
Isolierung und Charakterisierung von Endolysinen aus Bakteriophagen gegen *Enterococcus faecalis* und *Enterococcus faecium*

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat) der naturwissenschaftlichen Fakultät III –
Biologie und vorklinische Medizin der Universität Regensburg



vorgelegt von
Falko Bretfeld aus Oederan
November 2009

Promotionsgesuch eingereicht am: 10.11.2009

Die Arbeit wurde angeleitet von: Prof. Dr. Dr. H. R. Kalbitzer

Prüfungsausschuss:

Vorsitzender:	Prof. Dr. R. Wirth
1. Prüfer:	Prof. Dr. Dr. H. R. Kalbitzer
2. Prüfer:	Prof. Dr. G. Meister
3. Prüfer:	Prof. Dr. M. Thomm

1	Zusammenfassung	- 1 -
2	Einleitung	- 3 -
2.1	Infektionen und Sepsis	- 3 -
2.2	Enterokokken	- 4 -
2.3	Bakteriophagen	- 7 -
2.4	Endolysine.....	- 11 -
2.5	Ziele der Arbeit.....	- 15 -
3	Material	- 16 -
3.1	Bakterienstämme	- 16 -
3.1.1	Teststämme	- 16 -
3.1.2	<i>E. coli</i> Klonierungs- und Expressionsstämme	- 17 -
3.1.2.1	Stämme mit T7-Expressionssystem.....	- 18 -
3.1.2.2	Stämme mit T5 Expressionssystem.....	- 18 -
3.1.2.3	Stämme zur Amplifikation von Plasmiden	- 18 -
3.2	Expressionsvektoren	- 19 -
3.3	Enzyme	- 19 -
3.4	Oligonukleotide.....	- 19 -
3.5	Größenstandards	- 20 -
3.6	Verwendete Chemikalien	- 20 -
3.7	Antibiotika und Medienzusätze.....	- 21 -
3.8	Puffer und Lösungen	- 21 -
3.9	Kits	- 24 -
3.10	Verbrauchsmaterial	- 24 -
3.11	Geräte	- 25 -
3.12	Software und Online-Tools.....	- 26 -
4	Methoden.....	- 27 -
4.1	Mikrobiologische Methoden.....	- 27 -
4.1.1	Anzucht und Erhaltung von Bakterien	- 27 -
4.1.2	Sammlung von Umweltproben	- 28 -
4.1.3	Isolierung von Phagen aus Umweltproben.....	- 28 -
4.1.4	Bestimmung des Phagentiters	- 29 -
4.1.5	Konservierung der Bakteriophagen.....	- 29 -
4.1.6	Wirtsspektrum von Bakteriophagen	- 29 -
4.1.7	Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen	- 30 -

4.1.8	Transformation von DNA in <i>E. coli</i>	- 30 -
4.1.9	Rekombinante Proteinexpression in <i>E. coli</i>	- 31 -
4.2	Molekularbiologische Methoden	- 31 -
4.2.1	Isolierung von DNA aus Bakteriophagen	- 31 -
4.2.2	Isolierung von Plasmid-DNA	- 31 -
4.2.3	Unspezifische Amplifikation von DNA	- 32 -
4.2.4	Spezifische Amplifikation von DNA (PCR)	- 32 -
4.2.4.1	Kolonie-PCR	- 33 -
4.2.5	Verwendung von Enzymen zur Veränderung der DNA	- 34 -
4.2.5.1	Restriktionsverdau	- 34 -
4.2.5.2	Ligation	- 34 -
4.2.6	Shot-Gun Klonierung von Zufallssequenzen aus Phagen-DNA	- 34 -
4.2.7	Blau-Weiß-Screening	- 34 -
4.2.8	Agarose-Gelelektrophorese	- 35 -
4.3	Proteinbiochemische Methoden	- 35 -
4.3.1	Gewinnung unlöslich exprimierter Proteine	- 35 -
4.3.1.1	Isolierung von <i>inclusion bodies</i>	- 36 -
4.3.1.2	Solubilisierung von <i>inclusion bodies</i>	- 36 -
4.3.1.3	Rückfaltung denaturierter Proteine	- 36 -
4.3.2	Proteinreinigung	- 37 -
4.3.2.1	Anionenaustauscherchromatographie.....	- 37 -
4.3.2.2	Kationenaustauscherchromatographie.....	- 38 -
4.3.2.3	Ni-NTA-Affinitätschromatographie	- 38 -
4.4	Analytische Methoden	- 39 -
4.4.1	SDS Polyacrylamidgelelektrophorese	- 39 -
4.4.2	<i>Semi Dry</i> Westernblot	- 39 -
4.4.2.1	Detektion des Zielproteins.....	- 40 -
4.4.3	Expressions- und Löslichkeitstest	- 40 -
4.4.4	UV-Spektroskopie	- 41 -
4.4.4.1	Konzentrationsbestimmung von DNA	- 41 -
4.4.4.2	Konzentrationsbestimmung von Proteinen.....	- 41 -
4.4.5	Fluoreszenzspektroskopie.....	- 42 -
4.4.6	Untersuchung der thermischen Stabilität	- 43 -
4.5	Funktionstestung	- 43 -

4.5.1	Peroxidase-Zellbindetests	- 43 -
4.5.2	Aktivitätstests für Endolysine.....	- 44 -
4.5.2.1	Plattenlysetests mit hitzeinaktivierten Bakterien	- 44 -
4.5.2.2	Plattenlysetests mit lebenden Bakterien	- 45 -
4.5.2.3	Flüssigzellysetest	- 45 -
4.5.2.4	Bestimmung der minimalen bakteriziden Konzentration	- 46 -
4.5.2.5	Bestimmung der minimalen inhibitorischen Konzentration.....	- 47 -
4.6	Bioinformatische Methoden	- 48 -
5	Ergebnisse.....	- 49 -
5.1	Isolierung lytischer Bakteriophagen.....	- 49 -
5.2	Screening nach Endolysinen	- 59 -
5.3	Konstrukte	- 63 -
5.3.1	EPhL-20	- 63 -
5.3.2	EPhL-25	- 65 -
5.4	Reinigung und Charakterisierung der Endolysine	- 66 -
5.4.1	Reinigung von EPhL-20	- 66 -
5.4.2	Reinigung von EPhL-25	- 69 -
5.4.3	Charakterisierung der Endolysine	- 70 -
5.4.3.1	Thermostabilität	- 70 -
5.4.3.2	Guanidinium induzierte Denaturierungsübergänge	- 72 -
5.4.3.3	Bestimmung der optimalen Lysebedingungen	- 73 -
5.4.3.3.1	Bestimmung der Ionenabhängigkeit.....	- 73 -
5.4.3.3.2	Bestimmung des pH-Optimums	- 75 -
5.4.3.3.3	Lysegeschwindigkeit von Enterokokken in verschiedenen Wachstumsphasen	- 76 -
5.4.3.4	Aktivitätsbestimmung	- 78 -
5.4.3.5	Spezifitätsbestimmung	- 80 -
5.4.3.6	Bestimmung der minimalen bakteriziden Konzentration	- 82 -
5.4.3.7	Bestimmung der minimalen inhibitorischen Konzentration.....	- 84 -
5.4.4	Zusammenfassender Vergleich von EPhL-20K und EPhL-25.....	- 85 -
5.5	Kombination von Domänen	- 86 -
5.5.1	Klonierung von Konstrukt-1 (K-1)	- 86 -
5.5.2	Reinigung von K1	- 88 -
5.5.3	Charakterisierung von K-1.....	- 90 -

5.5.3.1	Thermostabilität	- 90 -
5.5.3.2	Guanidinium induzierte Denaturierungsübergänge	- 91 -
5.5.3.3	Bestimmung der optimalen Lysebedingungen	- 93 -
5.5.3.3.1	Bestimmung der Ionenabhängigkeit.....	- 93 -
5.5.3.3.2	Bestimmung des pH Optimums	- 94 -
5.5.3.4	Aktivitätsbestimmung	- 95 -
5.5.3.5	Spezifitätsbestimmung	- 96 -
5.5.3.6	Bestimmung der minimalen bakteriziden Konzentration	- 97 -
5.5.3.7	Bestimmung der Aktivität von K-1 in Humanserum	- 99 -
6	Zusammenfassende Diskussion	- 100 -
6.1	Identifizierung antimikrobieller Proteine.....	- 100 -
6.2	Charakterisierung von EPhL-20K und EPhL-25	- 105 -
6.3	Proteinoptimierung durch Domänenkombination.....	- 111 -
7	Ausblick	- 115 -
8	Literaturverzeichnis.....	- 116 -
9	Danksagung.....	- 128 -

Abkürzungsverzeichnis

Abs _{xxx}	Absorption bei xxx nm Wellenlänge
ABTS	2,2Azino-bis(3-ethyl)benzthiazoline 6-sulfonic acid
AP	alkalische Phosphatase
ATCC	American Type Culture Collection
BSA	bovines Serumalbumin
bidest.	doppelt destilliert
bzw.	beziehungsweise
CBD	cellwall binding domain
CD	Circulardichroismus
CDC	Centers for Disease Control and Prevention
cfu	colony forming units
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
EAD	enzymatisch aktive Domäne
EARSS	European Antimicrobial Resistance Surveillance System
ECDC	European Centre for Disease Prevention and Control
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
Gdn-HCl	Guanidinhydrochlorid
GlcNAc	N-Acetylglucosamin
Hepes	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
h	Stunde
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
l	Liter
LRE	Linezolid-resistente Enterokokken
MBC	minimal bactericidal concentration
MES	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure
MIC	minimal inhibitory concentration
min	Minute
ml	Milliliter
μ l	Mikroliter
MOPS	3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure
MRSA	Methizilin-restistente <i>Staphylococcus aureus</i>
MurNAc	N-Acetylmuramin
nm	Nanometer

Abkürzungsverzeichniss

Ni-NTA	Nickel-NitriloTriacetic Acid
OD ₆₀₀	optische Dichte bei einer Wellenlänge von 600nm
p.a.	<i>pro analysi</i> (zur Analyse)
PBP	Penicillin-Bindeprotein
PBS	phosphate buffered saline
PBST	phosphate buffered saline with tween
ProCC	Profos Culture Collection
SDS	sodiumdodecylsulfate
s	Sekunde
Tris-HCl	2-Amino-2-(hydroxymethyl)-propan-1,3-diol – hydrochlorid
TBS	Tris buffered saline
TBST	Tris buffered saline with tween
VRE	Vancomycin-resistente Enterokokken
X-Gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl- beta-D-galactopyranoside

Aminosäuren wurden im internationalen Ein-Buchstaben-Code angegeben. Eine Zahl hinter dem Buchstaben gibt die Aminosäureposition im Protein an.

1 Zusammenfassung

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Entwicklung eines bakteriolytisch aktiven Phagenproteins zur Bekämpfung von Infektionen durch die klinisch relevanten Stämme *Enterococcus faecalis* und *Enterococcus faecium*.

Nach der Isolierung von 31 lytischen Bakteriophagen gegen beide Stämme aus Umweltproben, wurden innerhalb des Genoms der gefundenen Phagen durch Homologiesuche passende Endolysinsequenzen identifiziert. Die gefundenen Endolysine EPhL-20 aus dem *Enterococcus faecalis*-Phagen EPh-20 und EPhL-25 aus dem *Enterococcus faecium*-Phagen EPh-25 konnten rekombinant in *E. coli* exprimiert und aus *E. coli* gereinigt werden. Das Protein EPhL-20K bestand aus einer lytischen Domäne (N-Acetylmuramoyl-L-Alanin-Amidase), welche über einen Linker mit einer putativen CBD und einer SH3b-Domäne mit Zellbindefunktion verbunden war. EPhL-25 bestand ebenfalls aus einer lytischen Domäne (N-Acetylmuramoyl-L-Alanin-Amidase) und einer über einen Linker angeschlossenen putativen CBD.

Da das modifizierte Protein EPhL-20K unlöslich in *inclusion bodies* exprimiert wurde, wurde eine Methode zu dessen Reinigung aus *inclusion bodies*, zur Solubilisierung und Renaturierung dieses Proteins etabliert. EPhL-25 konnte löslich aus *E. coli* gereinigt werden.

Für die Charakterisierung beider Proteine wurden verschiedene Methoden zur Testung der Funktion etabliert. Dazu gehörten Testverfahren wie der Platten- und Flüssigzellysetest mit lebenden und hitzeinaktivierten Testbakterien, sowie die Bestimmung der minimalen bakteriziden- sowie minimalen inhibitorischen Konzentration der beiden Proteine. Diese Methoden waren vor allem für die Abschätzung der therapeutischen Eignung der Proteine notwendig.

EPhL-25 zeigte in diesen Tests eine höhere spezifische Aktivität gegen *Enterococcus faecium* als gegen *Enterococcus faecalis*, wobei allerdings nicht alle Isolate von *Enterococcus faecalis* lysiert wurden. EPhL-20K zeigte nur Aktivität gegen *Enterococcus faecalis*. Das Ziel der Arbeit, mit einem Protein alle Isolate der beiden Stämme *Enterococcus faecalis* und *Enterococcus faecium* zu lysieren, wurde jedoch von keinem der beiden Proteine erreicht.

Die Herstellung eines chimären Proteins durch Kombination von Funktionsmodulen beider Proteine sollte das Problem der eingeschränkten Spezifität der beiden Ausgangsproteine lösen. Hierfür wurde das Protein EPhL-25, welches grundsätzlich

die bessere spezifische Aktivität und Spezifität zeigte, um den Zellbindebereich des Proteins EPhL-20K erweitert. Dadurch sollte eine Verbesserung der Spezifität für *Enterococcus faecalis* erreicht werden, während die hohe Spezifität von EPhL-25 gegen *Enterococcus faecium* erhalten bleiben sollte.

Das neue Protein K-1 wurde, wie die beiden Ausgangsproteine, hinsichtlich Stabilität, Aktivität und Spezifität charakterisiert. Die erwartete Verbesserung der Spezifität gegenüber *Enterococcus faecalis* durch die zusätzliche CBD konnte bei K-1 festgestellt werden. Diese verbesserte Eigenschaft wurde allerdings auf Kosten der Löslichkeit und einer um 10°C verringerten Thermostabilität gegenüber EPhL-25 erreicht. Das neue Protein K-1 zeigte eine geringere spezifische Aktivität gegenüber *Enterococcus faecium*, während sich die spezifische Aktivität gegenüber *Enterococcus faecalis* erhöht hatte. Beim Vergleich der therapeutisch wichtigeren Daten der minimalen inhibitorischen Konzentration von K-1 mit den beiden Ausgangsproteinen zeigte sich, dass K-1 bei gleicher Proteinmenge mehr Zellen beider Teststämme lysierte als die beiden Ausgangsproteine. K-1 war in der Lage 99,95% der eingesetzten Testzellen beider Teststämme innerhalb einer Stunde zu lysieren. Die Ausgangsproteine erreichten diesen Wert entweder gar nicht (EPhL-20K), oder nur mit einem der beiden Teststämme (EPhL-25). Weitere Lyseversuche mit K-1 in humanem Blutserum zeigten, dass das Protein auch unter systemischen Bedingungen Aktivität besitzt.

Im Verlauf der Arbeit konnte gezeigt werden, dass es prinzipiell möglich ist, lytische Proteine wie Endolysine aus Bakteriophagen als potentielle therapeutische Wirkstoffe zur selektiven Bekämpfung von *Enterococcus faecalis* und *Enterococcus faecium* zu gewinnen. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass durch gezielte Kombination von Funktionsmodulen dieser Proteine eine Optimierung und Anpassung an bestimmte Vorgaben des therapeutischen Einsatzes möglich ist.

2 Einleitung

2.1 Infektionen und Sepsis

In den Industriestaaten haben Menschen aufgrund der hygienischen Lebensverhältnisse und der guten medizinischen Versorgung eine deutlich höhere Lebenserwartung als Menschen in Entwicklungsländern. Die beiden häufigsten Todesursachen in den Industriestaaten sind kardiologische Probleme und Krebs. Bakterielle Infektionen liegen auf Platz drei der Haupttodesursachen.

Menschen mit einem gesunden Immunsystem, haben in der Regel kein Problem eine Infektion zu überleben. Personen mit geschwächtem Immunsystem, wie etwa ältere Menschen, Kinder und Personen mit einer Vorerkrankung, besitzen ein viel höheres Risiko, einer Infektion zum Opfer zu fallen. Bei diesen Personen kann sich eine lokale bakterielle Infektion so weit verschlimmern, dass Bakterien in die Blutbahn gelangen und dort einen Schockzustand auslösen, welcher als Sepsis bezeichnet wird. Verantwortlich für das Auslösen dieses septischen Schocks sind Bestandteile der bakteriellen Zellwände. Diese Bestandteile, wie Lipopolysaccharide (LPS), Peptidoglycan oder Lipoteichonsäuren koppeln in der Blutbahn an Rezeptoren auf der Oberfläche von Phagozyten. Die als LPS-Bindeprotein bezeichneten Rezeptoren sind der Ausgangspunkt einer Signalkaskade, an deren Ende die Ausschüttung von Cytokinen, Interleukinen und Wachstumsfaktoren steht. Gleichzeitig werden das Komplementsystem und die Koagulationskaskade ausgelöst (Wang et al., 2003). Diese Reaktionen des Körpers sollen den Infektionsherd begrenzen und den Heilungsprozess beschleunigen. Bei einer schweren Infektion kann dieser Prozess das Blutbild jedoch so stark verändern, dass die Sauerstoff- und Nährstoffversorgung der Organe zusammenbricht. Dies führt letzten Endes zum Organversagen und damit zum Tod des Infizierten (Infectious Disease Study, 2000). Es gibt verschiedene klinische Anzeichen, welche auf eine Sepsis hindeuten. Der erste Hinweis für eine Infektion ist eine Körpertemperatur über 39°C oder unter 36°C. Im späteren Verlauf der Infektion sind Atmung und Herzschlag meist stark beschleunigt, was ein Anzeichen dafür ist, dass der Körper versucht die Sauerstoffversorgung zu gewährleisten. In diesem Stadium ist eine starke Abweichung vom Blutbild einer gesunden Person feststellbar (Bone et al., 1992).

Tritt eine Infektion erst im Krankenhaus, etwa nach einem intensivmedizinischen Eingriff auf, wird diese als nosokomiale Infektion (griech.: nosokomeion = Krankenhaus) bezeichnet. Jedes Jahr werden in den USA und Europa etwa 2 Millionen Fälle von schwerer Sepsis behandelt, wobei etwa 70 Prozent davon erst während eines Klinikaufenthalts entstehen. Die Mortalitätsrate einer schweren Sepsis liegt bei etwa 50 Prozent (Infectious Disease Study, 2000; Spencer *et al.*, 1996). Das einzige erfolgversprechende Mittel zu Behandlung einer Sepsis sind derzeit Antibiotika. Wird die Sepsis jedoch von einem Antibiotika-resistenten Keim ausgelöst, verschlechtern sich die Überlebenschancen des Patienten dramatisch. Reagiert der Keim auf keines der bekannten Antibiotika, bleibt nur noch die medikamentöse Stabilisierung der Körperfunktionen. In diesem Fall, kann man nur darauf hoffen, dass das Immunsystem des Patienten alleine in der Lage ist die Infektion erfolgreich zu bekämpfen (van Amserfoort *et al.*, 2003).

Die Zahl der einfach oder mehrfach Antibiotika-resistenten Keime nimmt ständig zu. Die beiden bekanntesten Vertreter multiresistenter Keime sind Methicillin-resistente *Staphylococcus aureus* (MRSA) und Vancomycin-resistente Enterokokken (VRE). Staphylokokken sind für etwa 80 Prozent aller septisch verlaufenden Infektionen verantwortlich, wobei der Anteil der Infektionen mit MRSA bei etwa 60 Prozent liegt. Enterokokken verursachen etwa 15 Prozent der septischen Infektionen. Der Anteil der VRE-Stämme liegt hier bei etwa 50 Prozent (EARSS-Report, 2007).

2.2 Enterokokken

Bei Enterokokken handelt es sich um grampositive, meist paarweise angeordnete kokkoide Bakterien. Sie besitzen eine weitgehende Resistenz gegenüber Umwelteinflüssen und wachsen bei Temperaturen zwischen 10°C und 45°C, bei pH-Werten bis 9,6; sowie in Gegenwart von Gallenflüssigkeit. Enterokokken gehören neben *Escherichia coli*, Streptokokken, Bifidobakterien und Lactobazillen zur normalen Darmflora des Menschen. Sie besiedeln normalerweise den Dünndarm und sind wichtig für die Verdauung der Nahrung in resorbierbare Bestandteile.

Bisher sind die Stämme *avium*, *casseliflavus*, *flavescens*, *durans*, *gallinarium*, *hirae*, *faecalis* und *faecium* bekannt, wobei nur den beiden letzten Stämmen eine klinische Bedeutung zukommt. Diese zählen zu den potentiell pathogenen Keimen. Bei operations- oder krankheitsbedingter Schwächung des Immunsystems können sie

eine Vielzahl verschiedener Infektionen auslösen. Sehr häufig kommen Harnwegs-, Bauchfell-, Weichteil-, Herzklappen- und Atemwegsinfektionen vor.

Enterokokken besitzen den für gram positive Bakterien typischen Zellwandaufbau. Dieser besteht aus langen Ketten von N-Acetylmuramin (MurNAc) und N-Acetylglucosamin (GlcNAc), welche stets abwechselnd β -1,4 glycosidisch verknüpft sind. Die Ketten werden untereinander durch Peptide zusammengehalten. Der Aufbau der Zellwand beginnt mit der Bereitstellung des so genannten Pentapeptidprecursors auf der Außenseite der Zellmembran. Diese Precursormoleküle werden durch die Transglycosylase zu einer Kette verknüpft (Abbildung 2-1). Die Ketten erreichen eine Länge von etwa 50 Precursormolekülen. Die Vernetzung der Ketten untereinander erfolgt durch die Transpeptidase. Diese katalysiert die proteolytische Abspaltung der fünften Aminosäure des Precursormoleküls, des D-Alanins. Dadurch wird die Energie für die Ausbildung der Interpeptidbrücke bereitgestellt. Diese bildet sich zwischen der dritten Aminosäure, L-Lysin, des ersten Precursormoleküls und der vierten Aminosäure, D-Alanin, des gegenüberliegenden Precursormoleküls aus (Navarre *et al.*, 1999). Die Interpeptidbrücke besteht bei *Enterococcus faecalis* aus zwei L-Alaninen (Bouhss *et al.*, 2002), und bei *Enterococcus faecium* aus einem D-Aspartat (Bellais *et al.*, 2006).

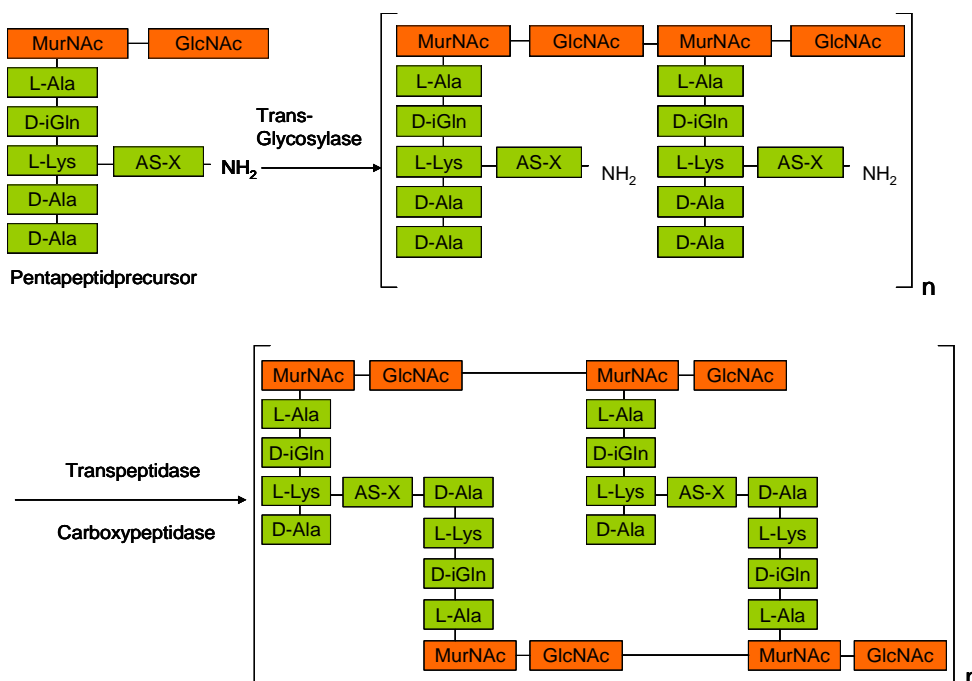


Abbildung 2-1

Darstellung der beiden Reaktionen, die zur Verknüpfung der Zellwand gram positiver Bakterien führt.

Viele Antibiotika greifen an verschiedenen Punkten des Zellwandaufbaus ein und verhindern diesen. Die am häufigsten eingesetzte Gruppe von Antibiotika sind die β -Lactam-Antibiotika, zu denen auch Penicillin gehört. Die Antibiotika zerstören das katalytische Zentrum, den β -Lactam-Ring der Transpeptidase, welche in diesem Zusammenhang auch als Penicillin-Bindeprotein (PBP) bezeichnet wird. Dadurch wird der Zellwandaufbau gestoppt und die Zelle stirbt beim nächsten Teilungszyklus ab. Enterokokken besitzen eine Primärresistenz gegen β -Lactam-Antibiotika. Als Primärresistenz bezeichnet man eine nicht erworbene, chromosomal veranlagte Resistenz. Diese beruht auf einer veränderten Transpeptidase, welche eine stark verminderte Affinität gegenüber β -Lactam-Antibiotika besitzt.

Vancomycin, ein Glycopeptid-Antibiotikum, greift ebenfalls in den Zellwandaufbau gram positiver Bakterien ein. Dieses Antibiotikum komplexiert den Pentapeptidprecursor. Der Grundbaustein des Zellwandaufbaus steht somit nicht mehr zu Verfügung, wodurch die Zelle bei der nächsten Teilung abstirbt. Die Resistenz der VRE-Stämme beruht auf einer Veränderung eines Enzyms, welches am Aufbau des Pentapeptidprecursors beteiligt ist. Dieses Enzym, die D-Ala-D-Ala-Ligase, stellt normalerweise die Verknüpfung zwischen der vierten und fünften Aminosäure des Precursormoleküls her. VRE-Stämme besitzen Variationen dieses Gens, welche als *vanA* bis *vanE* bezeichnet wird. Diese Genvariationen codieren für Enzyme, welche statt dem D-Alanin an Position fünf, eine Verknüpfung zu D-Lactat (*vanA*, *B* und *D*) beziehungsweise zu L-Serin (*vanC* und *E*) herstellen. Da Vancomycin zu den so veränderten Precursormolekülen keine Affinität besitzt, kann es seine hemmende Wirkung beim Zellwandaufbau nicht entfalten (Cetinkaya *et al.*, 2000). Die Vancomycin-Resistenz wird als sekundäre Resistenz bezeichnet, da das entsprechende Gen auf einem Plasmid oder innerhalb eines Transposons liegt. Da sie dadurch mittels des horizontalen Gentransfers weiter gegeben werden kann, ist eine sehr rasche Ausbreitung dieser Resistenz zu beobachten. Im Jahr 2001 wurden VRE-Stämme nur in einigen Ländern der EU registriert, wo sie selten mehr als 25% der Enterokokken-Infektionen ausmachten. Fünf Jahre später haben sich VRE-Stämme über ganz Europa ausgebreitet und machen zum Teil 50 Prozent der Enterokokken-Infektionen aus (Abbildung 2-2). Wie schnell sich Resistenzen innerhalb von Bakterienpopulationen entwickeln und ausbreiten zeigt sich am Beispiel eines der neuesten Antibiotika, Linezolid. Dieses Antibiotikum gehört zur Gruppe der Oxazolidinone, welche auf die Peptidyltransferase der 50s ribosomalen

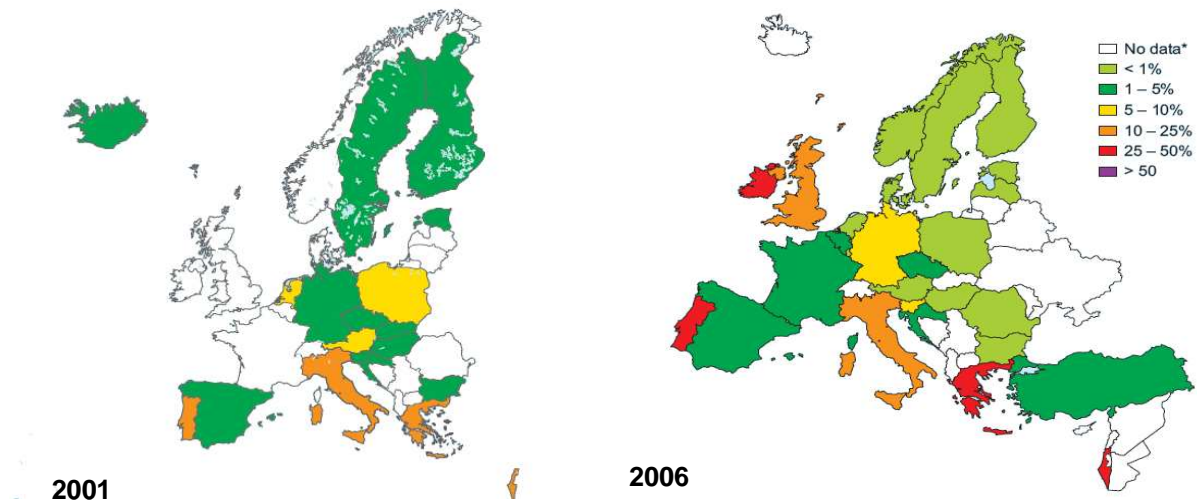


Abbildung 2-2

Vergleich der statistischen Resistenz-Verteilung von Vancomycin-resistenten *Enterococcus faecium* im Jahr 2001(links) und 2006 (rechts) aus dem EARSS-Report (European Antimicrobials Resistance Surveillance System) 2001 und 2006

Untereinheit wirken und somit die Proteinbiosynthese verhindern. Linezolid wurde im Jahr 2000 in den USA, und 2001 in Deutschland zugelassen. Das Antibiotikum zeigte eine sehr gute Wirksamkeit gegen VRE, MRSA und alle Streptokokken (Halle *et al.*, 2002). Zwischen der Zulassung in den USA und dem ersten bekannten Ausbruch von Linezolid-resistenten-Enterokokken (LRE) vergingen aber nur vier Jahre. (Kainer *et al.*, 2007). Die schnelle Entwicklung und Ausbreitung der Antibiotika-Resistenzen zwingt die Pharmaindustrie, sich nach neuen Möglichkeiten zur Bekämpfung bakterieller Infektionen umzusehen. Eine dieser Möglichkeiten ist die Anwendung von Bakteriophagen oder Bakteriophagenproteinen.

2.3 Bakteriophagen

Bei Bakteriophagen handelt es sich um Bakterien infizierende Viren, welche im allgemeinen eine Größe zwischen 2 nm und 200 nm besitzen. Sie werden anhand ihrer Morphologie und der enthaltenen Nukleinsäure klassifiziert. Das Genom von Phagen hat in den meisten Fällen eine Größe von 5-500 Kilobasenpaaren und kann als einsträngige DNA oder RNA beziehungsweise als doppelsträngige DNA oder RNA vorliegen. Die heutige Klassifizierung der Bakteriophagen basiert auf der morphologischen Einteilung von Bradley (Bradley *et al.*, 1965 und 1967).

Die Morphologie einiger heute bekannten Phagen ist von pleomorphem, filamentösem oder kubischem Charakter, die meisten Phagen jedoch (ca. 96%)

besitzen eine Kopf-Schwanz-Struktur (*tailed phages*) und gehören zur Ordnung *Caudovirales* (Ackermann, 1999). Das genetische Material ist bei Vertretern dieser Ordnung in einem ikosaedrisch geformten Kopf enthalten. Der Schwanz und die Basisplatte dienen der Anheftung an den Wirt und der Injektion der Nukleinsäure (Abbildung 2-3).

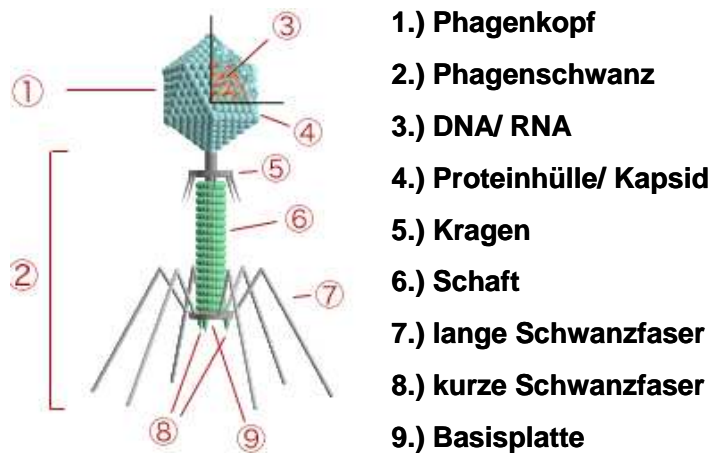


Abbildung 2-3

Schematische Darstellung eines caudoviralen Phagen (Tambe, 2005)

Zu den *Caudovirales* gehören drei Familien: *Myoviridae* besitzen einen kontraktilen Schwanz, *Siphoviridae* einen sehr langen, jedoch nicht kontraktilen Schwanz, und *Podoviridae* haben einen sehr kurzen, nicht kontraktilen Schwanz (Abbildung 2-4).

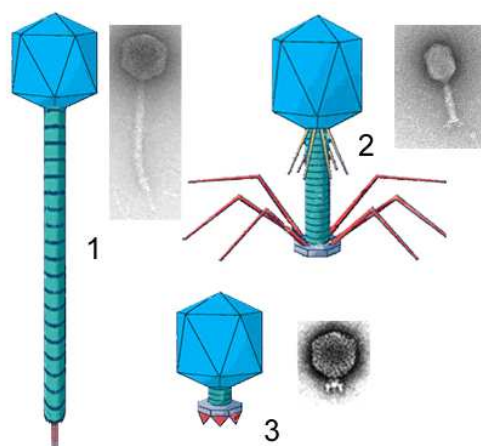


Abbildung 2-4

Morphologie der *Caudovirales*. (1) *Siphoviridae*, (2) *Myoviridae*, (3) *Podoviridae*. (Profos AG, 2006)

Wie alle Viren haben Phagen keinen eigenen Stoffwechsel. Sie benötigen Bakterienzellen zur Vermehrung. Nach der spezifischen Erkennung der Wirtszelle durch Proteine der Basisplatte oder der Schwanzfasern, wird die DNA des Phagen in die Zelle injiziert. Ab diesem Moment kann man zwischen einem lysogenen oder lytischen Vermehrungszyklus des Phagen unterscheiden. Die DNA lysogener Phagen wird nach der Injektion in das Genom der Wirtszelle integriert. Eine Vervielfältigung des Phagen findet hier zunächst nicht statt. Das Genom des Phagen wird bei jeder Zellteilung ebenfalls repliziert und auf die beiden Tochterzellen verteilt. Phagen, welche in das Genom der Wirtszelle integriert sind, werden als temperente- oder Prophagen bezeichnet. Der Wechsel in den lytischen Vermehrungszyklus wird erst ausgelöst, wenn sich die Wachstumsbedingungen für die Wirtszelle verschlechtern. Da durch Absterben der Wirtszelle die Erbinformationen des Phagen ebenfalls verloren gehen würden, beginnt dieser sich zu replizieren. Nach Zusammenbau der Phagenpartikel wird die Zellwand der Wirtszelle zerstört und die Phagen werden freigesetzt (Abbildung 2-5). Das Genom von Phagen mit ausschließlich lytischem Vermehrungszyklus wird nicht ins Genom der Wirtszelle integriert. Bei diesem Vermehrungszyklus beginnt die befallene Zelle sofort mit der Vervielfältigung des Phagengenoms und der Herstellung der darin codierten Proteine.

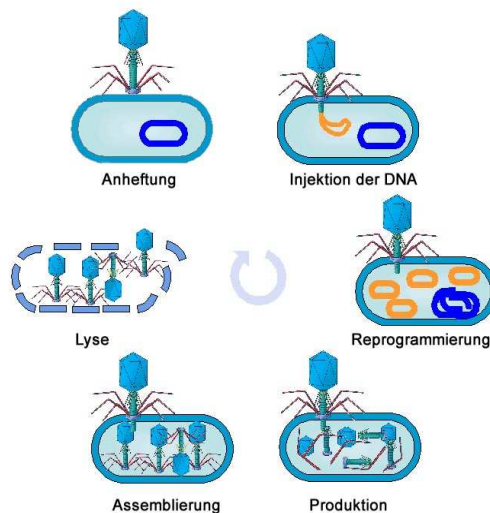


Abbildung 2-5

Darstellung des lytischen Vermehrungszyklus eines Bakteriophagen (Profos AG, 2006)

Bakteriophagen wurden 1915 von Frederick Twort sowie 1919 von Felix Hubert d'Herelle unabhängig voneinander beschrieben, wobei erst die Versuche von

d'Herelle in der Fachwelt Beachtung fanden. Im Jahr 1919 beschrieb d'Herelle wie man Phagen gegen Typhus-Infektionen einsetzen kann (d'Herelle 1919). Diese sogenannte Phagentherapie geriet mit Einführung der ersten Antibiotika, wie zum Beispiel Sulfonamid 1935 und Penicillin 1943, zunehmend wieder in Vergessenheit. Lediglich in einigen osteuropäischen Staaten und der ehemaligen Sowjetunion gehörte die Phagentherapie weiterhin zu den medizinisch eingesetzten Therapieformen. Die größte Erfahrung mit der medizinischen Anwendung von Bakteriophagen besitzt das Eliava-Institut in Tiflis, Georgien. Giorgi Eliava, der Gründer dieses Institutes, arbeitete in den zwanziger Jahren mit d'Herelle zusammen in Paris und untersuchte die Wirksamkeit von Phagen gegen verschiedenste Infektionen.

Durch die zunehmende Verbreitung von Bakterien mit Resistenzen gegen alle bekannten Antibiotika, ist die Pharmaindustrie auf der Suche nach neuen antimikrobiellen Wirkstoffen. Bakteriophagen würden sich dazu eignen, da sie am Ende ihres Vermehrungszyklus die befallenen Zellen zerstören. Ihre hohe Wirtsspezifität ist eine weitere Eigenschaft, welche sie für medizinische Entwicklungen interessant macht. Mittlerweile wurde eine Vielzahl von Phagen gegen fast jedes bekannte Bakterium gefunden. Bekannte Vertreter für Phagen von gram positiven Bakterien sind in der Tabelle 2-1 aufgelistet.

Tabelle 2-1

Wichtigste Vertreter der Bakteriophagen gegen *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* und *faecium* sowie *Streptococcus pneumoniae*

Bakteriophage	Wirtstamm	Quelle
Twort	<i>Staphylococcus aureus</i>	Twort <i>et al.</i> , 1915
Phi11	<i>Staphylococcus aureus</i>	Novick <i>et al.</i> , 1967
Phage K	<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC Herkunft unbekannt
phi 1	<i>Enterococcus faecalis</i>	Sewage <i>et al.</i> , 1975
phi EF24C	<i>Enterococcus faecalis</i>	Uchiyama <i>et al.</i> , 2007
F4	<i>Enterococcus faecium</i>	Nigutova <i>et al.</i> , 2008
CP1	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Garcia <i>et al.</i> , 1987
CP7	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Garcia <i>et al.</i> , 1989
CP9	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Garcia <i>et al.</i> , 1989

Im Tiermodell konnte die Wirksamkeit von Phagen gegen VRE-Stämme (Biswas *et al.*, 2001), *Staphylococcus aureus* (Capparelli *et al.*, 2007), *Pseudomonas*

aeruginosa (Catherine *et al.*, 2007) und *Escherichia coli* O157 H7 (Sheng *et al.*, 2006) bewiesen werden.

Eine weitere Möglichkeit zur Bekämpfung von Bakterien ist die Anwendung der Proteine, welche es dem Phagen ermöglichen am Ende des Reproduktionszyklus die Wirtszelle zu zerstören. Diese Proteine nennt man Endolysine.

2.4 Endolysine

1937 beschrieb Dubos erstmals, dass es Zellbestandteile gibt, welche die Eigenschaft besitzen Bakterienzellen zu zerstören. Er zeigte in Versuchen, dass Pneumokokken die Stress ausgesetzt sind, lysiert werden. Da die Zellen bei diesen Versuchen ihre antigenen Oberflächeneigenschaften verloren, musste ein anderer, enzymatischer Mechanismus verantwortlich sein, als bei der Zerstörung durch Hitze oder physikalische Einwirkungen (Dubos, 1937). Ralston beschrieb 1956 erstmals den Unterschied zwischen lytischen Proteinen, welche bei einer Phageninfektion freigesetzt werden, und zelleigenen, autolytisch auf eine Zelle wirkenden Proteinen. Die beiden Proteintypen weisen verschiedene Abbauprodukte der Zellwand auf, was auf unterschiedliche enzymatische Reaktionen schließen lässt (Ralston *et al.*, 1956). Im selben Jahr veröffentlichten Lieberman, dass das Substrat der lytischen Phagenproteine, die Polysaccharide der Zellwand sind (Lieberman *et al.*, 1956). Diese Proteine wurden damals als Virolysine bezeichnet, während man heute den Begriff Endolysin verwendet.

Für Phagen gram positiver Bakterien ist der Mechanismus, welcher zur Zerstörung der Wirtszelle am Ende der Phagenreproduktion führt weitestgehend aufgeklärt. In der späten Phase der Phagenreproduktion kommt es zu Bildung von zwei Proteinen. Das erste Protein ist Holin. Dieses hydrophobe Membranprotein fügt der Cytoplasmamembran der befallenen Zellen Läsionen zu (Wang *et al.*, 1991; Kaneko *et al.*, 1998; Loessner *et al.*, 1998; Loessner *et al.*, 1999; Wang *et al.*, 2003). Durch die Läsionen kann das zweite Protein, das Endolysin, an die Zellwand gelangen (Wang *et al.*, 2000). Diese wird durch das Endolysin abgebaut, woraufhin die Zelle aufgrund des osmotischen Drucks der Umgebung platzt. Die neu gebildeten Phagen werden dabei freigesetzt und können neue Wirtszellen befallen (Groman, 1962).

Bakteriolytische Enzyme werden aufgrund ihrer Herkunft und Aufgabe in verschiedene Gruppen aufgeteilt. Neben den schon beschriebenen Endolysinen gibt es noch Autolysine und Bakteriocine. Autolysine sind Enzyme, welche

zellwandgebunden vorliegen und eine entscheidende Rolle bei der Zellteilung spielen (Smith *et al.*, 2000). Bakteriocine sind Enzyme, welche von Bakterien zur Unterdrückung des Wachstums konkurrierender Bakterien ausgeschüttet werden. Eines der bekanntesten Bakteriocine ist Lysostaphin, welches von *Staphylococcus simulans* gebildet wird (Wu *et al.*, 2003; Kumar, 2008).

