

# **Isolierung und Optimierung antimikrobiell wirkender Phagenproteine zur Bekämpfung antibiotikaresistenter Staphylokokken**

DISSERTATION ZUR ERLANGUNG DES DOKTORGRADES DER  
NATURWISSENSCHAFTEN (DR. RER. NAT.) DER NATURWISSENSCHAFTLICHEN  
FAKULTÄT III - BIOLOGIE UND VORKLINISCHE MEDIZIN DER UNIVERSITÄT  
REGENSBURG



vorgelegt von  
Michael Forchheim aus Kändler

Januar 2009

Promotionsgesuch eingereicht am 09.01.2009

Die Arbeit wurde angeleitet von: Prof. Dr. R. Sterner

Prüfungsausschuß: Vorsitzender: Prof. Dr. R. Wirth

1. Prüfer: Prof. Dr. R. Sterner

2. Prüfer: Prof. Dr. M. Thomm

3. Prüfer: Prof. Dr. H. Tschochner

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Oktober 2005 bis Januar 2009 bei der Profos AG in Regensburg in der Abteilung Forschung und Entwicklung, Bereich Antimicrobials in Kooperation mit dem Lehrstuhl Biochemie II des Institutes für Biophysik und physikalische Biochemie der Naturwissenschaftlichen Fakultät III der Universität Regensburg unter Leitung von Herrn Prof. Dr. Reinhard Sterner angefertigt.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe des Literaturzitats gekennzeichnet.

.Regensburg, 09.01.2009

Ort, Datum

.....

(Michael Forchheim)



## Inhaltsverzeichnis

|   |           |
|---|-----------|
| <b>1 Einleitung.....</b>  | <b>1</b>  |
| 1.1 <i>Staphylococcus aureus</i> .....                              | 1         |
| 1.1.1 Mikrobiologie.....  | 1         |
| 1.1.2 Struktur der Zellhülle von <i>Staphylococcus aureus</i> ..... | 1         |
| 1.1.3 Pathologie .....  | 3         |
| 1.1.4 Antibiotikaresistenz .....                                    | 5         |
| 1.2 Bakteriophagen .....  | 8         |
| 1.3 Endolysine.....   | 10        |
| 1.4 Autolysine.....   | 12        |
| 1.5 Antimikrobielle Strategien.....                                 | 13        |
| 1.5.1 Bacteriocine .....  | 13        |
| 1.5.2 Immuntherapie .....   | 13        |
| 1.5.3 Phagentherapie.....   | 14        |
| 1.6 Ansatz .....  | 15        |
| 1.7 Zielsetzung:.....   | 16        |
| <b>2 Material.....</b>  | <b>17</b> |
| 2.1 Bakterienstämme .....   | 17        |
| 2.1.1 <i>Escherichia coli</i> Stämme.....                           | 17        |
| 2.1.2 Teststämme .....  | 18        |
| 2.2 Enzyme .....  | 20        |
| 2.3 Plasmide .....  | 21        |
| 2.4 Oligonukleotide.....  | 25        |
| 2.5 DNA- und Protein-Größenstandards.....                           | 27        |
| 2.5.1 DNA-Größenstandard.....                                       | 27        |
| 2.5.2 Protein Größenstandard .....                                  | 27        |
| 2.6 Chemikalien .....   | 28        |
| 2.7 Nährmedien.....   | 28        |
| 2.8 Antibiotika und Medienzusätze.....                              | 29        |
| 2.9 Häufig verwendete Puffer und Lösungen .....                     | 29        |
| 2.9.1 Allgemeine Puffer.....  | 29        |
| 2.9.2 Zellaufschluss und Rückfaltung.....                           | 30        |
| 2.9.3 Chromatographie .....   | 31        |

|          |  |           |
|----------|--|-----------|
| 2.9.4    | Analytik .....   | 32        |
| 2.9.5    | Funktionstestung.....  | 33        |
| 2.10     | Kits .....   | 33        |
| 2.11     | Verbrauchsmaterialien .....  | 34        |
| 2.12     | Geräte .....   | 34        |
| 2.13     | Software .....   | 36        |
| <b>3</b> | <b>Methoden .....</b>  | <b>37</b> |
| 3.1      | Mikrobiologische Methoden.....                                       | 37        |
| 3.1.1    | Isolation lytischer Bakteriophagen.....                              | 37        |
| 3.1.2    | Bestimmung des Phagentiters .....                                    | 38        |
| 3.1.3    | Konservierung der Bakteriophagen.....                                | 38        |
| 3.1.4    | Wirtsspektrum von Bakteriophagen .....                               | 38        |
| 3.1.5    | Proteinexpression in <i>Escherichia coli</i> .....                   | 38        |
| 3.1.6    | Aufnahme einer Wachstumskurve .....                                  | 39        |
| 3.1.7    | Herstellung kompetenter <i>Escherichia coli</i> Zellen.....          | 40        |
| 3.1.8    | Zellwandpräparation von Staphylokokken.....                          | 40        |
| 3.2      | Molekularbiologische Methoden .....                                  | 41        |
| 3.2.1    | Isolierung von DNA aus Bakteriophagen .....                          | 41        |
| 3.2.2    | Unspezifische Amplifikation von DNA .....                            | 41        |
| 3.2.3    | Polymerasekettenreaktion.....  | 42        |
| 3.2.3.1  | <i>colony</i> -PCR.....  | 43        |
| 3.2.3.2  | PCR-Mutagenese .....   | 43        |
| 3.2.4    | Isolierung von Plasmid-DNA .....                                     | 44        |
| 3.2.5    | Verwendung von Enzymen zur Veränderung der DNA .....                 | 44        |
| 3.2.5.1  | Restriktionsverdau .....   | 44        |
| 3.2.5.2  | Ligation .....   | 45        |
| 3.2.6    | Transformation von DNA in <i>Escherichia coli</i> .....              | 45        |
| 3.2.7    | <i>Shot-Gun</i> Klonierung von Zufallssequenzen aus Phagen-DNA ..... | 45        |
| 3.2.8    | Blau-Weiß-Screening .....  | 46        |
| 3.2.9    | Agarose-Gelelektrophorese .....                                      | 47        |
| 3.3      | Proteinbiochemische Methoden .....                                   | 48        |
| 3.3.1    | Gewinnung unlöslich exprimierter Proteine .....                      | 48        |
| 3.3.1.1  | Isolierung von <i>inclusion bodies</i> .....                         | 48        |
| 3.3.1.2  | Solubilisierung von <i>inclusion bodies</i> .....                    | 48        |

|          |   |           |
|----------|---|-----------|
| 3.3.1.3  | Rückfaltung denaturierter Proteine .....                                  | 49        |
| 3.3.2    | Proteinreinigung .....  | 49        |
| 3.3.2.1  | Anionenaustauscherchromatographie .....                                   | 49        |
| 3.3.2.2  | Kationenaustauscherchromatographie .....                                  | 50        |
| 3.3.2.3  | Affinitätschromatographie mittels Heparinsäule .....                      | 50        |
| 3.3.2.4  | Affinitätschromatographie mittels Streptavidinsäule.....                  | 50        |
| 3.3.2.5  | Extraktion von denaturiertem Protein aus einem SDS-PA-Gel ...             | 51        |
| 3.4      | Analytische Methoden .....  | 51        |
| 3.4.1    | SDS-Polyacrylamidgelektrophorese und Coomassie Blue Färbung.              | 51        |
| 3.4.2    | Westernblot.....  | 52        |
| 3.4.3    | Test auf lösliche Expression.....   | 54        |
| 3.4.4    | UV-Spektroskopie .....  | 54        |
| 3.4.4.1  | Bestimmung der Proteinkonzentration .....                                 | 54        |
| 3.4.4.2  | Konzentrationsbestimmung vor Sequenzierung von DNA .....                  | 55        |
| 3.4.5    | Fluoreszenzspektroskopie zur Untersuchung der chemischen Stabilität ..... | 56        |
| 3.4.6    | Circulardichroismus (CD)-Spektroskopie .....                              | 57        |
| 3.4.7    | Untersuchung der thermischen Stabilität (Aggregationsübergang) ....       | 58        |
| 3.4.8    | Proteaseverdau.....   | 58        |
| 3.5      | Funktionstestung.....   | 59        |
| 3.5.1    | Zellbindetests .....  | 59        |
| 3.5.1.1  | Peroxidasetest .....  | 59        |
| 3.5.1.2  | Zellbindetest mit magnetischen Beads .....                                | 59        |
| 3.5.2    | Test der lytischen Aktivität.....   | 61        |
| 3.5.2.1  | Aktivitätstest auf Agarplatten.....                                       | 61        |
| 3.5.2.2  | Flüssiglysetest .....   | 62        |
| 3.5.2.3  | Bestimmung der minimalen bakteriziden Konzentration .....                 | 63        |
| 3.5.2.4  | Bestimmung der minimalen inhibitorischen Konzentration.....               | 63        |
| 3.6      | Bioinformatische Methoden .....   | 64        |
| <b>4</b> | <b>Ergebnisse und Diskussion .....</b>                                    | <b>65</b> |
| 4.1      | Isolation lytischer Bakteriophagen.....                                   | 65        |
| 4.2      | Screening nach Endolysinen.....   | 67        |
| 4.3      | Etablierung benötigter Verfahren.....                                     | 69        |
| 4.3.1    | Solubilisierung der <i>inclusion bodies</i> .....                         | 69        |

|         |   |     |
|---------|---|-----|
| 4.3.2   | Rückfaltung von Proteinen aus solubilisierten <i>inclusion bodies</i> ..... | 70  |
| 4.3.3   | Optimierung des Flüssiglysetests an Pitti26Ami.....                         | 71  |
| 4.4     | Charakterisierung einzelner Domänen .....                                   | 74  |
| 4.4.1   | Zellwandbindedomäne CBD.....  | 74  |
| 4.4.1.1 | Bindung an Staphylokokkenzellen .....                                       | 74  |
| 4.4.1.2 | Thermische Stabilität .....   | 77  |
| 4.4.2   | Enzymatisch aktive Domänen EADs.....  | 77  |
| 4.4.2.1 | Lytische Aktivität .....  | 77  |
| 4.5     | Verbesserung der Eigenschaften durch Domänenkombination .....               | 79  |
| 4.5.1   | Modulshuffling.....   | 79  |
| 4.5.2   | Untersuchungen an Modul 3 .....   | 81  |
| 4.5.2.1 | Lyseaktivität .....   | 81  |
| 4.5.2.2 | Löslichkeit .....   | 81  |
| 4.5.2.3 | Proteasestabilität .....  | 84  |
| 4.5.2.4 | Aktivität und Stabilität in Blut.....                                       | 86  |
| 4.5.2.5 | Lyse von MRSA .....   | 87  |
| 4.5.2.6 | Chemische Denaturierung von K9-Domänen.....                                 | 88  |
| 4.6     | Stabilisierung und Aktivitätssteigerung durch Einzelmutationen .....        | 89  |
| 4.6.1   | Auswahl der Mutationsstellen in der Sequenz von K9 .....                    | 89  |
| 4.6.2   | Charakterisierung der K9 Varianten .....                                    | 92  |
| 4.6.2.1 | Anzucht, Solubilisierung und Rückfaltung.....                               | 92  |
| 4.6.2.2 | Lyseaktivität .....   | 92  |
| 4.6.2.3 | Lysespektrum.....   | 94  |
| 4.6.2.4 | Proteasestabilität .....  | 95  |
| 4.6.2.5 | Lagerstabilität.....  | 96  |
| 4.6.2.6 | Schlussfolgerungen aus der Charakterisierung der mutierten Proteine.....    | 97  |
| 4.7     | Affinitätschromatographie mit Heparin .....                                 | 97  |
| 4.8     | Reinigungsschema für Endolysine .....                                       | 100 |
| 4.9     | Eigenschaften von K10 .....   | 102 |
| 4.9.1   | Lagerstabilität.....  | 103 |
| 4.9.2   | Thermische Stabilität.....  | 104 |
| 4.9.3   | Bakterizide Aktivität und Lyse in Mucin .....                               | 105 |
| 4.9.4   | CD-Spektroskopie .....  | 106 |

|   |            |
|---|------------|
| 4.10 Untersuchungen an K10 <i>in vivo</i> .....                       | 108        |
| 4.10.1 Toxizität.....   | 108        |
| 4.10.2 Neutralisation von K10 durch Anti-K9 Antikörper .....          | 109        |
| 4.10.3 Pharmakokinetik.....   | 111        |
| 4.10.4 Wirksamkeit von K10 im Tiermodell .....                        | 114        |
| 4.11 MBC-Vergleich in verschiedenen Sera.....                         | 117        |
| 4.12 Design neuer Moleküle zur Minimierung der Aktivitätshemmung..... | 118        |
| 4.12.1 Einführung einer neuen Zellwandbindedomäne .....               | 118        |
| 4.12.1.1 Klonierung.....  | 118        |
| 4.12.1.2 Lyseaktivität .....  | 118        |
| 4.12.1.3 Minimale inhibitorische Konzentration.....                   | 119        |
| 4.12.1.4 Minimale bakterizide Konzentration .....                     | 120        |
| 4.12.1.5 Stabilität .....   | 121        |
| 4.12.2 Verwendung anderer EADs .....                                  | 123        |
| 4.13 Charakterisierung der Kandidatenproteine.....                    | 126        |
| 4.13.1 Thermische Stabilität.....                                     | 126        |
| 4.13.2 Lyseaktivität .....  | 127        |
| 4.13.3 Wachstumsphasenabhängigkeit der Lyse.....                      | 128        |
| 4.13.4 Minimale bakterizide Konzentration .....                       | 129        |
| <b>5 Zusammenfassende Diskussion .....</b>                            | <b>131</b> |
| 5.1 Gewinnung unlöslich exprimierter Proteine .....                   | 131        |
| 5.2 Identifizierung lytischer Proteine.....                           | 132        |
| 5.3 Proteinoptimierung durch Modulshuffling und Einzelmutationen..... | 133        |
| 5.4 <i>In vivo</i> Untersuchungen am Kandidatenprotein K10 .....      | 135        |
| <b>6 Zusammenfassung .....</b>  | <b>139</b> |
| <b>7 Literaturverzeichnis .....</b>                                   | <b>141</b> |
| <b>8 Abkürzungsverzeichnis.....</b>                                   | <b>157</b> |
| <b>9 Danksagung.....</b>  | <b>159</b> |

## 1 Einleitung

### 1.1 *Staphylococcus aureus*

#### 1.1.1 Mikrobiologie

Bei Staphylokokken handelt es sich um gram-positive, unbewegliche, fakultativ anaerobe, nicht sporulierende Kokken (Holt *et al.*, 2000). Die Zellen bilden, wie der Name schon sagt, traubenförmige Gruppen (griechisch: *staphylé* – Weintraube, *kókkos* – Kugel).

