen genutzt werden.

3.5.2. Untersuchung der ADEP Stabilität mittels HPLC

Zur relativen Quantifizierung von ADEPs und zur Detektion von Degradationsprodukten wurde 12,8 μ l ADEP2 oder 3 [10 mg/ml] in 2 ml Mineralmedium (Yam *et al.*, 2009) gegeben

und diese Mischung [64 µg/ml] 10 Tage lang bei 37 °C inkubiert. Alle zwei Tage wurden 250 µl Probe entnommen und 200 µl in die HPLC auf die oben genannte rp c18 Säule injiziert. Das oben beschriebene Programm wurde angewendet und alle Peaks zwischen 15 und 45 min Retentionszeit aufgefangen. Die Proben wurden lyophilisiert, in 200 µl Methanol (HPLC grade) gelöst und mittels LC-MS Messung analysiert.

3.5.3. Semipräparative HPLC zur Isolierung der ADEP3 Komponenten

Um die beiden Komponenten, die in der von der Firma Bayer synthetisierten ADEP3 Probe enthalten waren, voneinander zu trennen, wurden 6 mg ADEP3 in 120 µl Methanol gelöst und 100 µl wurden in die HPLC auf eine Umkehrphasen Octadecylsilan-(rp-C18)-Säule (250 × 10 mm) injiziert. Es wurde das oben beschriebene Programm verwendet und Peaks in 2 ml Reaktionsgefäßen gesammelt, die zuvor bereits im leeren Zustand lyophilisiert worden waren und deren Leergewicht ermittelt wurde. Die gesammelten Fraktionen wurden über Nacht bei -80 °C gekühlt und anschließend lyophilisiert. Von jeder Fraktion wurden zuvor 50 µl abgenommen und separat lyophilisiert. Diese Probe wurde anschließend in Methanol (HPLC grade) gelöst und mittels LC-MS Messung analysiert. Der Rest der Proben wurde nach Lyophilisation gewogen und durch Subtraktion der Reaktionsgefäß-Leergewichte konnte die gewonnene Menge der aufgereinigten Substanz ermittelt werden. Diese wurde in DMSO auf eine Konzentration von 10 mg/ml eingestellt und eine MHK Bestimmung durchgeführt.

3.5.4. LC-MS Messungen

5 - 50 µl der in Methanol resuspendierten Proben wurden mittels HPLC mit einer rp C18 Säule (100 × 2,5 mm) aufgetrennt und mit einem Dioden-Array Detektor detektiert. Die Ionisierung der Proben erfolgte über Elektrospray-ionisation (ESI). Die Massen jedes Peaks wurden in negativer und positiver Ionisierung ausgewertet und mögliche Degradationsprodukte von ADEP2 und 3 mit entsprechender Masse mit dem Programm Symyx dargestellt.

3.6. Bioinformatische Kalkulation der Aufnahmewahrscheinlichkeit von ADEPs in die mykobakterielle Zelle

Um zu kalkulieren mit welcher Wahrscheinlichkeit ADEPs die spezielle mykobakterielle Zellwand passieren und somit in die Mykobakterienzelle eindringen können, wurde das open source online Programm mycpermcheck (Merget *et al.*, 2013) (<http://www.mycpermcheck.aksotriffer.pharmazie.uni-wuerzburg.de/index.html>)

verwendet. Hierfür wurden die Strukturen der verschiedenen ADEP-Derivate zunächst mit dem chemischen Zeichenprogramm Symyx dargestellt und anschließend in einen SMILE file exportiert. Diese Datei wurde mit dem Programm OpenBabel (O'Boyle *et al.*, 2011) zu einem 3D Molekül im mol2 Format konvertiert. Mit Hilfe von Pymol wurde das 3D Model der ADEPs auf Richtigkeit überprüft. Für ADEP7 wurde außerdem exemplarisch direkt die Daten der Kristallstruktur (Hinzen *et al.*, 2006) als pdb Format verwendet. Im Programm Qikprop wurden anschließend verschiedene Eigenschaften der 3D Modelle von ADEP2, 3, 4, 7 und 8

sowie der Kristallstruktur von ADEP7 berechnet und in einer CSV Datei gespeichert, welche schließlich in das mycpermcheck Programm hochgeladen wurde, wo dann die Aufnahmewahrscheinlichkeit in die mykobakterielle Zelle berechnet wurde.

4. Ergebnisse

4.1. Wirksamkeit von ADEPs gegen Mykobakterien

4.1.1. Wirksamkeit gegen verschiedene Mykobakterien außerhalb eukaryontischer Zellen

Um die Wirkung von ADEPs gegen freie Mykobakterien zu testen, wurden MHK Bestimmungen wie oben beschrieben durchgeführt. Es wurde zunächst eine Startkonzentration von 5×10^4 Cfu/ml in dem BSA haltigen Standardmedium, Middlebrook 7H9 sowie in BSA freiem Mineralmedium (Yam *et al.*, 2009) eingesetzt (Tab. 5).

Tabelle 5: MHK-Werte verschiedener ADEP Derivate gegen verschiedene Mykobakterienstämme in Middlebrook 7H9 Medium oder Mineralmedium (Yam *et al.*, 2009).

MHK [$\mu\text{g/ml}$] in 7H9 Medium	ADEP1	ADEP2	ADEP3	ADEP4	ADEP5	ADEP7	ADEP8	Hygro-mycin B	Iso-niazid
<i>M. bovis</i> BCG pasteur	>64	64	32	>64	>64	>64	32	0,25	0,0625
MHK [$\mu\text{g/ml}$] in Mineralmedium	ADEP1	ADEP2	ADEP3	ADEP4	ADEP5	ADEP7	ADEP8	Apra-mycin	Iso-niazid
<i>M. tuberculosis</i> H37Rv	-	32 (16)	32 (16)	>64	-	>64	32	1	-
<i>M. bovis</i> BCG Pasteur	32	16 (8)	16(8)	>64 (16)	32(16)	>64	32	2	0,0625
<i>M. smegmatis</i> mc ² 155	-	64	>64	>64	>64	>64	64	-	2
<i>M. abscessum</i>	-	>64	>64	>64	-	>64	>64	-	-

Es zeigte sich, dass einige der ADEP-Derivate eine moderate Aktivität gegen *M. tuberculosis* und den langsam wachsenden Modellorganismus *M. bovis* BCG aufweisen. Bei einigen Derivaten, wie beispielsweise ADEP4 traten starke Schwankungen innerhalb der verschiedenen Messungen auf. Bei den meisten Ansätzen war ADEP4 inaktiv gegen *M. bovis* BCG, einige Male konnte aber auch ein MHK-Wert von 16 $\mu\text{g/ml}$ bestimmt werden. Worauf diese Schwankungen zurück zu führen sind, konnte in dieser Arbeit nicht geklärt werden. Überraschend war vor allem die Aktivität von ADEP3, einem ADEP Derivat das zuvor als inaktiv gegenüber allen bisher getesteten Grampositiven Bakterien beschrieben worden war (Brötz-Oesterhelt *et al.*, 2005). Gegen den schnell wachsenden Modellorganismus *M. smegmatis* und das schnell wachsende pathogene Bakterium *M. abscessum* waren ADEPs dagegen nur schwach oder gar nicht wirksam. Aus diesem Grund wurden alle weiteren Arbeiten mit *M. bovis* BCG durchgeführt.

Da weiterhin auffiel, dass die MHK-Werte in BSA haltigem 7H9 Medium schlechter ausfallen als in BSA freiem Medium, wurde der Einfluss von BSA und fetalem Kälberserum (FCS) auf die MHK-Werte verschiedener anderer Grampositiver Bakterien getestet (Tab. 6).

Tabelle 6: MHK-Werte von ADEP2 gegen verschiedene Grampositive Bakterien in Abwesenheit und Anwesenheit verschiedener BSA oder FCS Konzentrationen.

MHK [$\mu\text{g/ml}$] von ADEP2 in Müller Hinton Medium	w/o BSA	0,3125 g/l BSA	0,625 g/l BSA	1,25 g/l BSA	2,5 g/l BSA	5 g/l BSA
<i>S. aureus</i> ATCC29213	0,25	0,25	0,25	0,25	0,5	1
<i>B. subtilis</i> 168	0,0625	0,0625	0,0625	0,0625	0,125	0,125

MHK [$\mu\text{g/ml}$] von ADEP2 in Müller Hinton Medium	w/o FCS	0,625 % FCS	1,25 % FCS	2,5 % FCS	5 % FCS	10 % FCS
<i>E. faecalis</i> ATCC29212	<0,03125	<0,03125	<0,03125	0,03125	0,0625	0,125
<i>S. aureus</i> ATCC29213	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
<i>B. subtilis</i> 168	0,125	0,125	0,125	0,125	0,5	0,5

Auch in Bakterien, gegen die ADEP eine deutlich bessere Wirkung hat als gegen Mykobakterien, scheint die Anwesenheit von FCS oder BSA einen negativen Einfluss auf die MHK-Werte zu haben. Bei der höchsten eingesetzten Menge von 10 % FCS sollten etwa 0,25 % BSA im Medium vorhanden sein. Dies entspricht 2,5 g/l direkt eingesetztem BSA. Der Effekt gegen *B. subtilis* ist bei Einsatz dieser Menge an FCS allerdings größer, als bei direktem Einsatz dieser Menge BSA. Sogar nur 5 % FCS (also 0,125 % BSA) reichten aus um die ADEP Wirkung vierfach zu verringern. Es scheint also nicht nur BSA, sondern auch weitere Komponenten im FCS Einfluss auf die Aktivität von ADEP zu haben. Aber auch die in 7H9 Medium normalerweise vorhandene Menge von 5 g/l (also 0,5 %) BSA führt zu einer geringeren ADEP Aktivität gegen *S. aureus* und *B. subtilis*. Aus vorherigen Versuchen der Firma AiCuris war außerdem schon bekannt, dass ADEPs an Albumin und an das in Serum enthaltene $\alpha 1$ -Glycoprotein binden können (unveröffentlichte Daten, H. Brötz-Oesterheld). Die folgenden Versuche mit *M. bovis* BCG wurden daher alle mit BSA freiem Mineralmedium (Yam *et al.*, 2009) durchgeführt.

Da die Wirkung von ADEPs gegen *M. bovis* BCG auch nur im moderaten Bereich lag, wurde untersucht inwiefern die eingesetzte Cfu-Konzentration einen Einfluss auf die MHK-Werte hat (Tab. 7).

Tabelle 7: Einfluss der eingesetzten Cfu-Konzentration auf die MHK-Werte von ADEPs gegen *M. bovis* BCG.

MHK [$\mu\text{g/ml}$] von ADEP2 gegen <i>M. bovis</i> BCG in Mineralmedium	5×10^4 Cfu/ml	1×10^5 Cfu/ml	1×10^6 Cfu/ml
ADEP2	16	64	64
ADEP3	16	16	32
ADEP4	>64	>64	>64
Apramycin	2	2	2

Die besten MHK-Werte ließen sich erzielen, wenn nur 5×10^4 Cfu/ml in den Assay eingesetzt wurden. Es konnte also ein Inoculum-Effekt beobachtet werden, da die eingesetzte Zellkonzentration einen Einfluss auf die Wirkung von ADEPs hat. Weitere Versuche wurden daher mit einer möglichst geringen Cfu-Konzentration durchgeführt.

Zur weiteren Charakterisierung der ADEP-Wirkung gegen *M. bovis* BCG wurden auch Wachstumskurven in Anwesenheit verschiedener ADEP2 Konzentrationen gemessen (Abb. 12).

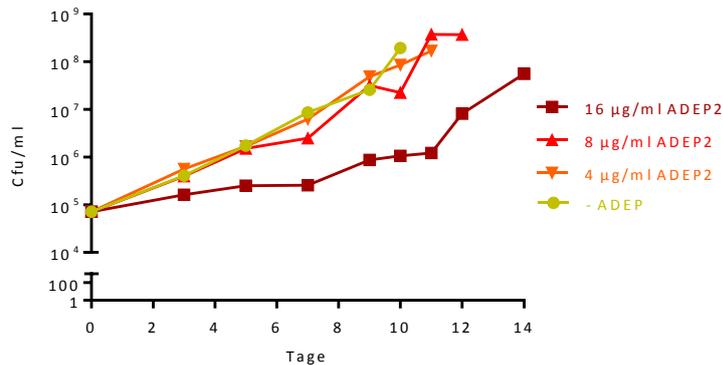


Abbildung 12: Wachstumskurve von *M. bovis* BCG in Anwesenheit verschiedener ADEP2 Konzentrationen.

Während die Anwesenheit von 8 µg/ml ADEP2 nicht ausreichte um eine Inhibierung des Wachstums zu messen, führten 16 µg/ml ADEP2 zu einem deutlichen Wachstumsdefizit von *M. bovis* BCG. Eine bakterizide Wirkung wurde in dieser Konzentration aber nicht erzielt.

Generell liegt die Wirkung von ADEPs gegenüber Mykobakterien in einem moderaten Bereich und ist somit also weitaus schlechter als es zuvor für viele andere Grampositive Bakterien beschrieben wurde. Diese Tatsache könnte beispielsweise an einer schlechteren Aufnahme von ADEPs über die sehr spezielle mykobakterielle Zellwand liegen. Um dieser Fragestellung weiter nachzugehen ohne komplexe Aufnahmestudien durchzuführen, wurde das online-tool mycpermcheck (Merget *et al.*, 2013) verwendet, um die Aufnahmewahrscheinlichkeit von ADEPs in die mykobakterielle Zelle zu kalkulieren. Für alle untersuchten ADEP Derivate wurde dabei eine Aufnahmewahrscheinlichkeit von 0 % berechnet. Dass dieses Ergebnis nicht der Realität entspricht, wurde aber im Rahmen dieser Arbeit bereits gezeigt, da MHK-Werte bestimmt werden konnten und ADEPs somit offensichtlich zumindest in begrenztem Ausmaß in die Zelle gelangen können. Generell ist die Anwendung dieses online-tools kritisch zu betrachten, da das verwendete Modell für Moleküle entwickelt wurde, die kleiner als 400 Da sind, was nicht auf ADEPs zutrifft, die eine Größe von 750 – 800 Da haben.

Eine weitere Möglichkeit, mit der sich die vergleichsweise schwächeren MHK-Werte erklären lassen könnten, kann aber auch die lange Inkubationszeit der Assays sein, die aufgrund des langsamen Wachstums von *M. bovis* BCG zustande kommt. Während zur Bestimmung von MHK Werten gegen die meisten Bakterien, wie zum Beispiel *B. subtilis*, *S. aureus* und *E. faecalis*, nur 18 h Inkubationszeit benötigt wird, müssen die Ansätze zur Bestimmung von

MHK-Werten gegen *M. bovis* BCG unter den hier gewählten Konditionen 10 Tage lang inkubiert werden. Aus diesem Grund wurden MHK Bestimmungen mit *B. subtilis* durchgeführt, nachdem verschiedene ADEP-Derivate 9 Tage lang bei 37 °C vorinkubiert wurden (Tab. 8). Die Assaybedingungen wurden somit angepasst, um der Frage nachzugehen, ob ADEPs über diese lange Inkubationszeit hinweg, im Medium stabil bleiben. Hierbei sollte außerdem überprüft werden, ob die überraschende Wirkung von ADEP3 gegen Mykobakterien eventuell durch ein Degradationsprodukt von ADEP3 und nicht durch das eigentliche ADEP3 zustande kommen könnte, da ADEP3 zuvor als inaktives Stereoisomer von ADEP2 beschrieben wurde (vgl. Abb. 6) (Brötz-Oesterhelt *et al.*, 2005).

Tabelle 8: MHK-Werte von verschiedenen ADEP-Derivaten gegen den Grampositiven Modellorganismus *B. subtilis* ohne Vorinkubation, bzw. nach 9 tägiger Vorinkubation der ADEP-Derivate in Müller-Hinton-Medium.

MHK [$\mu\text{g/ml}$] in Müller-Hinton-Medium	ADEP2	ADEP3	ADEP4	ADEP7	ADEP8
<i>B. subtilis</i> 168 nach 1 Tag	0,0625	>64	0,125	0,25	0,0625
<i>B. subtilis</i> 168 nach 10 Tagen Vorinkubation im Medium	8	>64	1	2	1

Nach 10 tägiger Inkubation von verschiedenen ADEP-Derivaten im Medium wurde auch der MHK-Wert gegen *B. subtilis* deutlich schlechter als es bei direktem Einsatz von ADEPs der Fall war. Die lange Inkubationszeit bei Bestimmung der MHK gegen Mykobakterien kann also durchaus eine mögliche Erklärung dafür sein, dass schlechtere MHK-Werte gegen Mykobakterien ermittelt wurden als gegen andere Bakterien. Dies deutet darauf hin, dass ADEPs im Medium eine begrenzte Stabilität aufweisen. Weiterhin ist zu bemerken, dass ADEP3 unabhängig von der Inkubationszeit inaktiv gegen *B. subtilis* bleibt. Die ungewöhnliche Wirkung von ADEP3 gegen *M. bovis* BCG kann somit nicht mit der längeren Inkubationszeit begründet werden.

4.1.2. Untersuchung der Stabilität von ADEPs im Medium

Zur Untersuchung der Stabilität von ADEPs in wässriger Lösung während der langen Inkubationszeit, welche für die Bestimmung von MHK-Werten bei langsam wachsenden Mykobakterien nötig ist, wurde ADEP unter Assay Bedingungen im Medium inkubiert und täglich eine Probe mittels HPLC analysiert.

Zunächst wurde eine Standardgerade mit bekannten ADEP Mengen erstellt (Abb. 13), um später die Peakflächen der HPLC-Läufe quantifizieren zu können.

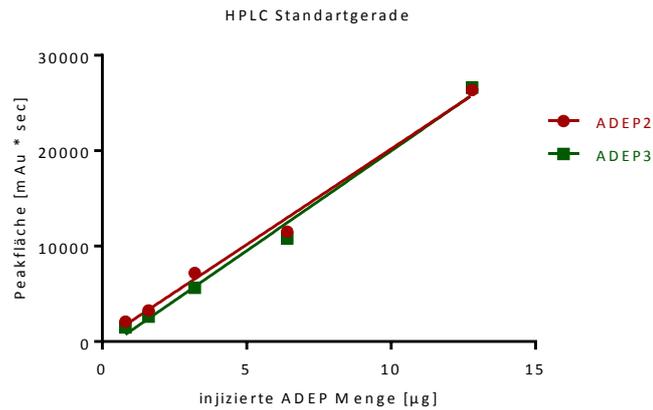


Abbildung 13: Standardgerade der detektierten Peakfläche bei bekannter ADEP Konzentration.

Anhand dieser Standardgerade konnte die ADEP-Konzentration in den Proben berechnet werden. Der Verlauf der ADEP-Konzentration wurde gegen die Inkubationszeit aufgetragen (Abb. 14).

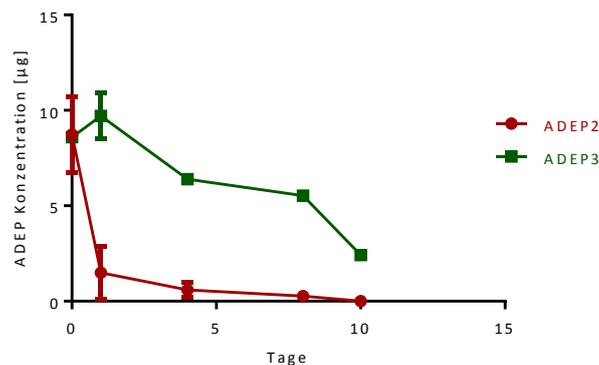


Abbildung 14: Verlauf der ADEP2 und 3 Konzentration bei Inkubation im Medium. Gezeigt sind Mittelwerte und Standardabweichungen von je zwei biologisch unabhängigen Versuchen.

Es wird deutlich, dass insbesondere ADEP2 instabil im Medium ist. Schon nach einem Tag sind nur noch ca. 25 % der eingesetzten ADEP2 Menge mit der HPLC detektierbar. Nach 5 Tagen ist nur noch eine sehr geringe Menge ADEP2 detektierbar und nach 10 Tagen kann ADEP2 nicht mehr nachgewiesen werden. ADEP3 wird im Medium dagegen nur sehr langsam degradiert. Nach einem Tag ist noch die komplette Menge ADEP3 detektierbar, nach 5 Tagen sind immer noch ca. 80 % der eingesetzten Menge an ADEP3 im Medium vorhanden und nach 10 Tagen ist die ADEP3 Menge auf ca. 40 % reduziert. Diese Untersuchungen ergeben, dass ADEP3 im Vergleich zu ADEP2 stabiler ist und dass der verhältnismäßig hohe MHK-Wert gegen langsam wachsende Mykobakterien tatsächlich mit der geringe Stabilität von ADEPs in wässriger Lösung zusammenhängen kann. Neben der Konzentrationsberechnung, wurden auch die HPLC Chromatogramme der verschiedenen Tage übereinandergelegt (Abb.15).

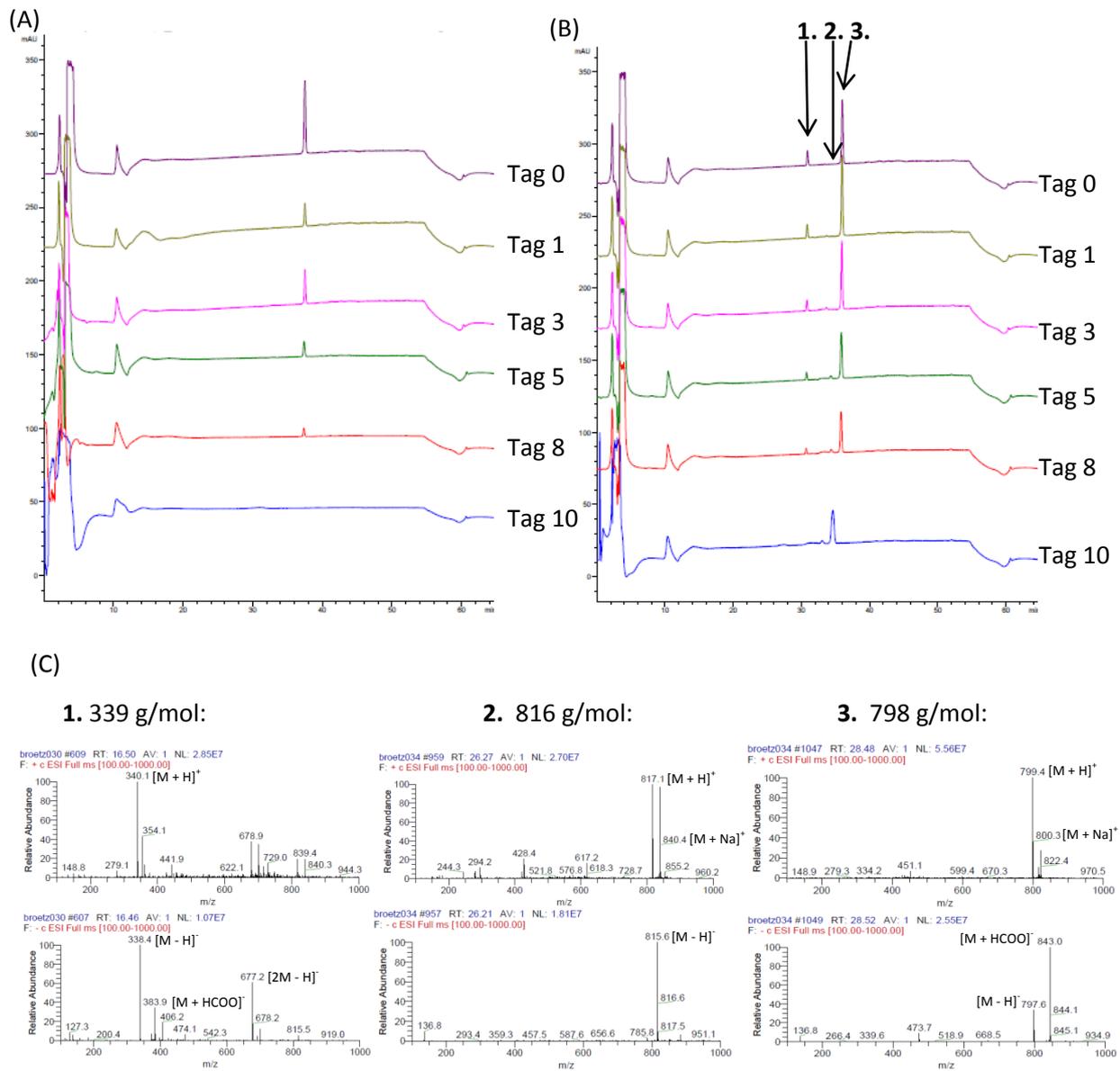


Abbildung 15: HPLC Chromatogramme von ADEP2 (A) und ADEP3 (B) im Medium an verschiedenen Tagen. Aus dem HPLC Lauf der ADEP3 Proben wurden zusätzlich alle Peaks aufgefangen und LC-MS Messungen durchgeführt (C) um die Massen zu bestimmen.

Die Chromatogramme von ADEP2 zeigen einen Substanzpeak von hoher Reinheit, der im Verlauf der Tage deutlich kleiner wird. Um der Frage nach zu gehen, warum ADEP3 gegen Mykobakterien aktiv ist, wurde in den Chromatogrammen nach zusätzlich auftretenden Peaks gesucht, die potentiell aktiven Abbauprodukten entsprechen könnten. Im Chromatogramm von ADEP3 wurden insgesamt drei Peaks detektiert, wobei zwei davon von Beginn an im Pulver vorhanden waren und über die Zeit abgebaut wurden (Retentionszeit 31 min und 37,5 min), wohingegen ein sehr kleiner Peak im Laufe der Zeit auftrat und wieder verschwand (Retentionszeit 36 min). Durch LC-MS Messungen der täglich entnommenen Proben konnte für den prominentesten HPLC-Peak mit der Retentionszeit von 37,5 min (Nr. 3) ein Basispeak von m/z 799,4 $[M + H]^+$ im positiven ESI-Modus und m/z 797,6 $[M - H]^-$ im negativen ESI-Modus detektiert werden. Außerdem traten die pseudomolekulare Ionen von m/z 822,4 $[M + Na]^+$ und von 843,0 $[M + HCOO]^-$ auf. Somit wurde diesem Peak eine Masse

von 798 g/mol zugeordnet, die ADEP3 entspricht. Dem zweiten Peak, der bei einer Retentionszeit von 31 min auftrat (N. 1) und ebenfalls von Beginn an detektiert wurde, konnte eine Masse von 339 g/mol zugeordnet werden, da ein Basispeak von m/z 740,1 $[M + H]^+$ im positiven ESI-Modus und von m/z 738,4 $[M - H]^-$ im negativen ESI-Modus detektiert wurde. Weiterhin traten die beiden pseudomolekularen Peaks von m/z 383,9 $[M + HCOO]^-$ und m/z 677,2 $[2M - H]^-$ auf. Diese Masse könnte der Seitenkette von ADEP3 entsprechen (Abb. 15), und auf eine Verunreinigung des verwendeten ADEP3 Materials durch ein Edukt der chemischen Synthese hindeuten. An Tag 5 und 8 war ein zusätzlicher sehr kleiner Peak bei einer Retentionszeit von 36 min detektierbar, für den mittels LC-MS Messungen ein Basispeak von m/z 817,1 $[M + H]^+$ im positiven ESI-Modus und m/z 815,6 $[M - H]^-$ im negativen ESI-Modus, sowie das pseudomolekulare Ion m/z 840,4 $[M + Na]^+$, detektiert wurden. Dieser Substanz konnte somit eine Masse von 816 g/mol zugewiesen werden. Hierbei könnte es sich um ADEP3 mit geöffnetem Lactonring (Abb. 16) handeln.

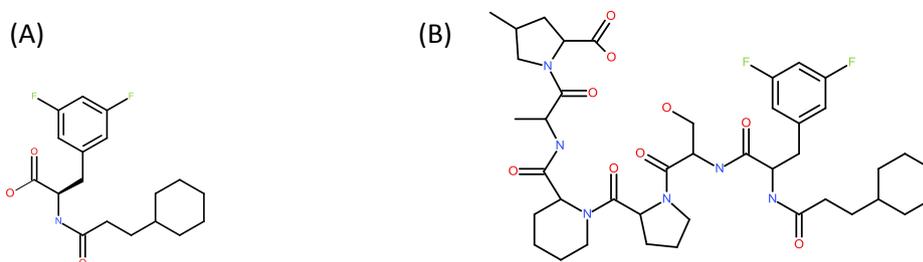


Abbildung 16: Chemische Struktur der ADEP3 Seitenkette (A) und des potentiellen ersten Abbauproduktes von ADEP3. (Zum Vergleich mit den Strukturen von ADEP2 und 3 vgl. Abb. 6).

Dieses Abbauprodukt würde damit dem ersten Schritt der ADEP Degradation im Medium entsprechen. Allerdings wären zur eindeutigen Bestätigung dieser Struktur eindimensionale und zweidimensionale NMR-Analysen notwendig. Beide Produkte wurden ebenfalls in mycpermcheck darauf geprüft, ob sie die mykobakterielle Zellwand theoretisch durchdringen könnten und in beiden Fällen wurde erneut eine Aufnahmewahrscheinlichkeit von 0 % berechnet. Da die Substanz mit der Größe von 339 g/mol 20% der Anfangsprobe von ADEP3 ausmachte, sollte weiterhin geprüft werden, ob diese Substanz für die Wirksamkeit von ADEP3 verantwortlich sein könnte. Hierzu wurden beide Substanzen aus dem ADEP3 Gemisch mittels semipräparativer HPLC isoliert. Bei Einsatz von 5 mg ADEP3 Gemisch wurden 4 mg reines ADEP3 und 1 mg der anderen Substanz aufgereinigt. Die Massen wurden erneut über LC-MS Messungen bestätigt und die Reinheit überprüft (Abb.17).

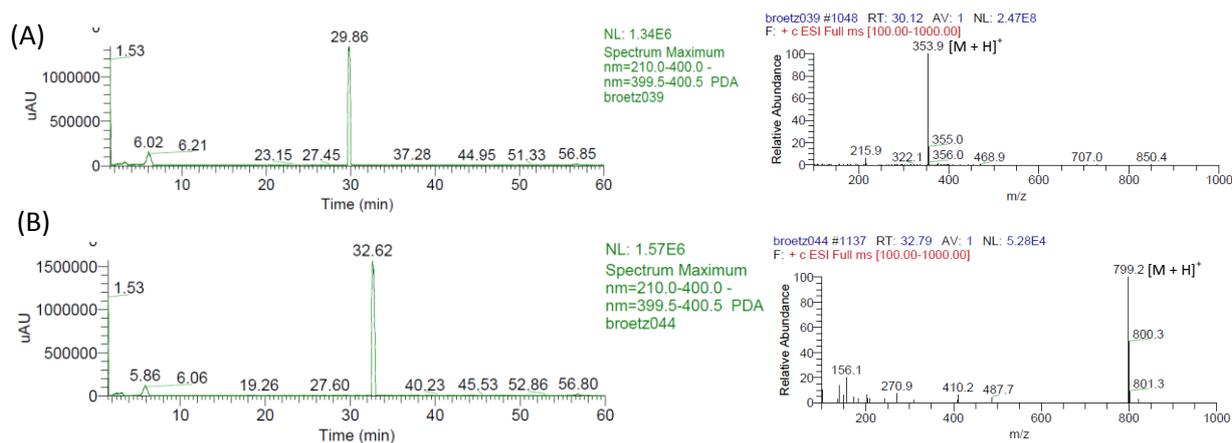


Abbildung 17: UV-Detektion und positive Ionisierung der LC-MS Messungen nach Aufreinigung der zusätzlichen Komponente (A) und ADEP3 (B).

Die Masse des isolierten ADEP3 konnte mit 798 g/mol bestätigt werden, da im positiven ESI-Modus ein Basispeak von m/z 799,4 [M+H]⁺ auftrat. Während in den analytischen HPLC Läufen die Masse der zusätzlichen Komponente im ADEP3 Gemisch immer auf 339 g/mol bestimmt wurde, wurde die Masse dieser Komponente nach Isolation mittels semipräparativen HPLC auf 353 g/mol bestimmt, da im positiven ESI-Modus ein Basispeak von m/z 353,9 [M + H]⁺ auftrat. Eine Möglichkeit diese Veränderung der Masse um 15 amu zu erklären, wäre die Methylierung der ADEP3 Seitenkette (Abb. 15 A) am freien OH der Säuregruppe (Abb. 18).

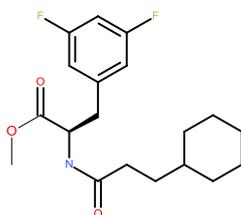


Abbildung 18: Struktur der methylierten ADEP3 Seitenkette, die potentiell der Masse von 353 g/mol entsprechen könnte.

Zu solch einer Methylierung könnte es während der Lyophilisierung in Methanol in Anwesenheit von 0,1 % Ameisensäure gekommen sein. Aber auch diese Struktur lässt sich aufgrund der durchgeführten LC-MS Messungen nur vermuten. Zur definitiven Strukturaufklärung müssten auch in diesem Fall komplexere Studien, wie NMR-Analysen durchgeführt werden. Auf jeden Fall zeigten die aufgereinigten Proben, weder bei UV-Detektion noch im positiven ESI-Modus der LC-MS Messungen weitere Peaks, was für einen hohen Reinheitsgrad der isolierten Substanzen spricht. Für die beiden aufgereinigten Substanzen, sowie für das ursprüngliche ADEP3 Gemisch wurden die MHK-Werte gegen *M. bovis* BCG bestimmt (Tab.9).

Tabelle 9: MHK-Werte von ADEP3 vor und nach Aufreinigung, sowie von der zusätzlichen Komponente in ADEP3 gegen *M. bovis* BCG Pasteur.

MHK [$\mu\text{g/ml}$] in Mineralmedium	ADEP3 Gemisch	ADEP3 gereinigt	ADEP3 "Seitenkette"	Apramycin	Isoniacid
<i>M. bovis</i> BCG Pasteur wt	16	16	>64	2	0,0625

Die Aufreinigung von ADEP3 führte nicht zu niedrigeren MHK-Werten gegen *M. bovis* BCG Pasteur. Dies ist dadurch erklärbar, dass der MHK-Wert zwischen 16 und 8 $\mu\text{g/ml}$ liegt und prozentual berechnet im „gemischten“ ADEP3 immer noch 13 $\mu\text{g/ml}$ ADEP3 und nur 3 $\mu\text{g/ml}$ der anderen Komponente enthalten sein müssen. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die zusätzliche Komponente, die im ADEP3 Gemisch vorhanden war, inaktiv ist. Die Wirkung gegen Mykobakterien ist also definitiv auf ADEP3 und nicht auf die andere Komponente, also die putative ADEP-Seitenkette, zurückzuführen.

4.1.3 Intrazelluläre Wirksamkeit gegen *M. bovis* BCG

Da es sich bei *M. tuberculosis* um ein fakultativ intrazelluläres Pathogen handelt, muss ein gutes Antituberkulotikum auch Mykobakterien abtöten können, welche in Makrophagen persistieren. Da es sich bei *M. bovis* BCG um attenuierte Bakterien handelt, persistieren diese nur in Makrophagen und können sich im Gegensatz zu *M. tuberculosis* nicht darin teilen. Als Modell wurde im Zuge dieser Arbeit eine Infektion der murinen Makrophagen-Zelllinie J774.A1 mit *M. bovis* BCG Pasteur etabliert. Aufgrund des oben beschriebenen Wirkverlusts von ADEPs in BSA-haltigen Medien, wurden die Infektionen in Anwesenheit von nur 3 % FCS durchgeführt. Es wurde zunächst eine Zellzahl ermittelt, bei der die Makrophagen 10 Tage lang in einer 96 Well Platte überlebten. Zwei dadurch ermittelte mögliche Zellkonzentrationen (1×10^3 Zellen/Well und 1×10^4 Zellen/Well) wurden daraufhin mit *M. bovis* BCG in einen Vielfachen der Infektionsdosis (*Multiples of Infection*, MOI) von 1:2 und 1:5 infiziert. Alle zwei Tage wurden Makrophagen lysiert und die Cfu-Werte der Mykobakterien bestimmt, um Persistier- oder Absterbekurven zu erhalten (Abb. 19).

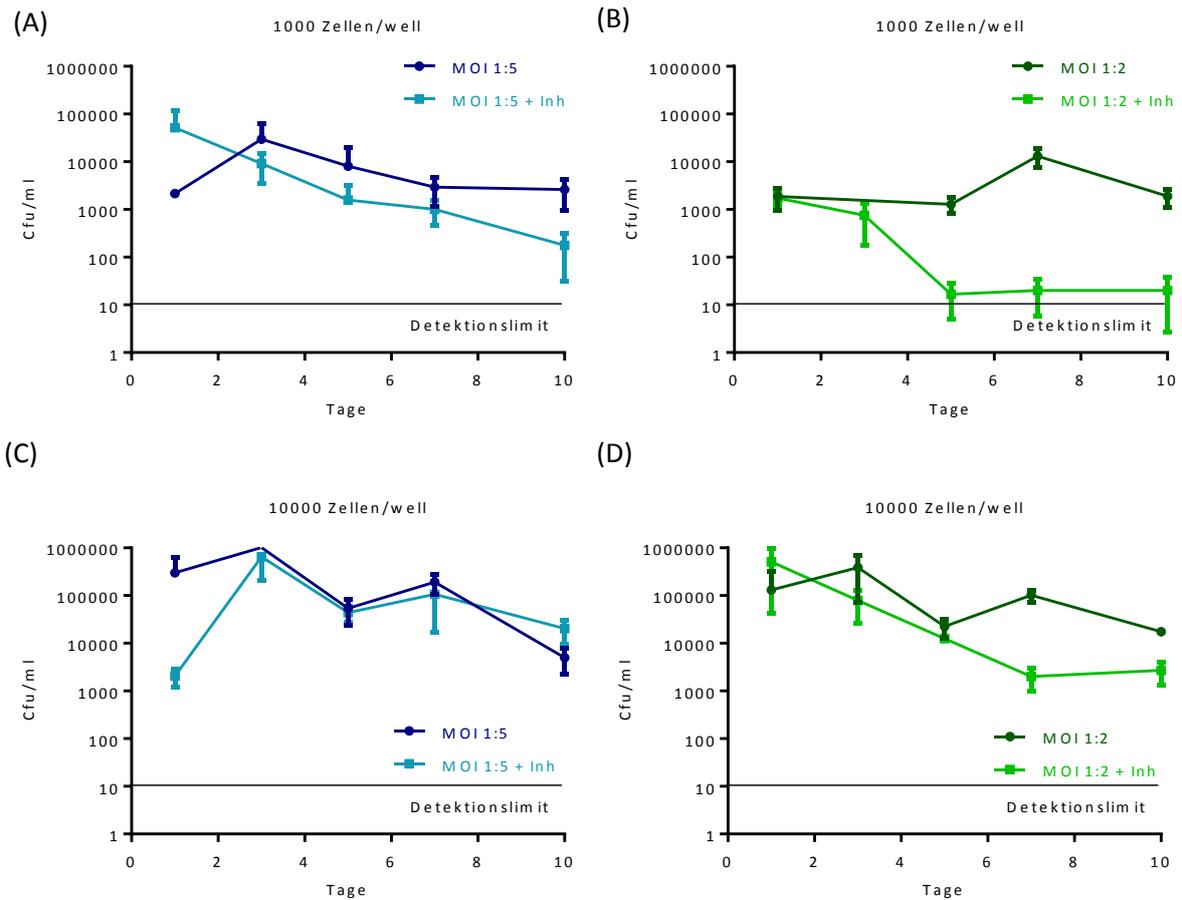


Abbildung 19: Cfu Entwicklung von *M. bovis* BCG nach Infektion von J744.A1 Makrophagen mit verschiedenen Zellzahlen pro Well und verschiedenen MOI. Gezeigt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von drei parallelen Ansätzen aus denselben Zell- und Bakterienkulturen. Inh = Isoniazid

Da bei allen anderen Bedingungen die Mykobakterien auch ohne Behandlung mit Isoniazid über die Zeit zu schnell abstarben oder das Isoniazid in der gewählten Konzentration [0,2 µg/ml] nicht wirkte, wurden die weiteren Versuche mit 1×10^3 Zellen/Well und einem MOI von 1:2 durchgeführt. Unter diesen Konditionen blieben die Bakterien der Infektionskontrolle bei einem relativ konstanten Cfu-Wert, wohingegen in Anwesenheit von Isoniazid die Mykobakterien innerhalb von 5 Tagen soweit abgetötet wurden, dass der Cfu-Wert in den Bereich des Detektionslimits sank. Um die Infektion weitergehend eindeutig zu bestätigen, wurde eine AuraminO/RhodaminB Färbung der Mykobakterien in den infizierten Makrophagen durchgeführt und mittels Fluoreszenzmikroskopie ausgewertet (Abb. 20).

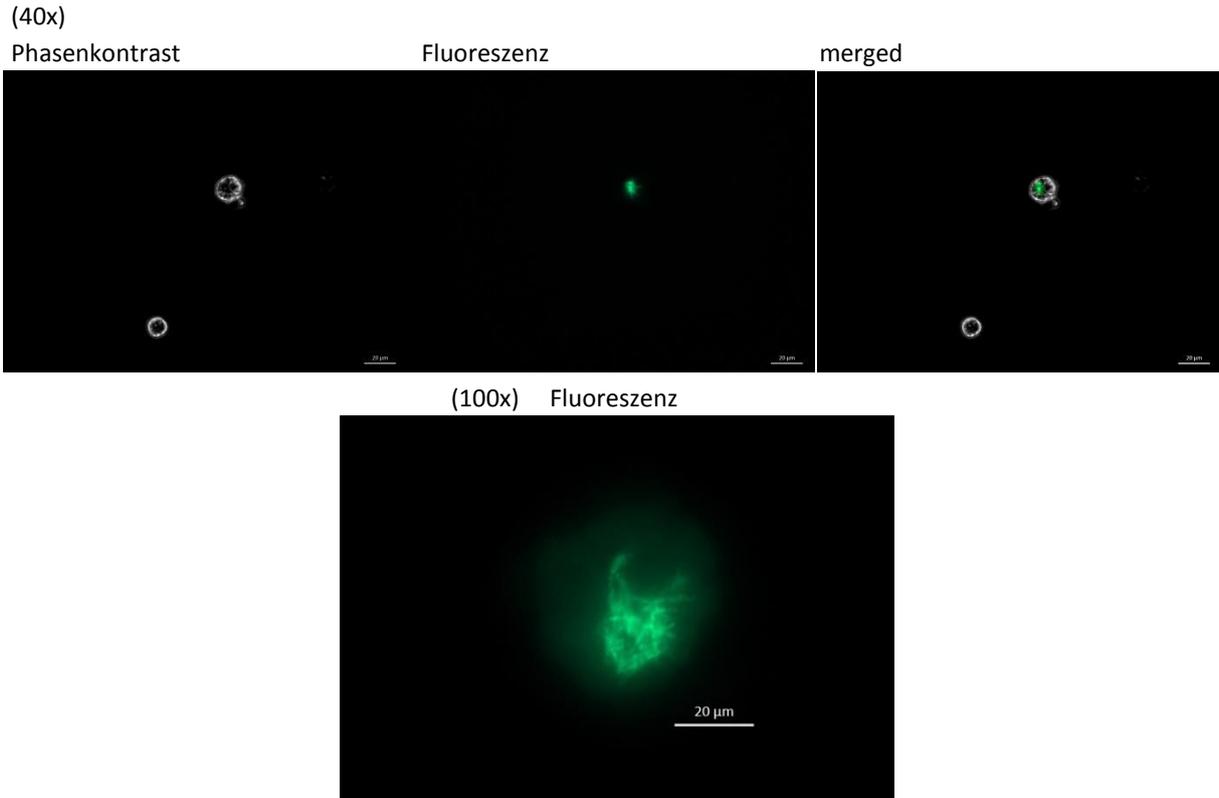


Abbildung 20: Phasenkontrastmikroskopische und fluoreszenzmikroskopische Bilder der mit *M. bovis* BCG infizierten J744.A1 Makrophagen nach AuraminO/RhodaminB Färbung.

Die erfolgreiche Infektion der Makrophagen mit Mykobakterien konnte schon mit 40-facher Vergrößerung eindeutig nachgewiesen werden, da das Fluoreszenzsignal der Mykobakterienfärbung spezifisch in einem infizierten Makrophagen detektiert wurde. Durch Betrachtung mit 100-facher Vergrößerung und weiterer Vergrößerung des Bildes lassen sich sogar eindeutig stäbchenförmige Mykobakterien innerhalb des Makrophagen erkennen. Im nächsten Schritt wurden die Effekte von verschiedenen ADEP-Derivaten [16 µg/ml] unter den oben beschriebenen Konditionen gegen intrazellulär persistierende *M. bovis* BCG getestet (Abb. 21).

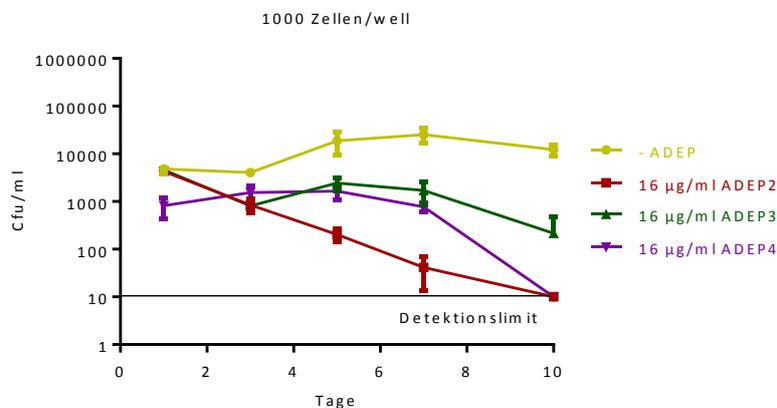


Abbildung 21: Cfu Verlauf von *M. bovis* BCG aus J744.A1 Makrophagen nach intrazellulärer Behandlung mit ADEPs. Gezeigt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von drei biologisch unabhängigen Versuchen.

Während die Mykobakterien in der Infektionskontrolle über den Zeitraum von 10 Tagen einen konstanten Cfu-Verlauf zeigten, sank der Cfu-Wert in Anwesenheit von ADEP2 bis unter das Detektionslimit ab. Auch ADEP3 zeigte einen leichten Wachstums-inhibierenden Effekt. Der Cfu-Wert der Proben, die mit ADEP4 behandelt wurden, blieb bis zu Tag 7 konstant, sank aber von Tag 7 auf Tag 10 sehr rapide unter das Detektionslimit ab. Grundsätzlich schien eine Wirkung von ADEPs also auch gegen intrazelluläre Mykobakterien vorhanden zu sein. Dies wurde genauer analysiert indem verschiedene Infektionen jeweils mit verschiedenen Konzentrationen von ADEP2 und ADEP4 und zum Vergleich mit Isoniazid [0,2 µg/ml] behandelt wurden (Abb. 22).

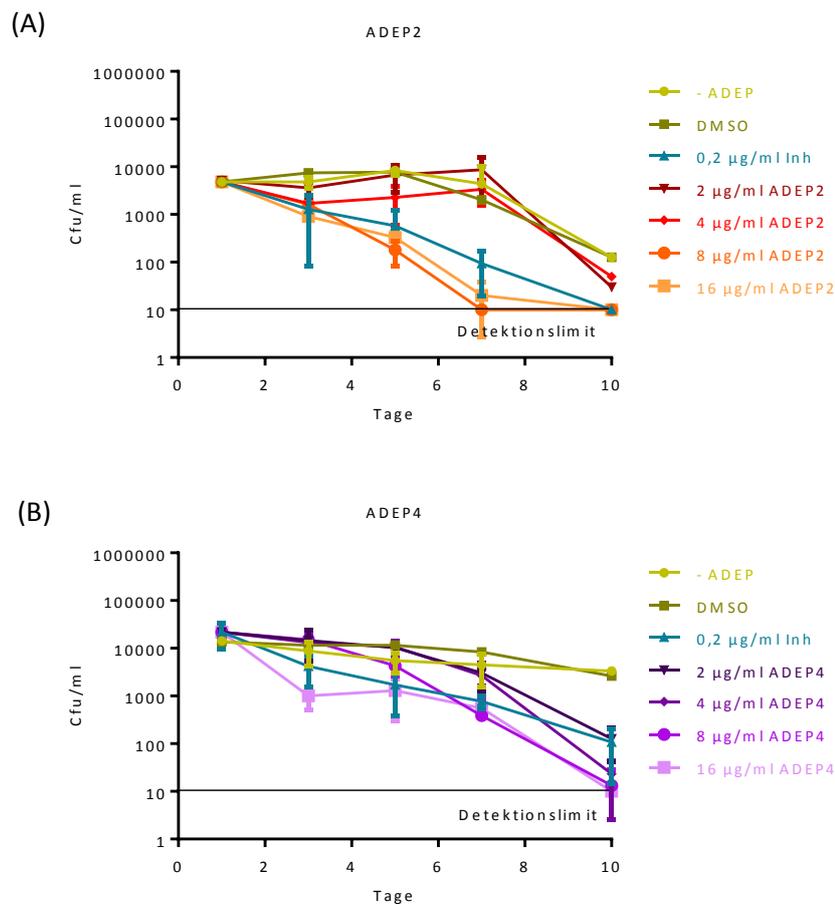


Abbildung 22: Cfu Verlauf von *M. bovis* BCG aus J744.A1 Makrophagen nach intrazellulärer Behandlung mit verschiedenen Verdünnungen von ADEP2, ADEP4 und Isoniazid. Gezeigt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von drei biologisch unabhängigen Versuchen. Werte am „limit of detection“ entsprechen 1 oder 0 gewachsener Kolonien.