Autolysine und Bakteriocine ähneln in ihrem Aufbau oft den Endolysinen. Diese bestehen meist aus einer spezifischen, hochaffinen Bindedomäne (engl. *cell wall binding domain*, CBD), welche für die Erkennung und Kopplung des Enzyms an die Zellwand verantwortlich ist (Loessner *et al.*, 1998, 1999 und 2002), sowie einer lytischen Domäne (engl. *enzymatic activ domain*, EAD), welche die Zellwand abbaut (Garcia *et al.*, 1987). Für die Funktion des Proteins spielt es keine Rolle, ob die CBD oder EAD im N- oder C-terminalen Bereich des Proteins liegen (Garcia *et al.*, 2000). Im Bereich der CBD kommen bestimmte strukturelle Motive vor, welche für die Erkennung des Peptidoglycans verantwortlich sind. Bekannt sind hier vor allem das SH-3- und das LysM-Motiv (Garcia *et al.*, 1988; Lopez *et al.*, 1992 und 1997). Beide Motive können einzeln oder wiederholt vorkommen. Auch eine Aneinanderreihung verschiedener Motive ist möglich. In Abbildung 2-6 ist die Struktur des Endolysins Ply-PSA des *Listeria monocytogenes*-Phagen PSA zu sehen, welcher eine Zink-Amidase als lytische Domäne, und zwei SH-3 Bindedomänen besitzt.

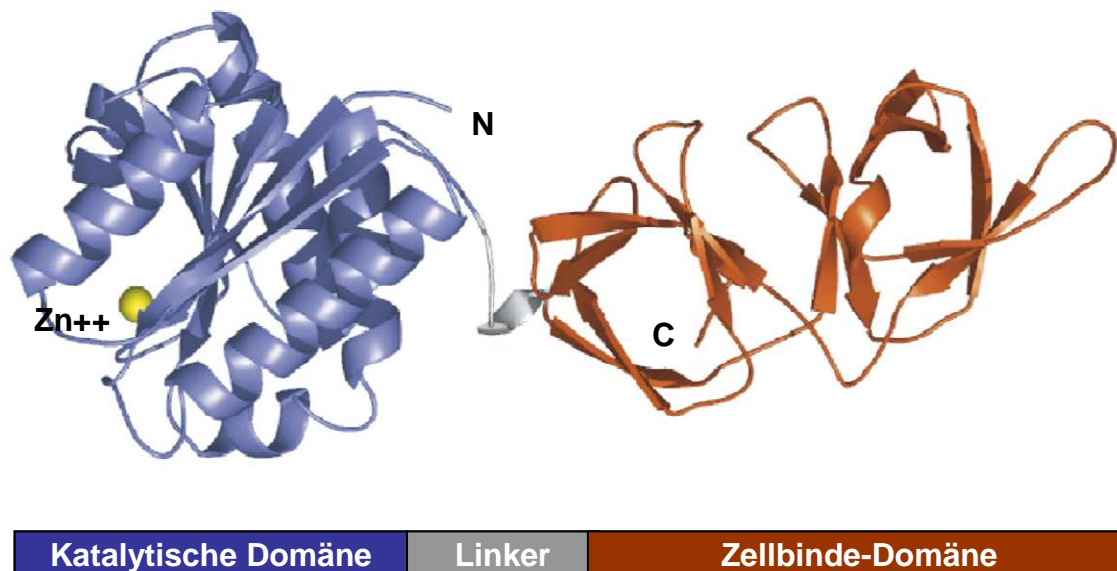


Abbildung 2-6

Röntgenkristallstruktur des Endolysins Ply-PSA des *Listeria monocytogenes*-Phagen PSA. Blau: EAD mit gebundenem Zink im aktiven Zentrum, Braun: zwei hintereinander liegende SH-3-Domänen (Korndörfer, *et al.*, 2006)

Die CBD der bakteriolytischen Enzyme bindet reversibel an die Lipoteichonsäuren oder das Peptidoglycan der Zellwand, was zur Ausrichtung der EAD in die Nähe des Substrates führt. Durch die Einordnung des Substrates in die Bindungsfurche der EAD, werden die Aminosäuren des aktiven Zentrums, meist Glutamat oder Aspartat in eine Position gebracht, in der sie eine hydrolytische Spaltung der Polysacharidbindung des Zuckerrückgrades beziehungsweise der Peptidbindung der Interpeptidbrücke katalysieren können (Perez-Dorado *et al.*, 2007). Dies ist in den Abbildungen 2-7 und 2-8 anhand des Endolysins CPL1 des *Streptococcus pneumoniae* Phagen CP1 dargestellt

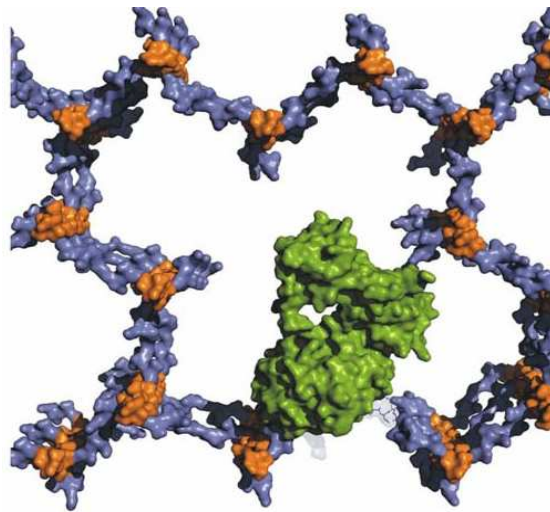


Abbildung 2-7

Modell der Bindung des Endolysins CPL1 an die Zellwand. (blau: Polysacharidrückgrad, orange: Interpeptidbrücken, grün: CPL1; Perez-Dorado *et al.*, 2007)

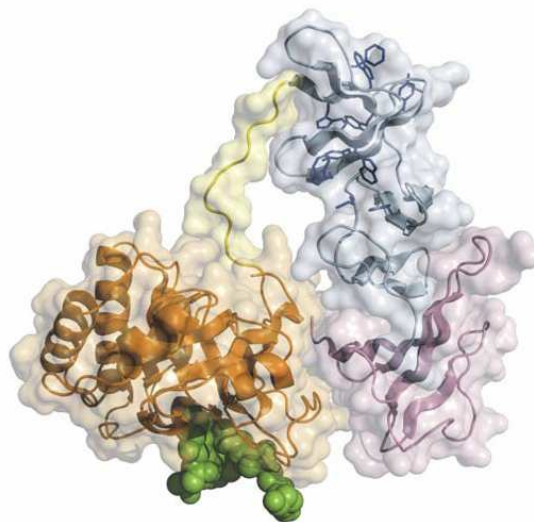


Abbildung 2-8

Röntgenkristallstruktur von CPL1 mit gebundenem Substrat (grün: gebundenes Polysacharid, orange: katalytische Domäne, blau und lila: SH-3-Motive der CBD, gelb: Linker; Perez-Dorado *et al.*, 2007)

Man unterscheidet zwischen vier verschiedenen EADs. Die Klassifizierung der EAD erfolgt nach ihrem Angriffsort in der Zellwand. Muramidasen und N-Acetyl-Glucosaminidasen schneiden zwischen Muraminsäure und N-Acetyl-Glucosamin, während Amidasen und Endopeptidasen die Peptidbindungen hydrolysieren (Young, 1992; Loessner, 2005) (Abbildung 2-9).

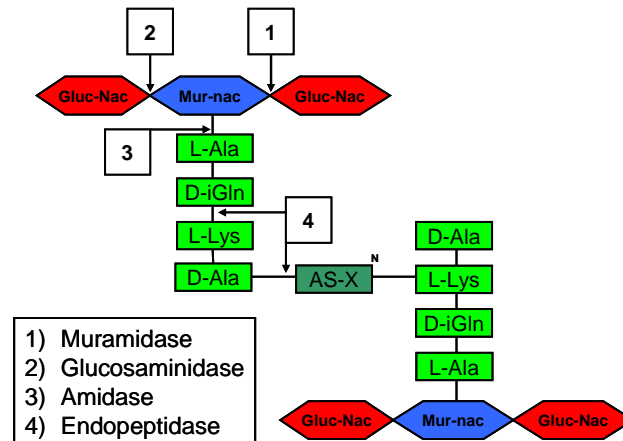


Abbildung 2-9

Schematische Darstellung der Angriffspunkte der verschiedenen EADs

Bis zum heutigen Zeitpunkt wurde noch kein Fall von Resistenzbildung gegen diese Art von Enzymen beobachtet (Borysowski *et al.*, 2006). Bei Versuchen mit wiederholter Lyse von Bakterien durch Endolysine, und erneuter Anzucht der überlebenden Zellen, stellte sich selbst nach 40 Zyklen keine Resistenz ein (Fischetti, 2008). Selbst längere Behandlung mit niedrigen Konzentrationen an Lysin in Flüssigkultur führte nicht zur Identifizierung resistenter Bakterien (Loeffler *et al.*, 2001; Schuch *et al.*, 2002).

Lytische Phagenproteine kommen somit als potentielle antimikrobielle Wirkstoffe in der Medizin in Frage. Dies bewies ein Versuch, bei dem Mäuse, welche eine Infektion der oberen Atemwege mit *Streptococcus pneumoniae* besaßen, erfolgreich mit dem Endolysin CPI-1 des Phagen CP-1 behandelt wurden (Loeffler *et al.*, 2007). Chimäre, gattungsübergreifend wirkende Endolysine gegen *Staphylococcus aureus* und *Streptococcus agalactiae* wurden 2006 zur Behandlung von Mastitis (Euterentzündung) bei Kälbern eingesetzt (Donovan *et al.*, 2006).

Zu Beginn der Arbeit war gegen Enterokokken nur das Endolysin „PlyV12“ bekannt, welches in der Lage war, auch Antibiotika-resistente Enterokokken (unter anderem VRE) zu lysieren (Fischetti *et al.*, 2004).

2.5 Ziele der Arbeit

In dieser Arbeit sollte eine mögliche Strategie zur Bekämpfung von Enterokokken-Infektionen untersucht werden. Dabei sollten Endolysine Anwendung finden, da sie in der Lage sind bakterielles Peptidoglycan nicht nur von innen, sondern auch von außen abzubauen (Donovan *et al.*, 2006; Sass & Bierbaum, 2007). Ein Vorteil der Anwendung von Endolysinen wäre deren Spezifität, da sie, im Gegensatz zu den meisten Antibiotika, die natürliche Bakterienflora des Menschen nicht zerstören (Rashel *et al.*, 2007; Fischetti, 2008;). Da die Ausbildung einer bakteriellen Resistenz nicht zu erwarten war, sollten die gefundenen Endolysine nach Optimierung der Aktivität und Stabilität medizinische Anwendung finden. Bei der Suche nach neuen Endolysinen sollte auf eine hohe Spezifität gegen die medizinisch relevanten Stämme *Enterococcus faecalis* und *Enterococcus faecium* geachtet werden, wobei im Hinblick auf die Wirtschaftlichkeit möglichst beide Stämme von einem Endolysin lysiert werden sollten. Dazu sollten zunächst Bakteriophagen gegen die genannten Enterokokken-Stämme aus Umweltproben isoliert und auf ihr Wirtsspektrum untersucht werden. Das Genom von Phagen mit geeigneten Wirtsspektren sollte partiell sequenziert und potentielle Endolysinsequenzen durch Homologiesuche in Sequenzdatenbanken identifiziert werden. Nach rekombinanter Expression in *Escherichia coli* sollte Lyseaktivität, Löslichkeit, Stabilität und Spezifität charakterisiert werden. Hierfür mussten geeignete Reinigungsprozeduren und Testverfahren gefunden, adaptiert oder entwickelt werden. Die Optimierung und Anpassung der Eigenschaften der gefundenen Endolysine an das Ziel der Arbeit sollte unter anderem durch *modul-shuffling* erfolgen. Dabei soll durch die Kombination verschiedener funktioneller Domänen ein Protein mit neuen Eigenschaften erzeugt werden. So sollte die Spezifität des Endolysins, durch Austauschen oder Ergänzen der CBD durch eine andere, verändert werden. Die enzymatische Aktivität sollte durch Austausch einer EAD durch eine aktivere EAD gesteigert werden. Die Kombination verschiedener EADs wäre ebenfalls möglich (Garcia *et al.*, 1990; Lopez *et al.*, 1992).

Am Ende der Arbeit sollte eine reproduzierbare Methode zur stabilen Expression und Reinigung des optimierten Endolysins stehen. Fernziel wäre ein Protein, welches aufgrund seiner Eigenschaften als therapeutischer Wirkstoff eingesetzt werden könnte.

3 Material

3.1 Bakterienstämme

3.1.1 Teststämme

Folgende Bakterienstämme wurden für die Isolierung der Bakteriophagen (4.1.3), der Testung ihrer Wirtsspezifität (4.1.6) und die Charakterisierung der gefundenen Endolysine benötigt (4.5.2). Alle Teststämme waren Teil der Profos Culture Collection (ProCC)

Tabelle 3-1

Tabellarische Übersicht über die verwendeten Teststämme

ProCC-Nr.	Stamm	Quelle
17	<i>Enterococcus faecalis</i>	Prof. Stetter (Uni Regensburg)
25	<i>Salmonella typhimurium</i> DB7136	Uniklinikum Regensburg
310	<i>Bacillus subtilis</i>	DSMZ 10T
879	<i>Enterococcus durans</i>	Eigenisolat Profos
880	<i>Enterococcus faecium</i>	Uniklinikum Regensburg
931	<i>Escherichia coli</i> JM109	Promega
1176	<i>Enterococcus faecalis</i>	ATCC 19433
1177	<i>Enterococcus faecium</i>	ATCC 20477
1180	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	Eigenisolat Profos
1181	<i>Lactobacillus casei</i>	ATCC 334
1185	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	Eigenisolat Profos
1193	<i>Streptococcus salivarius</i>	DSMZ 20560
1504	<i>Enterococcus faecalis</i>	Uniklinikum Regensburg
1505	<i>Enterococcus faecalis</i>	Uniklinikum Regensburg
1506	<i>Enterococcus faecium</i>	Uniklinikum Regensburg
1507	<i>Enterococcus durans</i>	Eigenisolat Profos
1508	<i>Enterococcus faecalis</i>	Uniklinikum Regensburg
1513	<i>Staphylococcus aureus</i>	Uniklinikum Regensburg
1547	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	DSMZ 1798
1548	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	DSMZ 20228
1550	<i>Staphylococcus aureus</i>	DSMZ 20231
1552	<i>Enterococcus faecalis</i>	DSMZ 2570
1553	<i>Enterococcus faecium</i>	DSMZ 2146
1563	<i>Enterococcus faecium</i>	Uniklinikum Regensburg
1564	<i>Enterococcus faecium</i>	Uniklinikum Regensburg
1565	<i>Enterococcus faecium</i>	Uniklinikum Regensburg
1566	<i>Enterococcus faecalis</i>	Uniklinikum Regensburg
1567	<i>Enterococcus faecalis</i>	Uniklinikum Regensburg
1568	<i>Enterococcus faecium</i>	Uniklinikum Regensburg
1569	<i>Enterococcus faecalis</i>	Uniklinikum Regensburg
1570	<i>Enterococcus faecium</i>	Uniklinikum Regensburg
1571	<i>Enterococcus faecalis</i>	Uniklinikum Regensburg

ProCC-Nr.	Stamm	Quelle
1572	<i>Enterococcus faecalis</i>	Uniklinikum Regensburg
1578	<i>Enterococcus faecalis</i>	Uniklinikum Regensburg
1579	<i>Bacillus cereus</i>	DSMZ 345
1583	<i>Lactobacillus plantarum</i>	DSMZ 2601
1584	<i>Lactobacillus plantarum</i>	DSMZ 20174
1601	<i>Carnobakterium gallinarum</i>	DSMZ 4847
1603	<i>Streptococcus mutans</i>	DSMZ 20523
1604	<i>Carnobakterium divergens</i>	DSMZ 20589
1606	<i>Enterococcus casseliflavus</i>	DSMZ 20680
1607	<i>Enterococcus durans</i>	DSMZ 20633
1634	<i>Enterococcus faecium</i>	RKI, Wernigerode
1798	<i>Streptococcus mutans</i>	DSMZ 20561
1800	<i>Streptococcus mutans</i>	DSMZ 20727
2465	<i>Enterococcus faecalis</i> V583	ATCC 700802

3.1.2 *E. coli* Klonierungs- und Expressionsstämme

Im Verlauf der Arbeit wurden *E. coli* Stämme mit T5- und T7-Expressionssystem verwendet. Das T7 System bedient sich der T7-RNA Polymerase, welche eine fünffach höhere Aktivität als die *E. coli* RNA Polymerase hat (Studier *et al.*, 1990). Das auf dem Chromosom des Expressionsstammes gelegene Gen für diese Polymerase steht unter Kontrolle des lacUV5-Operators. Dieser enthält eine Bindestelle für einen Repressor. Das Gen für den Repressor liegt auf einem Plasmid und wird konstitutiv exprimiert. Die Expression der T7-RNA-Polymerase wird durch Zugabe von Isopropyl- β -DThiogalaktopyranosid (IPTG) induziert, welches an den Repressor bindet und dessen Wechselwirkung mit dem lacUV5-Operator verhindert. Die T7-RNA-Polymerase kann nun an den T7-Promotor auf einem Expressionsplasmid binden und mit der Expression eines rekombinant klonierten Gens auf dem Expressionsplasmid beginnen.

Das T5-Expressionssystem funktioniert identisch, wobei allerdings die T5-RNA-Polymerase des Phagen T5 verwendet wird.

3.1.2.1 Stämme mit T7-Expressionssystem

HMS174 (DE3) (EMD-Biosciences, Darmstadt)

F⁻ *recA1 hsdR* ($r_{K12}^- m_{K12}^+$) Rif^r λ (DE3)

Rifampicin-Resistenz

BL21 (DE3) (EMD-Biosciences, Darmstadt)

F⁻ *ompT hsdS_B*($r_B^- m_B^-$) *gal dcm* (DE3)

BL21 Codon Plus (DE3) RIL (Stratagene, La Jolla, USA)

B F⁻ *ompT hsdS*($r_B^- m_B^-$) *dcm*⁺ Tet^r *gal* λ (DE3) *endA Hte* [*argU ileY leuW Cam*^r]

Tetracyclin-Resistenz

Bei BL21 CodonPlus (DE3) RIL Zellen werden Gene von einem zusätzlichen Plasmid coexprimiert, welche für in *E. coli* seltene tRNAs kodieren (*argU* (AGA, AGG); *ileY* (AUA); *leuW* (CUA)). Das Plasmid enthält zusätzlich das Gen für die Chloramphenicolacetyltransferase, welches die Resistenz gegen Chloramphenicol vermittelt.

Origami B (DE3) (EMD-Biosciences, Darmstadt)

F⁻ *ompT hsdS_B*($r_B^- m_B^-$) *gal dcm lacY1 aphC* (DE3) *gor522::Tn10 trxB* (Kan^r Tet^r)

Kanamycin- und Tetracyclin-Resistenz

In Origami-Stämmen sind die Thioredoxin Reduktase und die Glutathion Reduktase mutiert. Deshalb kommt es zu einer gesteigerten Bildung von Disulfidbrücken.

3.1.2.2 Stämme mit T5 Expressionssystem

M15

nalS, strS, rifS, thi-, lac-, ara+, gal+, mtl-, recA+, uvr+, lon+

3.1.2.3 Stämme zur Amplifikation von Plasmiden

JM109 (New England Biolabs)

F⁻ *traD36 proA⁺B⁺ lac^f Δ(lacZ)M15/ Δ(lac-proAB) glnV44 e14 gyrA96 recA1 relA1 endA1 thi hsdR17*

Nova Blue singles (EMD-Biosciences, Darmstadt)

endA1 hsdR17 ($r_{K12}^- m_{K12}^+$) *supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lacF*[*proA⁺B⁺lac^fΔM15::Tn10*] (Tet^r)

Tetracyclin-Resistenz

Nova Blue Singles werden zum Blau-Weiß-Screening verwendet.

3.2 Expressionsvektoren

T7-Expressionsvektoren:	pET14b, pET21a (EMD-Biosciences, Darmstadt)
T5-Expressionsvektoren:	pQE-60 (Qiagen, Hilden)
Vektoren für Blau-Weiß-Screening:	pSTblue (EMD-Biosciences, Darmstadt)

3.3 Enzyme

Produkt	Hersteller
Restriktionsendonukleasen	New England Biolabs GmbH (Frankfurt am Main)
T4-Ligase	New England Biolabs GmbH (Frankfurt am Main)
Phusion-Polymerase	New England Biolabs GmbH (Frankfurt am Main)
Ex-Taq-Polymerase	Lonza (Basel, Schweiz)
Phire-Polymerase	Biozym (Hessisch Oldendorf)
Calf intestine Phosphatase (CIP)	New England Biolabs GmbH (Frankfurt am Main)
DNase 1	Biozym (Hessisch Oldendorf)
Proteinase K	Applichem GmbH (Darmstadt)
Streptactin-horseradish peroxidase (HRP)	IBA GmbH (Göttingen)

3.4 Oligonukleotide

Folgende Primer wurden für die Klonierung der Endolysine, sowie für deren Modifikation im Rahmen des modul shufflings benötigt. Alle Primer wurden bei der Firma Eurofins-MWG (Ebersberg, Deutschland) bestellt.

Primer für die Klonierung von EPhL-20 und Derivaten:

EPH20for(-)T	5'-TTAATAGAGCTCCATATGATGAAGTTAAAAGGTATTTTATTTGGT-3'
EPH20rev(-)T	5'-GCCATAGAGCTCGGATCCTTATACTAATGTACCCCA-3'
EPH20K_sal_for	5'-TTAATAGTCGACATGACAGCTAATGCATATGAA-3'
EPH20K_Bam_rev	5'-TTAATAGGATCCTTATACTAATGTACCCACGTG-3'
EPH20CBD1for	5'-TTAATACCATGGGAGCTCATGGTAAAACCAACCAAGCAAA-3'
EPH20CBD1rev	5'-GTTATAGGATCCCTACTTAGTGTAAAGGTCCTCTAA-3'
EPH20CBD2for	5'-TTAATACCATGGGAGCTCATGTCCCCACCAAAACCAAGC-3'

Primer für die Klonierung von EPh-25 und Derivaten:

5`-EPH25Amifor	5'-TTAATACCATGGGAGCTCATGGCTTATAAAGTAGAAAGACGAATTAGA-3'
5`-EPH25CBDfor	5'-TTAATACCATGGGAGCTCATGGTGTCCCATGATAAAGCTATC-3'
3`-EPH25Amirev	5'-TAGGATCCTTATAGCGTGAAGTAGAATTCATTGAA-3'

Primer für die Klonierung von K-1:

5'-Delta1nhefor 5'-TAGCTAGCATGGCTTATAAAGTAGAAAGACGAATTAGA-3'
3'-EPH25sacrev 5'-ATAGAGCTCTAGCGTGAAGTAGAATTCAATGAA-3'
5'-EPh20CBDsacfor 5'-ATAGAGCTCATGGTAAAACCAACACCAAGCAAA-3'
3'-EPh20Bamrev 5'-ATAGGATCCTTATACTAATGTACCCCA-3'

3.5 Größenstandards

Zur Abschätzung der Größe von DNA-Proben bei Agarosegelen (4.2.8) und Proteinproben bei SDS-Polyacrylamidgelen (4.4.1) wurden Standards der Firma Fermentas (St. Leon-Rot) verwendet.

Protein-Größenstandards:

Unstained Protein Molecular Weight Marker (Cat.-Nr: SM0431)

Prestained Protein Molecular Weight Marker (Cat.-Nr: SM0441)

DNA-Größenstandards

Gene Ruler 1kb-DNA-Ladder: (Cat.-Nr: SM0311)

Gene Ruler 100bp-DNA-Ladder: (Cat.-Nr: SM0241)

3.6 Verwendete Chemikalien

Alle für diese Arbeit benötigten Chemikalien besaßen den höchsten verfügbaren Reinheitsgrad. Die verwendeten Chemikalien wurden von folgenden Firmen bezogen:

Applichem	Darmstadt	www.applichem.de
Becton Dickinson GmbH	Heidelberg	www.bd.com
Biozym Scientific GmbH	Hess	www.biozym.com
Carl Roth GmbH & Co. KG	Karlsruhe	www.carl-roth.de
GE Healthcare	Freiburg	www.amershambiociences.com
Gerbu Biochemicals GmbH	Gaiberg	www.gerbu.de
Merck KGaA	Darmstadt	www.merck.de
Oxoid	Wesel	www.oxoid.com
Qiagen	Hilden	www.qiagen.com
Roche Diagnostics GmbH	Mannheim	www.roche.de
Serva	Heidelberg	www.serva.de
Sigma Aldrich	Steinheim	www.sigmaaldrich.de
Fermentas	St. Leon-Rot	www.fermentas.de

3.7 Antibiotika und Medienzusätze

Die Stammlösungen wurden gegebenenfalls sterilfiltriert, aliquotiert und bei -20°C aufbewahrt. Alle Zusätze wurden den Medien im Verhältnis 1:1000 zugesetzt.

Stammlösung	Zusammensetzung
Ampicillin Stammlösung	100 mg/ml in H ₂ O bidest.
Chloramphenicol Stammlösung	34 mg/ml in Ethanol p.a.
Kanamycin Stammlösung	25 mg/ml in H ₂ O bidest.
Rifampicin Stammlösung	10 mg/ml in Methanol p.a.
Tetracyclin Stammlösung	100 mg/ml in Ethanol p.a.
IPTG Stammlösung:	238 mg/ml in H ₂ O bidest.
X-Gal Stammlösung:	20 mg/ml in H ₂ O bidest.

3.8 Puffer und Lösungen

Alle verwendeten Puffer wurden mit Millipore-H₂O hergestellt und gegebenenfalls autoklaviert bzw. sterilfiltriert.

Puffer	Zusammensetzung
4-Chlor-1-Naphtol Substratlösung	0,086 g/l 4-Chlor-1-Naphthol 6,06 g/l Tris-HCl 11,68 g/l NaCl 17% (v/v) Methanol
4x Lower SDS-Puffer (pH 8,0)	181,17 g/l Tris-HCl 0,8% (w/v) SDS
4x Upper SDS-Puffer (pH 6,8)	60,57 g/l Tris-HCl 0,8% (w/v) SDS
ABTS-Reaktionslösung (pH 5,0)	17,3 g/l Zitronensäure 32,07 g/l Na ₂ HPO ₄ 0,1% (w/v) ABTS 0,005% (v/v) H ₂ O ₂

Material

Puffer	Zusammensetzung
AP-Färbelösung (pH 9,5)	12,41 g/l Tris-HCL 5,84 g/l NaCl 0,48 g/l MgCl ₂ 0,225 g/l 5-Brom-4-chlor-3-indolyolphosphat 0,245 g/l Nitroblau-Tetrazoliumchlorid
Fairbanks A	25% (v/v) Isopropanol 10% (v/v) Essigsäure
Fairbanks D	10% (v/v) Essigsäure
<i>Inclusion body</i> -Waschpuffer (pH 8,0)	0,6 g/l Tris-HCl
Lysepuffer (pH 7,4)	0,35 g/l CaCl ₂ 0,19 g/l MgCl ₂ 10 g/l DNase I gelöst in ½ PBS
Ni-NTA-Puffer A (pH 7,5)	3,03 g/l Tris-HCl 17,54 g/l NaCl 1,36 g/l Imidazol
Ni-NTA-Puffer E (pH 7,5)	3,03 g/l Tris-HCl 17,54 g/l NaCl 34,04 g/l Imidazol
PBS Puffer (pH 7,4)	1,38 g/l Na ₂ HPO ₄ 0,31 g/l NaH ₂ PO ₄ 8,76 g/l NaCl
Rückfaltungspuffer	3,03 g/l Tris-HCl (pH 7,5) 52,27 g/l L-Arginin 5,16 g/l Natriumcitrat 0,028 g/l ZnSO ₄ 1,54 g/l DTE

Material

Puffer	Zusammensetzung
SDS-Auftragspuffer (pH 8,0)	0,61 g/l Tris-HCl 10% (v/v) Glycerin 2,5% (v/v) β -Mercaptoethanol 2% (w/v) SDS 0,6% (v/v) Bromphenolblau (10 g/ml) 0,29 g/l EDTA
SDS-Laufpuffer (pH 8,0)	3,03 g/l Tris-HCl 1,5% (v/v) Glycerin 1% (w/v) SDS
Solubilisierungspuffer (pH 8,0)	480,48 g/l Harnstoff 3,03 g/l Tris-HCl 5,16 g/l Natriumcitrat 0,028 g/l ZnSO_4 1,54 g/l DTE
TBE Puffer (pH 8,0)	10,78 g/l Tris-HCl 5,5 g/l Borsäure 0,74 g/l EDTA
TBS Puffer (pH-7,4)	2,42 g/l Tris-HCl 7,04 g/l NaCl
TP1-Puffer (pH 5,8)	12 g/l RbCl 9,9 g/l MnCl_2 2,94 g/l Kaliumacetat 1,5 g/l CaCl_2 13% (v/v) Glycerin
TP2-Puffer (pH 6,8)	2,1 g/l MOPS 1,2 g/l RbCl 11 g/l $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ 13% (v/v) Glycerin
Westernblottransferpuffer (pH 9,0)	19,07 g/l Natriumborat 10% (v/v) Methanol

Material

Puffer	Zusammensetzung
Zellaufschlusspuffer (pH 8,0)	7,04 g/l NaCl

3.9 Kits

Produkt	Hersteller
<i>GenomiPhi DNA Amplification Kit</i>	GE Healthcare, München
<i>pSTBlue-1 Perfectly Blunt Cloning Kit</i>	Novagen, Darmstadt
<i>QIAquick Gel Extraction Kit</i>	Qiagen GmbH, Hilden
<i>QIAquick PCR Purification Kit</i>	Qiagen GmbH, Hilden
<i>QIAquick Spin Miniprep Kit</i>	Qiagen GmbH, Hilden
<i>Wizard[®] Lambda Preps DNA Purification System</i>	Promega, Madison, USA

3.10 Verbrauchsmaterial

Produkt	Hersteller
96 Well Mikrotiterplatte	Nunc GmbH, Wiesbaden
96 Deepwellplatte 2 ml	Nunc GmbH, Wiesbaden
96 Well Rigid PCR Ultra Plate 0,2 µl	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
AcrodiscSyringe Filter 0,2 µm und 0,45 µm	Pall Gelman Laboratory, Dreieich
Cryobank [™]	Mast Diagnostics, Reinfeld
Dialysemembran Zellutrans (versch.)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Omnifix Einmalspritzen (versch.)	VWR, Melsungen
Parafilm	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Pasteurpipetten	Hirschmann, Eberstadt
Petrischalen	Greiner Bio-one, Frickenhausen
Pipettenspitzen 1000 und 200 und 20 µl	Sarstedt, Nümbrecht
Pipetten "Serological Pipet" 5, 10, 25 ml	BD Falcon, Heidelberg
Polypropylen Round Bottom Tubes 14 ml	BD Falcon, Heidelberg
Reaktionsgefäße 1,5 und 2 ml	Eppendorf, Hamburg
UV/VIS- Präzisionsküvette 1 cm	Hellma, Mühlheim
Zentrifugenröhrchen 15 ml und 50 ml	Corning Inc., Corning, USA

3.11 Geräte

Produkt	Hersteller
Agarosegelelektrophoresekammern	PeqLab Biotechnologie, Erlangen
Analysenwaage Kern 770	Kern, Balingen
Autoklav Varioklav 135 S	H+P Labortechnik, Oberschleißheim
Äkta FPLC	Amersham Biosciences, Freiburg
Äkta Purifier	Amersham Biosciences, Freiburg
ELISA Reader Sunrise	Tecan, Maennedorf (CH)
Fluoreszenz-Spektrometer Fluoromax-3	Horiba Jobin Yvon, Unterhaching
G-Storm Cycler	G-Storm, Essex (UK)
Horizontalschüttler	GFL, Burgwedel
Hochdruckhomogenisator – Fluidizer	Microfluidics, Newton MA (USA)
Image Master VDS mit Software Liscomp	GE Healthcare, München
Inkubatoren	Myrton, Heiligenstadt
Mastercycler Gradient	Eppendorf, Hamburg
Metallblockthermostat Block Heater	Stuart Scientific, Watford Herts (UK)
Mikroliterpipetten	Eppendorf, Hamburg
Multifuge 3 S-R	Heraeus Kendro, Hanau
Reinstwasseranlage	Millipore, Billerica (USA)
Rotor SS334	Kendro, Sorvall, Hanau
Rotor SLA1500	Kendro, Sorvall, Hanau
Rotor SLC4000	Kendro, Sorvall, Hanau
SDS-Gelapparatur Mighty Small E250/260	Invitrogen, Carlsbad (USA)
Spannungsquellen	Amersham Pharmacia Biotech,
Standzentrifuge RC5C	Kendro Sorvall, Hanau
Sterilbank Herasafe	Heraeus, Nürnberg
Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg
Tischzentrifuge Biofuge Pico	Heraeus Kendro, Hanau
Tischzentrifuge Biofuge Fresco	Heraeus Kendro, Hanau
Ultra Turrax T18 basic	IKA Labortechnik, Staufen
Ultraschall Homogenisator	Bandelin Electronic, Berlin
Zellphotometer Ultrospec10	Amersham Biosciences, Freiburg
UV/VIS-Spektrometer V550 und V650	Jasco, Tokyo (Japan)
Vortex-Genie®	Scientific Industries Inc, Bohemia (USA)

3.12 Software und Online-Tools

Programm	Hersteller/ Internetadresse
BLAST	(http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi)
Chromas	Version 1.45, McCarthy 1996-1998 (www.technelysium.com.au)
ClustalW2	(http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html)
DataMax	Version 2.20 (Instruments SA, Inc.)
DLP-SVM	(http://www.tuat.ac.jp/~domserv/cgi-bin/DLP-SVM.cgi)
ExpASy	Proteomics server (http://www.expasy.ch/) mit tools zur Sequenzübersetzung (<i>translate</i>), Proteaseschnittstellenerkennung (<i>peptide cutter</i>), Ermittlung von Protein-Eigenschaften (<i>protparam</i>)
GOR	(http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsagor4.html)
NEBcutter2	(http://tools.neb.com/NEBcutter2/index.php)
Rev Complement	(http://www.bioinformatics.org/sms/rev_comp.html)
Spectra Manager	Version 2.06.01 (Jasco Corp.)
Swiss PDB Viewer	Version 3.70b (http://au.expasy.org/spdbv/)
Unicorn	Version 5.11 (http://www.gehealthcare.com/unicorn)

4 Methoden

4.1 Mikrobiologische Methoden

4.1.1 Anzucht und Erhaltung von Bakterien

Die Anzucht von *E. coli*-Stämmen erfolgte, wenn nicht anders angegeben, bei 37°C in LB-Medium, dem bei Bedarf ein selektionierendes Antibiotikum zugesetzt wurde (Sambrook, *et al.*, 1989). Alle weiteren Bakterienstämme wurden in BHI-Medium bei 37°C angezogen. Die Vereinzelnung von Kulturen erfolgte auf 1,5% LB-Agar-Platten. Zur Konservierung von Bakterien wurden 700 µl einer stationären Kultur mit 700 µl 20% (v/v) Glycerin in H₂O bidest versetzt, und nach kurzer Inkubation bei Raumtemperatur in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung erfolgte bei -80°C.

LB-Medium (pH 7,5)	5 g/l	Hefeextrakt
	10 g/l	Trypton
	10 g/l	NaCl
SOB-Medium (pH 7,5)	5 g/l	Hefeextrakt
	20 g/l	Trypton
	0,6 g/l	NaCl
	0,5 g/l	KCL
Peptonwasser (Fertigmedium)	Herstellung nach Angaben von Oxoid, Wesel.	
BHI (Fertigmedium)	Herstellung nach Angaben von Oxoid, Wesel.	
Müller Hinton II (Fertigmedium)	Herstellung nach Angaben von Merck, Darmstadt	

Für die Herstellung von Agarplatten wurde das entsprechende Medium mit 1,5% (w/v) Agar versetzt und anschließend autoklaviert. Topagar wurde durch Zugabe von 0,7% Agar und anschließendes Autoklavieren hergestellt.

4.1.2 Sammlung von Umweltproben

Die Umweltproben, aus denen später die Phagen isoliert werden sollen, wurden aus den Zuläufen von Kläranlagen gezogen. Dazu wurden etwa 50 ml des ungefilterten Zulaufs der Kläranlagen in 50 ml Gefäße abgefüllt und ins Labor zur weiteren Verwendung überführt.

4.1.3 Isolierung von Phagen aus Umweltproben

Die Isolierung der Phagen aus Umweltproben erfolgte mit einer modifizierten Methode von Felix Hubert d'Herelle (d'Herelle *et al.*, 1919). Um lytische Bakteriophagen aus Umweltproben zu gewinnen wurden diese zuerst mittels eines 0,45 µm Filters sterilfiltriert. Das Filtrat wurde 1:1 mit 2fach LB-Medium (4.1.1) versetzt und anschließend entweder mit *Enterococcus faecalis* und *Enterococcus faecium* (1% des Gesamtvolumens, Zellen in der exponentiellen Phase) beimpft. Danach erfolgte eine schüttelnde Inkubation über Nacht bei 37°C. Nach 12 Stunden wurden die Enterokokken 20 Minuten mit 3% Chloroform behandelt. Die dadurch abgetöteten Zellen wurden durch Zentrifugation (Multifuge 3 SR, 4500 rpm, 30 min, 4°C) vom Überstand getrennt. Der Überstand wurde sterilfiltriert (Porengröße 0,2 µm). Dieses Lysat diente als Ausgangsmaterial für die Vereinzelung und Isolierung der Bakteriophagen. Hierzu wurden 300 µl einer stationären Wirtskultur mit 200 µl Lysat und 3 ml LB-Topagar (4.1.1) vermischt und auf LB-Agarplatten ausgegossen (Toplayer). Nach Verfestigung des Topagars wurden die Platten über Nacht bei 37°C inkubiert.

Durch Lyse der Wirtszellen durch die Phagen entstehen so genannte Plaques im Bakterienrasen. Diese können von unterschiedlicher Trübung, Form und Größe sein. Die Größe und das Aussehen wurden dokumentiert und Plaques unterschiedlicher Morphologie mit sterilen Pasteurpipetten ausgestochen. Während einer einstündigen Inkubation in 200 µl LB-Medium diffundierten die Phagen aus dem Agar. Das erhaltene „Phagendiffundat“ wurde sterilfiltriert (Porengröße 0,2 µm). Anschließend wurden 300 µl einer stationären Wirtskultur mit 10 µl, 1 µl bzw. 1 µl einer 1:500 Verdünnung des Diffundats in LB-Medium zusammen mit 3 ml LB-Topagar auf Agarplatten gegossen. Die Verdünnungsreihe der Phagenlösung war nötig, um Einzelplaques im Bakterienrasen zu erhalten. Nach Inkubation bei 37°C über Nacht wurden erneut Plaques gestochen. Um eine Phagenreinkultur zu erhalten wurde

dieser Vorgang mindestens dreimal wiederholt. Jetzt sollten nur noch Plaques mit einheitlicher Morphologie erkennbar sein.

4.1.4 Bestimmung des Phagentiters

Um Ausreichend Phagen-DNA zu gewinnen, war es nötig 10 ml Lysat mit einem Titer von mindestens 10^8 pfu/ml (*Plaque forming units*) herzustellen. Dazu wurden 10 ml LB-Medium, 300 μ l einer stationären Wirtskultur und 1 μ l Phagendiffundat über Nacht bei 37°C schüttelnd inkubiert. Anschließend wurde das Lysat abzentrifugiert (Multifuge 3 SR, 4500rpm, 30min) und mit einem Filter mit 0,45 μ m Porengröße sterilfiltriert. Nun wurde in einer 96well Platte eine serielle Verdünnung des Lysats in SM-Puffer bis zu einem Verdünnungsfaktor von 10^{-8} angelegt. Jeweils 5 μ l der einzelnen Verdünnungsstufen wurden dann auf einen Toplayer des entsprechenden Wirtes aufgetüpfelt. Bei der höchsten Verdünnungsstufe, bei der noch Einzelplaques zu sehen waren, wurden diese ausgezählt. Unter Berücksichtigung der Verdünnung konnte man nun die pfu/ml des Phagenlysats angeben.

4.1.5 Konservierung der Bakteriophagen

Bakteriophagen wurden für die Arbeitsbank als sterilfiltriertes Phagenlysate mit einem Titer $>10^7$ pfu/ml bei 4°C gelagert. Zur Langzeitlagerung wurde ein sterilfiltriertes Phagenlysate mit einem Titer von mindestens 10^7 pfu/ml 1:1 mit Glycerin (87%) gemischt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung erfolgte bei -80°C.

4.1.6 Wirtsspektrum von Bakteriophagen

Für die Erstellung des Wirtsspektrums wurden Agarplatten mit einem Toplayer relevanter Organismenstämme hergestellt. Dazu wurden die Teststämme bei 37°C über Nacht in BHI-Medium angezogen. 1 ml der stationären Bakterienkulturen wurde zusammen mit 3 ml LB-Topagar auf LB-Agar-Platten ausgegossen. Nach Erstarren des Topagars konnten die Platten für die Bestimmung des Wirtsspektrums verwendet werden. Es wurden Platten mit verschiedenen Isolaten des Wirtsstammes, verschiedenen Stämmen der gleichen Gattung und anderen medizinisch relevanten Bakteriengattungen hergestellt.

Um möglichst viele Phagen auf einer Agarplatte testen zu können, wurden die verschiedenen Phagenlysate in einer sterilen Teflon-Matrize vorgelegt und mit einem

sterilen Metallstempel auf die Topagarplatte aufgetüpfelt. Der Stempel wurde vor jedem Übertrag mit 100% Ethanol abgeflammt und kurz auf einer sterilen Agarplatte abgekühlt. Nachdem die Tropfen (3 bis 5 µl) in den Topagar eindiffundiert waren, wurde die Platte über Nacht bei 37°C inkubiert. Phagen, die spezifisch für einen bestimmten Wirt waren, erzeugten Plaques auf dem Bakterienrasen.

4.1.7 Herstellung kompetenter *E. coli*-Zellen

Die Herstellung kompetenter Zellen erfolgte nach der Methode von Chung et al. (1989). Zur Herstellung kompetenter *E. coli*-Zellen wurden 400 ml SOB-Medium mit 10 mM MgSO₄ und 10 mM MgCl₂ versetzt und mit 2 ml einer frischen Übernachtskultur beimpft. Die Anzucht erfolgte bei 37°C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,3. Die Zellsuspension wurde in vorgekühlte SLA-1500 Zentrifugenbecher verteilt und 15 min auf Eis inkubiert. Nach der Zellernte durch Zentrifugation (Rotor SLA1500, 4500 rpm, 10 min, 4°C) folgte die Resuspension des Zellpellets in 64 ml eiskaltem Puffer TP1. Nach Inkubation auf Eis für 90 min sowie einem erneuten Zentrifugationsschritt wurde das Pellet in 16 ml eiskaltem Puffer TP2 aufgenommen. Aliquots á 300 µl wurden sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren und anschliessend bei -80°C gelagert. Zur Qualitätskontrolle der kompetenten Zellen wurde eine Kontroll-Transformation durchgeführt. Hierfür wurden 10 ng Plasmid-DNA zu 150 µl kompetenten Zellen gegeben und 30 min auf Eis inkubiert. Nach dem Hitzeschock bei 42°C für 90 sec und weiterer Inkubation auf Eis für 90 sec erfolgte die Zugabe von 1 ml LB-Medium. Der Ansatz wurde 60 min bei 37°C langsam schüttelnd inkubiert. Nun wurden je 100 µl einer Verdünnungsreihe (1:1000, 1:100, 1:10 - entspricht 0,001 ng, 0,01 ng bzw. 0,1 ng DNA) und des unverdünnten Ansatzes (entspricht 1 ng DNA) auf LB-Platten mit Antibiotikum (entsprechend der Plasmid-codierten Resistenz) ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Zur Auswertung wurden die Transformanden gezählt und auf Kolonien / µg DNA normiert. Ein guter Transformationswert liegt bei über 5x10⁷ – 1x10⁸ Kolonien / µg DNA.