Die systematische Einordnung der Staphylokokken ist in Tab. 1.1 dargestellt.

**Tab. 1.1** Systematische Einordnung am Beispiel des Typstammes *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus*.

|           |  |
|-----------|--|
| Domäne    | Bacteria   |
| Abteilung | Firmicutes   |
| Klasse    | Bacilli  |
| Ordnung   | Bacillales   |
| Familie   | <i>Staphylococcaceae</i>   |
| Gattung   | <i>Staphylococcus</i>  |
| Art       | <i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i> Rosenbach 1884 |

Innerhalb der Gattung *Staphylococcus* wurden über 20 Arten beschrieben (Holt *et al.*, 2000). Klinisch relevant sind jedoch nur vier Arten, welche man nach der Fähigkeit zur Produktion freier Koagulase unterteilt. Bei der Koagulase handelt es sich um ein Protein, welches an Prothrombin bindet. Dieser proteolytische Komplex löst dann die Spaltung von Fibrinogen und damit die Aktivierung von Fibrin aus (Hahn *et al.*, 2005). Koagulase-negativ sind *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus haemolyticus* und *Staphylococcus saprophyticus*. Der einzige humanpathogene Koagulase-positive Vertreter ist *Staphylococcus aureus*.

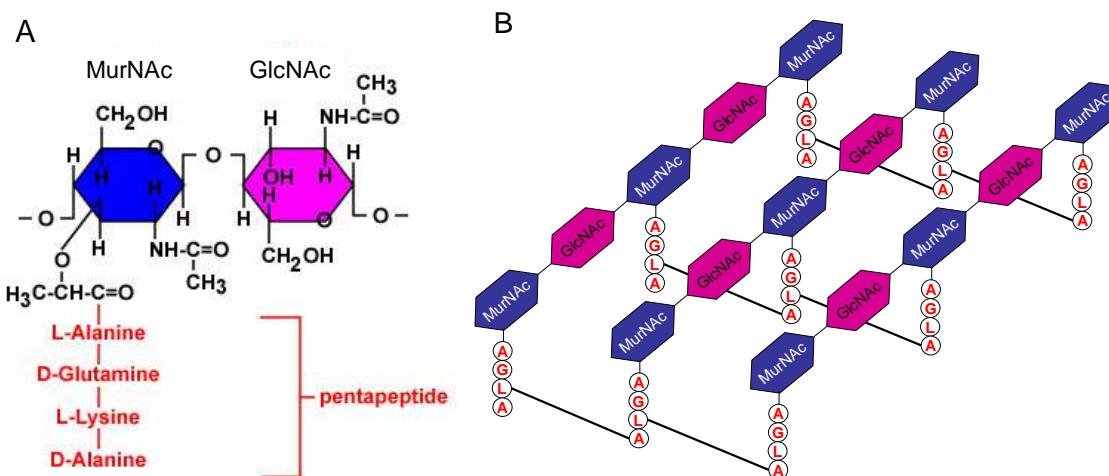
Staphylokokken sind Bestandteil der Haut und Schleimhautflora des Menschen. So sind beispielsweise 30%-40% der Erwachsenen Träger von *Staphylococcus aureus*, ohne jedoch Krankheitssymptome zu zeigen.

#### 1.1.2 Struktur der Zellhülle von *Staphylococcus aureus*

Für eine effektive Behandlung von Staphylokokkeninfektionen ist die Kenntnis der Strukturen der Zellhülle des Zielbakteriums von großer Bedeutung. Diese Strukturen stellen die Kontaktfläche zur Umgebung dar. Sie sind an vielen, die Infektion betreffenden Vorgängen beteiligt. Hierfür wären zum Beispiel die Anheftung an

Epithelien, die Interaktion mit dem Immunsystem und die Exposition von Pathogenitätsfaktoren (1.1.3) zu nennen. Die Zellhülle stellt auch die Zielstruktur vieler antimikrobieller Wirkstoffe, wie z.B. vieler Antibiotika (1.1.4), Endolysine (1.3), Bacteriocine (1.5.1), Antikörper (1.5.2) und Phagen (1.5.3) dar.

*Staphylococcus aureus* gehört zu den gram-positiven Bakterien und besitzt deshalb eine Cytoplasmamembran, jedoch keine äußere Membran. Das Peptidoglycan besteht aus Glycanketten alternierender N-AcetylMuraminsäure- (MurNAc) und N-AcetylGlucosamin- (GlcNAc) Moleküle, welche  $\beta$ -1,4-glykosidisch verknüpft sind. An MurNAc ist ein Tetrapeptid kovalent über eine Amidbindung gekoppelt. Dieses besteht bei *Staphylococcus aureus*, ausgehend von MurNAc, aus L-Alanin, D-iso Glutamin, L-Lysin und D-Alanin (Vollmer *et al.*, 2008), (Abb. 1.1A). Tetrapeptidketten sind über ein Pentaglycin-Brückenpeptid zwischen der freien Aminogruppe des basischen L-Lysins und der freien Carboxylgruppe des terminalen D-Alanins quervernetzt (Schleifer & Kandler, 1972), (Abb. 1.1B).



**Abb. 1.1** Aufbau der Zellwand von *Staphylococcus aureus*. (A) Peptidoglycan Monomer (B) mittels Pentaglycinbrücke quervernetztes Peptidoglycan. (MurNAc) N-Acetyl-Muraminsäure, (GlcNAc) N-Acetyl-Glucosamin, (A) Alanin, (G) D-iso-Glutamin, (L) L-Lysin. Die Pentaglycinbrücke ist als schwarze Linie zwischen L-Lysin und D-Alanin dargestellt. (Quelle Abb.1.1 A: <http://student.ccbcmd.edu/courses/bio141/lecguide/unit1/prostruct/u1fig8b.html>)

*Staphylococcus aureus* besitzt zwei Arten von Zellwand-Glycopolymeren (engl. *cell-wall glycopolymers*-CWGs), die Teichonsäuren und die Lipoteichonsäuren (Neuhaus & Baddiley, 2003). Teichonsäuren sind über Phosphodiesterbrücken an MurNAc gekoppelt (Araki & Ito, 1989), während Lipoteichonsäuren über Glycolipide in der Membran verankert sind (Fischer, 1988). Bei *Staphylococcus aureus* setzen sich die Teichonsäuren aus repetitiven Ribitol-Einheiten zusammen (Schleifer & Kandler, 1972). Die Lipoteichonsäuren bestehen aus sich wiederholenden Glycerin-

Phosphaten (Weidenmaier & Peschel, 2008). Beide CWGs können nach außen ragen und als Phagenrezeptor dienen (Takác & Bläsi, 2005).

Die Kapselbildung an *Staphylococcus aureus* konnte erstmals im Jahre 1931 beschrieben werden (Gilbert, 1931). Erst 1982 wurde ein Schema zur Typisierung der Kapselsaccharide mittels Antikörpern vorgeschlagen (Karakawa & Vann, 1982). Mit Hilfe der Typisierungsmethode konnten acht Serotypen der Polysaccharidkapsel unterschieden werden. Ferner wurde festgestellt, dass die meisten *Staphylococcus aureus* Stämme Kapseln bilden. Bei der Typisierung einer großen Stammsammlung konnten weitere drei Serotypen gefunden werden (Sompolinski *et al.*, 1985). Etwa 75% der, von Menschen gewonnenen, kapselbildenden *Staphylococcus aureus* – Isolate gehören zu den Serotypen 5 oder 8 (O’Riordan & Lee, 2004). Durch die Produktion der Kapsel-Polysaccharide 5 oder 8 wird das Bakterium nicht phagozytiert und ist somit vor der Zerstörung durch humane polymorphenonucleare Leukocyten geschützt (Karakawa *et al.*, 1988; Thakker *et al.*, 1998). Andererseits wird die Adhäsion an Endothelzellen, durch Maskierung der Bindedomäne des *Staphylococcus aureus* Adhäsins durch Kapsel-Polysaccharid 5, vermindert (Pohlmann-Dietze *et al.*, 2000). Durch die Polysaccharidkapsel wird außerdem die Adsorption von Bakteriophagen an *Staphylococcus aureus* gehemmt (Wilkinson & Holmes, 1979).

### 1.1.3 Pathologie

Die medizinische Relevanz liegt in der Fülle der Pathogenitätsfaktoren von *Staphylococcus aureus* begründet. Wie in 1.1.2 beschrieben, wird die Phagozytose des Bakteriums durch eine Polysaccharidkapsel gehemmt. Eine weitere, auf der Zelloberfläche lokalisierte Struktur, stellt Protein A dar. Dieses Oberflächenprotein ist in der Lage an den F<sub>C</sub>-Rezeptor von Antikörpern zu binden, wodurch dieser blockiert und eine effektive Immunantwort verhindert wird (Palmqvist *et al.*, 2002). Ein weiteres Oberflächenprotein, neben Protein A ist der sog. *clumping factor*. Mit Hilfe des *clumping factors* ist *Staphylococcus aureus* in der Lage, sich an die Cytokeratine der Epidermis anzuheften (O’Brien *et al.*, 2002; Walsh EJ *et al.*, 2004). Außerdem bindet der *clumping factor* Fibrinogen (Ní Eidhin *et al.*, 1998). Weiterhin sind auf der Zelloberfläche Bindeproteine gegen Fibronectin (Flock *et al.*, 1987), Kollagen (Patti *et al.*, 1992), Fibrinogen (Bodén & Flock, 1992), Vitronectin (Paulsson *et al.*, 1992) und Elastin (Park *et al.*, 1996)) lokalisiert. Diese, auch Rezeptine genannten (Kronvall &

Jönsson, 1999), Proteine gewährleisten eine effektive Kolonisierung und Persistenz von *Staphylococcus aureus* an verschiedenen Stellen (z.B. Epithelien) des Wirts (Haggar *et al.*, 2003). Neben den Zellwand-gebundenen Receptinen werden freie Bindeproteine produziert. Beispiele hierfür sind die freie Plasmakoagulase und Eap (*extracellular adherence protein*). Eap ist in der Lage diverse Plasmaproteine, wie Fibronectin, Fibrinogen und Prothrombin zu binden. Durch Oligomerisierung und Bindung an die Staphylokokkenzelle verursacht Eap Agglutination von *Staphylococcus aureus*. Beides führt zu einer gesteigerten Anlagerung der Zellen an Fibroblasten und Epithelzellen (Palma *et al.*, 1999). Durch die Plasmakoagulase wird Prothrombin gebunden. Der entstandene, proteolytische Komplex aktiviert Fibrinogen, so dass Fibrin entsteht (Akiyama *et al.*, 1997). Hinter diesem Fibrinwall ist die *Staphylococcus aureus* Zelle für das Immunsystem schwer zu erkennen. Um eine weitere Verbreitung zu gewährleisten, besitzt *Staphylococcus aureus* die Staphylokinase. Diese interagiert mit Plasminogen. Das Resultat ist die Serinprotease Plasmin (Collen & Lijnen, 1994). Durch Plasmin kann Fibrin hydrolysiert werden und eine weitere Verbreitung von *Staphylococcus aureus* kann erfolgen. Weiterhin interagiert Staphylokinase auch mit  $\alpha$ -Defensinen (antimikrobielle Peptide), wodurch die Aktivität beider Bindungspartner inaktiviert wird (Braff *et al.*, 2007). Ein weiterer extrazellulärer Faktor ist die Hyaluronidase (Davison *et al.*, 1949). Durch die Hyaluronidase werden Zell-Zellverbindungen zerstört, wodurch die Ausbreitung des Erregers im Gewebe möglich wird. Diese Ausbreitung wird durch DNasen, Lipasen und Hämolysin unterstützt.

Eine weitere Gruppe von Virulenzfaktoren sind die Toxine. Zum Beispiel bildet  $\alpha$ -Toxin, welches eine Phospholipase C-Aktivität trägt, Poren in der Membran von Blutplättchen und Monocyten und wird deshalb auch  $\alpha$ -Hämolysin genannt. Die Enterotoxine A bis M, sowie TSST-1 wirken als Superantigene. Sie binden sowohl MHC-II-Proteine (*Major Histocompatibility Complex*), als auch an den T-Zellrezeptor auf CD4+-T-Zellen (Malchiodi *et al.*, 1995; Llewelyn *et al.*, 2004). Die, durch diese Vernetzung induzierte, übermäßige Aktivierung der T-Zellen hat eine unkoordinierte Zytokinfreisetzung zur Folge. Ein weiterer Pathogenitätsfaktor ist das Panton-Valentine Leukozidin (PVL), welches aus den Genprodukten von *lukS* und *lukF* besteht. Die beiden Gene werden durch den Bakteriophagen phiSLT im lysogenen Zyklus in das Staphylokokkengenom integriert. Die Zelle exprimiert und sekretiert nun LukS-PV und LukF-PV, welche extrazellulär ein Heptamer ausbilden. Dieses

kann Poren in der Cytoplasmamembran von Makrophagen bilden, was zu deren Lyse führt (Kaneko & Kamio, 2004). Bei Granulocyten und Makrophagen löst PVL vermutlich einen nekrotischen Zelltod aus (Boyle-Vavra & Daum, 2007).