Erstaunlicherweise sank der Cfu-Wert in einem der beiden Infektionskontrollansätze zum zehnten Tag hin, auch in den Proben ohne Antibiotikum oder mit sehr niedrigen Konzentrationen deutlich ab, wodurch dieser Zeitraum nicht auswertbar ist. Betrachtet man nur die Daten bis Tag 7, führt die Anwesenheit von ADEP2 in einer Konzentration von 8 µg/ml und 16 µg/ml zu einem deutlichen abtötenden Effekt, der vergleichbar zu dem Effekt ist, der mit 0,2 µg/ml Isoniazid erzielt wird. Bei Verwendung von ADEP4 ist dieser Effekt weniger deutlich zu beobachten. Eine deutliche Verringerung der Cfu-Anzahl im Vergleich

zur Infektionskontrolle ist von Tag 7 bis Tag 10 zu sehen. Dieser Effekt ist allerdings kritisch zu beurteilen, da in den anderen Infektionskontrollansätzen der Cfu-Wert auch ohne Antibiotikabehandlung in dieser Zeitspanne deutlich sank. Betrachtet man wiederum die Werte bis zu Tag 7, so wurde auch bei Verwendung von 8 oder 16 $\mu\text{g/ml}$ ADEP4 eine abtötende Wirkung erzielt, die der Wirkung der mitgeführten Isoniazid Kontrolle entspricht. Im Vergleich zu ADEP2 war die Wirksamkeit von ADEP4 aber schwächer, was im Einklang mit der Wirkung gegen freie *M. bovis* BCG Zellen steht, bei der für ADEP4 einige Male ein MHK-Wert von 16 $\mu\text{g/ml}$ bestimmt werden konnte, in den meisten Durchgängen der MHK-Wert aber bei >64 $\mu\text{g/ml}$ lag (vgl. Tab. 4). In weiteren Versuchen wurde daher der Fokus auf ADEP2 gelegt.

Um sicher zu gehen, dass der oben beschriebene abtötende Effekt eindeutig auf eine intrazelluläre Wirkung von ADEP2 gegen Mykobakterien, die in intakten Makrophagen persistieren, zurück zu führen ist, wurde die Viabilität der Makrophagen im Verlauf des oben gezeigten Infektionsversuches mit Hilfe eines Alamar Blue assays überprüft (Abb. 23).

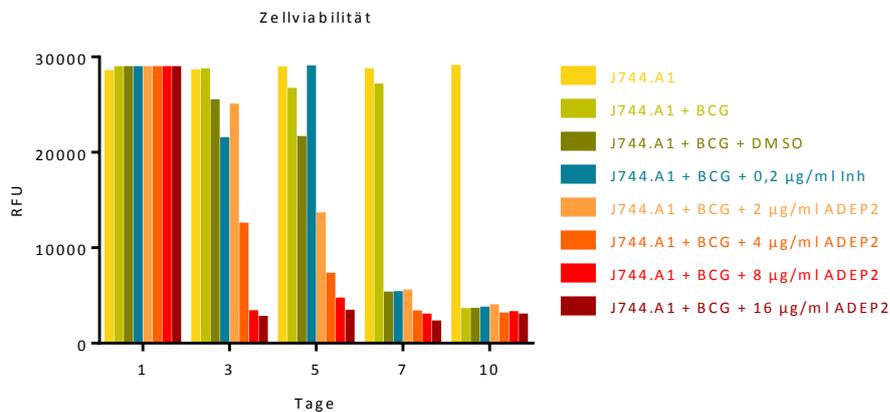


Abbildung 23: Viabilität der infizierten Makrophagen an verschiedenen Tagen nach Behandlung mit verschiedenen ADEP2 Konzentrationen.

Es wird deutlich, dass an Tag 10 bereits alle infizierten Makrophagen eine deutlich verringerte Viabilität zeigen, was aber bis Tag 7 nicht signifikant der Fall ist. Allerdings scheint die verwendete DMSO Konzentration von 0,8 % die Makrophagen an Tag 7 auch schon zu töten, weshalb der Effekt an Tag 7 nicht mehr eindeutig auf ADEP2 zurückgeführt werden kann. Die mit Isoniazid oder DMSO behandelten Zellen zeigen zumindest bis Tag 5 keine signifikante Beeinträchtigung, wohingegen die Zellen, die mit mehr als 2 $\mu\text{g/ml}$ ADEP2 behandelt wurden, schon an Tag 3 und Tag 5 ein deutliches Viabilitätsdefizit aufwiesen. Dies deutet auf einen zytotoxischen Effekt von ADEP2 gegen die infizierten Makrophagen unter diesen Kulturbedingungen hin. Diese Hypothese konnte in lichtmikroskopischen Bildern der infizierten Makrophagen, die an Tag 5 nach der Infektion aufgenommen wurden, bestätigt werden (Abb. 24).

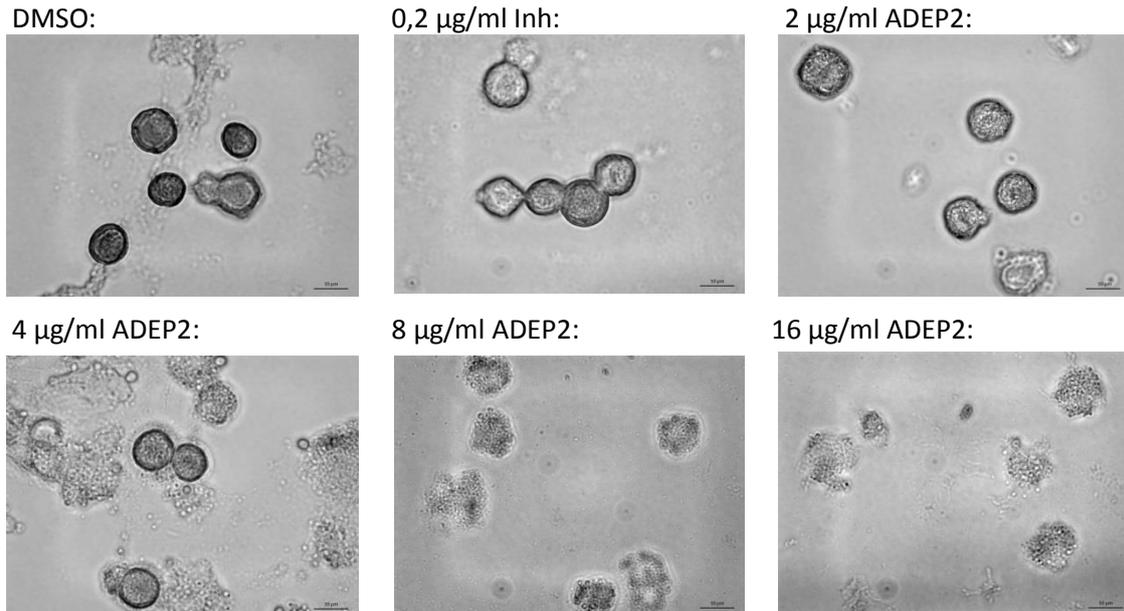


Abbildung 24: Phasenkontrastmikroskopische Aufnahmen von J744.A1 Makrophagen 5 Tage nach Infektion mit *M. bovis* BCG und Behandlung mit verschiedenen ADEP2 Konzentrationen sowie Isoniazid und DMSO als Kontrolle.

Während Isoniazid und DMSO 5 Tage nach der Infektion keine sichtbaren Schäden an den Makrophagen verursachten, führten 2 µg/ml ADEP2 schon zur Schädigung von einigen der untersuchten Makrophagen. Mit steigender ADEP2 Konzentration wurde dieser schädigende Effekt deutlicher und schon bei 8 µg/ml ADEP2 sah keine der Makrophagen mehr gesund aus. Zusammen mit den Ergebnissen des Alamar Blue Assays führt dies zu der Problematik, dass nicht festgelegt werden kann, ob ADEP tatsächlich die intrazellulär persistierenden Mykobakterien abtötet oder ob es zuerst die Makrophagen zerstört und dann die frei gewordenen Mykobakterien extrazellulär abtötet.

Um herauszufinden, ob ADEP nur auf die infizierten Makrophagenkulturen einen toxischen Einfluss hat oder ob es auch bei nicht infizierten Makrophagen zytotoxisch wirkt, wurde ein Zytotoxizitätstest mit verschiedenen ADEP Derivaten gegen J774.A1 Makrophagen durchgeführt (Tab. 10). Laut Literatur sollte der IC_{50} gegen diese Zelllinie bei Verwendung von 10 % FCS, für ADEP2 bei 23 µg/ml und für ADEP4 bei >100 µg/ml liegen (Brötz-Oesterhelt *et al.*, 2005).

Tabelle 10: IC_{50} Werte von verschiedenen ADEP Derivaten und vom Vergleichszytostatika Cycloheximid gegen J774.A1 Makrophagen, bezogen auf Wachstumskontrollen, welche dieselbe Menge DMSO enthielten.

IC_{50} [µg/ml]	ADEP2	ADEP3	ADEP4	Cycloheximid
J774.A1 in DMEM mit 10% FCS	16	16	4	0,03125
J774.A1 in DMEM mit 3% FCS	6	8	16	0,0625
J774.A1 in DMEM mit 10% Serumersatz	3	12	4	0,0625

Die gemessenen Zytotoxizitätswerte liegen für ADEP4 deutlich unter den Literaturwerten, während der gemessene Wert für ADEP2 in 10% FCS zum Literaturwert passt. Allerdings liegt auch der IC_{50} für ADEP2, bei Verwendung von 3 % FCS, mit 6 $\mu\text{g}/\text{ml}$ schon unter dem MHK-Wert der zuvor für Mykobakterien bestimmt wurde und auch unter dem Bereich, der in den Infektionsmodellen eine Wirkung zeigte. Das Absenken der FCS-Konzentration von den üblichen 10% auf 3% führte zu einer stärkeren Schädigung der Zellen und auch die Verwendung von Serumersatzstoff anstelle von FCS löste das Problem nicht. Somit wird deutlich, dass ADEPs unter den getesteten Konditionen einen zytotoxischen Effekt auf die Makrophagen haben, und dass dieser im gleichen moderaten Bereich liegt, wie die gemessenen MHK-Werte gegen *M. bovis* BCG. Daher wurde dieser Versuchsansatz nicht weiter verfolgt und es konnte nicht eindeutig geklärt werden, ob ADEPs gegen intrazellulär persistierende Mykobakterien wirken.

4.1.4. Untersuchungen zur Resistenzentwicklung von *M. bovis* BCG gegen ADEPs

Ein zentraler Grund, die Wirkung von ADEPs gegen Mykobakterien zu testen, war die Hypothese, dass Mykobakterien aufgrund ihrer zwei Homologe von ClpP, die beide essentiell sind (Ollinger *et al.*, 2011; Raju *et al.*, 2011), ein geringeres Potential zur Entwicklung von ADEP Resistenz durch ClpP Mutationen aufweisen könnten. Dieser Hypothese sollte durch die Bestimmung der spontanen Resistenzrate nachgegangen werden. Zunächst musste hierzu ein geeignetes agarhaltiges Medium gefunden werden. Da auf agarhaltigem Mineralmedium auch nach 5 Wochen Inkubation kein Wachstum von *M. bovis* BCG sichtbar war, wurden 7H10 Agarplatten mit verschiedenen BSA Konzentrationen hergestellt. Die geringste BSA Konzentration, bei der ein gutes Wachstum nach 3 Wochen Inkubation auftrat war 1 g/l BSA. Diese Konzentration wurde verwendet um 7H10 Agarplatten mit 1 g/l BSA und 64 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ADEP2 herzustellen. Die gewählte ADEP2 Konzentration entspricht dabei dem 4xMHK gegen freie *M. bovis* BCG Zellen in flüssigen Mineralmedium. Auf diesen Platten wurden verschiedene Cfu-Mengen (10^6 , 10^5 , 10^4 und 10^3) von *M. bovis* BCG wt aufgebracht und die Platten 3 Wochen inkubiert (Abb. 25).

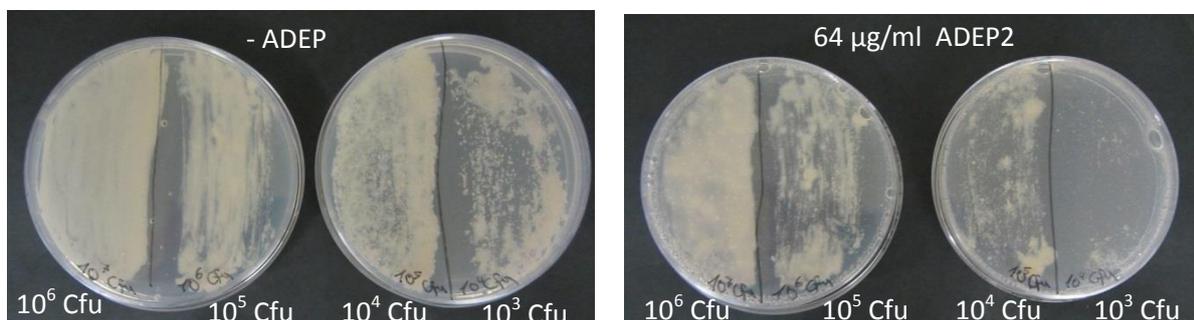


Abbildung 25: Wachstum von *M. bovis* BCG auf 7H10 Agarplatten mit 1 g/l BSA in Anwesenheit und Abwesenheit von ADEP2.

Auch in den ADEP haltigen Platten war bei jeder getesteten Cfu-Konzentration noch deutlich Wachstum zu beobachten, auch wenn es definitiv gehemmt war. Bei dem Ansatz mit 1×10^5

Cfu/ml auf ADEP haltigen Agarplatten, wurden die Kolonien gezählt und somit eine Überlebensrate von $2,2 \times 10^{-4}$ Cfu/ml bestimmt. Diese Überlebensrate ist nicht mit einer Resistenzrate gleichzusetzen, da man bedenken muss, dass spontane Resistenzraten normalerweise mit Antibiotikakonzentrationen angesetzt werden, die der 4 x MHK unter den gleichen Konditionen, also in diesem Fall auf 7H10 Agarplatten mit 1 g/l BSA, entsprechen. Ein solcher MHK-Wert wurde in dieser Arbeit allerdings nicht bestimmt, sondern es wurde von dem MHK-Wert in flüssigem Mineralmedium ausgegangen, welcher sich von dem MHK-Wert auf Agarplatten unterscheiden könnte. Es wäre also möglich, dass eine zu geringe ADEP-Konzentration eingesetzt wurde. Eine Wiederholung des Versuches mit höherer ADEP-Konzentration wäre allerdings problematisch, da die Löslichkeit von ADEPs in wässriger Lösung begrenzt ist.

Von den ADEP haltigen Agarplatten wurden 16 Kolonien isoliert und in Mineralmedium angezogen. Nur 6 der 16 isolierten Kolonien wuchsen erneut an. Für diese 6 Stämme (*M. bovis* BCG R1 – R6) wurde der MHK-Wert bestimmt (Tab. 11) und die *clpP1P2* Region sequenziert.

Tabelle 11: MHK-Werte der *M. bovis* BCG Stämme, die von ADEP haltigen Agarplatten isoliert wurden.

MHK in Mineralmedium [µg/ml]	ADEP2	ADEP3	Apramycin
<i>M. bovis</i> BCG R1	32(16)	16(8)	2
<i>M. bovis</i> BCG R2	32(16)	16(8)	2
<i>M. bovis</i> BCG R3	32(16)	16(8)	2
<i>M. bovis</i> BCG R4	16	8	2
<i>M. bovis</i> BCG R5	8(4)	16(8)	2
<i>M. bovis</i> BCG R6	32(8)	8	1
<i>M. bovis</i> BCG wt	16	8	2

Keiner der isolierten Stämme wies eine detektierbare Resistenz gegen ADEP2 oder 3 auf. Auch die Sequenzierung der *clpP1P2* Regionen zeigte keine Mutation in *clpP1P2*, der zugehörigen Promotorregion oder der downstream von *clpP* liegenden ClgR-Bindestelle. Im Gegensatz hierzu wurden bei allen anderen bisher isolierten ADEP resistenten Stämmen aus verschiedenen Grampositiven Bakterien verschiedene Mutationen in der *clpP* Region gefunden (unveröffentlichte Daten, Brötz-Oesterhelt et al.).

Da für die von den ADEP-haltigen Platten isolierten Kolonien keine ADEP Resistenz bestimmbar war, bilden sie keine Grundlage zur Ermittlung der spontanen Resistenzrate. Zur Erklärung, warum die Kolonien auf den Platten überhaupt wachsen konnten, gibt es zwei Möglichkeiten. Die erste Möglichkeit ist, dass es sich tatsächlich um Kolonien mit leicht reduzierte ADEP-Empfindlichkeit handelt und diese Toleranz gegenüber ADEPs durch einen ClpP-unabhängigen Mechanismus zustande kommt. Eine Möglichkeit hierzu wäre die Hochregulierung einer Efflux-Pumpe, da bereits gezeigt wurde, dass ADEPs ein Substrat für Efflux-Pumpen in Mykobakterien sind und dass die Inhibierung dieser Pumpen die ADEP-Empfindlichkeit der Mykobakterien um das Zwei- bis Vierfache ansteigen lässt (Ollinger et

al., 2011). Da allerdings nach wiederholter Kultivierung der MHK-Wert von ADEPs im gleichen Bereich lag wie beim wt, müsste man bei dieser Hypothese von einer nur temporären Hochregulierung der Pumpen ausgehen, was somit eher einem Toleranz- statt einem Resistenzphänomen entsprechen würde. Die zweite Möglichkeit, das Wachstum von *M. bovis* BCG auf den ADEP haltigen Agarplatten zu erklären ist, dass aufgrund der oben gezeigten Instabilität von ADEP2 schon nach wenigen Tagen nur noch so wenig ADEP2 in den Agarplatten enthalten war, dass alle Bakterien, die nicht schon innerhalb der ersten paar Tage getötet wurden im Laufe der langen Inkubationszeit doch noch hochwachsen konnten, ohne ADEP resistent zu sein. Die ursprüngliche Hypothese, dass Mykobakterien ein geringeres Potential zur Entwicklung von ADEP Resistenz aufweisen, lässt sich somit auf Grundlage dieser Arbeit weder bestätigen noch ausschließen.

4.2. Regulation der ClpP1P2 Expression in *M. bovis* BCG

4.2.1. Konstruktion von *M. bovis* BCG *clpP1-tetoff*

Um eine regulierbare *clpP* Mutante in *M. bovis* BCG zu konstruieren, wurde zunächst ein *knock-in* Plasmid kloniert, welches wiederum mit einem Phasmid fusioniert wurde, um anschließend Hochtiterphagen für die Transduktion in *M. bovis* BCG zu generieren. Nach erfolgreicher Transduktion sollte in den Bakterien eine doppelte homologe Rekombination stattfinden, die dazu führt, dass Tet Operatoren (TetO) downstream von *clpP1P2* oder zwischen *clpP1* und *clpP2* eingebaut werden (Abb. 26). Zuletzt wurde ein Tet Repressorplasmid in den Stamm transformiert, so dass sich die *clpP1P2* Expression über die Anhydrotetrazyklin (ATc)-Konzentration regulieren lassen sollte (vgl. Abb. 33). Die einzelnen Schritte zur Erzeugung dieser Stämme werden im Folgenden genauer erläutert.

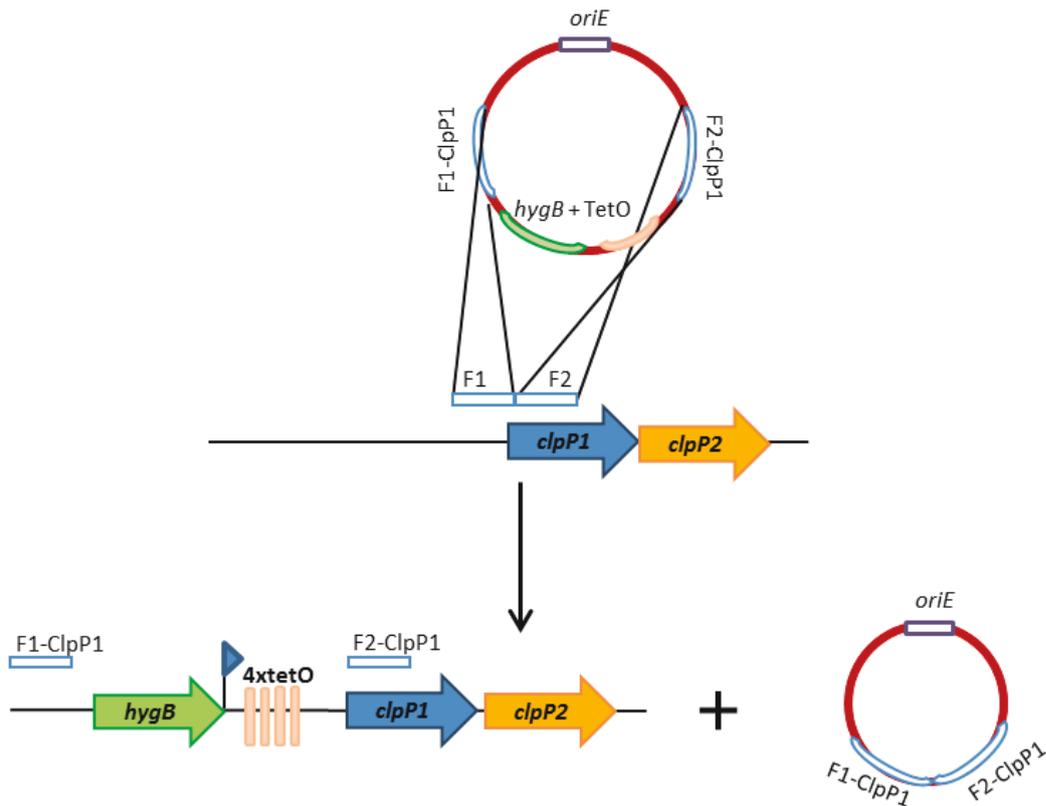


Abbildung 26: Schematische Darstellung der doppelten homologen Rekombination, die zum *knock-in* der HygromycinB Resistenzkassette (*hygB*) und der 4 Tetrazyklin Operatoren (TetO) vor *clpP1* führt. Der *knock-in* vor *clpP2* sollte analog mit Verwendung anderer Flanken stattfinden.

Im ersten Schritt wurden zunächst mittels PCR die *knock-in* Flanken amplifiziert, welche homolog zu den Bereichen sind, in denen die homologe Rekombination später stattfinden soll (Abb. 27).

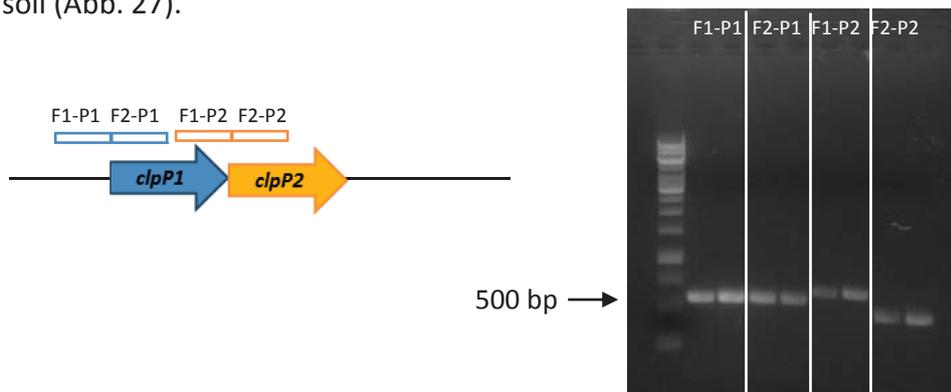


Abbildung 27: Schematische Darstellung der Lage der *knock-in* Flanken im Genom von *M. bovis* BCG (A) und Agarosegel nach erfolgreicher Amplifizierung der *knock-in* Flanken. Als Größenmarker wurde der Genereller 1 kb DNA ladder verwendet.

Diese Flanken wurden wiederum mit einer *oriE*- und einer HygromycinB (*hygB*) Resistenzkassette fusioniert, wobei die *hygB* Resistenzkassette auch 2, 4 oder 8 Tetrazyklin-

Operatoren (TetO) in verschiedenen Orientierungen enthielt. Es wurden insgesamt 5 Konstrukte für *clpP1P2* und 5 Konstrukte für *clpP2* kloniert. Nach Transformation in *E. coli* NEB5 α wurde nach den korrekten *knock-in* Plasmiden mittels EcoR1 Verdau gescreened (Abb. 28).

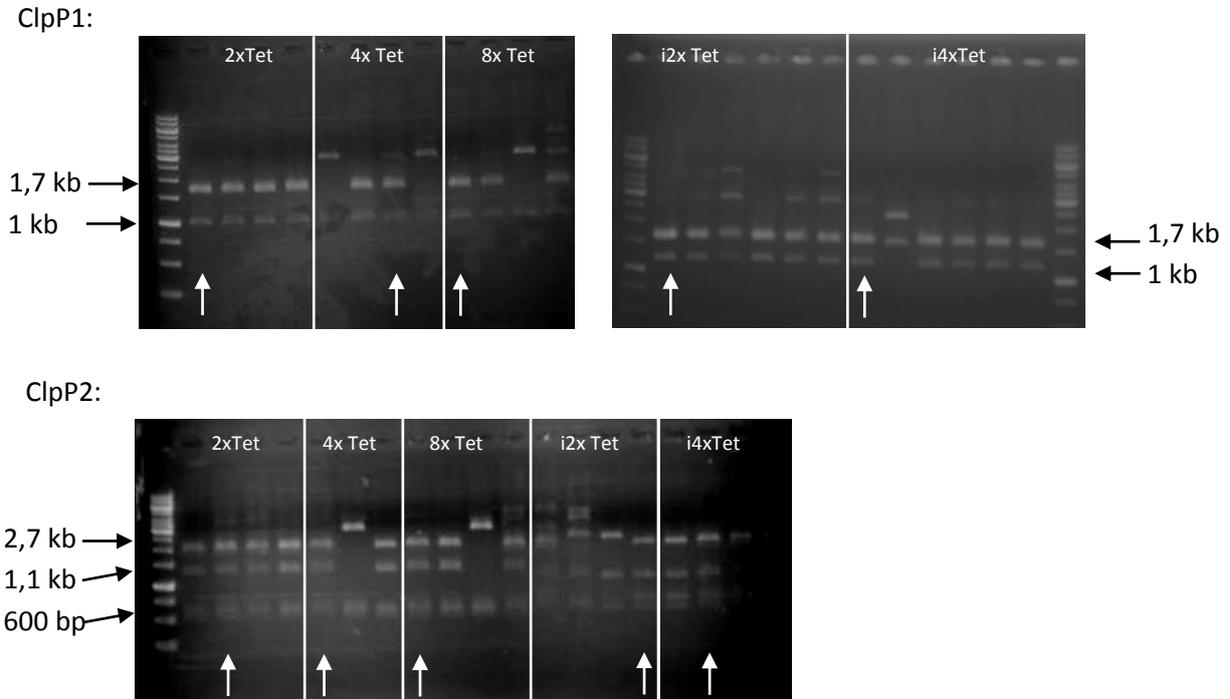


Abbildung 28: Agarosegel mit *knock-in* Plasmiden nach EcoR1 Kontrollverdau. Die Plasmide, die das korrekte Bandenmuster aufweisen und weiter verwendet wurden, sind mit Pfeilen markiert. Als Größenmarker wurde der Genruler 1kb DNA erwendet.

Die Plasmide die das korrekte Bandenmuster aufwiesen (für *clpP1* ca. 1 kb + 1,7 kb + 1,7 kb und für *clpP2* ca. 600 bp + 1,1 kb + 2,7 kb), wurden sequenziert. Plasmide mit korrekter Sequenz wurden mit Pac1 linearisiert, mit dem Phasmid phAE159 fusioniert und in *E. coli* HB101 transformiert. Anschließend wurde erneut mittels Pac1 Verdau nach dem korrekten *knock-in* Phasmid gescreened (Abb. 29).

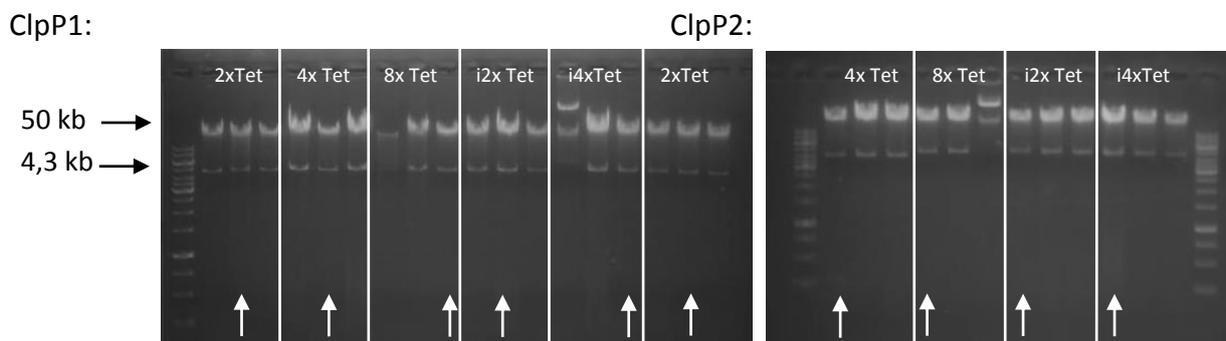


Abbildung 29: Agarosegel mit *Knock-in* Phasmiden nach Pac1 Kontrollverdau. Die Phasmeide die das korrekte Bandenmuster aufweisen und weiter verwendet wurden, sind mit Pfeilen markiert. Als Größenmarker wurde der Genruler 1kb DNA erwendet.

Die Phasmide mit dem korrekten Bandenmuster (ca. 4,3 kb + 50 kb) wurden in *M. smegmatis* transformiert und es wurden Hochtiterphagen hergestellt mit denen anschließend die Transduktion in *M. bovis* BCG erfolgte. Von den entstandenen HygromycinB resistenten Klonen wurde die genomische DNA isoliert und mittels Southern Blot auf erfolgreiche *knock-in* Mutanten gescreened (Abb.30).

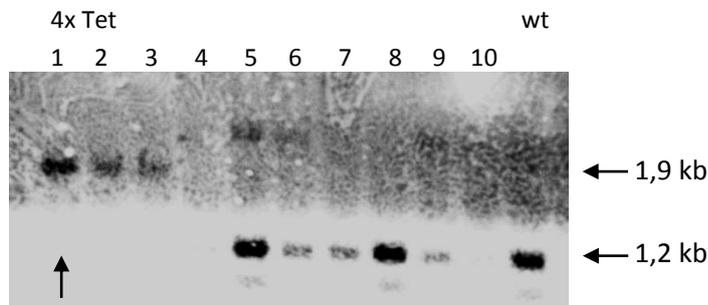


Abbildung 30: Southern Blot zum Screening nach erfolgreichen knock-in Mutanten.

Nach viermaligem Transduktionsversuch wurden drei richtige Klone (Klon 1-3) für das Konstrukt 4x TetO-*clpP1* identifiziert, die nach Verdau der genomischen DNA mit EcoR1 eine Bandengröße von 1,9 kb anstelle von 1,2 kb aufwiesen, welche mit der *clpP1*-Sonde detektierbar war. Mittels PCR wurde dieser Befund zusätzlich noch einmal bestätigt. Für alle anderen Konstrukte konnte auch nach 4-5 Transduktionsversuchen kein richtiger Klon identifiziert werden. Aus diesem Grund wurde der Ansatz andere Anzahlen von TetO vor *clpP1p2* einzubringen und auch der Ansatz TetO zwischen *clpP1* und *clpP2* einzubringen um nur die Expression von *clpP2* zu regulieren, nicht weiter verfolgt. In Klon1 des Konstruktes 4x TetO-*clpP1* wurden verschiedene Plasmide transformiert, die alle einen Tetrazyklin Repressor (TetR) oder einen reversen Tetrazyklin Repressor (rev TetR) konstitutiv exprimieren. Die Transformation von Plasmiden mit TetR würde hierbei zur Konstruktion eines Tet-on Systems führen, welches in Abwesenheit von ATc aufgrund von Bindung des Repressors kein *clpP1P2* exprimieren würde und ATc benötigen würde, um die Expression von *clpP1P2* anzuschalten. Die Transformation von Plasmiden mit rev TetR würde zur Konstruktion eines Tet-off Systems führen, bei welchem *clpP1P2* in Abwesenheit von ATc exprimiert würde, die Expression aber mit verschiedenen ATc-Konzentrationen herunterreguliert werden könnte (vgl. Abb.33). Die verschiedenen Plasmide unterscheiden sich außerdem in der ribosomalen Bindestelle (RBS) (Alber et al., unveröffentlichte Daten), wodurch die Expression von TetR unterschiedlich stark sein sollte. Als positiv-Kontrolle wurde zusätzlich auch der Vektorhintergrund ohne *tetR* (pMV261) transformiert. Direkt bei der Transformation dieser Plasmide wurden die Ansätze auf 7H10 Agarplatten ausplattiert, die verschiedene Konzentrationen ATc enthielten und nach 4 Wochen wurden die Cfu-Werte bestimmt (Tab. 12).

Tabelle 12: Cfu-Werte nach Transformation der Tet Repressor Plasmide in den knock-in Stamm *M. bovis* BCG 4xTetO-ClpP1. Der Stamm, der für weitere Versuche verwendet wurde ist gelb unterlegt.

ATc [$\mu\text{g/ml}$]	0	0.5	1	5	10
pMV261	+	++	++	+	++
pTetR-D	1	0	0	1	0
pTetR-E	0	0	0	0	0
pTetR-F	2	3	2	2	0
pTetR-G	2	3	0	0	0
prevTetR-A	1	0	0	0	1
prevTetR-B	0	0	1	1	2
prevTetR-C	3	1	1	3	0
prevTetR-D	178	40	14	6	1
prevTetR-E	12	0	0	0	0
prevTetR-F	0	0	2	0	0
prevTetR-G	190	1	3	5	3

Dass die Transformation grundsätzlich mit hoher Transformationseffizienz erfolgreich war, lässt sich an den dicht bewachsenen Agarplatten der positiv-Kontrolle erkennen, bei welcher der Vektorhintergrund transformiert wurde, von dem kein Tet Repressor exprimiert wird. Nur zwei der verwendeten Plasmide, die beide reverse Tet Repressoren exprimieren, ließen sich relativ effizient in den Stamm einbringen. Die beste Regulation des Wachstums über die ATc Konzentration wurde eindeutig mit dem Plasmid prevTetR-D erzielt. Dass diese Regulation tatsächlich am gewünschten ATc Regulationssystem liegen muss, wird wiederum durch Vergleich mit dem von der Atc Konzentration unabhängigen Wachstum der positiv-Kontrolle deutlich (Abb. 31).

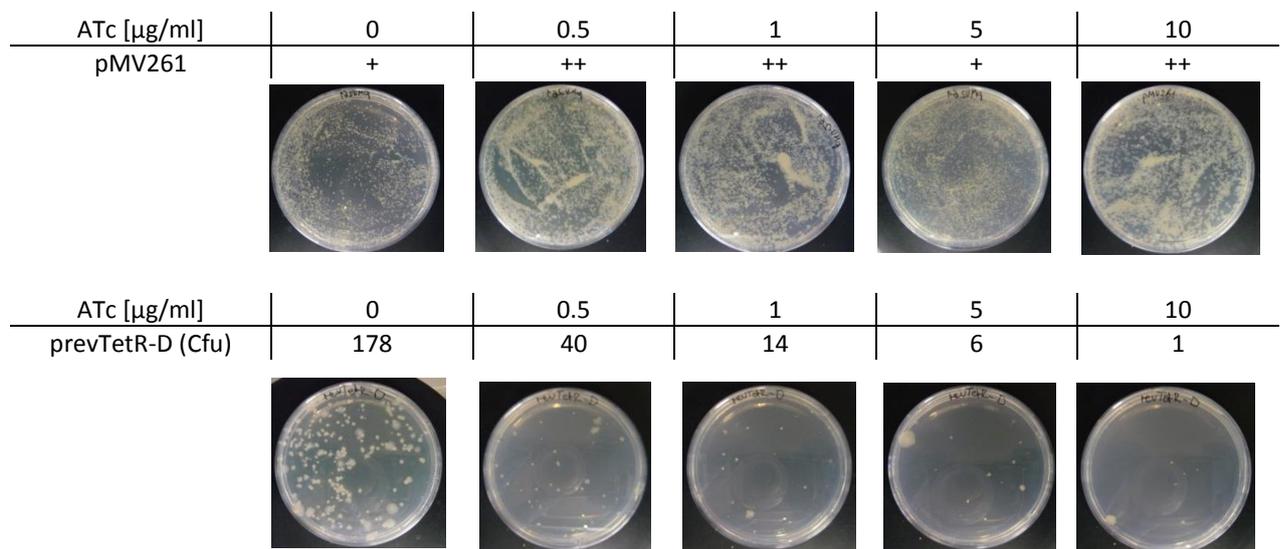


Abbildung 31: Cfu-Werte nach Transformation von *M. bovis* BCG 4xTetO-clpP1 mit dem Vektorhintergrund pMV261 und mit prevTetR-D mit verschiedenen ATc Konzentrationen.

Der so entstandene Stamm wird im folgenden *M. bovis* BCG clpP1-tetoff genannt. Es wurden 3 Kolonien dieses Stammes isoliert und der erfolgreiche knock-in der Tet-Operatoren vor die

clpP1P2 Region der drei Stämme wurde erneut mittels PCR und Sequenzierung überprüft (Abb. 32).

ClpP1_4xTet0	2351	GAGGCGGCACGATCCGCGACGTGATGATCGGCCGCATCCCCACGGTGCTG
Klon 1	107	GAGGCGGCACGATCCGCGACGTGATGATCGGCCGCATCCCCACGGTGCTG
Klon 2	99	GAGGCGGCACGATCCGCGACGTGATGATCGGCCGCATCCCCACGGTGCTG
Klon 3	99	GAGGCGGCACGATCCGCGACGTGATGATCGGCCGCATCCCCACGGTGCTG
ClpP1_4xTet0	2401	CGCAGTGAGCTCTACGCCATCCCCTATCAGTGATAGAGAACGCAC
Klon 1	157	CGCAGTGAGCTCTACGCCATCCCCTATCAGTGATAGAGAACGCAC
Klon 2	149	CGCAGTGAGCTCTACGCCATCCCCTATCAGTGATAGAGAACGCAC
Klon 3	149	CGCAGTGAGCTCTACGCCATCCCCTATCAGTGATAGAGAACGCAC
ClpP1_4xTet0	2451	ATCCCTATCAGTGATAGAGACTCTGACGAGCGGGAGATCCCTATCAGTGA
Klon 1	207	ATCCCTATCAGTGATAGAGACTCTGACGAGCGGGAGATCCCTATCAGTGA
Klon 2	199	ATCCCTATCAGTGATAGAGACTCTGACGAGCGGGAGATCCCTATCAGTGA
Klon 3	199	ATCCCTATCAGTGATAGAGACTCTGACGAGCGGGAGATCCCTATCAGTGA
ClpP1_4xTet0	2501	TAGAGAGTTTGTCCATCCCTATCAGTGATAGATAGGCTCTGGGAGTACCCG
Klon 1	257	TAGAGAGTTTGTCCATCCCTATCAGTGATAGATAGGCTCTGGGAGTACCCG
Klon 2	249	TAGAGAGTTTGTCCATCCCTATCAGTGATAGATAGGCTCTGGGAGTACCCG
Klon 3	249	TAGAGAGTTTGTCCATCCCTATCAGTGATAGATAGGCTCTGGGAGTACCCG
ClpP1_4xTet0	2551	TGTGTACGACCAGCACGGCATAACATCATTTTCGACGCCGAGAGATTTCGCCG
Klon 1	307	TGTGTACGACCAGCACGGCATAACATCATTTTCGACGCCGAGAGATTTCGCCG
Klon 2	299	TGTGTACGACCAGCACGGCATAACATCATTTTCGACGCCGAGAGATTTCGCCG
Klon 3	299	TGTGTACGACCAGCACGGCATAACATCATTTTCGACGCCGAGAGATTTCGCCG
ClpP1_4xTet0	2601	CCCGAAATGAGCACGATCCGCATTCGAAGCTAAGGAGGCCATAGATTGCA
Klon 1	357	CCCGAAATGAGCACGATCCGCATTCGAAGCTAAGGAGGCCATAGATTGCA
Klon 2	349	CCCGAAATGAGCACGATCCGCATTCGAAGCTAAGGAGGCCATAGATTGCA
Klon 3	349	CCCGAAATGAGCACGATCCGCATTCGAAGCTAAGGAGGCCATAGATTGCA
ClpP1_4xTet0	2651	TGAGCCAAGTGACTGACATGCGTTTCGAACTCGCAGGGTCTTAGCCTCACG
Klon 1	407	TGAGCCAAGTGACTGACATGCGTTTCGAACTCGCAGGGTCTTAGCCTCACG
Klon 2	399	TGAGCCAAGTGACTGACATGCGTTTCGAACTCGCAGGGTCTTAGCCTCACG
Klon 3	399	TGAGCCAAGTGACTGACATGCGTTTCGAACTCGCAGGGTCTTAGCCTCACG

Abbildung 32: Ausschnitt aus dem Alignment der DNA Sequenzen von den drei *M. bovis* BCG *clpP1-tetoff* Klonen im Bereich downstream von *clpP1P2*. Die RBS ist blau umrandet, die Tet-Operatoren sind rot umrandet. Das Start-Codon für *clpP1* ist in roten Buchstaben dargestellt.

In allen drei Stämmen war demnach der *knock-in* erfolgreich und weder die vier Tet Operatoren oder die Ribosomenbindestelle (RBS) noch *clpP1* oder *clpP2* wiesen Mutationen auf. Im Zuge der Klonierung wurde zwischen der RBS und dem Startcodon von *clpP1* eine Punktmutation von G zu T eingebaut, die aber nicht relevant sein sollte. Beachten sollte man weiterhin, dass durch den *knock-in* die Regulation über den Transkriptionsfaktor ClgR verhindert wird, dessen Bindestelle sich im wt 89 bp downstream von *clpP1P2* befindet (Estorninho *et al.*, 2010) und im Stamm *clpP1-tetoff* nun wesentlich weiter entfernt liegt. Mit Hilfe dieses Stammes sollte nun die Expression des *clpP* Operons in Abhängigkeit der ATc Konzentration herunter reguliert werden. Bei dem verwendeten System handelt es sich um ein Tet-off System, dass in Abb. 33 schematisch erklärt wird.

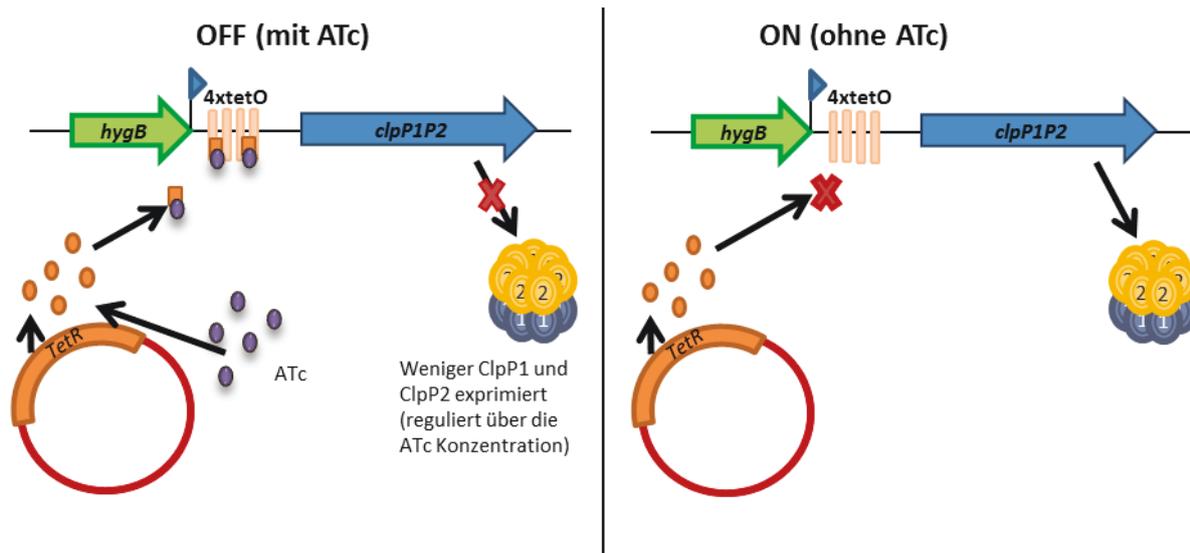


Abbildung 33: Schematische Darstellung der Funktionsweise des Stammes *M. bovis* BCG *clpP1-tetoff*.

Solange kein ATc im Medium vorhanden ist, ist die Expression des Zielproteins im Stamm mit dem Tet-off System auf „on“ geschaltet. Der reverse Tet Repressor wird zwar konstitutiv exprimiert, kann aber aufgrund seiner Konformation nicht an den Tet Operator binden, der sich upstream vom *clpP1P2* Operon befindet. *ClpP1* und *clpP2* können also exprimiert werden. Die Anwesenheit von ATc im Medium des Stammes kann das System auf „off“ schalten, da ATc an den reversen Tet Repressor bindet, wodurch dieser seine Konformation ändert und an die Tet Operatoren binden kann. Wenn die ATc Konzentration hoch genug ist, kann die Expression von *clpP1* und *clpP2* abgeschaltet werden, was zum Zelltod führen sollte, da es sich um Proteine handelt, die essentiell für das Wachstum von Mykobakterien sind. Für *M. smegmatis* wurde dies schon mit einem ähnlich funktionierendem Tet-on System gezeigt (Raju *et al.*, 2011). Auch für *M. tuberculosis* wurde ein ähnliches Tet-on System bereits beschrieben (Carroll *et al.*, 2011), allerdings schien in diesem Falle die Regulation der Expression von *clpP1P2* nicht zu funktionieren, da der Stamm zwar ein grundsätzliches Wachstumsdefizit aufwies, welches aber unabhängig von der Anwesenheit oder Abwesenheit von ATc auftrat. Parallel zu der Konstruktion des hier vorgestellten Tet-off Systemes in *M. bovis* BCG, wurde nun auch in *M. tuberculosis* ein gut funktionierender Tet-off Stamm konstruiert und erneut die Essentialität der *clpP1P2* Expression für das Wachstum von *M. tuberculosis* bewiesen (Raju *et al.*, 2014). Ziel im weiteren Verlauf dieser Arbeit war es, die Regulierbarkeit der *clpP1P2* Expression für *M. bovis* BCG zu überprüfen und ATc Konzentrationen zu finden, bei denen die *clpP1P2* Expression herunterreguliert, der Stamm aber noch lebensfähig ist. Unter diesen Konditionen sollte dann getestet werden, welchen Einfluss die ClpP1P2 Menge auf die Wirksamkeit von ADEPs hat, um zu bestätigen, dass ClpP auch in Mykobakterien tatsächlich das Target von ADEPs ist und um herauszufinden, ob ADEPs in Mykobakterien ebenfalls einen dualen Wirkmechanismus haben, oder ob das Vorhandensein von zwei potentiellen Targets, die beide essentiell sind, eventuell dazu

führen könnte, das die Wirkung hauptsächlich über die unkontrollierte Überaktivierung der Protease oder über die Inhibierung der essentiellen Funktionen von ClpP1P2, auftritt.

4.2.2. Charakterisierung von *M. bovis* BCG *clpP1-tetoff*

Der oben hergestellte Stamm *M. bovis* BCG *clpP1-tetoff* wurde zunächst mittels Wachstumskurven in Anwesenheit verschiedener ATc Konzentrationen genauer charakterisiert. Im ersten Ansatz wurden Konzentrationen zwischen 10 ng/ml und 250 ng/ml gewählt, da auf den Agarplatten mit 500 ng/ml nach der Transformation des Repressorplasmides bereits ein deutliches Wachstumsdefizit zu erkennen war, aber noch Restwachstum stattfand. In flüssigem Minimalmedium zeigte sich allerdings ein anderer Effekt. Während der wt in allen Ansätzen ein gleichmäßig gutes Wachstum, unabhängig von der ATc Konzentration aufwies, waren bei *M. bovis* BCG *clpP1-tetoff* schon nach 5 Tagen keine Cfu's mehr detektierbar und die Kultur wuchs auch nach 20 Tagen Inkubation nicht mehr an. Der Versuch wurde mit niedrigeren ATc Konzentrationen zwischen 0,05 ng/ml und 2 ng/ml ATc wiederholt (Abb. 34).