4.1.8 Transformation von DNA in *E. coli*

Zur Transformation wurden 150 µl kompetente Zellen auf Eis aufgetaut, zu 10 µl der Plasmid-Lösung (ca. 5 µg/ml DNA) gegeben und 30 min auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock (90 sec, 42°C) und weiteren 2 min auf Eis folgte die Zugabe von 1 ml sterilem LB-Medium. Nach Inkubation für 30 min bei 37°C und 600 rpm wurden die Zellen auf Agarplatten mit Selektivmedium ausgebracht und über Nacht bei 37°C

inkubiert. Durch eine Kolonie-PCR (4.2.4.1) und DNA-Sequenzierung wurden die erhaltenen Transformanten überprüft (Inoue *et al.*, 1990).

4.1.9 Rekombinante Proteinexpression in *E. coli*

Zur Expression von Proteinen wurden *E. coli*-Stämme (3.1.2) verwendet, die mit dem entsprechenden Plasmid transformiert (4.1.8) wurden. Die Anzucht erfolgte in sterilem LB-Medium (4.1.1). Zur Selektion auf den Expressionsstamm wurde das Medium mit Antibiotika versetzt. Die Endkonzentration der Antibiotika betrug für Ampicillin 100 µg/ml, für Rifampicin 10 µg/ml, für Kanamycin 25 µg/ml und für Chloramphenicol 34 µg/ml. Zur Anzucht im 5 l Erlenmeyerkolben wurden zwei Liter Medium 1:50 mit einer Übernachtskultur beimpft und bei 30°C bzw. 37°C schüttelnd inkubiert. Die Proteinexpression wurde bei einer OD₆₀₀ von 0,6 durch Zugabe von IPTG mit einer Endkonzentration von 1 mM induziert. Nach weiterer Inkubation für drei bis vier Stunden folgte die Zellernte durch Zentrifugation (Sorvall, Rotor SLC-4000, 5000 rpm, 30 min, 4°C). Das Zellpellet wurde in 40 ml Zellaufschlusspuffer (3.8) resuspendiert. Der Zellaufschluss erfolgte im Hochdruckhomogenisator bei 70 bar über 15 Zyklen. Lösliche und unlösliche Fraktion wurden durch Zentrifugation des Zellaufschlusses (Sorvall, Rotor SS34, 14000 rpm, 30 min, 4°C) getrennt. Die Analyse der löslichen und unlöslichen Bestandteile der Expression erfolgte per SDS-PAGE (4.4.1).

4.2 Molekularbiologische Methoden

4.2.1 Isolierung von DNA aus Bakteriophagen

Die DNA-Isolierung aus Phagen (Titer > 5 x 10⁸ pfu/ml) erfolgte mittels *Wizard[®] Lambda Preps DNA Purification System* (3.9). Die DNA Präparation erfolgte gemäß der Vorschrift des Herstellers.

4.2.2 Isolierung von Plasmid-DNA

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien mittels des *QIAquick Spin Miniprep Kit* (Qiagen, Hilden) basiert auf der Methode von Birnboim *et al.* (1979).

Eine Übernachtskultur von transformierten *E. coli* wurde in LB-Medium angezogen. Zur Selektion diente das Antibiotikum, dessen Resistenz auf dem transformierten Plasmid codiert war. Die Präparation von Plasmid-DNA erfolgte mit Hilfe des *QIAquick Spin Miniprep Kit* (Qiagen, Hilden) nach beiliegender Vorschrift des

Herstellers. Die Funktionsweise des Kits basiert auf der alkalischen Lyse der *E. coli* Zellen und der anschließenden Reinigung der Plasmid-DNA über eine Anionenaustauschersäule.

4.2.3 Unspezifische Amplifikation von DNA

Zur unspezifischen Amplifikation von Fragmenten linearer genomischer DNA wurde der *GenomiPhi DNA Amplification Kit* (3.9) verwendet. Dieser enthält die DNA Polymerase des Bakteriophagen Phi29 zur Amplifikation von einzel- oder doppelsträngiger DNA. Die *proofreading*-Aktivität der DNA-Polymerase gewährleistet eine geringe Fehlerquote. Als Primer wurden hexamere Oligonukleotide zufälliger Sequenz verwendet. Während der Synthese entstehen neue DNA-Einzelstränge unterschiedlicher Länge, an welche die Primer erneut binden können. Eine exponentielle Zunahme der DNA-Menge ist die Folge. Alle Ansätze erfolgten nach Herstellerprotokoll. Die Reaktion fand über Nacht bei 30°C statt.

4.2.4 Spezifische Amplifikation von DNA (PCR)

Die PCR ist eine *in vitro* Methode zur enzymatischen Amplifikation spezifischer DNA-Fragmente (Mullis & Faloona, 1987). Sie ermöglicht die selektive Vervielfachung des DNA-Templates in einem komplexen DNA-Gemisch. Die Reaktion basiert auf der Anlagerung (*Annealing*) und Verlängerung (*Extension*) zweier Oligonukleotid-Primer, die auf gegenüberliegenden Strängen in entgegengesetzter Richtung die Zielregion einer doppelsträngigen DNA flankieren. Die Analyse der PCR erfolgte über ein analytisches Agarosegel (4.2.8). Der Standard-PCR-Ansatz enthielt folgende Bestandteile:

forward-/ reverse-Primer (10 µM):	je 5 µl
dNTP-Mix (10 mM)	5 µl
5xPhusion-Taq Puffer	10 µl
Phusion-Taq-Polymerase	0,25 µl
DNA-Matrize	2 µl
DMSO	2 µl
H ₂ O	20,75 µl

Als Standard-PCR-Programm wurde ein so genanntes *touchdown*-Programm verwendet. Dabei beginnt man mit einer *Annealing*-Temperatur, welche 10°C höher liegt, als die des Oligonukleotid-Primers. In den ersten zehn Amplifikationszyklen

wurde die Temperatur pro Zyklus um 1°C gesenkt. Dies erhöht die Spezifität des Primers gegenüber der DNA-Matrize. Unspezifische Amplifikationen sollten durch diese Methode unterdrückt werden. Falls nicht anders beschrieben, wurde folgendes PCR-Programm genutzt:

Initiale Denaturierung	300 s	98°C
<i>touchdown</i> -Zyklus (10 Zyklen):		
Denaturierung	30 s	98°C
<i>Annealing</i>	30 s	65°C (-1°C/Zyklus)
Elongation	120 s	72°C
Amplifikationszyklus (25 Zyklen):		
Denaturierung	30 s	98°C
<i>Annealing</i>	30 s	55°C
Elongation	120 s	72°C
finale Elongation	300 s	72°C
Stop	kein Zeitlimit	10°C

4.2.4.1 Kolonie-PCR

Bei der Kolonie-PCR handelt es sich um einen Standard-PCR-Ansatz, bei dem statt isolierter DNA, Zellen von einer Agarplatte in den Ansatz überführt werden. Der initiale Denaturierungsschritt führt zum Zellaufschluss, wodurch die Plasmid-DNA frei wird. Als Primer wurden Oligonukleotide gewählt, welche an die Plasmid-codierte Promotor- und Terminatorregion *annealen*. Die Analyse der PCR erfolgte über ein analytisches Agarosegel (4.2.8). Für die Kolonie-PCR wurde folgendes Programm verwendet:

Initiale Denaturierung	300 s	98°C
Amplifikationszyklus (25 Zyklen):		
Denaturierung	30 s	98°C
<i>Annealing</i>	30 s	55°C
Elongation	120 s	72°C
finale Elongation	300 s	72°C
Stop	kein Zeitlimit	10°C

4.2.5 Verwendung von Enzymen zur Veränderung der DNA

4.2.5.1 Restriktionsverdau

Restriktionsendonukleasen (3.3) sind in der Lage DNA spezifisch an bestimmten Sequenzen zu schneiden (Aber, Nathans und Smith, 1978). Zwei mit demselben Enzym geschnittene DNA Fragmente können durch Ligase wieder miteinander verbunden werden (4.2.5.2). Der Verdau der DNA erfolgte durch Enzyme der Firma NEB nach den Herstellerangaben.

4.2.5.2 Ligation

Um ein DNA Fragment in einen Expressionsvektor zu klonieren, mussten sowohl die DNA als auch der Vektor mit denselben Restriktionsendonukleasen verdaut werden. Dem Verdau des Vektors wurde zusätzlich 1 μ l alkalische Phosphatase (3.3) zugegeben. Die alkalische Phosphatase dephosphoryliert das 5'-Ende des DNA-Doppelstrangs, so dass eine Ligation des Vektors mit sich selbst verhindert wird. Die Verbindung der kompatiblen Schnittstellen von PCR-Fragment und Vektor wurde durch das Enzym T4-Ligase (3.3) aus dem Bakteriophagen T4 mittels ATP-Hydrolyse vermittelt (Lehman *et al.*, 1974). Die Ligation erfolgte nach Angaben des Herstellers.

4.2.6 Shot-Gun Klonierung von Zufallssequenzen aus Phagen-DNA

Für die Suche nach homologen DNA-Sequenzen wurden unterschiedliche DNA-Fragmente eines Genoms benötigt. Diese Fragmente erhält man entweder durch unspezifische DNA-Amplifikation (4.2.33) oder durch Verdau von Phagen-DNA (4.2.5.1). Die erhaltenen DNA-Stücke mussten vor der Sequenzierung in einen Vektor überführt werden. Dazu wurde der *Perfectly Blunt Cloning Kit* (3.9) verwendet. Die DNA wurde nach Verdau oder Amplifikation per *PCR Purification Kit* (3.9) aufgereinigt. Die Klonierung der Fragmente in den pST-Blue-Vektor des Kits erfolgte nach Angaben des Herstellers. Die Identifizierung plasmidhaltiger Klone erfolgte per Blau-Weiß-Screening (4.2.7).

4.2.7 Blau-Weiß-Screening

Bei diesem Verfahren wird die Fähigkeit des Enzyms β -Galaktosidase zur Hydrolyse von X-Gal zu Galaktose und 5-Brom-4-chlor-3-hydroxyindol genutzt. Letzteres wird durch Luftsauerstoff zu dem blauen Farbstoff 5,5'-Dibrom-4,4'-dichlorindigo oxidiert. In dem verwendeten pSTblue-Klonierungsvektor (3.2) liegt die Insertionsstelle für

Fremd-DNA in der für die β -Galaktosidase codierenden Sequenz. Durch Einbringen eines Inserts in den Vektor kann die β -Galaktosidase nicht mehr exprimiert werden. Die Transformanden wurden auf LB-Agar mit 50 $\mu\text{g/ml}$ Ampicillin, 12,5 $\mu\text{g/ml}$ Tetracyclin, 70 $\mu\text{g/ml}$ 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galaktopyranosid (X-Gal) und 80 μM Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG) ausplattiert. Die Expression der β -Galaktosidase wurde mittels IPTG induziert. Zellen die erfolgreich mit einem Vektor mit Insert transformiert wurden, konnten das X-Gal im Agar nicht mehr umsetzen und bildeten weiße Kolonien. Transformanden deren Vektor kein Insert enthielt, bildeten blaue Kolonien.

4.2.8 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese diente zur Analyse von Nukleinsäurefragmenten. Man unterscheidet die analytische und die präparative Agarose-Gelelektrophorese. DNA-Fragmente wurden hierbei in 1% (w/v) Agarosegelen getrennt. Für die analytische Agarose-Gelelektrophorese reichten 25 μl Taschen aus während für präparative Zwecke 50 μl Geltaschen benötigt wurden. Der Gellauf erfolgte in TBE-Puffer (3.8) bei einer Spannung von 110 V. Die Dokumentation der Agarose-Gele erfolgte mit dem Video-Dokumentationssystem. Wurde ein präparativer Lauf durchgeführt, konnten die DNA-Fragmente aus dem Gel ausgeschnitten, und mittels des *QIAquick Gel Extraction Kits* (3.9) nach Angaben des Herstellers aufgereinigt werden.

4.3 Proteinbiochemische Methoden

4.3.1 Gewinnung unlöslich exprimierter Proteine

Ob ein Protein löslich oder unlöslich exprimiert wird, ist abhängig von dessen Stabilität und dem Organismus, in dem es exprimiert wird. Ein Teil der Proteine welche in dieser Arbeit beschrieben wurden, exprimierten löslich. Lösliche Proteine konnten nach Aufschluss der Expressionszellen aus dem Aufschluss-Überstand gewonnen werden. Einige Proteine wurden unlöslich in sphärischen Einschlusskörperchen, so genannten *inclusion bodies*, exprimiert. Die vollständig synthetisierten Proteine lagen hier meist nur ungefaltete oder maximal partiell gefaltet vor. Zur Isolierung mussten die *inclusion bodies* solubilisiert und das enthaltene Protein komplett denaturiert werden. Schließlich erfolgte in der Rückfaltung die

Renaturierung des Proteins, wobei dieses bei korrekter Faltung seine native Struktur annahm.

4.3.1.1 Isolierung von *inclusion bodies*

Die hier angewandte Methode der Reinigung von *inclusion bodies* basierte auf den Ergebnissen von Rudolph *et al.* (1996). Nach Expression des Zielproteins in *E. coli* und Zellaufschluss wurde die unlösliche Fraktion mit Hilfe des Ultra-Turrax in *inclusion body*-Waschpuffer (3.8) resuspendiert und anschließend durch Zentrifugation (Sorvall, SLA1500, 12000 rpm, 25 min, 4°C) erneut pelletiert. Der Überstand wurde verworfen. Dieser Waschvorgang wurde mehrfach wiederholt. Dabei wurde zuerst *inclusion body*-Waschpuffer mit 2,5% (v/v), dann 1% (v/v) Triton X100 verwendet. Abschließend wurde nochmals mit *inclusion body*-Waschpuffer ohne Triton X100 gewaschen. Zur besseren Handhabung wurden die gereinigten *inclusion bodies* in wenigen ml H₂O bidest aufgenommen. Die in H₂O aufgenommenen *inclusion bodies* konnten bis zur Verwendung bei -20°C gelagert werden.

4.3.1.2 Solubilisierung von *inclusion bodies*

Die in Wasser aufgenommenen *inclusion bodies* wurden zuerst mit 10% (v/v) 1 M NaOH-Lösung versetzt und gründlich durchmischt. Danach wurde das Gemisch 1:10 in Solubilisierungspuffer (3.8) mit 8 M Harnstoff verdünnt und wieder homogenisiert (McCoy & Frost, 1988). Das Protein lag nach der Solubilisierung im ungefalteten Zustand vor. Durch Zentrifugation (Multifuge SR3, 20 min, 4500 rpm, 4°C) wurden in Solubilisierungspuffer unlösliche Bestandteile entfernt.

4.3.1.3 Rückfaltung denaturierter Proteine

Um die native Struktur des Proteins wiederherzustellen, musste der Solubilisierungs-Ansatz in einen Puffer ohne Denaturierungsmittel verdünnt werden. Um die Bildung von Aggregaten unfertig gefalteter Proteine während der Rückfaltung so gering wie möglich zu halten, wurde die Methode der schnellen Verdünnung angewandt. Hierbei wurde das Protein 1:16 in Rückfaltungspuffer (3.8) verdünnt. Der Puffer enthielt verschiedene Zusätze um die Überführung in den nativen Faltungszustand zu optimieren. Da es sich bei der lytischen Domäne des Proteins EPhL-20K um eine Zink-Metalloprotease (NCBI-CDD pfam01510) handelte, welche nur mit gebundenem Zink im aktiven Zentrum lytische Eigenschaften besitzt, enthielt der Puffer 0,1 mM

Zinksulfat. Um das Zink für den Einbau in das Protein verfügbar zu machen, wurde der Komplexbildner Natriumcitrat eingesetzt. Um eine Aggregatbildung während der Rückfaltung zu vermeiden wurde dem Puffer L-Arginin zugegeben (Rudolph *et al.*, 1996). Versuche mit verschiedenen Argininkonzentrationen zwischen 50 mM und 500 mM ergaben eine optimale Konzentration von 300 mM Arginin. Ebenso wie der Solubilisierungspuffer enthielt auch der Rückfaltungspuffer DTE um eine fehlerhafte Ausbildungen von Disulfidbrücken zu unterbinden. Die Zusammensetzung des Rückfaltungspuffers wurde im Rahmen der Arbeit von Forchheim (2009) optimiert.

Die Rückfaltung des Proteins fand bei 4°C im Kühlraum statt. Das zugegebene Protein wurde über Nacht unter Rühren im Kühlraum inkubiert. Anschließend wurden zurückbleibende, unlösliche Bestandteile des Rückfaltungsansatzes durch Zentrifugation (Multifuge SR3, 20 min, 4500 rpm, 4°C) entfernt.

4.3.2 Proteinreinigung

Die Chromatographieschritte wurden in dieser Arbeit, falls nicht anders angegeben, mit einer ÄKTA-FPLC oder ÄKTA-Purifier Chromatographieanlage (GE Healthcare, München) durchgeführt.

4.3.2.1 Anionenaustauscherchromatographie

Zur Abtrennung von DNA aus Proteinlösungen wurde in dieser Arbeit der starke Anionenaustauscher Toyopearl GigaCap Q-650M (Tosoh Biosciences GmbH, Stuttgart) mit einem Säulenvolumen von 36 ml verwendet. Die Reinigung wurde bei einem pH-Wert von 8 durchgeführt. DNA besitzt bei diesem pH-Wert eine negative Gesamtladung und interagiert mit dem positiv geladenen Säulenliganden (-O-R-N⁺(CH₃)₃). Der isoelektrische Punkt (pI), der mit dieser Methode aufgereinigten Proteine, lag bei 9.49 (EPhL-25) und 9,44 (K-1). Die Seitengruppen der Aminosäuren Lysin, Aspartat und Glutamat sind bei einem pH-Wert unterhalb des pI protoniert, wodurch das Protein eine positive Gesamtladung erhält. Dadurch konnte das Protein nicht an die Liganden der stationären Phase binden, und war in der Durchlaufraction zu finden. Die DNA-Abtrennung erfolgte bei einer Flussrate von 5 ml/min. Als Auftragspuffer diente im Fall eines löslichen Proteins der Zellaufschlusspuffer (3.8). Unlösliche Proteine wurden in Solubilisierungspuffer (3.8) aufgetragen. Die proteinhaltige Fraktion des Durchlaufs wurde mittels Kationenaustauscherchromatographie weiter gereinigt.

4.3.2.2 Kationenaustauscherchromatographie

Zur weiteren Aufreinigung des Zielproteins fand der starke Kationenaustauscher Toyopearl SP-550C (Tosoh Biosciences GmbH, Stuttgart) mit einem Säulenvolumen von 20 ml Verwendung. Wie bei 4.3.2.1, fand auch dieser Reinigungsschritt bei einem pH-Wert von 8 statt. Das positiv geladene Zielprotein konnte bei diesem pH-Wert mit dem Säulenliganden (-O-CH₂-CH₂-CH₂-SO₃⁻) interagieren. Als Flussrate wurden 2 ml/min für Auftrag und Waschen bzw. 1 ml/min während der Elution gewählt. An den Waschvorgang der Säule mit 3 Säulenvolumen Auftragspuffer (4.3.2.1) schloss sich die Elution im Gradienten über 10 Säulenvolumen nach dem Elutionspuffer an. Für lösliche Proteine kam als Elutionspuffer Zellaufschlusspuffer mit 500 mM NaCl zu Einsatz, unlösliche exprimierende, solubilisierte Proteine wurden mit Solubilisierungspuffer mit 150 mM Natriumcitrat eluiert. Der erhöhte Salzgehalt des Elutionspuffers bewirkte hierbei eine Verdrängung der gebundenen Proteine vom Liganden. Fraktionen von 2 ml wurden gesammelt und mittels SDS-PAGE (4.4.1) auf Zielprotein untersucht. Die proteinhaltigen Eluatfraktionen wurden vereinigt.

4.3.2.3 Ni-NTA-Affinitätschromatographie

Bei dieser Methode wurde die Affinität eines Affinitätspeptids, des so genannten 6xHis-tags, zu dem Säulenliganden Nickel-Nitrilotriessigsäure (Ni⁺⁺-NTA) zur Reinigung eines Proteins genutzt. Der 6xHis-Tag war N-terminal an die zu reinigenden Proteine kloniert. Nach Equilibrierung der Säule mit Auftragspuffer, Ni-NTA-Puffer A (3.8), erfolgte der Auftrag des proteinhaltigen Überstandes aus dem Zellaufschluss. Nach Waschen der Säule mit 3 - 4 Säulenvolumen Auftragspuffer, wurde das gebundene Protein mit vier Säulenvolumen Elutionspuffer, Ni-NTA-Puffer E (3.8) mit Imidazol von der Säule eluiert. Die Affinität des Ni⁺⁺-NTA Komplexes zu dem im Elutionspuffer enthaltenen Imidazol ist größer als die zum Histidin-Tag. Dadurch wurde das Protein vom Liganden verdrängt. Fraktionen zu je 1 ml wurden gesammelt und mittels SDS-PAGE (4.4.1) auf Zielprotein untersucht. Die proteinhaltigen Eluatfraktionen wurden vereinigt.

4.4 Analytische Methoden

4.4.1 SDS Polyacrylamidgelelektrophorese

Zur Analyse von Proteinproben wurde die denaturierende SDS-Polyacrylamid-gelelektrophorese mit diskontinuierlichem Puffersystem verwendet (King & Laemmli, 1971). Die verwendete Polyacrylamid-konzentration betrug 12%. Es wurden immer Gele mit den Ausmaßen 10 x 8 x 0,15 cm verwendet. Für die Taschen des Sammelgels kamen Käbme mit 15 Taschen für je 25 µl zum Einsatz.

Tabelle 4-1

Zusammensetzung eines 12% SDS-Gels

	Trenngel	Sammelgel
Acrylamid-Biacrylamid 30%	3 ml	0,5 ml
4x Lower SDS Puffer (2.9)	1,875 ml	0,75 ml
Wasser	2,625 ml	1,75 ml
Ammoniumperoxodisulfat 10% (w/v) in H ₂ O	45 µl	30 µl
N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine	4,5 µl	3 µl

Die Proteinproben wurden vor der Gelelektrophorese mit 20% (v/v) 5xSDS-Probenpuffer (3.8) versehen und zur Denaturierung für fünf Minuten auf 95°C erhitzt. Die Elektrophorese erfolgte in SDS-Laufpuffer (3.8) bei einer konstanten Spannung von 180 V. Zur Visualisierung der Proteinbanden wurde eine modifizierte Methode nach Fairbanks (Fairbanks *et al.*, 1971) verwendet. Dabei wurde das zu färbende Gel in Fairbanks-Lösung A (3.8) in der Mikrowelle aufgeköcht und anschließend 10 min unter leichtem Schütteln inkubiert. Nachdem das Gel mit H₂O gewaschen wurde erfolgte die Entfärbung mit Fairbanks-Lösung D (3.8). Dazu wurde das Gel in der Lösung aufgeköcht, und anschließend erneut unter leichtem Schütteln inkubiert, bis die Proteinbanden sichtbar wurden. Die Dokumentation erfolgte mittels des *Image Master[®] Videodokumentationssystem*s.

4.4.2 Semi Dry Westernblot

Für einen Westernblot wurden die Proteine zunächst über SDS-PAGE (4.4.1) nach der Größe aufgetrennt und anschließend elektrophoretisch auf eine Polyvinylidendifluorid (PVDF, Hybond-P PVDF-Membran, GE Healthcare) Membran

übertragen. Da die Proteine im SDS-Gel negativ geladen vorlagen, wanderten sie im Transferpuffer (3.8) entlang des elektrischen Feldes aus dem Gel in Richtung Anode. An der Membranoberfläche blieben sie aufgrund hydrophober Wechselwirkungen haften, wobei das Muster der elektrophoretischen Auftrennung erhalten blieb (Renart, et al., 1979). Der Blot erfolgte bei einer Spannung von 294 mA für etwa 50 min.

4.4.2.1 Detektion des Zielproteins

Für eine spezifische Detektion eines *getaggt*en Zielproteins kamen Antikörper zum Einsatz. Direkt nach dem Blotten wurde die Membran in PBS-Puffer (3.8) mit 0,1% (v/v) Tween 20 und 0,5% (w/v) BSA für 45 min bei Raumtemperatur blockiert. Der Antikörper gegen den *Tag* des Zielproteins wurde in PBST- oder TBST-Puffer 60 min mit der Membran inkubiert. Im Anschluss daran erfolgten drei weitere Waschschrte in PBST- oder TBST-Puffer (3.8) mit 0,1% (v/v) Tween 20. Welcher Puffer gewählt wurde, hing von der enzymatischen Funktion ab, die an den Antikörper gekoppelt war. Für einen Peroxidase-Antikörper wird PBST-Puffer, für einen Phosphatase-Antikörper TBST-Puffer gewählt.

Die Visualisierung erfolgte bei Peroxidase-Antikörpern durch Inkubation der Membran mit 4-Chlor-1-naphtol Substratlösung (3.8). Durch die Umsetzung des Substrates zu einem Farbstoff wurden die Proteinbanden sichtbar. Wurde ein Phosphatase-Antikörper benutzt, so erfolgte die Färbung in AP-Färbelösung (3.8) wobei sich ebenfalls ein Farbstoff bildet. Beide Reaktionen konnten mit Wasser gestoppt werden. Die Dokumentation des Blots erfolgte mittels Videodokumentationssystem (3.11).

4.4.3 Expressions- und Löslichkeitstest

Nachdem ein Gen eines bestimmten Proteins rekombinant in einen Vektor eingefügt, und dieser in einen Expressionsstamm transformiert wurde, musste geklärt werden, ob das Protein exprimiert wurde. Dazu wurde eine Kultur in 1,5 ml sterilem LB-Medium (4.1.1) in einem 2 ml-Eppendorfgefäß bei 37°C unter Schütteln angezogen. Zur Selektion enthielt das Medium Antibiotika. Sobald sich durch das Zellwachstum im Gefäß eine leichte Trübung zeigte, wurde die Expression durch Zugabe von IPTG mit einer Endkonzentration von 1 mM induziert. Nach weiteren drei Stunden schüttelnder Induktion bei 37°C wurden die Zellen abzentrifugiert. Falls nur getestet werden sollte ob das Protein prinzipiell exprimiert, wurde das Zellpellet in 50 µl

1xSDS-Probenpuffer (3.8) aufgenommen und 10 min auf 95°C erhitzt. Anschließend erfolgte die Analyse per SDS-PAGE (4.4.1).

Für einen Löslichkeitstest erfolgte der Aufschluss in 250 µl Aufschlusspuffer (3.8) mittels Ultraschall Homogenisator. Lösliche und unlösliche Zellbestandteile, wurden danach durch Zentrifugation in der Tischzentrifuge getrennt. Sowohl Pellet als auch Überstand wurden anschließend mit 20% (v/v) SDS-Probenpuffer versetzt. Die Analyse der beiden Fraktionen erfolgte ebenfalls per SDS-PAGE.

4.4.4 UV-Spektroskopie

4.4.4.1 Konzentrationsbestimmung von DNA

Die Konzentration von DNA wurde photometrisch in einer 200 µl Quarzküvette bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt. Eine Absorption von 1,0 entsprach einer Konzentration von 50 ng/µl bei doppelsträngiger bzw. 37 ng/µl bei einzelsträngiger DNA. Durch Messung der Absorption bei 280 nm wurden Verunreinigungen durch Proteine deutlich. Der Quotient aus den Absorptionen bei 260 nm und 280 nm sollte 1,8 nicht unterschreiten.

4.4.4.2 Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Die aromatischen Aminosäuren Tryptophan, Tyrosin, Phenylalanin sowie Cystine absorbieren UV-Licht im Bereich von 250 nm bis 300 nm. Nach Pace *et al.* (1995) kann aus der Aminosäuresequenz der Molare Extinktionskoeffizient bei 280 nm (ϵ_{280}) und daraus, bei bekanntem Molekulargewicht, der spezifische Extinktionskoeffizient ($^{0,1\%}A_{280}$) berechnet werden:

$$\begin{aligned} \epsilon_{280} &= \sum \text{Trp} \times 5500 + \sum \text{Tyr} \times 1490 + \sum \text{Cystine} \times 125 \\ ^{0,1\%}A_{280} &= \epsilon_{280} / M \end{aligned}$$

ϵ_{280}	molarer Extinktionskoeffizient bei 280nm [M-1cm-1]
$^{0,1\%}A_{280}$	spezifischer Extinktionskoeffizient [cm ² mg ⁻¹]
M	Molare Masse [g/mol]

Formel 4-1

Formel zur Berechnung des molaren Extinktionskoeffizienten bei 280nm.

Durch Einsetzen in das Lambert-Beersche-Gesetz ($A = \epsilon \times c \times d$) kann die Protein-konzentration berechnet werden:

$$c = A_{280} / [^{0,1\%}A_{280} \times d]$$

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

Formel 4-2

Formel zur Berechnung der Proteinkonzentration anhand der Absorption bei 280nm.

Zur Bestimmung der Konzentration und Abschätzung des DNA-Gehalts der Proteinlösung wurden Spektren von 240 nm bis 340 nm aufgenommen. DNA hat ein Absorptionsmaximum bei 260 nm, weshalb der Quotient aus den Absorptionswerten bei 280 und 260 nm (A_{280}/A_{260}) als Parameter für den DNA-Anteil der Proteinlösung gewertet wurde. Dieser sollte mindestens einen Wert von 1,8 haben. Die Absorption oberhalb einer Wellenlänge von 300 nm sollte Null sein. Ein erhöhter Wert kann auf eventuell vorhandene Aggregate in der Proteinlösung hindeuten.

4.4.5 Fluoreszenzspektroskopie

Die Bestimmung der Faltungsintegrität der Proteine durch Messung der Fluoreszenz erfolgte nach der Methode von Schmid (1989).

Alle Messungen wurden mit dem Fluoreszenzspektrometer FluoroMax-3 der Firma HORIBA Jobin Yvon durchgeführt. Die Messung des emittierten Fluoreszenzlichts erfolgte im 90°-Winkel zum Anregungslichtstrahl. Die Proteineigenfluoreszenz durch Tryptophan- und Thyrosinreste wurde bei einer Wellenlänge von 280 nm angeregt. Für die ausschließliche Messung der Eigenfluoreszenz von Tryptophan wurde eine Extinktionswellenlänge von 295 nm gewählt. Das Spektrum der Emission wurde bei einer Anregung von 310 bis 450 nm detektiert. Die Integrationszeit betrug 1 s, die Spaltbreite für Anregungs- und Emissionswellenlänge lag bei 2,5 nm. Alle Fluoreszenzspektren wurden gegen die jeweiligen Pufferspektren korrigiert. Die Messtemperatur betrug 24°C.

Die Proteinproben werden zur Denaturierung mit Guanidin-HCl in einer Konzentrationsreihe versetzt. Die Endkonzentration wurde in Stufen von 0,25 M zwischen 0 M und 1 M GdnHCl bzw. in Stufen von 0,5 M zwischen 1 M und 6 M Gdn-HCl eingestellt. Zur Einstellung des Gleichgewichts wurden die Ansätze drei Tage bei Raumtemperatur inkubiert. Die Auswertung der Spektren erfolgte mittels der Software DataMax Version 2.20 (3.12).

4.4.6 Untersuchung der thermischen Stabilität

Proteine beginnen ab einer bestimmten Temperatur zu aggregieren. Diese Proteinaggregate verursachen eine Zunahme der Lichtstreuung (Wetlaufer, 1962), welche spektroskopisch verfolgt werden kann. Die zu testenden Proteine wurden mit einer Endkonzentration von 0,1 mg/ml in 150 mM Na-Phosphat-Puffer pH 7,5 mit 150 mM NaCl verdünnt. Die Messungen erfolgten am UV/VIS Spektrometer V650 (3.11) in einem temperierbaren Küvettenhalter, wobei Küvetten mit Rührkammer verwendet wurden. Die Temperatursteuerung erfolgt mittels des Programms *Temp-Scan (Melting) Measurement* (Jasco Corporation, Tokyo, J). Die Messung der Absorption bei 360 nm erfolgt im Temperaturbereich von 20°C bis 95°C bei einer Heizrate von 1°C/min.

4.5 Funktionstestung

4.5.1 Peroxidase-Zellbindetests

Im Peroxidase-Zellbindetest wurde die Bindung von Zellwand-Bindedomänen (CBD) an Bakterienzellen nachgewiesen. Die CBDs wurden dazu mit einem C-terminalen Strep-Tag exprimiert, an welchen ein Antikörper-Streptactin-*horseradish*-Peroxidase-Konjugat binden konnte. Der Nachweis erfolgte über eine Farbreaktion, welche durch die Peroxidase katalysiert wurde. Für die Bindetests wurden verschiedene Bakterienstämme (3.1) verwendet.

Der Test erfolgte in 96well Platten mit 2 ml Fassungsvermögen und V-förmigem Boden (3.10). Diese wurden eine Stunde bei 37°C mit PBST-Puffer (3.8) blockiert. Für den Test wurden 200 µl Übernachtskultur des zu testenden Bakteriums mit je 25 µl CBD-Lösung mit einer Proteinkonzentration von 100 µg/ml, 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Als Kontrolle wurden Zellen mit Puffer bzw. BHI-Medium mit Proteinlösung inkubiert. Alle Ansätze wurden dreifach angesetzt. Während der Inkubationszeit konnten die CBDs an die Zellen binden. Es folgte ein Zentrifugationsschritt (Multifuge 3SR, Heraeus Kendro, 4°C, 3600 rpm, 10 min). Die Überstände wurden verworfen. Die Pellets wurden anschließend zweimal mit 200 µl PBST gewaschen. Ungebundene CBDs wurden über diesen Waschschrift entfernt. Danach wurde das Pellet in 200 µl Streptactin HRP-Lösung (Streptactin-*horseradish*-Peroxidase-Konjugat 1:5000 in PBST) resuspendiert und 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Während dieser Zeit konnte der Antikörper an die

gebundenen CBDs koppeln. Nach erneuter Zentrifugation und zweimaligem Waschen mit je 200 μ l PBS-Tween erfolgte der colorimetrische Nachweis über die Peroxidaseaktivität. Hierzu wurden die Pellets in je 200 μ l ABTS-Reaktionslösung (3.8) resuspendiert. Die Umsetzung des Substrats durch das Enzym verursachte einen Farbumschlag, anhand dessen Stärke man Aussagen über die Menge der gebundenen CBDs, und somit über die Bindungsstärke machen konnte. Nach erneuter Zentrifugation wurden die Überstände in eine klare 96well Platte mit flachem Boden (Nunc GmbH & Co. KG, Langenselbold) überführt. Die Messung des Farbumschlags erfolgte bei einer Wellenlänge von 600 nm in einem ELISA-Reader (3.11).

4.5.2 Aktivitätstests für Endolysine

4.5.2.1 Plattenlysetests mit hitzeinaktivierten Bakterien

Anhand eines Lysetests auf Platten, mit in Agar eingegossenen Bakterien, konnte eine qualitative Aussage über die Aktivität der zu testenden Endolysine getroffen werden. Der Plattenlysetest konnte durch Aufbringen eines Expressionklons oder durch Auftüpfeln von 5 μ l gereinigter Proteinlösung mit einer Konzentration von 500 μ g/ml erfolgen. Ein Teil der Plattenlysetests wurde mit hitzeinaktivierten Bakterien durchgeführt.

Für einen Plattenlysetest mit hitzeinaktivierten Bakterien, wurden diese in 200 ml BHI-Medium angezogen und bei einer $OD_{600} = 1$ abzentrifugiert (Heraeus Pico, 13000 rpm, 5 min). Durch Wiederaufnahme des Zellpellets in 10 ml BHI-Medium (4.1.1) wurden die Zellen aufkonzentriert. Die Inaktivierung erfolgte durch eine 45 minütige Inkubation bei 80°C unter leichtem Schüttelein. Hitzeinaktivierte Zellen konnten bis zur Verwendung bei -20°C gelagert werden. Zur Herstellung der Lysetestplatte wurden 500 μ l der Zellen mit 10 ml Top-Agar (4.1.1) vermischt und in eine Petrischale gegossen. Die eingegossenen Bakterien sorgten für eine starke Trübung. Falls ein Expressionsklon aufgebracht werden sollte, enthielt der Agar zusätzlich 1 mM IPTG, wodurch im Expressionsklon die Herstellung des Zielproteins induziert wurde. Nach Erstarren des Agars, konnten ein oder mehrere Expressionsklone bzw. gereinigtes Protein für Tests aufgebracht werden. Die Lysetestplatte wurde anschließend 12 Stunden bei 30°C inkubiert. Da bei der Koloniebildung von *E. coli* während der Expression stets Zellen absterben, kam es zur Freisetzung von kleinen Mengen des Endolysins, welches, im Fall vorhandener

Aktivität, einen klaren Lysehof um die Kolonie erzeugte. Anhand der Größe des Lysehofs, konnte man eine Aussage über die Stärke der Lyseaktivität treffen.

4.5.2.2 Plattenlysetests mit lebenden Bakterien

Für Plattenlysetests mit lebenden Zellen, wurden 300 µl einer Übernachtskultur des entsprechenden Bakteriums zusammen mit 10 ml Top-Agar in eine Petrischale gegossen. Das Wachstum der Bakterien führte zur Trübung des Agars. Nach Erstarren des Agars, konnte ein Expressionsklon oder 5 µl gereinigte Proteinlösung mit einer Konzentration von 500 µg/ml für Tests aufgebracht werden. Man unterscheidet zwischen Tests auf bakterizide oder bakteriostatische Aktivität. Ein Protein besitzt bakterizide Aktivität, wenn es lebende Bakterien abtötet. Bakteriostatische Aktivität ist vorhanden, wenn das Anwachsen von Bakterien durch ein Protein unterdrückt wird. Bakteriostatische Lysetests wurden ausschließlich mit gereinigtem Protein durchgeführt, welches sofort nach Erstarren des Agars aufgebracht wurde. Die Platte musste anschließend bei 30°C 12 Stunden inkubieren. Aktives Protein unterdrückte das Bakterienwachstum an der Auftragungsstelle.

Für bakterizide Lysetests wurden Proteinlösung oder Expressionsklon erst nach 12 Stunden aufgebracht, wenn sich im Agar ein Bakterienrasen gebildet hatte. Falls das zu testende Protein bakterizid wirkte, wurde nach einigen Stunden ein klarer Lysehof im Bakterienrasen sichtbar.

4.5.2.3 Flüssigzelllysetest

Der Flüssigzelllysetest wurde zur schnellen Bestimmung der spezifischen Aktivität von Proteinen genutzt. Dazu wurde eine Übernachtskultur der zu lysierenden Zellen (*Enterococcus faecalis* oder *faecium*) 1:10 in BHI Medium (4.1.1) verdünnt und für zwei Stunden bei 37°C in einem Überkopfschüttler (3.11) inkubiert. Die Absorption der Zellkultur wurde bei einer Wellenlänge von 600 nm im Photometer Ultrospec 10 (3.11) gemessen. Lag die OD₆₀₀ zwischen 1,0 und 1,3 befanden sich die Zellen in der exponentiellen Wachstumsphase und wurden durch Zentrifugation (Multifuge 3, Heraeus, 4°C, 4500 rpm, 10 min) geerntet. Die Zellpellets wurden in Lysepuffer (3.8) resuspendiert und auf eine OD₆₀₀ = 1 eingestellt.

Alternativ konnte der Test mit hitzeinaktivierten Bakterien durchgeführt werden. Für einen Flüssigzelllysetest mit hitzeinaktivierten Bakterien, wurden diese in 200 ml BHI-Medium angezogen und bei einer OD₆₀₀ = 1 abzentrifugiert (Heraeus Pico, 13000 rpm, 5 min). Durch Wiederaufnahme des Zellpellets in 10 ml BHI-Medium

(4.1.1) wurden die Zellen aufkonzentriert. Die Inaktivierung erfolgte durch eine 45 minütige Inkubation bei 80°C unter leichtem Schüttelein. Hitzeinaktivierte Zellen konnten bis zur Verwendung bei -20°C gelagert werden. Für den Test wurden die Zellen in Lysepuffer (3.8) resuspendiert und auf $OD_{600} = 1$ eingestellt.

Nach Inkubation der Zellsuspension für 30 Minuten bei Raumtemperatur erfolgte der Test in 1,5 ml halbmikro Einmal-Küvetten (3.10) im UV/VIS Spektrometer V550 (3.11) bei 30°C mit dem Programm *Parallel Kinetics Measurement* (3.12). Nach Zugabe von aktivem Protein wurden die Zellen lysiert, was durch Absinken der OD_{600} beobachtet werden konnte. Als Kontrolle diente eine Küvette mit Zellsuspension, zu welcher der Lagerungspuffer des entsprechenden Proteins gegeben wurde. Die spezifische Aktivität eines Proteins entsprach dem Quotient aus der Absorptionsabnahme pro Minute und der Mengen an Protein in mg.

$$\text{Spezifische Aktivität} = (A_0 - A_t) / (tx) = \Delta A / (tx)$$

A_0	= Absorption bei 600nm zum Zeitpunkt $t = 0$
A_t	= Absorption bei 600nm zum Zeitpunkt $t = 1$
t	= Zeit in min
x	= Proteinmenge in mg

Formel 4-3

Formel zu Berechnung der spezifischen Aktivität

Eine OD_{600} von 1 entsprach im Falle von *Enterococcus faecalis* etwa einer Zellzahl von 10^9 cfu/ml (cfu = *colony forming units*). Sank die Absorption auf 1% des Ausgangswertes, so wurden 99% der Zellen lysiert. Dies bedeutet, dass immer noch 10^7 Zellen vorhanden sein konnten. Die Methode des Flüssiglysetests dient der Geschwindigkeitsbestimmung, kann aber keine Aussage über die Anzahl der lysierten oder überlebenden Zellen treffen.

4.5.2.4 Bestimmung der minimalen bakteriziden Konzentration

Die minimale bakterizide Konzentration (*minimal bactericidal concentration*, MBC) gibt die minimale Konzentration einer Substanz an, bei der ein bestimmter Teil der Zielzellen abgetötet wird.