*Staphylococcus aureus* ist zur Bildung von Biofilmen auf humanen Geweben oder implantierten medizinischen Geräten in der Lage (Parsek & Singh, 2003). Dies führt häufig zu chronischen Infektionen (Furukawa *et al.*, 2006), da der Angriff des Immunsystems und antimikrobieller Therapeutika durch den Biofilm erschwert wird. Als Beispiel sei die stark erhöhte Unempfindlichkeit von *Staphylococcus aureus* Zellen im Biofilm gegen Rifampicin, im Vergleich zu freien Zellen genannt (Boles & Horswill, 2008).

Die durch Staphylokokken verursachten Krankheitsbilder sind sehr vielgestaltig. Es treten eitrige Infektionen, wie z.B. Haut- und Weichteilinfektionen, Abszesse, Impetigo, Osteomyelitis, Pneumonie, Sepsis und Fremdkörperassoziierte Infektionen auf. Weitere Erkrankungen, wie *Toxic Shock-Syndrom*, bullöse Impetigo, *Staphylococcal Scalded Skin-Syndrom*, rezidivierende Abszesse und Lebensmittelvergiftung sind toxinbedingt (Linde & Lehn, 2005). Ein weiteres medizinisch relevantes Problem ist die Besiedelung implantierter Plastikmaterialien durch *Staphylococcus epidermidis* unter Ausbildung von Biofilmen-die sog. Endoplastitis.

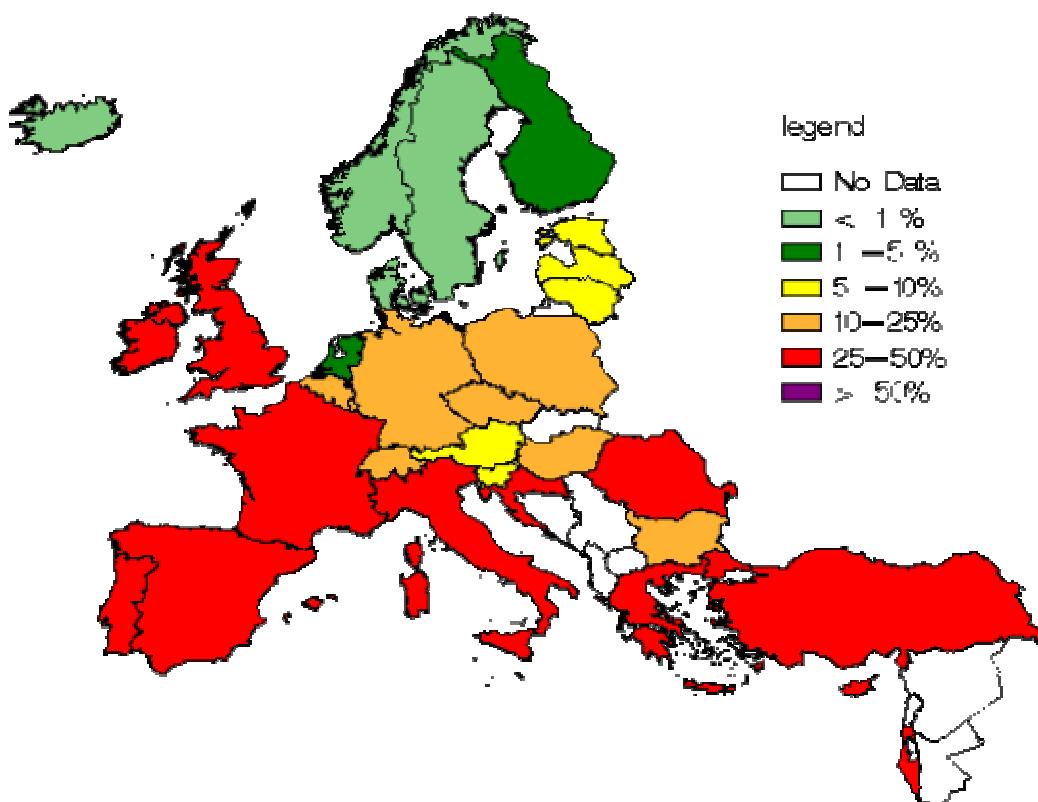
### 1.1.4 Antibiotikaresistenz

Die Behandlung der von *Staphylococcus aureus* verursachten Krankheiten erfolgt unter teilweise exzessivem Einsatz von Antibiotika. Hierdurch wird die Entwicklung von Antibiotikaresistenzen beschleunigt, die ein großes und weiter zunehmendes Problem in der Therapie darstellen. Das Auftreten resistenter Stämme erfordert die Entwicklung neuer Antibiotika bzw. eine Kombinationstherapie mit verschiedenen Antibiotika. Der dadurch zunehmende Selektionsdruck führt wiederum zum schnelleren Auftreten von Stämmen, welche gegen die eingesetzten Antibiotika unempfindlich sind. So beträgt z.B. bei *Staphylococcus aureus* die Dauer von der Einführung einer neuen antibiotischen Substanz bis zum Auftreten erster resistenter Stämme lediglich vier Jahre (Linde & Lehn, 2005).

Das erste Antibiotikum, welches seit Beginn der 1940er Jahre großflächig eingesetzt wurde, war das  $\beta$ -Laktamantibiotikum Penicillin. Bereits im Jahr 1945 wurden erste Staphylokokken isoliert, die gegen Penicillin resistent waren (Spink & Ferris, 1945). Der Grund der Resistenz ist eine Plasmid-codierte  $\beta$ -Laktamase, die den  $\beta$ -

Laktamring des Penicillins hydrolysiert und das Antibiotikum damit inaktiviert. Die zuerst in wenigen Fällen auftretende Resistenz verbreitete sich jedoch aufgrund des weiteren Einsatzes von Penicillin. So waren in den 1970er Jahren nahezu alle, in Krankenhäusern isolierten *Staphylococcus aureus*-Stämme resistent gegenüber Penicillin. 1959 wurde Methicillin, das erste „penicillinasefeste“ halbsynthetische Penicillin entwickelt. Dessen  $\beta$ -Laktamring ist durch sterische Abschirmung im Vergleich zu PenicillinG besser gegen den Angriff von  $\beta$ -Laktamasen geschützt. Schon zwei Jahre später wurden Methicillin-resistente Staphylokokken beschrieben (Barber, 1961).

Eine Gruppe medizinisch besonders relevanter Bakterien stellen die MRSA (**Methicillin-resistente *Staphylococcus aureus***) dar. Wird eine Resistenz gegen Methicillin (bzw. Oxacillin) festgestellt, gilt der Stamm als resistent gegen alle  $\beta$ -Laktamantibiotika. Diese Resistenz wird durch das *mecA*-Gen vermittelt, das in der *SCCmec*-Genkassette durch horizontalen Gentransfer übertragen und in das bakterielle Genom rekombiniert wird (Gordon & Lowy, 2008). Als Genprodukt von *mecA* wird ein Penicillin-Bindeprotein (PBP2a) exprimiert. Dieses zeigt im Vergleich zu PBP2, dem in Methicillin-sensitiven Staphylokokken vorkommenden Analogon zu PBP2a, eine geringere Affinität zu  $\beta$ -Laktamantibiotika (Fuda *et al.*, 2004). PBP2 besitzt eine Transpeptidaseaktivität und sorgt während der Zellwandsynthese für die Quervernetzung der Zellwand. Durch die Bindung von PBP2 an  $\beta$ -Laktame werden die Peptidoglycanstränge nicht mehr quervernetzt. Dies führt zu einer Instabilisierung der Zellwand. PBP2a trägt ebenfalls eine Transpeptidasedomäne, übernimmt die Funktion von PBP2 und kann aufgrund der niedrigen Affinität zu  $\beta$ -Laktamantibiotika durch diese nicht mehr inaktiviert werden. Der Anteil von MRSA an *Staphylococcus aureus*-Isolaten lag in Deutschland 1999 noch bei 8,5%. Bis 2004 stieg er bereits auf 19,6% und für 2008 liegt der Wert bis jetzt bei 23,2% (EARSS Datenbank).



**Abb. 1.2** Anteil von MRSA an *Staphylococcus aureus* Isolaten im Jahre 2007. Quelle: EARSS Jahresbericht 2007 (<http://www.rivm.nl/earss/database/>)

In der Therapie werden daher Glycopeptidantibiotika, wie Vancomycin oder Teicoplanin eingesetzt. Diese binden an terminale Aminosäurereste (D-Alanyl-D-Alanin) der Peptidseitenketten während der Zellwandsynthese. Die Peptidquervernetzung kann nicht realisiert und die Zellwand kann nicht stabilisiert werden. Allerdings wurden mittlerweile auch schon Einzelfälle von Vancomycin-resistenten *Staphylococcus aureus* in Japan und den USA gemeldet (Hiramatsu *et al.*, 1997; CDC, 2002). Es treten zwei Resistenzmechanismen auf: Im Falle von Vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* (VISA) wird durch Verdickung der Peptidoglycanschicht eine verminderte Sensibilität der Zellen gegen Vancomycin erreicht (Hanaki *et al.*, 1998). Diese kann durch Erhöhung der Dosis des Antibiotikums überwunden werden. Dagegen besitzen Vancomycin-resistente *Staphylococcus aureus* (VRSA) das VanA codierende Resistenzgen (Noble *et al.*, 1992) und zeigen eine Dosis-unabhängige Unempfindlichkeit gegen Vancomycinbehandlung.

Als Reserveantibiotika stehen nur noch Oxazolidinonantibiotika wie Linezolid zur Verfügung. Linezolid behindert die bakterielle Proteinbiosynthese an der 50S-Untereinheit des Ribosoms. Jedoch wurden auch hier schon resistente Stämme isoliert (Tsiodras *et al.*, 2001; Kola *et al.* 2007).

## 1.2 Bakteriophagen

Bakteriophagen wurden am Anfang des 19. Jahrhunderts von zwei Wissenschaftlern, unabhängig voneinander entdeckt. Im Jahre 1915 beschrieb Frederick W. Twort die „glasige Transformation“ von *Micrococcus*-Kolonien durch eine unbekannte Substanz (Twort, 1915). 1917 führte Felix d'Herelle die Lyse von Bakterien auf die Gegenwart von Viren zurück, welche er „Bakteriophagen“ nannte (d'Herelle, 1917).

Bei Bakteriophagen handelt es sich um Bakterien infizierende Viren mit einer Größe zwischen 2nm und 200nm. Sie werden anhand ihrer Morphologie und der enthaltenen Nukleinsäure klassifiziert. Das Genom von Phagen hat eine Größe von 5-500kbp (Kilobasenpaare) und kann als einsträngige DNA (ssDNA), RNA (ssRNA), doppelsträngige DNA (dsDNA) oder RNA (dsRNA) vorliegen. Die heutige Klassifizierung der Bakteriophagen basiert auf der morphologischen Einteilung von Bradley (Bradley *et al.*, 1965, Bradley *et al.*, 1967).

Die Morphologie einiger der bis heute bekannten Phagen ist von pleomorphem, filamentösem oder kubischem Charakter. Die meisten Phagen (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 dient zur Anheftung an den Wirt und schließlich zur Injektion der Nukleinsäure (Abb. 1.3).

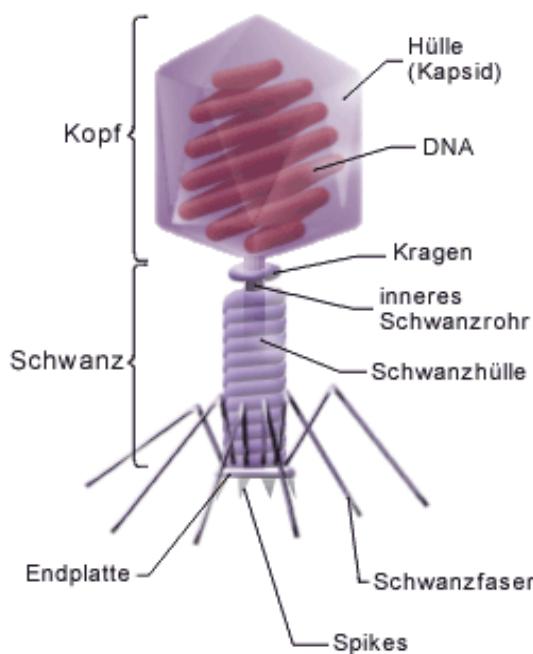
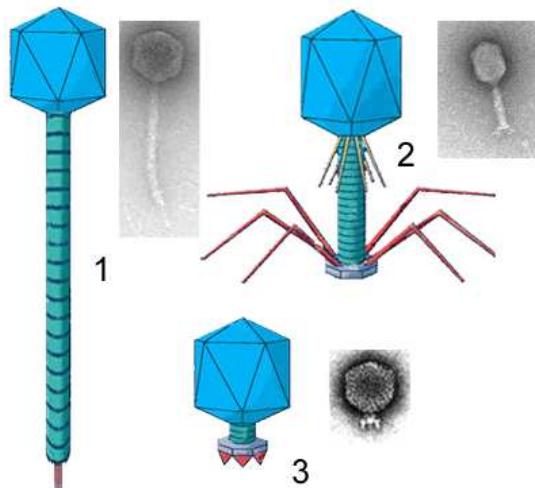


Abb. 1.3 Aufbau eines Bakteriophagen am Beispiel des T4-Phagen. Quelle:<http://www.lukashensel.de/phage.gif>

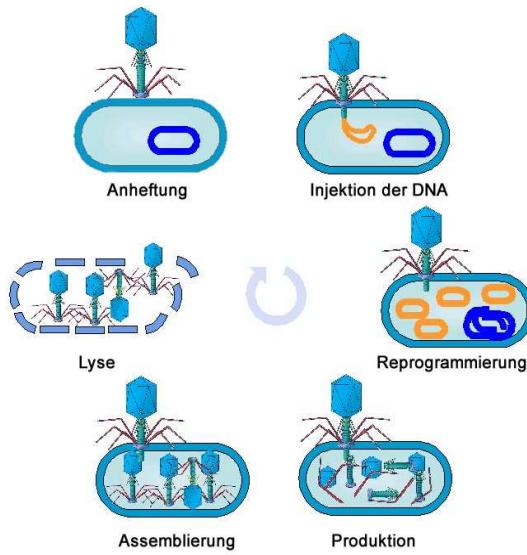
Zu den *Caudovirales* gehören drei Familien: *Myoviridae* besitzen einen kontraktilen Schwanz. Dieser ist bei Phagen der Familie *Siphoviridae* sehr lang, jedoch nicht kontraktile. *Podoviridae* haben einen sehr kurzen, nicht kontraktilen Schwanz (Abb. 1.4).