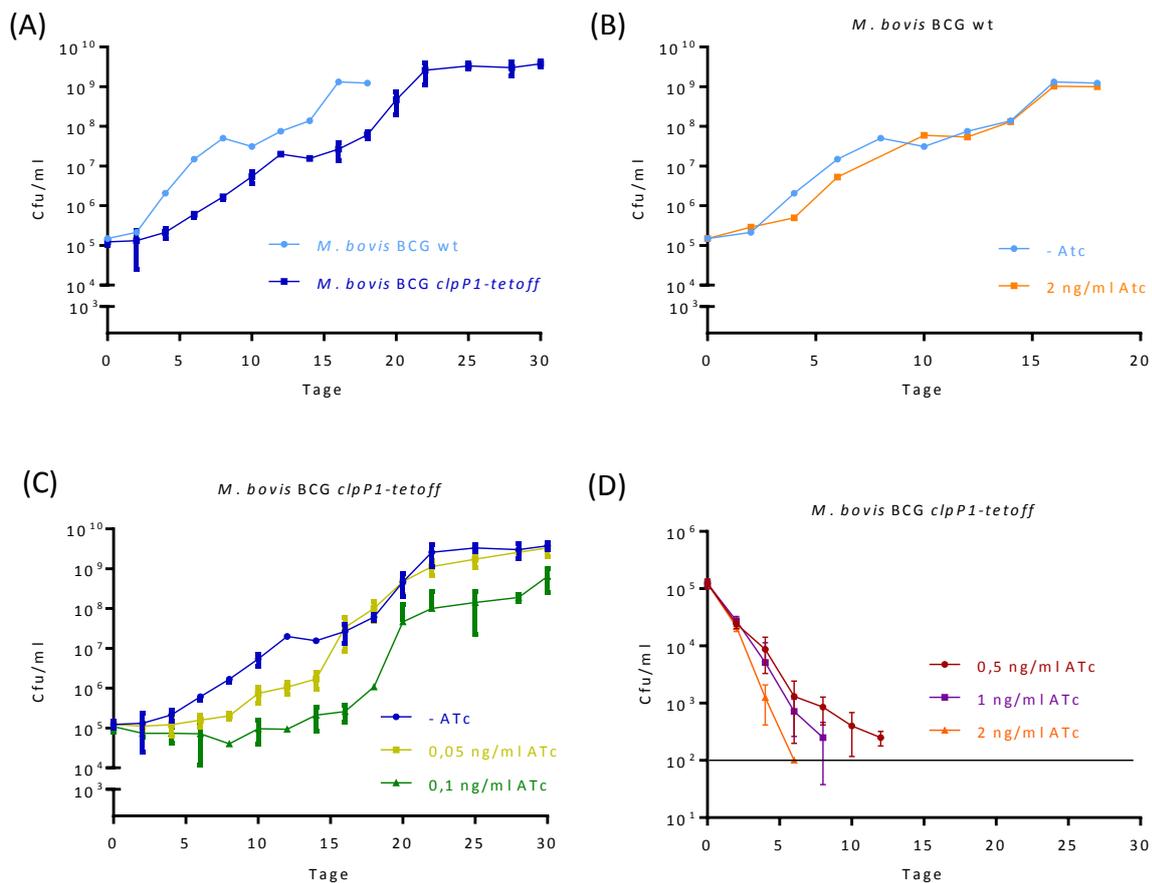


Abbildung 34: Wachstumskurve von *M. bovis* BCG wt und *M. bovis* BCG *clpP1-tetoff* ohne ATc (A). Wachstumskurven von *M. bovis* BCG wt (B) und *M. bovis* BCG *clpP1-tetoff* (C) mit verschiedenen ATc Konzentrationen, sowie Absterbekurve von *M. bovis* BCG *clpP1-tetoff* mit höheren ATc Konzentrationen (D). In (C) und (D) sind Mittelwerte und Standardabweichungen von drei verwendeten Klonen gezeigt.

Während 2 ng/ml ATc keinen Einfluss auf das Wachstum in Wildtyp von *M. bovis* BCG hatten, führten Konzentrationen von > 0,5 ng/ml ATc in *M. bovis* BCG *clpP1-tetoff* zum Absterben des Stammes. Dieser Effekt war, abhängig von der ATc-Konzentration, unterschiedlich schnell zu beobachten. Mit 0,1 ng/ml ATc zeigte der Stamm bereits ein Wachstumsdefizit. Bei Verwendung von 0,05 ng/ml ATc war in den ersten 15 Tagen ein Wachstumsdefizit zu erkennen, das aber im Laufe der Zeit ausgeglichen wurde, bis die stationäre Phase bei einem vergleichbar hohem Cfu Niveau erreicht wurde wie in Abwesenheit von ATc. Das phänotypische Bild der Wachstumshemmung bei steigenden ATc-Konzentrationen deckt sich mit der erwarteten geringeren Expression des *clpP1P2* Operons. Um die Herunterregulierung von *clpP1P2* in *M. bovis* BCG *clpP1-tetoff* eindeutig zu beweisen, wurde die Gesamt RNA aus den Stämmen in Abwesenheit und in Anwesenheit von 0,1 ng/ml ATc isoliert. Die RNA Konzentration wurde mit Hilfe des Nano Drops gemessen (Tab. 13) und die Qualität auf einem 3 %igen Agarosegel überprüft (Abb. 35).

Tabelle 13: Konzentration der Gesamt RNA aus *M. bovis* BCG wt und den Klonen 1, 2 und 3 von *M. bovis* BCG *clpP1-tetoff* sowie die berechnete Verdünnung für die cDNA Synthese.

Probe	Konzentration [ng/μl]	Verdünnung für 0,5 μg cDNA Synthese
Wt ohne ATc	129	3,9 + 8,8 H ₂ O
Wt 0,1 ng/ml ATc	98	5,1 + 7,6 H ₂ O
K1 ohne ATc	62	8,1 + 4,6 H ₂ O
K1 0,1 ng/ml ATc	101	5 + 7,7 H ₂ O
K2 ohne ATc	100	5 + 7,7 H ₂ O
K2 0,1 ng/ml ATc	88	5,7 + 7 H ₂ O
K3 ohne ATc	120	4,2 + 8,5 H ₂ O
K3 0,1 ng/ml ATc	104	4,8 + 7,9 H ₂ O

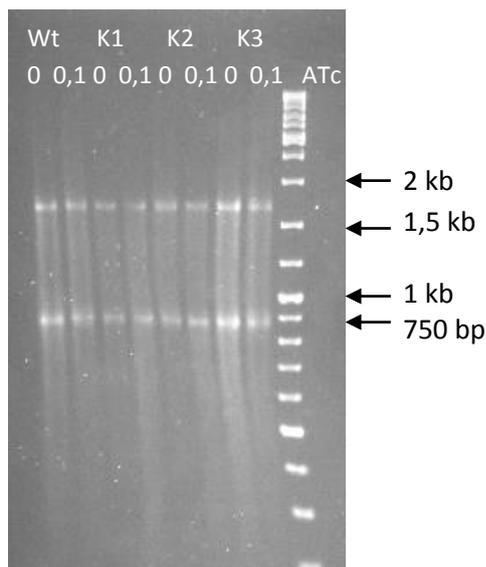


Abbildung 35: Agarosegel der isolierten Gesamt RNA aus *M. bovis* BCG wt und *clpP1-tetoff*. Als Größenstandart wurde der Generuler 1 kb dNA ladder genutzt.

Nachdem eine mögliche Kontamination der RNA durch DNA mit Hilfe von Kontroll qPCR Durchläufen ausgeschlossen werden konnte, wurde die Transkriptmenge von *clpP1P2* im wildtyp *versus clpP1-tetoff* in Anhängigkeit von ATc [0 und 0,1 ng/ml] mittels quantitativer PCR bestimmt und auf die 16s rRNA Menge normalisiert. Die Expression in den beiden Stämmen wurde ins Verhältniss zueinander gesetzt ($2^{-\Delta\Delta Ct}$). Ein Wert von 1 würde hierbei bedeuten, dass die Expression in beiden Stämmen unter den angegebenen Konditionen gleich hoch ist (Abb. 36).

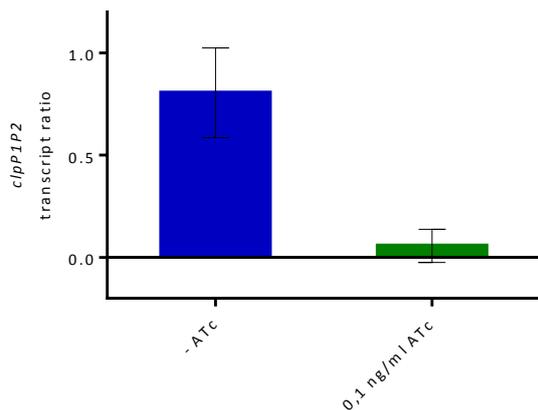


Abbildung 36: Mittels qPCR bestimmte *clpP1P2* Transkriptmenge in *M. bovis* BCG *clpP1-tetoff* im Verhältnis zur Transkriptmenge im wt. Gezeigt sind Mittelwerte und Standardabweichungen der Daten von drei verwendeten Klonen.

Während das Verhältnis der Expression von *clpP1P2* im Stamm *clpP1-tetoff* in Abwesenheit von ATc nur knapp unterhalb von 1 liegt, *clpP1P2* also nur ein wenig geringer exprimiert wird als im wt, ist in Anwesenheit von 0,1 ng/ml ATc eine deutlich geringere *clpP1P2* Transkriptmenge im Stamm *clpP1-tetoff* als im wt vorhanden. Dieser Befund geht einher mit dem geringen Wachstumsdefizit das *M. bovis* BCG *clpP1-tetoff* im Vergleich zum wt schon in Abwesenheit von ATc zeigte und dem deutlichen Wachstumsdefizit das in diesem Stamm bei Anwesenheit von 0,1 ng/ml ATc auftrat (vgl. Abb. 34). Es konnte mittels qPCR also eindeutig bewiesen werden, dass Anwesenheit von 0,1 ng/ml ATc in *M. bovis* BCG *clpP1-tetoff* zu einer deutlichen Herunterregulierung der Transkription von *clpP1P2* führt, während die Transkriptmenge im wt unabhängig von der ATc-Konzentration konstant blieb.

Im nächsten Schritt wurde überprüft, welchen Einfluss diese Herunterregulierung von *clpP1P2* in *M. bovis* BCG *clpP1-tetoff* auf die Wirksamkeit von ADEPs hat. Hierzu wurden MHK-Werte in Gegenwart von verschiedenen ATc-Konzentrationen bestimmt (Tab. 14 + Abb. 37).

Tabelle 14: MHK-Werte von ADEPs gegen *M. bovis* BCG Pasteur wt (A) und *M. bovis* BCG *clpP1-tetoff* (B) bei verschiedenen ATc Konzentrationen. Der Versuch wurde viermal unabhängig voneinander durchgeführt (n.g. = nicht gewachsen)

(A)

MHK gegen <i>M. bovis</i> BCG Pasteur wt [$\mu\text{g/ml}$]	w/o Atc	25 ng/ml Atc
ADEP2	16	16
ADEP3	16	16
ADEP4	>64	>64
Apramycin	1	1

(B)

MHK gegen <i>M. bovis</i> BCG <i>clpP1-tetoff</i> [$\mu\text{g/ml}$]	w/o Atc	0,05 ng/ml Atc	0,1 ng/ml Atc	0,2 ng/ml Atc	0,4 ng/ml Atc
ADEP2	16 (8)	8(4)	4(2)	4(0,25)	n.g.
ADEP3	8	8	8(4)	4(2)	n.g.
ADEP4	>64	>64	>64	n.g.	n.g.
Apramycin	1	1	1	1	n.g.

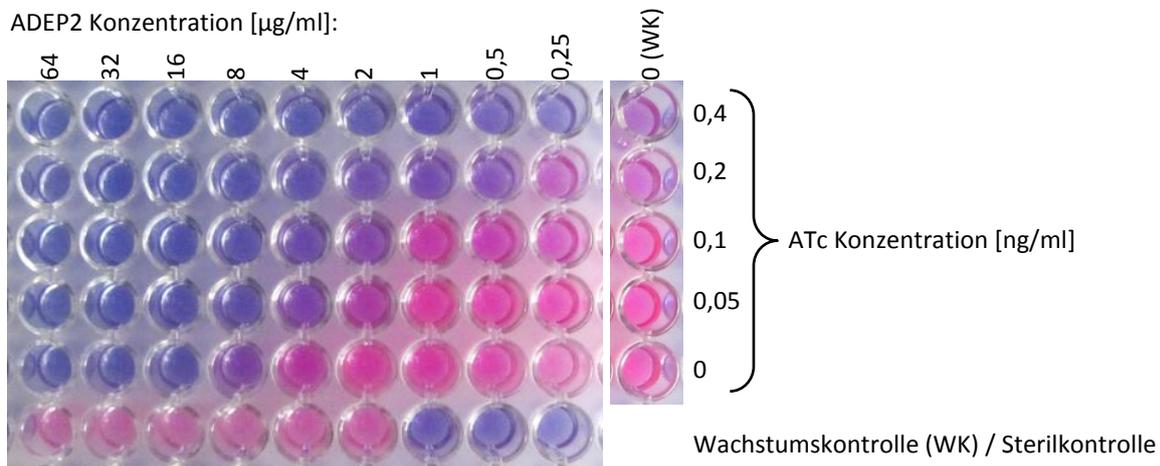


Abbildung 37: 96 Well Platte nach Durchführung eines exemplarischen Alamar Blue Assays zur Bestimmung der MHK-Werte von ADEP2 gegen *M. bovis* BCG *clpP1-tetoff* in Anwesenheit verschiedener ATc-Konzentrationen.

Beim Vergleich der MHK-Werte von ADEP2 ist deutlich zu erkennen, dass mit steigender ATc Konzentration die Wirksamkeit gegen *M. bovis* BCG *clpP1-tetoff* besser wird. Dieser Trend lässt sich weniger stark ausgeprägt auch für den MHK-Wert von ADEP3, nicht aber für den MHK-Wert des Vergleichsantibiotikums Apramycin, beobachten. Der MHK von ADEP2 und ADEP3 gegen *M. bovis* BCG Pasteur wt blieb auch bei höheren ATc-Konzentrationen [25 ng/ml] konstant. Die Verbesserung der ADEP Wirkung gegen *M. bovis* BCG *clpP1-tetoff* in Anwesenheit von ATc ist also auf die Herunterregulierung von *clpP1P2* zurückzuführen. Dies lässt den Schluss zu, dass ADEPs auch in Mykobakterien tatsächlich am Target ClpP1P2 wirken. Außerdem lässt sich ableiten, dass der Wirkmechanismus von ADEPs in Mykobakterien primär über die Ausschaltung des essentiellen Clp-Protease Komplexes und nicht über dessen Überaktivierung funktioniert, da der MHK-Wert ja mit sinkender *clpP1P2* Kopienzahl besser und nicht schlechter wird. Eine geringere Targetmenge in der Zelle führt

somit dazu, dass eine geringere ADEP Konzentration benötigt wird um eine Wirkung zu erzielen. Für *B. subtilis* ist bekannt, dass ADEP zwar auch die natürlichen Funktionen von ClpP inhibiert, aber der Zelltod eine Folge der unregulierten Überaktivierung von ClpP durch ADEPs ist, wodurch essentielle Proteine degradiert werden (Kirstein *et al.*, 2009a). Dies würde also auf einen Unterschied im Wirkmechanismus von ADEPs gegen Mykobakterien und anderen Grampositiven Bakterien hindeuten. Um dieser Hypothese nachzugehen, wurden vergleichsweise auch die MHK-Werte von ADEP2 für eine regulierbare Mutante von *B. subtilis* gemessen. Diese Versuche wurden mit dem Stamm *B. subtilis* 168-pX2-clpP (Gerth *et al.*, 2004) durchgeführt, in dem sich upstream von *clpP* ein Xylose induzierbarer Promotor befindet. Das Regulationsprinzip dieses Stammes ist in Abb. 38 schematisch dargestellt.

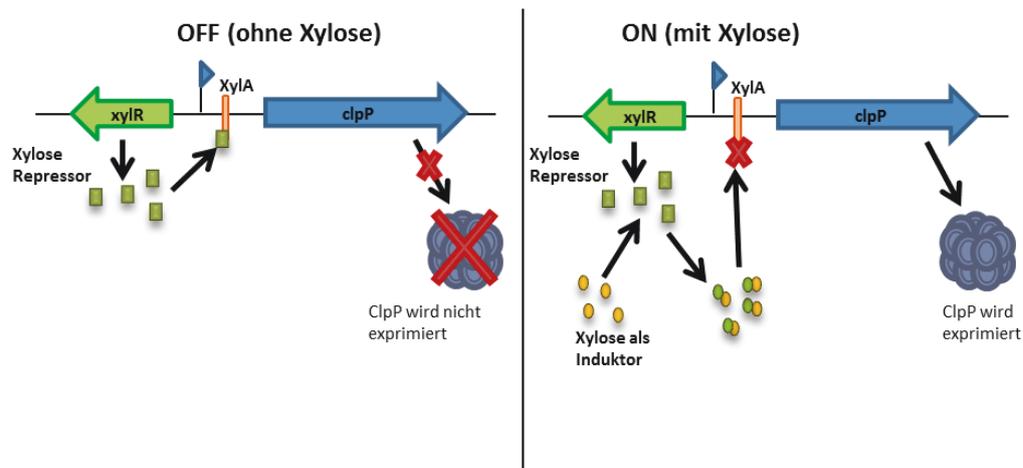


Abbildung 38: Schematische Darstellung der Funktionsweise des Stammes *B. subtilis* 168-pX2-clpP.

Bei dem Stamm *B. subtilis* 168-pX2-clpP handelt es sich um ein Xyl-on System. Die Regulation der *clpP* Expression funktioniert also im Grunde genau umgekehrt wie bei dem Tet-off System, das oben für Mykobakterien beschrieben ist. In Abwesenheit von Xylose, wird der Xylose-Repressor (*xylR*) exprimiert und bindet an den Operator vor *clpP*, so dass *clpP* nicht exprimiert wird. Ist Xylose im Medium vorhanden, so fungiert Xylose als Induktor des Systems, da sie an XylR bindet, der Repressor dadurch seine Konformation ändert und nicht mehr an den Operator binden kann. ClpP wird somit wieder exprimiert (Kim *et al.*, 1996). Die Xylose Konzentration im Medium reguliert somit die Menge an *clpP*, die exprimiert wird. Als Kontrolle wurden auch die MHK-Werte von ADEP2 gegen *B. subtilis* 168 wt, bei dem der MHK unabhängig von der Xylose Konzentration sein sollte, sowie gegen *B. subtilis* 168 Δ *clpP* bestimmt, welcher aufgrund der fehlenden Targetstruktur unabhängig von der Xylose Konzentration ADEP resistent sein sollte (Tab. 15).

Tabelle 15: MHK-Werte von ADEP2 gegen *B. subtilis* Stämme in Anwesenheit verschiedener Xylose Konzentrationen in LB Medium.

ADEP2 MHK [$\mu\text{g/ml}$]	w/o Xylose	1 % Xylose	2 % Xylose	3 % Xylose	4 % Xylose	5 % Xylose	8 % Xylose	10 % Xylose
<i>B. subtilis</i> 168 wt	0,25	0,125				0,125	0,125	0,25
<i>B. subtilis</i> 168-pX2-clpP	>32	>32	16	16	8	4	1	0,25
<i>B. subtilis</i> 168 Δ clpP	>32	>32				>32		>32

Apramycin MHK [$\mu\text{g/ml}$]	w/o Xylose	1 % Xylose	2 % Xylose	3 % Xylose	4 % Xylose	5 % Xylose	8 % Xylose	10 % Xylose
<i>B. subtilis</i> 168 wt	4	1				2		2
<i>B. subtilis</i> 168-pX2-clpP	2	1	2	2	4	2	4	4
<i>B. subtilis</i> 168 Δ clpP	2	2				2		1

Während der regulierbare Stamm *B. subtilis*-pX2-clpP in Abwesenheit von Xylose, und damit in Abwesenheit von ClpP, genau wie *B. subtilis* Δ clpP, ADEP resistent ist, führt die Zugabe von 10 % Xylose (ClpP Induktion) bei diesem Stamm zu einem MHK-Wert von ADEP2 der dem des *B. subtilis* 168 wt entspricht. Dies war nicht der Fall für das verwendete Vergleichsantibiotikum Apramycin. *B. subtilis* 168 wt blieb unabhängig von der Xylose Konzentration gleichbleibend ADEP-empfindlich. Je weniger ClpP also in *B. subtilis* vorhanden ist, desto ADEP-unempfindlicher werden die Zellen. In *B. subtilis* hat die Herunterregulierung der clpP Expression somit genau den gegenteiligen Effekt wie in *M. bovis* BCG. Dies lässt die Schlussfolgerung zu, dass in Mykobakterien die Wirkung von ADEPs hauptsächlich auf einen inhibierenden Effekt auf die natürlichen Funktionen von ClpP1P2 zurückzuführen ist, wohingegen in *B. subtilis* die unkontrollierte Überaktivierung von ClpP den hauptsächlichsten antibiotischen Effekt hervorruft.

4.3. Wirkung von ADEPs am isolierten ClpP1P2 Komplex aus *M. tuberculosis*

4.3.1. Einfluss auf die Peptidase-Aktivität

Während ClpP aus verschiedenen anderen Organismen ein relativ gut beschriebenes Protein ist, war über das mykobakterielle ClpP1 und ClpP2 lange Zeit nicht viel bekannt. Nachdem im Jahr 2007 die Kristallstruktur von ClpP1 gelöst wurde (Ingvarsson *et al.*, 2007), schlugen einige Versuche dieses Enzym zu aktivieren fehl, bis schließlich beschrieben wurde, dass sowohl MTB ClpP1 als auch MTB ClpP2 inaktiv sind (Benaroudj *et al.*, 2011). Unsere Kooperationspartner fanden aber heraus, dass verschiedene Aktivatorpeptide, wie das Dipeptid Z-LL zur Ausbildung eines enzymatisch aktiven Komplexes führen, wobei sich dabei ein gemischter Komplex mit einem Ring ClpP1 und einem Ring ClpP2 ausbildet (Akopian *et al.*, 2012). Um den Effekt von ADEPs am isolierten Target zu charakterisieren, war die erste Fragestellung, ob ADEPs den aktivierenden Effekt von Z-LL ersetzen können. Dazu wurden zunächst MTB ClpP1, MTB ClpP2 und im 1:1 Verhältnis gemischtes MTB ClpP1 mit MTB ClpP2

in einen Peptidverdauassay mit Z-GGL-AMC als Substrat in Gegenwart von 129 μM ADEP8 und ohne ADEP eingesetzt (Abb.39).

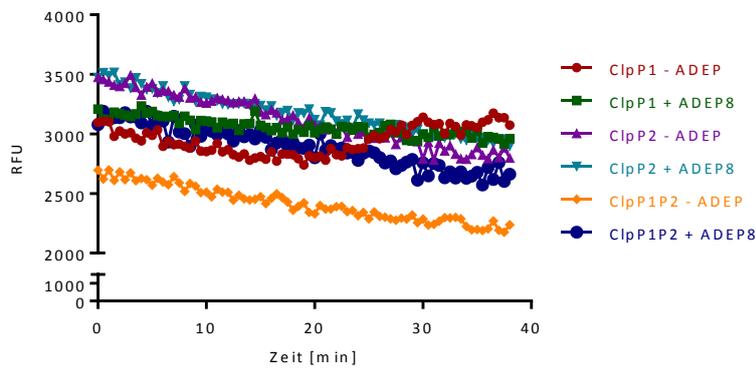


Abbildung 39: Verdau von Z-GGL-AMC mit MTB ClpP1, ClpP2 oder ClpP1P2 ohne vorherige Aktivierung mit Z-LL. Gezeigt ist ein repräsentativer Versuch.

Bei enzymatischer Hydrolyse des Peptids wird der AMC Fluorophor frei und lässt sich durch einen Anstieg der Fluoreszenz detektieren. In diesem Versuch konnte aber in keinem der Ansätze Aktivität gemessen werden. Das bedeutet, dass Z-LL nicht durch ADEP ersetzt werden kann um eine der MTB ClpP Varianten oder das Gemisch aus ClpP1 und ClpP2 zu aktivieren. Für weitere Peptid Abbauversuche wurde also der ClpP1P2 Komplex zunächst durch Vorinkubation mit Z-LL aktiviert, wie es kürzlich beschrieben wurde (Akopian *et al.*, 2012) und ADEP wurde zusätzlich hinzugegeben. Zunächst wurde mit dem aktiviertem MTB ClpP1P2/Z-LL-Komplex in Anwesenheit von 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ verschiedener ADEP Derivate erneut ein Z-GGL-AMC Abbauassay durchgeführt (Abb. 40).

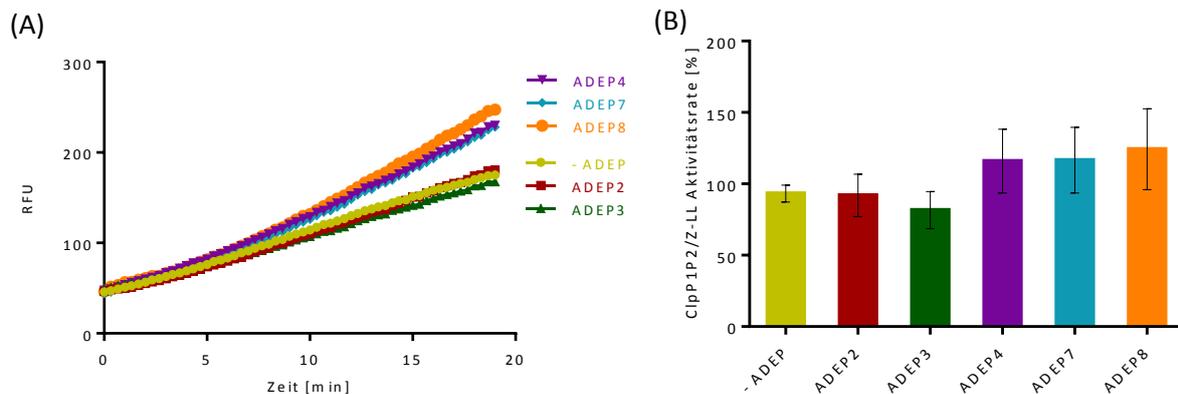


Abbildung 40: zeitlicher Verlauf des Abbaus von Z-GGL-AMC mit MTB ClpP1P2/Z-LL in Anwesenheit und Abwesenheit verschiedener ADEP Derivate (A). Aus den ersten, linearen 5 min von (A) berechnete Peptidase Aktivitätsraten (B). In (B) sind Mittelwerte und Standardabweichungen von drei biologisch unabhängigen Versuchen gezeigt.

In Anwesenheit von ADEP 4, 7 und 8 ließ sich hierbei nur eine bis zu 20 %ige Steigerung der Peptidase Aktivitätsrate erkennen, welche sich aus der Reaktionsgeschwindigkeit während des initialen, linearen Bereich des Assays ergibt. ADEP2 und 3 zeigten dagegen keinen Effekt.

Dieser geringe Effekt von ADEPs auf die Peptidaseaktivität entspricht den Erwartungen, da ADEP im Falle von MTB ClpP nicht zur Oligomerisierung benötigt wird und weil die Zugabe von Z-LL allein bereits zur Ausbildung eines enzymatisch aktiven Komplexes ausreicht (Akopian *et al.*, 2012). Außerdem ist der Durchmesser der Eintrittspore bei allen bisher beschriebenen ClpP Oligomeren bereits im geschlossenen Zustand groß genug, damit kleine Substrate, wie das hier verwendete Tipeptid bis zum aktiven Zentrum gelangen. Der Porendurchmesser für den MTB ClpP1P2 Komplex ist nicht bekannt, scheint aber zumindest groß genug zu sein, damit kleine Tripeptide bis zum aktiven Zentrum gelangen können.

Um der Frage nachzugehen, ob ADEPs auch bei mykobakteriellem ClpP1P2 die Pore, analog zu der beschriebenen Porenöffnung bei *B. subtilis* und *E. coli* ClpP (Lee *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2010) erweitern, wurde ein weiterer Abbaubersuch mit längeren Peptiden durchgeführt (Abb. 41). Hierzu wurde die „FRET Substrate 25Xaa library“ verwendet, in der 475 verschiedene Peptide enthalten sind, die aus je 11 Aminosäuren bestehen.

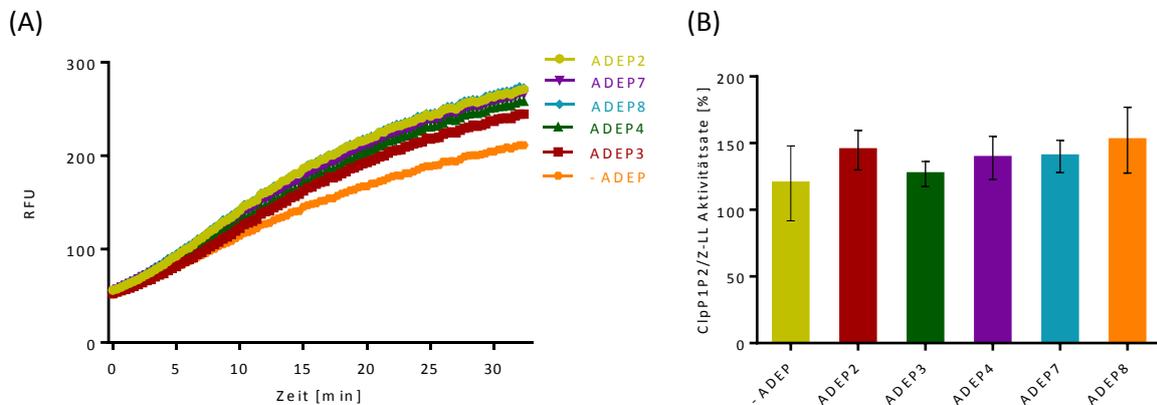


Abbildung 41: Zeitlicher Verlauf des Abbaus der „FRET 25Xaa substrate library“ mit MTB ClpP1P2/Z-LL in Anwesenheit und Abwesenheit verschiedener ADEP Derivate (A). Aus den ersten, linearen 5 min von (A) berechnete Peptidase Aktivitätsraten (B). In (B) sind Mittelwerte und Standardabweichungen von zwei biologisch unabhängigen Versuchen gezeigt.

In diesem Versuch führten alle getesteten ADEP Derivate maximal zu 30 % Überaktivierung der Peptidaseaktivität. Da auch bei den längeren Peptidsubstraten auch in Abwesenheit von ADEPs schon Peptidaseaktivität zu beobachten war und nur ein geringer Effekt durch Zugabe von ADEPs zu beobachten war, scheint die Eintrittspore zum katalytischen Zentrum von MTB ClpP1P2/Z-LL auch ohne ADEP schon weit genug geöffnet zu sein, damit solche 11 Aminosäure langen Peptide eintreten können. Im Gegensatz hierzu wurde für *E. coli* ClpP (EC ClpP) gezeigt, dass das 10 Aminosäuren lange Peptid F-V in Abwesenheit von ADEPs oder Clp-ATPase nicht hydrolysiert werden konnte, wohingegen Zugabe von ADEP1 EC ClpP für den Abbau dieser längeren Peptide 50fach aktivierte (Li *et al.*, 2010). Der Vergleich dieser Daten, deutet an, dass die Eintrittspore von MTB ClpP1P2/Z-LL größer zu sein scheint, als die Eintrittspore zu EC ClpP und ADEPs deshalb einen geringeren Effekt auf MTB ClpP1P2/Z-LL haben könnten. Im nächsten Schritt wurde nach größeren Peptidsubstraten gesucht. Hierzu wurden die „three generation peptides“ als Substrat verwendet, die ursprünglich

synthetisiert worden waren, um die Eingangspore zum Proteasom zu blockieren und gleichzeitig als Substrat für die HIV1 Protease dienen (Buckley *et al.*, 2011). Die Struktur dieser drei Peptide ist in Abb. 13 dargestellt. Während die erste Generation nur drei Lysin-Reste am C-Terminus aufweist, hat die zweite Generation 7 Lysin-Reste und die dritte Generation des Peptids 15 Lysin-Reste. An der zweiten und dritten Generation des Peptids sind somit immer mehr verzweigte Lysin Reste angekoppelt, wodurch das Molekül immer breiter und positiver geladen wird. Am N-Terminus der Peptide befindet sich das Fluorophor AMC, wodurch der Abbaussay mit MTB ClpP1P2/Z-LL analog zu den anderen Peptidaseassays durchgeführt werden konnte (Abb. 42).

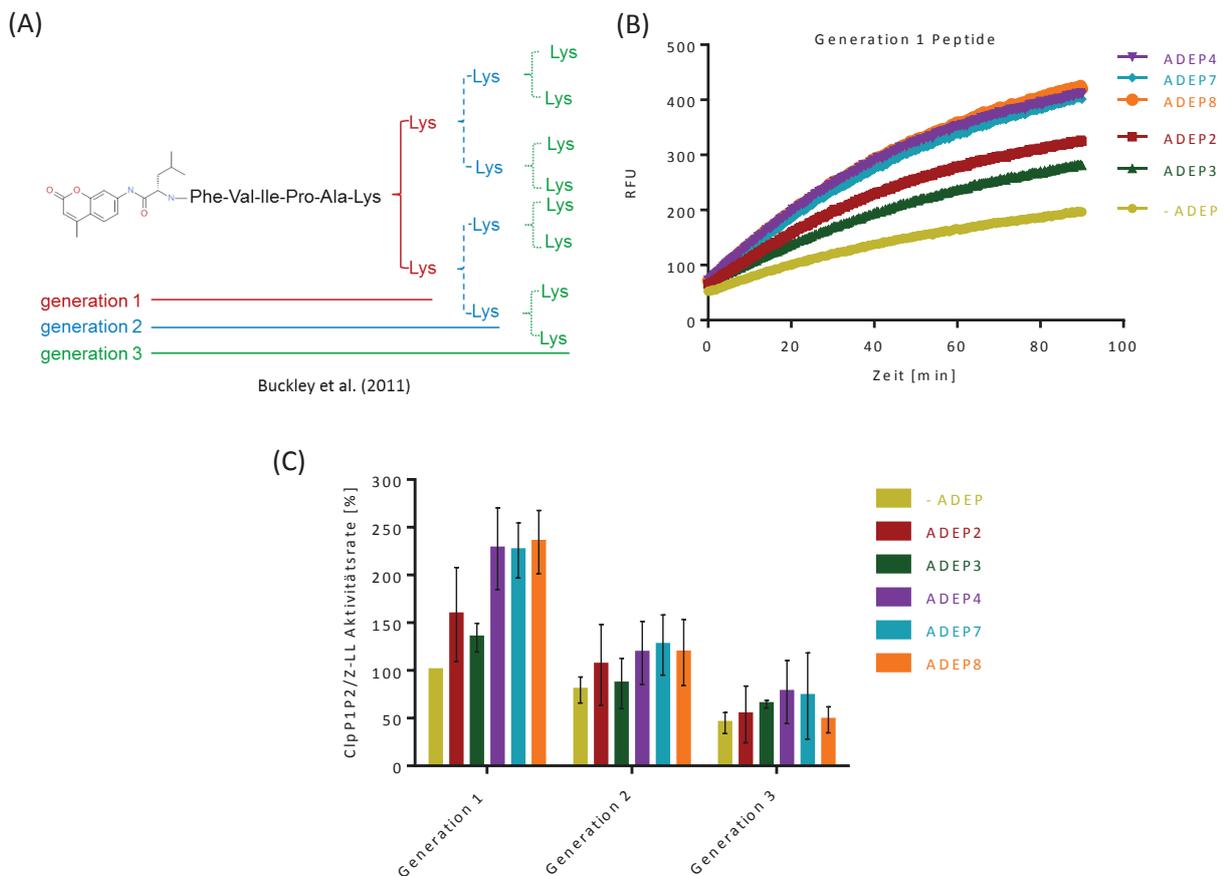


Abbildung 42: Struktureller Aufbau der „three generation peptides“ (A). repräsentativer Verlauf des Abbaus der ersten Generation des Peptids mit MTB ClpP1P2/Z-LL in Abwesenheit und Anwesenheit verschiedener ADEP Derivate (B). Aktivitätsraten von MTB ClpP1P2/Z-LL beim Abbau der drei verschiedenen Generationen der „three generation peptides“ in Abwesenheit und Anwesenheit verschiedener ADEP-Derivate (C). Die Aktivitätsrate des Verdauens der ersten Generation mit MTB ClpP1P2 ohne ADEP wurde hierbei auf 100 % gesetzt. Gezeigt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von zwei biologisch unabhängigen Versuchen, die jeweils in Duplikaten durchgeführt wurden.

Der Abbau der ersten Generation dieser Peptide zeigt mit ADEP2 und 3 eine ca 30 - 50 %ige Steigerung der Aktivität von MTB ClpP1P2/Z-LL, während ADEP 4, 7 oder 8 sogar zu einer ca. 2 - 3 fach höheren MTB ClpP1P2 Aktivitätsrate führten. Anwesenheit von ADEPs und damit Öffnen der Eintrittspore zu den katalytischen Zentren scheint daher für den Verdau der

ersten Generation der „3-generation-peptides“ eine günstige Wirkung zu haben. Der Abbau der zweiten und dritten Generation dieser Peptide kann jedoch nur noch sehr schwach durch ADEPs aktiviert werden und auch die Aktivitätsraten von MTB ClpP1P2/Z-LL in Abwesenheit von ADEP sind geringer für diese höher verzweigten Substrate. Dies kann zum einen daran liegen, dass die Peptide der zweiten und dritten Generation auch für den ClpP1P2 Komplex, dessen Pore schon durch ADEP geöffnet wurde zu breit sind, zum anderen könnte aber auch eine zu hohe positive Ladung des Substrates die Proteaseaktivität stören. Anhand der ausladenden Peptidsubstrate der 1. und 2. Generation lässt sich also zeigen, dass ADEPs auch im mykobakteriellen ClpP eine Porenöffnung bewirken. Ein genauer Rückschluss auf die Größe der Eintrittspore von MTB ClpP1P2 lässt sich somit auf Grundlage der vorliegenden Daten allerdings nicht treffen, da die „three-generation peptides“ in so vielen verschiedenen Konformationen vorliegen können, dass man keine Aussage über die genauen Ausmaße dieser Substrate treffen kann.

Zusammenfassend lässt sich schlussfolgern, dass ADEPs wie erwartet einen geringen aktivierenden Effekt auf die MTB ClpP1P2/Z-LL Peptidaseaktivität beim Abbau kleinerer Peptide haben, sich bei komplexen Peptidsubstraten die Porenöffnung durch ADEPs aber aktivierend auswirkt. Dieser Effekt tritt jedoch nur bis zu einer gewissen Substratgröße auf. Ist aber das Substrat sterisch zu anspruchsvoll, so wird die Pore verstopft und ADEP kann die enzymatische Aktivität nicht steigern. Die beste Wirkung an MTB ClpP1P2/Z-LL haben die Derivate ADEP4, 7 und 8.

4.3.2. Einfluss auf den Verdau von Casein

Ein häufig verwendetes Modellsubstrat zur Bestimmung von Proteaseaktivitäten ist das Milchprotein β -Casein, welches eine fast ungefaltete Struktur hat. Für ClpP des Grampositiven Modellorganismus, *B. subtilis* wurde bereits gezeigt, dass β -Casein in Anwesenheit von ADEPs verdaut werden kann (Brötz-Oesterhelt *et al.*, 2005), da ADEPs die Eintrittspore zum katalytischen Zentrum der Protease weit genug öffnen können (Lee *et al.*, 2010). In dieser Arbeit wurde dies für MTB ClpP1P2/Z-LL zunächst anhand von unmarkiertem β -Casein bestätigt (Abb. 43).

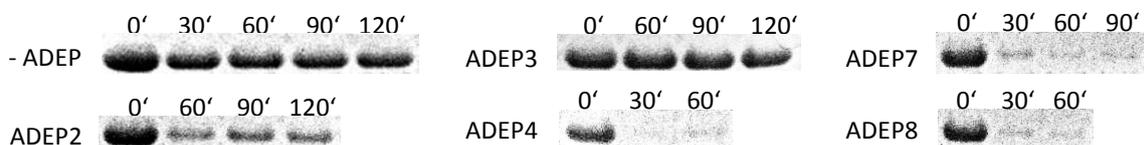


Abbildung 43: SDS-PAGE des Verdaus von unmarkiertem β -Casein mit MTB ClpP1P2/Z-LL in Abwesenheit und Anwesenheit verschiedener ADEP Derivate. Gezeigt ist ein repräsentativer Versuch von drei biologisch unabhängigen Replikaten.

Während MTB ClpP1P2/Z-LL in Abwesenheit von ADEPs innerhalb von 2 h Inkubationszeit das β -Casein nicht abbauen konnte, wurde es in Anwesenheit von ADEP4, 7 und 8 innerhalb von 30 min fast vollständig hydrolysiert. Auch die Anwesenheit von ADEP2 führte zum Abbau

von β -Casein, der allerdings langsamer verlief. ADEP3 scheint MTB ClpP1P2/Z-LL nicht in sichtbarem Maße zum Abbau von unmarkiertem Casein aktivieren zu können.

Um den Caseinabbau durch MTB ClpP1P2 kinetisch zu charakterisieren, wurden Versuche mit Fluoresceinisothiocyanat (FITC) markiertem Casein durchgeführt.

Zunächst wurde kontrolliert, ob ADEPs die Proteaseaktivität, anders als die Peptidaseaktivität von MTB ClpP, auch ohne die vorherige Inkubation mit Z-LL, aktivieren können. Es wurden FITC-Casein Abbauprobungen mit MTB ClpP1, MTB ClpP2 und zuvor 1:1 gemischtem MTB ClpP1P2 in Abwesenheit und Anwesenheit von ADEP8 angesetzt, wobei in keinem der Ansätze eine Proteaseaktivität detektiert werden konnte. Auch für weitere Untersuchungen der Proteaseaktivität von MTB ClpP1P2 wurde daher das Enzym zunächst in Anwesenheit von Z-LL aktiviert und erst dann in die FITC-Casein Abbauprobungen eingesetzt (Abb. 44).

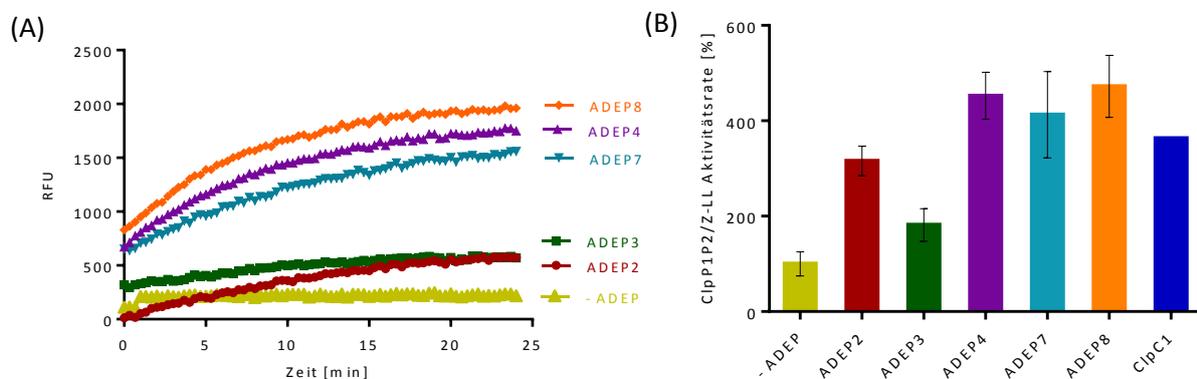


Abbildung 44: Zeitlicher Verlauf des Abbaus von FITC-Casein mit MTB ClpP1P2/Z-LL in Anwesenheit und Abwesenheit verschiedener ADEP Derivate (A). Aus den ersten, linearen 5 min von (A) berechnete Peptidase Aktivitätsraten (B). In (B) sind Mittelwerte und Standardabweichungen von drei biologisch unabhängigen Versuchen gezeigt.

Wie auch schon bei den Peptidaseassays zu erkennen war, hatten ADEP4, 7 und 8 auch im Proteaseassay die stärkste aktivierende Wirkung auf MTB ClpP1P2/Z-LL, wobei sie zu einer 4-5 fachen Steigerung der Proteaseaktivität und somit sogar zu einer etwas höheren Aktivitätsrate führen als es bei Anwesenheit der Clp-ATPase ClpC1 der Fall ist. ADEP2 und 3 führen dagegen erneut nur zu einer geringeren Überaktivierung.

Weiterhin wurde untersucht, ob die Wirkung von ADEPs an MTB ClpP1P2/Z-LL konzentrationsabhängig ist. Hierzu wurden Protease Aktivitätsassays durchgeführt, bei denen die ADEP Konzentration variiert wurde. Die berechneten Aktivitätsraten wurden gegen die ADEP Konzentration aufgetragen. Exemplarisch ist hier das Diagramm für das am stärksten aktivierende Derivat, ADEP8 gezeigt (Abb. 45).

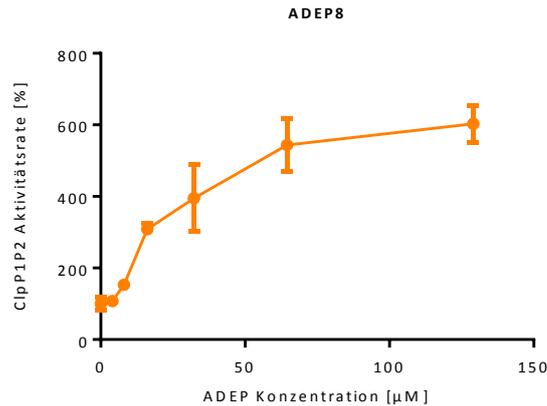


Abbildung 45: Der aktivierende Effekt von ADEP8 auf den FITC-Casein Abbau von ClpP1P2/Z-LL ist konzentrationsabhängig. Gezeigt sind Mittelwerte und Standardabweichung von zwei biologisch unabhängigen Versuchen. Die basale Aktivitätsrate ohne ADEP wurde auf 100% gesetzt.

Für ADEP 8 war eine klare Konzentrationsabhängigkeit zu erkennen. Für die halbmaximale Aktivierung des Komplexes benötigt man aber etwa 25 µM ADEP8. Da 3 µM ClpP1P2 eingesetzt wurden, entspricht dies einem Verhältnis von 8 Molekülen ADEP8 auf 1 Monomer von ClpP1 oder ClpP2. Anders ausgedrückt wären 112 ADEP8 Moleküle pro Tetradekamer des MTB ClpP1P2-Komplexes nötig, um die halbmaximal mögliche Aktivierung zu erzielen. Das ist deutlich mehr als in vorangegangenen Arbeiten benötigt wurde, um gleiche Effekte an *B. subtilis* oder *E. coli* ClpP zu erzielen. Dies könnte auf eine ungewöhnlich niedrige Affinität von ADEPs zum MTB ClpP1P2 Komplex hindeuten. Auffällig ist auch die leicht sigmoidale Form der Kurve, was dafür spricht, dass die Bindung von ADEP an den ClpP1P2/Z-LL-Komplex zumindest eine geringe positive Kooperativität aufweist, bei der die Bindung weiterer ADEP Moleküle begünstigt wird, wenn zuvor schon welche gebunden haben.

Es lässt sich also zusammenfassen, dass ADEPs die Proteaseaktivität von MTB ClpP1P2/Z-LL aktivieren. Besonders die Derivate ADEP4, 7 und 8 scheinen hierfür gut geeignet zu sein. Grundsätzlich ist eine Aktivität sowohl mit als auch ohne ADEP aber nur in Gegenwart des Aktivatorpeptids Z-LL möglich, was bedeutet, dass die Aktivierung des Enzyms durch ADEP einen anderen Mechanismus hat als Aktivierung durch Z-LL und dass Z-LL daher nicht durch ADEP ersetzt werden kann.

Weiterhin ist aber auch zu bedenken, dass der MTB ClpP1P2/Z-LL-Komplex zwar von ADEPs zum Caseinverdau aktiviert wird, dass dies allerdings in weitaus geringeren Maßen zutrifft, als es unter diesen Konditionen für ClpP von *B. subtilis* der Fall ist (Abb. 46).

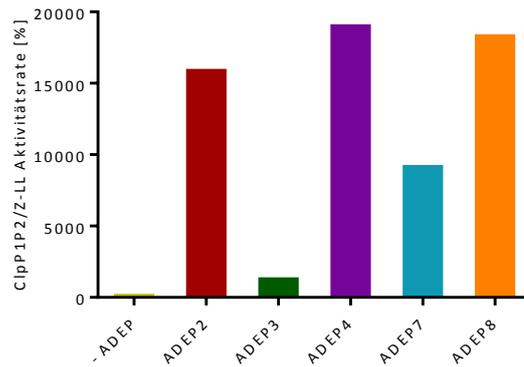


Abbildung 46: Aktivierung von ClpP aus *B. subtilis* durch ADEPs zum Caseinverdau. Gezeigt ist ein repräsentativer Durchlauf des Versuches.

In Gegenwart von sättigenden Konzentrationen von ADEP2, 4 und 8 wird ClpP von *B. subtilis* (BS ClpP) bis zu 1800-fach aktiviert. Ein entscheidender Unterschied ist definitiv, dass ClpP von *B. subtilis* ohne die Anwesenheit von ADEPs komplett inaktiv im Caseinverdau ist, wohingegen MTB ClpP1P2/Z-LL bereits mit geringen Raten Casein verdauen kann. Unbekannt ist hierbei aber, ob dies das natürliche Verhalten von MTB ClpP1P2 ist, was zum Beispiel an einer weiter geöffneten Eintrittspore zum katalytischen Zentrum oder einem stabilerem aktiven Tetradekamer liegen könnte, oder ob es nur an der Anwesenheit des Aktivatorpeptids Z-LL liegt. Im Zusammenhang mit Z-LL ist zudem zu bedenken, dass es als Inhibitor von anderen Proteasen wie Calpain und dem Proteasom bekannt ist (Tsubuki *et al.*, 1996). Daher wäre auch denkbar, dass Z-LL zwar benötigt wird um das Enzym überhaupt zu aktivieren, es aber eventuell auch zusätzliche inhibierende Effekte haben könnte. Um dieser Frage nachzugehen wurde ein FITC-Casein-, sowie ein suc-LY-AMC Abbauassay mit ClpP von *B. subtilis* in Anwesenheit von ADEP8 und Z-LL durchgeführt (Abb. 47).

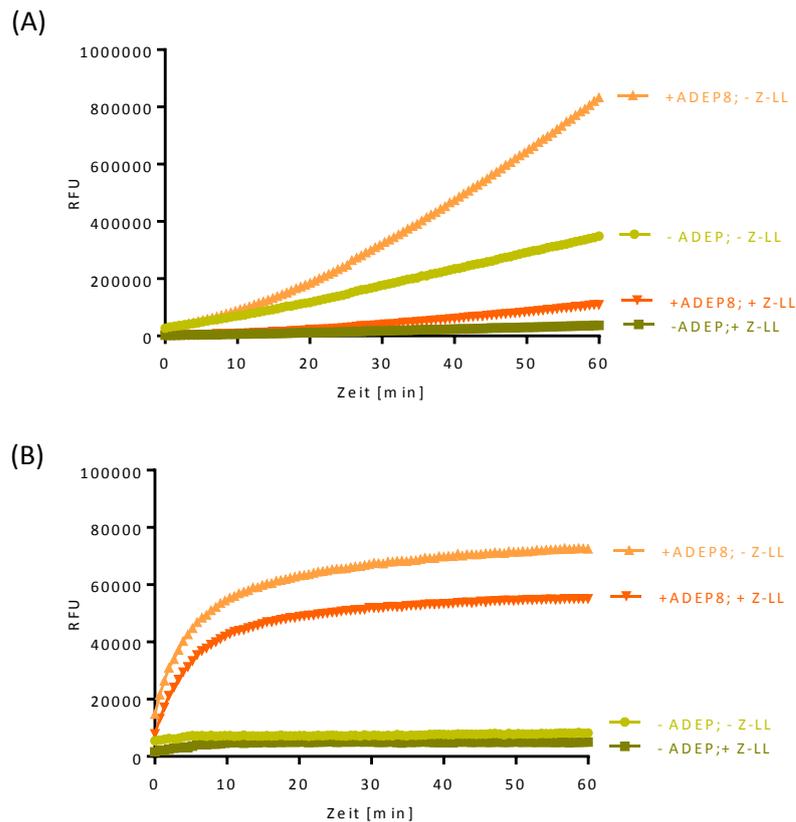


Abbildung 47: Verdau von suc-LY-AMC (A) und FITC-Casein (B) mit BS ClpP in Abwesenheit und Anwesenheit von ADEP8 und/oder Z-LL. Gezeigt ist je ein repräsentativer Durchlauf des Versuches.