Alle verwendeten Geräte, Gefäße, Puffer und Proteinlösungen mussten steril sein um Kontaminationen zu vermeiden, da dies zu einer Verfälschung der Ergebnisse führen konnte. Zur Vorbereitung des Tests wurden Testzellen mit einer Zellzahl von

10^9 cfu/ml abzentrifugiert (Multifuge 3, Rotor 6441, Heraeus, 4°C, 4500 rpm, 5 min) und in Lysepuffer (3.8) mit 10 mg/ml BSA wieder auf diese Zellzahl ($OD_{600} = 1$) eingestellt. Die Zellsuspension wurde anschließend in Lysepuffer auf 10^5 cfu/ml verdünnt. Unmittelbar vor dem Test wurde eine sterile 1:10 Verdünnungsreihe der Proteine von 500 µg/ml bis 0,5 ng/ml in PBS (3.8) mit 10 mg/ml BSA angelegt. Für den Test wurden 450 µl Zellsuspension vorgelegt und mit 50 µl der verschiedenen Verdünnungsstufen des Proteins versetzt. Als Kontrolle diente ein Ansatz mit Zellsuspension und Proteinverdünnungspuffer. Nach einer Inkubationszeit von 60 min bei 30°C wurden 1:10 Verdünnungen der Ansätze bis zu einer Verdünnung von 1:1000 angefertigt. Jeweils 50 µl der letzten beiden Verdünnungsstufen der Ansätze wurden auf LB-Agarplatten ausplattiert. Zusätzlich wurden noch die Verdünnungen der Pufferkontrolle ausplattiert, um später die tatsächlich eingesetzte Zellzahl zu bestimmen. Nach Inkubation bei 37°C über Nacht erfolgte die Auswertung. Dazu werden die Platten ausgezählt. Als Wert für die tatsächlich eingesetzte Zellzahl galt die ermittelte Zellzahl der Pufferkontrolle.

Von der ermittelten cfu/ml der Ansätze wurde der Logarithmus zur Basis 10 gebildet. Die Reduktion des Logarithmus im Vergleich zum Logarithmus der Kontrolle wird gegen die eingesetzte Proteinkonzentration aufgetragen.

4.5.2.5 Bestimmung der minimalen inhibitorischen Konzentration

Die minimale inhibitorische Konzentration (*minimal inhibitory concentration*, MIC) gibt die minimale Konzentration einer Substanz an, bei der das Wachstum der Zielzellen verhindert wird. Auch hier kamen nur sterile Gefäße und Lösungen zum Einsatz. Zellen und Protein wurden analog zur MBC-Bestimmung (4.5.2.4) vorbereitet. In einer 96well-Platte (3.10) wurden 180 µl Zelllösung mit einer Zellzahl von 10^5 cfu/ml vorgelegt und mit 20 µl der Proteinverdünnungen versetzt. Als Kontrolle diente ein Ansatz mit Zellsuspension und Proteinverdünnungspuffer sowie ein Ansatz mit Medium und Proteinverdünnungspuffer. Nach mindestens 24-stündiger, stehender Inkubation bei 30°C erfolgte die Absorptions-Messung im ELISA-Reader (3.11) bei einer Wellenlänge von 600 nm. Zur Auswertung wurde die OD_{600} der Ansätze gegen die eingesetzte Proteinmenge aufgetragen.

4.6 Bioinformatische Methoden

Folgende Software wurde zur Charakterisierung der Proteine und zur Auswertung der Versuche verwendet.

Tabelle 4-2

Tabellarische Übersicht über die verwendete Software

Programm	Adresse	Nutzung
BLAST	http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi	Homologiesuche, Domänensuche
Chromas	www.technelysium.com.au	Analyse von DNA-Sequenzierungen
ClustalW2	http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html	Alignment von Aminosäure- oder Nukleotidsequenzen
DLP-SVM	http://www.tuat.ac.jp/~domserv/cgi-bin/DLP-SVM.cgi	Vorhersage von Linkerbereichen zwischen Proteindomänen
SOPMA	http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_sopma.html	Sekundärstrukturvorhersage von Proteinen
NEBcutter	http://tools.neb.com/NEBcutter2/index.php	Schnittstellen von Restriktionsendonukleasen
PDBviewer	http://spdbv.vital-it.ch/	Tertiärstruktur-Modeling
ProtParam	http://www.expasy.org/tools/protparam.html	Verschiedene Proteineigenschaften
RADAR	http://www.ebi.ac.uk/Tools/Radar/index.html	repetitive Sequenzen
Reverse Complement	http://www.bioinformatics.org/sms/rev_comp.html	umgekehrte, komplementäre Nukleotidsequenz
SignalP 3.0	http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/	Erkennung verschiedener Signalsequenzen
Titration	http://www.iut-arles.univ-rs.fr/w3bb/d_abim/compo-p.html	Titrationkurve von Proteinen, Isoelektrischer Punkt
Translate	http://www.expasy.org/tools/dna.html	Aminosäuresequenzermittlung aus Nucleotidsequenz

5 Ergebnisse

5.1 Isolierung lytischer Bakteriophagen

Ziel der Arbeit war es, Phagen-Endolysine gegen *Enterococcus faecalis* und *faecium* zu finden und zu charakterisieren. Da zu Beginn der Arbeit nur wenige Phagen gegen *Enterococcus faecalis* und *faecium* bekannt waren (2.3), mussten solche zunächst aus Umweltproben isoliert und kultiviert werden. *Enterococcus faecalis* und *faecium* gehören zur normalen Darmflora des Menschen. Um Bakteriophagen gegen diese Bakterien zu erhalten, wurden Umweltproben aus einer Umgebung gezogen, in der der Zielorganismus mit hoher Wahrscheinlichkeit anzutreffen ist. Es wurde angenommen, dass im Zulauf einer Kläranlage alle fäkalen Keime der menschlichen Darmflora anzutreffen sind. Es wurden Proben aus neun Kläranlagen der örtlichen Umgebung (Etterzhausen, Geiselhöring, Hemau, Laaber, Pfatter, Regensburg, Sinzing, Undorf, Wörth) entnommen. Die Bakteriophagen wurden mit der unter 4.1.3 beschriebenen Methode isoliert und vereinzelt. Dabei kamen die ProCC-Stämme 17 und 1176 für *Enterococcus faecalis* sowie 880 und 1177 für *Enterococcus faecium* als Wirtsstamm zum Einsatz (ProCC = Profos Cultur Collection, 3.1.1). Es konnten insgesamt 31 Phagen isoliert werden. Die Bakteriophagen wurden EPh (Enterokokken-Phagen) 1 bis 31 genannt und anhand ihrer Plaque-Morphologie unterschieden. Alle untersuchten Isolate sind in Tabelle 5-1 aufgelistet. Die in der Tabelle 5-1 fehlenden Phagen EPh-2, EPh-11 und EPh-17 konnten zwar auf Platte isoliert aber nicht flüssig kultiviert werden. Dadurch war eine Konservierung und weitere Klassifizierung dieser Phagen nicht möglich. Die in Tabelle 5-1 aufgelisteten Phagen wurden mit den unter 4.1.3 und 4.1.5 beschriebenen Methoden kultiviert und konserviert.

Tabelle 5-1

Liste der isolierten Bakteriophagen mit dem Enterokokken-Stamm, auf dem sie isoliert wurden, der beobachteten Plaque-Morphologie und die Quelle der Umweltprobe aus der sie isoliert wurden.

Phage	Wirt	Plaque-Morphologie	Quelle
EPh1	<i>Enterococcus faecalis</i> ProCC 17	mittel, rund, leicht trüb	Laaber
EPh3	<i>Enterococcus faecalis</i> ProCC 17	mittel, lappig, klar	Geiselhöring
EPh4	<i>Enterococcus faecalis</i> ProCC 17	klein, lappig, klar	Geiselhöring
EPh5	<i>Enterococcus faecalis</i> ProCC 17	mittel, rund, klar	Sinzing
EPh6	<i>Enterococcus faecalis</i> ProCC 17	groß, lappig, klar	Sinzing
EPh7	<i>Enterococcus faecalis</i> ProCC 17	mittel, rund, klar	Pfatter
EPh8	<i>Enterococcus faecalis</i> ProCC 17	klein, lappig, mit Hof	Pfatter
EPh9	<i>Enterococcus faecalis</i> ProCC 17	groß, fransig, klar	Regensburg
EPh10	<i>Enterococcus faecalis</i> ProCC 17	klein, rund, klar	Etterzhausen
EPh12	<i>Enterococcus faecalis</i> ProCC 1176	klein, rund, klar	Laaber
EPh13	<i>Enterococcus faecalis</i> ProCC 1176	klein, rund, klar	Geiselhöring
EPh14	<i>Enterococcus faecalis</i> ProCC 1176	groß, lappig, klar	Pfatter
EPh15	<i>Enterococcus faecalis</i> ProCC 1176	groß, rund, klar	Regensburg
EPh16	<i>Enterococcus faecalis</i> ProCC 1176	groß, rund, klar	Etterzhausen
EPh18	<i>Enterococcus faecalis</i> ProCC 1176	klein, rund, klar	Undorf
EPh19	<i>Enterococcus faecalis</i> ProCC 1176	groß, rund, klar	Hemau
EPh20	<i>Enterococcus faecalis</i> ProCC 1176	mittel, fransig, leicht trüb	Wörth
EPh21	<i>Enterococcus faecalis</i> ProCC 1176	mittel, rund, leicht trüb	Wörth
EPh22	<i>Enterococcus faecium</i> ProCC 880	groß, rund, klar	Etterzhausen
EPh23	<i>Enterococcus faecium</i> ProCC 880	mittel, rund, klar	Geiselhöring
EPh24	<i>Enterococcus faecium</i> ProCC 880	klein, fransig, trüb	Regensburg
EPh25	<i>Enterococcus faecium</i> ProCC 880	klein, rund, klar	Undorf
EPh26	<i>Enterococcus faecium</i> ProCC 880	klein, lappig, klar	Undorf
EPh27	<i>Enterococcus faecium</i> ProCC 880	klein, rund, klar	Laaber
EPh28	<i>Enterococcus faecium</i> ProCC 880	groß, lappig, klar	Sinzing
EPh29	<i>Enterococcus faecium</i> ProCC 880	klein, mit Hof, Mitte klar	Sinzing
EPh30	<i>Enterococcus faecium</i> ProCC 880	klein, lappig, klar	Sinzing
EPh31	<i>Enterococcus faecium</i> ProCC 1177	klein, fransig, trüb	Etterzhausen

Um die, für die Arbeit wichtigen lytischen Eigenschaften der Phagen EPh 1-31 näher klassifizieren zu können, wurde das Wirtsspektrum (4.1.6) der Phagen bestimmt. Um eine möglichst genaue Aussage über die Breite des lytischen Spektrums der Phagen treffen zu können, wurde eine große Anzahl verschiedener Gattungen gram positiver und einige gram negative Bakterien getestet. Um die Spezifität gegenüber den Wirtsstämmen zu testen, wurden zwölf verschiedene Isolate des Stammes *Enterococcus faecalis* sowie neun verschiedene Isolate des Stammes *Enterococcus faecium* verwendet. Unter diesen Stämmen befanden sich auch die oben genannten Stämme, auf denen die Phagen isoliert wurden. Für die Einschätzung der lytischen

Eigenschaften gegenüber anderen gram positiven Gattungen wurden verschiedene Stämme von *Bacillus*, *Carnobakterium*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Staphylococcus* und *Streptococcus* getestet. Als Teststämme für gram negative Bakterien wurden *E. coli* und *Salmonella* verwendet. Die Auswertung des Wirtsspektrums erfolgte anhand der Lysehöfe, welche sich bei lytischer Aktivität um die Aufbringungsstelle im Bakterienrasen bilden. Die Einteilung der Lysehöfe erfolgte nach Größe und Klarheit. Kleine und schwach sichtbare Lysehöfe wurden mit (+) markiert, mittelgroße, gut sichtbare mit (++) , und große, sehr klare Lysehöfe mit (+++). Wenn kein Lysehof zu sehen war, wurde der Ansatz mit (-) markiert. Die Ergebnisse des Wirtsspektrums sind in den Tabellen 5-2 bis 5-5 auf den nächsten Seiten dargestellt.

Ergebnisse

Tabelle 5-2

Wirtsspektrum der auf *Enterococcus faecalis* ProCC 17 isolierten Phagen. Legende: (-) keine Lyse, (+) Kleine und schwach sichtbare Lysehöfe, (++) mittelgroße, gut sichtbare Lysehöfe, (+++) große, sehr klare Lysehöfe

Enterokokkenstämme	ProCC	EPH1	EPH3	EPH4	EPH5	EPH6	EPH7	EPH8	EPH9	EPH10
<i>Enterococcus faecalis</i>	17	+	+++	+++	+++	+++	+	+	+++	++
<i>Enterococcus faecalis</i>	1176	-	-	-	-	-	++	++		++
<i>Enterococcus faecalis</i>	1504	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Enterococcus faecalis</i>	1505	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Enterococcus faecalis</i>	1507	+++	-	-	-	-	-	-	-	+++
<i>Enterococcus faecalis</i>	1552	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Enterococcus faecalis</i>	1566	+++	-	-	-	-	-	-	-	++
<i>Enterococcus faecalis</i>	1567	-	++	++	-	-	++	++	-	++
<i>Enterococcus faecalis</i>	1569	+++	-	-	-	-	-	-	-	++
<i>Enterococcus faecalis</i>	1571	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Enterococcus faecalis</i>	1572	-	-	-	-	-	-	-	-	+
<i>Enterococcus faecalis</i>	1578	-	-	-	-	-	++	++	-	-
<i>Enterococcus faecium</i>	880	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Enterococcus faecium</i>	1177	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Enterococcus faecium</i>	1553	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Enterococcus faecium</i>	1563	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Enterococcus faecium</i>	1564	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Enterococcus faecium</i>	1565	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Enterococcus faecium</i>	1568	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Enterococcus faecium</i>	1570	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Enterococcus faecium</i>	1506	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Enterococcus durans</i>	1607	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Enterococcus durans</i>	879	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Enterococcus casseliflavus</i>	1606	-	-	-	-	-	-	-	-	-
gram positive Teststämme										
<i>Lactobacillus casei</i>	1181	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Lactobacillus plantarum</i>	1583	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	1185	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Carnobacterium divergens</i>	1604	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Streptococcus salivarius</i>	1193	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Streptococcus mutans</i>	1603	-	+	+	-	-	++	++	-	++
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	1547	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	1548	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	1550	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Bacillus subtilis</i>	310	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Bacillus cereus</i>	1579	-	-	-	-	-	-	-	-	-
gram negative Teststämme										
<i>Escherichia coli</i>	931	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Salmonella Typhimurium</i>	25	-	-	-	-	-	-	-	-	-

In der Tabelle 5-2 ist das Wirtsspektrum der Gruppe der auf *Enterococcus faecalis* ProCC 17 isolierten Phagen dargestellt. Alle Phagen dieser Gruppe lysierten den Stamm auf dem sie isoliert wurden. Die Phagen EPh-1, 3, 4, 7 und 8 konnten vereinzelt weitere *Enterococcus faecalis*-Stämme lysieren (1-3 aus 12 getesteten). Der Phage EPh-10 zeigte innerhalb der *Enterococcus faecalis*-Stämme das breiteste Wirtsspektrum, in dem er insgesamt sieben der zwölf getesteten *Enterococcus faecalis*-Isolate lysierte. Kein Phage dieser Gruppe zeigte Wirtsspezifität für *Enterococcus faecium*-Stämme. Mit Ausnahme der Phagen EPh-3, 4, 7, 8 und 10, welche in der Lage waren *Streptococcus mutans* zu lysieren, bestand keine weitere Spezifität gegenüber anderen gram positiven und gram negativen Stämmen.

Ergebnisse

Tabelle 5-3

Wirtsspektrum der auf *Enterococcus faecalis* ProCC 1176 isolierten Phagen. Legende: (-) keine Lyse, (+) Kleine und schwach sichtbare Lysehöfe, (++) mittelgroße, gut sichtbare Lysehöfe, (+++) große, sehr klare Lysehöfe

Enterokokkenstämme	ProCC	EPh12	EPh13	EPh14	EPh15	EPh16	EPh18	EPh19	EPh20	EPh21
<i>Enterococcus faecalis</i>	17	+	-	-	-	-	+++	-	-	-
<i>Enterococcus faecalis</i>	1176	+++	+++	+++	+++	+++	++	+++	+++	+++
<i>Enterococcus faecalis</i>	1504	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Enterococcus faecalis</i>	1505	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Enterococcus faecalis</i>	1507	-	-	-	-	-	+++	+	-	-
<i>Enterococcus faecalis</i>	1552	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Enterococcus faecalis</i>	1566	-	-	-	-	-	+++	-	-	-
<i>Enterococcus faecalis</i>	1567	-	-	-	-	-	++	-	-	-
<i>Enterococcus faecalis</i>	1569	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Enterococcus faecalis</i>	1571	-	-	-	-	-	+++	-	-	-
<i>Enterococcus faecalis</i>	1572	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Enterococcus faecalis</i>	1578	-	-	-	-	-	++	-	-	-
<i>Enterococcus faecium</i>	880	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Enterococcus faecium</i>	1177	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Enterococcus faecium</i>	1553	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Enterococcus faecium</i>	1563	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Enterococcus faecium</i>	1564	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Enterococcus faecium</i>	1565	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Enterococcus faecium</i>	1568	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Enterococcus faecium</i>	1570	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Enterococcus faecium</i>	1506	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Enterococcus durans</i>	1607	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Enterococcus durans</i>	879	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Enterococcus casseliflavus</i>	1606	-	-	-	-	-	-	-	-	-
gram positive Teststämme										
<i>Lactobacillus casei</i>	1181	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Lactobacillus plantarum</i>	1583	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	1185	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Carnobakterium divergens</i>	1604	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Streptococcus salivarius</i>	1193	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Streptococcus mutans</i>	1603	-	-	-	-	-	++	-	-	-
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	1547	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	1548	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	1550	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Bacillus subtilis</i>	310	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Bacillus cereus</i>	1579	-	-	-	-	-	-	-	-	-
gram negative Teststämme										
<i>Escherichia coli</i>	931	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Salmonella Typhimurium</i>	25	-	-	-	-	-	-	-	-	-

In der Tabelle 5-3 ist das Wirtsspektrum der Gruppe der auf *Enterococcus faecalis* ProCC 1176 isolierten Phagen dargestellt. Alle Phagen dieser Gruppe lysierten den Stamm auf dem sie isoliert wurden. Die Phagen EPh-12 und 19 haben neben dem Stamm auf dem sie isoliert wurden noch einen weiteren *Enterococcus faecalis*-Stamm erkannt. Der Phage EPh-18 war in der Lage sieben der zwölf eingesetzten Isolate dieses Stammes zu lysieren. Kein Phage dieser Gruppe zeigte Wirtsspezifität für *Enterococcus faecium*-Stämme. Außer bei dem Phagen EPh-18, welcher in der Lage war *Streptococcus mutans* zu lysieren, bestand keine weitere Spezifität gegenüber anderen gram positiven und gram negativen Stämmen.

Ergebnisse

Tabelle 5-4

Wirtsspektrum der auf *Enterococcus faecium* ProCC 880 isolierten Phagen. Legende: (-) keine Lyse, (+) Kleine und schwach sichtbare Lysehöfe, (++) mittelgroße, gut sichtbare Lysehöfe, (+++) große, sehr klare Lysehöfe

Enterokokkenstämme	ProCC	EPh22	EPh23	EPh24	EPh25	EPh26	EPh27	EPh28	EPh29	EPh30
<i>Enterococcus faecalis</i>	17	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Enterococcus faecalis</i>	1176	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Enterococcus faecalis</i>	1504	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Enterococcus faecalis</i>	1505	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Enterococcus faecalis</i>	1507	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Enterococcus faecalis</i>	1552	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Enterococcus faecalis</i>	1566	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Enterococcus faecalis</i>	1567	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Enterococcus faecalis</i>	1569	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Enterococcus faecalis</i>	1571	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Enterococcus faecalis</i>	1572	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Enterococcus faecalis</i>	1578	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Enterococcus faecium</i>	880	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
<i>Enterococcus faecium</i>	1177	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Enterococcus faecium</i>	1553	-	-	-	-	-	+++	-	-	+++
<i>Enterococcus faecium</i>	1563	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Enterococcus faecium</i>	1564	-	-	-	-	-	++	-	-	+++
<i>Enterococcus faecium</i>	1565	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Enterococcus faecium</i>	1568	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Enterococcus faecium</i>	1570	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Enterococcus faecium</i>	1506	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Enterococcus durans</i>	1607	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Enterococcus durans</i>	879	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
<i>Enterococcus casseliflavus</i>	1606	-	-	-	-	-	-	-	-	-
gram positive Teststämme										
<i>Lactobacillus casei</i>	1181	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Lactobacillus plantarum</i>	1583	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	1185	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Carnobakterium divergens</i>	1604	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Streptococcus salivarius</i>	1193	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Streptococcus mutans</i>	1603	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	1547	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	1548	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	1550	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Bacillus subtilis</i>	310	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Bacillus cereus</i>	1579	-	-	-	-	-	-	-	-	-
gram negative Teststämme										
<i>Escherichia coli</i>	931	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Salmonella Typhimurium</i>	25	-	-	-	-	-	-	-	-	-

In der Tabelle 5-4 ist das Wirtsspektrum der Gruppe der auf *Enterococcus faecium* ProCC 880 isolierten Phagen dargestellt. Alle Phagen dieser Gruppe lysierten den Stamm auf dem sie isoliert wurden. Die Phagen EPh-27 und -30 haben neben dem Stamm auf dem sie isoliert wurden noch zwei weitere der neun eingesetzten *Enterococcus faecium*-Stämme lysiert. Kein Phage dieser Gruppe zeigte Wirtsspezifität für *Enterococcus faecalis*-Stämme. Alle Phagen dieser Gruppe waren in der Lage ein Isolat des Stammes *Enterococcus durans* zu lysieren. Keiner der getesteten Phagen zeigte Wirtsspezifität gegen weitere getestete gram positive und gram negative Stämme.

Tabelle 5-5

Wirtsspektrum des auf *Enterococcus faecium* ProCC 1177 isolierten Phagen. Legende: (-) keine Lyse, (+) Kleine und schwach sichtbare Lysehöfe, (++) mittelgroße, gut sichtbare Lysehöfe, (+++) große, sehr klare Lysehöfe

Enterokokkenstämme	ProCC	EPh31
<i>Enterococcus faecalis</i>	17	-
<i>Enterococcus faecalis</i>	1176	-
<i>Enterococcus faecalis</i>	1504	-
<i>Enterococcus faecalis</i>	1505	-
<i>Enterococcus faecalis</i>	1507	-
<i>Enterococcus faecalis</i>	1552	-
<i>Enterococcus faecalis</i>	1566	-
<i>Enterococcus faecalis</i>	1567	-
<i>Enterococcus faecalis</i>	1569	-
<i>Enterococcus faecalis</i>	1571	-
<i>Enterococcus faecalis</i>	1572	-
<i>Enterococcus faecalis</i>	1578	-
<i>Enterococcus faecium</i>	880	-
<i>Enterococcus faecium</i>	1177	+++
<i>Enterococcus faecium</i>	1553	-
<i>Enterococcus faecium</i>	1563	-
<i>Enterococcus faecium</i>	1564	-
<i>Enterococcus faecium</i>	1565	-
<i>Enterococcus faecium</i>	1568	-
<i>Enterococcus faecium</i>	1570	-
<i>Enterococcus faecium</i>	1506	+++
<i>Enterococcus durans</i>	1607	-
<i>Enterococcus durans</i>	879	-
<i>Enterococcus casseliflavus</i>	1606	-
gram positive Teststämme		
<i>Lactobacillus casei</i>	1181	-
<i>Lactobacillus plantarum</i>	1583	-
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	1185	-
<i>Carnobakterium divergens</i>	1604	-
<i>Streptococcus salivarius</i>	1193	-
<i>Streptococcus mutans</i>	1603	-
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	1547	-
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	1548	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	1550	-
<i>Bacillus subtilis</i>	310	-
<i>Bacillus cereus</i>	1579	-
gram negative Teststämme		
<i>Escherichia coli</i>	931	-
<i>Salmonella Typhimurium</i>	25	-

In der Tabelle 5-5 ist das Wirtsspektrum des auf *Enterococcus faecium* ProCC 1177 isolierten Phagen dargestellt. Der Phage konnte den Stamm auf dem er isoliert wurde sowie einen zusätzlichen *Enterococcus faecium*-Stamm lysieren. Eine Spezifität gegenüber *Enterococcus faecalis* oder den anderen gram positiven und gram negativen Stämmen bestand nicht.

Insgesamt konnten 31 Bakteriophagen aus den neun Umweltproben isoliert werden. Diese Bakteriophagen waren alle entweder spezifisch für *Enterococcus faecium* oder *Enterococcus faecalis*. Keiner der Phagen konnte beide Stämme lysieren.

5.2 Screening nach Endolysinen

In einem nächsten Schritt sollten lytische Phagenproteine gegen *Enterococcus faecalis* und *Enterococcus faecium* identifiziert werden. Als am besten geeignet scheinen dabei Endolysine zu sein.

Nachdem lytische Phagen für die Stämme *Enterococcus faecalis* und *Enterococcus faecium* isoliert wurden (5.1), musste in deren Genom nach Sequenzhomologien zu bekannten lytischen Phagenproteinen gesucht werden. Dazu wurde die Phagen-DNA mit der in Kapitel 4.2.1 beschriebenen Methode isoliert, fragmentiert (4.2.3) und kloniert (4.2.6). Die Kontrolle der Größe der klonierten Fragmente erfolgte über Agarose-Gelelektrophorese (4.2.8). Fragmente mit einer Größe von mehr als 500 bp wurden sequenziert. Die Suche nach homologen Sequenzen erfolgte über *BLAST* (4.6). Innerhalb der Datenbank wurde nach Übereinstimmung zu bekannten bakteriolytischen Proteinen wie Amidasen, Muramidasen, Endopeptidasen, Transglycolasen bzw. Glucosaminidasen gesucht. So identifizierte Genfragmente wurden durch Sequenzierung des Phagengenoms mit spezifischen Primern vervollständigt.

Durch die Sequenzierung der Phagengenom-Fragmente konnten drei Endolysine gefunden werden. Die beiden Endolysine EPhL-5 und EPhL-20 stammen aus den Phagen EPh-5 und EPh-20, welche auf dem Stamm *Enterococcus faecalis* isoliert wurden. Das Endolysin EPhL-25 stammt aus dem auf *Enterococcus faecium* isolierten Phagen EPh-25.

EPhL-5 und EPhL-20 sind auf Aminosäureebene zu 98% identisch. Aufgrund der besseren Expression von EPhL-20 wurde im Verlauf der Arbeit nur mit diesem

Ergebnisse

Protein weiter gearbeitet. Die Sequenzidentität beider Proteine ist in Abbildung 5-1 dargestellt.

```
EPhL-5, 1 MKLKGILFGALATIGLFGAGMQTANAYEVNNEFNLSPWEGSGQVAVPNKIVLHETANERAT
EPhL-20, 1 MKLKGILFGALATIGLFGAGMQTANAYEVNNEFNLSPWEGSGQVAVPNKIVLHETANERAT
*****

EPhL-5, 61 GRNEATYMKNNWFNAHTTAIIGDGGIVYKIAPEGNIISWGAGNANPYAPIQIELQHTHDKE
EPhL-20, 61 GRNEATYMKNNWFNAHTTAIIGDGGIVYKIAPEGNIISWGAGNANPYAPIQIELQHTHDKE
*****

EPhL-5, 121 LFKKNYKAYIDYTRDMGKKFGIPMTLDQGSVWEKGVISHKWVSDYVWGDHTDPYGYLAE
EPhL-20, 121 LFKKNYKAYIDYTRDMGKKFGIPMTLDQGSVWEKGVISHKWVSDYVWGDHTDPYGYLAE
*****

EPhL-5, 181 MGISKAQLAKDLANGVSGESVKPTPSKPKTFKKGQNVYIYNGHKSHNGPVVPPFVAGASLW
EPhL-20, 181 MGISKAQLTKDLANGVSGESVKPTPSKPKTFKKGQNVYIYNGHKSHNGPVVPPFVAGASLW
*****

EPhL-5, 241 TQVGTITEVKQGVVNHYKIENSGKFVTYANAGDLEDLNTKFPKPSKPVNQFTIGVDAIV
EPhL-20, 241 TQVGTITEVKQGSVNYPYKIENSGKFVTYANAGDLEDLNTKFPKPSKPVNQFTIGVDAIV
*****

EPhL-5, 301 LRSGRPSVYAPVYGTWKQGAVFKYDEITVGDGYVWIGGTDINGTRIYLP IGPNDGDPNNT
EPhL-20, 301 LRSGRPSVYAPVYGTWKQGAVFKYDEITVGDGYVWIGGTDINGTRIYLP IGPNDGDPNNT
*****

EPhL-5, 361 WGTLV
EPhL-20, 361 WGTLV
*****
```

Abbildung 5-1

Alignment der Aminosäuresequenzen von EPhL-5 und EPhL-20; grün: Aminosäureaustausche, pink: EAD-Bereich, gelb: Linkerbereich, blau: CBD-Bereich

Die in Abbildung 5-1 zu sehenden Aminosäureaustausche sind ausschließlich konservative Austausche. Diese liegen zwar zum größten Teil in Bereichen der EAD und CBD, sollten aber, da sie keine relevanten Aminosäuren des Aktiven Zentrums der EAD oder CBD betreffen keinen Einfluss auf die Funktionalität haben.

Theoretisch wäre in jedem der isolierten lytischen Phagen mindestens ein Endolysin zu finden. Im Rahmen dieser Arbeit konnte jedoch nur eine begrenzte Anzahl von Zufalls-Genfragmenten jedes Phagen sequenziert werden. In den Genfragmenten der Phagen EPh-18 und -30, welche das breiteste Wirtsspektrum aufwiesen, konnte leider keine Sequenzhomologie zu lytischen Proteinen gefunden werden. Um zuverlässig in diesen Phagen die Endolysinsequenzen zu finden, müssten diese Phagen vollständig sequenziert werden.

Tabelle 5-6

Übersicht über die Sequenzidentität der gefundenen Endolysine zu bekannten Endolysinen

Endolysin	Wirt	Sequenzidentität auf Aminosäureebene
EPHl-5/-20 (365 AS)	<i>Enterococcus faecalis</i> ProCC 1176	NP_815207 Endolysin [<i>Enterococcus faecalis</i> V583] 84% NP_815016 Endolysin [<i>Enterococcus faecalis</i> V583] 77%
EPHl-25 (317 AS)	<i>Enterococcus faecium</i> ProCC 880	ZP_01828965 Autolysin [<i>Streptococcus pneumoniae</i>] 71% YP_001693491 lytic Amidase [<i>Streptococcus pneumoniae</i>] 70%

Wie in Tabelle 5-6 zu sehen ist, besitzt EPHl-20 die größte Sequenzidentität zu zwei Prophagen-Endolysinen aus dem VRE-Stamm *Enterococcus faecalis* V583. Bei den Prophagen-Endolysinen handelt es sich um zinkabhängige N-Acteylmuramoyl-L-Alanin-Amidasen, welche eine SH3-b Domäne zur spezifischen Erkennung des Wirtsstammes besitzen (NP_815207, NP_815016). Das Endolysin EPHl-25 besitzt die größte Sequenzidentität zu einem Autolysin aus *Streptococcus pneumoniae*. Bei diesem Autolysin handelt es sich ebenfalls um eine zinkabhängige N-Acteylmuramoyl-L-Alanin-Amidase (ZP_01828965). In Tabelle 5-7 sind die drei gefundenen Proteine mit den dazugehörigen Sequenzen aufgelistet.

Tabelle 5-7

Identifizierte Proteine und die dazu gehörenden Aminosäuresequenzen

Protein	Aminosäuresequenz
EPHl-5	MKLKGIILFGALATIGLFGAGMQTANAYEVNNEFNLSPEWEGSGQVAVPNKII LHETANERATGRNEATYMKNNW FNAHTTAIIGDGGIVYKIAPEGNVSWGAGNANPYAPIQIELQHTHDKELFKKNYKAYIDYTRDMGKKFGIPM TLDQGTSTVWEKGVISHKVVSDYVWGDHTDPYGYLAEMGISKAQLAKDLANGVSGESVKPTPSKPKTFKKGQN VYIYNGHKSHNGPVPVFPVAGASLWTQVGTITEVKQGVVNHYKIENSGKFVTYANAGDLEDLNTKFPKPSKP VNQFTIGVDAIVLRSGRPSVYAPVYGTWKQGA VFKYDEITVGDGYVWIGGTD TNGTRI YLP IGPNDGDPNNT WGTLV
EPHl-20	MKLKGIILFGALATIGLFGAGMQTANAYEVNNEFNLSPEWEGSGQVAVPNKIVLHETANERATGRNEATYMKNNW FNAHTTAIIGDGGIVYKIAPEGNISWGAGNANPYAPIQIELQHTHDKELFKKNYKAYIDYTRDMGKKFGIPM TLDQGSSTVWEKGVISHKVVSDYVWGDHTDPYGYLAEMGISKAQLTKDLANGVSGESVKPTPSKPKTFKKGQN VYIYNGHKSHNGPVPVFPVAGSSLWTQVGTITEVKQGSVNPYKIENSGKFVTYANAGDLEDLNTKFPKPSKP VSQFTIGVDAIVLRSGRPSVYAPVYGTWKQGA VFKYDEITVGDGYVWIGGTD TNGTRI YLP IGPNDGDPNNT WGTLV
EPHl-25	MAYKVERRIRPGLPQVGYPYQVHAHSTGNPRSTAQNEADYFQTKDITTFGYTHLVGNRVIQLAEVNRGA WDVGGGWNQWGYASVELIESHSNRDEFMRDYKIYCELLHDLAKQAGLPTTVDQGN TGI ITHNYATHNQPNNG SDHVDPIPYLAKWGINLAQFRSDVANAKSNSKPVTPSKPVSHDKAIAKSPAKTVNGYTGKMDKFNVQGNKFR VAGWMLPTAGGQPYNYGYVFLLDAKTQKEIARQLAGAVSRPDVTKAYGVKGGTNYGLDVTDFVKKLKGKGFY AMFRRTNDKAGNTAGGHKDIGFNEFYFTL

Anhand der vollständigen Sequenzen der beiden Genprodukte konnte als nächstes eine Vorhersage des Domänenaufbaus und der grundlegenden Eigenschaften durchgeführt werden. Dazu wurden die Programme *BLAST* und *ProtParam* genutzt (4.6). Der vorhergesagte Domänenaufbau der beiden Endolysine ist in den Abbildungen 5-2 und 5-3 dargestellt.

EPhL-20 (aus *Enterococcus faecalis* Phage EPh-20)

Größe: 39,9 kDa pI-Wert: 8,36

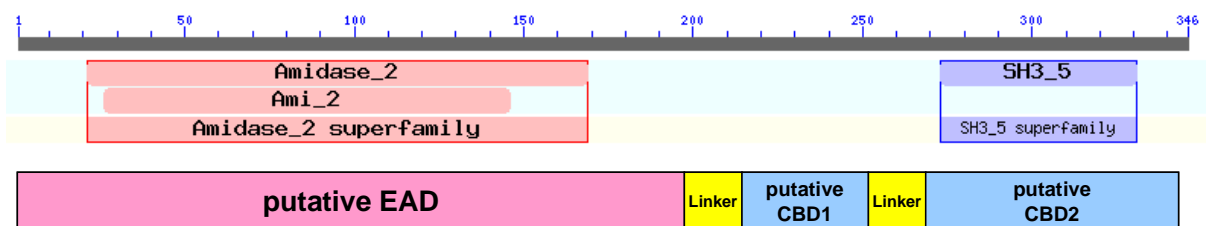


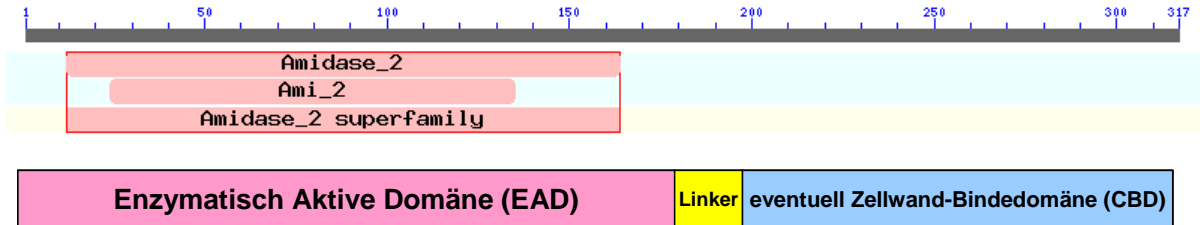
Abbildung 5-2

Domänenstruktur des Endolysins EPhL-20 aus dem *Enterococcus faecalis*-Phagen EPh-20

Wie den Abbildungen 5-2 zu sehen ist, handelt es sich bei dem Genprodukt von *ephL-20* um eine N-Acetylmuramoyl-L-Alanin-Amidase. Das Genprodukt besitzt eine Länge von 346 Aminosäuren. Die putative enzymatisch aktive Domäne (EAD) befindet sich zwischen Aminosäure (AS) 20 und 170. Anhand des Programms *SOPMA* (4.6) konnte herausgefunden werden, dass sich nach der EAD, zwischen den AS 200 bis 220, ein Linker befindet, welcher diese mit einer weiteren Domäne verbindet. Der Bereich des Proteins zwischen AS 220 und 250 konnte keiner bekannten Domänenstruktur zugeordnet werden. Aufgrund von Sequenzhomologien wurde jedoch vermutet, dass es sich um eine CBD handelt. Diese putative erste CBD ist über einen zweiten Linker zwischen AS 252 und 274 mit einer SH3b-Domäne, also einer zweiten CBD verbunden, welche sich zwischen AS 275 und 330 befindet.

EPhL-25 (aus *Enterococcus faecium* Phage EPh-25)

Größe: 34,9 kDa pI-Wert: 9,49

**Abbildung 5-3**Domänenstruktur des Endolysins EPhL-25 aus dem *Enterococcus faecium*-Phagen EPh-25

Die Abbildung 5-3 zeigt den vorhergesagten Domänenaufbau des Genprodukts von *ephL-25*. Bei diesem, 317 Aminosäuren großen Protein handelt es sich um eine N-Acetylmuramoyl-L-Alanin-Amidase. Die EAD des Proteins befindet sich zwischen den AS 10 und 160. Im Anschluss an die EAD ist ein Linker, welcher von AS 170 bis 190 reicht. Im C-terminalen Bereich konnte keine bekannte Domänenstruktur erkannt werden. Aufgrund von Sequenzhomologien wurde jedoch vermutet, dass es sich um eine CBD handelt.

Die Gen-Sequenzen der Proteine EPhL-20 und EPhL-25 wurden im Anschluss an die Sequenzierung und Sequenzanalyse in Expressionsvektoren kloniert und in *E. coli*-Zellen rekombinant exprimiert. Anschließend wurden die beiden im Rahmen dieser Arbeit identifizierten Endolysine charakterisiert.

5.3 Konstrukte

Zur weiteren Überprüfung der Eigenschaften und Aktivität der Proteine mussten diese rekombinant exprimiert werden. Als Expressionssystem für die Proteine wurde das pET-System mit T-7 Polymerase/ Promotor gewählt.

5.3.1 EPhL-20

Das Protein EPhL-20 wurde ohne Tag exprimiert, da Ergebnisse einer anderen Arbeit (Forchheim, 2009) zeigten, dass sowohl ein N- als auch C-terminaler 6xHistidin-Tag die Aktivität von *Staphylococcus*-Endolysinen blockieren kann. Als Vektor kam der T-7-Expressionsvektor pET-21d (3.2) zum Einsatz, als Expressionsstamm wurde *E. coli* HMS 174 (DE3) verwendet.

Erste Expressionstests zeigten eine sehr schwache Expression des Proteins bei 37°C. Löslichkeitstests zeigten, dass das Expressionsprodukt unlöslich exprimiert wurde. Weitere Expressionstests bei 25°C und 30°C zeigten keine erhöhte Expressionsausbeute und Löslichkeit des Proteins. Als Erklärung wurden ein Faltungsproblem oder eine falsche *codon usage* vermutet. Die *codon usage* gibt an, mit welcher Häufigkeit bestimmte Organismen verschiedene Codons des degenerierten Codes in ihrem Genom verwenden. So werden zum Beispiel bestimmte Codons von Arginin (R), Isoleucin (I) und Leucin (L) in *E. coli* sehr selten verwendet, was bei rekombinanter Expression von artfremden Proteinen zu Expressionsproblemen führen kann. Zur Behebung des Problems wurde EPhL-20 in die *E. coli* Stämme BL21 Origami B (3.1.2) und BL21 codon plus RIL (3.1.2) transformiert. Der Stamm BL21 codon plus RIL enthält zusätzliche Gene für die tRNA der seltenen Codons von Arginin, Isoleucin und Leucin. Die Expression in diesen beiden Stämmen konnten die Expressionsausbeute und Löslichkeit des Proteins nicht signifikant erhöhen.

Ein weiterer Grund für eine schlechte Expressionsausbeute kann eine sehr kurze Halbwertszeit eines rekombinanten Proteins in *E. coli* sein. Die Halbwertszeit eines Proteins in *E. coli* wird über einige N-terminale Aminosäuren gesteuert (Varshavsky *et al.*, 1997). Bestimmte Aminosäuren wie zum Beispiel Arginin, Lysin, Phenylalanin, Leucin, Tryptophan und Tyrosin können in N-terminaler Position die Halbwertszeit eines Proteins in *E. coli* auf unter zwei Minuten beschränken.

Eine Überprüfung der Sequenz von EPhL-20 ergab, dass in den ersten 20 Aminosäuren des Proteins sehr häufig Lysin und Leucin zu finden war. Eine Analyse des Bereichs mit den Programmen BLAST und SOPMA (4.6) ergab, dass dieser Bereich keine besondere Struktur und Funktion besitzen sollte. Für die bakteriolytische Funktion des Proteins ist dieser Bereich vermutlich entbehrlich. Im Anschluss an diese Analyse wurde das Protein um 19 Aminosäuren verkürzt. Die neue Variante des Proteins wurde als EPhL-20K bezeichnet. Erneute Expressionstests mit der verkürzten Variante des Proteins ergaben eine deutliche Verbesserung der Expressionsausbeute, welche in Abbildung 5-4 dargestellt ist.

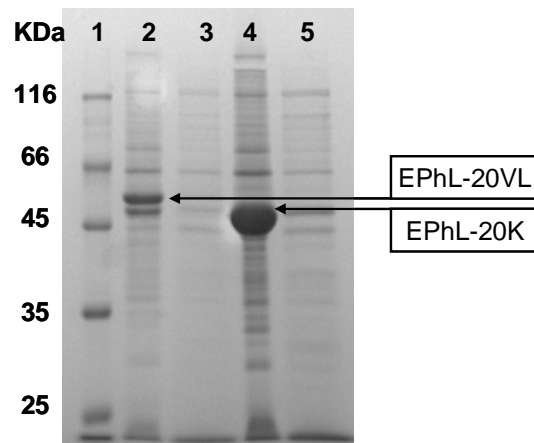


Abbildung 5-4

Die Abbildung zeigt die Expressionsausbeute im Vergleich zwischen dem Vollängenprotein und der verkürzten Variante. (1) Größenstandard, (2) Pellet EPhL-20VL, (3) Überstand EPhL-20VL, (4) Pellet EPhL-20K, (5) Überstand EPhL-20K

Wie in Abbildung 5-4 zu sehen ist, liegen die Expressionsprodukte von *ephL-20* und *ephL-20k* unlöslich in *inclusion bodies* vor. Aufgrund der höheren Ausbeute wurde nur mit der verkürzten Variante weitergearbeitet. Für EPhL-20K musste eine entsprechende Reinigungsmethode etabliert werden, um das Protein aus *inclusion bodies* zu gewinnen und zu renaturieren.