**Abb. 1.4** Morphologie der *Caudovirales*. (1) *Siphoviridae*, (2) *Myoviridae*, (3) *Podoviridae*.

Da sich Bakteriophagen nicht allein vermehren können, benötigen sie ein Wirtsbakterium. Der erste Schritt ist eine spezifische Bindung des Phagen an eine, an der Oberfläche des Wirts exponierte Phagenrezeptor-Struktur. Anschließend wird das genetische Material in den Wirtsorganismus injiziert. Ab hier kann zwischen lysogenem und dem lytischen Zyklus unterschieden werden. Beim lysogenen Zyklus wird das Erbgut des Phagen in das Genom des Wirts integriert. Bei der Zellteilung des infizierten Bakteriums werden somit auch die Nukleinsäuren des Phagen mit repliziert. Phagen im lysogenen Zyklus werden als Prophagen, oder temperante Phagen bezeichnet. Sie lösen unter normalen Wachstumsbedingungen keine Zelllyse aus. Unter Stressbedingungen des Wirtes kann der Übergang in den lytischen Zyklus induziert werden. Virulente Bakteriophagen nutzen ausschließlich den lytischen Reproduktionszyklus.

Während des lytischen Zyklus (Abb. 1.5) kommt es, nach Injektion des genetischen Materials des Phagen, zur Reprogrammierung der Wirtszelle. Hierbei wird der Stoffwechsel des Wirts für die Phagenproduktion genutzt. Das Phagengenom wird in der Latenzphase repliziert, transkribiert und schließlich kommt es zur Translation der viralen mRNA. In der sich anschließenden Reifephase werden die Phagenbestandteile assembliert. Zur Freisetzung des fertigen Phagen erfolgt abschließend die Lyse des Bakteriums.



**Abb. 1.5** Reproduktionszyklus eines lytischen Phagen.

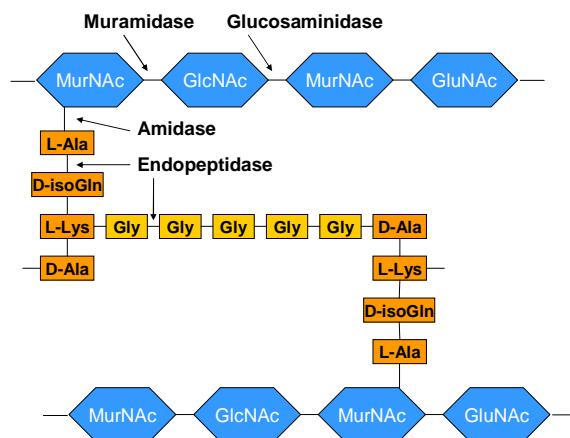
Bakteriophagen kommen in nahezu allen Lebensräumen der Erde vor. Ihre Zahl wurde auf ca.  $10^{30}$ - $10^{32}$  geschätzt (Chibani-Chennoufi *et al.*, 2004; Rohwer & Edwards, 2002).

### 1.3 Endolysine

Während des letzten Schrittes des Reproduktionszyklus kommt es zur Freisetzung neu synthetisierter Phagen aus dem Wirtsbakterium. Vor allem zwei Arten Phagen-codierter Enzyme werden hierbei benötigt: Die Permeabilisierung der Cytoplasma-membran wird durch Holine realisiert (Wang *et al.*, 1991; Kaneko *et al.*, 1998; Loessner *et al.*, 1998; Loessner *et al.*, 1999; Wang *et al.*, 2003). Holine sind hydrophobe Membranproteine, die Läsionen in der Cytoplasmamembran verursachen (Young & Bläsi, 1995). Dies ermöglicht lytischen Phagenenzymen, den Endolysinen den Zugang zur Zellwand (Wang *et al.*, 2000). Endolysine bestehen gewöhnlich aus einer wirtsspezifischen, hochaffinen Zellwandbindedomäne (engl. *cell wall binding domain*-CBD) (Loessner *et al.*, 1998; Loessner *et al.*, 1999; Loessner *et al.*, 2002) am C-Terminus und mindestens einer, N-terminal gelegenen, enzymatisch aktiven Domäne (EAD) (Diaz *et al.*, 1990; Garcia *et al.*, 1990). In einigen Fällen, vor allem bei Endolysinen aus *Staphylococcus*-Phagen, wurden zwei oder sogar drei EADs in einem Protein gefunden (Navarre *et al.*, 1999). Bisher wurden das LysM-Motiv und die SH3-Domäne in Zellbindedomänen identifiziert. Die

CBD bindet spezifisch an ein Substrat im Peptidoglycan der Wirtszelle (Garcia *et al.*, 1988; Lopez *et al.*, 1992; Lopez *et al.*, 1997). Dies führt zur Ausrichtung der EAD zur Angriffsstelle und damit zu einer effizienten Hydrolyse (Fischetti, 2008). Diese Schädigung der Zellwand führt zur Zelllyse und damit zur Freisetzung der Phagen. Dieses System aus Holin und Endolysin wurde sowohl bei Phagen mit gram-positiven, als auch bei Phagen mit gram-negativen Wirten gefunden (Loessner *et al.*, 1995; Young & Bläsi, 1995).

Die Klassifizierung der EADs erfolgt nach ihrem Angriffsort in der Zellwand (Abb. 1.6). Muramidasen und N-Acetyl-Glucosaminidasen schneiden zwischen Muraminsäure und N-Acetyl-Glucosamin, während Amidasen und Endopeptidasen Peptidbindungen hydrolysierten (Young, 1992; Loessner, 2005).



**Abb. 1.6** Angriffs punkte verschiedener EADs in der Zellwand von *Staphylococcus aureus*. (MurNAc) N-Acetyl-Muraminsäure, (GlcNAc) N-Acetyl-Glucosamin, (L-Ala) L-Alanin, (D-Ala) D-Alanin, (D-isoGln) D-iso Glutamin, (L-Lys) L-Lysin.

Bis zum heutigen Zeitpunkt wurde noch kein Fall von Resistenzbildung beobachtet (Borysowski *et al.*, 2006) und die Entwicklung von Bakterien, welche unempfindlich gegen Endolysine sind, wird durch Kombination verschiedener EADs erschwert. So wurden Kolonien am Rande klarer, durch Endolysineinwirkung verursachter, Lysehöfe entnommen, auf Agarplatten ausgebracht und erneut mit dem Enzym behandelt. Auch nach 40 Runden konnten keine resistenten Kolonien festgestellt werden (Fischetti, 2008). Selbst längere Behandlung mit niedrigen Konzentrationen an Lysin in Flüssigkultur führte nicht zur Identifizierung resisternter Bakterien (Loeffler *et al.*, 2001; Schuch *et al.*, 2002).

Zur Verhinderung des Abtötens potentieller Wirtsbakterien nach der Lyse gibt es verschiedene Strategien: Zum einen werden die Endolysine über ihre C-terminalen Bindedomänen mit hoher Affinität an die Zellwand gebunden (Loessner *et al.*, 2002), wodurch die Freisetzung von freiem Enzym limitiert werden könnte (Fischetti, 2008). Zum anderen werden nur geringe Mengen an Endolysin exprimiert und die Stabilität der Endolysine ist eher gering. Für die Nutzung von Endolysinen in industriellen und therapeutischen Anwendungen sind deshalb sowohl die Steigerung der Expressionsrate, bzw. der Rückfaltungsausbeute als auch die Erhöhung der Proteinstabilität wichtige Punkte.

### 1.4 Autolysine

Bakterien müssen bei einigen Prozessen, wie der Zellteilung, Wachstum, Transformation oder der Sekretion von Proteinen, in der Lage sein, die feste Struktur der Peptidglycanschicht aufzubrechen. Die hierfür genutzten Enzyme sind die Autolysine (Smith *et al.*, 2000). Endolysine und Autolysine besitzen ähnliche katalytische Aktivitäten (Hermoso *et al.*, 2007) und viele Daten unterstützen die Hypothese, dass beide Enzyme gleichen Ursprungs sind (López & García, 2004). Wie Endolysine, werden auch die Autolysine entsprechend ihres Angriffsortes klassifiziert. Man unterscheidet Glycosidasen ( $\beta$ -N-Acetyl muramidase (Lysozyme) und  $\beta$ -N-Acetylglucosaminidase), Amidasen und Endopeptidasen (López & García, 2004). Neben der katalytischen Domäne besitzen viele Autolysine Bereiche, die oft *tandem-repeats* enthalten und an der Zellwandbindung beteiligt sind (Smith *et al.*, 2000). Als Beispiele für Autolysine aus Staphylokokken können AtlA (*Staphylococcus aureus*) und LytM (*Staphylococcus aureus*) genannt werden. AtlA besteht aus einer N-terminalen N-Acetyl muramoyl-L-Alanin-Amidase und einer Endo- $\beta$ -N-Acetyl-Glucosaminidase am C-Terminus (Oshida *et al.*, 1995) und wird für die Zellteilung, die Zelllyse und die Freisetzung von Peptidglycan an der Zelloberfläche benötigt (Foster, 1995; De Las Rivas *et al.*, 2002). LytM trägt C-terminal eine Glycyl-Glycin-Endopeptidase-Domäne M23 und hydrolysiert Peptidglycan von *Staphylococcus aureus* in der Pentaglycinbrücke (Dubrac *et al.*, 2007).

## 1.5 Antimikrobielle Strategien

Antibiotika sind zurzeit das Mittel der Wahl zur Bekämpfung bakterieller Infektionen. Das Auftreten antibiotikaresistenter Keime erfordert eine ständige Suche nach neuen und Weiterentwicklung bekannter Antibiotika. Alternativ bzw. ergänzend zur Antibiotikatherapie werden verschiedene Strategien verfolgt:

### 1.5.1 Bacteriocine

Toxine, welche von Bakterien zur Inhibition des Wachstums ähnlicher Bakteriengattungen abgegeben werden, nennt man Bacteriocine. Das erste Bacteriocin wurde 1925 von A. Gratia entdeckt (Gratia, 1925). Er nannte es, aufgrund der Fähigkeit *Escherichia coli* abzutöten, Colicin. Die Wirkmechanismen sind sehr unterschiedlich und reichen von Permeabilisierung der Cytoplasmamembran über Nucleaseaktivität der Bacteriocine bis hin zur Hemmung der Peptidoglykansynthese (Riley & Wertz, 2002). Ein für *Staphylococcus* relevantes Bacteriocin ist Nisin, welches Poren in der Cytoplasmamembran bildet und als Konservierungsmittel unter der Nummer E234 eingesetzt wird. Lysostaphin ist ein, von *Staphylococcus simulans* gebildetes Bacteriocin. Lysostaphin besitzt eine N-terminale Glycyl-Glycin-Endopeptidase M23 und am C-Terminus eine Zellwandbindedomäne. Das Enzym hydrolysiert die Pentaglycinbrücke im Peptidoglycan von *Staphylococcus aureus*, auch wenn die Zellen nicht im Wachstum sind (Wu *et al.*, 2003; Kumar, 2008). Ein Homologes Protein zu Lysostaphin, das ALE-1 wurde in *Staphylococcus capitis* EPK1 gefunden (Sugai *et al.*, 1997). Die Zellwandbindedomäne gehört zur SH3b Familie (Lu *et al.*, 2006). Beide Proteine zeigen lytische Aktivität spezifisch gegen *Staphylococcus aureus*, was den jeweiligen Ursprungsorganismen einen Vorteil im Kampf um Ressourcen wie Nährstoffe und Lebensraum einbringt.

### 1.5.2 Immunotherapie

Eine weitere Strategie zur Bekämpfung bakterieller Infektionen ist die Verwendung von Antikörpern. Die Wirkung stellt sich im Beispiel von Tefibazumab, einem monoklonalen Antikörper (Immunoglobulin G) mit hoher Affinität zum clumping factor A, wie folgt dar: Clumping factor A gehört zu den Oberflächenkomponenten, welche mit der Anlagerung von *Staphylococcus aureus* an Proteine der extrazellulären

Matrix assoziiert sind. Durch die Bindung des Antikörpers wird der clumping factor A blockiert und *Staphylococcus aureus* kann sich nicht mehr festsetzen, was zu einer schnelleren, durch Vancomycin verursachten, Abnahme der Zellen im Blut führt (Vernachio *et al.*, 2003). Als weiterer Effekt wird die Verbesserung der Phagozytose von *Staphylococcus aureus* durch polymorphonukleare Leukozyten vermutet (Nilsson *et al.*, 1998).