In diesen Ansätzen wurde deutlich, dass Z-LL sowohl die Peptidaseaktivität von BS ClpP in Abwesenheit und Anwesenheit von ADEP, als auch die Proteaseaktivität von BS ClpP in Anwesenheit von ADEP8 hemmt. Es wäre somit denkbar, dass auch der MTB ClpP1P2 Komplex von Z-LL gehemmt wird, obwohl Z-LL scheinbar zunächst zur Aktivierung benötigt wird und auch Heraustitrieren von Z-LL zur direkten Inaktivierung des Enzyms führte (Akopian *et al.*, 2012). Für einen zusätzlichen hemmenden Einfluss von Z-LL auf MtbClpP1P2 könnte auch sprechen, dass sich die Proteaseaktivität des Komplexes selbst in Gegenwart der zugehörigen Clp-ATPase, ClpC1, nur auf das 3-Fache anheben lässt (vgl. Abb. 44). Durch Anwesenheit von ADEP 8 wurde dieser Effekt sogar noch überschritten.

4.3.3. Einfluss von ADEPs auf den Verdau anderer Proteine

Neben dem Verdau des Modellsubstrates Casein wurde weiterhin versucht, auch andere Proteine mit MTB ClpP1P2/Z-LL unter Einfluss von ADEPs abzubauen. Ein nativ ungefaltetes Protein, das zuvor noch nie als Modellsubstrat für ClpP genutzt wurde, ist das eukaryotische mikrotubuli-assoziierte Tau Protein. Tau liegt im zentralen Nervensystem verschiedener Säugetiere vor und wird vom Proteasom abgebaut, ohne dass zuvor eine Ubiquitinierung nötig ist (David *et al.*, 2002). Von den verschiedenen Isoformen des Tau-Proteins wurde in dieser Arbeit die humane Isoform 2 verwendet, welche die längste humane Isoform ist. Ein Abbauassay wurde sowohl mit BS ClpP als auch mit MTB ClpP1P2/Z-LL durchgeführt (Abb. 48).

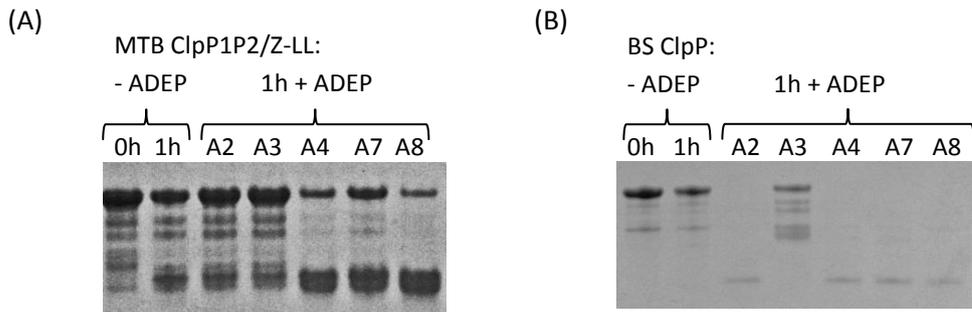


Abbildung 48: SDS-PAGE des Verdaus der Isoform 2 des humanen Tau Proteins mit BS ClpP und MTB ClpP1P2/Z-LL in Abwesenheit und Anwesenheit verschiedener ADEP Derivate. Gezeigt ist ein repräsentativer Versuch von drei biologisch unabhängigen Replikaten. (A2 = ADEP2, A3 = ADEP3, A4 = ADEP4, A7 = ADEP7, A8 = ADEP8)

Sowohl BS ClpP, als auch MTB ClpP1P2/Z-LL konnten in Anwesenheit von ADEPs die Isoform 2 des humanen Tau Proteins verdauen. Während bei BS ClpP ADEP2, 4, 7 und 8 zu einer Aktivierung des Abbaus von Tau führte, war dies bei MTB ClpP1P2/Z-LL mit ADEP2 nicht im sichtbaren Rahmen möglich, aber ADEP4, 7 und 8 aktivierten auch das mykobakterielle Enzym zum Abbau von Tau. ADEP3 führte bei den ClpP Enzymen beider Organismen nicht zu einem sichtbaren Effekt. Auffällig ist außerdem, dass MTB ClpP1P2/Z-LL wieder eine basale Proteaseaktivität in Abwesenheit von ADEPs zeigt, was bei BS ClpP nicht beobachtet werden kann. Um dem Phänomen der basalen Proteaseaktivität von MTB ClpP1P2/Z-LL nachzugehen, wurde außerdem ein Assay angesetzt, in dem der Verdaus einer verkürzten Variante des Tau Proteins (K18) (von Bergen *et al.*, 2001), in Abwesenheit von ADEPs und in Anwesenheit von ADEP4 untersucht wurde (Abb. 49).

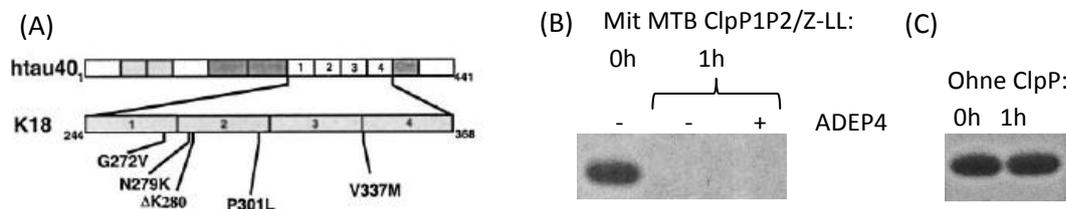


Abbildung 49: Modell der K18 Mutante (124 Aminosäuren lang) des humanen Tau Proteins (441 Aminosäuren lang) (von Bergen *et al.*, 2001) (A). SDS-PAGE des Verdaus von K18 mit MTB ClpP1P2/Z-LL in Abwesenheit und Anwesenheit von ADEP4 (B). In Abwesenheit von ClpP bleibt K18 während der Inkubationszeit stabil (C). Gezeigt ist je ein repräsentativer Durchlauf des Versuches.

Bereits ohne den Einsatz von ADEPs konnte MTB ClpP1P2/Z-LL diese verkürzte Mutante des Tau Proteins innerhalb von 1 h vollständig degradieren. Ein ungefaltetes Protein mit der Länge von 124 Aminosäuren scheint also durch die Eingangspore zum katalytischen Zentrum von MTB ClpP1P2/Z-LL gelangen zu können, ohne dass ADEPs die Pore dazu weiter öffnen müssen.

Des Weiteren wurde in dieser Arbeit der Abbau des Zellteilungsproteins FtsZ getestet, welches das bisher am ausführlichsten untersuchte natürliche Substrat des ADEP-ClpP Komplexes in *B. subtilis* und *S. aureus* ist (Sass *et al.*, 2011). Es handelt sich hierbei um ein gut strukturiertes und kompakt gefaltetes Protein. Zunächst wurden MTB FtsZ und BS FtsZ

mit Hilfe eines His-tags über Ni-NTA Säulen aufgereinigt und anschließend in einen Abbauassay mit MTB ClpP1P2/Z-LL eingesetzt. (Abb. 50).

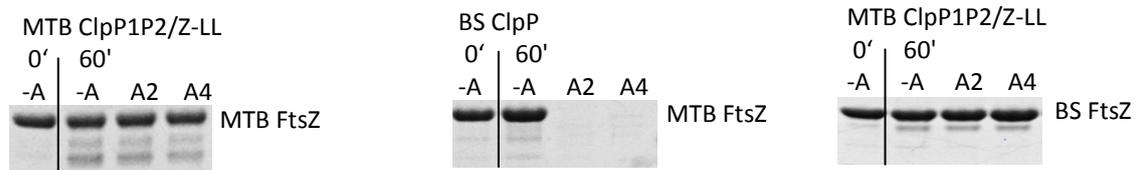
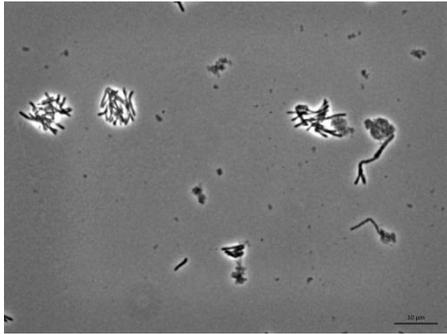


Abbildung 50: SDS-PAGE des Verdauens von FtsZ aus *M. tuberculosis* und *B. subtilis* mit MTB ClpP1P2/Z-LL oder BS ClpP. A2 = ADEP2; A4 = ADEP4. Gezeigt ist je ein repräsentativer Durchlauf des Versuches.

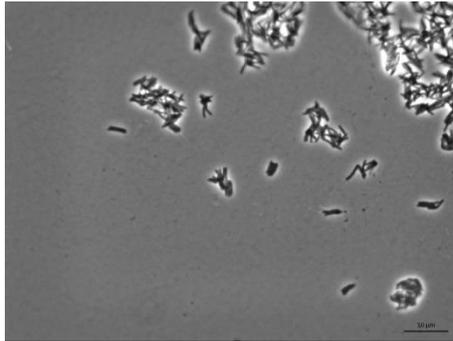
Es zeigte sich das FtsZ von MTB ClpP1P2/Z-LL in Abwesenheit von ADEPs innerhalb von 1 h schon in geringem Maße abgebaut wurde (Abb.22), was ungewöhnlich ist, da dies weder mit BS ClpP noch mit ClpP aus *S. aureus* (SA ClpP) möglich war (Sass *et al.*, 2011). Wie schon beim Caseinverdau, deutet dieses Ergebnis erneut darauf hin, dass die Eintrittspore zum katalytischen Zentrum von MTB ClpP1P2/Z-LL schon weiter geöffnet ist, als dies bei ClpP von anderen bisher untersuchten Spezies der Fall war. Allerdings lässt sich aufgrund der bisherigen Datenlage nicht beurteilen, ob dies an dem mykobakteriellen Enzym selbst oder an der Anwesenheit von Z-LL im *in vitro* System liegt. Weiterhin zeigte in den untersuchten Assays die Anwesenheit von verschiedenen ADEP-Derivaten keinen Effekt auf den Verdau von FtsZ durch MTB ClpP1P2/Z-LL, wohingegen BS ClpP auch das MTB FtsZ in Anwesenheit von ADEPs komplett verdauen konnte. Auch BS FtsZ konnte von MTB ClpP1P2/Z-LL in Anwesenheit von ADEPs nicht wesentlich abgebaut werden. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass FtsZ zumindest *in vitro* kein Target für den Komplex aus MTB ClpP1P2/Z-LL mit ADEPs ist und dass dies an Besonderheiten des mykobakteriellen ClpP1P2 Komplexes liegt und nicht an Besonderheiten des mykobakteriellen FtsZ, da dieses von BS ClpP genauso effektiv verdaut werden kann wie BS FtsZ.

Des Weiteren wurde untersucht, ob FtsZ auch in mykobakteriellen Zellen kein Target für ADEP aktiviertes MTB ClpP1P2 ist. Zunächst wurden in diesem Zusammenhang *M. bovis* BCG Kulturen mit verschiedenen ADEP Konzentrationen inkubiert und nach 10 Tagen mikroskopiert (Abb. 51), um zu untersuchen ob die Zellen filamentieren wie es für das ebenfalls stäbchenförmige Modellbakterium *B. subtilis* beobachtet worden war (Brötz-Oesterhelt *et al.*, 2005). Der Grund für diese Filamentierung von *B. subtilis* ist die gehemmte Zellteilung durch Verdau von FtsZ mit ADEP aktiviertem ClpP (Sass *et al.*, 2011).

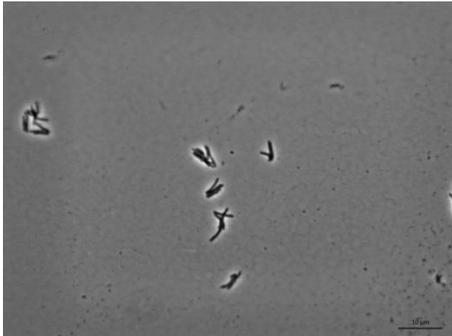
w/o ADEP2 Tag 10 :



4 µg/ml ADEP2 Tag10:



8 µg/ml ADEP2 Tag11 :



16 µg/ml ADEP2 Tag12:

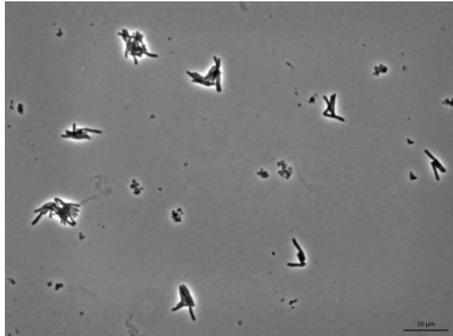


Abbildung 51: Mikroskopische Bilder von *M. bovis* BCG nach Inkubation mit verschiedenen ADEP2 Konzentrationen.

Im Falle von *M. bovis* BCG konnte bei keiner verwendeten ADEP2 Konzentration eine Filamentierung der Bakterien beobachtet werden. Der Versuch wurde mit 16 µg/ml ADEP2 wiederholt und dabei jeden Tag Proben mikroskopiert, aber erneut waren zu keinem Zeitpunkt filamentierte Bakterien zu beobachten. Zusätzlich wurden Proteinlysate von den *M. bovis* BCG Kulturen, die mit verschiedenen ADEP2 Konzentrationen angezogen wurden, hergestellt und Western-Blots durchgeführt die mit Antiserum gegen MTB FtsZ behandelt wurden (Abb. 52).

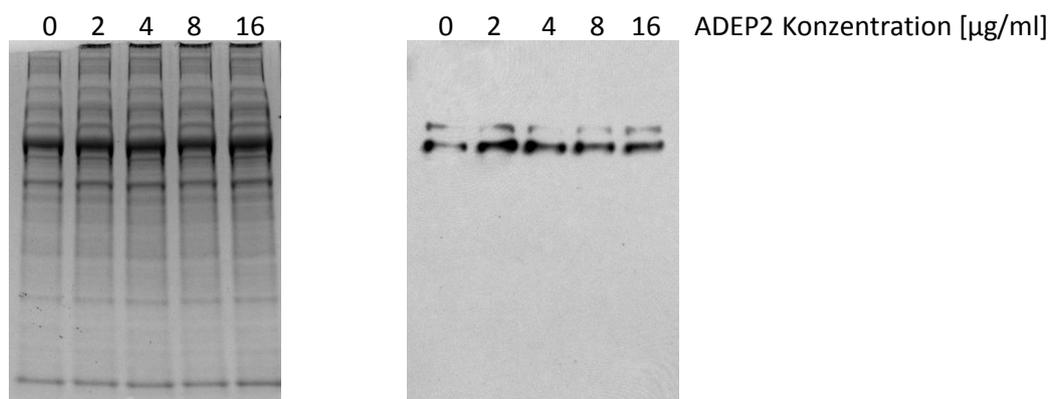


Abbildung 52: SDS-PAGE und Western Blot zum Detektieren von FtsZ in den Lysaten von *M. bovis* BCG in Abwesenheit und Anwesenheit verschiedener ADEP Derivate. Gezeigt ist ein repräsentativer Durchlauf von drei biologisch unabhängigen Versuchen.

Auch hier ließ sich bei gleicher Lysat Konzentration, keine deutliche Abweichung der Menge an FtsZ in Abwesenheit oder Anwesenheit von verschiedenen ADEP2 Konzentrationen detektieren, woraus sich schlussfolgern lässt, dass FtsZ auch in der mykobakteriellen Zelle in Anwesenheit von ADEPs nicht abgebaut wird.

Zusammenfassend wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass ADEPs MTB ClpP1P2/Z-LL zum Proteinverdau aktivieren können, dies aber nur in Anwesenheit von Z-LL möglich ist. Das für andere Bakterien beschriebene Substrat des ADEP-ClpP Komplexes, FtsZ, wird weder in *in vitro* Abbauassays mit isoliertem MTB ClpP1P2/Z-LL-Komplex, noch in der mykobakteriellen Zelle in Anwesenheit von ADEPs abgebaut. Der MTB ClpP1P2-ADEP Komplex scheint also ein anderes Substratspektrum zu besitzen, als die ADEP-ClpP Komplexe der bisher untersuchten Bakterien.

4.4. Wirkung von ADEPs gegen ClpP aus *S. aureus*

4.4.1. Expression und Aufreinigung von ClpP aus *S. aureus*

Um die Wirkung von ADEPs an ClpP aus *S. aureus* (SA ClpP) zu beurteilen, wurden in dieser Arbeit umfangreiche *in vitro* Studien am isolierten Enzym durchgeführt.

Nach der Expression von SA ClpP in *E. Coli* SG1146a, erfolgte die Aufreinigung zunächst mittels Affinitätschromatographie über den StreptII-tag. Danach wurden die Fraktionen auf eine SDS-PAGE aufgetragen (Abb. 53).

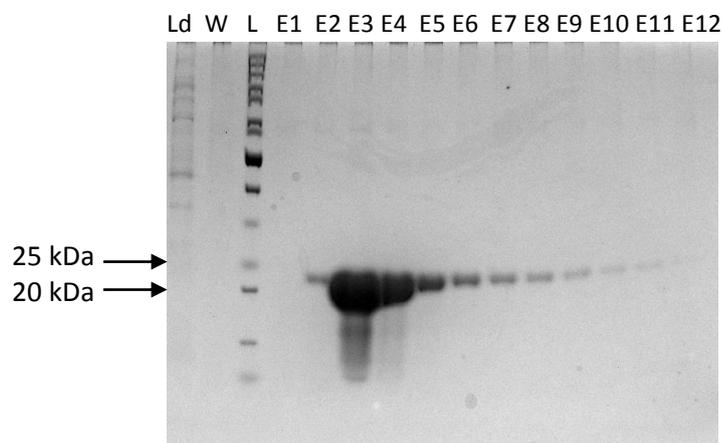


Abbildung 53: Fraktionen der StreptII-tag Aufreinigung von SA ClpP auf einer SDS-PAGE. Ld = Lysat Durchlauf; W = Waschfraktion; L = PAGEruler unstained protein ladder ; E1 – E122 =Elutionsfraktionen.

Für die weitere Aufreinigung wurden die Elutionsfraktionen E2 - E9 vereinigt und zusätzlich eine Größenausschlusschromatographie durchgeführt. Zum Vergleich wurde zuvor unter gleichen Bedingungen eine Größenausschlusschromatographie mit Standardproteinen mit bekannten Größen durchgeführt und die beiden Chromatogramme miteinander verglichen (Abb. 54).

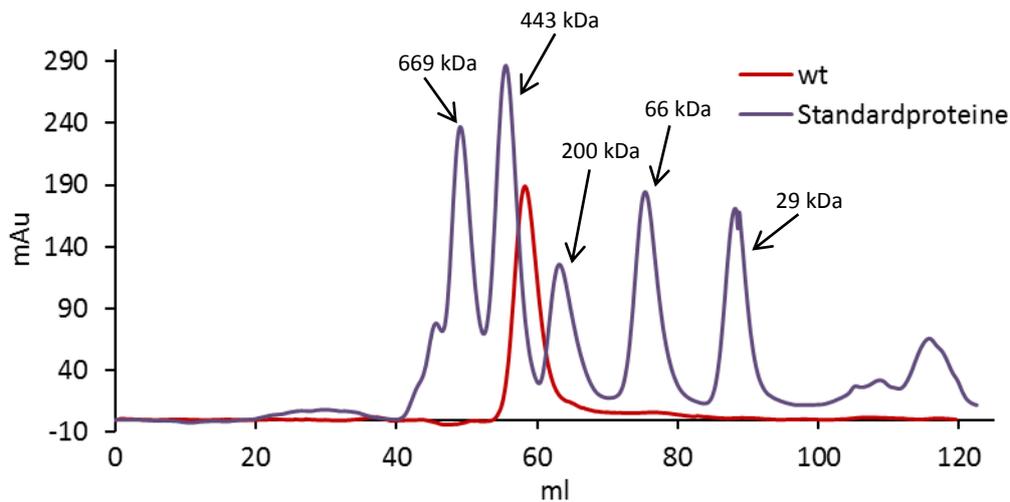
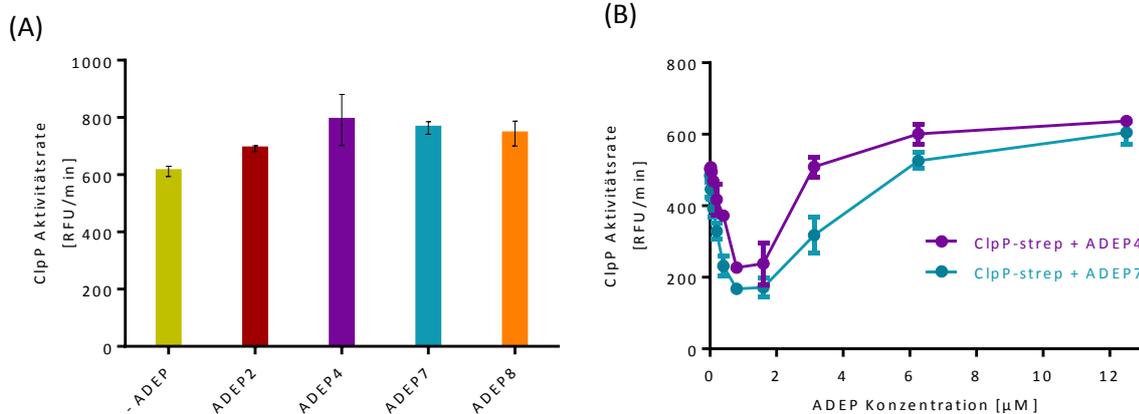


Abbildung 54: Chromatogramme der Größenausschlusschromatographie von Standardproteinen (lila) und von wt SA ClpP (rot).

Es war nur ein Peak in der Größenausschlusschromatographie zu erkennen, welcher nach Vergleich mit den Größenstandards einem Tetradekamer von SA ClpP mit StrepII-tag (316 kDa) entspricht. Dieser Peak wurde gesammelt und aufkonzentriert. Anschließend wurden 5 % Glycerin zu der Probe hinzugefügt und die Proteinkonzentration wurde mittels Bradford-Assay bestimmt. Die Probe wurde aliquotiert und bis zur weiteren Verwendung bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

4.4.2. Einfluss von ADEPs auf die Peptidase- und Protease-Aktivität von ClpP aus *S. aureus*

Bevor in der weiteren Fragestellung dieser Arbeit der Einfluss verschiedener Aminosäurepositionen der ADEP Bindetasche in ClpP von *S. aureus* (SA ClpP) untersucht wurde, musste zunächst das wt SA ClpP genauer charakterisiert werden. Hierzu wurde zunächst die Peptidaseaktivität in Abwesenheit und Anwesenheit verschiedener ADEP Derivate in verschiedenen Konzentrationen getestet. Dabei wurde das gängige Modellpeptid suc-LY-AMC als Substrat verwendet (Abb.55).



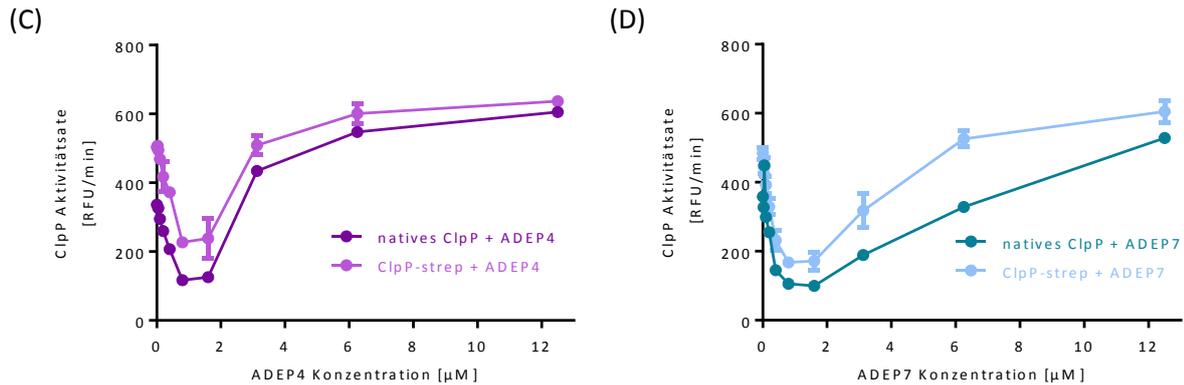


Abbildung 55: Peptidaseaktivität von nativem SA ClpP wt und SA ClpP-strepII wt in Anwesenheit von 25 µM verschiedener ADEP-Derivate (A) und Konzentrationsreihen des selben Peptidase-Assays zum Vergleich der Aktivierbarkeit von SA ClpP-strep wt mit ADEP4 und ADEP7, sowie der Aktivierbarkeit von nativem SA ClpP wt und SA ClpP-strepII wt mit ADEP4 (C) und ADEP7 (D). Gezeigt sind jeweils die Mittelwerte und Standardabweichungen von Triplikaten eines repräsentativen von drei biologisch unabhängigen Durchläufen.

Insgesamt fiel auf, dass alle ADEP-Derivate wie erwartet nur einen geringen Effekt auf die Peptidase Aktivität von SA ClpP haben. Unter Bedingungen, bei denen ClpP mit ADEP gesättigt war, wurde beim suc-LY-AMC Verdau mit ADEP2, 4, 7 und 8 eine Überaktivierung des Enzyms um 20 – 25 % erzielt. Es wurden die ADEP Derivate 4 und 7 für die Messung von Kinetiken bei verschiedenen ADEP Konzentrationen ausgesucht. ADEP4 zeigte in der Vergangenheit bereits eine gute Wirksamkeit gegen *S. aureus* Zellen (Brötz-Oesterhelt *et al.*, 2005; Conlon *et al.*, 2013). ADEP7 zeigte gegen *S. aureus* Zellen eine deutlich schlechtere Wirksamkeit als andere ADEP Derivate (vgl. Tab 14). Bei Messungen der Enzymkinetiken war aber kein signifikanter Unterschied zwischen der Verwendung von ADEP4 oder ADEP7 zu beobachten. Um zu überprüfen, ob der strepII-tag die Untersuchungen stören könnte, wurden die Assays parallel mit C-terminal strepII-getagtem ClpP und nativem ClpP durchgeführt. Die für das native ClpP ermittelten Kurven entsprachen im Wesentlichen denen von SA ClpP-strep, was beweist, dass der strepII-tag bei dieser Art der Assays die Enzymreaktionen nicht stört. Um sicher zu stellen, dass auch die gleiche SA ClpP Konzentration in allen Assays verwendet wurde und das Ergebnis nicht durch unterschiedliche Enzymkonzentrationen verfälscht wurde, wurde dies nochmals mittels SDS-PAGE bestätigt. Eine überraschende Beobachtung während der Messungen war, dass ADEP-Konzentrationen unterhalb von 3 µM einen inhibierenden Effekt auf die Peptidase Aktivität von SA ClpP hatten. Dieser inhibierende Effekt ist zuvor noch nie in der Literatur beschrieben worden. Da SA ClpP bereits als Tetradekamer vorliegt und nicht zuerst aus einzelnen Monomeren mit Hilfe von ADEP zusammengebaut werden muss, ist eine mögliche Erklärung, dass vereinzelt gebundene ADEP Moleküle eher den Zusammenhalt oder die Konformation des Tetradekamer stören könnten, wobei dies negative Auswirkung auf die katalytische Aktivität hat. Das ClpP des Modellorganismus *B. subtilis* (BS ClpP), lässt sich als Monomer isolieren, aber in Anwesenheit von Glycerin zu einer tetradekameren Konformation drängen (Lee *et al.*, 2010). Um der Frage nach dem inhibierenden Effekt nach zu gehen, wurde BS

ClpP sowohl als Dimer, als auch als Tetradekamer isoliert und suc-LY-AMC Abbaussays mit den aufgereinigten Fraktionen durchgeführt (Abb. 56).

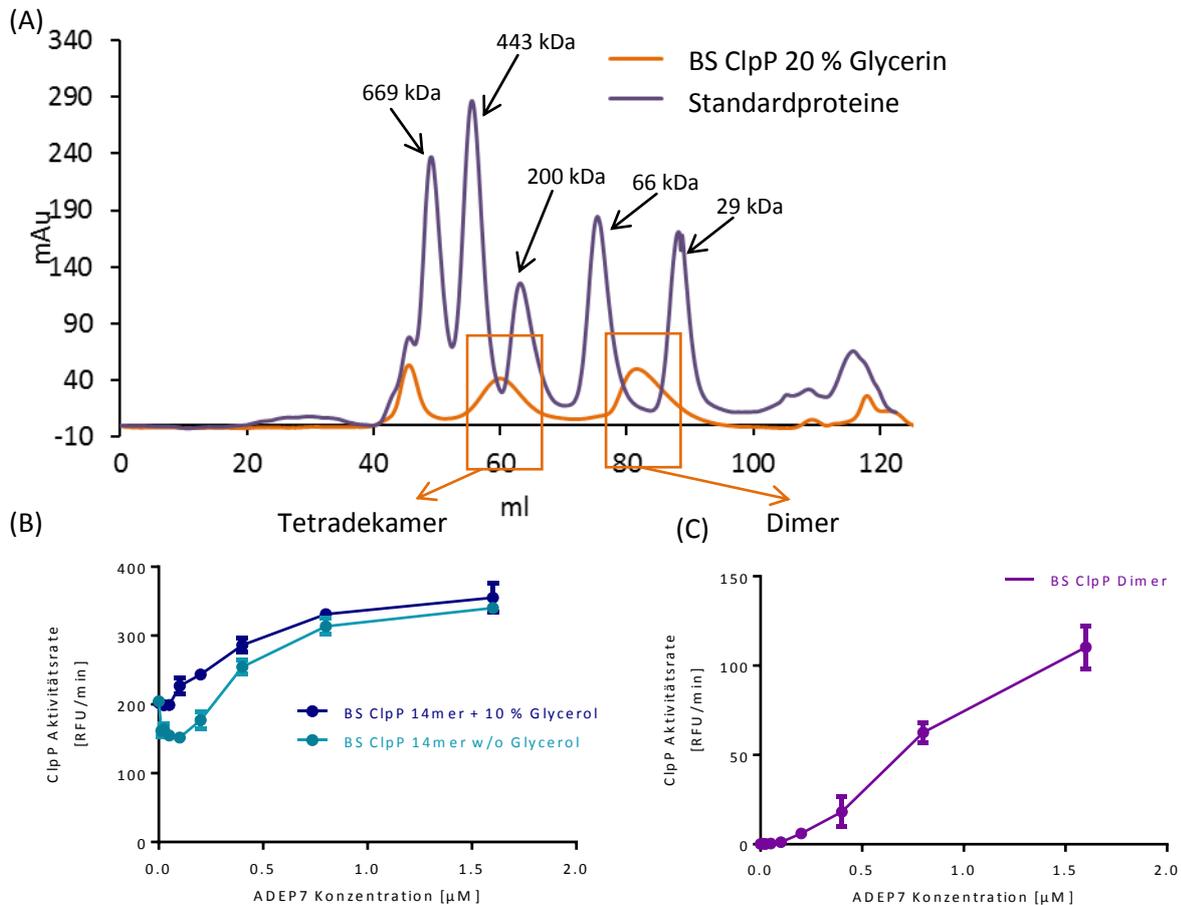


Abbildung 56: Größenausschlusschromatographie von BS ClpP in Anwesenheit von 20% Glycerin führt zu Bildung eines höhermolekularen Aggregates, sowie zu Tetradekamer- und Dimer Fraktionen (A). Im suc-LY-AMC Abbaussay wird die Peptidaseaktivität vom BS ClpP Tetradekamer bei niedrigen ADEP Konzentrationen inhibiert. Der inhibierende Effekt lässt sich durch Anwesenheit von 10 % Glycerin wieder aufheben (B). Die Peptidaseaktivität vom BS ClpP Dimer wird bereits bei geringeren ADEP Konzentrationen aktiviert. Konzentrationen die zu niedrig für die Aktivierung sind, haben keinen Effekt auf die Peptidaseaktivität (C). Gezeigt sind jeweils die Mittelwerte und Standardabweichungen von Triplikaten eines repräsentativen von zwei biologisch unabhängigen Durchläufen.

Es wird deutlich, dass der oben beobachtete inhibierende Effekt auch bei isoliertem Tetradekamer von BS ClpP auftritt, wohingegen die Peptidase Aktivität der Dimer Fraktion von BS ClpP nicht von ADEP inhibiert, sondern immer aktiviert wird. ADEP Konzentrationen, die zu niedrig sind um die Aktivität zu stimulieren haben keinen Effekt auf die Peptidaseaktivität. Dies bestätigt die oben genannte Theorie, dass im Falle der Dimer Fraktion schon geringe ADEP Konzentrationen hilfreich sind, um Monomere oder in diesem Fall Dimere zum Tetradekamer zusammen zu bauen, wohingegen geringe ADEP-Konzentration die Aktivität eines bereits vorgeformten Tetradekamers stören. Diese Störung könnte darin begründet sein, dass die Bindung von nur wenigen ADEP Molekülen an den ClpP Komplex zur Störung der Konformation des Tetradekamers führt. Durch die

Anwesenheit von 10 % Glycerin kann dieser Effekt wiederum aufgehoben werden, da die stabilisierende Wirkung von Glycerin gegenüber der destabilisierenden Wirkung von niedrigen ADEP Konzentrationen überwiegt.

Zur weiteren Charakterisierung von SA ClpP wt wurde auch die Proteaseaktivität in Anwesenheit von ADEPs genauer charakterisiert. Dass ADEPs gegen *S. aureus* wirken wurde in der Vergangenheit bereits mehrfach gezeigt (Brötz-Oesterhelt *et al.*, 2005; Sass *et al.*, 2011; Conlon *et al.*, 2013). Allerdings wurden bisher noch keine *in vitro* Studien am isolierten SA ClpP durchgeführt. Zunächst wurde also überprüft, ob die verschiedenen ADEP Derivate das Enzym zum Verdau von Casein aktiveren können. Dies wurde sowohl mit FITC gelabeltem als auch mit ungelabeltem Casein als Substrat bestätigt (Abb. 57).

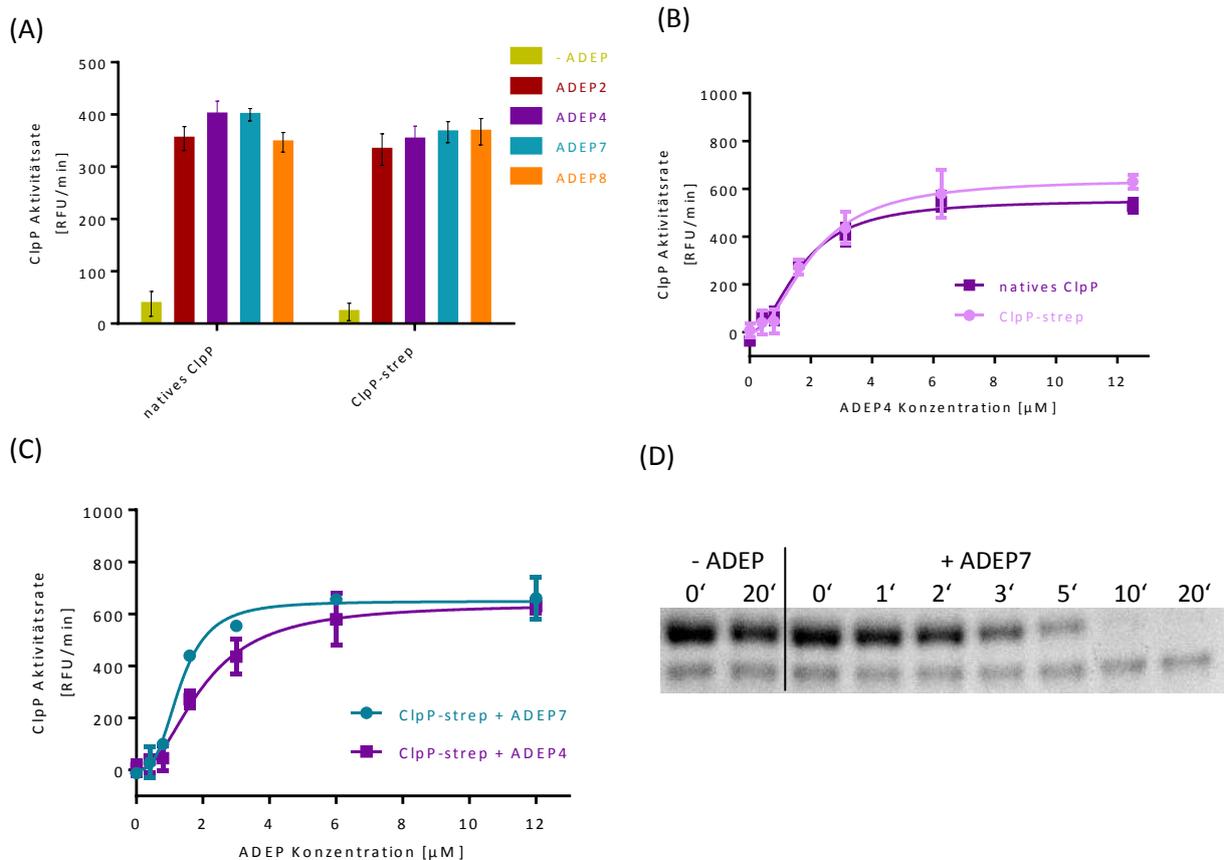


Abbildung 57: Protease Aktivitätsraten von SA ClpP gegen FITC-Casein in Anwesenheit von 25 μM verschiedener ADEP Derivate (A) und Kinetik von nativem SA ClpP sowie SA ClpP-strepII mit ADEP4 (B) sowie von der ADEP4 und ADEP7 Aktivität an SA ClpP-strepII (C) im Vergleich. SDS-PAGE des Verdau von ungelabeltem Casein mit SA ClpP in Anwesenheit von ADEP7 (D). Gezeigt sind jeweils die Mittelwerte und Standardabweichungen von Triplikaten eines repräsentativen von drei biologisch unabhängigen Durchläufen.

Wie zu erwarten war, führt die Anwesenheit aller verwendeten ADEP-Derivate zur Aktivierung von SA ClpP und somit zum Verdau von Casein, sowohl in ungelabelter als auch in FITC gelabelter Form. Auch in diesen Assays hatte der strepII-tag keinen Effekt auf die Aktivität und die Derivate ADEP4 und ADEP7 führten zu gleich guter Aktivierung des Enzyms bei gleichem Verlauf der Kinetiken, wobei ADEP7 eine geringfügig bessere Affinität zu SA ClpP zu haben scheint, als ADEP4. Genauere kinetische Daten von drei unabhängig

durchgeführten FITC-Casein Abbauassays mit SA ClpP in Anwesenheit von ADEP4 und 7 wurden mit Hilfe eines Hill-fittings in GraphPad Prism erhoben (Tab. 16).

Tabelle 16: Kinetische Daten des Hill-fittings der Mittelwerte von drei biologisch unabhängigen FITC-Casein Abbauassays mit nativem SA ClpP und SA ClpP-strepII mit ADEP4 und ADEP7. (MW = Mittelwert; stabw = Standardabweichung)

natives SA ClpP wt	Khalf		Vmax		h	
	MW	stabw	MW	stabw	MW	stabw
ADEP4	1,69	0,16	554,1	25,6	2,0	0,33
ADEP7	1,49	0,46	571	41,68	1,53	0,17

SA ClpP-strep wt	Khalf		Vmax		h	
	MW	stabw	MW	stabw	MW	stabw
ADEP4	1,58	0,68	500,5	36,65	1,69	0,36
ADEP7	1,32	0,69	566,6	62,58	1,42	0,56

Unter Berücksichtigung der Standardabweichungen lassen sich auch bei den kinetischen Daten keine signifikanten Unterschiede zwischen den SA ClpP Varianten mit und ohne StrepII-tag feststellen und auch ADEP4 und ADEP7 verhalten sich gleich. Die ADEP Konzentration, die zu halbmaximaler Aktivierung von SA ClpP (Khalf) zum Caseinverdau führt liegt in allen Fällen ca. bei ca. 1,5 μM . Das würde bedeuten, dass für die halbmaximale Aktivierung des Enzyms pro Tetradekamer 21 ADEP Moleküle benötigt werden. Der Hill-Koeffizient liegt bei allen gemessenen Varianten zwischen 1,5 und 2, was auf eine leichte Kooperativität der ADEP Bindung hindeutet. Die Bindung der ersten ADEP Moleküle an das ClpP Tetradecamer begünstigt also im geringen Ausmaß die Bindung weiterer ADEP Moleküle.

Im nächsten Schritt wurde erneut *in vitro* überprüft, ob FtsZ aus *S. aureus* (SA FtsZ) von SA ClpP in Anwesenheit von ADEP7 abgebaut wird (Abb. 58). Dass dies *in vitro* und in intakten *S. aureus* Zellen mit ADEP2 der Fall ist, war bereits bekannt (Sass *et al.*, 2011).

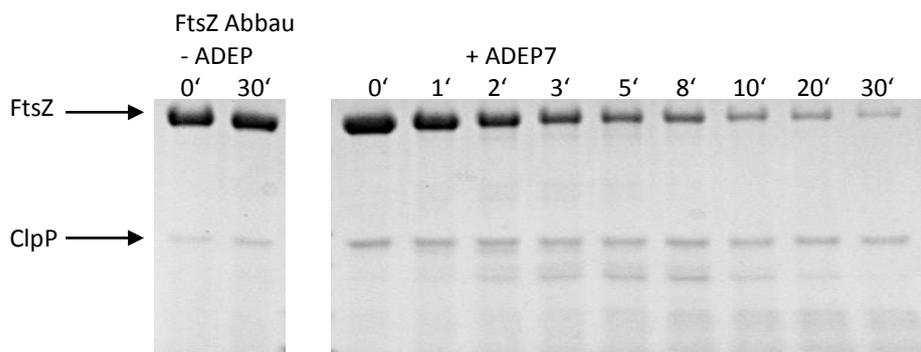


Abbildung 58: SDS-PAGE des Verdaus von SA FtsZ mit SA ClpP in Anwesenheit von 12 μM ADEP7.

Es wird deutlich, dass auch die Anwesenheit von ADEP7, in *S. aureus* Zellen, am isolierten SA ClpP zum Verdau von SA FtsZ führt, wobei verschiedene Abbauprodukte entstehen, die kleiner als 20 kDa sind.

4.4.3. Konstruktion von ClpP Mutanten in verschiedenen ADEP-Bindestellen

Bei Vergleich der MHK-Werte von ADEPs gegen *S. aureus* war bereits in der Vergangenheit auffällig, dass diese zwar in einem hochwirksamen Bereich liegen, aber signifikant schlechter ausfallen als gegen *B. subtilis*, *E. faecalis* oder *E. faecium* (Brötz-Oesterhelt *et al.*, 2005). Dies ist auch für ADEP7 der Fall (Tab. 17), welches für die Untersuchungen am isolierten Enzym in dieser Arbeit hauptsächlich verwendet wurde.

Tabelle 17: MHK-Werte verschiedener ADEP Derivate gegen verschiedene Grampositive Bakterien.

MHK in Müller-Hinton Medium [$\mu\text{g/ml}$]	ADEP2	ADEP4	ADEP7	Kanamycin	Ampicillin
<i>B. subtilis</i> 168 trpc2	0,25	<0,015	0,5	0,015	0,06
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	1	0,5	8	0,25	0,5
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	<0,015	0,015	1	1	>64
<i>E. faecium</i> L4001	0,015	<0,015	1	>64	>64

Eine mögliche Begründung für die vergleichbar schwächere Wirksamkeit gegen *S. aureus* wäre eine weniger effiziente Aufnahme von ADEPs in die Bakterienzelle. Eine andere Möglichkeit wäre aber auch, dass ADEPs eine geringere Affinität zu SA ClpP haben als zu ClpP von anderen Spezies. Zum Vergleich der Affinität von ADEPs zu SA ClpP mit der Affinität zu BS ClpP wurde ein FITC-Casein Abbauassay mit BS ClpP durchgeführt (Abb. 59) und die kinetischen Daten des Hill fittings verglichen (Tab. 18 und Tab. 16).

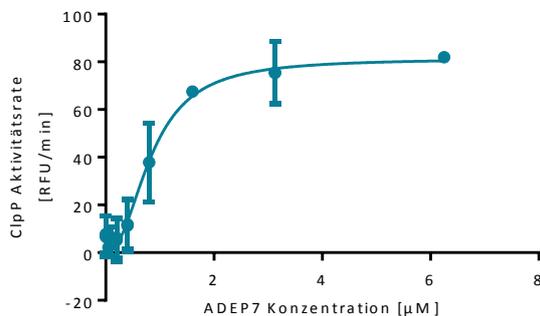


Abbildung 59: Kinetik des FITC-Casein Abbauassays mit BS ClpP und ADEP7. Gezeigt sind jeweils die Mittelwerte und Standardabweichungen von Triplikaten eines repräsentativen von zwei biologisch unabhängigen Durchläufen.

Tabelle 18: Kinetische Daten des Hill-fittings der Mittelwerte von zwei biologisch unabhängigen FITC-Casein Abbauassays mit BS ClpP und ADEP7. (MW = Mittelwert; stabw = Standardabweichung)

BS ClpP-His	Khalf		Vmax		h	
	MW	stabw	MW	stabw	MW	stabw
ADEP7	0,84	0,09	81,35	5,57	2,22	0,40

Aufgrund der kinetischen Daten konnte die Theorie bestätigt werden, dass die Affinität von ADEP7 zu BS ClpP höher ist als zu SA ClpP, da bei BS ClpP nur 0,84 μM und bei SA ClpP ca. 1,5 μM ADEP7 für die halbmaximale Aktivierung des Enzyms benötigt werden (vgl. Tab 16 und 18).

Um der Fragestellung, woran dieser Unterschied der Affinitäten liegen könnte, weiter nachzugehen wurde ein Alignment der ClpP Aminosäuresequenzen aus verschiedenen bakteriellen Spezies durchgeführt (vgl. Abb. 66) und die von *E. coli* und *B. subtilis* ClpP bekannten ADEP Bindestellen (Lee *et al.*, 2010) verglichen. Dabei fielen drei Abweichungen in der Aminosäuresequenz von ClpP von *S. aureus* auf, die genauer untersucht werden sollten. Hierzu wurden die Mutationen H83F, Q89S und M190L mittels zielgerichteter Mutagenese auf dem Expressionsplasmid für SA ClpP-strepII eingebracht. Es handelt sich jeweils um eine Mutation einer Aminosäure aus SA ClpP zu der Aminosäure, die sich an der jeweiligen Position in BS ClpP und EC ClpP befindet. Die erfolgreiche Amplifikation des Plasmides wurde mittels Gelelektrophorese überprüft (Abb. 60).

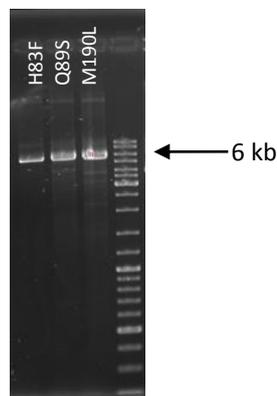


Abbildung 60: Agarosegel der SA ClpP Mutanten H83F, Q89S und M190L nach Amplifikation während der zielgerichteten Mutagenese. Als Größenstandart wurde der Generuler 1kb DNA ladder verwendet.

Die Mutageneseprodukte wurden in *E. coli* XL1 transformiert, die Plasmide der so entstandenen Klone erneut isoliert und mittels Sanger-Sequenzierung auf das Vorhandensein der Mutation an der richtigen Position gescreent (Abb. 61).

wt	1	MNLIPTVIETTNRGERAYDIYSRLLKDRIIMLGSQIDDNVANSIVSQLLFLQAQDSEKDI
H83F	1	MNLIPTVIETTNRGERAYDIYSRLLKDRIIMLGSQIDDNVANSIVSQLLFLQAQDSEKDI
Q89S	1	MNLIPTVIETTNRGERAYDIYSRLLKDRIIMLGSQIDDNVANSIVSQLLFLQAQDSEKDI
M190L	1	MNLIPTVIETTNRGERAYDIYSRLLKDRIIMLGSQIDDNVANSIVSQLLFLQAQDSEKDI
wt	59	YLYINSPGGSVTAGFAIYDTIQHIKPDVQTICIGMAASMGSFLLAAGAKGKRFALPNAEV
H83F	59	YLYINSPGGSVTAGFAIYDTIQFIKPDVQTICIGMAASMGSFLLAAGAKGKRFALPNAEV
Q89S	59	YLYINSPGGSVTAGFAIYDTIQHIKPDVSTICIGMAASMGSFLLAAGAKGKRFALPNAEV
M190L	59	YLYINSPGGSVTAGFAIYDTIQHIKPDVQTICIGMAASMGSFLLAAGAKGKRFALPNAEV
wt	119	MIHQPLGGAQQQATEIEIEAANHILKTREKLNRIISERTGQSIEKIQKDTDRDNFLTAEEA
H83F	119	MIHQPLGGAQQQATEIEIEAANHILKTREKLNRIISERTGQSIEKIQKDTDRDNFLTAEEA
Q89S	119	MIHQPLGGAQQQATEIEIEAANHILKTREKLNRIISERTGQSIEKIQKDTDRDNFLTAEEA
M190L	119	MIHQPLGGAQQQATEIEIEAANHILKTREKLNRIISERTGQSIEKIQKDTDRDNFLTAEEA

wt	179	KEYGLIDEVMVPETKWSHPQFEK*
H83F	179	KEYGLIDEVMVPETKWSHPQFEK*
Q89S	179	KEYGLIDEVMVPETKWSHPQFEK*
M190L	179	KEYGLIDEVLPETKWSHPQFEK*

Abbildung 61: Alignment nach erfolgreicher zielgerichteter Mutagenese der Mutanten H83F, Q89S und M190L in SA ClpP-strep

Das Alignment zeigt, dass alle drei Mutagenesen erfolgreich durchgeführt wurden. Die entsprechenden Plasmide wurden in *E. coli* SG1146a transformiert und das entsprechend mutierte ClpP konnte analog zum wt überexprimiert werden.