5.3.2 EPhL-25

Für die Expression des Proteins EPhL-25 wurde der Vektor pET-14b gewählt. Als Expressionsstamm diente *E. coli* HMS 174 (DE3). Wie auch das Protein EPhL-20, wurde EPhL-25 ohne Tag exprimiert. Expressions- und Löslichkeitstests zeigten, dass das Protein zwar schwach, aber dafür löslich exprimierte. Das Ergebnis des Löslichkeitstests ist in Abbildung 5-5 dargestellt.

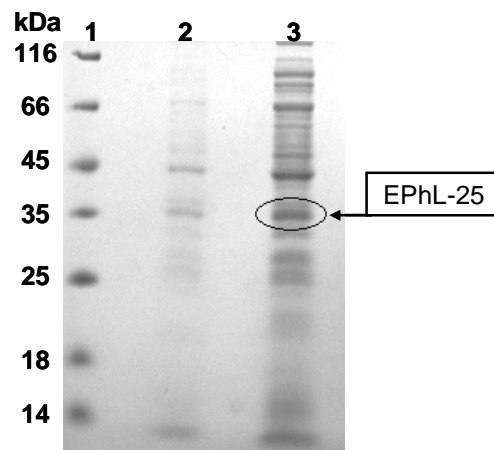


Abbildung 5-5

Die Abbildung zeigt das Ergebnis des Löslichkeitstests von EPhL-25. (1) Größenstandard, (2) Pellet, (3) Überstand

Aufgrund der löslichen Expression des Proteins konnte direkt mit der Etablierung einer Reinigungsmethode für das Protein begonnen werden.

5.4 Reinigung und Charakterisierung der Endolysine

Um die biophysikalischen Eigenschaften der beiden Endolysine zu bestimmen, mussten diese zunächst gereinigt werden. Des Weiteren musste eine Methode zur Gewinnung von Proteinen aus *inclusion bodies*, sowie deren Renaturierung entwickelt werden.

5.4.1 Reinigung von EPhL-20K

Da das Protein EPhL-20K in *E. coli* HMS 174 (DE3) unlöslich in *inclusion bodies* exprimiert wurde, musste es zunächst aus diesen isoliert werden. Dazu wurden die unlöslichen Bestandteile nach dem Zellaufschluss durch Zentrifugation von den löslichen Bestandteilen getrennt. Im Pellet des Zellaufschlusse sollten sich nur Zellwandtrümmer und die *inclusion bodies* mit EPhL-20K befinden. Im Anschluss wurden die *inclusion bodies* durch mehrmaliges Waschen mit Tris-Puffer mit dem Detergenz Triton X-100 von den Zellwandtrümmern gereinigt (4.3.1.1). Eine reine weiße Färbung des Pellets zeigte, dass die Zellwandtrümmer weitestgehend entfernt wurden. Das Pellet wurde in wenig Wasser aufgenommen. Die anschließende Solubilisierung wurde mit Hilfe von 1 M NaOH und einem Solubilisierungspuffer (3.8) mit 8 M Harnstoff durchgeführt, (4.3.1.2). Die Ausbeute an solubiliertem Protein aus einer 2 l Expressionskultur betrug circa 28 mg mit einer Konzentration von 1,4 mg/ml in Solubilisierungspuffer.

Im nächsten Schritt musste das solubilierte Protein renaturiert werden. Dazu sollte die Harnstoffkonzentration mittels einer 1:16 Verdünnung in Rückfaltungspuffer (3.8) soweit verringert werden, dass sich im Protein die ursprüngliche 3D-Struktur wieder ausbilden konnte (4.3.1.3). Eine mögliche Aggregatbildung kann während der Rückfaltung durch den Einsatz von L-Arginin verringert werden (Rudolph *et al.*, 1996), welches im Rückfaltungspuffer mit einer Konzentration von 300 mM vorlag. Nach der Rückfaltung konnte im Ansatz eine Proteinkonzentration von 0,08 mg/ml gemessen werden, was einer Ausbeute von etwa 91% entspricht. Die fehlenden 8% des Proteins gingen vermutlich durch Aggregation oder Präzipitation an den Wänden des Gefäßes verloren. Später musste die Rückfaltungsausbeute deutlich nach unten korrigiert werden, da nur etwa 25% des Proteins nativ gefaltet und aktiv waren.

Der Reinheitsgrad des Proteins nach der Rückfaltung war so hoch, dass auf eine weitere Reinigung des Proteins verzichtet wurde. Die Abbildung 5-6 zeigt den Reinheitsgrad des Proteins EPhL-20K nach der *inclusion body*-Reinigung.

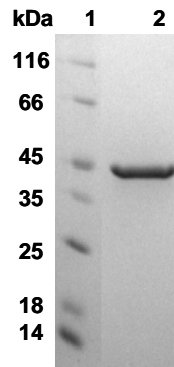


Abbildung 5-6

Die Abbildung zeigt eine SDS-PAGE mit EPhL-20K nach der inclusion body Reinigung, Solubilisierung und Rückfaltung. (1) Größenstandard, (2) rückgefaltetes EPhL-20K

Der Reinheitsgrad des Proteins EPhL-20K wurde anhand der SDS-PAGE auf über 95% geschätzt. Für weitere Experimente wurde versucht, das Protein durch Fällung mit Ammoniumsulfat und Wiederaufnahme in einem anderen Puffer umzupuffern. Dazu wurde die Proteinlösung mit Ammoniumsulfat in einer Endkonzentration von bis zu 1 M versetzt. Diese Ansätze wurden anschließend 2 Stunden bei 4°C mit 50 rpm gerührt. Das ausgefallene Protein wurde anschließend im entsprechenden Puffer wieder aufgenommen und erneut 2 Stunden bei 4°C und 50 rpm gerührt. Dabei fiel auf, dass selbst bei erneuter Wiederaufnahme in Rückfaltungspuffer nur maximal 25% des Proteins wieder in Lösung gingen. Es wurde daher vermutet, dass 75% des Proteins nach der Rückfaltung nicht in der aktiven nativen Form vorlagen. Um dies zu untersuchen wurde ein Lysetest (4.5.2.3) mit frisch rückgefaltetem, sowie gefällttem und wieder aufgenommenem Protein durchgeführt. Die spezifische Aktivität sollte dabei als Indiz für korrekte Faltung gelten. Der Test wurden gegen lebende *Enterococcus faecalis* ProCC 17 in ½ PBS durchgeführt, wobei jeweils 25 µg Protein eingesetzt wurden. Abbildung 5-7 zeigt die Unterschiede in der Lysegeschwindigkeit, welche darauf schließen lassen, dass nach der ersten Rückfaltung etwa 75% des Proteins fehlgefaltet in Lösung gehen. Somit muss die Ausbeute von 91% während der Rückfaltung auf etwa 25% korrigiert werden.

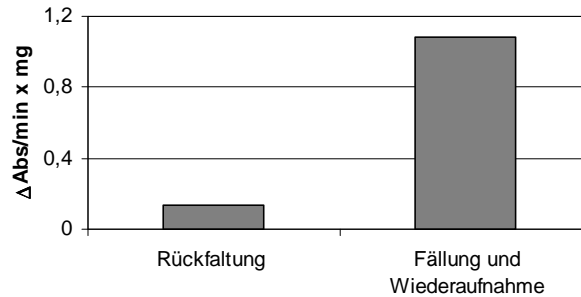


Abbildung 5-7

Unterschied der Lysegeschwindigkeit zwischen direkt rückgefaltetem und ausgefälltem und wieder solubilisiertem EPhL-20K. Test in ½ PBS pH-7,4; 2mM CaCl₂ bei 30°C gegen *Enterococcus faecalis* ProCC 17

Die Ammoniumsulfatfällung und Wiederaufnahme in Rückfaltungspuffer wurde als letzter Reinigungsschritt ins Reinigungsprotokoll aufgenommen.

Im Fließschema der Abbildung 5-8 ist die Reinigung des Endolysins EPhL-20K zusammengefasst. Die Ausbeute aus einer 2 l Expressionskultur nach allen Reinigungsschritten betrug etwa 6,4 mg rückgefaltetes, natives Protein. Das gereinigte Protein wurde zur biophysikalischen Charakterisierung und Aktivitätstestung verwendet.

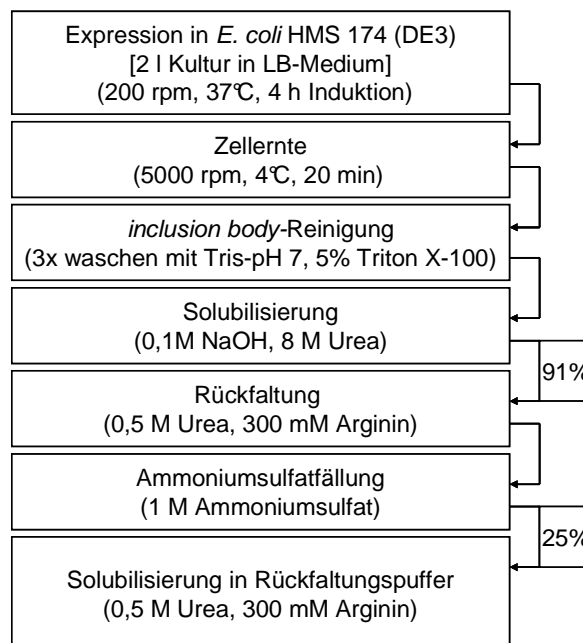


Abbildung 5-8

Fließschema der einzelnen Reinigungsschritte des Endolysins EPhL-20K

5.4.2 Reinigung von EPhL-25

Zur Gewinnung von EPhL-25 wurde eine Expressionstemperatur von 37°C gewählt. Nach Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,6 wurde mit Zugabe von 1 mM IPTG für 4 h induziert. Anschließend erfolgte die Ernte der Zellen. Nach Aufschluss der Zellen im Hochdruckhomogenisator (3.11) und Trennung der löslichen und unlöslichen Bestandteile wurde das Protein mittels Säulenchromatographie gereinigt.

Das Protein EPhL-25 besitzt in neutralem Puffer einen berechneten pI-Wert von 9,49. Daher bindet es unter diesen Bedingungen an die funktionellen Gruppen von Kationenaustauschersäulen. So lässt sich das Protein leicht von *E. coli*-Proteinen trennen, die im neutralen pH-Bereich einen neutralen bis sauren pI-Wert besitzen, und somit nicht an die funktionellen Gruppen des Kationenaustauschers binden (4.3.2.2). Die bei neutralem pH-Wert des Zellaufschlusspuffers (3.8) negativ geladene DNA und *E. coli*-Proteine des Zellaufschlusses wurden durch einen, vor den Kationenaustauscher geschalteten, Anionenaustauscher angereichert. Als Anionenaustauschersäule wurde eine Toyopearl GigaCap Q650M (3.11) mit einem Säulenvolumen von 36 ml verwendet. Der komplette Durchlauf des Anionenaustauschers wurde direkt über die Kationenaustauschersäule Toyopearl SP550C (3.11) mit einem Säulenvolumen von 15 ml geleitet. Die Elution des Zielproteins von der Kationenaustauschersäule wurde im Gradienten über 20 Säulenvolumen gegen Zellaufschlusspuffer mit 500 mM NaCl durchgeführt. Das Protein eluierte bei einer Salzkonzentration von circa 450 mM und einer Leitfähigkeit des Puffers von etwa 100 mS. Per SDS-Gel wurde überprüft, welche der Eluatfraktionen das Zielprotein enthielten. Die Fraktionen mit dem Zielprotein wurden anschließend vereinigt. In Abbildung 5-9 ist eine SDS-PAGE zu sehen, auf welcher verschiedene Fraktionen des Säulenlaufs aufgetragen sind.

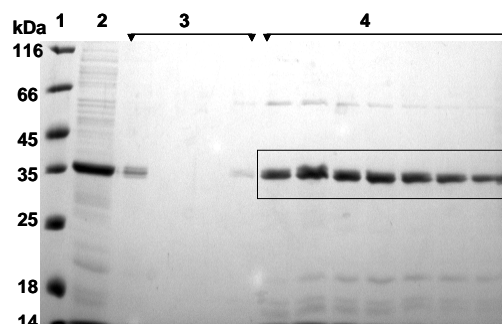


Abbildung 5-9

Auftrag verschiedener Fraktionen der Reinigung von EPhL-25 über eine SP550C-Säule auf eine SDS-PAGE. (1) Größenstandard, (2) Zellaufschluss/ Auftrag, (3) Durchlaufraktionen, (4) Eluatfraktionen

Der Reinheitsgrad des eluierten Proteins wurde nach der Reinigung auf mindestens 80% geschätzt und als ausreichend für eine weitere Charakterisierung betrachtet. Die Ausbeute an Zielprotein nach der Reinigung betrug aus einer Schüttelkolbenkultur von sechs Litern circa 10 mg Protein. Bei einer Gesamtproteinkonzentration von 16 mg/ml in 60 ml Zellaufschluss beträgt die prozentuale Ausbeute an Zielprotein nach der Reinigung etwa 1%. Die Abbildung 5-10 zeigt die einzelnen Schritte der Reinigung von EPhL-25 zusammengefasst.

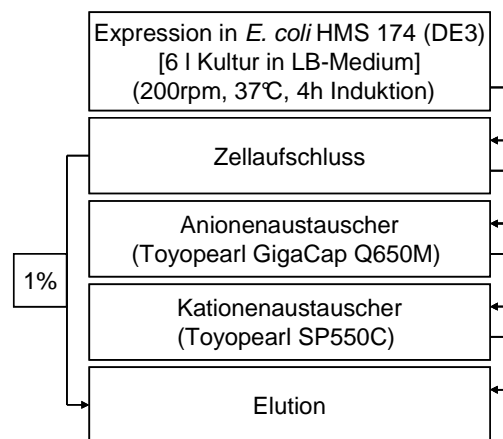


Abbildung 5-10

Fließschema der einzelnen Reinigungsschritte des Endolysins EPhL-25

5.4.3 Charakterisierung der Endolysine

Um Aussagen über die biophysikalischen Eigenschaften der beiden gereinigten Proteine EPhL-20K und EPhL-25 treffen zu können, wurden als nächstes verschiedene Untersuchungen zu deren Stabilität und Aktivität durchgeführt. Die Temperaturstabilität (4.4.6) und die chemische Stabilität der Proteine (4.4.5) wurden in einem ersten Schritt untersucht. Anschließend wurden verschiedene Versuche durchgeführt, um die optimalen Lysebedingungen festzulegen. Mit den optimalen Lysebedingungen sollte in der Folge die spezifische Aktivität (4.5.2.3), die minimale bakterizide Konzentration (MBC; 4.5.2.4) und die minimale inhibitorische Konzentration (MIC; 4.5.2.5) der Endolysine ermittelt werden.

5.4.3.1 Thermostabilität

Ziel dieser Arbeit war es, Proteine zu finden, die sich für den therapeutischen Einsatz zur Bekämpfung von Enterokokken eignen. Infektionen durch Enterokokken treten hauptsächlich intrakorporal auf. Aus diesem Grund sollte als erstes untersucht

werden, ob die Proteine ihre Stabilität bei einer Körpertemperatur von mindestens 37°C behalten, oder schon zu denaturieren beginnen.

Für den Versuch wurden 150 mM Natriumphosphatpuffer mit 150 mM Natriumchlorid und einem pH-Wert von 7,5 verwendet, weil Phosphatpuffer im Gegensatz zu Tris-Puffer seinen pH-Wert in Abhängigkeit der Temperatur nicht stark ändert. Die Lichtstreuung der Proteinlösung durch Aggregatbildung bei steigender Temperatur wurde bei einer Wellenlänge von 360 nm während des Testverlaufs aufgezeichnet. In der Abbildung 5-11 ist die Zunahme der Lichtstreuung durch Aggregation der beiden Endolysine gegen die Temperatur aufgetragen.

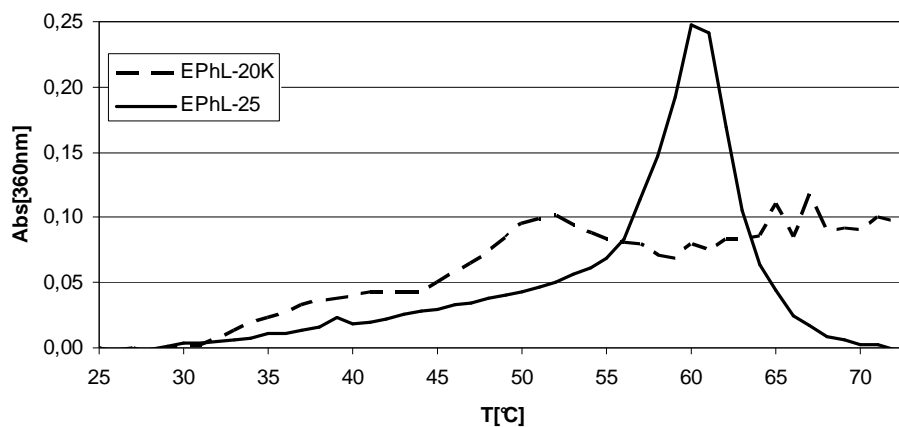


Abbildung 5-11

Messung der thermischen Stabilität von EPhL-20K und EPhL-25. Für beide Proteine wurde die Zunahme der Absorption gegen die Temperatur aufgetragen. 150 mM Natriumphosphatpuffer mit 150 mM NaCl, Proteinkonzentration 0,1 mg/ml, Heizrate 1°C/min, Schichtdicke 1 cm

In Abbildung 5-11 ist zu sehen, dass das Protein EPhL-20K eine geringere thermische Stabilität aufweist als EPhL-25. EPhL-20K beginnt bereits bei Temperaturen zwischen 30°C und 40°C zu aggregieren, während EPhL-25 bis zu einer Temperatur von circa 55°C stabil bleibt. Damit wäre EPhL-20K für eine intrakorporale Anwendung als Therapeutikum nicht geeignet. Obwohl EPhL-25 erst bei einer Temperatur von 55°C zu aggregieren beginnt, kann es sein, dass ein Verlust der Aktivität mit steigender Temperatur schon eher stattfindet. Um genau einschätzen zu können, ob die Proteine bis zu ihrer Aggregation in einem nativ gefalteten und aktiven Zustand sind, müssten Aktivitätsbestimmungen bei verschiedenen Temperaturen vorgenommen werden. Um die Stabilität besser zu analysieren, wäre eine Bestimmung der Sekundärstrukturveränderung mit steigender Temperatur am CD-Spektrometer sinnvoll.

5.4.3.2 Guanidinium induzierte Denaturierungsübergänge

Die chemische Stabilität der Proteine wurde untersucht, indem diese mit Guanidin-Hydrochlorid (Gdn-HCl) in ansteigender Konzentration inkubiert wurden (4.4.5). Die Denaturierung der Proteine wurde per Fluoreszenzspektroskopie bei den Anregungswellenlängen (λ_{ex}) 280 nm und 295 nm verfolgt. Als Emissionswellenlänge (λ_{em}) wurde die Wellenlänge gewählt, bei welcher der größte Intensitätsunterschied zwischen nativem und entfaltetem Protein zu sehen war (siehe Tabelle 5-8).

Tabelle 5-8

Messwellenlängen ($\lambda_{ex}/\lambda_{em}$) für die Denaturierungsübergänge von EPhL-20K und EPhL-25

	Anregungswellenlänge (λ_{ex})	Emissionswellenlänge (λ_{em})
EPhL-20K	280 nm	329 nm
	295 nm	329 nm
EPhL-25	280 nm	339 nm
	295 nm	341 nm

In der Abbildung 5-12 A und B ist die relative Fluoreszenz der gemessenen Emission der Proteine EPhL-20K und EPhL-25 gegen die Konzentration des Denaturierungsmittels aufgetragen.

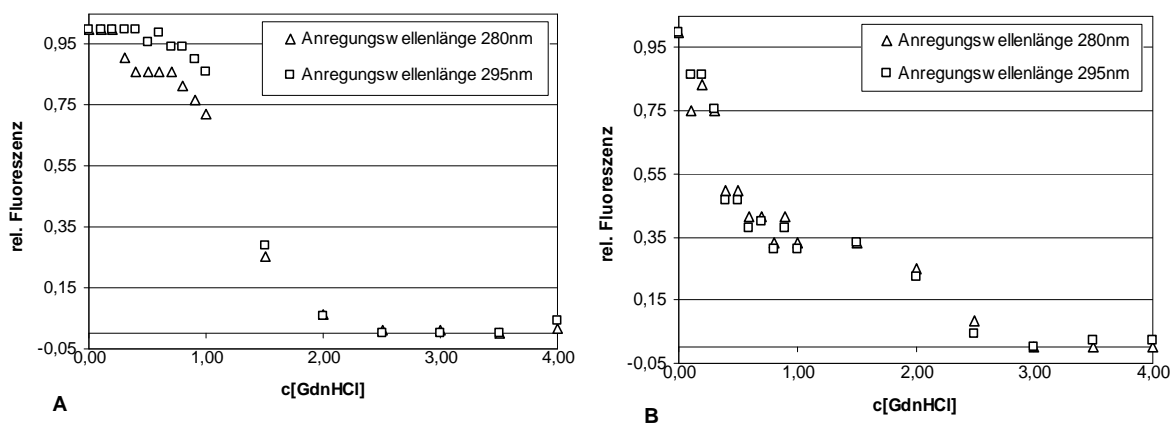


Abbildung 5-12

A) Denaturierungsübergang von EPhL-20K. T = 25°C, Inkubationszeit: 3 Tage, Puffer: 25mM Tris pH 7,5 mit 400 mM NaCl, c = 35 µg/ml, λ_{ex} = 280 nm und 295 nm, λ_{em} = 329 nm, Δ_{ex} = 2,5 nm, Δ_{em} = 2,5 nm

B) Denaturierungsübergang von EPhL-25. T = 25°C, Inkubationszeit: 3 Tage, Puffer: 25mM Tris pH 7,5 mit 400 mM NaCl, c = 35 µg/ml, λ_{ex} = 280 nm und 295 nm, $\lambda_{em}(280nm)$ = 339 nm, $\lambda_{em}(295nm)$ = 341 nm, Δ_{ex} = 2,5 nm, Δ_{em} = 2,5 nm

Bei dem Protein EPhL-20K (Abbildung 5-12 A) zeigt die Abnahme der relativen Fluoreszenz bei $\lambda_{em} = 329$ nm zeigt für $\lambda_{ex} = 280$ nm einen zweiphasigen Übergang. Der Übergangsmittelpunkt der ersten Phase liegt bei circa 0,3 M Gdn-HCl, während der Übergangsmittelpunkt der zweiten Phase bei circa 1,5 M Gdn-HCl liegt. Die Abnahme der relativen Fluoreszenz bei $\lambda_{em} = 329$ nm für $\lambda_{ex} = 295$ nm zeigt einen einphasigen Übergang, dessen Übergangsmittelpunkt bei circa 1,4 M Gdn-HCl liegt, und mit dem zweiten Übergang bei $\lambda_{ex} = 280$ nm übereinstimmt. Aufgrund der relativ gleichmäßigen Verteilung der Tyrosine und Tryptophane innerhalb des Proteins lässt sich keine Aussage darüber treffen, welche der Domänen des Proteins zuerst denaturiert. Bei dem Protein EPhL-25 (Abbildung 5-12 B) ist ein zweiphasiger Übergang für $\lambda_{ex} = 280$ nm und 295 nm zu beobachten. Der Übergangsmittelpunkt der ersten Denaturierungsphase liegt bei einer Gdn-HCl-Konzentration von circa 0,35 M während der Übergangsmittelpunkt der zweiten Denaturierungsphase bei einer Konzentration von circa 2,1 M Gdm-HCl liegt. Tyrosin, welches bei $\lambda_{ex} = 280$ nm zusammen mit Tryptophan angeregt wird, ist bei EPh-25 gleichmäßig über die gesamte Sequenz verteilt. Tryptophan, welches bei $\lambda_{ex} = 295$ nm allein angeregt wird, ist zu 80% in der lytischen Domäne des Proteins zu finden. Da die erste Phase des Übergangs eine Änderung von 70% des gesamten Übergangs ausmacht, kann vermutet werden, dass es sich bei dieser Phase um die Denaturierung der lytischen Domäne handelt. Die zweite Phase des Übergangs wäre dann die Denaturierung der CBD.

5.4.3.3 Bestimmung der optimalen Lysebedingungen

Zur Charakterisierung der Lyseaktivität der beiden Proteine mussten zunächst die optimalen Lysebedingungen ermittelt werden. Dies geschah durch eine Reihe von Flüssigzelllysetests (4.5.2.3), bei welchen der pH-Wert, zugesetzte Ionen, sowie die Wachstumsphase der zu lysierenden Zellen im Ansatz variiert wurden.

5.4.3.3.1 Bestimmung der Ionenabhängigkeit

Von einigen lytischen Proteinen, zum Beispiel Zink-Metalloproteasen, ist bekannt, dass ihre Aktivität nur gewährleistet ist, wenn bestimmte zweiwertige Metallionen im aktiven Zentrum der EAD gebunden sind. Da die EAD beider Proteine Homologie zu

Zink-abhängigen Amidasen aufweist, soll untersucht werden, ob eine solche Abhängigkeit auch für die beiden Proteine EPhL-20K und EPhL-25 vorliegt.

Dies wurde durch die Zugabe von je 2 mM CaCl_2 , CuCl_2 , MgCl_2 , ZnSO_4 , CoCl_2 , MnCl_2 , BaCl_2 , FeCl_2 und KCl (einwertiges K^+ -Ion) zum Flüssigzellyseansatz überprüft. Als Testzellen kamen hitzeinaktivierte *Enterococcus faecalis* ProCC 17 für EPhL-20K und *Enterococcus faecium* ProCC 880 für EPhL-25 zum Einsatz. Die eingesetzten hitzeinaktivierten Bakterien wurden in $\frac{1}{2}$ PBS-Puffer pH 7,4 resuspendiert und auf eine $\text{OD}_{600} = 1$ eingestellt. Der Test wurde durch Zugabe von 25 μg des jeweiligen Proteins zum Ansatz gestartet.

Bei dem Versuch zeigte sich, dass BaCl_2 , CoCl_2 und FeCl_2 zu einem sehr raschen Aggregieren der Testzellen führten, woraufhin diese Salze nicht weiter getestet wurden. Die Auswirkungen der anderen Metallsalze auf die Lysegeschwindigkeit sind in Abbildung 5-13 dargestellt.

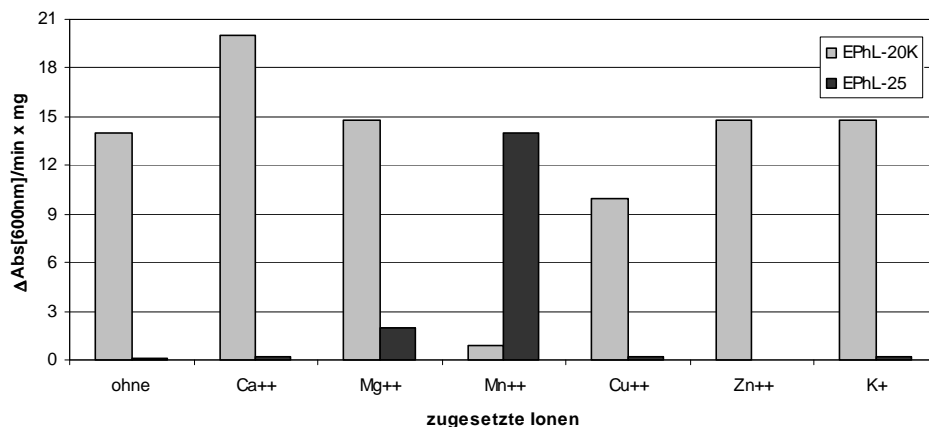


Abbildung 5-13

Lysegeschwindigkeit der Proteine EPhL-20K und EPhL25 in Abhängigkeit verschiedener zugewetzter Ionen (Einfachbestimmung). Puffer: $\frac{1}{2}$ PBS pH 7,4; T = 30°C, c = 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$, Teststämme: *Enterococcus faecalis* ProCC 17 (EPhL-20K) und *Enterococcus faecium* ProCC 880 (EPhL-25)

Wie in der Abbildung 5-13 zu sehen ist, steigt die Lysegeschwindigkeit von EPhL-20K lediglich durch die Zugabe von CaCl_2 leicht an. Durch die Zugabe von MnCl_2 sinkt die Lysegeschwindigkeit von EPhL20K fast auf fast Null. Dem Lysepuffer von EPhL-20K wird bei allen weiteren Versuchen CaCl_2 zugewetzt.

EPhL-25 zeigt in diesem Test nur bei der Zugabe von MnCl_2 eine signifikante Aktivität. Aufgrund der starken Abhängigkeit der Lyseaktivität des Proteins EPhL-25 von der Zugabe von Mangan, wurde getestet, in welcher optimalen Konzentration MnCl_2 zugewetzt werden muss. Für diesen Test wurden lebende *Enterococcus*

faecium ProCC 880 verwendet, die bei einer $OD_{600} = 1$ geerntet, und in $\frac{1}{2}$ PBS-Puffer pH 7,4 mit der entsprechenden $MnCl_2$ -Konzentration resuspendiert wurden. Die Ergebnisse dieses Versuchs sind in Abbildung 5-14 dargestellt.

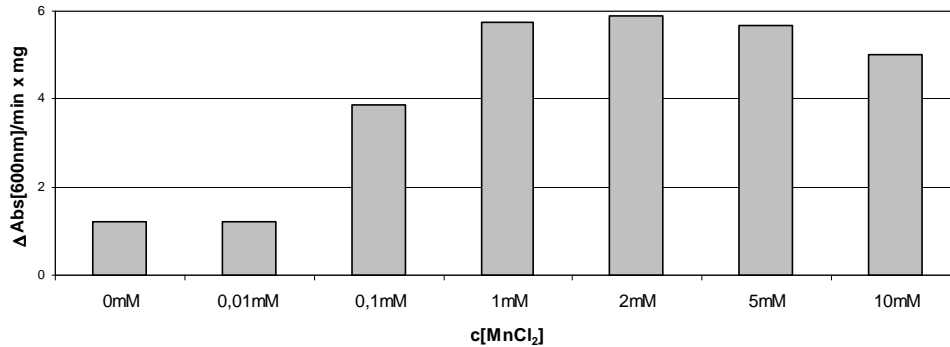


Abbildung 5-14

Lysegeschwindigkeiten von EPhL-25 bei verschiedenen $MgCl_2$ Konzentration in Puffer (Einfachbestimmung) Puffer: $\frac{1}{2}$ PBS pH 7,4; T = 30°C, c = 25 μ g/ml, Teststamm: *Enterococcus faecium* ProCC 880

Der Test zeigte, dass bei einer Konzentration von 1 mM $MnCl_2$ die maximale Aktivität erreicht ist. Eine höhere Konzentration bewirkt keine weitere Steigerung der Aktivität. Ab einer Konzentration von 10 mM wirkt sich $MnCl_2$ eher negativ auf die Aktivität aus. Weitere Tests zeigten, dass die Lysegeschwindigkeit von EPhL-25 höher war, wenn 1 mM $MnCl_2$ eine Stunde vor Testbeginn zur Proteinlösung gegeben wurden, als wenn $MnCl_2$ direkt in den Lysepuffer gemischt wurde (Ergebnisse nicht dargestellt). Bei allen weiteren Tests wurde EPhL-25 eine Stunde vor Beginn des Tests mit 1 mM $MnCl_2$ versetzt.

5.4.3.3.2 Bestimmung des pH-Optimums

Um eine Entscheidung über das zu verwendende Puffersystem und den optimalen pH-Wert treffen zu können, wurde getestet, bei welchem pH-Wert die Proteine EPhL-20K und EPhL-25 die höchsten Lysegeschwindigkeiten aufweisen. Dazu wurde ein Flüssigzelllysetest mit hitzeinaktivierten *Enterococcus faecalis* ProCC 17 für EPhL-20K und *Enterococcus faecium* ProCC 880 für EPhL-25 durchgeführt. Als Puffer kam ein Gemisch bestehend aus 25 mM MES, 25 mM MOPS und 25 mM Tris zum Einsatz. Dieses Puffergemisch lässt sich auf pH-Werte zwischen 5 und 9 einstellen. Die hitzeinaktivierten Zellen wurden in Puffer auf OD 1 eingestellt, und anschließend mit 25 μ g Protein versetzt. Die Lyse wurde für 30 min im UV/VIS-Photometer detektiert. Nach den Ergebnissen aus 5.4.3.3.1 wurde für die Versuche

mit EPhL-20K Puffer mit 2 mM CaCl₂ verwendet, während EPhL-25 eine Stunde vor dem Test mit 1 mM MnCl₂ versetzt wurde. Abbildung 5-15 zeigt die Ergebnisse dieser Lysetests.

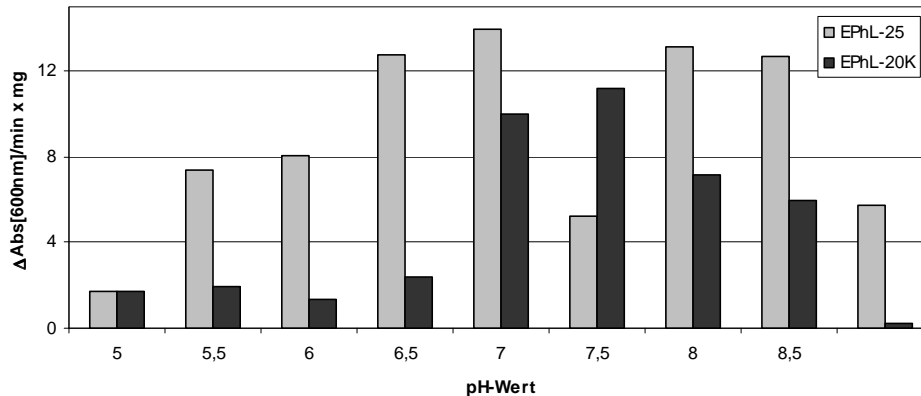


Abbildung 5-15

Lysegeschwindigkeiten der Proteine EPhL-20K und EPhL-25 bei unterschiedlichen pH-Werten. (Mittelwerte aus Doppelbestimmung), Puffer: 25 mM MES, 25 mM MOPS und 25 mM Tris, T = 30°C, c = 25 µg/ml, Teststämme: *Enterococcus faecalis* ProCC 17 (EPhL-20K) und *Enterococcus faecium* ProCC 880 (EPhL-25)

Wie in der Abbildung 5-15 zu sehen ist, besitzt das Protein EPhL-20K zwei pH-Optima bei den pH-Werten 6,5-7 und 8-8,5. Das Protein EPhL-25 zeigt die größte Lysegeschwindigkeit bei einem pH-Wert von 7,5. Für das Protein EPhL-20K wurde ½ PBS oder ½ TBS mit einem pH-Wert von 7 und 2 mM CaCl₂, für EPhL-25 ½ PBS oder ½ TBS mit einem pH-Wert von 7,5 als Standardlysepuffer gewählt.

5.4.3.3 Lysegeschwindigkeit von Enterokokken in verschiedenen Wachstumsphasen

Bakterienzellen sind in verschiedenen Wachstumsphasen unterschiedlich anfällig für lytische Aktivitäten von Proteinen. Dies lässt sich auf den Zustand der Zellwand während, beziehungsweise kurz nach der Zellteilung zurückführen. Um die maximale Lysegeschwindigkeit des Proteins zu erreichen sollte festgestellt werden, in welcher Wachstumsphase die *Enterococcus faecalis*- beziehungsweise *Enterococcus faecium*-Zellen besonders gut lysiert werden. Dafür wurde zunächst eine Wachstumskurve der Teststämme aufgenommen. Für den Test wurde steriles BHI-Medium 1:100 mit einer stationären Übernachtskultur der Teststämme beimpft und bei 37°C schüttelnd inkubiert. Anschließend wurde die Zunahme der OD₆₀₀ in Abhängigkeit der Zeit aufgezeichnet. Zusätzlich wurden mehrere Verdünnungen

einer Kultur mit $OD_{600} = 1$ ausplattiert und ausgezählt. Die Zellzahl beider Stämme bei einer $OD_{600} = 1$ beträgt circa 10^9 cfu/ml. Die Ergebnisse der Messung der Wachstumskurve sind in Abbildung 5-16 dargestellt

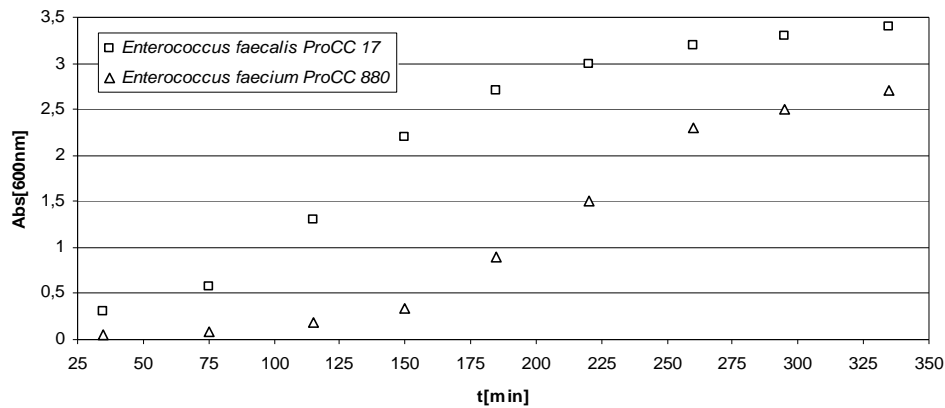
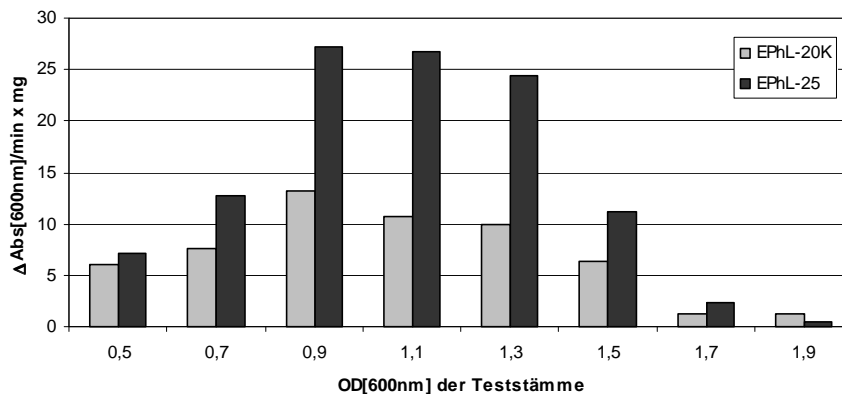


Abbildung 5-16

Wachstumskurve der Stämme *Enterococcus faecalis* ProCC 17 und *Enterococcus faecium* ProCC 880.

In der Abbildung 5-16 ist zu sehen, dass *Enterococcus faecalis* ProCC 17 sich etwa von 75 min bis 250 min nach dem Animpfen der Kultur in der exponentiellen Wachstumsphase befindet. *Enterococcus faecium* ProCC 880 wächst zwischen 150 min und 275 min nach dem Animpfen mit exponentieller Geschwindigkeit.

Im Anschluss an die Messung der Wachstumskurve von *Enterococcus faecalis* ProCC 17 und *Enterococcus faecium* ProCC 880 wurde untersucht, wie sich die Lysegeschwindigkeit in Abhängigkeit der Wachstumsphase der Testzellen verändert. Dazu wurden die Testzellen in BHI Medium angezogen und während der logarithmischen Wachstumsphase bei OD_{600} von 0,5; 0,7; 0,9; 1,1; 1,3; 1,5, 1,7 und 1,9 Proben entnommen. Die Zellen wurden abzentrifugiert und im entsprechenden Probenpuffer für das jeweilige Protein wieder aufgenommen. *Enterococcus faecalis* ProCC 17 diente als Teststamm für EPhL20K, *Enterococcus faecium* ProCC 880 für EPhL-25. In den Flüssigzelllysetest wurden 25 μ g des jeweiligen Proteins eingesetzt. In Abbildung 5-17 sind die Ergebnisse des Versuchs dargestellt.

**Abbildung 5-17**

Lysegeschwindigkeiten von EPhL-20K und EPhL-25 in Abhängigkeit von der Wachstumsphase der Testzellen. T = 30°C, c = 25 µg/ml, Teststäme: *Enterococcus faecalis* ProCC 17 (EPhL-20K) und *Enterococcus faecium* ProCC 880 (EPhL-25) Puffer (EPhL-20K): ½ PBS pH 7 mit 2 mM CaCl₂, Puffer (EPhL-25): ½ PBS pH 7,5, EPhL-25 1 h vor Testbeginn mit 1 mM MnCl₂ inkubiert

Das Maximum der Lysegeschwindigkeit wird bei beiden Proteinen bei Testzellen erreicht, welche bei einer OD₆₀₀ von 0,9 bis 1,3 geerntet wurden. Zu diesem Zeitpunkt befinden sich die Testzellen in der frühen exponentiellen Wachstumsphase, d. h. dass sich zu diesem Zeitpunkt sehr viele Zellen in Teilung befinden.

5.4.3.4 Aktivitätsbestimmung

In den vorangegangenen Versuchen wurden die optimalen Lysebedingungen, also der pH-Wert, notwendige Ionen und die Wachstumsphase der Testzellen für die Proteine EPhL-20K und EPhL-25 festgelegt. Der Lysepuffer von EPhL-20K setzt sich wie folgt zusammen: ½ PBS pH 7; 2 mM CaCl₂; der von EPhL-25: ½ PBS pH 7,5. Das Protein EPhL-25 muss eine Stunde vor Beginn eines Tests mit 1 mM MnCl₂ versetzt werden um seine maximale Aktivität zu erreichen. Beide Proteine zeigen ihr Maximum der Lysegeschwindigkeit gegen Enterokokken in der logarithmischen Wachstumsphase bei einer OD_{600nm} zwischen 0,9 und 1,3. Im Folgenden sollte die spezifische Aktivität der beiden Proteine bestimmt werden. Die spezifische Aktivität kann aus der Abnahme der Absorption bei 600nm im Flüssigzelllysetest pro Minute und eingesetzter Proteinmenge errechnet werden. Die Berechnung der spezifischen Aktivität erfolgte wie in Formel 5-1 abgebildet.