### 1.5.3 Phagentherapie

Bereits Felix d'Herelle entwickelte nach der Entdeckung der Bakteriophagen die Idee ihrer Nutzung zur Bekämpfung bakterieller Infektionen (d'Herelle, 1926). Die Phagentherapie verlor jedoch, durch die Entdeckung der Antibiotika, Anfang der 1940er Jahre in Westeuropa und den USA an Bedeutung (Kropinski, 2006; Hanlon, 2007). Nur in osteuropäischen Ländern, vor allem in Georgien und Russland, wurden Forschungen zur Phagentherapie weitergetrieben. Erst das zunehmende Auftreten von Antibiotikaresistenzen führt zum erneuten Anstieg des Interesses an der Phagentherapie. Diese hat einige Vorteile: Eine geringe Dosis virulenter Phagen reicht im Allgemeinen zur Therapie aus, da sich Bakteriophagen so lang vermehren, bis keine Zielzellen mehr vorhanden sind. Ohne Wirtszellen können sich die Bakteriophagen nicht mehr vermehren und werden aus dem Körper eliminiert (Brnáková *et al.* 2005). Der Wirkmechanismus unterscheidet sich grundlegend von dem der Antibiotika. Deshalb wird die Phagentherapie häufig als *last line defence* gegen Infektionen mit antibiotikaresistenten Erregern verwendet (Hanlon, 2007). Ein weiterer Vorteil von Bakteriophagen ist ihre hohe Wirtsspezifität. So bleibt die Begleitflora des Zielorganismus erhalten (Matsuzaki *et al.*, 2005). Die hohe Spezifität kann sich jedoch auch nachteilig auswirken, nämlich dann, wenn der Zielorganismus nicht genau bekannt ist oder es sich um eine multiple Infektion handelt. Ein weiteres Problem der Verwendung von Phagen, ist die Möglichkeit des Transfers von Resistenzen oder Toxinen zwischen den Genomen bakterieller Wirte (Loessner, 2000). Die schnelle Eliminierung durch körpereigene Systeme ist ein weiterer limitierender Faktor für die Phagentherapie (Geier *et al.*, 1973).

Eine weitere antimikrobielle Strategie stellt der Einsatz replikations- oder lysedefizienter Bakteriophagen dar. Diese Phagen sind in der Lage, an das pathogene Zielbakterium zu binden und ihr genetisches Material zu injizieren. Das Phagengenom ist dabei so modifiziert, dass es zum Zelltod, jedoch nicht zur finalen

Zelllyse kommt (Gill *et al.*, 2007). Diese Methode ist bei hoher bakterieller Zellzahl von Vorteil, da es hier, im Vergleich zur Verwendung lytischer Phagen, zu einer verminderten Endotoxinfreisetzung kommt (Hagens *et al.*, 2004).

### 1.6 Ansatz

In dieser Arbeit soll eine andere Strategie zur Bekämpfung von Staphylokokkeninfektionen bzw. zur Dekolonisierung verfolgt werden. Hierbei sollen Endolysine Verwendung finden. Sie sind in der Lage die Zellwand gram-positiver Bakterien von außen zu lysieren (Donovan *et al.*, 2006; Sass & Bierbaum, 2007). Da, wie in 1.3 beschrieben, das Auftreten Endolysin-resistenter Bakterien, im Gegensatz zur Behandlung mit Antibiotika, sehr unwahrscheinlich ist, können Endolysine, nach entsprechender Optimierung der Aktivität und Stabilität, als neue antimikrobielle Therapeutika Verwendung finden. Der Einsatz von Endolysinen zur Kontrolle von *Staphylococcus aureus* - Zellen und Biofilmen, wurde an einigen Beispielen sowohl *in vitro* als auch *in vivo* beschrieben (O'Flaherty *et al.*, 2005; Rashel *et al.*, 2007; Sass & Bierbaum, 2007). Ein weiterer Vorteil gegenüber der Behandlung mit Antibiotika liegt in der Spezifität der Endolysine. Während die meisten Antibiotika ein breites Wirkspektrum aufweisen und somit viele verschiedene Bakterien abtöten, wird die normale menschliche Bakterienflora durch den Einsatz spezifischer Endolysine kaum bis gar nicht beeinträchtigt (Fischetti, 2008; Rashel *et al.*, 2007). Die Verbesserung isolierter Endolysine kann unter anderem durch *Modul-shuffling* betrieben werden, da der modulare Aufbau der Endolysine aus katalytischer EAD und spezifischer CBD die Kombination verschiedener Domänen zu neuen Proteinen mit verbesserten Eigenschaften erlaubt (Garcia *et al.*, 1990; Lopez *et al.*, 1992). So könnte beispielsweise eine hoch aktive EAD, durch Austausch der CBD an ein neues Zielbakterium adaptiert werden, vorausgesetzt, die Struktur des Peptidoglycans lässt eine Hydrolyse durch die EAD zu.

### **1.7 Zielsetzung:**

Als Ziel soll die Herstellung eines neuen, gereinigten funktionellen Bakteriophagenproteins zur topischen Anwendung gegen Infektionen mit *Staphylococcus aureus* im Mittelpunkt dieser Arbeit stehen.

Nach der Isolation lytischer Bakteriophagen gegen *Staphylococcus aureus* aus Umweltproben, sollen das Wirtsspektrum der Phagen untersucht werden. Aus dem Genom von Phagen mit einem geeigneten Wirtsspektrum sollen durch Homologiesuche potentielle Endolysinsequenzen identifiziert werden. Nach rekombinanter Expression in *Escherichia coli* soll die Untersuchung der Lyseaktivität, der Löslichkeit, der Stabilität und der Spezifität erfolgen. Hierfür müssen geeignete Reinigungsprozeduren und Testverfahren gefunden, adaptiert oder entwickelt werden. Zur Optimierung und Stabilisierung des Proteins soll das sog. *Modul-shuffling*, also der intermolekulare Austausch einzelner Domänen verschiedener Kandidatenproteine, und rationales Proteindesign genutzt werden. Besonderes Augenmerk wird dabei auf den späteren Einsatz zur Dekolonisierung, bzw. als systemisch oder topisch einsetzbares Therapeutikum gelegt.

## 2 Material

### 2.1 Bakterienstämme

#### 2.1.1 *Escherichia coli* Stämme

##### HMS174 (DE3)

F- *recA1 hsdR* ( $r_{K12}^- m_{K12}^+$ ) *Rif<sup>r</sup> λ (DE3)*

Rifampicin-Resistenz

##### BL21 (DE3)

F- *ompT hsdS<sub>B</sub>*( $r_B^- m_B^-$ ) *gal dcm (DE3)*

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

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

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, die Resistenz gegen Chloramphenicol vermittelt.

##### Nova Blue singles

*endA1 hsdR17* ( $r_{K12}^- m_{K12}^+$ ) *supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1*

*lacF'*[*proA<sup>r</sup>B<sup>r</sup>lacI<sup>q</sup>ZΔM15::Tn10*] (*Tet<sup>r</sup>*)

Tetracyclin-Resistenz

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

##### Origami B (DE3) (Novagen)

F- *ompT hsdS<sub>B</sub>*( $r_B^- m_B^-$ ) *gal dcm lacY1 aphC (DE3) gor522::Tn10 trxR (Kan<sup>r</sup> Tet<sup>r</sup>)*

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.

**JM109 (New England Biolabs)**

*F' traD36 proA<sup>+</sup>B<sup>+</sup> lacI<sup>q</sup> Δ(lacZ)M15/ Δ(lac-proAB) glnV44 e14<sup>r</sup> gyrA96 recA1 relA1 endA1 thi hsdR17*

JM109 wird zur Expression von Genen in pQE-Vektoren genutzt.

### 2.1.2 Teststämme

Zur Phagenpropagation (3.1.1), in Lyse- (3.5.2) und Bindetests (3.5.1) wurden die in Tab. 2.1 aufgeführten Bakterienstämme verwendet.

**Tab. 2.1** In Lyse- und Bindetests verwendete Stämme mit Nummer der Profos Culture Collection (ProCC).

| Spezies                             | Stamm        | ProCC | Quelle                               |
|-------------------------------------|--------------|-------|--------------------------------------|
| <i>Escherichia coli</i>             | DSMZ 46295   | S5    | DSMZ                                 |
| <i>Enterococcus faecalis</i>        |              | S17   | Universität Regensburg (Stetter)     |
| <i>Staphylococcus haemolyticus</i>  |              | S27   | Eigenisolat Profos AG                |
| <i>Bacillus subtilis</i>            | DSMZ 10      | S310  | DSMZ                                 |
| <i>Bacillus mycoides</i>            |              | S328  | Biometric                            |
| <i>Bacillus cereus</i>              |              | S332  | Biometric                            |
| <i>Staphylococcus warneri</i>       |              | S430  | Infineon Dresden                     |
| <i>Staphylococcus aureus</i>        |              | S456  | Universitätsklinikum Regensburg      |
| <i>Staphylococcus aureus</i>        |              | S457  | Universitätsklinikum Regensburg      |
| <i>Staphylococcus aureus</i>        |              | S458  | Universitätsklinikum Regensburg      |
| <i>Staphylococcus aureus</i>        |              | S459  | Universitätsklinikum Regensburg      |
| <i>Staphylococcus aureus</i>        |              | S460  | Universitätsklinikum Regensburg      |
| <i>Staphylococcus aureus</i>        |              | S461  | Universitätsklinikum Regensburg      |
| <i>Staphylococcus aureus</i>        |              | S462  | Universitätsklinikum Regensburg      |
| <i>Staphylococcus aureus</i>        |              | S463  | Universitätsklinikum Regensburg      |
| <i>Staphylococcus aureus</i>        | MRSA         | S464  | Universitätsklinikum Regensburg      |
| <i>Staphylococcus aureus</i>        | MRSA         | S465  | Universitätsklinikum Regensburg      |
| <i>Staphylococcus aureus</i>        | MRSA         | S466  | Universitätsklinikum Regensburg      |
| <i>Staphylococcus aureus</i>        | MRSA         | S467  | Universitätsklinikum Regensburg      |
| <i>Staphylococcus aureus</i>        | MRSA         | S468  | Universitätsklinikum Regensburg      |
| <i>Staphylococcus aureus</i>        | MRSA         | S469  | Universitätsklinikum Regensburg      |
| <i>Staphylococcus aureus</i>        | MRSA         | S470  | Universitätsklinikum Regensburg      |
| <i>Bacillus thuringiensis</i>       | CC5          | S471  | Biometric                            |
| <i>Salmonella Kottbus SZ 423</i>    | RKI SZ 423   | S479  | Robert-Koch-Institut Wernigerode     |
| <i>Enterococcus faecium</i>         |              | S880  | Eigenisolat (Hühnerkot) Profos AG    |
| <i>Staphylococcus epidermidis</i>   | NCTC 100 655 | S1191 | ETH Zürich (Lössner)                 |
| <i>Staphylococcus equorum</i>       |              | S1192 | ETH Zürich (Lössner)                 |
| <i>Staphylococcus equorum</i>       |              | S1423 | Eigenisolat (Kochschinken) Profos AG |
| <i>Macrococcus caseolyticus</i>     |              | S1425 | Eigenisolat (Garnelen) Profos AG     |
| <i>Staphylococcus equorum</i>       |              | S1426 | Eigenisolat (Schinken roh) Profos AG |
| <i>Staphylococcus sciuri</i>        |              | S1427 | Eigenisolat (Schinken roh) Profos AG |
| <i>Staphylococcus saprophyticus</i> |              | S1429 | Eigenisolat (Hackfleisch) Profos AG  |

| Spezies  | Stamm                            | ProCC | Quelle                              |
|--|----------------------------------|-------|-------------------------------------|
| <i>Staphylococcus sciuri</i>                           |                                  | S1430 | Eigenisolat (Hackfleisch) Profos AG |
| <i>Staphylococcus aureus</i>                           | MRSA                             | S1501 | Universitätsklinikum Regensburg     |
| <i>Staphylococcus aureus</i>                           | MRSA                             | S1502 | Universitätsklinikum Regensburg     |
| <i>Staphylococcus epidermidis</i>                      |                                  | S1503 | Universitätsklinikum Regensburg     |
| <i>Staphylococcus epidermidis</i>                      |                                  | S1508 | Universitätsklinikum Regensburg     |
| <i>Staphylococcus haemolyticus</i>                     |                                  | S1509 | Universitätsklinikum Regensburg     |
| <i>Staphylococcus epidermidis</i>                      |                                  | S1510 | Universitätsklinikum Regensburg     |
| <i>Staphylococcus haemolyticus</i>                     |                                  | S1511 | Universitätsklinikum Regensburg     |
| <i>Staphylococcus simulans</i>                         |                                  | S1512 | Universitätsklinikum Regensburg     |
| <i>Staphylococcus aureus</i>                           |                                  | S1513 | Universitätsklinikum Regensburg     |
| <i>Staphylococcus aureus</i>                           |                                  | S1514 | Universitätsklinikum Regensburg     |
| <i>Staphylococcus aureus</i>                           |                                  | S1515 | Universitätsklinikum Regensburg     |
| <i>Staphylococcus aureus</i>                           |                                  | S1516 | Universitätsklinikum Regensburg     |
| <i>Staphylococcus aureus</i>                           |                                  | S1517 | Universitätsklinikum Regensburg     |
| <i>Staphylococcus aureus</i>                           |                                  | S1518 | Universitätsklinikum Regensburg     |
| <i>Staphylococcus aureus</i>                           |                                  | S1519 | Universitätsklinikum Regensburg     |
| <i>Staphylococcus aureus</i>                           |                                  | S1520 | Universitätsklinikum Regensburg     |
| <i>Staphylococcus epidermidis</i>                      | DSMZ 20044                       | S1546 | DSMZ                                |
| <i>Staphylococcus epidermidis</i>                      | DSMZ 1798<br>ATCC 12228          | S1547 | DSMZ                                |
| <i>Staphylococcus haemolyticus</i>                     | DSMZ 20228                       | S1548 | DSMZ                                |
| <i>Staphylococcus haemolyticus</i>                     | DSMZ 20263                       | S1549 | DSMZ                                |
| <i>Staphylococcus aureus</i>                           | DSMZ 20231                       | S1550 | DSMZ                                |
| <i>Staphylococcus aureus</i>                           | DSMZ 346                         | S1551 | DSMZ                                |
| <i>Enterococcus faecalis</i>                           | DSMZ 2570                        | S1552 | DSMZ                                |
| <i>Staphylococcus epidermidis</i>                      |                                  | S1573 | Eigenisolat (Auge) Profos AG        |
| <i>Staphylococcus xylosus</i>                          | DSMZ 20266                       | S1592 | DSMZ                                |
| <i>Staphylococcus xylosus</i>                          | DSMZ 6179                        | S1602 | DSMZ                                |
| <i>Staphylococcus aureus</i>                           | DSMZ 12463                       | S1612 | DSMZ                                |
| <i>Staphylococcus epidermidis</i>                      |                                  | S1695 | Robert-Koch-Institut Wernigerode    |
| <i>Staphylococcus carnosus</i><br>ssp. <i>utilis</i>   | DSMZ 11676                       | S1796 | DSMZ                                |
| <i>Staphylococcus carnosus</i><br>ssp. <i>carnosus</i> | DSMZ 20501                       | S1797 | DSMZ                                |
| <i>Staphylococcus aureus</i>                           | USA 300 MLST type8               | S2297 | Universitätsklinikum Regensburg     |
| <i>Staphylococcus aureus</i>                           | Oberpf. Epidemiestamm<br>Nr.3039 | S2298 | Universitätsklinikum Regensburg     |