4.4.4. Charakterisierung der ClpP Mutanten mit veränderter ADEP-Bindetasche

Die Aufreinigung der hier konstruierte SA ClpP Klone erfolgte analog zur oben beschriebenen Aufreinigung des wt. Bei der Größenausschlusschromatographie als zweiten Aufreinigungsschritt fiel auf, dass die beiden Klone H83F und Q89S einen Oligomerisierungsdefekt im Vergleich zum wt zeigten, da ein zusätzlicher Peak auftrat, welcher der Größe eines Heptamers entspricht. Der Klon M190L zeigte diesen Effekt nicht. Die Chromatogramme der vier SA ClpP Varianten wurden zum besseren Vergleich übereinander gelegt (Abb. 62).

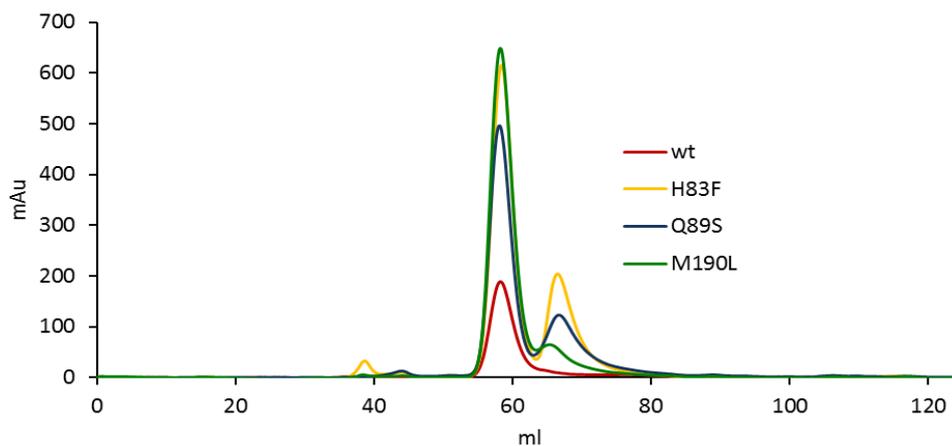


Abbildung 62: Chromatogramme der präparativen Größenausschlusschromatogramme von SA ClpP wt, H83F, Q89S und M190L.

Da die Proteinkonzentration in den verschiedenen Aufreinigungen unterschiedlich war, ist der hier gezeigte Vergleich der Oligomerisierungszustände nur als erster Hinweis zu sehen. Es wurde jeweils die Fraktionen, die der Größe des Tetradekamers entsprechen, gesammelt und nach Aufkonzentrierung und Bestimmung der Proteinkonzentration mittels Bradford Assay wurden die Proteine bis zum Einsatz in den nachfolgenden Assays in 5% Glycerin bei -20 °C gelagert.

Zunächst wurde die Peptidaseaktivität mit Verwendung des Modellsubstrates suc-LY-AMC untersucht (Abb. 63).

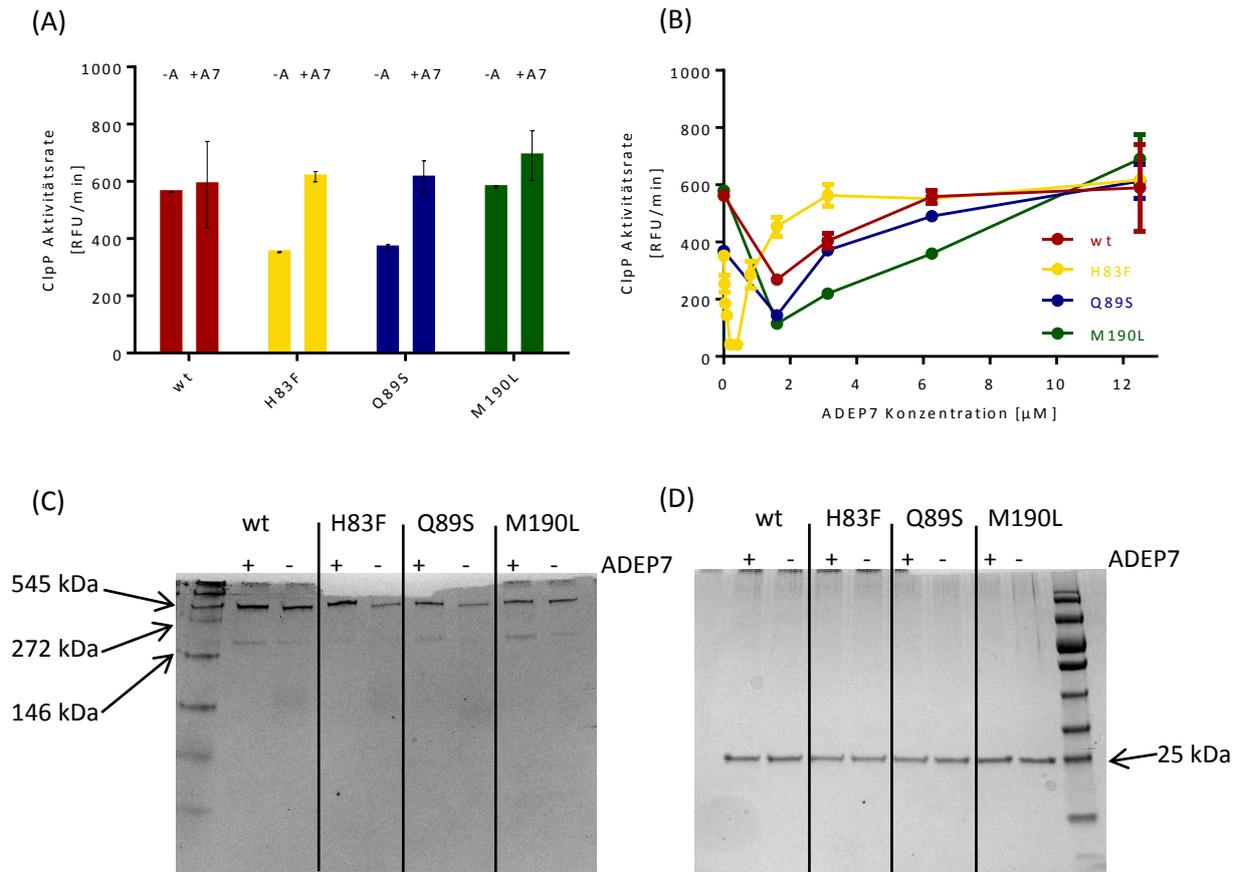


Abbildung 63: Peptidaseaktivitätsraten von SA ClpP wt, H83F, Q89S und M190L in Abwesenheit und Anwesenheit von 12 μM ADEP7 (A) und mit verschiedenen ADEP7 Konzentrationen (B). Aus den in (A) gezeigten Peptidase Abbauassays wurden weiterhin eine native PAGE (C) und eine SDS-PAGE (D) durchgeführt. In (A) und (B) sind jeweils die Mittelwerte und Standardabweichungen von Triplikaten eines repräsentativen von drei biologisch unabhängigen Durchläufen gezeigt. In (C) wurde als Größenmarker der native marker und in (D) der PAGEruler prestained protein ladder genutzt.

Bei der Peptidaseaktivität fiel auf, dass die beiden Mutanten, die den Oligomerisierungsdefekt aufweisen, auch eine deutlich geringere Peptidaseaktivität in Abwesenheit von ADEP zeigten. Anwesenheit von ADEP7 unter gesättigten Bedingungen führte jedoch zum Ausgleich dieser verringerten Aktivität bis auf das Niveau des wt. Außerdem konnte in den Assayproben durch eine native PAGE gezeigt werden, dass beim ClpP wt und der M190L Mutante mit und ohne ADEP die gleiche Menge an Tetradekamer detektiert wurde, wohingegen in der H83F und Q89S Mutante in den Proben ohne ADEP eine geringere Menge an Tetradekamer detektiert werden konnte als in den Proben mit ADEP. Der Oligomerisierungsdefekt konnte also mit dieser Methode erneut nachgewiesen werden. Andere oligomere Formen, wie Heptamer oder Monomer, sind in der native PAGE leider nicht zu erkennen. Dass dieser Effekt nicht am Einsatz verschiedener ClpP Konzentrationen lag wurde nochmals mittels SDS-PAGE bestätigt. Bei Messung der Peptidasekinetik mit verschiedenen ADEP Konzentrationen trat weiterhin bei allen Mutanten der inhibitorische Effekt auf, der schon beim wt beobachtet wurde (vgl. Abb. 55). Auffällig war aber, dass bei der H82F Mutante deutlich geringere Konzentrationen eingesetzt werden

mussten, um diesen inhibitorischen Effekt zu erzielen, da schon niedrigere ADEP Konzentrationen von 1 μM zu einer Aktivierung des Peptidverbaus führten. Dies gab den ersten Hinweis darauf, dass ADEPs tatsächlich eine bessere Affinität zur H83F Mutante als zum wt haben könnten.

Um den oben beschriebenen Oligomerisierungsdefekt genauer zu untersuchen, wurden die drei Mutanten und das wt SA ClpP mit und ohne ADEP unter Assaybedingungen bei 32 °C inkubiert und anschließend eine analytische Größenausschlusschromatographie mit den Proben durchgeführt. Die Chromatogramme mit und ohne ADEP sind für das jeweilige Protein übereinandergelegt (Abb. 64).

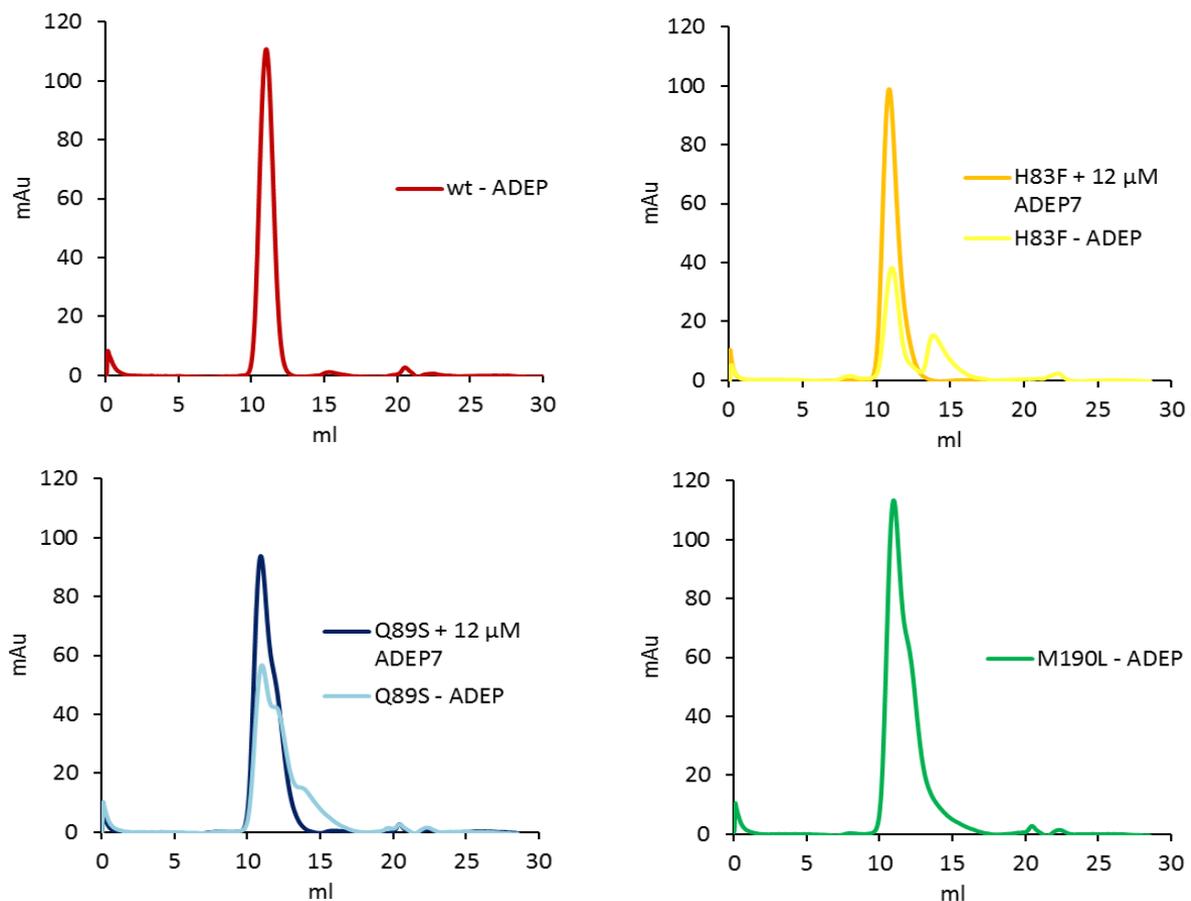


Abbildung 64: Chromatogramme der analytischen Größenausschlusschromatographie von SA ClpP wt, H83F, Q89S und M190L, in Abwesenheit und Anwesenheit von 12 μM ADEP7. Gezeigt ist jeweils ein repräsentativer Durchlauf.

Während in den Proben von H82F und Q88S ohne ADEP der Oligomerisierungsdefekt erneut auftrat, wurde in M190L und im wt SA ClpP wieder nur ein Peak mit der Größe eines Tetradekamers detektiert. Anwesenheit von ADEP7 konnte den Oligomerisierungseffekt in H83F und Q89S komplett aufheben, so dass auch in diesen Proben nur noch ein Tetradekamer vorhanden war. Da der Oligomerisierungsdefekt aber nur zum Auftreten von Heptamern und nicht von noch geringeren Massen führte, kann hiermit bewiesen werden, dass ADEP auch die Oligomerisierung zweier Heptamere zu einem Tetradekamer begünstigt

und stabilisiert. In der Literatur wurde dies bisher nur für die Oligomerisierung von Monomer zu Tetradekamer von BS ClpP gezeigt (Kirstein *et al.*, 2009a).

Weiterhin wurde auch die Proteaseaktivitäten der SA ClpP Mutanten mit dem wt verglichen. Hierzu wurde erneut das Modellsubstrat FITC-Casein verwendet und Kinetiken mit verschiedenen ADEP7 Konzentrationen erstellt (Abb. 65).

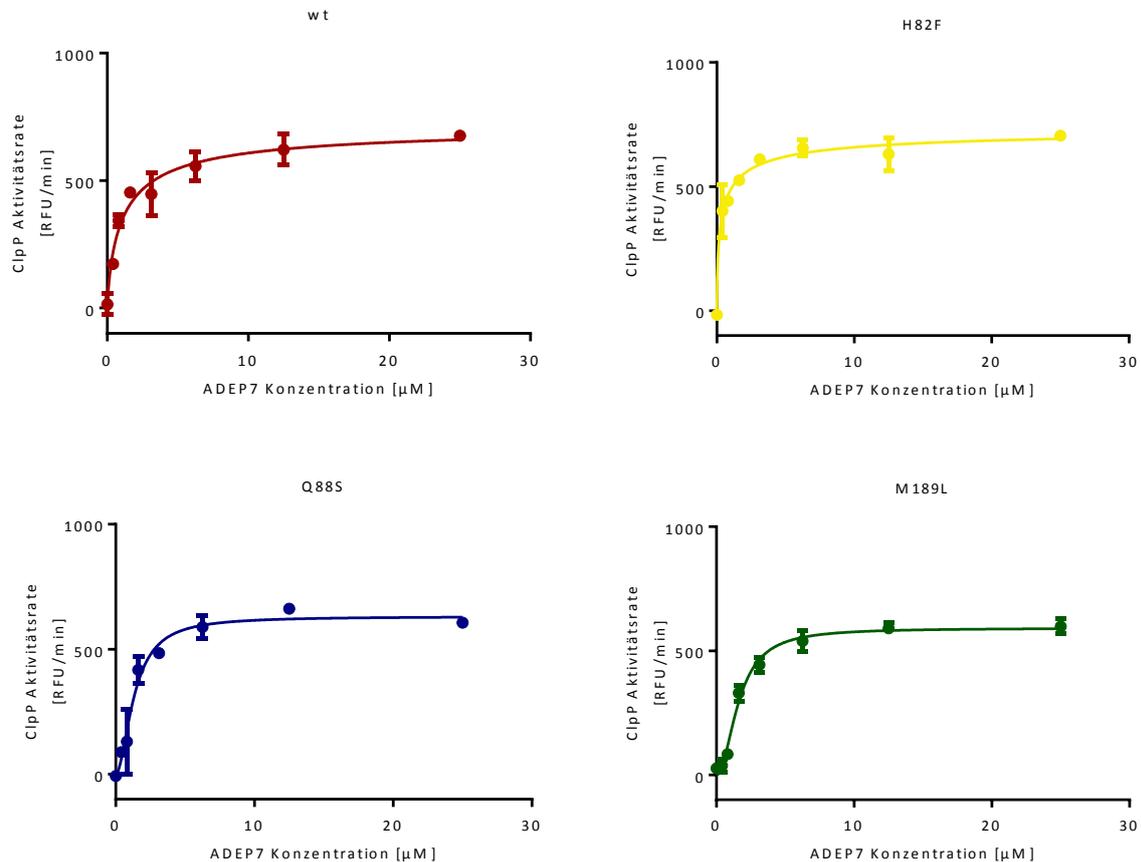


Abbildung 65: Hill-fitting der Proteaseaktivitätsraten beim FITC-Casein Abbau mit SA ClpP wt, H83F, Q89S und M190L in Anwesenheit verschiedener ADEP7 Konzentrationen. Gezeigt sind jeweils die Mittelwerte und Standardabweichungen von Triplikaten eines repräsentativen von drei biologisch unabhängigen Durchläufen.

Bei Betrachtung der Hill-fittings wird deutlich, dass alle untersuchten ClpP Mutanten ähnliche maximale Reaktionsgeschwindigkeiten wie der wt erreichen. Die H82F Mutante scheint dies aber schon in Anwesenheit geringerer ADEP7 Konzentrationen zu erreichen als der wt oder die anderen beiden Mutanten. Um dies genauer vergleichen zu können, wurden erneut verschiedene kinetische Daten aus drei unabhängig voneinander durchgeführten Messungen mit Hilfe von Graph Pad Prism berechnet (Tab. 19).

Tabelle 19: Kinetische Daten des Hill-fittings der Mittelwerte von drei biologisch unabhängigen FITC-Casrein Abbauassays mit SA ClpP-strep wt, H83F, Q89S und M190L mit ADEP7. (MW = Mittelwert; stabw = Standardabweichung)

	Khalf		Vmax		h	
	MW	stabw	MW	stabw	MW	stabw
Wt	1,32	0,69	717,1	71,31	1,42	0,56
H83F	0,56	0,16	744,1	74,23	1,52	0,14
Q89S	1,15	0,18	731,1	28,41	1,73	0,19
M190L	1,69	0,06	691,5	16,83	1,55	0,33

Bei Betrachtung der Hill Koeffizienten (h) und der maximalen Reaktionsgeschwindigkeit (Vmax) ist kein signifikanter Unterschied zwischen den Werten der Mutanten und des wt festzustellen. Dies bedeutet, dass Vmax sich nicht durch Austausch einer der Aminosäuren beeinflussen ließ und die leichte Kooperativität der ADEP Bindung, die oben schon für den wt beschrieben wurde nicht durch diese Mutationen beeinflusst wird. Betrachtet man aber die Khalf Werte, fällt auf, dass für H83F nur eine halb so hohe ADEP7 Konzentration benötigt wird um die halbmaximale Reaktionsgeschwindigkeit zu erreichen, als es für den wt der Fall ist. Die Mutationen Q89S und M190L beeinflussen aber auch diesen Wert nicht. Nur die Mutation H83F führt also zu einer erhöhten Affinität von ADEP zu SA ClpP, die der Affinität von ADEP zu BS ClpP gleicht (vgl. Tab. 18). Dies bestätigt die vorher aufgestellte Hypothese, dass diese Aminosäureposition in der ADEP Bindetasche essentiell wichtig für die ADEP Bindung ist.

Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass ADEPs ab einer gewissen Konzentration die Peptidase- und in stärkerem Ausmaß die Proteaseaktivität von SA ClpP stimulieren, während niedrigere ADEP Konzentrationen eine inhibierende Wirkung auf die Peptidaseaktivität von SA ClpP haben. Diese inhibierende Wirkung von niedrigen ADEP Konzentrationen konnte auch bei BS ClpP Tetradekameren, nicht aber bei BS ClpP Dimeren beobachtet werden. Somit scheint die Bindung von wenigen ADEP Molekülen den Zusammenhalt oder die Konformation des Tetradekamers zu stören, wohingegen die Bindung von ausreichend vielen ADEP Molekülen die aktive Konformation stabilisiert. Dies wurde auch bewiesen, da ADEPs die Heptamere der SA ClpP Mutanten mit Oligomerisierungsdefekt zu Tetradekameren zusammenhalten konnte. Mit Hilfe dieser Mutanten wurde darüber hinaus gezeigt, dass die Position H83 für die geringere Affinität von ADEPs zu SA ClpP im Vergleich zur Affinität zu BS ClpP verantwortlich ist.

5. Diskussion

5.1. Wirkmechanismus von ADEPs in Mykobakterien

In dieser Arbeit konnte eindeutig gezeigt werden, dass ADEPs gegen Mykobakterien wirksam sind und es konnten moderate MHK-Werte gegen verschiedene Mykobakterienspezies bestimmt werden. Demzufolge konnte die Aussage des online-tools mykpermcheck (Merget *et al.*, 2013), welches eine Wahrscheinlichkeit von 0 % für die Aufnahme von ADEPs in die mykobakterielle Zelle vorausgesagt hat, widerlegt werden. Da dieses reine Kalkulationsprogramm aber für Moleküle mit einer Größe von <400 kDa entwickelt wurde, war das berechnete Ergebnis ohnehin im Falle von ADEP, dessen Größe je nach Derivat ca. 800 kDa beträgt, kritisch zu betrachten. Außerdem wird in einem solchen Programm nur die passive Aufnahme einer Substanz und nicht der aktive Transport in die Zelle berücksichtigt. Als Negativbeispiele, für Substanzen, die die mykobakterielle Zelle nicht durchdringen können, wurden bei der Programmierung des Programmes Substanzen berücksichtigt, für die eine Wirkung an bestimmten isolierten Targets, nicht aber in intakten Mykobakterien in der Literatur beschrieben ist. Dass diese Substanzen aber tatsächlich nicht aufgenommen werden können wurde nicht zwingend bewiesen (Merget *et al.*, 2013). Die Kalkulation mit mykpermcheck, kann somit nur als zusätzlicher Anhaltspunkt betrachtet werden, um nach potentiellen Antituberkulotika zu suchen, und definitiv keine experimentellen Untersuchungen ersetzen.

Generell haben ADEPs einen dualen Wirkmechanismus, indem sie die natürlichen Funktionen der Clp-Protease inhibieren, gleichzeitig aber auch das proteolytische Zentrum der Clp-Proteasen, ClpP überaktivieren (Kirstein *et al.*, 2009a; Brötz-Oesterhelt *et al.*, 2005). In dieser Arbeit konnte bewiesen werden, dass ADEPs auch in Mykobakterien an ClpP1P2 wirken, da die Herunterregulierung der *clpP1P2* Expression einen positiven Einfluss auf den MHK-Wert von ADEPs hatte. Eine geringere Targetmenge in der Zelle führt also dazu, dass eine geringere ADEP Konzentration benötigt wird um eine Wirkung zu erzielen. Dies ist das typische Verhalten, dass Inhibitoren in solchen Assays zeigen. Somit konnten ADEPs als Inhibitoren der Clp-Protease in Mykobakterien identifiziert werden. Vergleichsweise wurde in dieser Arbeit ebenfalls gezeigt, dass es sich in *B. subtilis*, wo die Wirkung hauptsächlich auf die unkontrollierte Überaktivierung von ClpP zurückzuführen ist, genau andersherum verhält. Je weniger ClpP in der Zelle vorhanden war, umso weniger ADEP empfindlich waren die Zellen. In Mykobakterien scheint die Inhibierung der natürlichen Funktionen also die für die antibakterielle Aktivität relevante Wirkung zu sein. Um zu untersuchen, ob ADEPs überhaupt eine aktivierende Wirkung auf den MTB ClpP1P2 Komplex haben, wurden in dieser Arbeit zahlreiche *in vitro* Enzymassays durchgeführt, die zeigten das die Proteaseaktivität von MTB ClpP1P2 in Anwesenheit von ADEPs gesteigert werden kann. Bekannt war bereits, dass ClpP1 und ClpP2 beide zunächst N-terminal prozessiert werden müssen (Akopian *et al.*, 2012; Benaroudj *et al.*, 2011) und zumindest in *in vitro* Enzymassays ein spezifisches Aktivatorpeptid, wie beispielweise Z-LL nötig ist, um das aktive

Tetradekamer zu bilden (Akopian *et al.*, 2012). Wie diese Arbeit zeigt, kann Z-LL aber in *in vitro* Enzymassays nicht durch ADEPs ersetzt werden. Da ADEPs den IGF-Loop nachahmen und somit in vielen Studien als Model für Clp-ATPasen benutzt werden (Alexopoulos *et al.*, 2013; Sowole *et al.*, 2013a), passt dieses Ergebnis zu vorherigen Studien die zeigten, dass auch MTB ClpC1 nur in Anwesenheit von Z-LL den ClpP1P2 Komplex zum Verdau von ungefalteten Proteinen, wie Casein, stimulieren konnte (Akopian *et al.*, 2012). Ob in Mykobakterienzellen ein solcher Aktivator benötigt wird und falls ja, worum es sich dabei handelt, ist noch nicht bekannt. Ein erstes Modell zur Aktivierung von MTB ClpP1P2 in der Zelle wurde kürzlich aufgestellt. Es besagt, dass für die volle Aktivierung des Komplexes eine Clp-ATPase, ATP und ein zu entfaltendes Proteinsubstrat vorhanden sein müssen. Nur wenn ein Proteinsubstrat von der Clp-ATPase entfaltet und daraufhin aktiv in den ClpP1P2 Komplex hereingeleitet wird, ist demnach die volle Aktivierung des mykobakteriellen Clp-Protease Komplexes möglich (Schmitz und Sauer, 2014). Z-LL dient laut dieser Studie dazu, diesen Zustand am Enzym als Substratanalogon nachzuahmen (Schmitz und Sauer, 2014). Dies würde erklären, warum ADEPs MTB ClpP1P2 nicht unabhängig von Z-LL aktivieren können, da sie die Proteinsubstrate nicht aktiv zu den proteolytischen Zentren zuführen und die benötigte Energie somit nicht liefern können, sondern weiterhin auf die zusätzliche Z-LL-Bindung angewiesen sind.

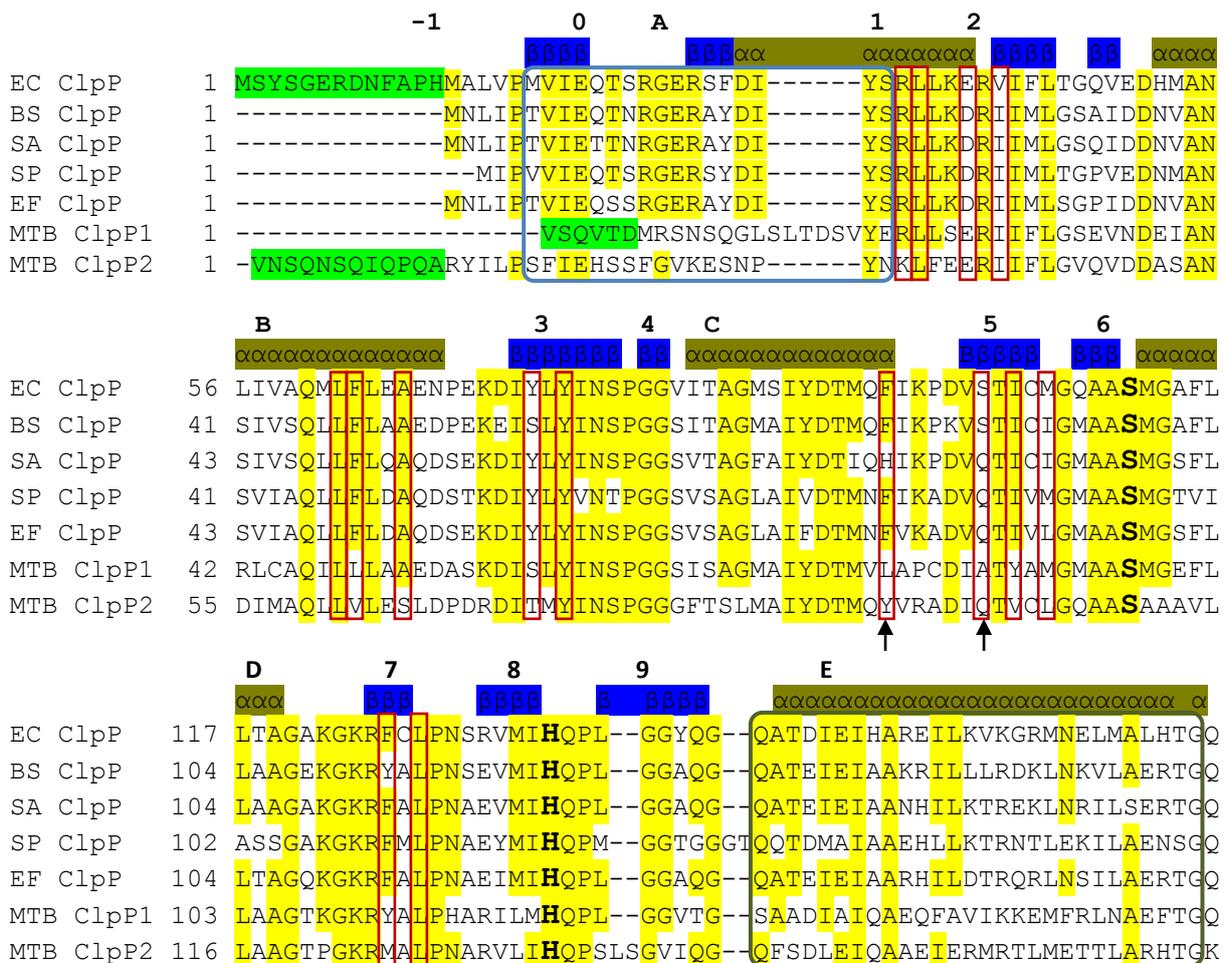
Die Frage ob es in Mykobakterien auch aktive Tetradekamere gibt, die nur aus ClpP1 oder nur aus ClpP2 bestehen, ist bisher nicht definitiv bewiesen worden. Dass ClpP1 und ClpP2 aber auch in den Zellen einen gemeinsamen Komplex bilden, konnte durch Kopräzipitierung aber eindeutig bewiesen werden (Raju *et al.*, 2011). Auch dass ADEPs die Pore von MTB ClpP1P2 öffnen und somit eine Proteaseaktivität, unabhängig von einer Clp-ATPase, ermöglichen, wie es für den Modellorganismus *B. subtilis* bereits beschrieben wurde (Lee *et al.*, 2010; Brötz-Oesterhelt *et al.*, 2005; Kirstein *et al.*, 2009a), konnte in dieser Arbeit gezeigt werden. Allerdings fielen hier einige Besonderheiten auf. Zum einen ist durch Z-LL aktiviertes MTB ClpP1P2 auch in der Abwesenheit von ADEPs eine aktive Protease, die bereits ungefaltete Proteine, wie Casein und Tau, innerhalb einer Stunde in gewissem Maße verdauen kann. Anwesenheit von ADEP 4, 7 oder 8 erhöht diese Aktivität zwar 4-5 fach, aber eine basale Grundaktivität ist auch in Abwesenheit von ADEPs vorhanden. Ein Verdau von Casein, der unabhängig von Clp-ATPasen oder ADEPs stattfand, konnte bisher nur einmal mit ClpP aus *E. coli* gezeigt werden, allerdings war die proteolytische Aktivität so schwach, dass es 24 h dauerte, bis Casein in signifikantem Umpfang abgebaut war (Jennings *et al.*, 2008b). MTB ClpP1P2/Z-LL ist also auch alleine deutlich aktiver als bisher untersuchte ClpP Proteine anderer bakterieller Spezies. In diesem Zusammenhang wäre es interessant, die Porengröße von MTB ClpP1P2/Z-LL zu vermessen und mit der Porengröße von ClpP aus anderen Spezies zu vergleichen. Eine größere Pore und somit ein besserer Zugang für Substrate zum katalytischen Zentrum würde die basale Aktivität erklären. Dies war auch der Fall bei N-terminal verkürzten ClpP Versionen von *E. coli* (Jennings *et al.*, 2008a). Die Kristallstruktur von MTB ClpP1 zeigte, genau wie die von BS ClpP einen Porendurchmesser von 1 – 2 nm,

allerdings handelte es sich hierbei um nicht prozessiertes ClpP1. Unter Berücksichtigung des abgespaltenen Präpeptides hat MTB ClpP1 im Alignment der Aminosäuresequenz einen deutlich verkürzten N-terminus im Vergleich zu anderen ClpP-Homologen. Bei MTB ClpP2 ist dies aber nicht der Fall. Man könnte also spekulieren, dass der verkürzte N-terminus von ClpP1 zu einer größeren Eintrittspore und somit zu der beobachteten basalen Aktivität führen könnte. ADEPs führen weiterhin zu einer geringeren Überaktivierung von MTB ClpP1P2 als es für ClpP aus *B. subtilis* oder *S. aureus* der Fall ist. Ob dieser geringere Effekt auf eine schlechtere Affinität von ADEPs an MTB ClpP1 oder ClpP2 zurückzuführen ist und ob ADEPs eventuell nur an eines der beiden Heptamere binden können oder ob die Anwesenheit von Z-LL in den Enzymassays einen störenden Faktor darstellt, ist auf der Grundlage der bisherigen Daten nicht eindeutig geklärt. Allerdings ist in diesem Zusammenhang hervorzuheben, dass ADEPs den MTP ClpP1P2 Komplex mindestens ebenso gut aktivierten wie die mykobakterielle Clp-ATPase ClpC1 unter den gleichen Assaybedingungen.

Zunächst sollte der Möglichkeit nachgegangen werden, dass die Anwesenheit von Z-LL in allen Assays zu einer im Vergleich zu BS ClpP oder SA ClpP geringeren Aktivierbarkeit von MTB ClpP1P2 mit ADEPs führt. Dafür spricht, dass auch die Clp-ATPase, ClpC1 zu keiner höheren Aktivierung von MTB ClpP1P2 führte, als es mit ADEPs der Fall war. Z-LL ist ein bekannter Inhibitor der Serin-Protease Calpain und des 20S Proteasoms, einer Threonin-Protease (Tsubuki *et al.*, 1996). In diesen Fällen wirkt er als transition-state-Analogon im aktiven Zentrum (Lee und Goldberg, 1998), was bedeutet, dass es wie ein Substrat am aktiven Zentrum gebunden, aber nicht gespalten werden kann. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass auch ClpP aus *B. subtilis* von Z-LL gehemmt wird. Weitergehende Daten zeigten außerdem, dass es sich um eine kompetitive Hemmung im aktiven Zentrum von ClpP und nicht an der ADEP-Bindetasche handelt, wobei Z-LL aber nicht als Substrat verdaut wird (Imran Malik, unveröffentlichte Daten). Diese Ergebnisse legen nahe, dass die Hemmung von *B. subtilis* ClpP durch Z-LL nach einem ähnlichen Mechanismus geschieht, wie er für das Proteasom beschrieben wurde und zeigen dass der hemmende Einfluss von Z-LL bei diversen Proteasen auftritt. Dieser Befund geht einher mit bereits beschriebenen Beobachtungen, bei denen die Anwesenheit von Z-LL die Reaktionsgeschwindigkeit von MTB ClpP1P2 mit FP-Biotin, welches kovalent an das Serin des aktiven Zentrums bindet, reduzierte. Nach diesen Studien wurde ebenfalls geschlossen, dass einige Z-LL Moleküle scheinbar am aktiven Zentrum binden könnten (Akopian *et al.*, 2012). Es ist daher durchaus vorstellbar, dass auch MTB ClpP1P2 gehemmt wird, obwohl Z-LL in dem hier genutzten *in vitro* System gleichzeitig unverzichtbar ist um den heterogenen ClpP1P2 Komplex zu bilden und in eine aktive Konformation zu bringen. Eine Möglichkeit wäre, dass Z-LL bei MTB ClpP1P2 nur an einigen der aktiven Zentren bindet, während andere aktive Zentren aktiv Proteolyse betreiben. Dies würde auch die vergleichsweise geringere Proteolyserate erklären, die MTB ClpP1P2 im Vergleich zu ClpP Komplexen aus anderen Organismen *in vitro* zeigt. Für die Clp-Protease wurde eine solche Möglichkeit bisher nie untersucht, aber für die HsIVU Protease, einer

Threonin Protease, die in ihrem Aufbau dem der Clp-Protease ähnelt, wurde bereits gezeigt, dass höchstens 6 der 12 aktiven Zentren des Komplexes während der Proteolyse aktiv sind (Lee *et al.*, 2009).

Um der Frage nachzugehen ob MTB ClpP1 und/oder ClpP2 eine geringere Affinität zu ADEPs haben könnten als ClpP von anderen Bakterien, kann man zunächst einmal die Ähnlichkeit der ClpP Proteine aus verschiedenen Spezies vergleichen. Generell sind die verschiedenen ClpP Homologen aus unterschiedlichen bakteriellen Spezies sehr stark konserviert. Beispielsweise zeigte das Alignment der Aminosäuren von *E. coli* ClpP mit *B. subtilis* ClpP 70 % und von *S. aureus* ClpP mit *B. subtilis* ClpP sogar 81% Übereinstimmung. MTB ClpP1 ist aber nur zu 57 % und MTB ClpP2 nur zu 48 % identisch zu ClpP aus *B. subtilis*. Auch die beiden ClpP Homologen aus *M. tuberculosis* untereinander sind nur zu 47 % identisch in ihrer Aminosäuresequenz. Das Alignment der Aminosäuresequenzen von MTB ClpP1 und ClpP2 mit ClpP von *B. subtilis* und *E. coli*, und Vergleich der dort bekannten Aminosäuren der ADEP-Bindetasche zeigt darüber hinaus, dass sich in beiden ClpP Homologen von *M. tuberculosis* an diesen Positionen einige Aminosäuren von denen der Modellorganismen unterscheiden (Abb. 66).



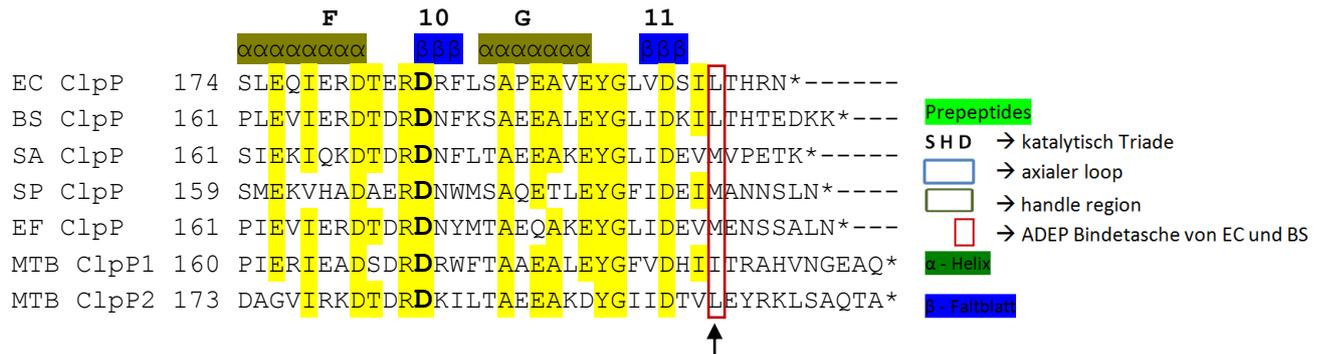


Abbildung 66: Alignment von ClpP Homologen verschiedener Bakterien. EC = *E. coli*, BS = *B. subtilis*, SA = *S. aureus*, SP = *Streptococcus pneumoniae*, EF = *Enterococcus faecium*, MTB = *M. tuberculosis*. Positionen die in SA ClpP mutiert wurden, sind mit Pfeilen markiert.

Die Aminosäuren der ADEP-Bindetasche, die in einem oder beiden MTB ClpP Homologen von denen aus EC ClpP und BS ClpP abweichen, sind in Tab. 20 Zusammengefasst

Tabelle 20: Übersicht über die Aminosäurepositionen der ADEP-Bindetasche, die in MTB ClpP1 und/oder MTB ClpP2 von denen in BS ClpP und EC ClpP abweichen.

Aminosäureposition in MTB ClpP1 oder ClpP2	Aminosäureposition in BS und EC ClpP	Chemische Unterschiede	Strukturelle Unterschiede	Bisher bekannte Mutation
ClpP2 K35	R23	beide basisch	ähnliche Struktur	
ClpP1 L50	F49	beide hydrophob	Aromat zu verzweigt-kettiger AS	F49S in EC ClpP und BS ClpP kein Effekt auf Aktivierbarkeit durch ADEPs, aber in BS ClpP Oligomerisierungsdefekt der sich durch ADEPs aufheben ließ (Lee <i>et al.</i> , 2010)
ClpP2 V62	F49	beide hydrophob	Aromat zu verzweigt-kettiger AS	
ClpP2 S65	A51	hydrophob zu polar	ähnliche Struktur	
ClpP1 L83	F82	beide hydrophob	Aromat zu verzweigt-kettiger AS	F82A in EC ClpP deutlich geringere und in BS ClpP keine Aktivierung von ClpP zum Caseinverdau mit ADEPs möglich (Lee <i>et al.</i> , 2010)
ClpP2 Y95	F82	hydrophob zu polar	beide Aromaten	
ClpP1 Y91	I90	hydrophob zu polar	verzweigt-kettige AS zu Aromat	
ClpP2 V103	I90	beide hydrophob	beide verzweigt-kettig	
ClpP2 125M	F112 (EC ClpP) Y112 (BS ClpP)	beide hydrophob	Aromat zu einfach-kettiger AS	

Betrachtet man die in Tab. 20 aufgeführten Unterschiede in der Aminosäurezusammensetzung der ADEP Bindetasche die aus EC ClpP und BS ClpP bekannt ist, so fällt auf, dass in MTB ClpP1 und MTB ClpP2 zum Teil hydrophobe Aminosäuren entfernt sind und

teilweise auch strukturelle Unterschiede auftreten, die theoretisch einen Einfluss auf die Bindungsaffinität von ADEPs haben könnten.

Ein Beispiel, das von Bedeutung für die ADEP-Bindung an MTB ClpP sein könnte, ist das Phenylalanin an Position 82 in BS ClpP und EC ClpP, welches dort eine sehr entscheidende ADEP-Bindestelle ist. Die Mutation F82A führte in *E. coli* zu einer deutlich verringerten caseinolytischen Aktivität in Gegenwart von ADEP. In *B. subtilis* war sogar keine Aktivierung von ClpP zum Caseinverdau mehr möglich (Lee *et al.*, 2010). In dieser Arbeit konnte auch gezeigt werden, dass diese Bindestelle in *S. aureus* ClpP einen Einfluss auf die Aktivierbarkeit durch ADEPs hat, da dort im wt ein Histidin vorhanden ist, und die Mutation H82F (His zu Phe) zu einer besseren Affinität von ADEP zu ClpP führte. Bei MTB ClpP2 entspricht diese Position dem Tyrosin an Position 95. Tyrosin ist ebenfalls aromatisch und strukturell gesehen dem Phenylalanin noch ähnlicher als das Histidin in *S. aureus*. Allerdings wird wieder eine hydrophobe Aminosäure gegen eine polare ausgetauscht, wodurch die Hydrophobie in der ADEP-Bindetasche erneut sinken könnte. Die größere Auffälligkeit zeigt sich aber bei ClpP1, welches an der entsprechenden Position 83 ein Leucin anstelle des Phenylalanins hat. Da an dieser Position ein Aromat entfernt wird, könnte dieser strukturelle Unterschied eventuell einen Einfluss auf die ADEP-Bindetasche haben. Allerdings ist die genaue ADEP-Bindetasche von beiden MTB ClpP Homologen nicht bekannt, da bisher keine Kristallstrukturen mit gebundenen ADEP existieren. Ein solcher Vergleich der verschiedenen Aminosäuren auf Sequenzebene ist also eher spekulativ und muss kritisch betrachtet werden. Um die hier diskutierte Abweichungen der Aminosäuresequenzen zu untersuchen, müsste man ein aktives ClpP1 mit einer inaktiven ClpP2-S98A Mutante und ein aktives ClpP2 mit einer ClpP1-S98A Mutante mischen und prüfen, ob beide Varianten noch von ADEP überaktiviert werden können. Falls dies nur noch für eine der beiden Varianten der Fall wäre, wüsste man, an welcher der beiden ClpP-Versionen ADEP binden kann. Um daraufhin genauere Untersuchungen durchzuführen, könnte man Punktmutationen in alle oben beschriebenen Aminosäurepositionen der ADEP-Bindetasche einbringen und die Affinität von ADEPs zu den verschiedenen Mutanten mit dem wt vergleichen. Aufgrund der vorliegenden Daten ist eine Aussage zu dieser Fragestellung aber nicht möglich. Ein gewisser Unterschied in der Struktur der ADEP-Bindetasche von den MTB ClpP Homologen im Vergleich zu ClpP aus bisher untersuchten Spezies, würde allerdings eine Erklärung für die überraschende Wirkung von ADEP3 gegen Mykobakterien bieten, die in dieser Arbeit gezeigt werden konnte. ADEP3 wurde als inaktives *R*-Enantiomer von ADEP2 synthetisiert (Brötz-Oesterhelt *et al.*, 2005) und passt aufgrund der falschen Orientierung des Phenylringes nicht in die ADEP-Bindetaschen von ClpP aus *B. subtilis* und *E. coli* (Lee *et al.*, 2010). In dieser Arbeit konnte erneut bestätigt werden, dass das hier verwendete ADEP3 inaktiv gegen *B. subtilis*, *S. aureus* und *E. faecalis* ist und auch nach vorangegangener zehntägiger Inkubation von ADEP3 keine Aktivität gegen *B. subtilis* auftrat, die durch ein Abbauprodukt hätte begründet werden können. Auch die zusätzliche kontaminierende Komponente, die sich im hier verwendeten ADEP3 befand, war inaktiv gegen *M. bovis* BCG, womit die Wirkung eindeutig auf ADEP3 zurückzuführen ist.

Dieses Ergebnis wurde auch in unabhängigen Studien an *M. tuberculosis* erzielt (Ollinger *et al.*, 2012). Obwohl ADEP3 am Enzym nur eine sehr geringe überaktivierende Wirkung zeigte, ist der gemessene MHK-Wert vergleichbar mit dem von ADEP2. Ein Grund hierfür kann sein, dass ADEP3 deutlich länger im Medium stabil bleibt als ADEP2. Beide ADEP-Derivate hatten in den Enzymassays die geringste Wirkung, führten aber zum besten MHK-Wert. Dies kann an der Aufnahme in die mykobakterielle Zelle liegen, die in dem Fall ADEP2 und 3 besser gelänge als den anderen ADEP Derivaten, die in dieser Arbeit getestet wurden. Eine andere Begründung könnte sein, dass ADEP2 und 3 zwar weniger gut darin sind, die Konformationsänderung zu bewirken, die die Eingangspore von ClpP1P2 öffnet, aber dennoch die Bindetasche für die Clp-ATPasen am effektivsten blockieren, was zur Hemmung der natürlichen essentiellen Funktionen von MTB ClpP1P2 und somit zum Zelltod führt. In den bisher veröffentlichten Kristallstrukturen von BS ClpP oder EC ClpP mit ADEP, waren immer alle Bindungspositionen besetzt und die Pore geöffnet, ob aber auch die Möglichkeit besteht, dass nur einige ADEP-Bindungspositionen besetzt sind, die Pore nicht geöffnet wird, aber die Clp-ATPasen trotzdem nicht binden können, ist bisher nicht bekannt. Außerdem unterscheiden sich die ClpP Proteine aus *M. tuberculosis* generell in Sequenz, Struktur und Funktion von den ClpP Proteinen aus anderen Bakterien. Somit ist es durchaus möglich, dass es hier einen Mechanismus der Bindung von ADEP2 und 3 gibt, der nicht zwangsweise zum Öffnen der Pore aber zum Inhibieren der natürlichen Funktionen von ClpP führt. Um hierzu weitere Schlüsse zu ermöglichen, müssten aber weitere Untersuchungen durchgeführt werden.