Spezifische Aktivität = $(A_0 - A_t) / (t \cdot x) = \Delta A / (t \cdot x)$

- A_0 = Absorption bei 600nm zum Zeitpunkt $t = 0$ (min)
- A_t = Absorption bei 600nm zum Zeitpunkt t (min)
- t = Zeit in min
- x = Proteinmenge in mg

Formel 5-1

Berechnung der spezifischen Aktivität

Zur Messung der spezifischen Aktivität wurden verschiedene Mengen an Protein in einen Flüssigzelllysetest (4.5.2.3) eingesetzt. Als Teststämme kamen lebende *Enterococcus faecalis* ProCC 17 für EPhL-20K und *Enterococcus faecium* ProCC 880 für EPhL-25 zum Einsatz. Die Abnahme der Absorption der Zellsuspension wurde gegen die Zeit aufgetragen. Die Lyse-diagramme für beide Proteine sind in Abbildung 5-18 zu sehen.

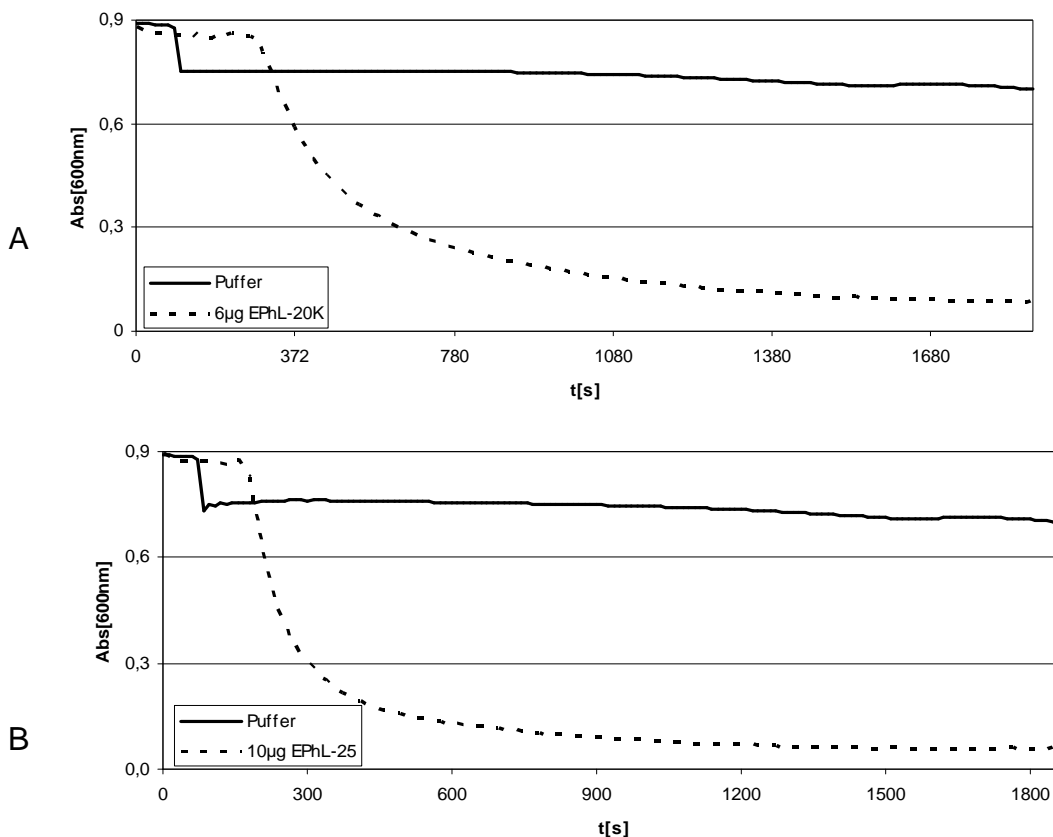


Abbildung 5-18

Lyseaktivität von EPhL-20K (A) und EPhL25 (B). $T = 30^\circ\text{C}$, Teststämme: *Enterococcus faecalis* ProCC 17 (EPhL-20K) und *Enterococcus faecium* ProCC 880 (EPhL-25). Puffer (EPhL-20K): $\frac{1}{2}$ PBS pH 7 mit 2 mM CaCl_2 , Puffer (EPhL-25): $\frac{1}{2}$ PBS pH 7,5, EPhL-25 1 h vor Testbeginn mit 1 mM MnCl_2 inkubiert

Für das Protein EPhL-20K wurde die maximale Lysegeschwindigkeit bei einer eingesetzten Menge von 6 µg/ml erreicht. Eine Erhöhung der Proteinkonzentration führte zu keiner weiteren Steigerung der Lysegeschwindigkeit. Die maximale spezifische Aktivität des Proteins EPhL-20K gegen *Enterococcus faecalis* ProCC 17, welche sich aus der Steigung des Diagramms und der zugegebenen Proteinmenge errechnet, liegt somit bei $15,7 \Delta\text{Abs}_{[600\text{nm}]} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$. Bei EPhL-25 ist die maximale Lysegeschwindigkeit mit der Zugabe von 10 µg Protein zu 1 ml Testansatz mit *Enterococcus faecium* ProCC 880 erreicht. Anhand des Lysediagramms konnte für dieses Protein eine spezifische Aktivität von $29,4 \Delta\text{Abs}_{[600\text{nm}]} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ errechnet werden. Damit besitzt das Protein EPhL-25 eine höhere spezifische Aktivität zu *Enterococcus faecium* als EPhL-20K zu *Enterococcus faecalis*.

5.4.3.5 Spezifitätsbestimmung

Da es Ziel der Arbeit war, ein lytisches Protein zu finden, welches sowohl *Enterococcus faecalis* als auch *Enterococcus faecium* lysieren sollte, wurde die Lysepezifität der beiden Proteine in einem Plattenlysetest mit hitzeinaktivierten Bakterien (4.5.2.1) bestimmt. Dazu wurden 2,5 µg des jeweiligen Proteins auf Testplatten aufgebracht, welche die in den Agar eingegossenen Testzellen enthielten. Anschließend wurden die Testplatten für 12 Stunden bei 30°C inkubiert. Die Auswertung erfolgte über die Größe der Lysehöfe an der Aufbringungsstelle. Größe und Klarheit der Lysehöfe wurde als Indikator für die Spezifität der Proteine zu dem jeweiligen Teststamm gewertet. Kleine und schwach sichtbare Lysehöfe wurden mit (+) markiert, mittelgroße, gut sichtbare mit (++) , und große, sehr klare Lysehöfe mit (+++). Wenn kein Lysehof zu sehen war, wurde der Ansatz mit (-) markiert. Die Ergebnisse des Plattenlysetests sind in Tabelle 5-9 aufgelistet.

Tabelle 5-9

Ergebnisse des Plattenlysetests mit EPhL-20K und EPhL-25 gegen verschiedene *Enterococcus faecalis*- und *Enterococcus faecium*-Isolate. Legende: (-) keine Lyse, (+) Kleine und schwach sichtbare Lysehöfe, (++) mittelgroße, gut sichtbare Lysehöfe, (+++) große, sehr klare Lysehöfe

Stamm	ProCC-Nr	EPhL-25	EPhL-20K
<i>Enterococcus faecium</i>	880	+++	-
	1177	+++	-
	1506	+++	-
	1553	+++	-
	1563	+++	-
	1564	+++	-
	1565	+++	-
	1568	+++	-
	1570	+++	-
	1634	+++	-
<i>Enterococcus faecalis</i>	17	++	+++
	1176	-	+++
	1505	++	+++
	1507	++	+++
	1552	-	+++
	1566	+++	+++
	1567	++	+++
	1571	++	+++
	1578	-	+++
	2465	+++	+++

Es wurde erwartet, dass das Protein EPhL-20K eine höhere Spezifität für *Enterococcus faecalis*-Stämme aufweist, da es einem Phagen entstammt, welcher auf diesem Stamm isoliert wurde. In Tabelle 5-9 ist zu sehen, dass EPhL-20K wie erwartet nur bei den Isolaten von *Enterococcus faecalis* eine hohe Lyse-spezifität zeigt, während die Isolate von *Enterococcus faecium* nicht lysiert werden. Für EPhL-25 wurde erwartet, dass die Lyse-spezifität für *Enterococcus faecium* höher ist, als die für *Enterococcus faecalis*, da das Protein aus einem Phagen stammt, der auf *Enterococcus faecium* isoliert wurde. Die Lyse-spezifität von EPhL-25 gegenüber *Enterococcus faecium* war im Test deutlich höher als die gegenüber *Enterococcus faecalis*. Alle getesteten *Enterococcus faecium* Stämme wurden sehr gut lysiert, während von den getesteten *Enterococcus faecalis* Stämmen nur sieben von zehn gut oder sehr gut lysiert wurden.

5.4.3.6 Bestimmung der minimalen bakteriziden Konzentration

Um die therapeutische Eignung der beiden Proteine EPhL-20K und EPhL-25 abschätzen zu können, sollte von beiden Proteinen die minimale bakterizide Konzentration (MBC; 4.5.2.4) bestimmt werden. Diese gibt die minimale Konzentration einer Substanz an, bei der ein bestimmter Teil der Zielzellen abgetötet wird. Anhand dieses Wertes kann ihre bakteriolytische Aktivität mit anderen therapeutisch wirksamen Substanzen, wie etwa Antibiotika, verglichen werden. Um vergleichbare Werte für beide Proteine zu erhalten, wurden als Teststämme für beide Proteine die Stämme *Enterococcus faecalis* ProCC 17 und *Enterococcus faecium* ProCC 880 verwendet. Von diesen Teststämmen wurden pro Ansatz 10^5 cfu/ml vorgelegt, und mit verschiedenen Konzentrationen der Proteine 60 Minuten bei 30°C inkubiert. Durch anschließendes Ausplattieren der Ansätze konnte festgestellt werden, wie viele der Testzellen den Versuch überlebt haben. Ziel war es, mit einem Protein eine vollständige Lyse aller Testzellen zu erreichen. Die Abbildung 5-19 zeigt die Ergebnisse der MBC-Messung für das Protein EPhL-20K.

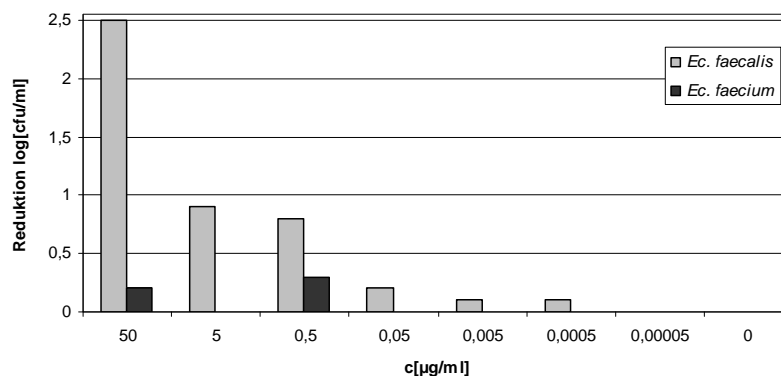


Abbildung 5-19

MBC-Messung von EPhL-20K gegen *Enterococcus faecalis* ProCC 17 und *Enterococcus faecium* ProCC 880. T = 30°C, t = 60 min

Aus der Abbildung 5-19 kann man entnehmen, dass EPhL-20K das gesetzte Ziel einer vollständigen Lyse beider Teststämmen nicht erfüllt hat. Das Protein hat bei einer Konzentration von 50 µg/ml 99,5% der eingesetzten 10^5 *Enterococcus faecalis* ProCC 17 Zellen getötet. Das bedeutet, dass etwa 500 Testzellen den Versuch überlebt haben. Gegen *Enterococcus faecium* ProCC 880 konnte im Versuchsansatz keine bakterizide Wirkung festgestellt werden. Dieses Ergebnis bestätigt die Ergebnisse des Versuchs zur Bestimmung der Lyse-spezifität, bei welchem EPhL-20K keines der getesteten *Enterococcus faecium*-Isolate lysieren konnte.

Abbildung 5-20 zeigt die Ergebnisse der MBC-Messung für das Protein EPhL-25.

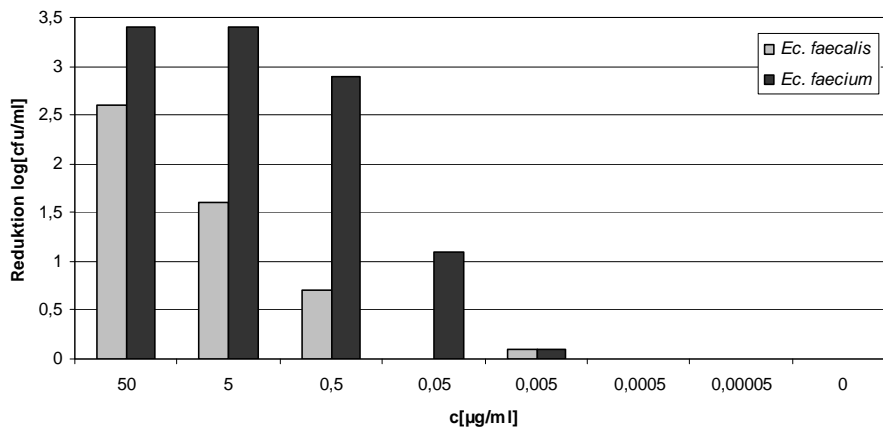


Abbildung 5-20

MBC-Messung von EPhL-25 gegen *Enterococcus faecalis* ProCC 17 und *Enterococcus faecium* ProCC 880. T = 30°C, t = 60 min

Wie in Abbildung 5-20 zu sehen, war auch EPhL-25 nicht in der Lage beide Teststämme vollständig zu lysieren, konnte aber gegenüber EPhL-20K eine deutliche Reduktion beider Teststämme bei hohen Konzentrationen erreichen. Das Protein erreicht in den Ansätzen mit dem Teststamm *Enterococcus faecalis* ProCC 17 eine Reduktion der Zellzahl um 99,6% bei einer Proteinkonzentration von 50 µg/ml. Die gemessene Lyserate bedeutet ein Überleben von etwa 400 Testzellen im Ansatz. Der Teststamm *Enterococcus faecium* ProCC 880 konnte bei einer Proteinkonzentration von 5 µg/ml zu 99,94% lysiert werden, was ein Überleben von etwa 60 Zellen des Teststammes bedeutet.

Das Ziel einer vollständigen Lyse von 100% der Testzellen wurde in diesem Versuch weder mit EPhL-20K noch mit EPhL-25 erreicht, wobei EPhL-25 diesem Ziel viel näher kam als EPhL-20K. Es wurde vermutet, dass dies an der Bildung eines Biofilms bei einigen eingesetzten Testzellen lag, welche die Zugänglichkeit der Peptidoglykanschicht für die Proteine erschwert oder verhindert. Um auszuschließen, dass es sich bei Überlebenden Zellen um Verunreinigungen durch andere Bakterien handelt, wurden diese erneut in BHI Medium angezogen und mit den Proteinen EPhL-20K und EPhL-25 lysiert. Die Ergebnisse der ersten MBC-Messung konnten bei dieser Wiederholung reproduziert werden.

5.4.3.7 Bestimmung der minimalen inhibitorischen Konzentration

Die minimale inhibitorische Konzentration (*minimal inhibitory concentration*, MIC) gibt die minimale Konzentration einer Substanz an, bei der das Wachstum der Zielzellen unterdrückt wird. Dieser Wert ist wichtig, um den therapeutischen Wert eines Proteins im Vergleich mit anderen Wirkstoffen abschätzen zu können. Die MIC wurde nach der in 4.5.2.5 beschriebenen Methode für die beiden Proteine EPhL-20K und EPhL-25 in verschiedenen Testmedien bestimmt. Aus Versuchen von Forchheim (2009) war bekannt, dass Endolysine in verschiedenen Anzuchtmedien unterschiedlich stark gehemmt werden. Daher wurde der Versuch in verschiedenen Medien durchgeführt. Als Medien für diesen Test kamen BHI-Medium, LB-Medium, Peptonwasser und Müller-Hinton II Medium zur Anwendung. Als Teststämme wurden für beide Proteine *Enterococcus faecalis* ProCC 17 und *Enterococcus faecium* ProCC 880 verwendet.

Die Auswertung der Testansätze ergab, dass das Protein EPhL-20K in den Medien gehemmt wurde, beziehungsweise die Testzellen in den verwendeten Medien nicht wuchsen (Ergebnisse nicht dargestellt). Für das Protein EPhL-25 konnte nur in BHI-Medium mit *Enterococcus faecium* ProCC 880 eine geringe inhibitorische Wirkung oberhalb einer Konzentration von 0,5 µg/ml festgestellt werden. In der folgenden Abbildung 5-21 sind die Ergebnisse für den Ansatz mit EPhL-25 in BHI-Medium mit *Enterococcus faecium* ProCC 880 dargestellt. Abgebildet ist die Zunahme der Abs_{600nm} nach 18 stündiger Inkubation bei 30°C zu sehen. Die abgebildete Absorptionzunahme ist um den Nullwert, also Medium mit Protein, aber ohne Testzellen, korrigiert.

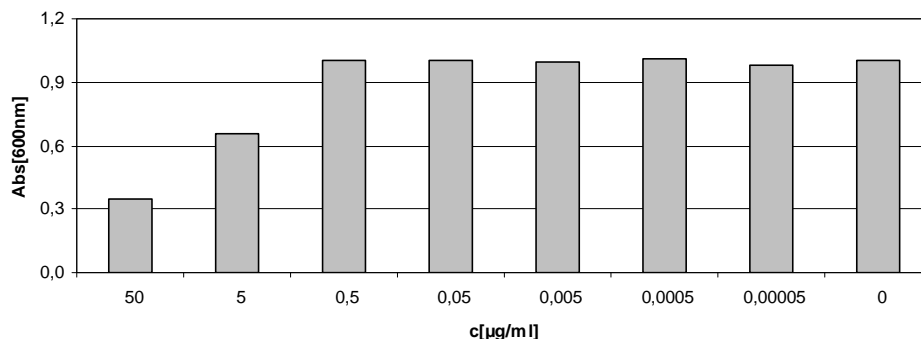


Abbildung 5-21

MIC-Messung von EPhL-25 in BHI-Medium und *Enterococcus faecium* ProCC 880, T = 30°C, t = 18 h

Weitere Messungen der inhibitorischen Wirkung von Proteinen in dieser Form wurden nicht durchgeführt, da die Endolysine offensichtlich in den verschiedenen Medien gehemmt wurden, beziehungsweise sich die Medien nicht zur Anzucht der Testzellen eigneten. Für weitere Proteine wurden lediglich inhibitorische Tests auf Agarplatten durchgeführt.

5.4.4 Zusammenfassender Vergleich von EPhL-20K und EPhL-25

In den vorangegangenen Versuchen wurden die Proteine EPhL-20K und EPhL-25 biophysikalisch charakterisiert. Dazu wurden die optimalen Lysebedingungen der Proteine festgelegt, sowie deren spezifische Aktivität und Lysespezifität gegenüber *Enterococcus faecalis* und *Enterococcus faecium* untersucht. In der nachfolgenden Tabelle 5-10 sind die biophysikalischen Eigenschaften der beiden Proteine zusammenfassend aufgelistet.

Tabelle 5-10

Tabellarischer Vergleich der biophysikalischen Eigenschaften der Protein EPhL-20K und EPhL-25.

	EPhL-20K	EPhL-25
optimaler pH-Wert / Lysepuffer	7 (1/2 PBS)	7,5 (1/2 PBS)
Ionenabhängigkeit der Aktivität	Calcium	Mangan
Ionenkonzentration	2 mM	1 mM
optimale Wachstumsphase für Lyse	log. Phase bei OD = 0,9 - 1,3	log Phase bei OD = 0,9 - 1,3
spezifische Aktivität [Δ Abs/min x mg]	15,7 (<i>Ec. faecalis</i>)	29,4 (<i>Ec. faecium</i>)
MBC (<i>Enterococcus faecalis</i>)	50 μ g/ml 99,5%	50 μ g/ml 99,6%
MBC (<i>Enterococcus faecium</i>)	50 μ g/ml 0%	5 μ g/ml 99,94%

Wie man der Tabelle 5-10 entnehmen kann, verfehlen beide Proteine die Zielvorgabe, mit einem Protein eine vollständige Lyse von 100% der *Enterococcus faecalis*- und *Enterococcus faecium*-Testzellen zu erreichen. Das Protein EPhL-25 kommt dabei dem Ziel näher als das Protein EPhL-20K, da EPhL-25 in der Lage ist einen Großteil der Testzellen beider Stämme zu lysieren, während EPhL-20K den Stamm *Enterococcus faecium* kaum oder gar nicht lysiert.

5.5 Kombination von Domänen

Da ein Protein gesucht wurde, welches sowohl *Enterococcus faecalis* als auch *Enterococcus faecium* vollständig lysieren kann, wurde versucht die Einzeldomänen von EPhL-20K und EPhL-25 zu kombinieren, um dieses Ziel zu erreichen.

Aus den Versuche von Garcia *et al.* (1991) war bekannt, dass die CBD eines Endolysins über dessen Spezifität entscheidet. Durch die in 5.4.3.5 dargestellten Ergebnisse eines Plattenlysetests mit verschiedenen Enterokokken-Stämmen konnte gezeigt werden, dass EPhL-20K eine starke Spezifität gegenüber *Enterococcus faecalis* aufwies, aber nicht in der Lage war *Enterococcus faecium* zu lysieren. EPhL-25 war in der Lage alle getesteten *Enterococcus faecium* und sieben von zehn *Enterococcus faecalis*-Stämme zu lysieren. Die Lyseaktivität als Indiz für die Spezifität war gegen *Enterococcus faecium* allerdings höher als gegen *Enterococcus faecalis*. Um eine hohe Spezifität gegen beide Enterokokkenstämme zu erreichen, sollte ein chimäres Protein konstruiert werden, welches sowohl die CBD von EPhL-20K, als auch die von EPhL-25 besitzt. Beide CBD sollten sich in ihrer Spezifität ergänzen.

EPhL-25 war als Gesamtprotein löslich und zeigte in den vorangegangenen Tests eine höhere spezifische Aktivität und breitere Spezifität. Daher sollte dieses Protein als Basis für ein neues Konstrukt dienen, in dem es C-terminal um die CBD von EPhL-20K erweitert wurde. Es wurde erwartet, dass bei dem geplanten Konstrukt die lytischen Eigenschaften von EPhL-25 gegenüber *Enterococcus faecium* zumindest gleich bleibend, wenn nicht gar besser sein sollten. Die lytischen Eigenschaften gegenüber *Enterococcus faecalis* sollten durch die zusätzliche Spezifität der CBD von EPhL-20K verbessert werden. Das neue, Hybridprotein wurde Konstrukt-1 (K-1) genannt.

5.5.1 Klonierung von Konstrukt-1 (K-1)

Um das Vollängenprotein EPhL-25 um die CBD von EPhL-20K zu erweitern, musste zunächst der Domänenaufbau und die Sekundärstruktur der beiden Proteine genauer untersucht werden. Die Analyse durch *BLAST* und *SOPMA* (4.6) zeigte, dass funktionelle Domänen bei Endolysinen immer durch Linkersequenzen verbunden sind. Das Protein EPhL-20K zeigte zwei Linkersequenzen. Der erste Linker mit einer Länge von 19 Aminosäuren befindet sich am Ende der lytischen Domäne an Position 195 bis 214, während der zweite Linker von Aminosäure 272 bis

294 die C-terminal liegende SH-3b Domäne mit einer davor liegenden, putativen CBD unbekannter Struktur verbindet. Daher wurde beschlossen die beiden CBD zusammen mit den 19 Aminosäuren des N-terminal davor liegenden Linkers als C-terminale Erweiterung von EPhL-25 zu verwenden. In Abbildung 5-22 ist der Domänenaufbau der beiden Ausgangsproteine, sowie des Konstrukts K-1 abgebildet. Als Expressionsvektor für das hybride DNA-Fragment wurde pET21a gewählt. Als Expressionsstamm kam *E. coli* HMS 174 (DE3) zum Einsatz.

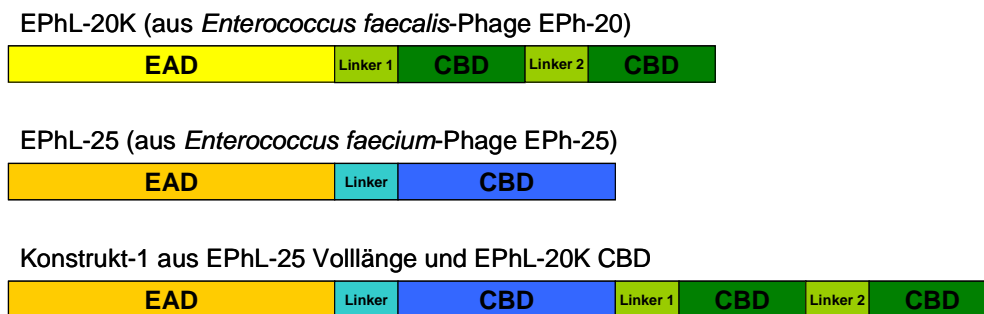


Abbildung 5-22

Darstellung der theoretischen Domänenstruktur der Proteine EPhL-20K, EPhL-25 und K1

Expressions- und Löslichkeitstests mit K-1 ergaben, dass das Protein mit der erwarteten Größe von 53 kDa exprimiert wurde. Die in Abbildung 5-23 dargestellte SDS-PAGE zeigt eine hohe, aber unlösliche Expression des Proteins.

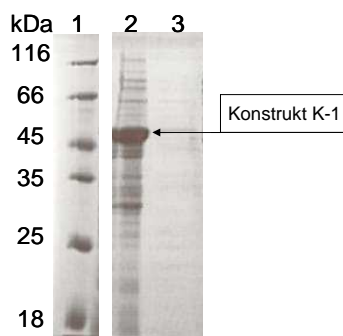


Abbildung 5-23

SDS-PAGE des Expressions- und Löslichkeitstest des Konstrukts K1. (1) Größenstandard, (2) Pellet, (3) Überstand.

Die Reinigung aus *inclusion bodies* war für das Protein EPhL-20K schon etabliert und konnte für K-1 übernommen werden.

5.5.2 Reinigung von K1

Das innerhalb der Zellen in *inclusion bodies* vorliegende Protein musste zunächst aus dem Pellet der aufgeschlossenen Zellen extrahiert werden. Dazu wurde die bereits für das Protein EPhL-20K etablierte Methode angewandt (4.3.1.1). Nach der *inclusion body*-Reinigung zeigte sich, dass das Protein nicht denselben Reinheitsgrad wie EPhL-20K nach diesem Reinigungsschritt aufwies. Der Reinheitsgrad des Proteins K-1 nach der *inclusion body*-Reinigung, welcher auf weniger als 75% geschätzt wurde, ist in Abbildung 5-24 dargestellt. Bei den Verunreinigungen, welche in Bande 4 der Abbildung zu sehen sind, handelt es sich eventuell um Abbaubanden des Proteins. Diese können jedoch nicht ausschließlich von der angefügten CBD stammen, da dieses Fragment kleiner als 20 kDa ist.

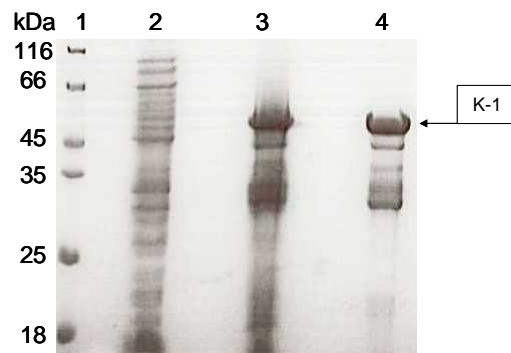


Abbildung 5-24

SDS-PAGE der *inclusion body*-Reinigung von K-1 (1) Größenstandard (2) Überstand des Zellaufschlusses, (3) Pellet des Zellaufschlusses (4) *inclusion body* Pellet nach *inclusion body*-Reinigung

Die Ausbeute der *inclusion body*-Reinigung wurde über eine SDS-PAGE auf mindestens 90% geschätzt. Die noch vorhandenen Verunreinigungen machten einen zusätzlichen Reinigungsschritt notwendig. Da die Methode von hintereinander geschalteten Anionen- und Kationenaustauschersäulen bei EPhL-25 sehr gut funktioniert hatte, wurde versucht, diese Methode auch zur Reinigung von K-1 einzusetzen. Um das Protein einer Säulenreinigung unterziehen zu können, musste es zunächst solubilisiert werden (4.3.1.2). Dazu wurde das *inclusion body* Pellet (in Wasser) mit 1/10 (v/v) 1 M NaOH versetzt, und das Gemisch anschließend 1:10 (v/v) in Solubilisierungspuffer (3.8) mit 8 M Harnstoff aufgenommen. Die Gesamtmenge an solubilisiertem Protein aus 6 l *E. coli*-Kultur betrug 950 mg mit einer Konzentration von ca. 9 mg/ml. Die Säulenreinigung des denaturierten Proteins fand in Solubilisierungspuffer (3.8) statt.

Das solubilisierete Protein wurde zuerst über eine GigaCap Q650M (3.11) geleitet, wodurch die, im neutralen pH des Solubilisierungspuffers negativ geladene DNA, abgereichert wurde. Da das Protein K-1 einen berechneten pI-Wert von 9,44 besitzt, bindet es im neutralen Solubilisierungspuffer nicht an die Anionenaustauschersäule, und sollte im Durchlauf zu finden sein. K-1 sollte an die nachgeschaltete Kationenaustauschersäule Toyopearl SP550C (3.11) binden. Die Elution von dieser Säule erfolgte, nach Abkoppeln der ersten Säule (GigaCap Q650M), in einem flachen Gradienten über 20 Säulenvolumen hin zu Solubilisierungspuffer (3.8) mit einer Natriumcitrat-Konzentration von 150 mM. Der Reinheitsgrad des Proteins konnte durch diese Säulenreinigung nur unwesentlich verbessert werden (Abbildung 5-25). Weitere Versuche mit anderen Chromatographiemethoden lieferten keine besseren Ergebnisse. Die Säulenreinigung über GigaCap Q650M und Toyopearl SP550C wurde beibehalten, um die DNA und *E. coli*-Proteine aus der Proteinlösung abzureichern.

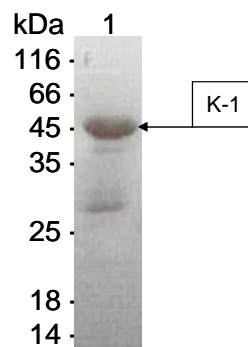


Abbildung 5-25

SDS-PAGE der vereinigten Eluate (1) der Säulenreinigung von K-1

Die Eluatfraktion des Proteins wurden nach der Säulenreinigung vereinigt. Von 950 mg auf die Säule aufgetragenen Proteins konnten 626 mg mit einer Konzentration von 3,34 mg/ml in 187 ml eluiert werden, was einer Ausbeute von 65% entspricht. Ein Teil des eluierten Proteins wurde anschließend mit der in 4.3.1.3 beschriebenen Methode in einen nativen Faltungszustand rückgefaltet. Dazu wurde das Eluat 1:16 in Rückfaltungspuffer verdünnt und unter leichtem Rühren über Nacht bei 4°C inkubiert. Die Ausbeute der Rückfaltung betrug circa 95%. Anders als bei EPhL-20K, konnte nach einer Ammoniumsulfatfällung von K-1 100% des Proteins wieder in Lösung aufgenommen werden. Daher wurde angenommen, dass das

rückgefaltete Protein vollständig in einem nativen und aktiven Zustand war. In dem in Abbildung 5-26 dargestelltem Fließschema ist die Reinigung des Proteins K1 im Überblick dargestellt.

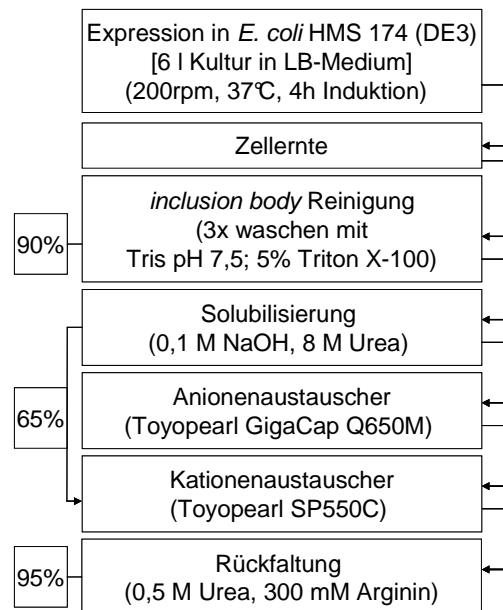


Abbildung 5-26

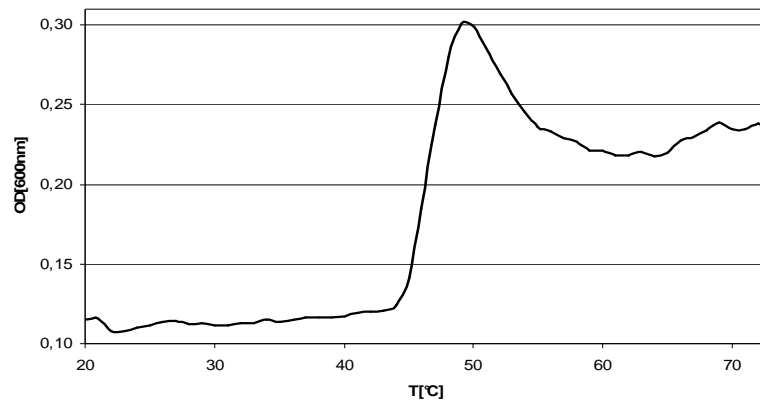
Fließschema der Reinigung von K-1 mit den prozentualen Ausbeuten der einzelnen Arbeitsschritte

5.5.3 Charakterisierung von K-1

5.5.3.1 Thermostabilität

Wie schon für die beiden Wildtypproteine EPhL-20K und EPhL-25, musste auch für K-1 überprüft werden, ob das Protein bei einem möglichen intrakorporalen Einsatz gegen Enterokokken-Infektionen bei mindestens 37°C temperaturstabil bleibt.

Für den Test wurde 25 mM Natriumphosphat pH 7 mit 150 mM NaCl als Puffer gewählt. In den Test wurden 100 µg Protein eingesetzt. Die Änderung der Lichtstreuung durch Aggregation im Verlauf der thermischen Denaturierung wurde bei einer Wellenlänge von 360 nm aufgezeichnet.



Abbildung

5-27

Aggregation von K-1 bei zunehmender Temperatur

In Abbildung 4-27 kann man sehen, dass das Protein ab einer Temperatur von 45°C zu aggregieren beginnt. Wie bei den beiden Ausgangsproteinen müsste auch hier genau verifiziert werden, ob es schon unterhalb von 45°C zu einem Verlust der nativen Faltungsstruktur und Aktivität kommt. Dazu wären Messungen der Aktivität bei verschiedenen Temperaturen und eine temperaturabhängige Bestimmung der Sekundärstruktur mittels CD-Spektroskopie notwendig. Das Konstrukt K-1 besitzt eine deutlich geringere Temperaturstabilität als EPhL-25 (circa 55°C) auf, ist aber stabiler als EPhL-20K (unter 40°C). Ob K-1 aufgrund seiner Temperaturstabilität als intrakorporal angewendetes Therapeutikum geeignet wäre, müsste im Rahmen weiterer Messungen untersucht werden.

5.5.3.2 Guanidinium induzierte Denaturierungsübergänge

Die chemische Stabilität des Proteins K-1 gegenüber Guanidin-Hydrochlorid (Gdn-HCl) wurde per Fluoreszenzspektroskopie verfolgt. Die Messung erfolgte in einem Puffer mit 25 mM Tris und 400 mM NaCl pH 7,5, die eingesetzte Proteinmenge betrug 35 µg/ml. Die Inkubationstemperatur betrug 25°C. Nach einer Inkubationszeit von drei Tagen wurde die Fluoreszenz bei den Anregungswellenlängen $\lambda_{\text{ex}} = 280$ nm und 295 nm gemessen. Die Spaltbreite für Anregungs- und Emissionswellenlänge betrug 2,5 nm. Die gemessenen Werte der emittierten Lichtintensität wurden um den Wert des Puffers mit Gdn-HCl korrigiert. In Abbildung 4-28 ist die relative Fluoreszenz der gemessenen Emissionen $\lambda_{\text{em}} = 331$ nm für $\lambda_{\text{ex}} = 280$ nm und $\lambda_{\text{em}} = 328$ nm für $\lambda_{\text{ex}} = 295$ nm gegen die Konzentration des Denaturierungsmittels aufgetragen.

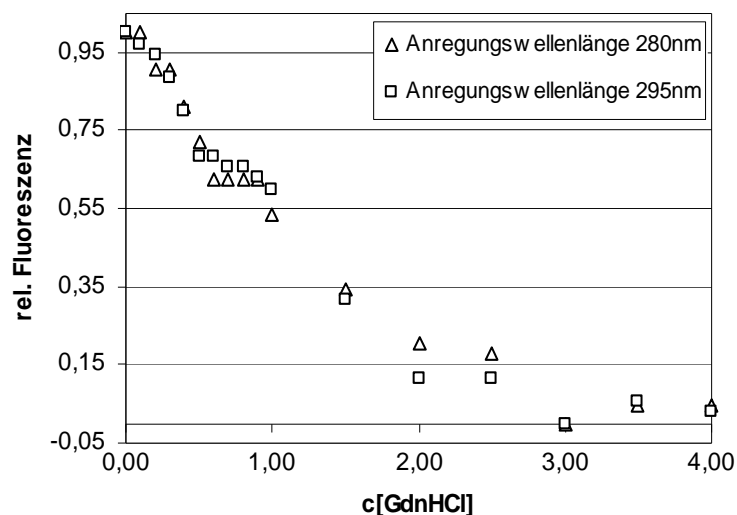


Abbildung 5-28

Denaturierungsübergang von K-1. T = 25°C, Inkubationszeit: 3 Tage, Puffer: 25 mM Tris pH 7,5 mit 400 mM NaCl, c = 35 µg/ml, $\lambda_{\text{ex}} = 280$ nm und 295 nm, $\lambda_{\text{em}}(280 \text{ nm}) = 331$ nm, $\lambda_{\text{em}}(295 \text{ nm}) = 328$ nm, $\Delta_{\text{ex}} = 2,5$ nm, $\Delta_{\text{em}} = 2,5$ nm

Sowohl die Werte für die $\lambda_{\text{ex}} = 280$ nm als die für $\lambda_{\text{ex}} = 295$ nm zeigen einen zwei oder dreiphasigen Denaturierungsübergang. Durch Vergleich mit den Denaturierungsübergängen der beiden Ausgangsproteine lassen sich Aussagen darüber treffen, welche der Denaturierungsphasen welchem Teil des Proteins zuzuordnen sind. Der Übergangsmittelpunkt der ersten Denaturierungsphase liegt bei circa 0,3 M Gdn-HCl. Beide Ausgangsproteine besitzen bei circa 0,3 M Gdn-HCl ebenfalls einen Übergangsmittelpunkt. Der Übergangsmittelpunkt der zweiten Denaturierungsphase liegt bei circa 1,4 M Gdn-HCl und könnte damit dem zweiten Übergangsmittelpunkt des Proteins EPhL-20K entsprechen. Der dritte, eventuelle Übergangsmittelpunkt liegt bei einer Konzentration von circa 2,8 M Gdn-HCl. Keines der beiden Wildtypprotein weist einen Übergangsmittelpunkt bei dieser Konzentration auf. Ob es sich bei dem dritten Übergang um einen echten Übergang oder nur um eine Streuung der Messergebnisse bei der Nachübergangsbaseline handelt, müsste genau verifiziert werden.

Man könnte aus der Messung ableiten, dass die in Abbildung 5-28 zu sehende erste und dritte Phase des Denaturierungsübergangs dem Protein EPhL-25 zu zuordnen sind, während die zweite Phase dieses Übergangs von der CBD des Proteins EPhL-20K stammt. Um diese Vermutungen zu verifizieren, müssten Einzelfragmente des Proteins kloniert und getestet werden. Dies war im zeitlichen Rahmen der Arbeit nicht mehr möglich.

5.5.3.3 Bestimmung der optimalen Lysebedingungen

Analog zu den Ausgangsproteinen EPhL-20K und EPhL-25 sollten zunächst die optimalen Lysebedingungen bestimmt werden. Dies geschah durch eine Reihe von Flüssigzelllysetests (4.5.2.3), wobei der pH-Wert verändert und zugesetzte Ionen getestet wurden. Da die lytische Domäne des Proteins von EPhL-25 stammt, für welches die Abhängigkeit von der Wachstumsphase der zu lysierenden Zellen schon getestet wurde, wurde dieser Versuch nicht noch einmal durchgeführt.

5.5.3.3.1 Bestimmung der Ionenabhängigkeit

Da für EPhL-20K und EPhL-25 zweiwertige Ionen für die Aktivität notwendig sind, wurde davon ausgegangen, dass dieser Sachverhalt für K-1 ebenfalls gilt. Dies wurde durch einen Flüssigzelllysetest mit lebenden *Enterococcus faecalis* ProCC 17 in $\frac{1}{2}$ PBS-Puffer pH 7 überprüft. Den jeweiligen Ansätzen wurden 2 mM CuCl_2 , MgCl_2 , ZnSO_4 , MnCl_2 und FeCl_2 zugesetzt. Da bei diesem Konstrukt die enzymatisch aktive Domäne von EPhL-25 beibehalten wurde, bestand die Annahme, dass MnCl_2 den größten positiven Effekt auf die Lysegeschwindigkeit des Proteins hat. Die Ergebnisse des Versuchs sind in Abbildung 5-29 dargestellt und bestätigten die Erwartungen.

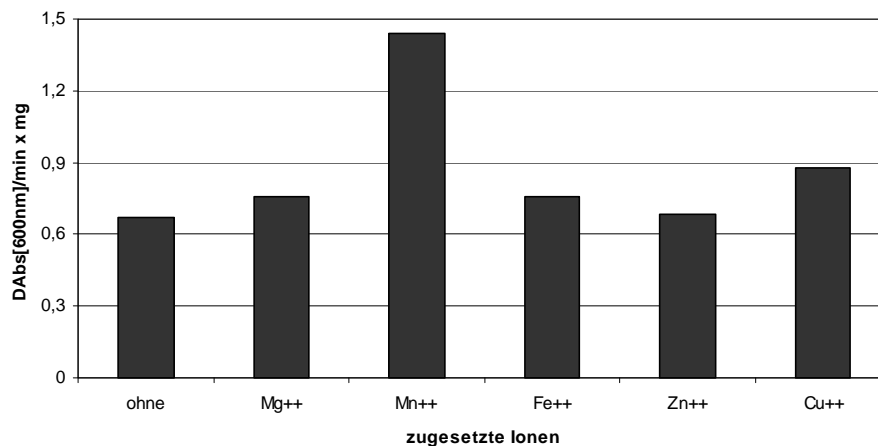


Abbildung 5-29

Lysegeschwindigkeit von K-1 in Abhängigkeit verschiedener zugesetzter Ionen (Einfachbestimmung). Puffer: $\frac{1}{2}$ PBS pH 7,4; T = 30°C, c = 25 $\mu\text{g/ml}$, Tests tamm: *Enterococcus faecalis* ProCC 17

Im Anschluss an diesen Versuch wurde noch untersucht, welche Mangan-Konzentration notwendig ist um die maximale Lysegeschwindigkeit zu erreichen. Dazu wurde das Protein eine Stunde vor Beginn der Versuche mit verschiedenen Konzentrationen von MnCl_2 inkubiert. Diese Methode zeigte sich schon bei dem

Protein EPhL-25 als besser geeignet, als das MnCl_2 in den Lysepuffer zu geben. Als Testzellen für den Versuch wurden hitzeinaktivierte *Enterococcus faecalis* ProCC 17 verwendet.