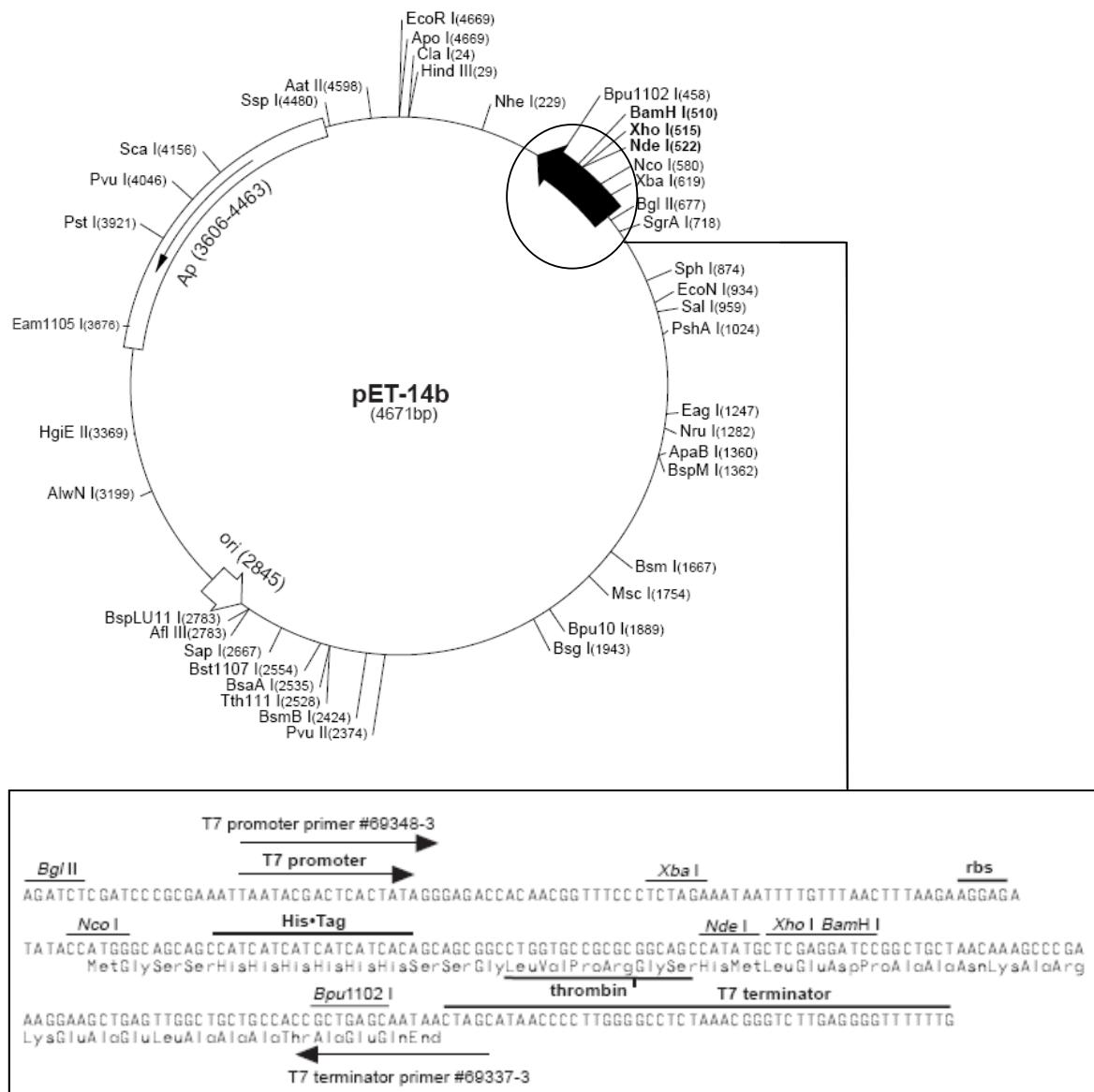
## 2.2 Enzyme

| Enzym  | Hersteller   |
|--|--|
| Restriktionsendonukleasen                          | New England Biolabs GmbH (Frankfurt / Main, <a href="http://www.neb-online.de">www.neb-online.de</a> ) |
| T4-DNA-Ligase                                      | New England Biolabs GmbH (Frankfurt / Main, <a href="http://www.neb-online.de">www.neb-online.de</a> ) |
| Phusion-Polymerase                                 | New England Biolabs GmbH (Frankfurt / Main, <a href="http://www.neb-online.de">www.neb-online.de</a> ) |
| Ex-Taq-Polymerase                                  | Lonza Group Ltd (Basel, Schweiz, <a href="http://www.lonza.com">www.lonza.com</a> )                    |
| Phire-Polymerase                                   | Biozym Diagnostik GmbH (Hessisch Oldendorf, <a href="http://www.biozym.com">www.biozym.com</a> )       |
| Calf Intestine Phosphatase CIP                     | New England Biolabs GmbH (Frankfurt / Main, <a href="http://www.neb-online.de">www.neb-online.de</a> ) |
| DNase 1  | Biozym Diagnostik GmbH (Hessisch Oldendorf, <a href="http://www.biozym.com">www.biozym.com</a> )       |
| Proteinase K                                       | Applichem GmbH (Darmstadt, <a href="http://www.applichem.de">www.applichem.de</a> )                    |
| Horse reddish peroxidase                           | IBA GmbH (Göttingen, <a href="http://www.iba-go.de">www.iba-go.de</a> )                                |
| Peroxidase conjugated Affinipure AB anti mouse IgG | Jackson Immuno Research (Suffolk, England, <a href="http://www.jireurope.com">www.jireurope.com</a> )  |
| Alkalische Phosphatase Rabbit                      | Sigma-Aldrich Chemie GmbH (München, <a href="http://www.sigmaaldrich.de">www.sigmaaldrich.de</a> )     |
| Anti Goat IgGH+L Konjugat                          | Sigma-Aldrich Chemie GmbH (München, <a href="http://www.sigmaaldrich.de">www.sigmaaldrich.de</a> )     |
| Thrombin (human or bovine)                         | Sigma-Aldrich Chemie GmbH (München, <a href="http://www.sigmaaldrich.de">www.sigmaaldrich.de</a> )     |
| Plasmin (human)                                    | Sigma-Aldrich Chemie GmbH (München, <a href="http://www.sigmaaldrich.de">www.sigmaaldrich.de</a> )     |
| Glu C Endopeptidase (V8)                           | Roche Diagnostics GmbH (Mannheim, <a href="http://www.roche.de">www.roche.de</a> )                     |

## 2.3 Plasmide

### pET-14b

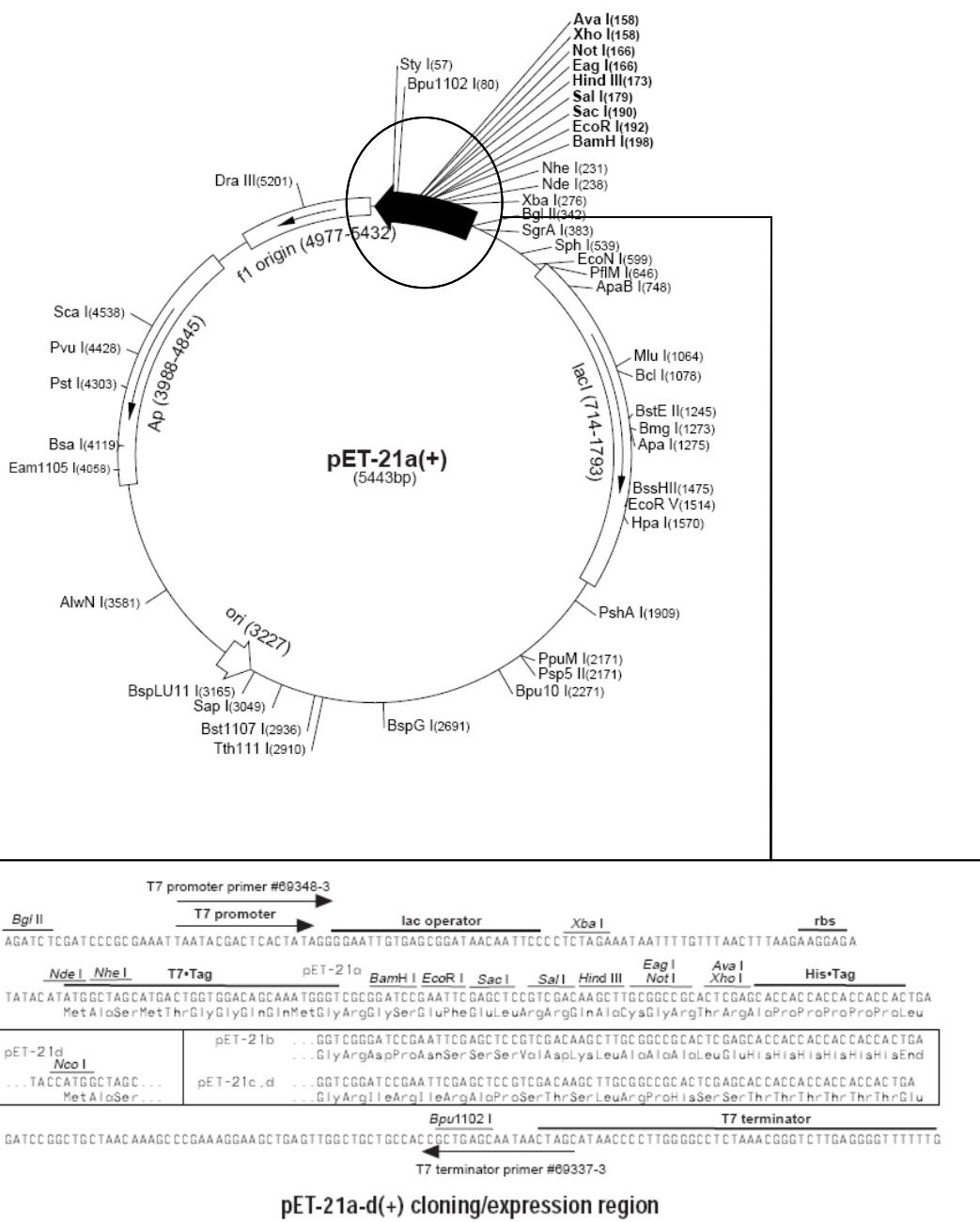
(Novagen, Darmstadt)



**Abb. 2.1** Vektor-Karte von pET-14b. Das Plasmid besitzt als Resistenzmarker eine Ampicillin-Resistenz. Für das Einfügen von Inserts stehen Schnittstellen in der *multiple cloning site* (MCS) zur Verfügung. Diese ist vergrößert dargestellt. Die Expression des Vektors wird über einen mit IPTG induzierbaren T7-Promotor geregelt. (Quelle: <http://www.merckbiosciences.com/docs/docs/PROT/TB044.pdf>).

pET-21a(+)

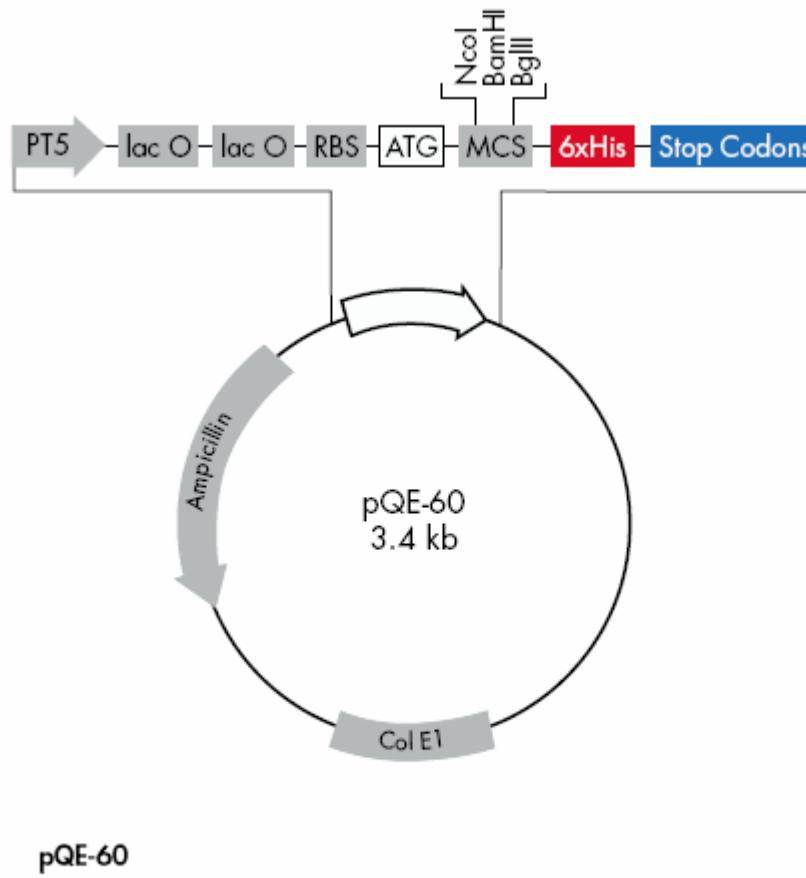
(Novagen, Darmstadt)