Eine weitere Auffälligkeit war, dass MTB ClpP1P2 das Zellteilungsprotein FtsZ, welches das bisher am besten untersuchte natürliche Substrat des ADEP-ClpP Komplexes ist (Sass *et al.*, 2011), nicht verdauen konnte. Dies lag nicht an der Anwesenheit von Z-LL oder anderen Bedingungen der *in vitro* Enzymassays, da die Stabilität von FtsZ mit Hilfe von Western Blots in Lysaten von *M. bovis* BCG, die zuvor mit ADEP2 inkubiert wurden, bestätigt werden konnte. ADEP aktiviertes MTB ClpP1P2 scheint also in Mykobakterien ein anderes Substratspektrum zu haben, als es für ClpP in *B. subtilis* und *S. aureus* der Fall ist. Dies ist bereits für die Peptidaseaktivität von MTB ClpP1P2 ohne ADEP beschrieben worden, bei der das sonst für ClpP gängige Substrat suc-LY-AMC kaum verdaut werden konnte, wohingegen ein guter Verdau von Z-GGL-AMC erzielt wurde (Akopian *et al.*, 2012). Um das natürliche Substratspektrum zu analysieren müssten komplexe Proteomstudien in Anwesenheit von ADEPs mit *M. tuberculosis* oder *M. bovis* BCG durchgeführt werden. Solche Studien wurden kürzlich für *M. tuberculosis* und *M. smegmatis* nach Herunterregulierung der *clpP1P2* Expression, aber ohne die Verwendung von ADEPs (Raju *et al.*, 2014) und für *S. aureus* in Anwesenheit von ADEPs, durchgeführt (Conlon *et al.*, 2013). Weiterhin ist es aber auch gut möglich, dass die überaktivierende Wirkung von ADEPs in Mykobakterien keine große Rolle spielt, sondern die Wirkung von ADEPs in Mykobakterien ausschließlich auf die Inhibierung der natürlichen Funktionen der Clp-Protease, zurückzuführen ist, welche in diesen Bakterien essentiell für das Überleben benötigt wird (Ollinger *et al.*, 2012; Raju *et al.*, 2011; Sassetti *et*

al., 2003). Einer der Gründe für die Essentialität der ClpP-Protease ist, dass sie für den Abbau der beiden wichtigen Transkriptionfaktoren WhiB1 und CarD verantwortlich zu sein scheint und die Inhibierung von ClpP dazu führt, dass diese beiden Transkriptionsfaktoren in den Zellen angereichert werden und somit wichtige, noch zu identifizierende Stoffwechselprozesse nicht mehr richtig reguliert werden können (Raju *et al.*, 2014). Für die Hypothese, dass die Inhibierung der natürlichen Funktionen von ClpP1P2 durch ADEPs der entscheidende Wirkmechanismus ist, spricht dass die Herunterregulierung der *clpP1P2* Expression in *M. bovis* BCG zu höherer Empfindlichkeit gegenüber ADEPs führt, der MHK-Wert also besser wird, umso weniger ClpP exprimiert wird. Im Gegensatz dazu führt die Herunterregulierung von *clpP* in *B. subtilis* zu einer höheren Toleranz von ADEP2. Der MHK-Wert wird in *B. subtilis* also umso schlechter, je weniger ClpP exprimiert wird. Um eindeutig zu zeigen, dass die natürlichen Funktionen von MTB ClpP1P2 durch ADEP gehemmt werden, indem die Bindung der beiden Clp-ATPasen ClpC1 und ClpX verhindert wird, würde man in *M. bovis* BCG ein System benötigen, in dem *ssrA* getaggetes GFP exprimiert und der Abbau durch Abnahme der Fluoreszenz verfolgt werden kann, so wie es für *M. smegmatis* beschrieben wurde (Raju *et al.*, 2011). Leider ist der MHK-Wert von ADEPs gegen *M. smegmatis* in einem zu hohen Konzentrationsbereich, so dass erste Versuche dieses System direkt mit ADEPs anzuwenden leider fehlschlugen (unveröffentlichte Daten). Alternativ würde auch ein reiner *in vitro* Enzymassay, wie er schon für ClpXP aus *E. coli* beschrieben wurde (Shin *et al.*, 2009), mit den entsprechenden Enzymen aus *M. tuberculosis* Aufschluss über diese Fragestellung geben, ob ClpX oder ClpC1 in Anwesenheit von ADEPs noch an den MTB ClpP1P2 Komplex binden können. Während dieser Arbeit stand uns ein solches System leider nicht zur Verfügung, aber kürzlich wurde genau dieses System, bei dem *ssrA* getaggetes GFP mit dem MTB ClpC1P1P2 oder dem MTB ClpXP1P2 Komplex verdaut werden konnte, entwickelt (Schmitz und Sauer, 2014). Zu überprüfen, ob dieser Verdau in Anwesenheit von ADEPs tatsächlich nicht mehr stattfindet, weil die Clp-ATPasen nicht mehr an ClpP1P2 binden können, wäre der entgeltliche Beweis, dass ADEPs den mykobakteriellen Clp-Proteasekomplex inhibieren.

5.2. ADEP als Antibiotikum gegen Tuberkulose

Um zu beurteilen, ob eine neue Substanz ein Potential als oral anzuwendendes Arzneimittel hat, wird oft die „Lipinski-Rule of five“ für eine pauschale, erste Abschätzung angewendet. Diese stellt per Definition vier Bedingungen an die chemische Substanz, welche erfüllt sein müssen, damit sie als gut oral bioverfügbar gilt (Lipinski *et al.*, 1996). Diesen Regeln zufolge sollte eine oral gut bioverfügbare Substanz nicht mehr als fünf Wasserstoff-Donatoren und nicht mehr als zehn Wasserstoff-Akzeptoren haben, die Molekülmasse sollte nicht größer als 500 g/mol sein und der Oktanol-Wasser-Verteilungskoeffizient (logP) sollte nicht höher als 5 sein (Lipinski *et al.*, 1996). Die meisten dieser Regeln treffen für ADEP2 zu, da es nur drei Wasserstoff-Donatoren und sieben Wasserstoff-Akzeptoren hat. Außerdem wurde für

ADEP2 ein logP von 3,02 mit Hilfe des online Tools ALOGPS (Tetko *et al.*, 2005) berechnet. LogP wird als Maß der Hydrophobie von Substanzen genutzt. Lipophile Substanzen haben einen positiv logP-Wert und hydrophile Substanzen einen negativen. ADEP ist also eher lipophil, liegt aber laut der „rule of five“ noch in einem gut bioverfügbaren Rahmen. Die einzige Regel der „rule of five“, die nicht erfüllt wird, ist die molekulare Größe von ADEP2, die mit 798 g/mol zu groß ist. ADEP2 wäre also aufgrund der Größe in einer Studie, die sich an den Lipinski „rule of five“ orientiert, aussortiert worden. Dennoch wurde bereits gezeigt, dass ADEPs hochpotente Antibiotika gegen verschiedene Gram-positive Pathogene im Mausmodell sind (Brötz-Oesterhelt *et al.*, 2005), und somit, trotz der Nichterfüllung der Lipinski „rule of five“, vielversprechende Wirkstoffe sind, auch wenn sie dabei nicht oral, sondern intravenös oder subcutan verabreicht wurden. Für Antibiotika im Allgemeinen wurde diese Abweichung bereits diskutiert, da sie oft zu groß, komplex und hydrophil sind. Dies muss aber kein Problem darstellen, da Antibiotika grundsätzlich nicht oral verfügbar sein müssen, sondern auch injiziert werden können (Lewis, 2013; Frantz, 2004). Für Antituberkulotika wäre eine orale Bioverfügbarkeit allerdings wünschenswert, da es sich um eine sehr lange Therapie handelt und gerade in ärmeren Ländern, in denen ein Großteil der Bevölkerung mit Tuberkulose infiziert ist, eine tägliche Injektion der Antituberkulotika nicht realisierbar ist. Sogar für oral verfügbare Antibiotika gibt es aber zahlreiche Beispiele, welche den „Lipinski rule of five“ widersprechen. Eines ist Erythromycin, was mit einer Masse von 733 g/mol ebenfalls zu groß wäre aber häufig in Form von Tabletten oral verabreicht wird. Auch die meisten Antituberkulotika folgen nicht den „rule of five“ (Koul *et al.*, 2011). Trotzdem wird die Suche nach neuen antibiotischen und antituberkulotischen Substanzen durch diese Kriterien stark limitiert, da Substanzbibliotheken im Rahmen von virtuellen Screenings oft genau auf die dort beschriebenen Eigenschaften hin durchsucht werden (Koul *et al.*, 2011).

Im Falle von ADEPs stellte aber unabhängig von der Bioverfügbarkeit die zu schnelle Entwicklung von ADEP-Resistenz ein Problem für ihre Anwendbarkeit als Antibiotika dar (Brötz-Oesterhelt *et al.*, 2005). In allen bisher isolierten ADEP-resistenten *B. subtilis* Stämmen, Staphylokokken, Streptokokken und Enterokokken, konnten Mutationen im Target ClpP identifiziert werden (unveröffentlichte Daten, Heike Brötz-Oesterhelt), was daran liegt, dass diese Proteine von den Bakterien nicht essentiell fürs Überleben benötigt werden. Da Mykobakterien zwei Versionen von ClpP exprimieren (ClpP1 und ClpP2) und beide essentiell sind (Sasseti *et al.*, 2003; Raju *et al.*, 2011; Ollinger *et al.*, 2012), lag dieser Arbeit die Annahme zu Grunde, dass die Resistenzproblematik in Mykobakterien geringer sein könnte, weil sich in dem essentiellen Target nicht so schnell Mutationen durchsetzen würden. Ob dies tatsächlich der Fall ist, konnte im Rahmen dieser Arbeit weder bewiesen noch widerlegt werden. Kolonien, die von ADEP-haltigen Agarplatten nach dreiwöchiger Inkubation isoliert wurden, zeigten in anschließenden MHK-Bestimmungen keine Resistenz gegen ADEPs. Eine mögliche Begründung hierfür ist die Degradation von ADEPs im Medium, die in dieser Arbeit nachgewiesen wurde. Es ist gut möglich, dass auch nicht resistente

Kolonien auf Agarplatten anwachsen, sobald die minimale Hemmkonzentration unterschritten wird. Außerdem wurde inzwischen gezeigt, dass ADEPs Substrate für Efflux-Pumpen in *M. tuberculosis* sind (Ollinger *et al.*, 2012), was die Vermutung nahe legt, dass es neben potentiellen ClpP Mutationen einen weiteren ADEP-Resistenzmechanismus in dieser Spezies geben könnte. Allerdings ist bei einer Überexpression der bekannten Pumpen nur von einem geringfügigen Anstieg der MHK auszugehen (Ollinger *et al.*, 2012).

Die relative Instabilität von ADEPs, die sich bei den Experimenten mit langsam wachsenden Mykobakterien im Rahmen dieser Arbeit als problematisch erwies, muss für die Anwendung als Medikament nicht zwangsläufig ein Problem darstellen, da man Antibiotika ja in der Regel mehrmals täglich verabreicht. Ob sich dies im Menschen genauso verhält, müsste ohnehin im Rahmen von umfangreichen Studien zur metabolischen Stabilität von ADEPs geklärt werden. Erste metabolische Studien wurden in der Vergangenheit bereits durchgeführt und zeigten, dass ADEP2 nur eine Halbwertszeit von 1,1 h in Mäusen hat und die Plasmaclearance von ADEP2 in einem moderaten Bereich liegt (Brötz-Oesterhelt *et al.*, 2005). Dennoch konnten bereits in unabhängigen Studien infizierte Mäuse durch Verwendung von ADEPs geheilt werden (Brötz-Oesterhelt *et al.*, 2005; Conlon *et al.*, 2013). Die Stabilität scheint also grundsätzlich ausreichend zu sein um vielversprechende *in vivo* Effekte zu erzielen. Ob dies im Menschen auch der Fall wäre, ist noch nicht bekannt. Auch für gängige Antibiotika wie Tetrazyklin und Erythromycin ist bekannt, dass sie keine hohe Stabilität in wässriger Lösung haben. Allerdings zeigten ähnliche HPLC-Untersuchungen, wie die hier für ADEP durchgeführten, dass die Tetrazyklinmenge nach 24 h Inkubation in TSB-Medium konstant blieb (Ray und Newton, 1991). Auch Stabilitätsstudien von Erythromycin A zeigten, dass bei neutralem pH-Wert nach 24 h noch mehr als 95 % der eingesetzten Erythromycinmenge detektiert werden konnten (Paesen *et al.*, 1995). ADEP2, bei dem nach einem Tag Inkubation im Medium noch 25% der Ausgangsmenge vorhanden war, ist somit also instabiler als Tetrazyklin und Erythromycin. Diese Erkenntnis kann jedoch als Basis für eine Substanzoptimierung genutzt werden. Kürzlich wurden bereits neue ADEP Derivate synthetisiert (vgl. Abb. 9), die sowohl eine höhere Stabilität als auch eine bessere Bioverfügbarkeit aufwiesen (Carney *et al.*, 2014). Interessant wäre es auch mit analogen HPLC-Analysen unter gleichen Bedingungen, direkt zu vergleichen, ob die Stabilität dieser neuen ADEP-Derivate tatsächlich verbessert werden konnte und wenn ja, ob dadurch auch die Wirkung gegen *M. tuberculosis* oder *M. bovis* BCG verbessert werden konnte.

Ein gutes neuartiges Antituberkulotikum müsste außerdem die Fähigkeit besitzen, auch in Makrophagen persistierende Mykobakterien abzutöten. Um dies für ADEPs zu überprüfen, wurden im Rahmen dieser Arbeit Zellen einer murinen Makrophagenzelllinie mit *M. bovis* BCG infiziert und die Wirkung von ADEPs gegen diese intrazellulären Bakterien getestet. Da jedoch die zytotoxische Wirkung von ADEPs gegen diese Zelllinie in der gleichen moderaten Größenordnung liegt, wie die Wirkung von ADEPs gegen Mykobakterien, ließ sich nicht eindeutig nachweisen, dass ADEPs tatsächlich gegen intrazellulär persistierende Mykobakterien wirken. Zwar hat sich in den Experimenten eine Reduktion der

Mykobakterienzahl in der Makrophagenkultur gezeigt, es lässt sich aber nicht ausschließen, dass zunächst die Makrophagen zerstört wurden und erst im Anschluss die freigewordenen Mykobakterien extrazellulär abgetötet wurden. Um zu untersuchen, ob ADEPs grundsätzlich gegen persistierende Bakterien wirken, müsste man diese Versuche mit anderen intrazellulären Gram-positiven Bakterien wiederholen, bei denen schon deutlich geringere ADEP-Konzentrationen und kürzere Inkubationszeiten ausreichen, um einen antibakteriellen Effekt zu erzielen. Möglich wären diese Versuche beispielsweise mit *Listeria monocytogenes* oder *S. aureus*. Für letztere wurde mittlerweile sogar gezeigt, dass ADEP4 gegen persistierende *S. aureus* wirkt (Conlon *et al.*, 2013).

Zusammengefasst lässt sich aus allen oben genannten Argumenten schlussfolgern, dass sich die hier getesteten ADEP Derivate vermutlich noch nicht als Antibiotika für die Tuberkulose-Therapie eignen. Auch wenn Zytotoxizitätstests nicht in direkter Weise Aufschluss über die Verträglichkeit im Tierversuch geben und in dieser Arbeit auch nur eine Zelllinie getestet wurde, müsste die beobachtete moderate Wirkung gegen eukaryotische Zellen zunächst weitergehend geprüft werden. Des Weiteren konnte in dieser Arbeit erneut bestätigt werden, dass ClpP ein hervorragendes Target für neue Antituberkulotika darstellt, was durch das rapide Absterben von *M. bovis* BCG *clpP1-tetoff* bei der Herunterregulierung von *clpP1P2* deutlich wird. Auch wenn es sich bei den bisher untersuchten ADEP Derivaten noch nicht um die richtigen Substanzen handelt, um effizient gegen Tuberkulose vorzugehen, macht die vielversprechende Aktivität gegen persistierende *S. aureus* Zellen und die Essentialität des Targets in Mykobakterien dennoch deutlich, dass ADEPs als mögliche Wirkstoffe weiter verfolgt werden sollten. Hierbei könnte der Fokus zunächst auf der Substanzoptimierung liegen, wie sie zuvor für *S. aureus* durchgeführt wurde (Hinzen *et al.*, 2006). Wünschenswert wäre hierbei die Entwicklung von ADEP Derivaten mit höherer Potenz gegen Mykobakterien und verbesserter Stabilität in wässriger Lösung. Weiterhin wäre eventuell auch eine Kombinationstherapie von geringeren ADEP Mengen und einem weiteren Antituberkulotikum denkbar. Zunächst müsste hierfür aber synergistische Wirkung gegen Mykobakterien nachgewiesen werden, wie es zum Beispiel für ADEP4 in Kombination mit Rifampicin gegen *S. aureus* der Fall ist (Conlon *et al.*, 2013). Erste Hinweise in diese Richtung gibt es für Streptomycin, dessen Wirkung bei Herunterregulierung von *clpP1P2* in *M. smegmatis* verbessert werden konnte (Raju *et al.*, 2011). Einen synergistischen Effekt von ADEPs und Streptomycin oder Rifampicin zu untersuchen wäre daher eine interessante Fragestellung.

Auch für die bisher schon bekannten Substanzen, die an ClpP von anderen Spezies angreifen, wäre es sehr interessant die Wirksamkeit gegen *M. tuberculosis* zu ermitteln. Die oben schon beschriebenen, antivirulenten β -Lactone (Böttcher und Sieber, 2008) wären ein Beispiel für solche Substanzen. Während sich deren Wirkung bei Anwendung gegen *S. aureus* oder *L. monocytogenes* immer auf eine antivirulente Wirkung beschränkt, sollten sie aufgrund der Essentialität von ClpP1P2 sogar antibiotische Wirkung gegen Mykobakterien haben, falls sie die mykobakterielle Zellwand penetrieren können. Für andere β -Lactone wurde allerdings

nur eine schwache Wirkung gegen *M. tuberculosis* und *M. smegmatis*, sowie eine Inhibierung der Peptidase Aktivität von MTB ClpP1P2/Z-LL gezeigt (Compton *et al.*, 2013). Interessant wäre es nun, die optimierten β -Lactone (Böttcher und Sieber, 2009; Zeiler *et al.*, 2012) und die anderen kürzlich veröffentlichten ClpP Inhibitoren (Gersch *et al.*, 2014) gegen Mykobakterien zu testen. Denkbar wäre auch eine weitere chemische Optimierung der Lactone, speziell für ihre Anwendung in Mykobakterien, zu starten. Andere vielversprechende Substanzen sind in diesem Zusammenhang auch die bereits in der Einleitung vorgestellten Naturstoffe CyclomarinC (Schmitt *et al.*, 2011) und Lassomycin (Gavriš *et al.*, 2014), die beide an ClpC1 in Mykobakterien angreifen und somit indirekt auch die ClpP1P2 Aktivität in den Zellen beeinflussen.

5.3. Untersuchungen zur Affinität von ADEPs zu ClpP aus *S. aureus*

Schon während der ersten Arbeiten zur Charakterisierung von ADEPs fiel auf, dass die Aktivität von ADEPs gegen *S. aureus* schlechter ist als gegen andere getestete Gram-positive Organismen. Dies wurde in dieser Arbeit auch für ADEP7 bestätigt. Um zu untersuchen, ob dies an einer schlechteren Affinität von ADEPs zu SA ClpP liegen könnte, wurde ein Alignment der Aminosäuresequenzen von ClpP aus verschiedenen bakteriellen Spezies durchgeführt und die von *E. coli* und *B. subtilis* bekannten ADEP-Bindestellen (Lee *et al.*, 2010) eingetragen. Des Weiteren wurden auch bekannte strukturelle Merkmale und Präpeptide eingetragen (vgl. Abb. 66).

Bei Betrachtung der ADEP-Bindestellen fielen nur drei Positionen auf, in denen ClpP von *S. aureus* von den in Zusammenhang mit ADEP besser untersuchten ClpP-Molekülen aus *B. subtilis* und *E. coli* abweicht. Diese Positionen sind im Alignment in Abb. 66 mit Pfeilen markiert. Abb. 67 zeigt darüber hinaus einen Ausschnitt aus der Kristallstruktur von SA ClpP, die mit Hilfe von PyMol mit der Kristallstruktur von BS ClpP mit ADEP1 übereinandergelegt wurde (Gersch *et al.*, unveröffentlichte Daten).

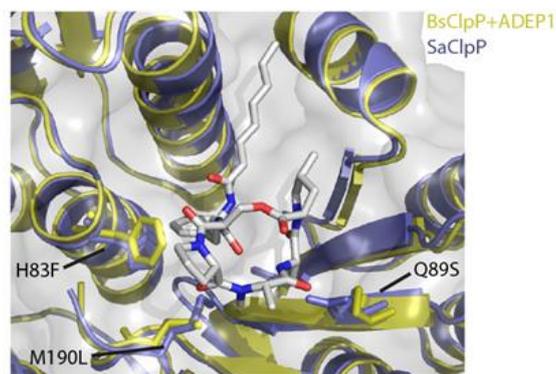


Abbildung 67: Ausschnitt aus der Kristallstruktur von SA ClpP und der Kristallstruktur von BS ClpP mit ADEP1. Die drei Positionen in der ADEP-Bindetasche, die in SA ClpP von BS ClpP und EC ClpP abweichen, sind markiert (Gersch *et al.*, unveröffentlichte Daten).

Die erste abweichende Position der ADEP Bindetasche ist Position 83, welche tief in der ADEP-Bindetasche sitzt und an der in *S. aureus* ein Histidin anstelle eines Phenylalanins

vorhanden ist. Diese Position wurde bereits als sehr wichtig für die ADEP Bindung beschrieben, da sich die F82A Mutante in *B. subtilis* garnicht mehr durch ADEP zum Caseinverdau aktivieren ließ und dies auch in *E. coli* nur noch mit deutlich verringerter Aktivität möglich war (Lee *et al.*, 2010). Da die Enzyme eine zum wt vergleichbar hohe Peptidaseaktivität aufwiesen, also generell voll funktionsfähig waren, muss dieser Defekt auf die ADEP Bindung zurückzuführen sein (Lee *et al.*, 2010). Ein zweiter auffälliger Unterschied ist ein Glutamin an Position 89, an der sich bei *B. subtilis* und *E. coli* ein Serin befindet. Die dritte Position, die eine Änderung gegenüber den ClpP Sequenzen der beiden untersuchten Modellbakterien aufweist ist die Position 190, an der bei *S. aureus* ein Methionin anstelle des Leucins vorhanden ist. Die SA ClpP Mutanten H83F, Q89S und M190L wurden in dieser Arbeit alle drei konstruiert und genauer analysiert. Die Mutation M190L zeigte weder bei Oligomerisierungs-Untersuchungen noch bei Untersuchung der Peptidase- und Proteaseaktivität einen Effekt. Dieser Befund geht damit einher, dass auch *E. faecalis* und *S. pneumoniae* ein Methionin an dieser Stelle besitzen und ADEPs gegen diese beiden Pathogen hochwirksam sind, was wiederum nicht für eine deutliche Verschlechterung der ADEP Bindung an ClpP spricht. Die Mutante Q89S, zeigte in den Untersuchungen einen Oligomerisierungsdefekt. Während das wt ClpP bei *S. aureus* immer als Tetradekamer vorliegt, handelte es sich bei Q89S um eine Mischung aus Tetradekamer und Heptamer. Dies führte auch zu einer geringeren Peptidaseaktivität, welche durch ADEPs wieder auf wt Niveau angehoben werden konnte. Auch der Oligomerisierungsdefekt konnte durch ADEPs aufgehoben werden, da die Größenausschlusschromatographie in Anwesenheit von ADEPs nur noch einen Peak mit der Größe des Tetradekamers zeigte. Bei Untersuchung der Proteaseaktivität ließ sich aber kein Effekt beobachten, da die Aktivierung vergleichbar zum wt ClpP verlief. Die Mutation Q89S führt in SA ClpP also nicht zu einer Verbesserung der Affinität von ADEPs zu ClpP, sondern nur zu einer geringeren Stabilität des Tetradekamers, was für zahlreiche andere Mutationen in verschiedensten Positionen von SA ClpP bereits beschrieben wurde (Gersch *et al.*, 2012). Die Tatsache, dass die Affinität von ADEP zu ClpP durch die Mutation Q89S nicht erhöht werden konnte steht wiederum im Einklang damit, dass *S. pneumoniae* und *E. faecalis* an dieser Position ebenfalls ein Glutamin haben und gegen diese beiden Stämme sehr gute MHK-Werte mit ADEPs erzielt wurden. Auch wenn Ganzzellwirkung natürlich nicht mit Targetaffinität gleichgesetzt werden kann, passen in diesem Fall die Befunde zusammen. Auch die Mutante H83F zeigte einen Oligomerisierungsdefekt, der zum Vorkommen von Heptameren führte und ebenfalls durch ADEP aufgehoben wurde, was sich sowohl mit Größenausschlusschromatographie als auch bei der Peptidaseaktivitätsmessung bestätigen ließ. Die H83F Mutante zeigte aber als einzige auch einen Effekt in der Proteaseaktivität, da nur halb so viel ADEP für die halbmaximale Aktivierung benötigt wurde, wie es beim wt und den anderen beiden Mutanten der Fall war. Die Affinität von ADEP zu ClpP ist also durch die Mutation H83F doppelt so gut wie zum wt ClpP. Dieser Befund unterstreicht erneut die Wichtigkeit dieser Aminosäureposition in der ADEP-Bindetasche, wie es zuvor schon für *E. coli* und *B. subtilis* beschrieben wurde (Lee *et*

al., 2010). Allerdings erhöht die Mutation zwar die Affinität zu ADEP und somit eventuell auch zu den Clp-ATPasen, aber sie verringert gleichzeitig auch die Stabilität des Tetradekamers. Es ist also denkbar, dass diese abweichende natürlich vorkommende Aminosäuresequenz durchaus evolutionär gesehen vorteilhaft für SA ClpP ist und dass die niedrigere Affinität in *S. aureus* Zellen weniger problematisch ist und somit besser toleriert werden kann als eine geringere Stabilität. Hinsichtlich der ADEP Funktionsweise zeigen die Ergebnisse interessanterweise zum ersten Mal, dass nicht nur ClpP Monomere von ADEPs zusammengehalten und stabilisiert werden, sondern auch ClpP Heptamere in Tetradekamere überführt werden. Dies deutet an, dass die Bindung von ADEPs in den hydrophoben Taschen am oberen/unteren Rand des Tetradekamers eine Konformationsänderung des gesamten Proteins zufolge haben muss, die auch die „handle region“ betrifft, an der die beiden Heptamere miteinander interagieren. Diese stabilisierende Wirkung wurde auch für humanes ClpP gezeigt, welches alleine als Heptamer vorliegt aber in Anwesenheit von humanem ClpX sowie von ADEP zum Tetradekamer assoziiert (Kang *et al.*, 2005;Lowth *et al.*, 2012). Dass die Bindung von ADEPs allosterisch zu einer erhöhten Stabilität in der „handle region“ führt, wurde außerdem kürzlich mit Hilfe von Wasserstoff-Austausch-Massenspektrometrie (HDX-MS) für *E. coli* ClpP gezeigt (Sowole *et al.*, 2013b). Weitere Studien konnten darüber hinaus beweisen, dass die Bindung von ADEPs an der hydrophobe ADEP-Bindetasche einen allosterischen Einfluss auf das weit entfernt liegende aktive Zentrum von ClpP hat, da die Hydrolysegeschwindigkeit von β -Lactonen in Anwesenheit von ADEP beschleunigt wurde. Außerdem konnte mit Hilfe von Enzymassays, Ultrazentrifugation und SAXS-Messungen gezeigt werden, dass eine D172N Mutante des aktiven Zentrums mit ADEP zum Caseinverdau aktiviert werden kann, indem ADEP Bindung die Konformationsänderung vom „compressed state“ zum „extended state“ bewirkt und den Enzymkomplex im „extended state“ stabilisiert (Gersch *et al.*, unveröffentlichte Daten). Insgesamt lässt sich also schlussfolgern, dass ADEP Bindung allosterisch zu einer Dynamik im gesamten Tetradekamer führt, die nicht nur auf die ADEP Bindetasche und die Eintrittspore zum katalytischen Zentrum, sondern auf die Konformation des gesamten Proteinkomplexes Einfluss hat. Diese Aussage bezieht sich aber nur auf den Fall, in dem ausreichend hohe ADEP Konzentrationen eingesetzt wurden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde nämlich beobachtet, dass niedrige ADEP Konzentrationen die Peptidase-Aktivität von SA ClpP und auch von tetradekamerem BS ClpP hemmen. Bei BS ClpP Dimeren wurde auch bei niedrigen ADEP Konzentrationen keine Hemmung, sondern immer eine Aktivierung beobachtet. Niedrige ADEP Konzentrationen scheinen also den Zusammenbau des Komplexes aus Monomeren zu stimulieren, aber einen bereits fertig gebauten tetradekameren Komplex in seiner Aktivität zu hemmen. Dies könnte daran liegen, dass bei niedrigen ADEP Konzentrationen nicht alle Bindetaschen besetzt werden und der Komplex somit nicht mehr so stabil ist wie zuvor. Diese Hypothese konnte mit Hilfe von Ultrazentrifugation bewiesen werden, da SA ClpP ohne ADEP und mit hohen ADEP Konzentrationen [12 μ M] als Tetradekamer vorlag, sich bei Einsatz von niedrigen ADEP Konzentrationen [$< 3 \mu$ M] aber eine Verschiebung zu geringerer

molekularer Größe ergab (Gersch et al., unveröffentlichte Daten). Dieser Befund unterstreicht erneut den Einfluss der Bindung von ADEP auf das komplette ClpP Tetradekamer.

6. Ausblick

In dieser Arbeit konnte erstmalig gezeigt werden, dass die Wirkung von ADEPs gegen Mykobakterien auf eine Wirkung am ClpP1P2 Komplex zurückzuführen ist. Für die weitere Aufklärung des genauen Wirkmechanismus müssen weitere Untersuchungen erfolgen. Diese sollten sich zum einen mit der Frage beschäftigen, ob ADEPs an ClpP1 und ClpP2 oder nur an einer der beiden ClpP Homologe binden. Des Weiteren sollte geklärt werden, ob die im Vergleich zu *B. subtilis* geringere überaktivierende Wirkung auf eine niedrigere Affinität von ADEPs zu MTB ClpP1P2 zurückzuführen ist oder ob die Aktivität durch das Vorhandensein von Z-LL künstlich verringert wird. Auch welches Aktivatorpeptid in der mykobakteriellen Zelle die Funktion von Z-LL übernimmt oder ob ein solches überhaupt existiert, wäre eine interessante Fragestellung für weitere Studien.

Die Ergebnisse dieser Arbeit lassen die Schlussfolgerung zu, dass ADEPs in Mykobakterien primär über die Inhibierung der natürlichen, essentiellen Funktionen des MTB ClpP1P2 Komplexes wirken und nicht über dessen Überaktivierung. Im Hinblick auf eine potentielle Verwendung von ADEPs gegen Tuberkulose zeigt diese Arbeit zwar das grundsätzliche Potential aber auch verschiedene Optimierungsparameter auf. Ein auf Mykobakterien ausgerichtetes Leitstrukturoptimierungsprogramm und/oder eine Kombinationstherapie mit anderen Antituberkulotika könnten aber Möglichkeiten bieten, den Einsatz von ADEPs in der Tuberkulosetherapie weiterhin zu verfolgen. Außerdem sind ADEPs ein nützliches Werkzeug, um die Funktionsweise des besonderen ClpP1P2 Komplexes von Mykobakterien weiter zu untersuchen.

Eine weitere Möglichkeit für zukünftige Projekte wäre die Untersuchung der Wirkung von ADEPs an anderen Pathogenen, die ebenfalls das Potential für geringere Resistenzentwicklung bieten. Ein Beispiel wäre das Gram-positive Bakterium *Listeria monocytogenes*, welches ebenfalls über zwei ClpP Homologe verfügt, die nicht in einem Operon kodiert werden. Für ClpP2 ist bereits bekannt, dass es, wie auch ClpP von *S. aureus*, nicht essentiell für das Wachstum, aber essentiell für die Virulenz ist (Gaillot *et al.*, 2000). Über die Funktion von ClpP1 ist bisher wenig bekannt. Es wird aber spekuliert, dass es eher regulatorische Funktionen in der Zelle übernimmt, da es über eine defekte katalytische Triade (SHN anstatt SHD) verfügt und nur eine sehr geringe Aktivität aufweist (Zeiler *et al.*, 2011; Zeiler *et al.*, 2013). Zu untersuchen, ob ADEPs auch an ClpP1 wirken und ob die ADEP Resistenzrate in *L. monocytogenes* geringer ist und resistente Klone nur Mutationen in ClpP2 oder auch in ClpP1 aufweisen, wäre eine interessante Fragestellung. Weitere Gram-positive Bakterien, die über mehrere ClpP Versionen verfügen, sind Streptomycceten und Cyanobakterien, von denen aber keine humanpathogenen oder zoopathogenen Arten bekannt sind. Auch die pathogenen Bakterien *Pseudomonas aeruginosa* und *Chlamydia pneumoniae* verfügen über zwei ClpP Homologe (Yu und Houry, 2007). Allerdings handelt es sich bei beiden um Gram-negative Bakterien, bei denen ADEPs nicht wirksam sind, weil sie vermutlich die äußere Membran nicht überwinden können (Heike Brötz-Oesterheld,

unveröffentlichte Daten). Für Chlamydien wurde bereits beschrieben, dass ClpP eine essentielle Funktion bei der Entwicklung von „Reticulate bodys“ (RB) zu „Elementary bodys“ (EB) einnimmt (Mukhopadhyay *et al.*, 2006). Diese Entwicklung ist für die Virulenz von Chlamydien essentiell, da nur EBs neue Zellen infizieren können, um sich dann in der Wirtszelle zu replizierenden RBs zu entwickeln und nach Lyse der Zellen erneut zu EBs zu differenzieren (Hammerschlag, 2002). Somit würden ADEPs gegebenenfalls eine antivirulente Wirkung gegen Chlamydien haben, falls sie in die Gram-negative Bakterienzelle aufgenommen werden können.

Kürzlich wurde für isoliertes ClpP aus *S. aureus* das Zusammenwirken von β -Lactonen und ADEPs untersucht. In diesen Studien konnte gezeigt werden, dass ADEPs nicht nur das Öffnen der Eintrittspore zum katalytischen Zentrum von ClpP bewirken (Lee *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2010), sondern allosterisch eine Konformationsänderung des ganzen Moleküls bewirken und das Tetradekamer in der katalytisch aktiven „extended form“ stabilisieren (Gersch *et al.*, unveröffentlichte Daten). Interessant wäre in diesem Zusammenhang auch, das synergistische Potential der Wirkung von ADEPs und β -Lactonen gegen *S. aureus* Zellen *in vitro* und im Falle guter Aktivität auch *in vivo* gegen persistierende Zellen zu untersuchen. Auch die Wirkung von β -Lactonen gegen Mykobakterien zu charakterisieren wäre eine interessante Fragestellung, da hier die Möglichkeit bestünde, dass sie nicht nur antivirulent, sondern aufgrund der Essentialität von *clpP1* und *clpP2* sogar antibiotisch wirken könnten.

7. Anhang

7.1. Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
A	Alanin
ADEP	Acyldepsipeptid Antibiotika
ADS	Albumin Dextrose Salt
AMC	7-Amino-4-Trifluoromethylcoumarin
BCG	Bacillus Calmette-Guérin
bp	Basenpaare
BS	<i>Bacillus subtilis</i>
BSA	Rinderserumalbumin (engl. bovine serum albumin)
C	Cystein
C	Cytosin
° C	Grad Celsius
ClgR	clp gene regulator
Clp	Caseinolytische Protease
D	Asparaginsäure
dest.	destilliert
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl. deoxyribonucleic acid)
dNTP	Desoxyribonucleotidtriphosphat
E	Glutaminsäure
EC	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamin-Tetraessigsäure (engl. ethylenediaminetetraacetic acid)
EF	Enterococcus Faecalis
F	Phenylalanin
FITC	Fluorescein-isothiocyanat
FtsZ	Filamenting temperature-sensitive mutant Z
fwd	forward (engl. vorwärts)
g	Gramm
G	Glycin
G	Guanin
g	Schwerebeschleunigung der Erde (9,81 ms ⁻²)
H	Histidin
h	Stunde
h	Hill-Koeffizient
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
I	Isoleucin
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
K	Lysin
k	Kilo (10 ³)
kb	Kilobasenpaare
K _{half}	Substanz-Konzentration, bei der die halbmaximale Reaktionsgeschwindigkeit erreicht wird
L	Leucin

I	Liter
LB	Lysogener-Zyklus-Medium (engl. lysogeny broth)
LM	<i>Listeria monocytogenes</i>
m	milli (10^{-3})
M	Methionin
M	molar (mol/L)
mA	milliampere
MES	2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid
MHK	minimale Hemmkonzentration
min	Minute(n)
mol	Mol ($6,02214179 \times 10^{23}$ Teilchen)
MOPS	3-(N-morpholino)propanesulfonic acid
MTB	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
mV	millivolt
N	Asparagin
n	nano (10^{-9})
nm	Nanometer
OADC	Oleic Albumin Dextrose Catalase
ori	Replikationsursprung (engl. origin of replication)
P	Prolin
p.a.	Per analysis (zur Analyse)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (engl. polymerase chain reaction)
PEG	Polyethylenglykol
PETG	Polyethylenterephthalat
pH	Säuregrad (lat. pondus/potentia hydrogenii)
PMBN	Polymycin B Nonapeptid
Q	Glutamin
qPCR	quantitative Polymerase-Ketten-Reaktion
R	Arginin
rev	reverse (engl. rückwärts)
rpm	Umdrehungen pro Minute (engl. revolutions per minute)
RT	Reverse Transkriptase
S	Serin
SA	<i>Staphylococcus aureus</i>
sek	Sekunde(n)
SP	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
Suc	succinyl
T	Threonin
T	Thymin
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TE	Tris-EDTA
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
V	Volt
V	Valin
V – F	Peptid aus den 10 Aminosäuren FAPHMALVPV
V _{max}	maximale Reaktionsgeschwindigkeit

W	Tryptophan
w	Gewicht (engl. weight)
wt	Wildtyp
Y	Tyrosin
Z	Benzyloxycarbonyl
μ	mikro (10 ⁻⁶)

7.2. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Zeitlicher Verlauf der Zulassungen verschiedener Antibiotikaklassen auf den amerikanischen Markt (Fischbach and Walsh, 2009).	- 1 -
Abbildung 2: Verteilung von 2012 neu aufgetretenen Tuberkulosefällen laut WHO Tuberkulose Report 2013.....	- 4 -
Abbildung 3: Aufbau der mykobakteriellen Zellhülle (Ouellet <i>et al.</i> , 2010).....	- 5 -
Abbildung 4: Derzeitige zugelassene Antituberkulotika und Substanzen, die sich in der Antituberkulose Forschungspipeline befinden (mit * markiert) zusammen mit ihren Wirkungsorten (Quelle: vfa, Mai 2012). Mittlerweile ist auch Bedaquilin sowohl auf dem amerikanischen, als auch auf dem europäischen Markt zugelassen worden.	- 6 -
Abbildung 5: Funktion der Clp-Protease im Modellorganismus <i>B. subtilis</i> (Brötz-Oesterhelt and Sass, 2014).....	- 9 -
Abbildung 6: Chemische Struktur des Naturstoffes ADEP1 sowie der in dieser Arbeit verwendeten ADEP-Derivate. Strukturelle Unterschiede sind grau hervorgehoben.	- 11 -
Abbildung 7: Wirkung von ADEPs an ClpP im Modellorganismus <i>B. subtilis</i> (Brötz-Oesterhelt and Sass, 2014).....	- 11 -
Abbildung 8: ADEP behandelte <i>B. subtilis</i> Stäbchen filamentieren (A) im Gegensatz zu unbehandelten Zellen (B). ADEP behandelte <i>S. aureus</i> Kokken schwellen (C) im Vergleich zu unbehandelten Zellen (D) an. Dies ist begründet durch den Abbau des Zellzyklusproteins FtsZ durch den ADEP-ClpP Komplex (E), was hier mit Hilfe von Western Blots gegen Zelllysate von behandeltem und unbehandeltem <i>B. subtilis</i> gezeigt wurde (Sass <i>et al.</i> , 2011).....	- 12 -
Abbildung 9: Neue ADEP-Derivate (Carney <i>et al.</i> , 2014). Unterschiede zu ADEP4 sind grau unterlegt. .	- 13 -
Abbildung 10: Schema der Aktivierung des MTB ClpP1P2 Komplexes mit Z-LL (Akopian <i>et al.</i> , 2012)...	- 15 -
Abbildung 11: In dieser Arbeit verwendete Marker zur Abschätzung von Größe und Konzentration von DNA oder Proteinen.	- 26 -
Abbildung 12: Wachstumskurve von <i>M. bovis</i> BCG in Anwesenheit verschiedener ADEP2 Konzentrationen.....	- 60 -
Abbildung 13: Standardgerade der detektierten Peakfläche bei bekannter ADEP Konzentration... -	- 62 -
Abbildung 14: Verlauf der ADEP2 und 3 Konzentration bei Inkubation im Medium. Gezeigt sind Mittelwerte und Standardabweichungen von je zwei biologisch unabhängigen Versuchen.	- 62 -

Abbildung 15: HPLC Chromatogramme von ADEP2 (A) und ADEP3 (B) im Medium an verschiedenen Tagen. Aus dem HPLC Lauf der ADEP3 Proben wurden zusätzlich alle Peaks aufgefangen und LC-MS Messungen durchgeführt (C) um die Massen zu bestimmen. - 63 -

Abbildung 16: Chemische Struktur der ADEP3 Seitenkette (A) und des potentiellen ersten Abbauproduktes von ADEP3. (Zum Vergleich mit den Strukturen von ADEP2 und 3 vgl. Abb. 6).... - 64 -

Abbildung 17: UV-Detektion und positive Ionisierung der LC-MS Messungen nach Aufreinigung der zusätzlichen Komponente (A) und ADEP3 (B). - 65 -

Abbildung 18: Struktur der methylierten ADEP3 Seitenkette, die potentiell der Masse von 353 g/mol entsprechen könnte. - 65 -

Abbildung 19: Cfu Entwicklung von *M. bovis* BCG nach Infektion von J744.A1 Makrophagen mit verschiedenen Zellzahlen pro Well und verschiedenen MOI. Gezeigt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von drei parrallelen Ansätzen aus denselben Zell- und Bakterirenkulturen. Inh = Isoniazid..... - 67 -

Abbildung 20: Phasenkontrastmikroskopische und fluoreszenzmikroskopische Bilder der mit *M. bovis* BCG infizierten J744.A1 Makrophagen nach AuraminO/RhodaminB Färbung. - 68 -

Abbildung 21: Cfu Verlauf von *M. bovis* BCG aus J744.A1 Makrophagen nach intrazellulärer Behandlung mit ADEPs. Gezeigt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von drei biologisch unabhängigen Versuchen..... - 68 -

Abbildung 22: Cfu Verlauf von *M. bovis* BCG aus J744.A1 Makrophagen nach intrazellulärer Behandlung mit verschiedenen Verdünnungen von ADEP2, ADEP4 und Isoniazid. Gezeigt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von drei biologisch unabhängigen Versuchen. Werte am „limit of detection“ entsprechen 1 oder 0 gewachsener Kolonien..... - 69 -

Abbildung 23: Viabilität der infizierten Makrophagen an verschiedenen Tagen nach Behandlung mit verschiedenen ADEP2 Konzentrationen..... - 69 -

Abbildung 24: Phasenkontrastmikroskopische Aufnahmen von J744.A1 Makrophagen 5 Tage nach Infektion mit *M. bovis* BCG und Behandlung mit verschiedenen ADEP2 Konzentrationen sowie Isoniazid und DMSO als Kontrolle. - 71 -

Abbildung 25: Wachstum von *M. bovis* BCG auf 7H10 Agarplatten mit 1 g/l BSA in Anwesenheit und Abwesenheit von ADEP2. - 72 -

Abbildung 26: Schematische Darstellung der doppelten homologen Rekombination, die zum *knock-in* der HygromycinB Resistenzkassette (*hygB*) und der 4 Tetrazyklin Operatoren (TetO) vor *clpP1* führt. Der *knock-in* vor *clpP2* sollte analog mit Verwendung anderer Flanken stattfinden. - 75 -

Abbildung 27: Schematische Darstellung der Lage der *knock-in* Flanken im Genom von *M. bovis* BCG (A) und Agarosegel nach erfolgreicher Amplifizierung der *knock-in* Flanken. Als Größenmarker wurde der Generuler 1 kb DNA ladder verwendet..... - 75 -

- Abbildung 28:** Agarosegel mit *knock-in* Plasmiden nach EcoR1 Kontrollverdau. Die Plasmide, die das korrekte Bandenmuster aufweisen und weiter verwendet wurden, sind mit Pfeilen markiert. Als Größenmarker wurde der Genruler 1kb DNA verwendet. - 76 -
- Abbildung 29:** Agarosegel mit *Knock-in* Phasmiden nach Pac1 Kontrollverdau. Die Phasmide die das korrekte Bandenmuster aufweisen und weiter verwendet wurden, sind mit Pfeilen markiert. Als Größenmarker wurde der Genruler 1kb DNA verwendet. - 76 -
- Abbildung 30: Southern Blot zum Screening nach erfolgreichen knock-in Mutanten..... - 77 -
- Abbildung 31: Cfu-Werte nach Transformation von *M. bovis* BCG 4xTetO-*clpP1* mit dem Vektorhintergrund pMV261 und mit prevTetR-D mit verschiedenen ATc Konzentrationen. - 78 -
- Abbildung 32: Ausschnitt aus dem Alignment der DNA Sequenzen von den drei *M. bovis* BCG *clpP1-tetoff* Klonen im Bereich downstream von *clpP1P2*. Die RBS ist blau umrandet, die Tet-Operatoren sind rot umrandet. Das Start-Codon für *clpP1* ist in roten Buchstaben dargestellt. - 79 -
- Abbildung 33: Schematische Darstellung der Funktionsweise des Stammes *M. bovis* BCG *clpP1-tetoff*.- 80 -
- Abbildung 34: Wachstumskurve von *M. bovis* BCG wt und *M. bovis* BCG *clpP1-tetoff* ohne ATc (A). Wachstumskurven von *M. bovis* BCG wt (B) und *M. bovis* BCG *clpP1-tetoff* (C) mit verschiedenen ATc Konzentrationen, sowie Absterbekurve von *M. bovis* BCG *clpP1-tetoff* mit höheren ATc Konzentrationen (D). In (C) und (D) sind Mittelwerte und Standardabweichungen von drei verwendeten Klonen gezeigt..... - 81 -
- Abbildung 35: Agarosegel der isolierten Gesamt RNA aus *M. bovis* BCG wt und *clpP1-tetoff*. Als Größenstandart wurde der Generuler 1 kb dNA ladder genutzt. - 82 -
- Abbildung 36: Mittels qPCR bestimmte *clpP1P2* Transkriptmenge in *M. bovis* BCG *clpP1-tetoff* im Verhältnis zur Transkriptmenge im wt. Gezeigt sind Mittelwerte und Standardabweichungen der Daten von drei verwendeten Klonen. - 83 -
- Abbildung 37: 96 Well Platte nach Durchführung eines exemplarischen Alamar Blue Assays zur Bestimmung der MHK-Werte von ADEP2 gegen *M. bovis* BCG *clpP1-tetoff* in Anwesenheit verschiedener ATc-Konzentrationen..... - 84 -
- Abbildung 38: Schematische Darstellung der Funktionsweise des Stammes *B. subtilis* 168-pX2-*clpP*. ... - 85 -
- Abbildung 39: Verdau von Z-GGL-AMC mit MTB ClpP1, ClpP2 oder ClpP1P2 ohne vorherige Aktivierung mit Z-LL. Gezeigt ist ein repräsentativer Versuch. - 87 -
- Abbildung 40: zeitlicher Verlauf des Abbaus von Z-GGL-AMC mit MTB ClpP1P2/Z-LL in Anwesenheit und Abwesenheit verschiedener ADEP Derivate (A). Aus den ersten, linearen 5 min von (A) berechnete Peptidase Aktivitätsraten (B). In (B) sind Mittelwerte und Standardabweichungen von drei biologisch unabhängigen Versuchen gezeigt..... - 87 -

- Abbildung 41: Zeitlicher Verlauf des Abbaus der „FRET 25Xaa substrate library“ mit MTB ClpP1P2/Z-LL in Anwesenheit und Abwesenheit verschiedener ADEP Derivate (A). Aus den ersten, linearen 5 min von (A) berechnete Peptidase Aktivitätsraten (B). In (B) sind Mittelwerte und Standardabweichungen von zwei biologisch unabhängigen Versuchen gezeigt. - 88 -
- Abbildung 42: Struktureller Aufbau der „three generation peptides“ (A). repräsentativer Verlauf des Abbaus der ersten Generation des Peptids mit MTB ClpP1P2/Z-LL in Abwesenheit und Anwesenheit verschiedener ADEP Derivate (B). Aktivitätsraten von MTB ClpP1P2/Z-LL beim Abbau der drei verschiedenen Generationen der „three generation peptides“ in Abwesenheit und Anwesenheit verschiedener ADEP-Derivate(C). Die Aktivitätsrate des Verdaus der ersten Generation mit MTB ClpP1P2 ohne ADEP wurde hierbei auf 100 % gesetzt. Gezeigt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von zwei biologisch unabhängigen Versuchen, die jeweils in Duplikaten durchgeführt wurden. - 89 -
- Abbildung 43: SDS-PAGE des Verdaus von unmarkiertem β -Casein mit MTB ClpP1P2/Z-LL in Abwesenheit und Anwesenheit verschiedener ADEP Derivate. Gezeigt ist ein repräsentativer Versuch von drei biologisch unabhängigen Replikaten. - 90 -
- Abbildung 44: Zeitlicher Verlauf des Abbaus von FITC-Casein mit MTB ClpP1P2/Z-LL in Anwesenheit und Abwesenheit verschiedener ADEP Derivate (A). Aus den ersten, linearen 5 min von (A) berechnete Peptidase Aktivitätsraten (B). In (B) sind Mittelwerte und Standardabweichungen von drei biologisch unabhängigen Versuchen gezeigt. - 91 -
- Abbildung 45: Der aktivierende Effekt von ADEP8 auf den FITC-Casein Abbau von ClpP1P2/Z-LL ist konzentrationsabhängig. Gezeigt sind Mittelwerte und Standardabweichung von zwei biologisch unabhängigen Versuchen. Die basale Aktivitätsrate ohne ADEP wurde auf 100% gesetzt. - 92 -
- Abbildung 46: Aktivierung von ClpP aus *B. subtilis* durch ADEPs zum Caseinverdau. Gezeigt ist ein repräsentativer Durchlauf des Versuches. - 93 -
- Abbildung 47: Verdau von suc-LY-AMC (A) und FITC-Casein (B) mit BS ClpP in Abwesenheit und Anwesenheit von ADEP8 und/oder Z-LL. Gezeigt ist je ein repräsentativer Durchlauf des Versuches. ... - 94 -
- Abbildung 48: SDS-PAGE des Verdaus der Isoform 2 des humanen Tau Proteins mit BS ClpP und MTB ClpP1P2/Z-LL in Abwesenheit und Anwesenheit verschiedener ADEP Derivate. Gezeigt ist ein repräsentativer Versuch von drei biologisch unabhängigen Replikaten. (A2 = ADEP2, A3 = ADEP3, A4 = ADEP4, A7 = ADEP7, A8 = ADEP8) - 95 -
- Abbildung 49: Modell der K18 Mutante (124 Aminosäuren lang) des humanen Tau Proteins (441 Aminosäuren lang) (von Bergen *et al.*, 2001) (A). SDS-PAGE des Verdaus von K18 mit MTB ClpP1P2/Z-LL in Abwesenheit und Anwesenheit von ADEP4 (B). In Abwesenheit von ClpP bleibt K18 während der Inkubationszeit stabil (C). Gezeigt ist je ein repräsentativer Durchlauf des Versuches. - 95 -
- Abbildung 50: SDS-PAGE des Verdaus von FtsZ aus *M. tuberculosis* und *B. subtilis* mit MTB ClpP1P2/Z-LL oder - 96 -