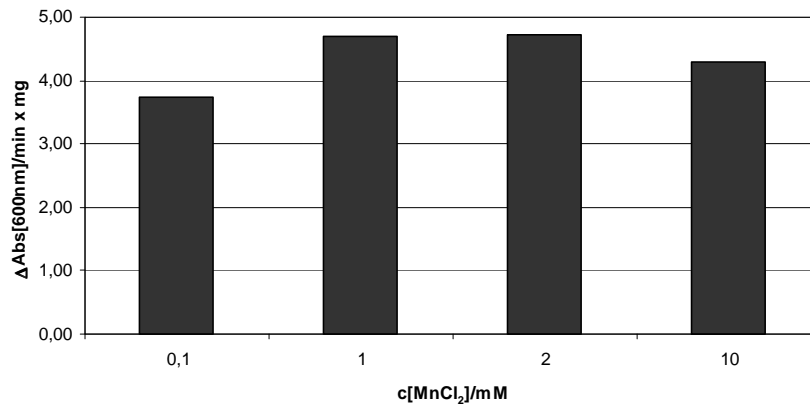


Abbildung 5-30

Lysegeschwindigkeit von K-1 bei verschiedenen Mangankonzentrationen für (Einfachbestimmung) Puffer: $\frac{1}{2}$ PBS pH 7,4; T = 30°C, c = 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$, Tests tamm: *Enterococcus faecium* ProCC 880

Die in Abbildung 5-30 dargestellten Messergebnisse zeigen, dass bei 1 mM MnCl_2 die höchste Lysegeschwindigkeit erreicht wurde. Da sich schon bei dem Protein EPhL-25 gezeigt hatte, dass eine Zugabe von Mangan kurz vor der Messung zur Proteinlösung eine höhere Lyseaktivität bringt, als die Zugabe von Mangan zum Lysepuffer, wurde diese Methode auch für das Protein K-1 angewendet. Für alle weiteren Versuche wurde das Protein etwa eine Stunde vor Beginn der Messungen mit 1 mM MnCl_2 versetzt. Versuche, MnCl_2 schon während der Rückfaltung in den Rückfaltungs- und Lagerungspuffer des Proteins einzusetzen, wurden eingestellt, da in diesem Fall die Lagerungsstabilität des Proteins sehr stark abnahm.

5.5.3.3.2 Bestimmung des pH Optimums

Wie für die beiden Wildtypproteine EPhL-20K und EPhL-25, sollte auch für K-1 der optimale pH-Wert für die Lyse der Zielzellen bestimmt werden. Dazu wurde ein Flüssigzelllysetest mit hitzeinaktivierten *Enterococcus faecalis* ProCC 17 durchgeführt. Als Puffer kam ein Gemisch bestehend aus 25 mM MES, 25 mM MOPS und 25 mM Tris zum Einsatz. Dieses Puffergemisch wurde auf pH-Werte zwischen 5 und 9 eingestellt. Die hitzeinaktivierten Zellen wurden in Puffer auf OD 1 eingestellt, und anschließend mit 25 μg Protein versetzt. Gemäß den Ergebnissen von 5.5.3.3.1 wurde K-1 eine Stunde vor dem Versuch mit 1 mM MnCl_2 versetzt. Abbildung 5-31 zeigt die Ergebnisse dieser Lysetests.

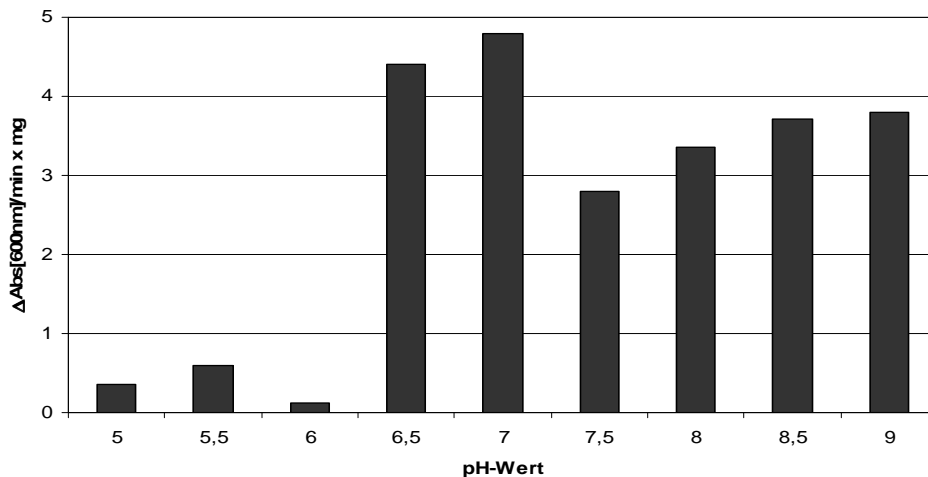


Abbildung 5-31

Lysegeschwindigkeit von K-1 bei unterschiedlichen pH-Werten. (Mittelwerte aus Doppelbestimmung), Puffer: 25 mM MES, 25 mM MOPS und 25 mM Tris, T = 30°C, c = 25 µg/ml, Teststamm: *Enterococcus faecalis* ProCC 17 (hitzeinaktiviert)

Das Protein K-1 zeigt ein Maximum der Lysegeschwindigkeit bei einem pH-Wert von 7. Nach der Messung des pH-Optimums für das Protein K-1 wurden als Lysepuffer ½ PBS oder ½ TBS pH 7 gewählt. Die potentielle spätere therapeutische Anwendung des Proteins K-1 gegen Enterokokken würde intrakorporal über die Blutbahn oder im Gewebe erfolgen. Da in diesem Milieu ebenfalls ein neutraler pH-Wert vorherrscht, ist das Protein aufgrund seines pH-Optimums als Kandidat für eine therapeutische Anwendung geeignet.

5.5.3.4 Aktivitätsbestimmung

Nach der Bestimmung der optimalen Lysebedingungen für K-1 (½ PBS, Zugabe von 1 mM MnCl₂ ca 1h vor Messung zum Protein, Testzellen aus der logarithmischen Wachstumsphase bei OD_{600nm} = 1) sollte als nächstes die spezifische Aktivität ermittelt werden. Zur Messung der spezifischen Aktivität wurden verschiedene Mengen an Protein in einen Flüssigzelllysetest (4.5.2.3) eingesetzt. Als Teststämme kamen *Enterococcus faecalis* ProCC 17 und *Enterococcus faecium* ProCC 880 zum Einsatz. Die Abnahme der Absorption der Zellsuspension während der Lyse wurde gegen die Zeit aufgetragen. Die Ergebnisse des Aktivitätstests sind in der Abbildung 5-32 dargestellt.

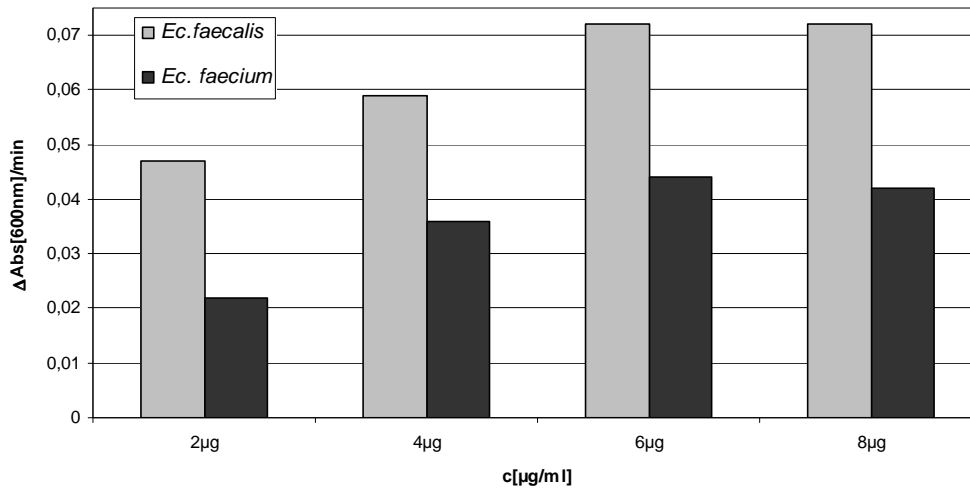


Abbildung 5-32

Lysegeschwindigkeit von K1 in Abhängigkeit der Proteinkonzentration. T = 30°C, Teststämme: *Enterococcus faecalis* ProCC 17 und *Enterococcus faecium* ProCC 880, Puffer: ½ PBS pH 7, K-1 1 h vor Testbeginn mit 1 mM MnCl₂ inkubiert

Wie in der Abbildung 5-32 zu sehen, ist bei dem Protein K-1 die maximale Lysegeschwindigkeit bei einer Zugabe von 6 μg Protein zu 1 ml Testansatz bei beiden Teststämmen erreicht. Anhand der Steigung der Absorptionsabnahme im Lysediagramm und der eingesetzten Proteinmenge lässt sich mit der Formel 5-1 eine spezifische Geschwindigkeit von 12,01 ΔAbs·min⁻¹·mg⁻¹ für *Enterococcus faecalis* ProCC 17 und 7,3 ΔAbs·min⁻¹·mg⁻¹ für *Enterococcus faecium* ProCC 880 errechnen. Diese beiden Werte liegen deutlich unter den spezifischen Aktivitäten, welche für EPhL-20K (15,7 ΔAbs_[600nm]·min⁻¹·mg⁻¹ gegen *Enterococcus faecalis*) und EPhL-25 (29,4 ΔAbs_[600nm]·min⁻¹·mg⁻¹ gegen *Enterococcus faecium*) gemessen wurden.

Möglicherweise kann man die geringere spezifische Aktivität des Proteins K-1 damit erklären, dass durch das Anfügen der CBD von EPhL-20K zum Vollängenprotein EPhL-25 eine räumliche Behinderung der CBD von EPhL-25 durch die neue CBD auftritt. Damit könnte die Geschwindigkeit der Bindung an das Zielbakterium verlangsamt und somit die spezifische Aktivität verringert werden.

5.5.3.5 Spezifitätsbestimmung

Ziel der Konstruktion von K-1 war es, ein Protein herzustellen, was in der Lage ist sowohl *Enterococcus faecalis* als auch *Enterococcus faecium* zu lysieren. Es wurde erwartet, dass durch Anfügen der CBD von EPhL-20K an das Vollängenprotein EPhL-25 eine gleich gute Spezifität gegen beide Enterokokken-Stämme erzeugt wird. Um die Spezifität von K-1 zu testen, wurde ein Plattenlysetest mit

hitzeinaktivierten Enterokokken durchgeführt. Als Teststämmen kamen elf *Enterococcus faecalis*- und zehn *Enterococcus faecium*-Stämme zum Einsatz. Unter den Teststämmen befand sich auch der Vancomycin-resistente Teststamm *Enterococcus faecalis* V583. Für den Test wurden 2,5 µg Protein auf Testplatten aufgebracht, welche die in den Agar eingegossenen Testzellen enthielten. Anschließend wurden die Testplatten für 12 Stunden bei 30°C inkubiert. Die Einteilung der Lysehöfe des Plattenlysetests erfolgte nach Größe und Klarheit. Die Größe und Klarheit der Lysehöfe dient als Indiz für die Lysespezifität des Proteins K-1 zu den einzelnen Teststämmen. Die Ergebnisse des Plattenlysetests sind in Tabelle 5-11 dargestellt.

Tabelle 5-11

Plattenlysetests mit K-1 gegen verschiedene *Enterococcus faecalis*- und *Enterococcus faecium*-Isolate (Einzelbestimmung). Legende: (-) keine Lyse, (+) Kleine und schwach sichtbare Lysehöfe, (++) mittelgroße, gut sichtbare Lysehöfe, (+++) große, sehr klare Lysehöfe

ProCC-Nr. <i>Ec. faecalis</i> :	K-1	ProCC-Nr. <i>Ec. faecium</i> :	K-1
17	+++	880	+
1176	+	1177	++
1504	+	1506	++
1505	++	1553	+
1507	++	1563	++
1552	++	1564	++
1566	+	1565	+
1567	++	1568	+
1569	++	1570	+
1571	+	1634	++
2465 (VRE)	++		

Das Protein K-1 konnte die Erwartung der breiteren Lysespezifität erfüllen. Alle getesteten Stämme wurden lysiert. Auch der Vancomycin-resistente Teststamm (ProCC 2465 VRE) konnte erfolgreich lysiert werden.

5.5.3.6 Bestimmung der minimalen bakteriziden Konzentration

Als nächstes sollte die MBC (4.5.2.4) für das Protein K-1 bestimmt werden. Diese ist notwendig um die therapeutische Eignung des Protein K-1 abschätzen zu können. Um vergleichbare Werte für alle Proteine zu erhalten, wurden als Teststämmen die Isolate *Enterococcus faecalis* ProCC 17 und *Enterococcus faecium* ProCC 880 verwendet. Diese Teststämmen kamen schon bei den Proteinen EPhL-20K und EPhL-25 zum Einsatz. Von diesen Testzellen wurden pro Testansatz 10^5 Zellen vorgelegt und mit verschiedenen Konzentrationen der Proteine für 60 Minuten bei

30°C inkubiert. Durch anschließendes Ausplattieren der Ansätze konnte festgestellt werden, wie viele der Testzellen den Versuch überlebt haben. Ziel war es, eine vollständige Lyse aller Testzellen zu erreichen.

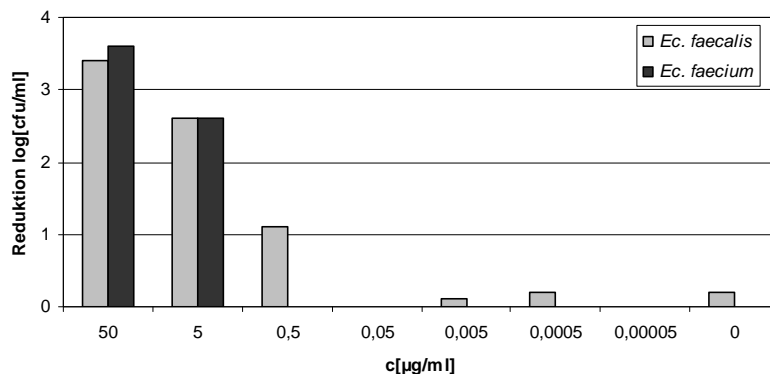


Abbildung 5-33

MBC-Messung von K-1 gegen *Enterococcus faecalis* ProCC 17 und *Enterococcus faecium* ProCC 880. T = 30°C, t = 60 min

Aus der Abbildung 5-33 kann man entnehmen, dass das Protein K-1 das Ziel der vollständigen Lyse beider Teststämme noch nicht erreicht. Das Protein konnte bei einer Konzentration von 50 µg/ml ca. 99,95% der eingesetzten 10^5 Zellen der beiden Teststämme lysieren. Das bedeutet, dass durchschnittlich etwa 50 Zellen jedes Teststammes den Versuch überlebt haben. Das Versuchsergebnis ist besser als das der beiden Wildtypproteine EPhL-20K und EPhL-25, erreicht aber noch nicht die Zielvorgabe. Das Überleben eines geringen Teils der Testzellen lässt sich eventuell auf die Bildung eines Biofilms zurückführen, der die Zugänglichkeit der Peptidoglykanschicht für das Protein erschwert. Die überlebenden Testzellen wurden erneut in BHI-Medium angezogen und in der Wiederholung des Versuchs eingesetzt. Die Ergebnisse des ersten MBC Versuchs konnten bei dieser Wiederholung reproduziert werden.

Die Bestimmung der minimalen inhibitorischen Konzentration wurde für das Protein K-1 nicht vorgenommen, da sich schon bei den beiden Ausgangsproteinen gezeigt hatte, dass ein starke Hemmung der Aktivität in den getesteten Medien vorlag. Da es sich bei der EAD von K-1 um die EAD des Proteins EPhL-25 handelt, wurde angenommen, dass diese Hemmung auch für K-1 gilt.

5.5.3.7 Bestimmung der Aktivität von K-1 in Humanserum

Ziel dieser Arbeit war es, ein Protein zu finden, welches in der Lage ist die medizinisch relevanten *Enterococcus faecalis* und *Enterococcus faecium* zu lysieren. Infektionen dieser Stämme finden sich fast immer intrakorporal. In diesem Zusammenhang sollte untersucht werden, ob das Protein K-1 in Human-Blutserum eine lytische Aktivität zeigte. Dazu wurden die beiden Teststämme *Enterococcus faecalis* ProCC 17 und *Enterococcus faecium* ProCC 880 in BHI Medium angezogen und bei einer $OD_{600} = 1$ geerntet. Die Testzellen wurden anschließend in Human-Blutserum resuspendiert und auf eine $OD_{600} = 1$ eingestellt. Da Versuche am Beispiel von MRSA (Forchheim, 2009) gezeigt hatten, das sich Humanserum hemmend auf die Aktivität auswirkt, wurden 50 μg K-1 pro 1ml Testansatz eingesetzt.

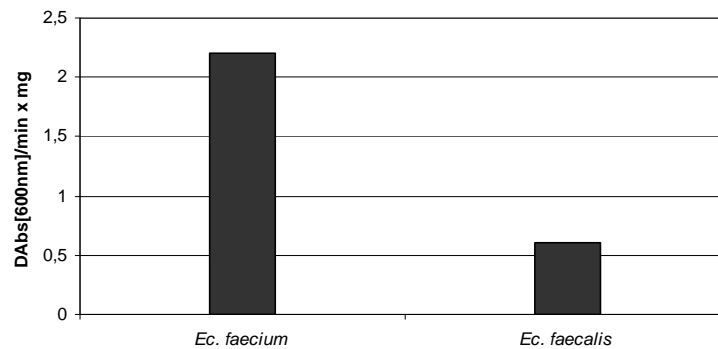


Abbildung 5-34

Darstellung der Aktivität von K1 gegen lebende Enterokokken in humanem Blutserum

Abbildung 5-34 zeigt, dass das Protein K1 durchaus Aktivität in Human-Blutserum besitzt. Diese ist allerdings viel geringer als in optimiertem Lysepuffer. Zur genaueren Bestimmung der Aktivität in Blutserum wären weitere Versuche, zum Beispiel die Messung einer MBC, notwendig. Dies war allerdings im zeitlichen Rahmen der Doktorarbeit nicht mehr möglich.

6 Zusammenfassende Diskussion

6.1 Identifizierung antimikrobieller Proteine

Aufgrund der immer stärker zunehmenden Verbreitung von Infektionen durch einfach oder mehrfach Antibiotika-resistente Bakterien (CDC, 2008; ECDC, 2008; EARSS-Report 2008) besteht die Notwendigkeit neue therapeutische Wirkstoffe zu finden. Um dieses Ziel zu erreichen, werden zurzeit verschiedene Ansätze verfolgt. Ein Ansatz ist natürlich die Entwicklung immer neuer Antibiotika, wobei oft schon während der Entwicklung wieder erste Resistenzen auftreten. Die Phagentherapie stellt eine mögliche Lösung des Problems dar. Zum heutigen Zeitpunkt beschäftigt sich eine Reihe von Firmen mit der therapeutischen Anwendung von Phagen. Mehrere Phagen sind bereits für medizinische Zwecke zum Patent angemeldet, wie zum Beispiel etwa PhiEF24C gegen *Enterococcus faecalis* (Uchiyama *et al.*, 2008) oder befinden sich in klinischen Studien (Gorski *et al.*, 2009). Produkte wie STAFAL (Fa. Sevapharma) zur spezifischen topischen Bekämpfung von MRSA besitzen bereits eine medizinische Zulassung. Ein weiterer Ansatz zur Bekämpfung Antibiotika-resistenter Bakterien ist der Einsatz von bakteriolytischen Proteinen aus Phagen. Diese Proteine besitzen den Vorteil einer sehr hohen Spezifität und können mit biotechnologischen Methoden in großer Menge produziert werden. Eine Resistenzbildung gegen lytische Phagenproteine wurde bislang noch nicht beobachtet (Borysowski *et al.*, 2006; Fischetti *et al.*, 2008).

Ziel dieser Arbeit war es, antimikrobiell wirksame Proteine gegen die medizinisch relevanten Stämme *Enterococcus faecalis* und *Enterococcus faecium* zu finden. Als Quelle für diese Proteine sollten Bakteriophagen dienen, welche aus Umweltproben isoliert werden sollten.

Bei der Auswahl geeigneter Umweltproben war zu bedenken, dass Phagen prinzipiell überall anzutreffen sind. Das entscheidende Auswahlkriterium waren die Phagen-Wirtsstämme *Enterococcus faecalis* und *Enterococcus faecium*. Die Umweltproben mussten aus einer Umgebung entnommen werden, in der diese Bakterienstämme mit Sicherheit anzutreffen waren. Da es sich bei diesen beiden Enterokokken-Stämmen um Darmbakterien handelt, wurde der Zulauf von Kläranlagen als der am besten geeignete Ort für eine Probenentnahme betrachtet. Ob in diesen Proben Phagen gegen einen oder beide Enterokokken-Stämme zu erwarten waren konnte

vorher nicht bestimmt werden, da nicht bekannt war, ob eine regionale Präferenz bei der komensalen Besiedlung gegenüber *Enterococcus faecium* oder *Enterococcus faecalis* vorliegt (Schleifer und Kilpper-Bälz, 1984).

Die Proben wurden aus neun Kläranlagen aus der Umgebung von Regensburg entnommen. Mit den Proben der neun Kläranlagen wurde eine Anreicherung der vermutlich vorhandenen Phagen auf je zwei Isolaten der Stämme *Enterococcus faecalis* (ProCC 17 und 1176) und *Enterococcus faecium* (ProCC 880 und 1177) durchgeführt. Das Ergebnis der Phagenanreicherung und Isolierung waren 31 Phagen. Es konnten mehr Phagen gegen *Enterococcus faecalis* (21) als gegen *Enterococcus faecium* (10) gefunden werden. Dieses Ergebnis entsprach in etwa auch dem Verhältnis der Phagen aus den Proben der einzelnen Kläranlagen. Aus den Proben von drei Kläranlagen konnten überhaupt keine Phagen gegen *Enterococcus faecium* isoliert werden. Das deutlich häufigere Vorkommen von *Enterococcus faecalis*-Phagen im Abwasser könnte durch eine stärkere Besiedlung des Darms von Menschen und Nutztieren der Region durch *Enterococcus faecalis* erklärt werden. Eine weitere mögliche Erklärung dafür ist eine unterschiedlich starke Absterberate bei *Enterococcus faecalis* und *Enterococcus faecium* (Sinton *et al.*, 1993; Godfree *et al.*, 1997). Der Stamm *Enterococcus faecalis* kann aufgrund verstärkter Fähigkeit zur Biofilmbildung in Abwasser länger überleben als *Enterococcus faecium* (Mohamed und Huang, 2007).

Da bekannt war, dass einige *Myoviridae* Phagen in der Lage sind, sich auf verschiedenen gram positiven Bakterien zu vermehren (Jarvis *et al.* 1993), sollte als erstes das Wirtsspektrum der gefundenen Phagen überprüft werden. Damit sollte überprüft werden, ob einer der isolierten Phagen in der Lage war, sich sowohl auf *Enterococcus faecalis* als auch auf *Enterococcus faecium* zu vermehren. Es wurde erwartet, dass ein Phage der dazu in der Lage wäre, auch ein Endolysin besitzt, welches ebenfalls beide Stämme sehr gut lysieren kann.

Die Überprüfung des Wirtsspektrums der isolierten Phagen ergab, dass einige Phagen in der Lage waren verschiedene Isolate von *Enterococcus faecalis* oder *Enterococcus faecium* zu Vermehrung zu nutzen. Weiterhin konnten sich einige Phagen die auf *Enterococcus faecalis* isoliert wurden auch auf *Streptococcus mutans* vermehren. Keiner der 31 Phagen war jedoch in der Lage *Enterococcus faecium* und *Enterococcus faecalis* zur Vermehrung zu nutzen. Vergleiche mit bereits bekannten Enterokokken-Phagen zeigen, dass diese ebenfalls entweder *Enterococcus faecalis*

oder *Enterococcus faecium*, aber niemals beide zur Vermehrung nutzen. Die bekannten Phagen EFAP-1 (Son *et al.*, 2009) und PhiEF24C (Uchiyama *et al.*, 2008) vermehren sich ausschließlich auf *Enterococcus faecalis*, während sich der Phage ENB-6 (Biswas *et al.*, 2001) nur auf *Enterococcus faecium* vermehrt. Die Tatsache, dass sich einige der *Enterococcus faecalis*-Phagen auch in *Streptococcus mutans* vermehren können, bedeutet für diese Phagen möglicherweise einen evolutionären Vorteil, da von diesen beiden Bakterienstämmen symbiotische Beziehungen bei der Biofilmbildung bekannt sind (Deng *et al.*, 2009). Für die spezifische Unterscheidung der beiden Enterokokken-Stämme durch Phagen sind vermutlich Variationen innerhalb der Zellwandstruktur verantwortlich. So besteht die Interpeptidbrücke von *Enterococcus faecalis* aus ein oder zwei L-Alaninen, während bei *Enterococcus faecium* zwei D-Aspartate oder D-Asparagine vorhanden sind (Billot-Klein *et al.*, 1996; de Jonge *et al.*, 1996; Mainardi *et al.*, 1998). Weiter Unterschiede zwischen beiden Stämmen zeigen sich in den Oberflächenproteinen, wie etwa dem *enterococcal surface proteine* (Esp) welches hochkonservierte Tandemsequenzwiederholungen besitzt, die sich in Zusammensetzung und Länge von Isolat zu Isolat sowie zwischen den beiden Stämmen unterscheiden (Shankar *et al.*, 1999). Weiterhin sind, unter anderen, als spezifische Oberflächenproteine noch die Aggregationssubstanz (AS, Clewell und Dunny, 2002) und das Ace-Protein (*adhesin of collagen from Enterococcus faecalis*, Nallapareddy *et al.*, 2000) zu nennen, welche eine spezifische Unterscheidung der beiden Stämme ermöglichen.

Das Genom der 31 isolierten Phagen sollte zunächst nach Endolysinen durchsucht werden. Endolysine erschienen aufgrund ihrer lytischen und wirtsspezifischen Eigenschaften als besonders geeignet für einen möglichen therapeutischen Einsatz. Die Endolysine innerhalb des Genoms der 31 isolierten Bakteriophagen sollten durch Sequenzierung und Homologiesuche identifiziert werden. Dazu wurde das Genom der Phagen isoliert, und mittels Restriktionsendonukleasen oder durch unspezifische Amplifikation in Fragmente zufälliger Länge zerlegt. Jeweils 5 Fragmente mit einer Größe von über 500 Basenpaaren sollten von jedem Phagen zur Sequenzierung geschickt werden. Probleme mit der Anreicherung einiger Phagen auf einen Titer von 10^9 cfu/ml für die Isolierung genomischer DNA führten dazu, dass das Genom von etwa 50% der Phagen nicht untersucht werden konnte (EPh-1, 2, 4, 6, 7, 8, 9, 11, 15, 21, 22, 23, 24, 26, 27, 31). Die Methode der Fragmentsequenzierung deckt nur einen kleinen Teil des Phagengenoms ab. Bei einer durchschnittlichen Größe eines

Phagengenoms von 50 – 100 kbp werden auf diese Art weniger als 10% des Genoms sequenziert.

Obwohl jeder dieser Phagen ein Endolysin besitzt, konnten aufgrund der geringen Fragmentzahl innerhalb des Genoms der verbliebenen 15 Phagen nur 3 Endolysine gefunden werden. Diese Endolysine stammten aus den Phagen EPh-5 und EPh-20, welche auf *Enterococcus faecalis* isoliert wurden, sowie aus dem Phagen EPh-25, welcher auf *Enterococcus faecium* isoliert wurde.

Um die Trefferwahrscheinlichkeit dieser Suchmethode zu erhöhen, müsste die Anzahl der zum sequenzieren geschickten Fragmente so weit erhöht werden, dass mindestens 50% des Genoms abgedeckt sind. Bei der oben genannten Größe des Phagengenoms, würde dies mindestens 100 Fragmente mit einer Größe über 500 bp erfordern. Dies war aus finanziellen Gründen nicht möglich.

Bessere Ergebnisse hätte eventuell eine Sequenzierung des Genoms mit spezifischen oder degenerierten Primern erbracht, welche von bekannten und stark konservierten Genen innerhalb des Phagengenoms ausgeht. Hierbei hätte man die bekannte Sequenz des Gens der Integrase nutzen können, welche bei vielen bekannten Phagen vor den Genen für Holin und Endolysin liegt (Deutsch *et al.*, 2004). Ein Vergleich der Nucleotidsequenzen verschiedener Phagen-Integrasen zeigt sehr hohe Sequenzhomologien am 5'-Ende dieser Gene (Swalla *et al.*, 2003; Frumerie *et al.*, 2005). Die Suche nach einer Integrase hätte per PCR mit degenerierten Primern für diesen Bereich auf dem Phagengenom erfolgen können.

Eine weitere Möglichkeit wäre die direkte Suche des Endolysins per PCR. Dafür wären Bereiche innerhalb der EAD geeignet. Vergleiche von Endolysinen mit einer N-Acetylmuramoyl-L-Alanin-Amidase als EAD zeigen stark konservierte Sequenzbereiche innerhalb des katalytischen Zentrums dieser EAD (Mesnage *et al.*, 2008). Konservierten Sequenzbereiche scheint es auch bei lytischen Proteinen mit anderen katalytischen Funktionen zu geben (Swe *et al.*, 2007), da für die Ausführung der katalytischen Funktion bestimmte Aminosäuren, sowie Sekundär- und Tertiärstrukturen benötigt werden. Zu Beginn der Arbeit waren diese Daten allerdings noch nicht zugänglich. Analog zur Suche nach dem Gen der Integrase könnten auch hier degenerierte Primer verwendet werden. Der Nachteil dieser Methode ist, dass man nur nach Endolysinen mit bekannter katalytischer Funktion suchen kann.

Die Herstellung einer Expressionsbank stellt ebenfalls eine Möglichkeit dar, innerhalb des Phagengenoms nach lytischen Proteinen zu suchen. Der Vorteil einer

Expressionsbank bestände darin, dass man bakteriolytische Proteine aufgrund ihrer Aktivität finden würde. Dabei könnten auch Proteine mit bisher nicht bekannten enzymatischen Funktionen, die also keine Homologie zu bekannten bakteriolytischen Proteinen aufweisen, gefunden werden. Da mit den zur Verfügung stehenden Methoden drei Endolysine für eine erste Charakterisierung und Testung auf prinzipielle Eignung gefunden wurden, wurde im Rahmen der Arbeit auf die Erstellung einer Expressionsbank verzichtet.

Weitere Proteine, welche man für den therapeutischen Einsatz gegen Enterokokken verwenden könnte wären lytische *tail fiber* Proteine aus Phagen oder Autolysine und Bacteriocine aus Bakterien. Manche Tail fiber Proteine, wie die des Staphylokokken-Phagen Phi12, besitzen lytische Domänen, welche in der Lage sind, bakterielle Zellwände abzubauen (Iandolo *et al.*, 2002). Autolysine und Bacteriocine besitzen einen nahezu identischen Aufbau im Vergleich zu Endolysinen und nutzen ähnliche katalytische- und Zellwandbindedomänen (Garcia *et al.*, 1987; Diaz *et al.*, 1990).

Die gefundenen Endolysinen EPhL-5, EPhL-20 und EPhL-25 konnten kloniert und rekombinant in *E. coli* exprimiert werden. Aufgrund der Sequenzübereinstimmung von 98% auf Aminosäureebene der beiden Endolysine EPhL-5 und EPhL-20, sowie der Tatsache, dass EPhL-20 eine bessere Expression zeigte als EPhL-5 wurde nur EPhL-20 weiterbearbeitet.

EPhL-20 besitzt als lytische Domäne eine N-Acetylmuramoyl-L-Alanin-Amidase, welche über einen Linker mit zwei weiteren Domänen verbunden ist. Sequenzvergleiche zeigen, dass es sich bei beiden Domänen um Zellbindedomänen handelt, wobei allerdings nur die letztere (C-terminale) als SH-3b Domäne erkannt wird. Das Protein besitzt auf Aminosäureebene im Bereich der EAD 89% Identität mit der EAD des Endolysins aus dem *Enterococcus faecalis*-Phagen EFAP-1 sowie über die volle Länge eine hohe Identität zu verschiedenen Prophagen-Endolysinen (u. a. NP_815207 *Enterococcus faecalis* V583).

EPhL-20 musste für eine bessere Expressionsausbeute modifiziert werden. Das Protein wurde N-terminal verkürzt um die Halbwertszeit in *E. coli* zu erhöhen (Varshavsky *et al.* 1997). Das modifizierte Protein wurde als EPhL-20K bezeichnet und exprimiert unlöslich in *inclusion bodies*. Eine Reinigungsmethode für unlöslich exprimierende Proteine, sowie eine Methode für deren Renaturierung wurden im Verlauf der Arbeit etabliert.

EPhL-25 besitzt als lytische Domäne ebenfalls eine N-Acetylmuramoyl-L-Alanin-Amidase. Im Bereich der EAD besteht 65% Identität im Vergleich zu einem Autolysin und einer Amidase aus *Streptococcus pneumoniae*. Die EAD ist über einen Linker mit einer putativen Zellwand-Bindedomäne verbunden. Die Zellwand-Bindedomäne des Proteins zeigt keine Homologie zu bekannten Domänen mit Zellbindefunktion. Versuche mit dieser Domäne zeigten jedoch, dass gute Bindungseigenschaften zu *Enterococcus faecium* bestehen. Das Protein exprimiert in *E. coli* löslich und konnte für weitere Charakterisierungen direkt aus *E. coli* gereinigt werden.

Vergleiche der beiden Proteine mit anderen Endolysinen aus Enterokokken-Phagen zeigen, dass diese immer eine N-Acetylmuramoyl-L-Alanin-Amidase als EAD besitzen. Weitere zusätzliche EADs, wie etwa eine CHAP-Domäne bei Staphylokokken-Endolysinen, kommen bei Enterokokken-Endolysinen nicht vor. Warum dieser Unterschied zwischen Enterokokken-Endolysinen und Staphylokokken-Endolysinen besteht ist nicht bekannt. Beide Bakterien besitzen einen ähnlichen Zellwandaufbau und unterscheiden sich lediglich in ihrer Interpeptidbrücke und den Zellwandproteinen. Von beiden Bakterien ist ebenfalls bekannt, dass sie zur Biofilmbildung neigen, was somit auch kein Grund für die Unterschiede bei den Endolysinen sein kann.

EPhL-20 zeigt einen ähnlichen Aufbau wie das Endolysin PlyV12 (Sewage *et al.*, 1975) aus dem Enterokokken-Phagen Phi-1. Von PlyV12 bekannt, dass es in *Bacillus megaterium* löslich exprimiert werden kann (Fischetti *et al.*, 2004) Beide Proteine besitzen die gleiche enzymatische Domäne sowie eine putative CBD, welche von einer SH-3b Domäne gefolgt wird. EPhL-25 gleicht im Aufbau den Endolysinen aus den Phagen EFAP-1 (Son *et al.*, 2009) und PhiEF24C (Uchiyama *et al.*, 2008). Alle drei Proteine besitzen eine N-Acetylmuramoyl-L-Alanin-Amidase als EAD, sowie eine putative CBD, welche keiner bekannten Domänenstruktur gleicht. Über die Eigenschaften der Endolysine aus EFAP-1 und PhiEF24C ist nichts bekannt, da bisher nur deren Sequenz veröffentlicht wurde.

6.2 Charakterisierung von EPhL-20K und EPhL-25

Um die Proteine EPhL-20K und EPhL-25 zu charakterisieren und miteinander vergleichen zu können, musste zunächst eine Methode zur Reinigung unlöslich exprimierender Proteine für EPhL-20K etabliert werden.

Unlöslich exprimierende Proteine liegen innerhalb der Expressionszellen in Einschlusskörperchen, so genannten *inclusion bodies*, vor. Für eine weitere Charakterisierung müssen diese Proteine zunächst aus den *inclusion bodies* gewonnen und solubilisiert werden. Dies geschah nach der von Jin *et al.* (1994), beschriebenen Methode. Dabei wurden die unlöslichen Bestandteile der Expressionskultur nach dem Zellaufschluss mehrfach mit einem Puffer mit Triton X-100 und EDTA gewaschen. Dadurch konnten Zellwandtrümmer und andere Verunreinigungen von den *inclusion bodies* getrennt werden. Die Methode erwies sich als sehr effektiv, da mehr als 90% des Zielproteins EPhL-20K aus der Expressionskultur gewonnen werden konnte. Die gereinigten *inclusion bodies* wurden anschließend mit 1 M NaOH und 8 M Harnstoff solubilisiert und vollständig entfaltet (McCoy & Frost, 1988).

Um die native Struktur des Proteins wiederherzustellen wurde die solubilisierte Proteinlösung in einen Puffer ohne Harnstoff und mit neutralem pH-Wert verdünnt. Bei einer Konzentration unterhalb von 0,5 M Harnstoff beginnt das Protein in der Regel seine ursprüngliche Faltungsstruktur einzunehmen. Die Renaturierung der Proteine läuft in langsamen und schnellen Phasen ab. Zuerst bildet sich die Sekundärstruktur durch Interaktionen über kurze Strecken innerhalb des Proteins aus. Die zweite Phase ist die Ausbildung der Tertiärstruktur durch Wechselwirkungen zwischen entfernt voneinander lokalisierten Bereichen. Da zur Ausbildung der Tertiärstruktur hoch spezifische Kontaktflächen erforderlich sind, wird davon ausgegangen, dass dies eine späte Phase der Strukturbildung ist (Jaenicke *et al.*, 1987). Um eine Aggregatbildung während der Rückfaltung zu vermeiden wurde dem Puffer L-Arginin zugegeben (Rudolph *et al.*, 1996).

Die Effektivität der Rückfaltung wurde zunächst dadurch beurteilt, wie viel des eingesetzten Proteins im Rückfaltungspuffer in Lösung gegangen ist. Nach dieser Beurteilung ergab sich für EPhL-20K eine Ausbeute von 91%.

Die Rückfaltung eines Proteins nur nach der in Lösung gegangenen Proteinmenge zu beurteilen, kann aber zu einer fehlerhaften Einschätzung der Ausbeute führen. Im Falle von EPhL-20K stellte sich bei späteren Versuchen heraus, dass 75% des in Lösung gegangenen Proteins nicht nativ gefaltet und inaktiv waren. Dieser Anteil des gelösten Proteins konnte durch Ausfällen mit Ammoniumsulfat und anschließende Wiederaufnahme in Rückfaltungspuffer abgetrennt werden. Vergleiche der

spezifischen Aktivität von EPhL-20K vor und nach dem Ausfällungsschritt zeigten, das EPhL-20K nach diesem Schritt eine vierfach höhere spezifische Aktivität besaß. Der hohe Proteinverlust würde im Fall von EPhL-20K für eine spätere Anwendung eine weitere Optimierung der Rückfaltungsmethode erfordern. Dies könnte durch Variation des Rückfaltungspuffers erfolgen. Die Konzentration der zugesetzten Inhaltsstoffe, wie etwa L-Arginin, oder der pH-Wert des Rückfaltungspuffers müsste verändert werden. Weitere Modifikationen sind bei der Methode der Rückfaltung möglich. Hier müsste man die Temperatur oder die Methode der Zugabe des Proteins zum Rückfaltungspuffer variieren.

Um die Effektivität einer Rückfaltung beurteilen zu können, sollten neben der Bestimmung der gelösten Proteinmenge weitere Versuche zur Verifizierung durchgeführt werden. Eine Möglichkeit ist, wie im Fall von EPhL-20K, die spezifische Aktivität des Proteins zu bestimmen. Diese Methode eignet sich vor allem, um bei Modifikationen der Rückfaltungsprozedur oder des Rückfaltungspuffers schnell über eine Verbesserung oder Verschlechterung zu entscheiden. Eine weitere Möglichkeit ist die Bestimmung der Faltungsstruktur des Proteins mittels CD-Spektroskopie. Diese Methode gibt genauere Auskunft darüber, ob ein Protein nach der Rückfaltung nativ gefaltet ist oder nicht. Im Gegensatz zur Bestimmung der spezifischen Aktivität ist für diese Messung jedoch eine Proteinkonzentration von etwa 1 mg/ml notwendig, was das Aufkonzentrieren des Proteins nötig gemacht hätte. Beim Aufkonzentrieren des Proteins bestünde jedoch die Gefahr der Aggregation des Proteins, was das Ergebnis der CD-Messung bezüglich der Rückfaltungsqualität verfälscht hätte.

Nach Etablierung der Reinigungsmethode für das unlöslich exprimierende Protein EPhL-20K zeigte sich, dass diese Methode gegenüber der Reinigung des löslich exprimierenden Proteins EPhL-25 einige Vorteile hatte. Der größte Vorteil gegenüber der Reinigung löslicher Proteine besteht in der Ausbeute an Zielprotein. Trotz des großen Verlusts während der Rückfaltung war die Ausbeute von EPhL-20K (7 mg) aus zwei Liter Kultur doppelt so groß wie die von EPhL-25 (3,5 mg).

Eine Erklärung hierfür sind die längere Expressionszeit und die höhere Expressionstemperatur bei einem in *inclusion bodies* exprimierenden Protein wie EPhL-20K (über Nacht, 37°C) gegenüber einem löslich exprimierenden Protein wie EPhL-25 (3 h, 30°C). Die kurze Expressionszeit und niedrigere Temperatur sollen im Fall von EPhL-25 Aggregation und Abbau des Proteins innerhalb der *E. coli* Zellen minimieren, schränken aber die Expressionsausbeute stark ein. Vergleiche

Endolysinen gegen *Staphylococcus aureus* zeigen, dass bei einem in *inclusion bodies* exprimierenden Protein Ausbeuten von 75 mg (nativ, aktiv) nach der Rückfaltung möglich sind (Forchheim, 2009).

Nachdem für die Proteine EPhL-20K und EPhL-25 eine Reinigungsmethode etabliert war, konnten beide Proteine biophysikalisch charakterisiert werden. Um abschätzen zu können, ob sich die Proteine für den bei Enterokokken notwendigen intrakorporalen Einsatz eignen, wurde als erstes die thermische Stabilität der Proteine anhand ihrer Aggregation bei steigender Temperatur überprüft. EPhL-20K und EPhL-25 sollten bis zu einer Temperatur von über 40°C stabil bleiben, um innerhalb des Körpers angewendet werden zu können. Die Tests ergaben, dass EPhL-25 bis 55°C stabil blieb, während EPhL-20K schon zwischen 30°C und 40°C zu denaturieren begann. Damit wäre EPhL-20K nicht als therapeutischer Wirkstoff geeignet. Diese Methode zeigt jedoch nur die Temperatur, bei der das Protein seine Faltungsintegrität verliert und zu aggregieren beginnt. Eine Aussage über die Aktivität des Proteins bei steigender Temperatur lässt sich damit nicht treffen. Dazu wären Aktivitätstests bei der entsprechenden Temperatur, oder eine Erwärmung des Proteins mit anschließendem Aktivitätstest notwendig (Waldherr, 2005). Für eine genaue Überprüfung der Proteinstruktur könnte man CD-spektroskopische Messungen durchführen. Arbeiten mit Endolysinen gegen andere Bakterien zeigen, dass diese Endolysine bei über 50°C zu Aggregieren beginnen (Forchheim, 2009), beziehungsweise den Großteil ihrer Aktivität verlieren (Waldherr, 2005). Wichtiger als die Bestimmung der maximal verträglichen Temperatur wäre allerdings die Bestimmung der Langzeitstabilität bei Temperaturen zwischen 37°C und 42°C, wie sie bei einer möglichen therapeutischen Anwendung des Proteins im Körper vorkommen würden.