**Abb. 2.2** Vektorkarte von pET-21. Das Plasmid besitzt als Resistenzmarker eine Ampicillin-Resistenz. Für das Einfügen von Inserts stehen Schnittstellen in der *multiple cloning site* (MCS) zur Verfügung. Diese ist vergrößert dargestellt. Die Expression des Vektors wird über einen mit IPTG induzierbaren T7-Promotor geregelt. (Quelle: <http://www.merckbiosciences.com/docs/docs/PROT/TB036.pdf>).

pQE-60

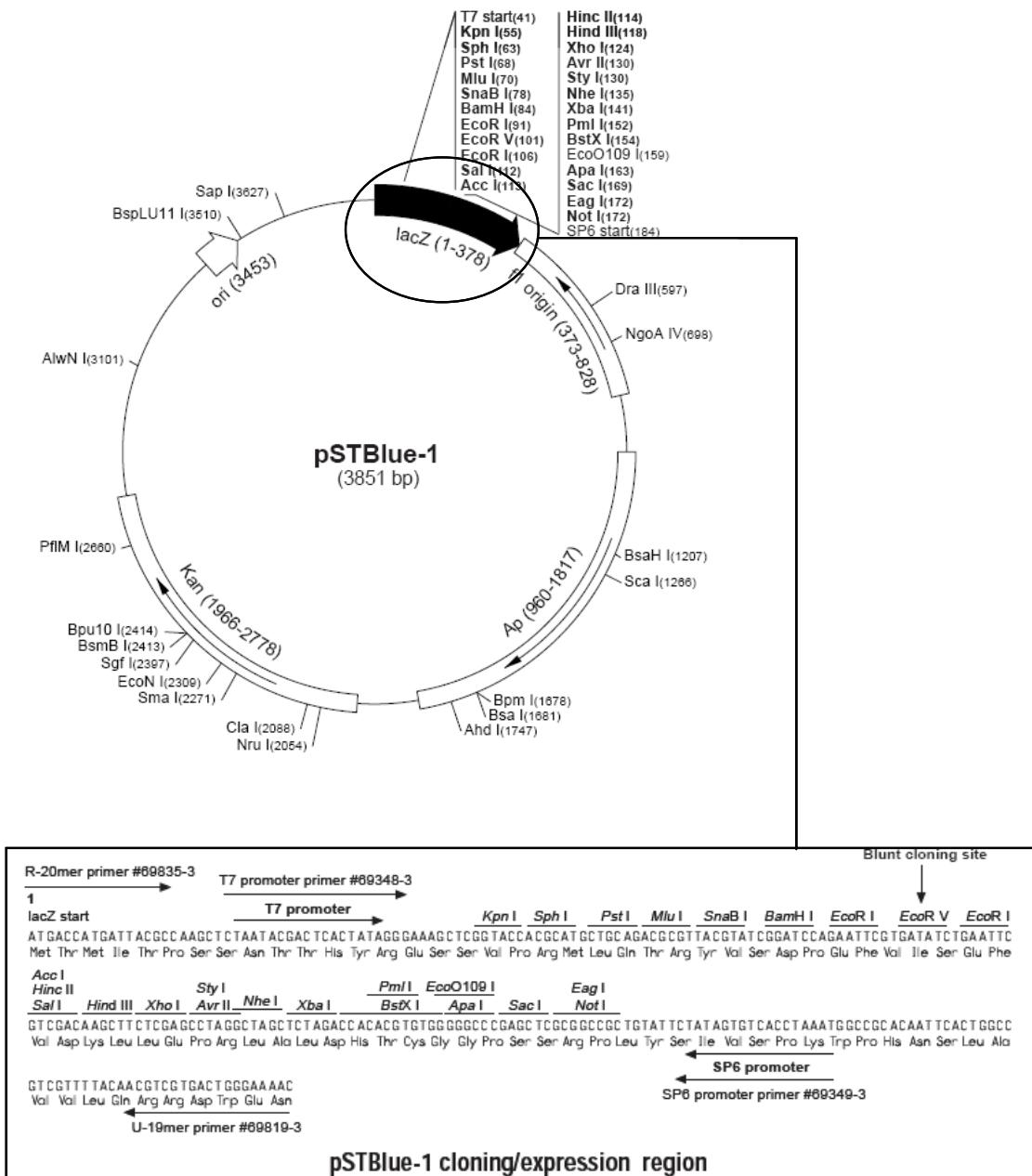
(Qiagen, Hilden)



**Abb. 2.3** Vektorkarte von pQE-60. Das Plasmid besitzt als Resistenzmarker eine Ampicillin-Resistenz. Für das Einfügen von Inserts stehen Schnittstellen in der *multiple cloning site* (MCS) zur Verfügung. Diese ist vergrößert dargestellt. Die Expression des Vektors wird über einen mit IPTG induzierbaren T5-Promotor geregelt. (Quelle: <http://www1.qiagen.com/literature/pqesequences/pqe60.pdf>).

pSTBlue-1

(Novagen, Darmstadt)



**Abb. 2.4** Vektor-Karte von pSTBlue-1. Das Plasmid besitzt als Resistenzmarker eine Ampicillin- und eine Kanamycin-Resistenz. Für das Einfügen von Inserts stehen Schnittstellen in der *multiple cloning site* (MCS) zur Verfügung. Diese ist vergrößert dargestellt und liegt innerhalb des lacZ Gens, wodurch per Blau-Weiß-Screening das Vorhandensein eines Inserts visualisiert werden kann. Die Expression des Vektors wird über einen mit IPTG induzierbaren T7-Promotor geregelt. (Quelle: <http://www.merckbiosciences.co.uk/docs/docs/PROT/TB214.pdf>).

## 2.4 Oligonukleotide

Folgende Oligonukleotide (Konzentration von 10 pmol/µl) wurden von der Firma MWG Biotech (Ebersberg) bezogen und als Primer verwendet:

| Primer           | Sequenz   | Verwendung   |
|------------------|---|--|
| Pitti20Ami/f     | 5'-gct agt tct aga <u>ggt acc</u> atg gta aaa att act aaa<br>aat tta agt tac-3' <i>KpnI</i> | Klonierungsprimer Pitti20Ami in pET21a mit N-term Strep-Tag, forward |
| Pitti20Ami/r     | 5'-gcc ata <u>ctc gag</u> cta cta ttt taa aat acc cca ata ttc<br>ttt-3' <i>Xhol</i>         | Klonierungsprimer Pitti20Ami in pET21a mit N-term Strep-Tag, reverse |
| P24Ami/f2        | 5'- gct agt tct aga <u>ggt acc</u> atg aaa tca caa caa caa<br>gca aag -3' <i>KpnI</i>       | Klonierungsprimer Pitti24Ami in pET21a mit N-term Strep-Tag, forward |
| P24Ami/r         | 5'- gaa ata <u>ctc gag</u> tta tta tga gaa cac ccc ccc -3'<br><i>Xhol</i>                   | Klonierungsprimer Pitti24Ami in pET21a mit N-term Strep-Tag, reverse |
| P26Ami/f         | 5'-gcc ata <u>gtc gac</u> cta act gat ttc tcc cca-3'<br><i>Sall</i>                         | Klonierungsprimer Pitti26Ami in pET21a, forward                      |
| P26Ami/r         | 5'-gat atc <u>gga tcc</u> ggt att cct atg acg cct-3'<br><i>BamHI</i>                        | Klonierungsprimer Pitti26Ami in pET21a, reverse                      |
| P26Ami-t-/f2     | 5'-tcc gag <u>cca tgg</u> atg agt atc atc atg gag-3'<br><i>Ncol</i>                         | Klonierungsprimer Pitti26Ami in pET14b, forward                      |
| P26Ami-t-/r      | 5'-gcc ata <u>gga tcc</u> cta act gat ttc tcc cca-3'<br><i>BamHI</i>                        | Klonierungsprimer Pitti26Ami in pET14b, reverse                      |
| SLTlys/F         | 5'-gct agt tct aga <u>ggt acc</u> atg ttg ata aca aaa aac<br>caa g-3' <i>KpnI</i>           | Klonierungsprimer Plyusa in pET21a mit N-term Strep-Tag, forward     |
| SLTlys/R         | 5'-gcc cgg <u>ctc gag</u> tta tta tca aac tgc act aaa ct-3'<br><i>Xhol</i>                  | Klonierungsprimer Plyusa in pET21a mit N-term Strep-Tag, reverse     |
| Chap26_Ncol_if_f | 5'-tat tta <u>ccc atg gca</u> agt atc atc atg gag gtg gc-3'<br><i>Ncol</i>                  | Klonierungsprimer CHAP aus Pitti26, forward                          |
| P26CHAP-fus/r2   | 5'-gcc ata <u>gag ctc</u> ttc ctt ttt aga tgc ttg cg-3'<br><i>SacI</i>                      | Fusionsprimer CHAP aus Pitti26Ami, reverse                           |
| USA07-CHAP-F     | 5'-cat <u>cca tgg</u> cga gta cat taa att att tg-3'<br><i>Ncol</i>                          | Klonierungsprimer CHAPusa7 forward                                   |
| LytN-R           | 5'-cgc <u>gga tcc</u> tta tgc ttt ttt aaa tgg-3'<br><i>BamHI</i>                            | Klonierungsprimer CHAPusa7 reverse                                   |
| USA09-CHAP-F     | 5'-cat <u>cca tgg</u> cgt ctg caa caa cga ca-3'<br><i>Ncol</i>                              | Klonierungsprimer CHAPusa9 forward                                   |
| SAUSA-0438-R     | 5'-cgc <u>gga tcc</u> tta gtg aat ata tct-3'<br><i>BamHI</i>                                | Klonierungsprimer CHAPusa9 reverse                                   |

## 2 Material

| Primer             | Sequenz   | Verwendung                                       |
|--------------------|---|--|
| lyso-r             | 5'-cta ctc <u>gtc gac</u> <u>gga tcc</u> tta ctt aat ggt acc-3'<br><i>Sall</i> <i>BamHI</i>             | Klonierungsprimer CBDLS, reverse                 |
| CBDp20ami/f        | 5'-tta ata <u>gga tcc</u> <u>gag ctc</u> atg aaa cgt aaa aaa cct aaa ggt tg-3' <i>BamHI</i> <i>Sacl</i> | Klonierungsprimer CBD aus Pitti20Ami, forward    |
| CBDp20ami/r        | 5'-gcc cgg <u>gtc gac</u> cta ttt taa aat acc cca ata ttc-3'<br><i>Sall</i>                             | Klonierungsprimer CBD aus Pitti20Ami, reverse    |
| CBDplyObpf-t/r     | 5'-gcc cgg <u>gga tcc</u> tta tta tca aac tgc act aaa ctt acc aaa act-3' <i>BamHI</i>                   | Klonierungsprimer CBDusa, reverse                |
| P26Lyt-fus/r2      | 5'-gcc ata <u>gag ctc</u> tgc aac tgg ttt aac tgt att-3'<br><i>Sacl</i>                                 | Fusionsprimer Amidase aus Pitti26Ami, reverse    |
| CBDplyObpf-fus/f   | 5'-tta ata <u>gag ctc</u> atg cca cca gtg cca gca ggt tat-3'<br><i>Sacl</i>                             | Fusionsprimer CBDusa, forward für Modulshuffling |
| lyso-f             | 5'-cta ctc <u>cca tgg</u> <u>gag ctc</u> atg tct aat agc acc-3'<br><i>Ncol</i> <i>Sacl</i>              | Fusionsprimer CBDLS, forward                     |
| CHAP07-CBDLS-F     | 5'-aga cca ttt aaa aaa gca atg tct aat agc acc-3'   | Fusionsprimer für CHAPusa7-CBDLS, forward        |
| CHAP07-CBDLS-R     | 5'-gg tgc att aga cat tgc ttt ttt aaa tgg tct-3'  | Fusionsprimer für CHAPusa7-CBDLS, reverse        |
| CHAP09-CBDLS-F     | 5'-aat tat aga tat att cac atg tct aat agc acc-3'   | Fusionsprimer für CHAPusa9-CBDLS, forward        |
| CHAP09-CBDLS-R     | 5'-gg tgc att aga cat gtg aat ata tct ata att-3'  | Fusionsprimer für CHAPusa9-CBDLS, reverse        |
| Chap26_L55H_L56T_f | 5'-gg tgg aaa gtt ttg ttt gga cat aca ctg aaa ggt tta ggt gca-3'  | Mutagenesepimer für L55H-L56T, forward           |
| Chap26_L55H_L56T_r | 5'-tgc acc taa acc ttt cag tgt atg tcc aaa caa aac ttt cca acc-3'                                       | Mutagenesepimer für L55H-L56T, reverse           |
| M3-E163A-R167A/f   | 5'-aaa agc gct aca gct cca gct tca ata-3'   | Mutagenesepimer für E163A-R167A, forward         |
| M3-E163A-R167A/r   | 5'-tat tga agc tgg agc tgt agc gct ttt-3'   | Mutagenesepimer für E163A-R167A, reverse         |
| M3-E163Q-R167A/f   | 5'-aaa agc caa aca gct cca gct tca ata-3'   | Mutagenesepimer für E163Q-R167A, forward         |
| M3-E163Q-R167A/r   | 5'-tat tga agc tgg agc tgt ttg gct ttt-3'   | Mutagenesepimer für E163Q-R167A, reverse         |
| M3-E179A/f         | 5'-atc taa aaa ggc tac agc taa gc-3'  | Mutagenesepimer für E179A, forward               |
| M3-E179A/r         | 5'-gc tta gct gta gcc ttt tta gat-3'  | Mutagenesepimer für E179A, reverse               |
| M3-E189Q/f         | 5'-taa agc ggt aca act taa aat ta-3'  | Mutagenesepimer für E189Q, forward               |

## 2 Material

---

| Primer       | Sequenz   | Verwendung                          |
|--------------|---|-------------------------------------|
| M3-E189Q/r   | 5'-ta att tta agt tgt acc gct tta-3'                    | Mutageneseprimer für E189Q, reverse |
| M13 Y200 H-f | 5'-aag atg tgg tta aag gtc atg acc ttc cta aac gtg g-3' | Mutageneseprimer für Y200H, forward |
| M13 Y200 H-r | 5'-cca cgt tta gga agg tca tga cct tta acc aca tct t-3' | Mutageneseprimer für Y200H, reverse |

## 2.5 DNA- und Protein-Größenstandards

### 2.5.1 DNA-Größenstandard

#### Gene Ruler 1kb-DNA-Ladder

Fermentas (St. Leon-Rot)

Die *Gene Ruler 1kb-DNA-Ladder* dient der Abschätzung der Größe von DNA-Fragmenten zwischen 250 und 10000 Basenpaaren (bp) auf einem Agarose-Gel (3.2.9). Sie enthält DNA-Fragmente folgender Größe: 10000, 8000, 6000, 5000, 4000, 3500, 3000, 2500, 2000, 1500, 1000, 750, 500, 250bp.