Abbildung 51: Mikroskopische Bilder von *M. bovis* BCG nach Inkubation mit verschiedenen ADEP2 Konzentrationen..... - 97 -

Abbildung 52: SDS-PAGE und Western Blot zum Detektieren von FtsZ in den Lysaten von *M. bovis* BCG in Abwesenheit und Anwesenheit verschiedener ADEP Derivate. Gezeigt ist ein repräsentativer Durchlauf von drei biologisch unabhängigen Versuchen..... - 97 -

Abbildung 53: Fraktionen der StrepII-tag Aufreinigung von SA ClpP auf einer SDS-PAGE. Ld = Lysat Durchlauf; W = Waschfraktion; L = PAGEruler unstained protein ladder ; E1 – E122 =Elutionsfraktionen. - 98 -

Abbildung 54: Chromatogramme der Größenausschlusschromatographie von Standardproteinen (lila) und von wt SA ClpP (rot). - 99 -

Abbildung 55: Peptidaseaktivität von nativem SA ClpP wt und SA ClpP-strepII wt in Anwesenheit von 25 µM verschiedener ADEP-Derivate (A) und Konzentrationsreihen des selben Peptidase-Assays zum Vergleich der Aktivierbarkeit von SA ClpP-strep wt mit ADEP4 und ADEP7, sowie der Aktivierbarkeit von nativem SA ClpP wt und SA ClpP-strepII wt mit ADEP4 (C) und ADEP7 (D). Gezeigt sind jeweils die Mittelwerte und Standardabweichungen von Triplikaten eines repräsentativen von drei biologisch unabhängigen Durchläufen. - 100 -

Abbildung 56: Größenausschlusschromatographie von BS ClpP in Anwesenheit von 20% Glycerin führt zu Bildung eines höhermolekularen Aggregates, sowie zu Tetradekamer- und Dimer Fraktionen (A). Im suc-LY-AMC Abbaussay wird die Peptidaseaktivität vom BS ClpP Tetradekamer bei niedrigen ADEP Konzentrationen inhibiert. Der inhibierende Effekt lässt sich durch Anwesenheit von 10 % Glycerin wieder aufheben (B). Die Peptidaseaktivität vom BS ClpP Dimer wird bereits bei geringeren ADEP Konzentrationen aktiviert. Konzentrationen die zu niedrig für die Aktivierung sind, haben keinen Effekt auf die Peptidaseaktivität (C). Gezeigt sind jeweils die Mittelwerte und Standardabweichungen von Triplikaten eines repräsentativen von zwei biologisch unabhängigen Durchläufen. - 101 -

Abbildung 57: Protease Aktivitätsraten von SA ClpP gegen FITC-Casein in Anwesenheit von 25 µM verschiedener ADEP Derivate (A) und Kinetik von nativem SA ClpP sowie SA ClpP-strepII mit ADEP4 (B) sowie von der ADEP4 und ADEP7 Aktivität an SA ClpP-strepII (C) im Vergleich. SDS-PAGE des Verdaus von ungelabeltem Casein mit SA ClpP in Anwesenheit von ADEP7 (D). Gezeigt sind jeweils die Mittelwerte und Standardabweichungen von Triplikaten eines repräsentativen von drei biologisch unabhängigen Durchläufen. - 102 -

Abbildung 58: SDS-PAGE des Verdaus von SA FtsZ mit SA ClpP in Anwesenheit von 12 µM ADEP7..... - 103 -

Abbildung 59: Kinetik des FITC-Casein Abbaussays mit BS ClpP und ADEP7. Gezeigt sind jeweils die Mittelwerte und Standardabweichungen von Triplikaten eines repräsentativen von zwei biologisch unabhängigen Durchläufen. - 104 -

- Abbildung 60: Agarosegel der SA ClpP Mutanten H83F, Q89S und M190L nach Amplifikation während der zielgerichteten Mutagenese. Als Größenstandart wurde der Generuler 1kb DNA ladder verwendet. - 105 -
- Abbildung 61: Alignment nach erfolgreicher zielgerichteter Mutagenese der Mutanten H83F, Q89S und M190L in SA ClpP-strep - 106 -
- Abbildung 62: Chromatogramme der präparativen Größenausschlusschromatogramme von SA ClpP wt, H83F, Q89S und M190L..... - 106 -
- Abbildung 63: Peptidaseaktivitätsraten von SA ClpP wt, H83F, Q89S und M190L in Abwesenheit und Anwesenheit von 12 μ M ADEP7 (A) und mit verschiedenen ADEP7 Konzentrationen (B). Aus den in (A) gezeigten Peptidase Abbauassays wurden weiterhin eine native PAGE (C) und eine SDS-PAGE (D) durchgeführt. In (A) und (B) sind jeweils die Mittelwerte und Standardabweichungen von Triplikaten eines repräsentativen von drei biologisch unabhängigen Durchläufen.gezeigt. In (C) wurde als Größenmarker der native marker und in (D) der PAGERuler prestained protein ladder genutzt.... - 107 -
- Abbildung 64: Chromatogramme der analytischen Größenausschlusschromatographie von SA ClpP wt, H83F, Q89S und M190L, in Abwesenheit und Anwesenheit von 12 μ M ADEP7. Gezeigt ist jeweils ein repräsentativer Durchlauf. - 108 -
- Abbildung 65: Hill-fitting der Proteaseaktivitätsraten beim FITC-Casein Abbau mit SA ClpP wt, H83F, Q89S und M190L in Anwesenheit verschiedener ADEP7 Konzentrationen. Gezeigt sind jeweils die Mittelwerte und Standardabweichungen von Triplikaten eines repräsentativen von drei biologisch unabhängigen Durchläufen. - 109 -
- Abbildung 66: Alignment von ClpP Homologen verschiedener Bakterien. EC = *E. coli*, BS = *B. subtilis*, SA = *S. aureus*, SP = *Streptococcus pneumoniae*, EF = *Enterococcus faecium*, MTB = *M. tuberculosis*. Positionen die im Rahmen dieser Arbeit in SA ClpP mutiert wurden, sind mit Pfeilen markiert. ... - 115 -
- Abbildung 67: Ausschnitt aus der Kristallstruktur von SA ClpP und der Kristallstruktur von BS ClpP mit ADEP1. Die drei Positionen in der ADEP-Bindetasche, die in SA ClpP von BS ClpP und EC ClpP abweichen, sind markiert (Gersch et al., unveröffentlichte Daten)..... - 122 -

7.3. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: In dieser Arbeit verwendete Bakterienstämme und Zellkulturlinien	- 24 -
Tabelle 2: In dieser Arbeit verwendete Säulen.	- 27 -
Tabelle 3: In dieser Arbeit verwendete Software.	- 28 -
Tabelle 4: Zellkonzentrationen verschiedener Bakterienstämme bei einer OD _{600nm} von 0,1.	- 39 -
Tabelle 5: MHK-Werte verschiedener ADEP Derivate gegen verschiedene Mykobakterienstämmen in Middlebrook 7H9 Medium oder Mineralmedium (Yam <i>et al.</i> , 2009).	- 58 -
Tabelle 6: MHK-Werte von ADEP2 gegen verschiedene Grampositive Bakterien in Abwesenheit und Anwesenheit verschiedener BSA oder FCS Konzentrationen.	- 59 -
Tabelle 7: Einfluss der eingesetzten Cfu-Konzentration auf die MHK-Werte von ADEPs gegen <i>M. bovis</i> BCG.	- 59 -
Tabelle 8: MHK-Werte von verschiedenen ADEP-Derivaten gegen den Grampositiven Modellorganismus <i>B. subtilis</i> ohne Vorinkubation, bzw. nach 9 tägiger Vorinkubation der ADEP-Derivate in Müller-Hinton-Medium.	- 61 -
Tabelle 9: MHK-Werte von ADEP3 vor und nach Aufreinigung, sowie von der zusätzlichen Komponente in ADEP3 gegen <i>M. bovis</i> BCG Pasteur.	- 66 -
Tabelle 10: IC ₅₀ Werte von verschiedenen ADEP Derivaten und vom Vergleichszytostatika Cycloheximid gegen J774.A1 Makrophagen, bezogen auf Wachstumskontrollen, welche dieselbe Menge DMSO enthielten.....	- 71 -
Tabelle 11: MHK-Werte der <i>M. bovis</i> BCG Stämme, die von ADEP haltigen Agarplatten isoliert wurden.	- 73 -
Tabelle 12: Cfu-Werte nach Transformation der Tet Repressor Plasmide in den knock-in Stamm <i>M. bovis</i> BCG 4xTetO-ClpP1. Der Stamm, der für weitere Versuche verwendet wurde ist gelb unterlegt. .	- 78 -
Tabelle 13: Konzentration der Gesamt RNA aus <i>M. bovis</i> BCG wt und den Klonen 1, 2 und 3 von <i>M. bovis</i> BCG <i>clpP1-tetoff</i> sowie die berechnete Verdünnung für die cDNA Synthese.	- 82 -
Tabelle 14: MHK-Werte von ADEPs gegen <i>M. bovis</i> BCG Pasteur wt (A) und <i>M. bovis</i> BCG <i>clpP1-tetoff</i> (B) bei verschiedenen ATc Konzentrationen. Der Versuch wurde viermal unabhängig voneinander durchgeführt (n.g. = nicht gewachsen)	- 84 -
Tabelle 15: MHK-Werte von ADEP2 gegen <i>B. subtilis</i> Stämme in Anwesenheit verschiedener Xylose Konzentrationen in LB Medium.....	- 86 -
Tabelle 16: Kinetische Daten des Hill-fittings der Mittelwerte von drei biologisch unabhängigen FITC-Casein Abbauassays mit nativem SA ClpP und SA ClpP-strepII mit ADEP4 und ADEP7. (MW = Mittelwert; stabw = Standardabweichung)	- 103 -

Tabelle 17: MHK-Werte verschiedener ADEP Derivate gegen verschiedene Grampositive Bakterien. ... - 104 -

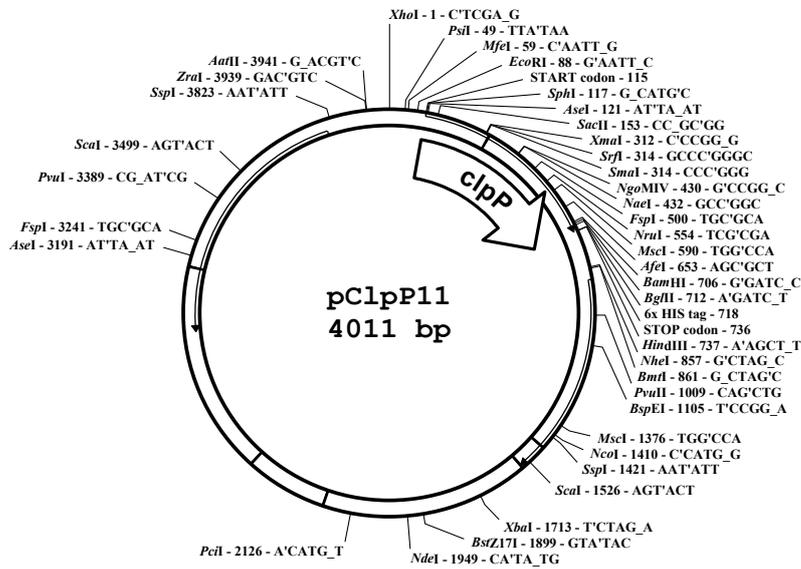
Tabelle 18: Kinetische Daten des Hill-fittings der Mittelwerte von zwei biologisch unabhängigen FITC-Casein Abbauassays mit BS ClpP und ADEP7. (MW = Mittelwert; stabw = Standardabweichung) - 104 -

Tabelle 19: Kinetische Daten des Hill-fittings der Mittelwerte von drei biologisch unabhängigen FITC-Casein Abbauassays mit SA ClpP-strep wt, H83F, Q89S und M190L mit ADEP7. (MW = Mittelwert; stabw = Standardabweichung) - 110 -

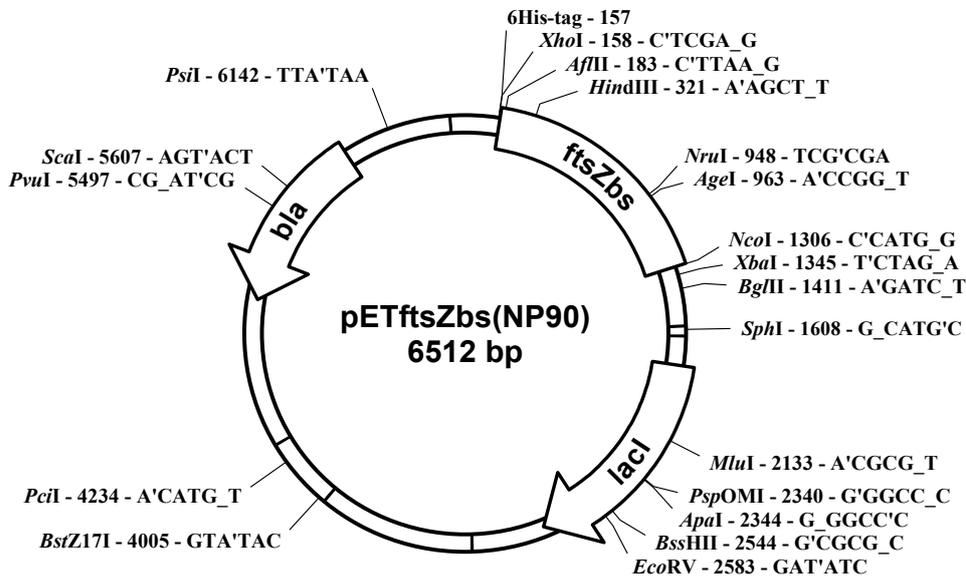
Tabelle 20: Übersicht über die Aminosäurepositionen der ADEP-Bindetasche, die in MTB ClpP1 und/oder MTB ClpP2 von denen in BS ClpP und EC ClpP abweichen. - 115 -

7.4. Plasmidkarten

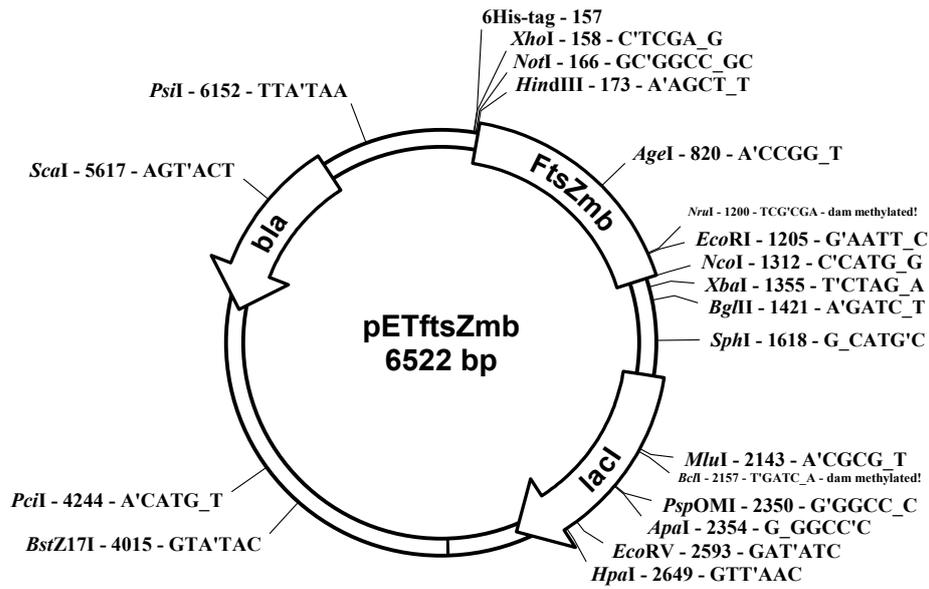
pClpP BS:



pET-FtsZ BS:



pET-FtsZ-BCG:

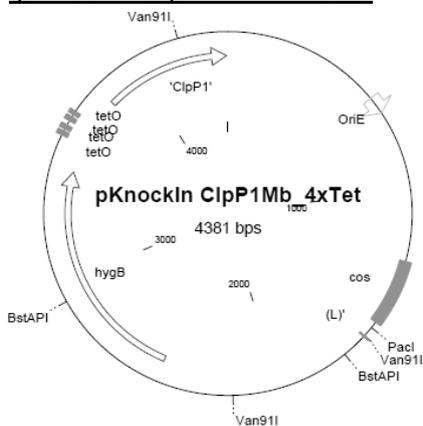


pET301-SA ClpP-strep:

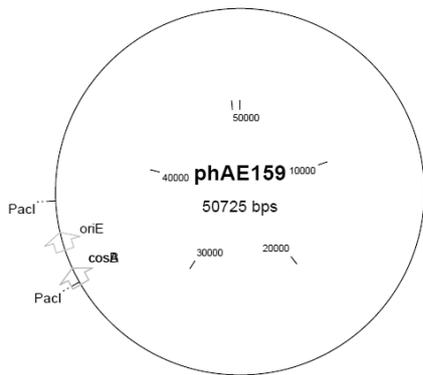


→ pET 301-SA ClpP H82F, Q88S, M189L sind identisch, bis auf die Punktmutation im SA ClpP.

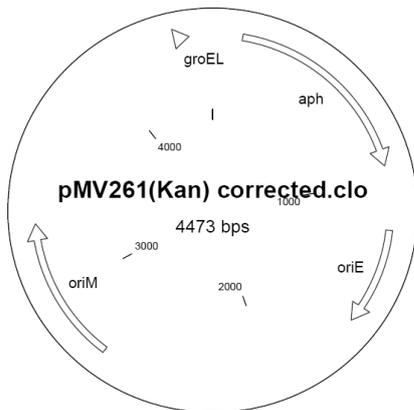
pKnockIn ClpP1MB 4xTetO:



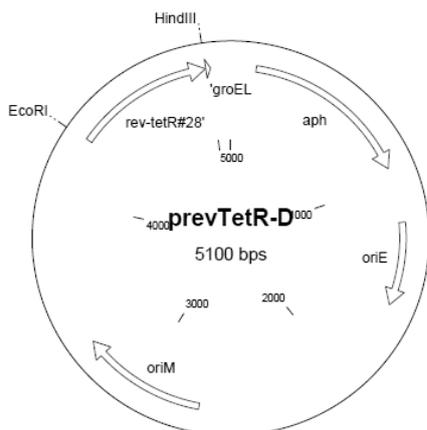
phAE159:



pMV261:

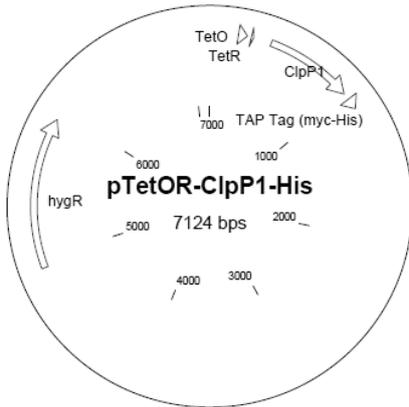


prevTet-D:

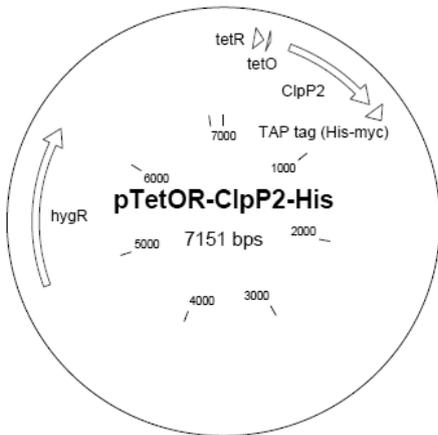


→ pTetR-A bis pTetR-D, sowie prevTetR-A- prevTetR-G sind identisch, bis auf kleine Änderungen, in der Ribosomen Bindestelle und in der Sequenz des TetRepressors.

pTetOR-MTB-ClpP1:



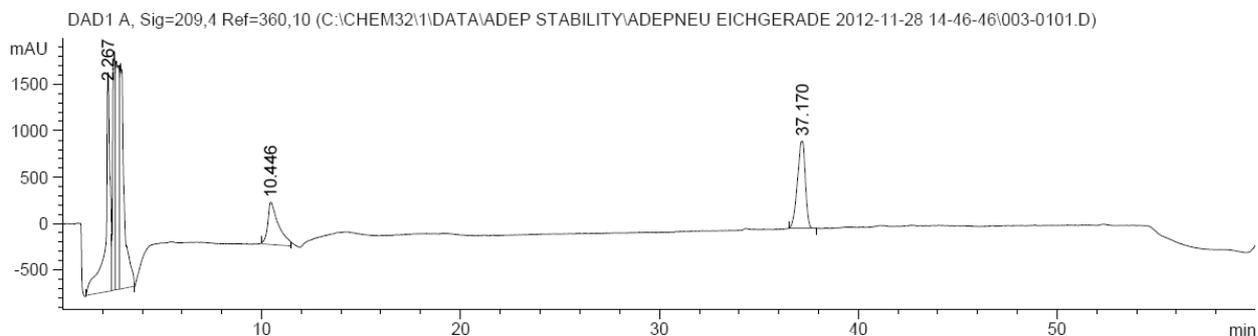
pTetOR-MTB-ClpP2:



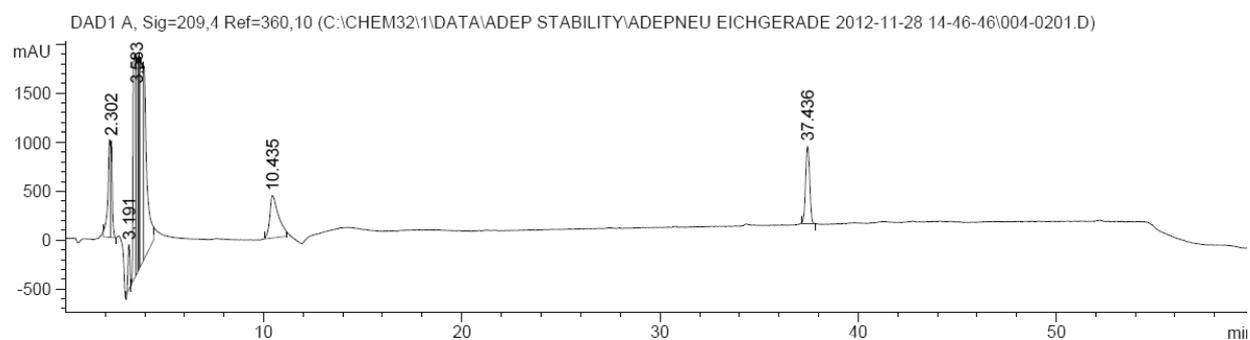
7.5. Chromatogramme

ADEP 2 Eichgerade:

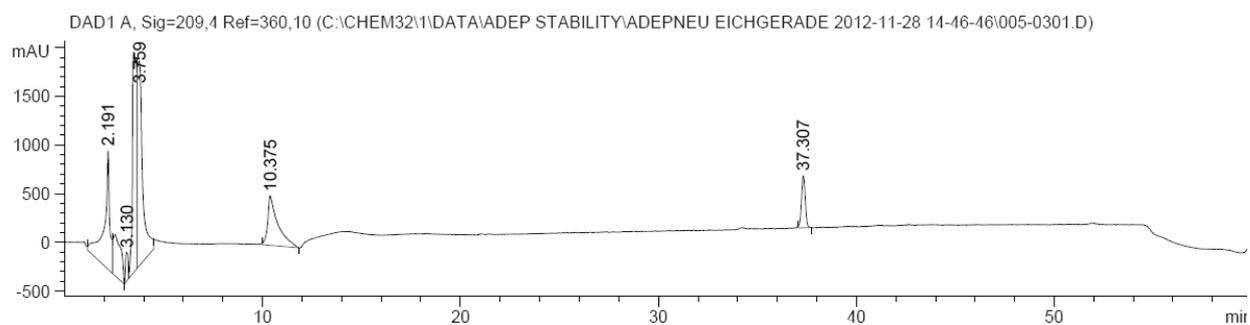
12,8 µg:



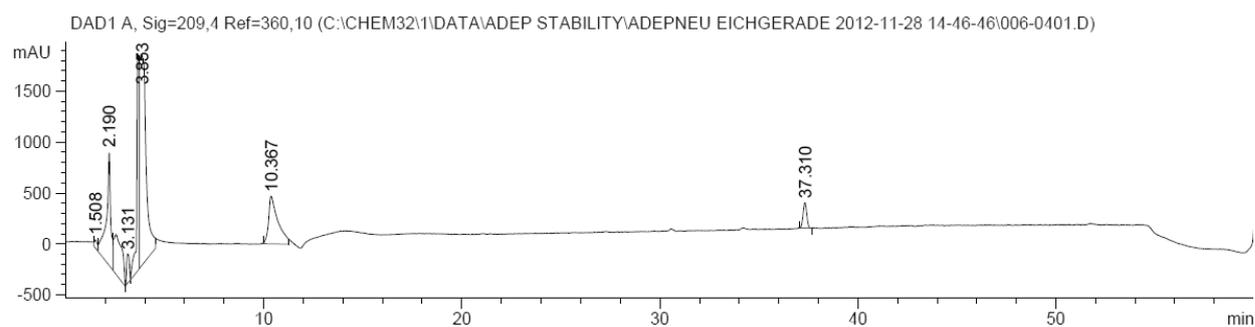
6,4 µg:



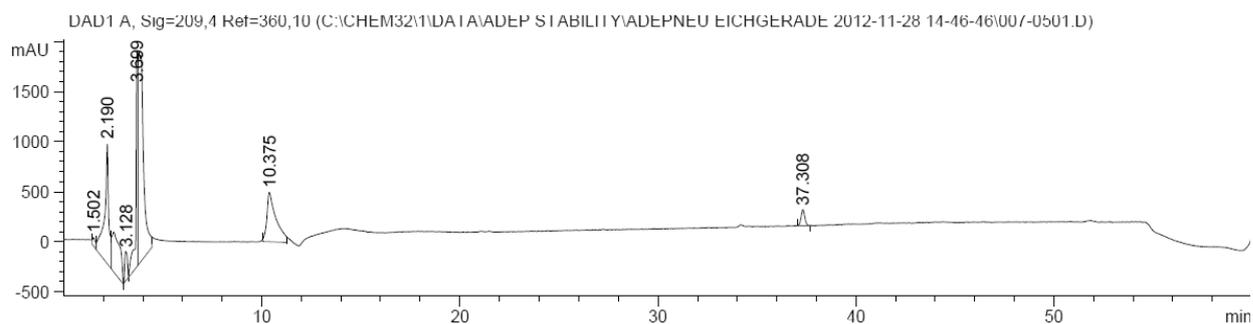
3,2 µg:



1,6 µg:

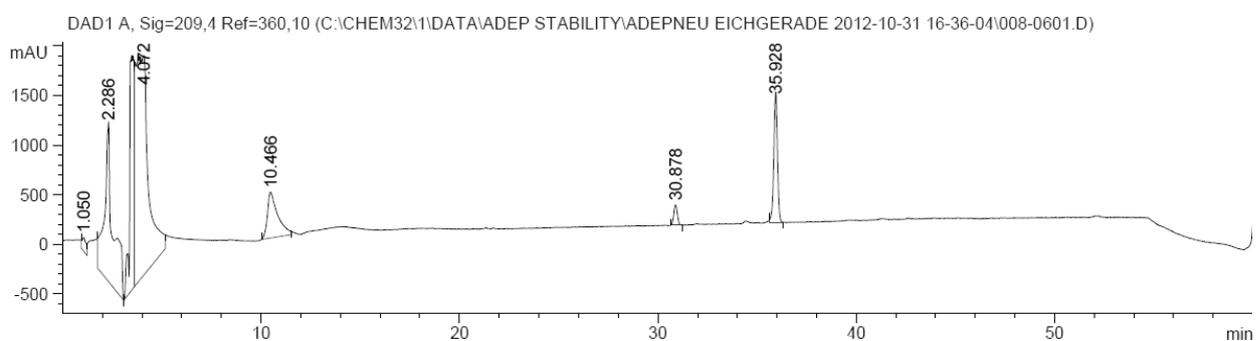


0,8 µg:

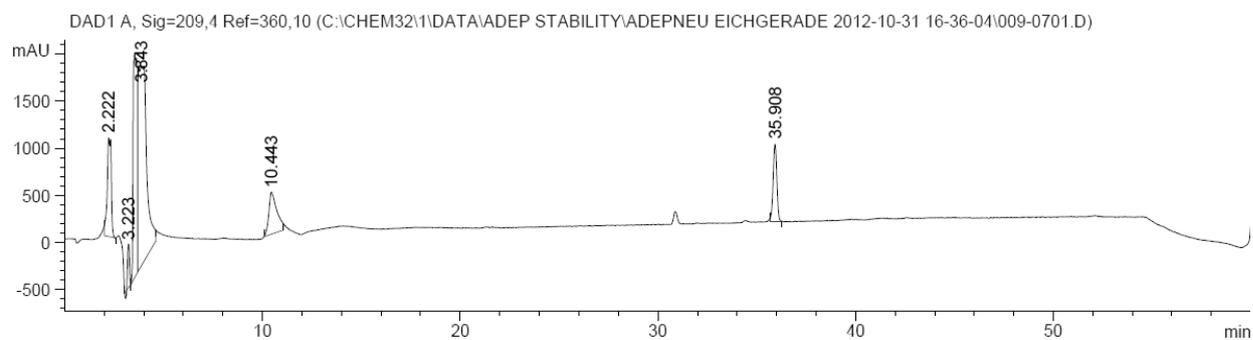


ADEP3 Eichgerade:

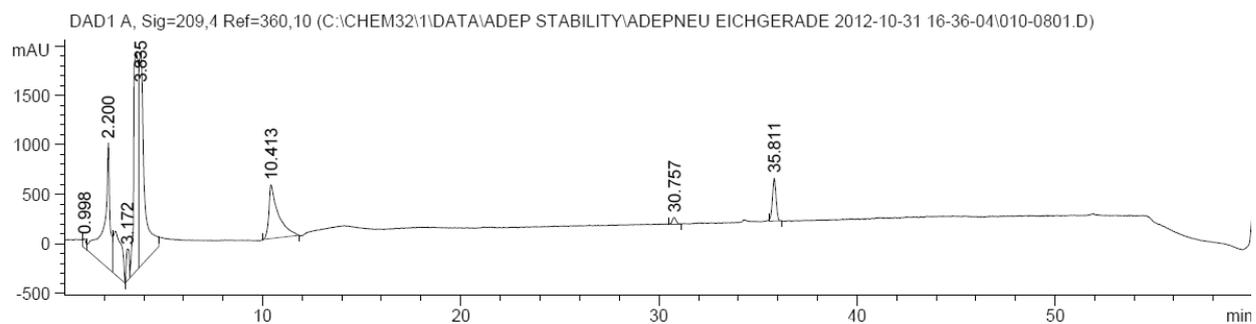
12,8 µg:



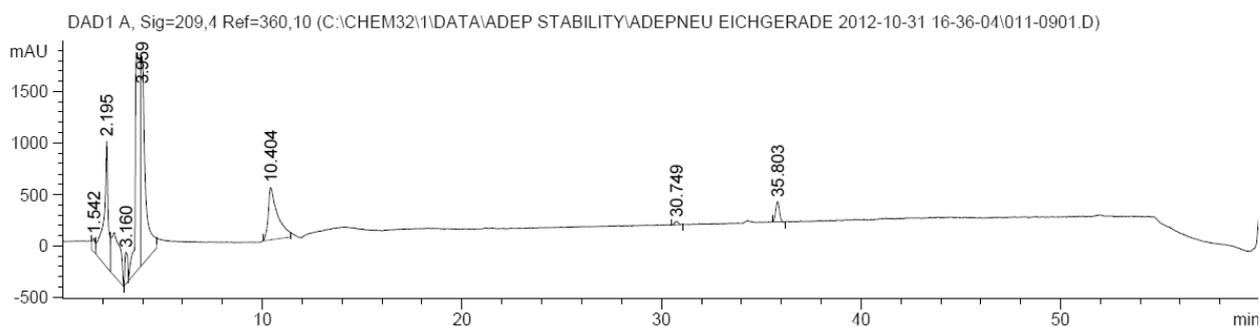
6,4 µg:



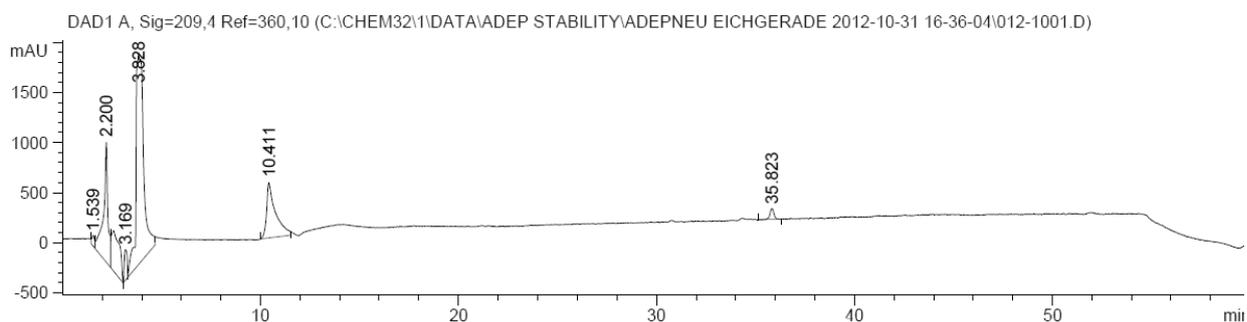
3,2 µg:



1,6 µg:

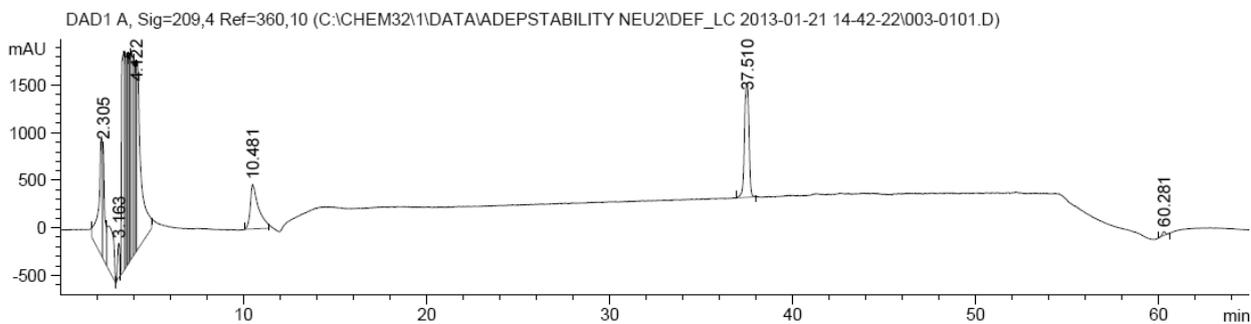


0,8 µg:

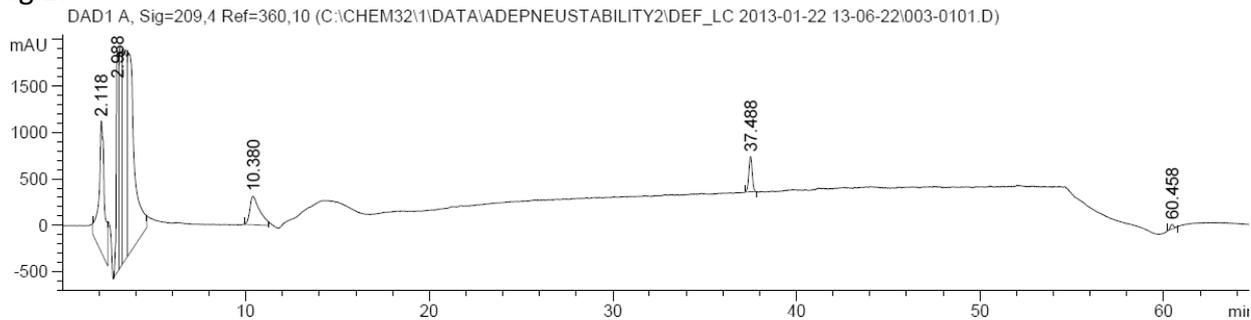


ADEP2 Stabilitätstest:

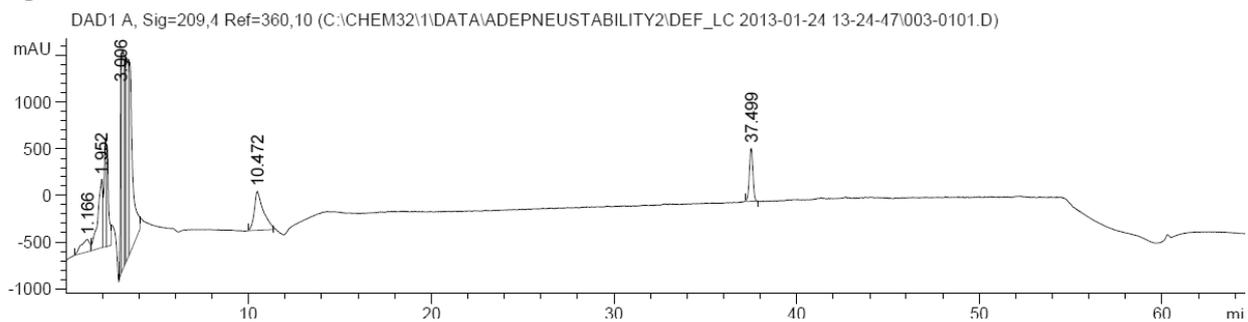
Tag0:



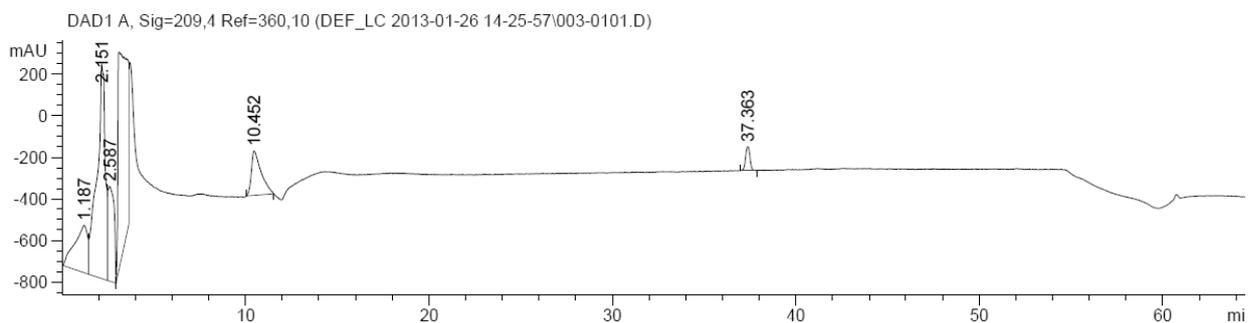
Tag 1:



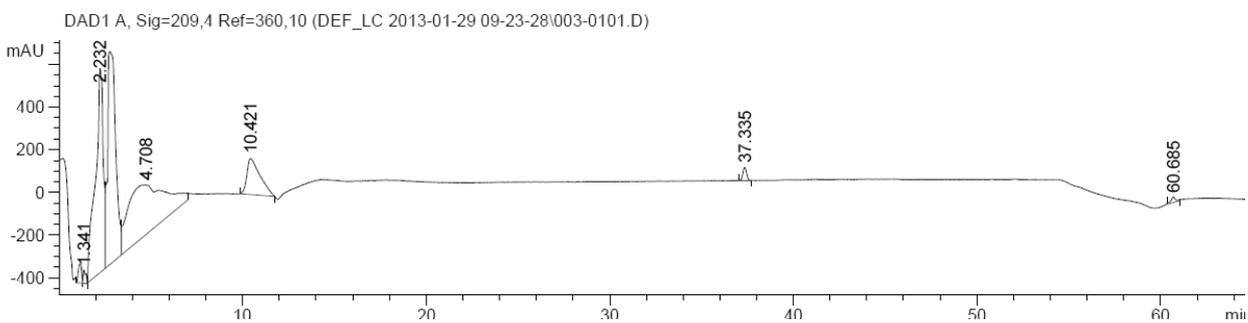
Tag 3:



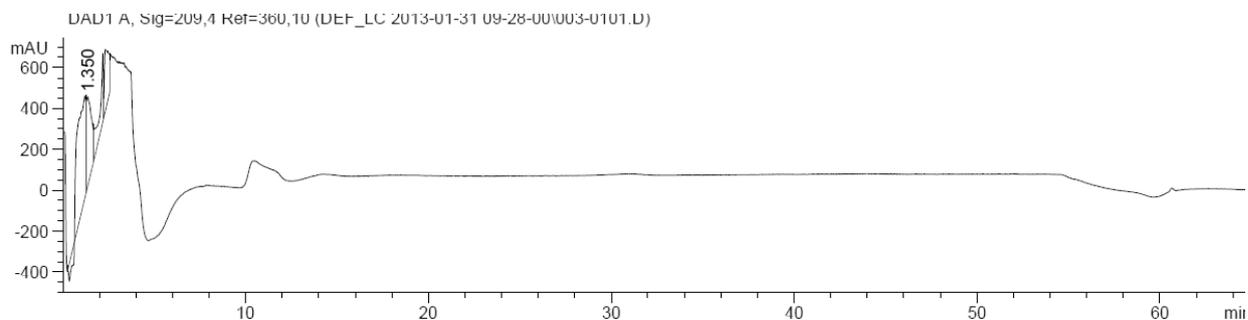
Tag 5:



Tag 8:

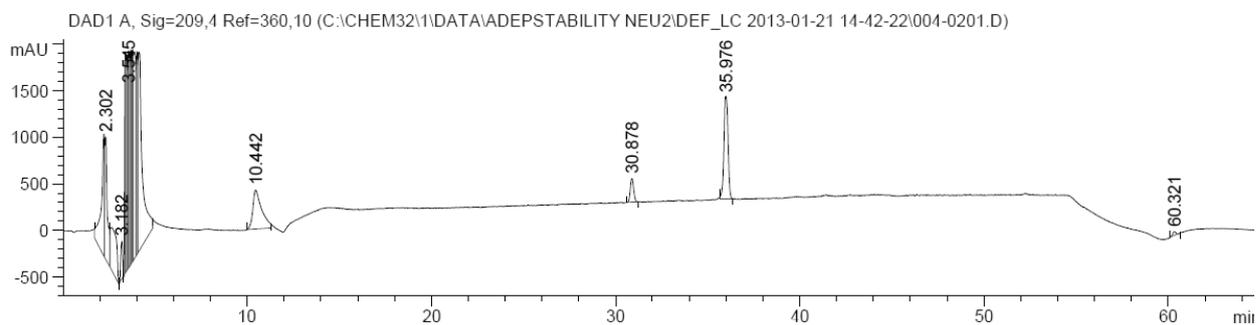


Tag 10:

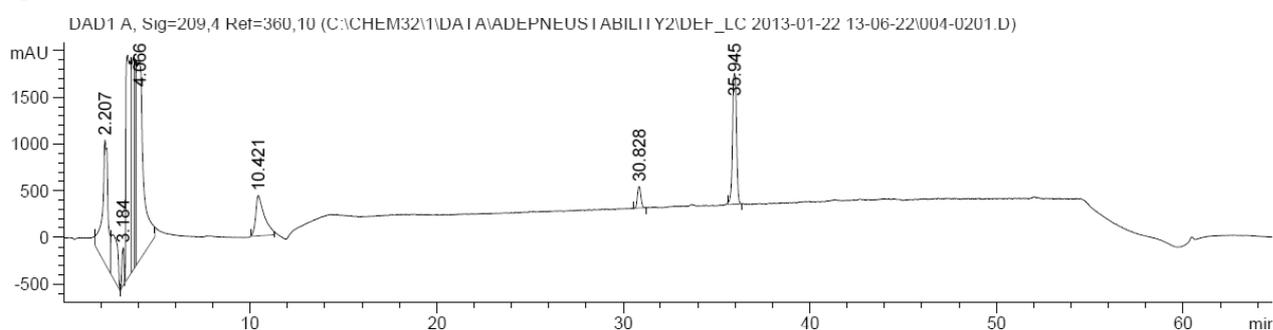


ADEP3 Stabilitätstest:

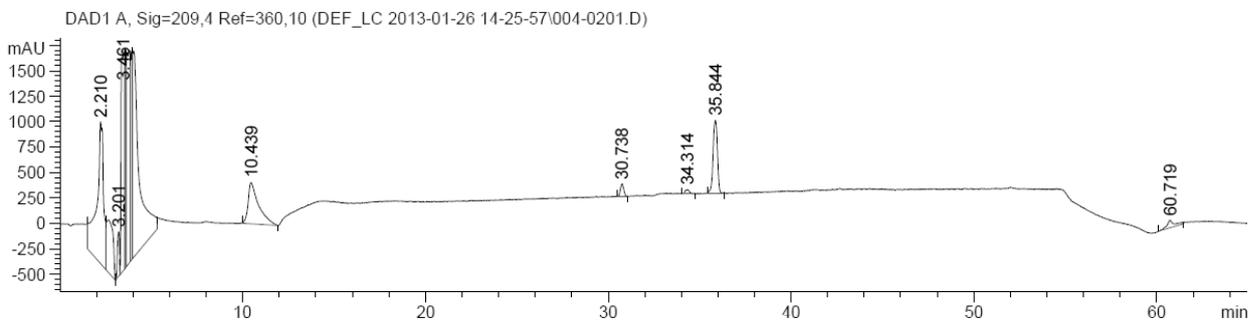
Tag 0:



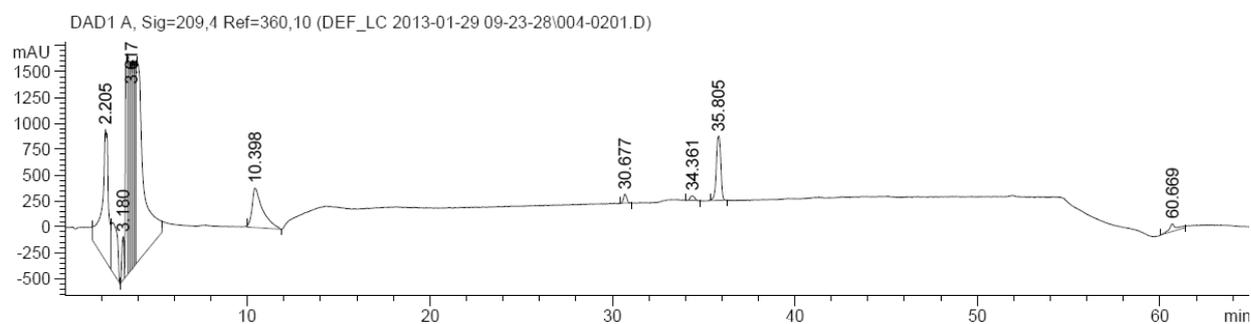
Tag 1:



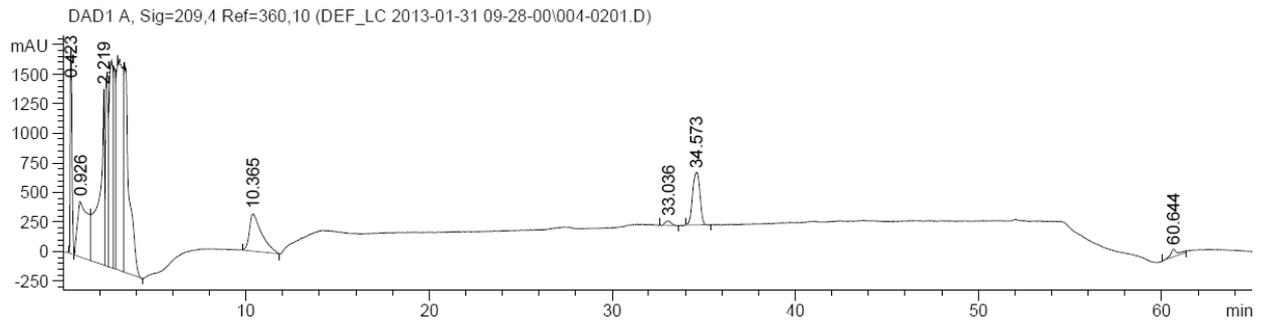
Tag 5:



Tag 8:



Tag 10:



7.6. Literaturverzeichnis

- Akopian,T., Kandror,O., Raju,R.M., Unnikrishnan,M., Rubin,E.J., and Goldberg,A.L. (2012) The active ClpP protease from *M. tuberculosis* is a complex composed of a heptameric ClpP1 and a ClpP2 ring. *EMBO J* **31**: 1529-1541.
- Alexopoulos,J., Ahsan,B., Homchaudhuri,L., Husain,N., Cheng,Y.Q., and Ortega,J. (2013) Structural determinants stabilizing the axial channel of ClpP for substrate translocation. *Mol Microbiol* **90**: 167-180.
- Altaf,M., Miller,C.H., Bellows,D.S., and O'Toole,R. (2010) Evaluation of the *Mycobacterium smegmatis* and BCG models for the discovery of *Mycobacterium tuberculosis* inhibitors. *Tuberculosis (Edinb)* **90**: 333-337.
- Anagnostopoulos,C., and Spizizen,J. (1961) Requirements For Transformation in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **81**: 741-746.
- Andreu,J.M., Schaffner-Barbero,C., Huecas,S., Alonso,D., Lopez-Rodriguez,M.L., Ruiz-Avila,L.B. *et al.* (2010) The antibacterial cell division inhibitor PC190723 is an FtsZ polymer-stabilizing agent that induces filament assembly and condensation. *J Biol Chem* **285**: 14239-14246.
- Andries,K., Verhasselt,P., Guillemont,J., Gohlmann,H.W., Neefs,J.M., Winkler,H. *et al.* (2005) A diarylquinoline drug active on the ATP synthase of *Mycobacterium tuberculosis*. *Science* **307**: 223-227.
- Arbex,M.A., Varella,M.C., Siqueira,H.R., and Mello,F.A. (2010a) Antituberculosis drugs: drug interactions, adverse effects, and use in special situations. Part 1: first-line drugs. *J Bras Pneumol* **36**: 626-640.
- Arbex,M.A., Varella,M.C., Siqueira,H.R., and Mello,F.A. (2010b) Antituberculosis drugs: drug interactions, adverse effects, and use in special situations. Part 2: second line drugs. *J Bras Pneumol* **36**: 641-656.
- Awasthi,D., Kumar,K., and Ojima,I. (2011) Therapeutic potential of FtsZ inhibition: a patent perspective. *Expert Opin Ther Pat* **21**: 657-679.
- Balganesh,T.S., Alzari,P.M., and Cole,S.T. (2008) Rising standards for tuberculosis drug development. *Trends Pharmacol Sci* **29**: 576-581.
- Banerjee,A., Dubnau,E., Quemard,A., Balasubramanian,V., Um,K.S., Wilson,T. *et al.* (1994) *inhA*, a gene encoding a target for isoniazid and ethionamide in *Mycobacterium tuberculosis*. *Science* **263**: 227-230.
- Bardarov,S., Bardarov Jr S Jr, Pavelka Jr,M.S.J., Sambandamurthy,V., Larsen,M., Tufariello,J. *et al.* (2002) Specialized transduction: an efficient method for generating marked and unmarked targeted gene disruptions in *Mycobacterium tuberculosis*, *M. bovis* BCG and *M. smegmatis*. *Microbiology* **148**: 3007-3017.
- Bardou,F., Raynaud,C., Ramos,C., Laneelle,M.A., and Laneelle,G. (1998) Mechanism of isoniazid uptake in *Mycobacterium tuberculosis*. *Microbiology* **144 (Pt 9)**: 2539-2544.