Um einen weiteren Eindruck von der Stabilität der Proteine zu gewinnen, wurde eine chemische Denaturierung mit Guanidin-HCl durchgeführt. Anschließend wurde die Faltungsintegrität der Proteine durch Fluoreszenz-Spektroskopie bestimmt. Die Messungen zeigten, dass EPhL-25 bei 0,3 M Gdn-HCl schon 50% seiner Faltungsstruktur verloren hat, während dazu bei EPhL-20K etwa 1,3 M Gdn-HCl notwendig waren. Die Fluoreszenzübergänge der Proteine verlaufen mehrphasig, was dafür spricht, dass bestimmte Domänenbereiche des Proteins eine geringere Stabilität besitzen als andere. Um zu bestimmen, welche Domänenbereiche der Proteine eine geringere und welche eine höhere Stabilität besitzen, wäre die

Klonierung und Messung einzelner Domänen der Proteine notwendig gewesen. Dies war jedoch im zeitlichen Rahmen der Arbeit nicht mehr möglich. Vergleiche mit der chemischen Stabilität des Endolysins Pitti-26Ami und dessen Derivaten gegen *Staphylococcus aureus* zeigen, dass diese Endolysine ebenfalls einen mehrphasigen Übergang aufweisen (Forchheim, 2009). Diese Endolysine verlieren ihre Faltungsintegrität bei einer Harnstoffkonzentration von über 2 M. Weitere Vergleiche von Gdn-HCl-Denaturierungsübergängen mit anderen Mehrdomänen-proteinen wie etwa dem Replication Protein A (Jonathan *et al.*, 2004) und dem Willebrand Faktor A (Auton *et al.*, 2007) zeigen, dass auch andere Mehrdomänen-proteine mehrphasige Übergänge aufweisen.

Nach Überprüfung der Stabilität, mussten für beide Proteine die Lysebedingungen optimiert werden. Nur unter optimalen Bedingungen konnten Eigenschaften wie die spezifische Aktivität und Spezifität der Proteine untersucht werden. Um die optimalen Lysebedingungen zu finden, wurden im Flüssigzelllyseansatz pH-Wert, zugesetzte Ionen und die Wachstumsphase der eingesetzten Testzellen variiert. Die Optimierungsversuche ergaben, dass EPhL-20K für ein Maximum an Aktivität Ca^{++} -Ionen und einen pH-Wert von 7,5 benötigt. Bei dem Protein EPhL-25 waren die Zugabe von Mn^{++} -Ionen und ein pH-Wert von 7 notwendig, um die maximale Aktivität zu erreichen. Da es sich bei den EAD beider Proteine um N-Acetylmuramoyl-L-Alanin-Amidasen mit starker Homologie zu anderen Zink-abhängigen Amidasen handelt, wurde eine Abhängigkeit von zweiwertigen Ionen erwartet. Diese ist auch von anderen Endolysinen mit diesem Typ EAD, wie etwa Pitti26Ami (Ca^{++}) und HPL118 (Mn^{++}) bekannt (Waldherr, 2005; Forchheim, 2009). Das ermittelte pH-Optimum beider Proteine im neutralen Bereich wurde erwartet, da die Wirtszellen der Phagen, aus denen die Proteine stammen, im Dünndarm bei neutralen pH-Werten zwischen 6,5 und 7,5 wachsen. Andere Endolysine gegen Enterokokken, wie etwa PlyV12 besitzen ebenfalls ein pH-Optimum bei 6,5 - 7 (Fischetti *et al.*, 2004).

Die optimale Wachstumsphase der Testzellen lag bei beiden Proteinen in der exponentiellen Wachstumsphase bei eine OD_{600} von 0,9 – 1,3. Zellen in dieser Wachstumsphase befinden sich ständig in Teilung und besitzen daher möglicherweise eine nicht vollständig ausgebildete Zellwand, was sie für Endolysine besonders angreifbar macht.

Nach Festlegung der optimalen Lysebedingungen konnte die spezifische Aktivität der beiden Proteine bestimmt werden. Sie lag im Fall von EPhL-20K bei $15,7 \Delta\text{Abs}_{[600\text{nm}]} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ gegen *Enterococcus faecalis* ProCC 17 und bei EPhL-25 bei $29,4 \Delta\text{Abs}_{[600\text{nm}]} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ gegen *Enterococcus faecium* ProCC 880. Diese Werte liegen über denen des Endolysins Phi11 (ca. $2 \Delta\text{Abs}_{[600\text{nm}]} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$) gegen Staphylokokken (Donovan, *et al.*, 2006), aber deutlich unter denen des optimierten Endolysins K-10 (ca. $240 \Delta\text{Abs}_{[600\text{nm}]} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$) welches ebenfalls Staphylokokken lysiert (Forchheim, 2009). Ein Vergleich der spezifischen Aktivität von EPhL-20K und EPhL-25 mit der anderer Enterokokken lysierender Endolysine ist nicht möglich, da in der Literatur (Fischetti *et al.*, 2004) entsprechende Angaben fehlen.

Die anhand von Plattenlysetests bestimmte Wirtsspezifität beider Proteine zeigte, dass EPhL-20K, das aus einem Phagen gegen *Enterococcus faecalis* stammte, ausschließlich spezifisch für *Enterococcus faecalis* war, und keinen der getesteten *Enterococcus faecium*-Stämme lysieren konnte. EPhL-25 stammt aus einem Phagen gegen *Enterococcus faecium* und konnte neben *Enterococcus faecium* auch einige Isolate der getesteten *Enterococcus faecalis*-Stämme lysieren. Während dieser Arbeit wurde die Spezifität nur innerhalb der Stämme *Enterococcus faecalis* und *Enterococcus faecium* bestimmt. Aus der Literatur ist bekannt, dass Endolysine neben den Bakterien des Wirtsstammes oft auch Bakterien anderer Gattungen lysieren können (Fischetti *et al.*, 2004). Um das Wirtsspektrum der beiden Ausgangsproteine möglichst vollständig zu erfassen müssten weitere Versuche mit möglichst vielen Vertretern gram positiver und auch einiger gram negativer Bakterien durchgeführt werden.

Abschließend wurde für EPhL-20K und EPhL-25 die minimale bakterizide Konzentration (MBC) bestimmt, welche ein wichtiger Wert für die Einordnung der therapeutischen Wirksamkeit antibakterieller Wirkstoffe ist. Für das Protein EPhL-20K bestätigte der Versuch die Ergebnisse des Spezifitätstests, da das Protein zwar bei einer Konzentration von $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ 99,5% der *Enterococcus faecalis*-Zellen lysieren konnte, aber keine Aktivität gegen *Enterococcus faecium* zeigte. EPhL-25 lysierte bei $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ 99,94% der *Enterococcus faecium*-Zellen und 99,6% der *Enterococcus faecalis*-Zellen. Eine vollständige Lyse eines oder beider Teststämme wurde von keinem der beiden Proteine erreicht. Eine mögliche Erklärung warum ein geringer Teil der Testzellen den Versuch überlebt hat, ist die Tatsache, dass Enterokokken-Stämme Biofilme bilden können. Dies ist schon länger bekannt, da

Biofilme von Enterokokken und anderen Krankenhauskeimen ein großes Problem bei der Desinfektion von klinischem Material darstellen. Diese Biofilme verhindern die Zugänglichkeit der Zelloberfläche für Desinfektionsmittel (Lima *et al.*, 2001, Toledo-Arana *et al.*, 2001) und möglicherweise auch für Endolysine. Ein Vergleich mit den MBC-Daten anderer Endolysine gegen Enterokokken ist nicht möglich, da in der Literatur keine Daten dafür vorliegen. Das Endolysin K-10 gegen Staphylokokken zeigte im MBC-Versuch bei einer Konzentration von 0,5 µg/ml eine vollständige Lyse aller eingesetzten Testzellen (Forchheim, 2009).

Das Ziel dieser Arbeit, ein Protein zu finden und zu reinigen, welches in der Lage ist beide Enterokokken-Stämme *faecium* und *faecalis* vollständig zu lysieren, wurde mit EPhL-25 nicht ganz erreicht. Das Protein zeigte gute Lyseeigenschaften, besaß jedoch keine gleich hohe Spezifität gegen beide Enterokokken-Stämme. Um das Ziel der Arbeit zu erreichen, sollte als nächstes eine Optimierung eines oder beider Proteine durchgeführt werden.

6.3 Proteinoptimierung durch Domänenkombination

Endolysine und andere bakteriolytische Proteine wie etwa Autolysine und Bacteriocine sind modular aufgebaut. Dieser modulare Aufbau wird als Grundlage einer evolutionären Optimierung der Proteine verstanden, und kann genutzt werden um chimäre Proteine mit neuen Eigenschaften herzustellen (Garcia *et al.*, 1989; Diaz *et al.*, 1990; Croux *et al.*, 1993).

Das Prinzip der Neukombination von Domänen verschiedener lytischer Proteine sollte in dieser Arbeit zur Herstellung eines neuen, optimierten Endolysins gegen *Enterococcus faecalis* und *Enterococcus faecium* genutzt werden. Das Ziel einer vollständigen Lyse beider Stämme sollte erreicht werden, indem das Protein EPhL-25 in seiner kompletten Länge C-terminal um einen Linker und die komplette CBD-Region von EPhL-20K erweitert wurde. Die Entscheidung für diese Kombination begründet sich darin, dass die EAD des Proteins EPhL-25 eine höhere spezifische Aktivität aufwies als die EAD von EPhL-20K. Weiterhin besitzt die CBD des Proteins EPhL-25 eine hohe Spezifität gegenüber *Enterococcus faecium* und eine geringe Spezifität gegenüber *Enterococcus faecalis*. Durch Anfügen der CBD von EPhL-20K sollte das neue Protein K-1 die gute spezifische Aktivität, sowie die hohe Spezifität gegen *Enterococcus faecium* behalten, während die Spezifität gegen *Enterococcus faecalis* durch die CBD-Kombination erhöht werden sollte. Des Weiteren wurde

erwartet, dass das neue Protein die guten Stabilitätseigenschaften von EPhL-25 beibehält.

Die ersten Expressionstests mit K-1 zeigten eine sehr viel höhere Expressionsausbeute als für EPhL-25 und EPhL-20K. K-1 exprimiert unlöslich in *inclusion bodies*. Die Methode der Reinigung aus *inclusion bodies* konnte ohne Modifizierung von EPhL-20K übernommen werden. Der Reinheitsgrad nach der *inclusion body*-Reinigung von weniger als 75% (EPhL-20K >95%) machte allerdings einen weiteren chromatographischen Reinigungsschritt notwendig. Während dieses Reinigungsschrittes kam es zu einem Verlust von etwa 35% des Proteins. Die Rückfaltungsmethode von EPhL-20K konnte ebenfalls übernommen werden. K-1 zeigte mit 95% aktivem und damit vermutlich nativem Protein und eine deutlich höhere Rückfaltungsausbeute als EPhL-20K. Der Schritt der Ammoniumsulfatfällung und Wiederaufnahme in Rückfaltungspuffer zur Abtrennung von inaktiven und nicht nativ gefalteten Protein war für K-1 nicht notwendig. Die Gesamtausbeute aus 2 l *E. coli*-Kultur von ca. 200 mg Protein nach der Reinigung und Rückfaltung ist viel höher als die von EPhL-25 (3,5 mg) und EPhL-20K (7 mg). Vergleiche mit optimierten Endolysinen mit sehr hohen Reinigungsausbeuten, wie etwa Modul-6 (75 mg/ 2 l Kultur; Forchheim, 2009) zeigen, dass das Protein K-1 eine sehr gute Ausbeute besitzt.

Wie auch die beiden Ausgangsproteine wurde K-1 nach der Reinigung biophysikalisch charakterisiert. Der zuerst durchgeführte Test der thermischen Stabilität zeigte, dass das Protein bei 45°C zu aggregieren begann. Somit verfügte K-1 über eine geringere Stabilität als EPhL-25 (55°C), zeigt aber eine höhere Stabilität als EPhL-20K (<40°C). Eine Stabilität bis 45°C wäre aber noch genug für einen möglichen intrakorporalen Einsatz bei 37°C - 42°C. Auch mit dem Protein K-1 müssten weitere Versuche zur Verifizierung der thermischen Stabilität, wie etwa Aktivitätstests bei verschiedenen Temperaturen, CD-spektroskopische Messungen und Langzeitstabilitäts- und Aktivitätstests bei 37°C bis 42°C durchgeführt werden.

Die Messung der chemischen Stabilität des Proteins K-1 zeigt, dass die Gegenwart von etwa 1 M Gdn-HCl zu einem 50% Verlust der Faltungsintegrität führen. Damit besitzt das Protein eine höhere chemische Stabilität als EPhL-25, ist aber instabiler als EPhL-20K. Um Aussagen darüber treffen zu können, welche der Domänen die geringste und welche die höchste Stabilität aufweist, müssten die jeweiligen

Einzeldomänen Fluoreszenz-spektroskopisch gemessen werden, was im zeitlichen Rahmen der Arbeit nicht mehr möglich war.

Bei den Versuchen zur Optimierung der Lysebedingungen durch Variation der zugesetzten Ionen und des pH-Werts wurde erwartet, dass sich das Aktivitätsoptimum nicht wesentlich von dem Protein EPhL-25 unterscheidet, da die EAD dieses Proteins bei K-1 ebenfalls vorhanden ist. Wie erwartet zeigte K-1 eine maximale Lyseaktivität bei einem pH-Wert von 6,5 - 7 und der Zugabe von Mn^{++} -Ionen.

Die Bestimmung der spezifischen Aktivität von K-1 zeigte, dass diese mit $12,01 \Delta Abs \cdot min^{-1} \cdot mg^{-1}$ für *Enterococcus faecalis* und $7,3 \Delta Abs \cdot min^{-1} \cdot mg^{-1}$ für *Enterococcus faecium* geringer war als bei EPhL-25 ($29,4 \Delta Abs_{[600nm]} \cdot min^{-1} \cdot mg^{-1}$ gegen *Enterococcus faecium*). Dieses Ergebnis überraschte, da die EAD des Proteins EPhL-25 ohne Modifikation auch im Protein K-1 vorhanden war. Es wurde vermutet, dass eine gegenseitige Hinderung der beiden CBD des Proteins K-1 die Bindungsgeschwindigkeit und damit auch die spezifische Aktivität verringern. Die Länge der Linkerbereiche zwischen den Domänen ist einerseits aufgrund möglicher sterischer Behinderungen andererseits wegen eventueller Interaktion der fusionierten Domänen von zentraler Bedeutung (He *et al.*, 2007). Da der Literatur zum Thema Domänenkombination bei Endolysinen nichts zur Beschaffenheit der Linker dieser Proteine zu entnehmen ist, müssten zur Überprüfung der Annahme einer sterischen Hinderung weitere Konstrukte mit modifizierten Linkerbereichen hergestellt und getestet werden.

Die Untersuchungen der Spezifität des Proteins zeigten, dass die Erwartung einer hohen Spezifität gegen die Stämme *Enterococcus faecalis* und *Enterococcus faecium* erfüllt wurden. In dem zur Bewertung der Spezifität durchgeführten Plattenlysetest konnten alle eingesetzten Isolate beider Stämme erfolgreich lysiert werden. Auch der Vancomycin-resistente Stamm *Enterococcus faecalis* V583 wurde erfolgreich lysiert.

Der Vergleich der minimalen bakteriziden Konzentrationen der Proteine EPhL-20K, EPhL-25 und K-1 gegen *Enterococcus faecalis* und *Enterococcus faecium* zeigte, dass die Erwartungen in das Protein zum größten Teil erfüllt wurden. In den Testansätzen konnte K-1 99,95% der beiden Teststämme innerhalb einer Stunde lysieren. EPhL-20K lysierte in diesem Test 99,5% der *Enterococcus faecalis*-Zellen aber keine *Enterococcus faecium*-Zellen. EPhL-25 lysierte 99,94% der *Enterococcus*

faecium-Zellen und 99,6% der *Enterococcus faecalis*-Zellen. Das Ergebnis von K-1 ist damit besser als das Ergebnis der beiden Ausgangsproteine. Das Ziel einer vollständigen Lyse der beiden Teststämme wurde allerdings noch nicht erreicht. Als Erklärung kann auch hier die Bildung eines Biofilms bei einem kleinen Teil der Testzellen angenommen werden. Möglicherweise kann das Problem der unvollständigen Lyse durch Anfügen einer weiteren lytischen Domäne mit anderer katalytischer Funktion behoben werden. Das aktivitätsoptimierte Endolysin K-10 gegen Staphylokokken besitzt zum Beispiel neben der Amidasedomäne eine CHAP-Domäne (*cysteine, histidine-dependent amidodepeptidase*) und ist in MBC-Versuchen zu einer vollständigen Lyse der Testzellen mit einer Konzentration von 0,5 µg/ml in der Lage (Forchheim, 2009)

Da auch das Protein K-1 nicht in der Lage war, das gesetzte Ziel der vollständigen Lyse beider Enterokokken-Stämme zu erreichen, sind weitere Optimierungen notwendig. Dies könnte durch die Kombination neuer Domänen oder durch Punktmutationen zur Erhöhung der Stabilität und Aktivität geschehen (Forchheim, 2009). Ein zukünftiges, im Labormaßstab besser funktionierendes Protein müsste dann als nächstes auf seine medizinische Eignung untersucht werden. Dazu gehören Lysetests in humanem Blutserum, sowie systemische Tests im Tiermodell an Maus oder Ratte. Erst wenn diese Tests erfolgreich verlaufen sind, können klinische Studien mit einem Endolysin beginnen.

7 Ausblick

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass es prinzipiell möglich ist lytische Proteine aus Bakteriophagen gegen die klinisch relevanten Stämme *Enterococcus faecalis* und *Enterococcus faecium* einzusetzen. Da im Fall dieser Stämme eine systemische Anwendung als Therapeutikum notwendig ist, wären weitere Untersuchungen und gegebenenfalls weitere Optimierungen des Proteins K-1 notwendig. An erster Stelle stünde dabei die Aktivität und Stabilität in systemischer Umgebung. Das Auftreten von Schnittstellen für im Blut vorkommende Proteasen, sowie eine Denaturierung des Proteins in dieser Umgebung müsste untersucht werden. Auftretende Aktivitäts- und Stabilitätsprobleme könnten dann durch Punktmutationen behoben werden. Des Weiteren bestünde die Notwendigkeit nach weiteren katalytischen Domänen und Zellbindedomänen zu suchen, um andere, eventuell optimalere Domänenkombinationen zu testen.

Ein potentiell deutlich besseres Protein müsste anschließend in systemischer Umgebung, also im Maus- oder Rattenmodell getestet werden. Erst mit diesen Ergebnissen ließe sich realistisch abschätzen, ob ein Protein als Kandidat für eine therapeutische Anwendung in Frage käme.

8 Literaturverzeichnis

Arber W., Nathans D. und Smith H. (1978) The discovery of restriction enzymes and their application to problems of molecular genetics. *The Nobel Prize in Physiology or Medicine 1978*

Ackermann H-W. (1999) Tailed bacteriophages: The order Caudovirales. *Adv Virus Res* **51**: 135-201.

Auton M., Holthauzen L.M., Bolen D.W. (2007) Anatomy of energetic changes accompanying urea-induced protein denaturation. *Proc Natl Acad Sci USA* **104** (39): 15317-22

Auton M., Cruz M.A., Moake J. (2007) Conformational stability and domain unfolding of the Von Willebrand factor A domains. *J Mol Biol.* **366** (3): 986-1000

Bellais S., Arthur M., Dubost L., Hugonnet J.E., Gutmann L., van Heijenoort J., Legrand R., Brouard J.P., Rice L., Mainardi J.L. (2006) Asl_{fm}, the D-aspartate ligase responsible for the addition of D-aspartic acid onto the peptidoglycan precursor of *Enterococcus faecium*. *J Biol Chem* **281** (17): 11586-94

Billot-Klein D., Shlaes D., Bryant D., Bell D., van Heijenoort J., Gutmann L. (1996) Peptidoglycan structure of *Enterococcus faecium* expressing vancomycin resistance of the VanB type. *Biochem J* **313** (3): 711-5

Birnboim H.C., Doly J. (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* **7** (6): 1513-23

Biswas B., Adhya S., Washart P., Paul B. Trostel A. N., Powell B., Carlton R., Merril C. R. (2002) Bacteriophage Therapy Rescues Mice Bacteremic from a Clinical Isolate of Vancomycin-Resistant *Enterococcus faecium*. *Infection and Immunity*: 204–210

Bone R.C., Balk R.A., Cerra F.B., Dellinger R.P., Fein A.M., Knaus W.A., (1992) Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. *JOP. J Pancreas* (Online) **4** (1): 11-16

Borysowski J., Weber-Dabrowska B., Górski A. (2006) Bacteriophage Endolysins as a Novel Class of Antibacterial Agents. *Experimental Biology and Medicine* **231**:366-377

Bouhss A., Josseaume N., Severin A., Tabei K., Hugonnet J.-E., Shlaes D., Mengin-Lecreulx D., van Heijenoort J., Arthur M. Synthesis of the L-Alanyl-L-alanine Cross-bridge of *Enterococcus faecalis* Peptidoglycan *The Journal of Biological Chemistry* **277** (48): 45935–45941

Bradley DE. (1965) The structure of the head, collar and base-plate of „T-even“ type bacteriophages. *J Gen Microbiol* **38**: 395-408

Bradley DE. (1967) Ultra structure of bacteriophages and bacteriocins. *Bacteriol Rev* **31**: 230-314

Capparelli R., Parlato M., Borriello G., Salvatore P., Iannelli D. (2007) Experimental Phage Therapy against *Staphylococcus aureus* in Mice. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **51** (8): 0066-4804

Catherine S. McV., Velásquez M., Fralick J.A. (2007) Phage Therapy of *Pseudomonas aeruginosa* Infection in a Mouse Burn Wound Model. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **51** (6):1934-1938

Centers for Disease Control and Prevention www.cdc.gov

Cetinkaya Y., Falk P., Mayhall C. G. (2000) Vancomycin-Resistant Enterococci. *Clin Mbiol Rev* **13** (4): 686-707

Chung, C. T., Niemela S. L. (1989) One-step preparation of competent *Escherichia coli*: transformation and storage of bacterial cells in the same solution. *Proc Natl Acad Sci USA* **86** (7): 2172-5

Clewell D. B. & Dunny G. M. (2002) Conjugation and genetic exchange in enterococci. *The Enterococci – pathogenesis, molecular biology, and antibiotic resistance.* : 265-300

Croux C, Ronda C, Lopez R, García JL. (1993) Interchange of functional domains switches enzyme specificity : construction of a chimeric pneumococcal-clostridial cell wall lytic enzyme. *Mol Microbiol* **9** (5):1019-1025

De Jonge B. L. M., Handweger S., Gage D. (1996) Altered peptidoglycan composition in vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis*. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **40** (4): 863-869

Deng D., Hoogenkamp M., Exterkate R., Jiang L., van der Sluis L., Cate J. ten, Crielaard W. (2009) Influence of *Streptococcus mutans* on *Enterococcus faecalis* Biofilm Formation *Journal of Endodontics* **35** (9): 1249-1252

Deutsch, S.-M., Guezenec, S., Piot, M., Foster, S., Lortal, S. (2004) Mur-LH, the Broad-Spectrum Endolysin of *Lactobacillus helveticus* Temperate Bacteriophage {phi}-0303. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**: 96-103

Díaz E., Lopez R., Garcia J.L. (1990) Chimeric phage-bacterial enzymes: a clue to the modular evolution of genes. *Proc Natl Acad Sci USA.* **87**: 8125-8129.

Donovan D.M., Foster-Frey J., Dong S., Rousseau G.M., Moineau S., Pritchard D.G. (2006) The cell lysis activity of the *Streptococcus agalactiae* Bacteriophage B30 endolysin relies on the Cysteine, Histidine-Dependent Amidohydrolase/Peptidase domain. *Appl Environ Microbiol* **72** (7): 5108-5112

Donovan D.M., Lardeo M., Foster-Frey J. (2006) Lysis of staphylococcal mastitis pathogens by bacteriophage phi11 endolysin. *FEMS Microbiol Lett* **265** (1):133-9

Donovan D.M., Dong S., Garrett W., Rousseau G.M., Moineau S., Protchard D.G. (2006) Peptidoglycan hydrolase fusions maintain their parental specificities. *Appl Environ Microbiol* **72** (4): 2988-96

Dubos R.J. (1937) The autolytic system of pneumococci *The Journal of Experimental Medicine* **65**: 873-883

European Antimicrobial Resistance Surveillance System (EARSS)-Report (2007 und 2008) <http://www.rivm.nl/earss>

European Centre for Disease Prevention and Control <http://www.ecdc.europa.eu>

Fairbanks G., Steck T. L., Wallach D. F. H. (1971) Electrophoretic analysis of the major proteins of the human erythrocyte membrane. *Biochem.* **10**: 2606-2617

Forchheim (2009) Isolierung und Optimierung antimikrobiell wirkender Phagenproteine zur Bekämpfung antibiotikaresistenter Staphylokokken *Dissertation Universität Regensburg*

d'Herelle F. (1917) Sur un microbe invisible antagoniste des bacilles dysentériques. *C R Acad Sci (Paris)* **165**: 73-5

Fischetti V.A., Yoong P., Schuch R., Nelson D. (2004) Identification of a Broadly Active Phage Lytic Enzyme with Lethal Activity against Antibiotic-Resistant *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium*. *Journal of Bacteriology* 4808-4812

Fischetti VA. (2008) Bacteriophage lysins as effective antibacterials. *Curr Opin Microbiol* **11**: 1-8

Garcia E., Garcia J.L., Garcia P., Lopez R. (1987) Molecular evolution of lytic enzymes of *Streptococcus pneumoniae* and its bacteriophages *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**: 914-918

García E., García J.L., Arraras A., Sanchez-Puelles J.M., Lopez R. (1989) Molecular evolution of lytic enzymes of *Streptococcus pneumoniae* and its bacteriophages. *Proc Natl Acad Sci USA* **85**: 914-8

Godfree, A.F., Kay D., Wyer M.D. (1997) Faecal streptococci as indicators of faecal contamination in water. *J. Appl. Microbiol. Symposium Supplement* **83**: 110- 119

Górski A, Miedzybrodzki R, Borysowski J, Weber-Dabrowska B, Lobočka M, Fortuna W, Letkiewicz S, Zimecki M, Filby G (2009) Bacteriophage therapy for the treatment of infections. *Current Opinion in Investigational Drugs* **10** (8): 766–74

Groman N.B., Suzuki G. J. (1962) Relation of endolysin to lysis by lambda bacteriophages. *Bacteriol.* **84**: 596-7

Halle E., Majcher-Peszynska J., Drewelow B. (2002) Linezolid das erste Antibiotikum aus der Klasse der Oxazolidinone *Chemotherapie Journal* **11**: 1-11

He H.W., Feng S., Pang M., Zhou H.M., Yan Y.B. (2007) Role of the linker between the N- and C-terminal domains in the stability and folding of rabbit muscle creatine kinase. *Int J Biochem Cell Biol.* **39** (10): 1816-27

Infectious Disease Study – Sepsis and Septic Shock (2000) www.idsociety.org

Inoue (1990) *E. coli* competent cells and transformation *Gene* **96**: 23-28

Jaenicke R. (1987) Folding and association of proteins. *Progress in Biophysics & Molecular Biology* **49** (2-3), 117-237

Jarvis A. W., Collins L. J., Ackermann H. W. (1993) A study of five bacteriophages of the *Myoviridae* family which replicate on different gram-positive bacteria. *Archives of Virology* **133** (1-2): 75-84

Nuss J.E., Alter G.M. (2004) Denaturation of replication protein A reveals an alternative conformation with intact domain structure and oligonucleotide binding activity. *Protein Science* **13**: 1365–1378

Kainer M.A., Devasia R.A., Jones T.F., Simmons B.P., Melton K., Chow S., Broyles J., Moore K.L., Craig A.S., Schaffner W. (2007) Response to Emerging Infection Leading to Outbreak of Linezolid-Resistant Enterococci. *EID Journal* **13**

Kaneko J, Kimura T, Narita S, Tomita T, Kamio Y. (1998) Complete nucleotide sequence and molecular characterization of the temperate staphylococcal bacteriophage phiPVL carrying Panton-Valentine leukocidin genes. *Gene* **215** (1): 57-67

King J., Laemmli U.K. (1971). Polypeptides of the tail fibres of bacteriophage T4. *J Mol Biol.* **62** (3): 465-477

Korndörfer I.P., Danzer J., Schmelcher M., Zimmer M., Skerra A., Loessner M.J. (2006) The Crystal Structure of the Bacteriophage PSA Endolysin Reveals a Unique Fold Responsible for Specific Recognition of *Listeria* Cell Walls *J. Mol Biol* **364** (4): 678-689

Kumar JK. (2008) Lysostaphin: an antistaphylococcal agent. *Appl Microbiol Biotechnol* **80**: 555–561

Lehman, I.R. (1974) DNA ligase: structure mechanism and function. *Science* **186**: 790

Liebermann (1956). Aspects of lysis in normal and phage-infected staphylococci. *Ph.D. Thesis*, University of California, Berkeley.

Lima K.C., Fava L.R., Siqueira J.F. Jr. (2001) Susceptibilities of *Enterococcus faecalis* biofilms to some antimicrobial medications. *J Endod.* **27** (10): 616-9

Loeffler JM, Nelson D, Fischetti VA. (2001) Rapid killing of *Streptococcus pneumoniae* with a bacteriophage cell wall hydrolase. *Science* **294**: 2170-2172

Loessner MJ, Schneider A, Scherer S. (1995) A new procedure for efficient recovery of DNA, RNA, and proteins from *Listeria* cells by rapid lysis with a recombinant bacteriophage endolysin. *Appl Environ Microbiol* **61**: 1150-2

Loessner MJ, Gäng S, Wendlinger G, Maier SK, Scherer S. (1998) The two component lysis system of *Staphylococcus aureus* bacteriophage Twort: a large TTG-start holin and an associated amidase endolysin. *FEMS Microbiol Lett* **162**: 265-74

Loessner MJ, Gäng S, Scherer S. (1999) Evidence for a holin-like protein gene fully embedded out of frame in the endolysin gene of *Staphylococcus aureus* bacteriophage 187. *J Bacteriol* **181**: 4452-60

Loessner MJ. (2000) Bakteriophagen: Eine Alternative zu Antibiotika?. *Biospektrum* **6**: 452-455

Loessner MJ, Kramer K, Ebel F, Scherer S. (2002) C-terminal domains of *Listeria monocytogenes* bacteriophage murein hydrolases determine specific recognition and high-affinity binding to bacterial cell wall carbohydrates. *Mol Microbiol* **44**: 335-349

Loessner MJ. (2005) Bacteriophage endolysins - current state of research and applications. *Curr Opin Microbiol* **8**: 480-487

Mainardi J. L., Billot-Klein D., Coutrot A., Legrand R., Schoot B., Gutmann, L. (1998) Resistance to cefotaxime and peptidoglycan composition in *Enterococcus faecalis* are influenced by exogenous sodium chloride. *Microbiology* **144**: 2679-2685

McCoy KM, Frost RA. (1988) Method for solubilization and naturation of somatotropin. *Patent number*: 5064943

Mesnage S., Chau F., Dubost L., Arthur M. (2008) Role of *N*-Acetylglucosaminidase and *N*-Acetylmuramidase Activities in *Enterococcus faecalis* Peptidoglycan Metabolism. *J. Biol Chem* **283** (28): 19845–19853

Mohamed J.A., Huang W., Nallapareddy S. R., Teng F., Murray B.E. (2004) Influence of origin of isolates, especially endocarditis isolates, and various genes on biofilm formation by *Enterococcus faecalis*. *Infect Immun* **72**: 3658-3663

Mullis K.B., Faloona F.A. (1987). Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.* **155**: 335-350

Nallapareddy S.R., Singh K.V., Duh R.-W., Weinstock G.M., Murray B.E. (2000) Diversity of *ace*, a gene encoding a Microbial Surface Component Recognizing Adhesive Matrix Molecules, from different strains of *Enterococcus faecalis* and evidence for production of Ace during human infections. *Infect Immun* **68**: 5210-5217

Nallapareddy S.R., Qin X., Weinstock G.M., Hook M., Murray B.E. (2000) *Enterococcus faecalis* adhesin, *ace*, mediates attachment to extracellular matrix proteins collagen type IV and laminin as well as collagen type I. *Infect Immun* **68**: 5218-5224

Navarre WW, Ton-That H, Faull KF, Schneewind O. (1999) Multiple enzymatic activities of the murein hydrolase from staphylococcal phage phi11. Identification of a D-alanylglycine endopeptidase activity. *J Biol Chem* **274**: 15847-15856

Nigutová K., Štyriak I., Javorský P., Pristaš P. (2007) Partial characterization of *Enterococcus faecalis* bacteriophage F4. *Folia Microbiologica* **53** (3): 234-236

Novick R.P. (1967) Properties of a cryptic high-frequency transducing phage in *Staphylococcus aureus*. *Virology* **33**: 155-166

Pace C.N., Vajdos F., Fee L., Grimsley G., Gray T. (1995) How to measure and predict the molar absorption coefficient of a protein. *Protein Sci.* **4** (11): 2411-23

Swe P.M., Heng N.C.K., Ting Y.-T., Baird H.J., Carne A., Tauch A., Tagg J.R., Jack R.W. (2007) ef1097 and ypkK encode enterococcin V583 and corynicin JK, members of a new family of antimicrobial proteins (bacteriocins) with modular structure from Gram-positive bacteria. *Microbiology* **153**: 3218–3227

Perez-Dorado I., Campillo N.E., Monterroso B., Heseck D., Lee M., Paez J.A., Garcia P., Martinez-Ripoll M., Garcia J.L., Mobashery S., Menendez M., Hermoso J.A. (2007) Elucidation of the molecular recognition of bacterial cell wall by modular pneumococcal phage endolysin CPL-1. *J Biol Chem.* **282** (34): 24990-9

Ralston D.J., Liebermann M., Baer B., Krueger A.P. (1956) Staphylococcal Virolysin, a Phage-induced Lysin *J. Gen. Physiol* **40** (5): 791-806

Ralston DJ, McIvor M. (1964) Lysis-from-without of *Staphylococcus aureus* strains by combinations of specific phages and phage-induced lytic enzymes. *J Bacteriol* **88**: 676-81

Rashel M, Uchiyama J, Ujihara T, Uehara Y, Kuramoto S, Sugihara S, Yagyu K, Muraoka A, Sugai M, Hiramatsu K, Honke K, Matsuzaki S. (2007) Efficient elimination of multidrug-resistant *Staphylococcus aureus* by cloned lysin derived from bacteriophage phi MR11. *J Infect Dis* **196** (8): 1237-47

Renart J., Reiser J., STARK G.R. (1979) Transfer of proteins from gels to diazobenzylxymethyl-paper and detection with antisera: a method for studying antibody specificity and antigen structure. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**: 3116–3120

Rudolph R., Lillie H. (1996) In vitro folding of inclusion body proteins. *The FASEB Journal* **10**: 49-56

Sass P., Bierbaum G., (2007) Lytic Activity of Recombinant Bacteriophage Phi11 and Phi12 Endolysins on Whole Cells and Biofilms of *Staphylococcus aureus*. *Applied and Environmental Microbiology* **73** (1): 347-352

Schleifer, K.-H., Kilpper-Bälz R. (1984) Transfer of *Streptococcus faecalis* and *Streptococcus faecium* to the Genus *Enterococcus* nom. rev. as *Enterococcus faecalis* comb. nov. and *Enterococcus faecium* comb. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **34**: 31-34

Schmid FX. (1989) Spectral methods of characterizing protein conformation and conformational changes. Protein structure approach, *Creighton, T.E., (Hrsg), IRL Press, Oxford, 251-86.*

Schuch R., Nelson D., Fischetti V.A. (2002) A bacteriolytic agent that detects and kills *Bacillus anthracis*. *Nature* **418**: 884–889.

Shankar V., Baghdayan A.S., Huycke M.M., Lindahl G., Gilmore M.S. (1999) Infection-derived *Enterococcus faecalis* strains are enriched in *esp*, a gene encoding a novel surface protein. *Infect Immun* **67**: 193-200

Sheng H., Knecht H.J., Kudva I.T., Hovde C.J. (2006) Application of Bacteriophages To Control Intestinal *Escherichia coli* O157:H7 Levels in Ruminants. *Appl Environ Microbiol.* **72** (8): 5359–5366

Sinton L.W., Donnison A.M., Hastie C.M. (1993) Faecal streptococci as faecal pollution indicators: a review. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research* **27**: 101-137

Smith T.J., Blackman S.A., Foster S.J. (2000) Autolysins of *Bacillus subtilis*: multiple enzymes with multiple functions. *Microbiol* **146**: 249-262.

Son J.S., Jun S.Y., Kim E.B., Park J.E., Paik H.R., Yoon S.J., Kang S.H., Choi Y.-J. (2009) Complete genome sequence of a newly isolated lytic bacteriophage, EFAP-1 of *Enterococcus faecalis*, and antibacterial activity of its endolysin EFAL-1. *Journal of Applied Microbiology online*

Spencer R.C. (1996) Predominant pathogens found in the European Prevalence of Infection in Intensive Care Study. *Eur. J. Clin Microbiol Infect Dis.* **15**: 281-285

Studier F.W., Dubendorff J.W. (1990) Cloning and expression of autogenes encoding RNA polymerases of T7-like bacteriophages. *US Patent 5824528*

Swalla B.M., Cho E.H., Gumpert R.I., Gardner J.F. (2003) The molecular basis of cooperative DNA binding between lambda integrase and excisionase. *Mol Microbiol.* **50**: 89–99

Toledo-Arana A., Valle J., Solano C., Arrizubieta M.J., Cucarella C., Lamata M., Amorena B., Leiva J., Penades J.R., Lasa I. (2001) The Enterococcal Surface Protein, Esp, is involved in *Enterococcus faecalis* biofilm formation. *Appl Environ Microbiol* **67**: 4538-4545

Twort TW. (1915) An investigation on the nature of the ultra-microscopic viruses. *Lancet II*: 1241-1243.

Uchiyama J., Rashed M., Takemura I., Wakiguchi H., Matsuzaki S. (2007) In Silico and In Vivo Evaluation of Bacteriophage phiEF24C, a Candidate for Treatment of *Enterococcus faecalis* Infections. *Applied and Environmental Microbiology* **74** (13): 4149-4163

Van Amserfoort ES (2003) Receptors, Mediators and mechanisms involved in bacterial sepsis and septic shock. *Clin Microbiol Rev* **16**: 379-414

Varshavsky A. (1997) The N-End Rule of Protein degradation. *Genes to Cells* **2**: 13-28

Waldherr F. (2005) Biochemical charakterisation of *Listeria* Phage endolysins. *Masterthesis Eidgenössische Technische Hochschule Zürich*

Wang X., Wilkinson B.J., Jayaswal R.K. (1991) Sequence analysis of a *Staphylococcus aureus* gene encoding a peptidoglycan hydrolase activity. *Gene* **102** (1): 105-9

Wang I.-N., Smith D.L., Young R. (2000) Holins: the protein clocks of bacteriophage infections. *Annu Rev Microbiol* **54**: 799-825

Wang I.-N., Deaton J., Young R. (2003) Sizing the Holin Lesion with an Endolysin-beta-Galactosidase fusion. *J Bacteriol* **185**: 779-787

Wang J.E. et al. (2003) Peptidoglycan and lipoteichoic acid in gram-positiv bacterial sepsis : receptors, signal, transduction, biological effects and synergism. *SHOCK* **20**: 402-414

Wetlaufer D.B. (1962) Ultraviolet spectra of proteins and amino acids. *Advances in Protein Chemistry* **17**: 303-391

Wu JA, Kusuma C, Mond JJ, Kokai-Kun JF. (2003) Lysostaphin disrupts *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms on artificial surfaces. *Antimicrob Agents Chemother* **47** (11): 3407-14

Young R. (1992) Bacteriophage lysis: mechanism and regulation. *Microbiol Rev* **56**: 430-481

9 Danksagung

Für die Möglichkeit zur Durchführung meiner Dissertation möchte ich mich recht herzlich beim Vorstand der Profos AG bedanken.

Für die Betreuung der Arbeit auf Universitätsseite gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. Dr. Hans Robert Kalbitzer.

Im Besonderen gilt mein Dank Dr. Monika Walter und Dr. Stefan Miller, welche mir durch ständige Diskussionsbereitschaft, viele Ideen und die große fachliche Unterstützung sehr bei der Fertigstellung meiner Arbeit behilflich waren.

Danken möchte ich auch Dr. Holger Grallert für sein stetes Interesse an meiner Arbeit.

Möglich wurde die Arbeit erst durch die finanzielle Unterstützung des BMBF, wofür ich natürlich auch danken möchte.

Allen Kolleginnen und Kollegen möchte ich meinen Dank für das herzliche Arbeitsklima, für die gute Zusammenarbeit und gegenseitige Unterstützung aussprechen. Michael Forchheim und Christoph Knappe gilt mein Dank für ihre Bemühungen in der Entwicklung der Methoden der Rückfaltung und Proteinreinigung, die mir und vielen Kollegen zu Gute kamen. Für die Hilfe und viele Tipps bei der Phagenisolierung möchte ich mich bei Elisabeth Olbrich und Dr. Manfred Biebl bedanken. Bei Dr. Monika Walter möchte ich mich für die Einführung in viele Geräte und Arbeitstechniken bedanken.

Bei Michael Forchheim bedanke ich mich sehr für die Gespräche, den Humor und die ausdauernde stoische Ruhe, welche mir halfen die teils sehr stressige Zeit während der Doktorarbeit ohne größere Schäden zu überstehen.

Danke sagen möchte ich auch Christoph Maier, für seine diplomatische und informative Rolle die er des öfteren, nicht immer freiwillig, übernehmen musste.

Danksagung

Michael Euringer, Sarah Feldkirchner, Dr. Sonja Leopoldseder, Michaela Pötzl und Anna Scherzinger gilt ebenfalls mein Dank für ihre Fähigkeiten eine Mittagspause mit spielerischer Leichtigkeit in einen Kurzurlaub zu verwandeln.

Abschließend möchte ich mich ganz herzlich bei meinen Eltern für die immerwährende Unterstützung und Geduld in jeglicher Hinsicht bedanken.

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe. Ich versichere weiterhin, dass allen anderen Werken wörtlich oder inhaltlich entnommene Stellen als solche gekennzeichnet sind.

Diese Arbeit wurde bislang weder einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt noch veröffentlicht.

Regensburg, den 10.11.2009

(Falko Bretfeld)