- Barik,S., Sureka,K., Mukherjee,P., Basu,J., and Kundu,M. (2010) RseA, the SigE specific anti-sigma factor of Mycobacterium tuberculosis, is inactivated by phosphorylation-dependent ClpC1P2 proteolysis. *Mol Microbiol* **75**: 592-606.
- Bass,I.A., Danilevskaya,O.N., Mekhedov,S.L., Fedoseeva,V.B., and Gorlenko,Z.M. (1979) The effect of rifampicin upon the transcription of RNA polymerase beta-gene in Escherichia coli. *Mol Gen Genet* **173**: 101-107.
- Bassetti,M., Merelli,M., Temperoni,C., and Astilean,A. (2013) New antibiotics for bad bugs: where are we? *Ann Clin Microbiol Antimicrob* **12**: 22.
- Beall,B., and Lutkenhaus,J. (1991) FtsZ in Bacillus subtilis is required for vegetative septation and for asymmetric septation during sporulation. *Genes Dev* **5**: 447-455.
- Behr,M.A., Wilson,M.A., Gill,W.P., Salamon,H., Schoolnik,G.K., Rane,S., and Small,P.M. (1999) Comparative genomics of BCG vaccines by whole-genome DNA microarray. *Science* **284**: 1520-1523.
- Belanger,A.E., Besra,G.S., Ford,M.E., Mikusova,K., Belisle,J.T., Brennan,P.J., and Inamine,J.M. (1996) The embAB genes of Mycobacterium avium encode an arabinosyl transferase involved in cell wall arabinan biosynthesis that is the target for the antimycobacterial drug ethambutol. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**: 11919-11924.
- Benaroudj,N., Raynal,B., Miot,M., and Ortiz-Lombardia,M. (2011) Assembly and proteolytic processing of mycobacterial ClpP1 and ClpP2. *BMC Biochem* **12**: 61.
- Bentley,R. (2001) Bartolomeo Gosio, 1863-1944: an appreciation. *Adv Appl Microbiol* **48**: 229-250.
- Bewley,M.C., Graziano,V., Griffin,K., and Flanagan,J.M. (2006) The asymmetry in the mature amino-terminus of ClpP facilitates a local symmetry match in ClpAP and ClpXP complexes. *J Struct Biol* **153**: 113-128.
- Boon,C., and Dick,T. (2002) Mycobacterium bovis BCG response regulator essential for hypoxic dormancy. *J Bacteriol* **184**: 6760-6767.
- Boon,C., and Dick,T. (2012) How Mycobacterium tuberculosis goes to sleep: the dormancy survival regulator DosR a decade later. *Future Microbiol* **7**: 513-518.
- Boon,C., Li,R., Qi,R., and Dick,T. (2001) Proteins of Mycobacterium bovis BCG induced in the Wayne dormancy model. *J Bacteriol* **183**: 2672-2676.
- Böttcher,T., and Sieber,S.A. (2008) Beta-lactones as specific inhibitors of ClpP attenuate the production of extracellular virulence factors of Staphylococcus aureus. *J Am Chem Soc* **130**: 14400-14401.
- Böttcher,T., and Sieber,S.A. (2009) Structurally refined beta-lactones as potent inhibitors of devastating bacterial virulence factors. *Chembiochem* **10**: 663-666.
- Boyer,H.W., and Roulland-Dussoix,D. (1969) A complementation analysis of the restriction and modification of DNA in Escherichia coli. *J Mol Biol* **41**: 459-472.

- Brötz-Oesterhelt,H., Beyer,D., Kroll,H.P., Endermann,R., Ladel,C., Schroeder,W. *et al.* (2005) Dysregulation of bacterial proteolytic machinery by a new class of antibiotics. *Nat Med* **11**: 1082-1087.
- Brötz-Oesterhelt,H., and Sass,P. (2010) Postgenomic strategies in antibacterial drug discovery. *Future Microbiol* **5**: 1553-1579.
- Brötz-Oesterhelt,H., and Sass,P. (2014) Bacterial caseinolytic proteases as novel targets for antibacterial treatment. *Int J Med Microbiol* **304**: 23-30.
- Buckley,D.L., Corson,T.W., Aberle,N., and Crews,C.M. (2011) HIV protease-mediated activation of sterically capped proteasome inhibitors and substrates. *J Am Chem Soc* **133**: 698-700.
- Buriankova,K., Doucet-Populaire,F., Dorson,O., Gondran,A., Ghnassia,J.C., Weiser,J., and Pernodet,J.L. (2004) Molecular basis of intrinsic macrolide resistance in the Mycobacterium tuberculosis complex. *Antimicrob Agents Chemother* **48**: 143-150.
- Butler,M.S., Blaskovich,M.A., and Cooper,M.A. (2013) Antibiotics in the clinical pipeline in 2013. *J Antibiot (Tokyo)* **66**: 571-591.
- Calligaro,G.L., Moodley,L., Symons,G., and Dheda,K. (2014) The medical and surgical treatment of drug-resistant tuberculosis. *J Thorac Dis* **6**: 186-195.
- Carney,D.W., Schmitz,K.R., Truong,J.V., Sauer,R.T., and Sello,J.K. (2014) Restriction of the conformational dynamics of the cyclic acyldepsipeptide antibiotics improves their antibacterial activity. *J Am Chem Soc* **136**: 1922-1929.
- Carroll,P., Faray-Kele,M.C., and Parish,T. (2011) Identifying vulnerable pathways in Mycobacterium tuberculosis by using a knockdown approach. *Appl Environ Microbiol* **77**: 5040-5043.
- Chambers,H.F., Moreau,D., Yajko,D., Miick,C., Wagner,C., Hackbarth,C. *et al.* (1995) Can penicillins and other beta-lactam antibiotics be used to treat tuberculosis? *Antimicrob Agents Chemother* **39**: 2620-2624.
- Choi,K.H., and Licht,S. (2005) Control of peptide product sizes by the energy-dependent protease ClpAP. *Biochemistry* **44**: 13921-13931.
- Cohen,J. (2013) Infectious disease. Approval of novel TB drug celebrated--with restraint. *Science* **339**: 130.
- Cole,S.T., Brosch,R., Parkhill,J., Garnier,T., Churcher,C., Harris,D. *et al.* (1998) Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature* **393**: 537-544.
- Collins,F.M. (1993) Tuberculosis: the return of an old enemy. *Crit Rev Microbiol* **19**: 1-16.
- Compton,C.L., Schmitz,K.R., Sauer,R.T., and Sello,J.K. (2013) Antibacterial activity of and resistance to small molecule inhibitors of the ClpP peptidase. *ACS Chem Biol* **8**: 2669-2677.
- Conlon,B.P., Nakayasu,E.S., Fleck,L.E., LaFleur,M.D., Isabella,V.M., Coleman,K. *et al.* (2013) Activated ClpP kills persisters and eradicates a chronic biofilm infection. *Nature* **503**: 365-370.

- Crowle,A.J., Dahl,R., Ross,E., and May,M.H. (1991) Evidence that vesicles containing living, virulent Mycobacterium tuberculosis or Mycobacterium avium in cultured human macrophages are not acidic. *Infect Immun* **59**: 1823-1831.
- Daffe,M., and Draper,P. (1998) The envelope layers of mycobacteria with reference to their pathogenicity. *Adv Microb Physiol* **39**: 131-203.
- David,D.C., Layfield,R., Serpell,L., Narain,Y., Goedert,M., and Spillantini,M.G. (2002) Proteasomal degradation of tau protein. *J Neurochem* **83**: 176-185.
- Elsen,N.L., Lu,J., Parthasarathy,G., Reid,J.C., Sharma,S., Soisson,S.M., and Lumb,K.J. (2012) Mechanism of action of the cell-division inhibitor PC190723: modulation of FtsZ assembly cooperativity. *J Am Chem Soc* **134**: 12342-12345.
- Estorninho,M., Smith,H., Thole,J., Harders-Westerveen,J., Kierzek,A., Butler,R.E. *et al.* (2010) ClgR regulation of chaperone and protease systems is essential for Mycobacterium tuberculosis parasitism of the macrophage. *Microbiology* **156**: 3445-3455.
- Fattorini,L., Piccaro,G., Mustazzolu,A., and Giannoni,F. (2013) Targeting Dormant Bacilli to Fight Tuberculosis. *Mediterr J Hematol Infect Dis* **5**: e2013072.
- Feng,J., Michalik,S., Varming,A.N., Andersen,J.H., Albrecht,D., Jelsbak,L. *et al.* (2013) Trapping and proteomic identification of cellular substrates of the ClpP protease in Staphylococcus aureus. *J Proteome Res* **12**: 547-558.
- Fischbach,M.A., and Walsh,C.T. (2009) Antibiotics for emerging pathogens. *Science* **325**: 1089-1093.
- Frantz,S. (2004) Better antibiotics through chemistry. *Nat Rev Drug Discov* **3**: 900-901.
- Frees,D., Gerth,U., and Ingmer,H. (2014) Clp chaperones and proteases are central in stress survival, virulence and antibiotic resistance of Staphylococcus aureus. *Int J Med Microbiol* **304**: 142-149.
- Frees,D., Qazi,S.N., Hill,P.J., and Ingmer,H. (2003) Alternative roles of ClpX and ClpP in Staphylococcus aureus stress tolerance and virulence. *Mol Microbiol* **48**: 1565-1578.
- Frees,D., Savijoki,K., Varmanen,P., and Ingmer,H. (2007) Clp ATPases and ClpP proteolytic complexes regulate vital biological processes in low GC, Gram-positive bacteria. *Mol Microbiol* **63**: 1285-1295.
- Frieden,T.R., Sherman,L.F., Maw,K.L., Fujiwara,P.I., Crawford,J.T., Nivin,B. *et al.* (1996) A multi-institutional outbreak of highly drug-resistant tuberculosis: epidemiology and clinical outcomes. *JAMA* **276**: 1229-1235.
- Gaillot,O., Pellegrini,E., Bregenholt,S., Nair,S., and Berche,P. (2000) The ClpP serine protease is essential for the intracellular parasitism and virulence of Listeria monocytogenes. *Mol Microbiol* **35**: 1286-1294.
- Gavrish,E., Sit,C.S., Cao,S., Kandrór,O., Spoering,A., Peoples,A. *et al.* (2014) Lassomycin, a Ribosomally Synthesized Cyclic Peptide, Kills Mycobacterium tuberculosis by Targeting the ATP-Dependent Protease ClpC1P1P2. *Chem Biol*.
- Geiger,S.R., Bottcher,T., Sieber,S.A., and Cramer,P. (2011) A conformational switch underlies ClpP protease function. *Angew Chem Int Ed Engl* **50**: 5749-5752.

- Gersch,M., Gut,F., Korotkov,V.S., Lehmann,J., Bottcher,T., Rusch,M. *et al.* (2013) The mechanism of caseinolytic protease (ClpP) inhibition. *Angew Chem Int Ed Engl* **52**: 3009-3014.
- Gersch,M., Kolb,R., Alte,F., Groll,M., and Sieber,S.A. (2014) Disruption of Oligomerization and Dehydroalanine Formation as Mechanisms for ClpP Protease Inhibition. *J Am Chem Soc* **136**: 1360-1366.
- Gersch,M., List,A., Groll,M., and Sieber,S.A. (2012) Insights into the structural network responsible for oligomerization and activity Of the bacterial virulence regulator caseinolytic protease P (ClpP). *J Biol Chem*.
- Gerth,U., Kirstein,J., Mostertz,J., Waldminghaus,T., Miethke,M., Kock,H., and Hecker,M. (2004) Fine-tuning in regulation of Clp protein content in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **186**: 179-191.
- Gerth,U., Kruger,E., Derre,I., Msadek,T., and Hecker,M. (1998) Stress induction of the *Bacillus subtilis* clpP gene encoding a homologue of the proteolytic component of the Clp protease and the involvement of ClpP and ClpX in stress tolerance. *Mol Microbiol* **28**: 787-802.
- Goldman,R.C., Plumley,K.V., and Laughon,B.E. (2007) The evolution of extensively drug resistant tuberculosis (XDR-TB): history, status and issues for global control. *Infect Disord Drug Targets* **7**: 73-91.
- Gottesman,S., Trisler,P., and Torres-Cabassa,A. (1985) Regulation of capsular polysaccharide synthesis in *Escherichia coli* K-12: characterization of three regulatory genes. *J Bacteriol* **162**: 1111-1119.
- Gould,I.M. (2013) Treatment of bacteraemia: meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) to vancomycin-resistant *S. aureus* (VRSA). *Int J Antimicrob Agents* **42 Suppl**: S17-S21.
- Hammerschlag,M.R. (2002) The intracellular life of chlamydiae. *Semin Pediatr Infect Dis* **13**: 239-248.
- Henderson,J.W. (1997) The yellow brick road to penicillin: a story of serendipity. *Mayo Clin Proc* **72**: 683-687.
- Hinzen,B., Raddatz,S., Paulsen,H., Lampe,T., Schumacher,A., Häbich,D. *et al.* (2006) Medicinal chemistry optimization of acyldepsipeptides of the enopeptin class antibiotics. *ChemMedChem* **1**: 689-693.
- Holzgrabe,U., and Schmitz,J. Neue Antibiotika - Den Vorsprung wahren. *Pharmazeutische Zeitung* (50/2009). 2009.
Ref Type: Magazine Article
- Honaker,R.W., Dhiman,R.K., Narayanasamy,P., Crick,D.C., and Voskuil,M.I. (2010) DosS responds to a reduced electron transport system to induce the *Mycobacterium tuberculosis* DosR regulon. *J Bacteriol* **192**: 6447-6455.
- Hossain,M.M., and Norazmi,M.N. (2013) Pattern recognition receptors and cytokines in *Mycobacterium tuberculosis* infection--the double-edged sword? *Biomed Res Int* **2013**: 179174.
- Huynh,K.K., Joshi,S.A., and Brown,E.J. (2011) A delicate dance: host response to mycobacteria. *Curr Opin Immunol* **23**: 464-472.

- Ibrahim,Y.M., Kerr,A.R., Silva,N.A., and Mitchell,T.J. (2005) Contribution of the ATP-dependent protease ClpCP to the autolysis and virulence of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun* **73**: 730-740.
- Ingvarsson,H., Mate,M.J., Hogbom,M., Portnoi,D., Benaroudj,N., Alzari,P.M. *et al.* (2007) Insights into the inter-ring plasticity of caseinolytic proteases from the X-ray structure of *Mycobacterium tuberculosis* ClpP1. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **63**: 249-259.
- Jennings,L.D., Bohon,J., Chance,M.R., and Licht,S. (2008a) The ClpP N-terminus coordinates substrate access with protease active site reactivity. *Biochemistry* **47**: 11031-11040.
- Jennings,L.D., Lun,D.S., Medard,M., and Licht,S. (2008b) ClpP hydrolyzes a protein substrate processively in the absence of the ClpA ATPase: mechanistic studies of ATP-independent proteolysis. *Biochemistry* **47**: 11536-11546.
- Kang,S.G., Dimitrova,M.N., Ortega,J., Ginsburg,A., and Maurizi,M.R. (2005) Human mitochondrial ClpP is a stable heptamer that assembles into a tetradecamer in the presence of ClpX. *J Biol Chem* **280**: 35424-35432.
- Keiler,K.C., Waller,P.R., and Sauer,R.T. (1996) Role of a peptide tagging system in degradation of proteins synthesized from damaged messenger RNA. *Science* **271**: 990-993.
- Kim,L., Mogk,A., and Schumann,W. (1996) A xylose-inducible *Bacillus subtilis* integration vector and its application. *Gene* **181**: 71-76.
- Kim,Y.I., Levchenko,I., Fraczkowska,K., Woodruff,R.V., Sauer,R.T., and Baker,T.A. (2001) Molecular determinants of complex formation between Clp/Hsp100 ATPases and the ClpP peptidase. *Nat Struct Biol* **8**: 230-233.
- Kimber,M.S., Yu,A.Y., Borg,M., Leung,E., Chan,H.S., and Houry,W.A. (2010) Structural and theoretical studies indicate that the cylindrical protease ClpP samples extended and compact conformations. *Structure* **18**: 798-808.
- Kirstein,J., Hoffmann,A., Lillie,H., Schmidt,R., Rubsamen-Waigmann,H., Brötz-Oesterhelt,H. *et al.* (2009a) The antibiotic ADEP reprogrammes ClpP, switching it from a regulated to an uncontrolled protease. *EMBO Mol Med* **1**: 37-49.
- Kirstein,J., Moliere,N., Dougan,D.A., and Turgay,K. (2009b) Adapting the machine: adaptor proteins for Hsp100/Clp and AAA+ proteases. *Nat Rev Microbiol* **7**: 589-599.
- Klotzsche,M., Ehrt,S., and Schnappinger,D. (2009) Improved tetracycline repressors for gene silencing in mycobacteria. *Nucleic Acids Res* **37**: 1778-1788.
- Knudson,S.E., Kumar,K., Awasthi,D., Ojima,I., and Slayden,R.A. (2014) In vitro-in vivo activity relationship of substituted benzimidazole cell division inhibitors with activity against *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis (Edinb)*.
- Koul,A., Arnoult,E., Lounis,N., Guillemont,J., and Andries,K. (2011) The challenge of new drug discovery for tuberculosis. *Nature* **469**: 483-490.
- Kress,W., Maglica,Z., and Weber-Ban,E. (2009) Clp chaperone-proteases: structure and function. *Res Microbiol* **160**: 618-628.

- Kumar,K., Awasthi,D., Berger,W.T., Tonge,P.J., Slayden,R.A., and Ojima,I. (2010) Discovery of anti-TB agents that target the cell-division protein FtsZ. *Future Med Chem* **2**: 1305-1323.
- Kumar,K., Awasthi,D., Lee,S.Y., Zanardi,I., Ruzsicska,B., Knudson,S. *et al.* (2011) Novel trisubstituted benzimidazoles, targeting Mtb FtsZ, as a new class of antitubercular agents. *J Med Chem* **54**: 374-381.
- Larsen,M.H., Biermann,K., and Jacobs,W.R., Jr. (2007a) Laboratory maintenance of Mycobacterium tuberculosis. *Curr Protoc Microbiol* **Chapter 10**: Unit.
- Larsen,M.H., Biermann,K., Tandberg,S., Hsu,T., and Jacobs,W.R., Jr. (2007b) Genetic Manipulation of Mycobacterium tuberculosis. *Curr Protoc Microbiol* **Chapter 10**: Unit.
- Lawn,S.D., and Zumla,A.I. (2011) Tuberculosis. *Lancet* **378**: 57-72.
- Lee,B.G., Kim,M.K., and Song,H.K. (2011) Structural insights into the conformational diversity of ClpP from *Bacillus subtilis*. *Mol Cells*.
- Lee,B.G., Park,E.Y., Lee,K.E., Jeon,H., Sung,K.H., Paulsen,H. *et al.* (2010) Structures of ClpP in complex with acyldepsipeptide antibiotics reveal its activation mechanism. *Nat Struct Mol Biol* **17**: 471-478.
- Lee,D.H., and Goldberg,A.L. (1998) Proteasome inhibitors: valuable new tools for cell biologists. *Trends Cell Biol* **8**: 397-403.
- Lee,J.W., Park,E., Jeong,M.S., Jeon,Y.J., Eom,S.H., Seol,J.H., and Chung,C.H. (2009) HsIVU ATP-dependent protease utilizes maximally six among twelve threonine active sites during proteolysis. *J Biol Chem* **284**: 33475-33484.
- Leung,E., Datti,A., Cossette,M., Goodreid,J., McCaw,S.E., Mah,M. *et al.* (2011) Activators of cylindrical proteases as antimicrobials: identification and development of small molecule activators of ClpP protease. *Chem Biol* **18**: 1167-1178.
- Lewis,K. (2013) Platforms for antibiotic discovery. *Nat Rev Drug Discov* **12**: 371-387.
- Li,D.H., Chung,Y.S., Gloyd,M., Joseph,E., Ghirlando,R., Wright,G.D. *et al.* (2010) Acyldepsipeptide antibiotics induce the formation of a structured axial channel in ClpP: A model for the ClpX/ClpA-bound state of ClpP. *Chem Biol* **17**: 959-969.
- Li,X.Z., and Nikaido,H. (2009) Efflux-mediated drug resistance in bacteria: an update. *Drugs* **69**: 1555-1623.
- Ligon,B.L. (2004) Penicillin: its discovery and early development. *Semin Pediatr Infect Dis* **15**: 52-57.
- Lin,G., Hu,G., Tsu,C., Kunes,Y.Z., Li,H., Dick,L. *et al.* (2006) Mycobacterium tuberculosis prcBA genes encode a gated proteasome with broad oligopeptide specificity. *Mol Microbiol* **59**: 1405-1416.
- Lipinski,C.A., Lombardo,F., Dominy,B.W., and Feeney,P.J. (1996) Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv Drug Deliv Rev* **46**: 3-26.
- Livak,K.J., and Schmittgen,T.D. (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* **25**: 402-408.

- Louw,G.E., Warren,R.M., Gey van Pittius,N.C., McEvoy,C.R., van Helden,P.D., and Victor,T.C. (2009) A balancing act: efflux/influx in mycobacterial drug resistance. *Antimicrob Agents Chemother* **53**: 3181-3189.
- Lowth,B.R., Kirstein-Miles,J., Saiyed,T., Brotz-Oesterhelt,H., Morimoto,R.I., Truscott,K.N., and Dougan,D.A. (2012) Substrate recognition and processing by a Walker B mutant of the human mitochondrial AAA+ protein CLPX. *J Struct Biol* **179**: 193-201.
- Lowy,F.D. (1998) Staphylococcus aureus infections. *N Engl J Med* **339**: 520-532.
- Malik,Z.A., Iyer,S.S., and Kusner,D.J. (2001) Mycobacterium tuberculosis phagosomes exhibit altered calmodulin-dependent signal transduction: contribution to inhibition of phagosome-lysosome fusion and intracellular survival in human macrophages. *J Immunol* **166**: 3392-3401.
- Meena,L.S., and Rajni (2010) Survival mechanisms of pathogenic Mycobacterium tuberculosis H37Rv. *FEBS J* **277**: 2416-2427.
- Mehra,S., and Kaushal,D. (2009) Functional Genomics Reveals Extended Roles of the Mycobacterium tuberculosis Stress Response Factor sigmaH. *J Bacteriol* **191**: 3965-3980.
- Merget,B., Zilian,D., Muller,T., and Sottriffer,C.A. (2013) MycPermCheck: the Mycobacterium tuberculosis permeability prediction tool for small molecules. *Bioinformatics* **29**: 62-68.
- Michalik,S., Bernhardt,J., Otto,A., Moche,M., Becher,D., Meyer,H. *et al.* (2012) Life and death of proteins: a case study of glucose-starved Staphylococcus aureus. *Mol Cell Proteomics* **11**: 558-570.
- Michel,K.H., and Kastner,R.E. A54556 antibiotics and process for production thereof. US patent 4492650 A54556. 27-9-1982.
Ref Type: Patent
- Molière,N., and Turgay,K. (2009) Chaperone-protease systems in regulation and protein quality control in Bacillus subtilis. *Res Microbiol* **160**: 637-644.
- Msadek,T., Dartois,V., Kunst,F., Herbaud,M.L., Denizot,F., and Rapoport,G. (1998) ClpP of Bacillus subtilis is required for competence development, motility, degradative enzyme synthesis, growth at high temperature and sporulation. *Mol Microbiol* **27**: 899-914.
- Mukhopadhyay,S., Good,D., Miller,R.D., Graham,J.E., Mathews,S.A., Timms,P., and Summersgill,J.T. (2006) Identification of Chlamydia pneumoniae proteins in the transition from reticulate to elementary body formation. *Mol Cell Proteomics* **5**: 2311-2318.
- Mukhopadhyay,S., Nair,S., and Ghosh,S. (2012) Pathogenesis in tuberculosis: transcriptomic approaches to unraveling virulence mechanisms and finding new drug targets. *FEMS Microbiol Rev* **36**: 463-485.
- Muttucumar,D.G., Roberts,G., Hinds,J., Stabler,R.A., and Parish,T. (2004) Gene expression profile of Mycobacterium tuberculosis in a non-replicating state. *Tuberculosis (Edinb)* **84**: 239-246.
- Nair,S., Poyart,C., Beretti,J.L., Veiga-Fernandes,H., Berche,P., and Trieu-Cuot,P. (2003) Role of the Streptococcus agalactiae ClpP serine protease in heat-induced stress defence and growth arrest. *Microbiology* **149**: 407-417.

- Nakano,S., Zheng,G., Nakano,M.M., and Zuber,P. (2002) Multiple pathways of Spx (YjbD) proteolysis in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **184**: 3664-3670.
- Nde,C.W., Toghrol,F., Jang,H.J., and Bentley,W.E. (2011) Toxicogenomic response of *Mycobacterium bovis* BCG to peracetic acid and a comparative analysis of the *M. bovis* BCG response to three oxidative disinfectants. *Appl Microbiol Biotechnol* **90**: 277-304.
- O'Boyle,N.M., Banck,M., James,C.A., Morley,C., Vandermeersch,T., and Hutchison,G.R. (2011) Open Babel: An open chemical toolbox. *J Cheminform* **3**: 33.
- Ollinger,J., O'Malley,T., Kesicki,E.A., Odingo,J., and Parish,T. (2011) Validation of the essential ClpP protease in *Mycobacterium tuberculosis* as a novel drug target. *J Bacteriol*.
- Ollinger,J., O'Malley,T., Kesicki,E.A., Odingo,J., and Parish,T. (2012) Validation of the essential ClpP protease in *Mycobacterium tuberculosis* as a novel drug target. *J Bacteriol* **194**: 663-668.
- Otto,M. (2012) MRSA virulence and spread. *Cell Microbiol* **14**: 1513-1521.
- Ouellet,H., Johnston,J.B., and Ortiz de Montellano,P.R. (2010) The *Mycobacterium tuberculosis* cytochrome P450 system. *Arch Biochem Biophys* **493**: 82-95.
- Paesen,J., Khan,K., Roets,E., and Hoogmartens,J. Study of the stability of erythromycin in neutral and alkaline solutions by liquid chromatography on poly(styrene-divinylbenzene). *International Journal of Pharmaceutics* 113(2), 215-222. 16-1-1995.
Ref Type: Journal (Full)
- Personne,Y., Brown,A.C., Schuessler,D.L., and Parish,T. (2013) *Mycobacterium tuberculosis* ClpP proteases are co-transcribed but exhibit different substrate specificities. *PLoS One* **8**: e60228.
- Pfeffer,K. Leitfaden Antiinfektiva und Infektionserkrankungen praktische Hinweise zur antimikrobiellen Therapie. 2, 206-207. 2009.
Ref Type: Serial (Book,Monograph)
- Quon,K.C., Marczynski,G.T., and Shapiro,L. (1996) Cell cycle control by an essential bacterial two-component signal transduction protein. *Cell* **84**: 83-93.
- Raghavan,S., Alagarasu,K., and Selvaraj,P. (2011) Immunogenetics of HIV and HIV associated tuberculosis. *Tuberculosis (Edinb)*.
- Rai,D., Singh,J.K., Roy,N., and Panda,D. (2008) Curcumin inhibits FtsZ assembly: an attractive mechanism for its antibacterial activity. *Biochem J* **410**: 147-155.
- Raju,R., Unnikrishnan,M., Rubin,D., Krishnamoorthy,V., Kandrор,O., Akopian,T. *et al.* (2011) *Mycobacterium tuberculosis* ClpP1 and ClpP2 Function Together in Protein Degradation and Are Required for Viability in vitro and During Infection. *PLoS Pathog* **8** (2).
- Raju,R.M., Goldberg,A.L., and Rubin,E.J. (2012) Bacterial proteolytic complexes as therapeutic targets. *Nat Rev Drug Discov* **11**: 777-789.
- Raju,R.M., Jedrychowski,M.P., Wei,J.R., Pinkham,J.T., Park,A.S., O'Brien,K. *et al.* (2014) Post-translational regulation via Clp protease is critical for survival of *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS Pathog* **10**: e1003994.

Ray,A., and Newton,V. (1991) Use of high-performance liquid chromatography to monitor stability of tetracycline and chlortetracycline in susceptibility determinations. *Antimicrob Agents Chemother* **35**: 1264-1266.

Renner,M.K., Shen,Y.C., Cheng,X.C., Jensen,P.R., Frankmoelle,W., Kauffman,C.A. *et al.* (1999) Cyclomarins A–C, New Antiinflammatory Cyclic Peptides Produced by a Marine Bacterium (*Streptomyces sp.*). *J Am Chem Soc* **121**: 11273-11276.

Reyrat,J.M., and Kahn,D. (2001) Mycobacterium smegmatis: an absurd model for tuberculosis? *Trends Microbiol* **9**: 472-474.

Roberts,D.M., Personne,Y., Ollinger,J., and Parish,T. (2013) Proteases in Mycobacterium tuberculosis pathogenesis: potential as drug targets. *Future Microbiol* **8**: 621-631.

Robertson,B.D., Altmann,D., Barry,C., Bishai,B., Cole,S., Dick,T. *et al.* (2012) Detection and treatment of subclinical tuberculosis. *Tuberculosis (Edinb)* **92**: 447-452.

Rodriguez-Rojas,A., Rodriguez-Beltran,J., Couce,A., and Blazquez,J. (2013) Antibiotics and antibiotic resistance: a bitter fight against evolution. *Int J Med Microbiol* **303**: 293-297.

Sass,P., and Brötz-Oesterhelt,H. (2013) Bacterial cell division as a target for new antibiotics. *Curr Opin Microbiol*.

Sass,P., Josten,M., Famulla,K., Schiffer,G., Sahl,H.G., Hamoen,L., and Brötz-Oesterhelt,H. (2011) Antibiotic acyldepsipeptides activate ClpP peptidase to degrade the cell division protein FtsZ. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**: 17474-17479.

Sassetti,C.M., Boyd,D.H., and Rubin,E.J. (2003) Genes required for mycobacterial growth defined by high density mutagenesis. *Mol Microbiol* **48**: 77-84.

Schmitt,E.K., Riwanto,M., Sambandamurthy,V., Roggo,S., Miault,C., Zwingelstein,C. *et al.* (2011) The natural product cyclomarin kills Mycobacterium tuberculosis by targeting the ClpC1 subunit of the caseinolytic protease. *Angew Chem Int Ed Engl* **50**: 5889-5891.

Schmitz,K.R., and Sauer,R.T. (2014) Substrate delivery by the AAA+ ClpX and ClpC1 unfoldases activates the mycobacterial ClpP1P2 peptidase. *Mol Microbiol*.

Schnappinger,D., Ehrt,S., Voskuil,M.I., Liu,Y., Mangan,J.A., Monahan,I.M. *et al.* (2003) Transcriptional Adaptation of Mycobacterium tuberculosis within Macrophages: Insights into the Phagosomal Environment. *J Exp Med* **198**: 693-704.

Scorpio,A., and Zhang,Y. (1996) Mutations in pncA, a gene encoding pyrazinamidase/nicotinamidase, cause resistance to the antituberculous drug pyrazinamide in tubercle bacillus. *Nat Med* **2**: 662-667.

Sherrid,A.M., Rustad,T.R., Cangelosi,G.A., and Sherman,D.R. (2010) Characterization of a Clp protease gene regulator and the re-aeration response in Mycobacterium tuberculosis. *PLoS One* **5**: e11622.

Shiloh,M.U., Manzanillo,P., and Cox,J.S. (2008) Mycobacterium tuberculosis senses host-derived carbon monoxide during macrophage infection. *Cell Host Microbe* **3**: 323-330.

- Shin,Y., Davis,J.H., Brau,R.R., Martin,A., Kenniston,J.A., Baker,T.A. *et al.* (2009) Single-molecule denaturation and degradation of proteins by the AAA+ ClpXP protease. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**: 19340-19345.
- Silva,P.E., Bigi,F., Santangelo,M.P., Romano,M.I., Martin,C., Cataldi,A., and Ainsa,J.A. (2001) Characterization of P55, a multidrug efflux pump in *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother* **45**: 800-804.
- Singh,D., Bhattacharya,A., Rai,A., Dhaked,H.P., Awasthi,D., Ojima,I., and Panda,D. (2014) SB-RA-2001 inhibits bacterial proliferation by targeting FtsZ assembly. *Biochemistry*.
- Slomski,A. (2013) South Africa warns of emergence of "totally" drug-resistant tuberculosis. *JAMA* **309**: 1097-1098.
- Sowole,M.A., Alexopoulos,J.A., Cheng,Y.Q., Ortega,J., and Konermann,L. (2013a) Activation of ClpP protease by ADEP antibiotics: insights from hydrogen exchange mass spectrometry. *J Mol Biol* **425**: 4508-4519.
- Sowole,M.A., Alexopoulos,J.A., Cheng,Y.Q., Ortega,J., and Konermann,L. (2013b) Activation of ClpP protease by ADEP antibiotics: insights from hydrogen exchange mass spectrometry. *J Mol Biol* **425**: 4508-4519.
- Sprangers,R., Gribun,A., Hwang,P.M., Houry,W.A., and Kay,L.E. (2005) Quantitative NMR spectroscopy of supramolecular complexes: dynamic side pores in ClpP are important for product release. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**: 16678-16683.
- Stewart,G.R., Wernisch,L., Stabler,R., Mangan,J.A., Hinds,J., Laing,K.G. *et al.* (2002) Dissection of the heat-shock response in *Mycobacterium tuberculosis* using mutants and microarrays. *Microbiology* **148**: 3129-3138.
- Studier,F.W., and Moffatt,B.A. (1986) Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J Mol Biol* **189**: 113-130.
- Telenti,A., Imboden,P., Marchesi,F., Lowrie,D., Cole,S., Colston,M.J. *et al.* (1993) Detection of rifampicin-resistance mutations in *Mycobacterium tuberculosis*. *Lancet* **341**: 647-650.
- Telenti,A., Philipp,W.J., Sreevatsan,S., Bernasconi,C., Stockbauer,K.E., Wieles,B. *et al.* (1997) The emb operon, a gene cluster of *Mycobacterium tuberculosis* involved in resistance to ethambutol. *Nat Med* **3**: 567-570.
- Tetko,I.V., Gasteiger,J., Todeschini,R., Mauri,A., Livingstone,D., Ertl,P. *et al.* (2005) Virtual computational chemistry laboratory--design and description. *J Comput Aided Mol Des* **19**: 453-463.
- Triccas,J.A., Pinto,R., and Britton,W.J. (2002) Destabilized green fluorescent protein for monitoring transient changes in mycobacterial gene expression. *Res Microbiol* **153**: 379-383.
- Tsubuki,S., Saito,Y., Tomioka,M., Ito,H., and Kawashima,S. (1996) Differential inhibition of calpain and proteasome activities by peptidyl aldehydes of di-leucine and tri-leucine. *J Biochem* **119**: 572-576.
- Turgay,K., Hahn,J., Burghoorn,J., and Dubnau,D. (1998) Competence in *Bacillus subtilis* is controlled by regulated proteolysis of a transcription factor. *EMBO J* **17**: 6730-6738.

- Udwadia,Z.F., Amale,R.A., Ajbani,K.K., and Rodrigues,C. (2012) Totally drug-resistant tuberculosis in India. *Clin Infect Dis* **54**: 579-581.
- Vasudevan,D., Rao,S.P., and Noble,C.G. (2013) Structural basis of mycobacterial inhibition by cyclomarin A. *J Biol Chem* **288**: 30883-30891.
- von Bergen,M., Barghorn,S., Li,L., Marx,A., Biernat,J., Mandelkow,E.M., and Mandelkow,E. (2001) Mutations of tau protein in frontotemporal dementia promote aggregation of paired helical filaments by enhancing local beta-structure. *J Biol Chem* **276**: 48165-48174.
- Voskuil,M.I., Schnappinger,D., Visconti,K.C., Harrell,M.I., Dolganov,G.M., Sherman,D.R., and Schoolnik,G.K. (2003) Inhibition of respiration by nitric oxide induces a Mycobacterium tuberculosis dormancy program. *J Exp Med* **198**: 705-713.
- WAKSMAN,S.A. (1947) What is an antibiotic or an antibiotic substance? *Mycologia* **39**: 565-569.
- Wang,J., Hartling,J.A., and Flanagan,J.M. (1997) The structure of ClpP at 2.3 Å resolution suggests a model for ATP-dependent proteolysis. *Cell* **91**: 447-456.
- Wang,X., and Lutkenhaus,J. (1993) The FtsZ protein of Bacillus subtilis is localized at the division site and has GTPase activity that is dependent upon FtsZ concentration. *Mol Microbiol* **9**: 435-442.
- Wiegert,T., and Schumann,W. (2001) SsrA-mediated tagging in Bacillus subtilis. *J Bacteriol* **183**: 3885-3889.
- Xu,S., Guo,P., Gao,Y., Shi,Q., He,D., Gao,Y., and Zhang,H. (2013) Acyldepsipeptides inhibit the growth of renal cancer cells through G1 phase cell cycle arrest. *Biochem Biophys Res Commun* **438**: 468-472.
- Yam,K.C., D'Angelo,I., Kalscheuer,R., Zhu,H., Wang,J.X., Snieckus,V. *et al.* (2009) Studies of a ring-cleaving dioxygenase illuminate the role of cholesterol metabolism in the pathogenesis of Mycobacterium tuberculosis. *PLOS Pathog* **5**: e1000344.
- Yanisch-Perron,C., Vieira,J., and Messing,J. (1985) Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* **33**: 103-119.
- Yu,A.Y., and Houry,W.A. (2007) ClpP: a distinctive family of cylindrical energy-dependent serine proteases. *FEBS Lett* **581**: 3749-3757.
- Zeiler,E., Braun,N., Bottcher,T., Kastenmuller,A., Weinkauff,S., and Sieber,S.A. (2011) Vibralactone as a tool to study the activity and structure of the ClpP1P2 complex from Listeria monocytogenes. *Angew Chem Int Ed Engl* **50**: 11001-11004.
- Zeiler,E., Korotkov,V.S., Lorenz-Baath,K., Bottcher,T., and Sieber,S.A. (2012) Development and characterization of improved beta-lactone-based anti-virulence drugs targeting ClpP. *Bioorg Med Chem* **20**: 583-591.
- Zeiler,E., List,A., Alte,F., Gersch,M., Wachtel,R., Poreba,M. *et al.* (2013) Structural and functional insights into caseinolytic proteases reveal an unprecedented regulation principle of their catalytic triad. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**: 11302-11307.
- Zhang,J., Ye,F., Lan,L., Jiang,H., Luo,C., and Yang,C.G. (2011) Structural switching of Staphylococcus aureus Clp protease: a key to understanding protease dynamics. *J Biol Chem* **286**: 37590-37601.

Zhang,Y. (2005) The magic bullets and tuberculosis drug targets. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **45**: 529-564.

Zhang,Y., Wade,M.M., Scorpio,A., Zhang,H., and Sun,Z. (2003) Mode of action of pyrazinamide: disruption of Mycobacterium tuberculosis membrane transport and energetics by pyrazinoic acid. *J Antimicrob Chemother* **52**: 790-795.

Zhang,Y., and Young,D. (1994) Molecular genetics of drug resistance in Mycobacterium tuberculosis. *J Antimicrob Chemother* **34**: 313-319.

7.9. Danksagung

Bei Frau Prof. Dr. Heike Brötz-Oesterhelt bedanke ich mich für die wissenschaftliche Betreuung. Besonders danke ich ihr für Aufenthalt in Boston, aber auch die Konferenzen und die zwei Tage in München, die sie mir ermöglicht hat. Das alles waren für mich wertvolle Erfahrungen, die ich sehr zu schätzen weiß.

Bei Herrn Prof. Dr. Matthias Kassack bedanke ich mich für die spontane Übernahme des Zweitgutachtens.

Bei Herrn Prof. Dr. Klaus Pfeffer bedanke ich mich die Bereitschaft das Zweitgutachten zu übernehmen und die Möglichkeit Kollegiatin in der MOI Manchot Graduiertenschule zu sein.

Bei Dr. Inge Krümpelbeck möchte ich mich für die hervorragende Organisation der MOI Graduiertenschule und für die aufmunternden Worte und Ratschläge bedanken. Auch bei den anderen MOI Kollegiaten und Stipendiaten bedanke ich mich für die kollegiale Atmosphäre. An dieser Stelle möchte ich auch Sabrina Thomas und Marina Alber für die Möglichkeit zur lab rotation danken.

Weiterhin möchte ich mich auch bei einigen Kooperationspartnern bedanken:

Ganz besonders danke ich Dr. Rainer Kalscheuer für die Möglichkeit in seinem Labor zu arbeiten, als unseres noch nicht fertig war aber auch für die steten Ratschläge rund um alle Probleme mit Mykobakterien. Auch bei seinen (Ex-)Mitarbeiterinnen Pegah, Marina, Lisanna, Milena und Jan bedanke ich mich für die nette Aufnahme in die Gruppe. Es war sehr schön mit euch noch ein paar zusätzliche nette Kollegen zu haben. Besonders die Kaffeepausen mit Pegah sind mir in sehr schöner Erinnerung geblieben.

Bei Prof. Alfred Goldberg bedanke ich mich dafür, dass er mich zwei Monate lang in seinem Labor aufgenommen hat. Bei seinen Mitarbeitern möchte ich mich für die nette Aufnahme in die Gruppe bedanken. Besonders Olga, Tatos und Chueh-Ling danke ich für die vielen hilfreichen Gespräche und auch bei den anderen Studenten Denis, Nathalie, Sofia, Henrike und Silvia bedanke ich mich für die nette Zeit in Boston.

Bei Prof. Eric Rubin bedanke ich mich für die Möglichkeit einige Versuche in seinem Labor durchzuführen und seinen Mitarbeitern Ravi und June danke ich für die experimentelle Hilfe.

Auch bei Herrn Prof. Dr. Stefan Sieber und Dr. Malte Gersch bedanke ich mich für die gute Zusammenarbeit und für die zwei Tage die ich bei ihnen im Labor in München verbringen durfte.

Für Bereitstellung von verschiedenen Materialien gilt mein Dank Holger Paulsen und Siegfried Raddatz (Bayer Pharma AG, Wuppertal, Germany) für die Synthese der

verwendeten ADEP-Derivate, Craig M. Crews (Yale University, New Haven) für die Bereitstellung der three-generation-peptides, Eckhard Mandelkow (DESY, Hamburg, Germany) für das Tau Protein, Malini Rajagopalan (University of Texas Health Science Center, Tyler, Texas) für das polyklonale Antiserum gegen MTB FtsZ und Ulf Gerth für den Stamm *B. subtilis-pX2-clpP*.

Bei Dr. Peter Sass bedanke ich mich für die wissenschaftlichen Ratschläge und für die Klonierung verschiedener hier verwendeter Proteine.

Bei der kompletten AG Brötz-Oesterhelt bedanke ich mich für die schöne Zeit und super Arbeitsatmosphäre.

Ganz besonders danke ich einigen Kollegen, die mittlerweile zu guten Freunden geworden sind. Allen Voran meiner allerersten Kollegin Heike Goldbach-Gecke, mit der sogar ein Pulver-Capuccino in leeren Büroräumen unglaublich gut war. Bei ihr und ihrem Mann Thomas Gecke bedanke ich mich aber auch für viele schöne Abende und hoffe, dass noch einige dazu kommen werden. Bei meiner ersten Doktoranden-Kollegin Catherine Schumacher bedanke ich mich auch ganz besonders für die tolle Zeit die wir hatten und die Unterstützung in allen Lebenslagen. Auch dein Besuch in Boston und den tollen Urlaub den wir dort hatten, werde ich nie vergessen! Bei der „immer noch neuen“ Doktorandin Dhana Thomy möchte ich mich auch für die schöne Zeit und den Beistand bedanken. Es ist wirklich schön, dass du noch in die Gruppe gekommen bist. Bei unserer adoptierten Doktorandin Lena Hammerschmidt bedanke ich mich ebenfalls für die schöne Zeit die wir gemeinsam durchgestanden haben. Wir sind eben einfach ein Dreamteam. Ohne dich hätte die Praktikumsbetreuung noch nicht einmal halb soviel Spaß gemacht. Ich bin sicher euch alle noch oft wieder zu sehen!

Aber auch den restlichen aktuellen und ehemaligen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Ilka Zerfass, Anne Berscheid, Peter Sass, Clemens Lux, Katharina Arenz und Imran Malik möchte ich für das kollegiale Verhältnis und die schöne gemeinsame Zeit danken.

Bei einigen Studenten, die mich im Labor unterstützt haben, möchte ich mich natürlich auch bedanken. Besonders danke ich Corinna und Ines, auch wenn zwei Wochen wirklich kurz waren, ihr wart super! Auch Melanie danke ich für ihre Ausdauer. Ich hoffe du musst nie wieder so viele Kolonien zählen!

Einigen ehemaligen und aktuellen Mitgliedern der AG Proksch möchte ich ebenfalls für die gute Zusammenarbeit und kollegiale Atmosphäre unter den Gruppen danken. Ganz besonders hervorheben möchte ich hierbei Nadine Kromberg, Catalina Pérez-Hemphill und Mi-Young Chung, mit denen ich einige spaßige Abende verbracht habe. Auch Hendrik Niemann und Amal Hassan danke ich für die gute Zusammenarbeit im Praktikum und David Rönsberg, Bartosz Lipowicz und Wera Hausschild danke ich dafür, dass sie mich im Institut aufgenommen haben. Auch dem Frauenrat Simone Miljanovic, Katja Friedrich, Waltraud

Schlag und Claudia Eckelskemper danke ich für die vielen netten Mittagspausen und lustigen Gespräche.

Für viele spaßige Freizeitaktivitäten bedanke ich mich auch bei Emanuele, Christopher, Alex und Ido. Besonders danke ich Emanuele Ciglia für seine Hilfe mit verschiedenen online-tools und Kalkulationsprogrammen.

Auch einigen guten alten Freunden möchte ich danken, dass sie in den letzten Jahren immer wieder mit mir mitgefiebert haben und für Ablenkung gesorgt haben, wenn ich sie brauchte. Allen voran danke ich in diesem Zusammenhang Olla, Ben, Maddin, Cati, Christian P., Danni, Viola, Sebastian, Tina und Christian S.

Bei meinem Bruder Timo Famulla, meiner Mutter Monika Famulla und meinem Vater Heinz Famulla bedanke ich mich für ihre Unterstützung und Aufmunterungen während meines gesamten Studiums und während dem anfertigen dieser Arbeit.

Bei Jürgen Beck und Imke Brunken bedanke ich mich ebenfalls für die Anteilnahme am Voranschreiten dieser Arbeit.

Ganz besonders danke ich Andreas Marmann, der schon seit langem immer für mich da ist, aber besonders in den letzten Jahren meine Launen ertragen hat und immer wieder versucht hat mich aufzubauen und zu unterstützen.