### 2.5.2 Protein Größenstandard

#### Unstained Protein Molecular Weight Marker

Fermentas (St. Leon-Rot)

Der *Unstained Protein Molecular Weight Marker* dient der Größenabschätzung von Proteinen auf einem SDS-Polyacrylamid-Gel (3.4.1).

**Tab. 2.2** Proteine und deren Molekulargewicht im *Unstained Protein Molecular Weight Marker*.

| Protein              | M / g/mol |
|----------------------|-----------|
| β-Galaktosidase      | 116       |
| Bovine Serum Albumin | 66,2      |
| Ovalbumin            | 45        |
| Laktat-Dehydrogenase | 35        |
| REase Bsp981         | 25        |
| β-Laktoglobulin      | 18,4      |
| Lysozym              | 14,4      |

### Prestained Protein Molecular Weight Marker

Fermentas (St. Leon-Rot)

Der *Prestained Protein Molecular Weight Marker* dient der Abschätzung der Größe eines Proteins auf einem Western Blot (3.4.2).

**Tab. 2.3** Proteine und deren Molekulargewicht im *Prestained Protein Molecular Weight Marker*.

| Protein              | M / g/mol |
|----------------------|-----------|
| β-Galaktosidase      | 116       |
| Bovine Serum Albumin | 66,2      |
| Ovalbumin            | 45        |
| REase Bsp981         | 25        |
| β-Laktoglobulin      | 18,4      |
| Lysozym              | 14,4      |

## 2.6 Chemikalien

Alle für molekularbiologische und biochemische Arbeiten benötigten Chemikalien besaßen den größtmöglichen Reinheitsgrad. Wenn nicht anders angegeben wurden die Chemikalien von Applichem (Darmstadt, [www.applichem.de](http://www.applichem.de)), Becton Dickinson GmbH (Heidelberg, [www.bd.com](http://www.bd.com)), Biozym Diagnostik GmbH (Hessisch Oldendorf, [www.biozym.com](http://www.biozym.com)), Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, [www.carl-roth.de](http://www.carl-roth.de)), GE Healthcare (Freiburg, [www.gehealthcare.com](http://www.gehealthcare.com)), Gerbu Biochemicals GmbH (Gaiberg, [www.gerbu.de](http://www.gerbu.de)), Merck KGaA (Darmstadt, [www.merck.de](http://www.merck.de)), Oxoid Deutschland GmbH (Wesel, [www.oxoid.com](http://www.oxoid.com)), Qiagen (Hilden, [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)), Roche Diagnostics GmbH (Mannheim; [www.roche.de](http://www.roche.de)), Serva (Heidelberg, [www.serva.de](http://www.serva.de)) oder Sigma-Aldrich Chemie GmbH (München, [www.sigmaaldrich.de](http://www.sigmaaldrich.de)) bezogen.

## 2.7 Nährmedien

Für Flüssigkulturen wird LB-Medium mit der Zusammensetzung von 5 g/l Hefeextrakt, 10 g/l Trypton und 10 g/l NaCl verwendet. Für Kulturplatten wurde dem Medium 15 g/l Agar zugesetzt, bei Topagar 7 g/l. Zur Herstellung kompetenter Zellen wurde SOB-Medium benötigt. Dies besteht aus 20 g/l Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 0,6 g/l NaCl und 0,5 g/l KCl. Des Weiteren werden Peptonwasser und Heart Infusion Bouillon der Firma Oxiod Deutschland GmbH (Wesel) sowie Müller Hinden II Medium der Firma Merck KgaA (Darmstadt) verwendet. Die Herstellung der Nährmedien

erfolgt nach Herstellerangaben. Alle verwendeten Medien werden vor Gebrauch autoklaviert.

### 2.8 Antibiotika und Medienzusätze

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

| Puffer          | Konzentration | gelöst in                |
|-----------------|---------------|--------------------------|
| Ampicillin      | 100 mg/ml     | H <sub>2</sub> O bidest. |
| Chloramphenicol | 34 mg/ml      | Ethanol p.a.             |
| Kanamycin       | 25 mg/ml      | H <sub>2</sub> O bidest. |
| Rifampicin      | 10 mg/ml      | Methanol p.a.            |
| Tetracyclin     | 100 mg/ml     | Ethanol p.a.             |
| IPTG            | 1 M           | H <sub>2</sub> O bidest. |
| X-Gal           | 20 mg/ml      | H <sub>2</sub> O bidest. |

### 2.9 Häufig verwendete Puffer und Lösungen

#### 2.9.1 Allgemeine Puffer

| Puffer        | Konzentration | Bestandteil                           |
|---------------|---------------|---------------------------------------|
| 1x PBS Puffer | 7,75 mM       | Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>      |
|               | 2,25 mM       | NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>      |
|               | 0,15 mM       | NaCl                                  |
| 1xTBS Puffer  | 20 mM         | Tris-HCl (pH7,5)                      |
|               | 120 mM        | NaCl                                  |
| 1x TBE Puffer | 92 mM         | Tris-HCl (pH8,0)                      |
|               | 89 mM         | Borsäure                              |
|               | 2,5 mM        | EDTA                                  |
| TP1-Puffer    | 12 g/l        | RbCl (R2)                             |
|               | 9,9 g/l       | MnCl <sub>2</sub> x 2H <sub>2</sub> O |
|               | 2,94 g/l      | Kaliumacetat                          |
|               | 1,5 g/l       | CaCl <sub>2</sub> x 2H <sub>2</sub> O |
|               | 13%           | Glycerin                              |
|               |               | mit Essigsäure auf pH 5,8 einstellen  |

## 2 Material

---

| Puffer     | Konzentration | Bestandteil                           |
|------------|---------------|---------------------------------------|
| TP2-Puffer | 2,1 g/l       | MOPS (pH 6,8)                         |
|            | 1,2 g/l       | RbCl                                  |
|            | 11 g/l        | CaCl <sub>2</sub> x 2H <sub>2</sub> O |
|            | 13%           | Glycerin                              |
| ZPA        | 20 mM         | Tris-HCl (pH 7,5)                     |
|            | 250 mM        | NaCl                                  |
|            | 1 mM          | MgCl <sub>2</sub>                     |

### 2.9.2 Zellaufschluss und Rückfaltung

| Puffer                 | Konzentration | Bestandteil       |
|------------------------|---------------|-------------------|
| Zellaufschlusspuffer   | 150 mM        | NaCl              |
|                        | 5 mM          | Tris-HCl (pH 8,0) |
|                        | 0,1 mM        | MgCl <sub>2</sub> |
|                        | 0,1 mg/ml     | DNase             |
| IB-Waschpuffer         | 5 mM          | Tris-HCl (pH 8,0) |
| Puffer S               | 100 mM        | Tris-HCl (pH 7,0) |
|                        | 5,4 M         | GdnHCl            |
|                        | 10 mM         | DTE               |
| Solubilisierungspuffer | 8 M           | Harnstoff         |
|                        | 25 mM         | Tris-HCl (pH 8,0) |
|                        | 20 mM         | Natriumcitrat     |
|                        | 0,1 mM        | ZnSO <sub>4</sub> |
|                        | 10 mM         | DTE               |
| Puffer R               | 200 mM        | Tris-HCl (pH 7,5) |
|                        | 500 mM        | L-Arginin         |
|                        | 1 mM          | ZnSO <sub>4</sub> |
|                        | 1 mM          | DTE               |
| RückfaltungspufferT    | 20 mM         | Tris-HCl (pH 7,5) |
|                        | 300 mM        | L-Arginin         |
|                        | 20 mM         | Natriumcitrat     |
|                        | 0,1 mM        | ZnSO <sub>4</sub> |
|                        | 10 mM         | DTE               |

## 2 Material

---

| Puffer              | Konzentration | Bestandteil       |
|---------------------|---------------|-------------------|
| RückfaltungspufferH | 50 mM         | Hepes (pH 6,0)    |
|                     | 300 mM        | Arginin           |
|                     | 20 mM         | Natriumcitrat     |
|                     | 0,1 mM        | ZnSO <sub>4</sub> |
|                     | 10 mM         | DTE               |

### 2.9.3 Chromatographie

| Puffer                 | Konzentration | Bestandteil       |
|------------------------|---------------|-------------------|
| SP-Auftragspuffer      | 20 mM         | MES (pH 5,0)      |
|                        | 20 mM         | Natriumcitrat     |
|                        | 50 mM         | Arginin           |
|                        | 50 mM         | NaCl              |
|                        | 10 mM         | CaCl <sub>2</sub> |
| SP-Elutionspuffer      | 20 mM         | MES (pH 5,0)      |
|                        | 20 mM         | Natriumcitrat     |
|                        | 500 mM        | Arginin           |
|                        | 100 mM        | NaCl              |
| Heparin-Laupuffer      | 25 mM         | Tris-HCl (pH 7,0) |
|                        | 10 mM         | CaCl <sub>2</sub> |
| Heparin-Elutionspuffer | 25 mM         | Tris-HCl (pH 7,5) |
|                        | 10 mM         | CaCl <sub>2</sub> |
|                        | 10 mM         | Citrat            |
|                        | 300 mM        | Arginin           |
| Puffer W               | 100 mM        | Tris-HCl (pH 8,0) |
|                        | 150 mM        | NaCl              |
|                        | 1 mM          | EDTA              |
|                        | 0,05%         | Tween 20          |
| Puffer E               |               | Puffer W          |
|                        | + 2,5 mM      | Desthiobiotin     |

### 2.9.4 Analytik

| Puffer                | Konzentration   | Bestandteil  |
|-----------------------|---|--|
| 4x Lower SDS-Puffer   | 1,5 M<br>0,8% (w/v)   | Tris-HCl (pH8)<br>SDS  |
| 4x Upper SDS-Puffer   | 0,5 M<br>0,8% (w/v)   | Tris-HCl (pH6,8)<br>SDS  |
| 1x SDS-Auftragspuffer | 5% (v/v)<br>10% (v/v)<br>2,5% (v/v)<br>2% (w/v)<br>0,6% (v/v)<br>0,2% (v/v) | Tris-HCl (pH8)<br>Glycerin<br>β-Mercaptoethanol<br>SDS<br>Bromphenolblau (10 g/ml)<br>EDTA (0,5 M) |
| 1x SDS-Laufpuffer     | 25 mM<br>192 mM<br>1% (w/v)   | Tris-HCl (pH8)<br>Glycerin<br>SDS  |
| Fairbanks A           | 25% (v/v)<br>10% (v/v)  | Isopropanol<br>Essigsäure  |
| Fairbanks D           | 10% (v/v)   | Essigsäure   |
| Transferpuffer        | 45 mM<br>10% (v/v)  | Borsäure (pH 9)<br>Methanol  |
| Puffer T              | 20 mM<br>10 mM<br>50 mM   | Hepes (pH 7,5)<br>CaCl <sub>2</sub><br>Arginin   |
| SDS-Gel-EluPu         | 50mM<br>0,08 g/l<br>0,5mM<br>1,00 g/l                                       | Tris-HCl (pH 9,0)<br>DTE<br>EDTA, kein Natriumsalz!<br>SDS   |

### 2.9.5 Funktionstestung

| Puffer               | Konzentration | Bestandteil                      |
|----------------------|---------------|----------------------------------|
| ABTS-Reaktionslösung | 90 mM         | Zitronensäure (pH 5,0)           |
|                      | 180 mM        | Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> |
|                      | 0,1%          | ABTS                             |
|                      | 0,005%        | H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>    |
| ½ TBS                | 20 mM         | Tris-HCl (pH 7,4)                |
|                      | 60 mM         | NaCl                             |
| Verdünnungspuffer 1  | 20 mM         | Hepes (pH 7,4)                   |
|                      | 150 mM        | NaCl                             |
| Lysepuffer           |               | ½ TBS                            |
|                      | + 2 mM        | CaCl <sub>2</sub>                |

### 2.10 Kits

| Kit  | Hersteller              |
|--|-------------------------|
| <i>GenomiPhi DNA Amplification Kit</i>                         | GE Healthcare, Freiburg |
| <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<sup>®</sup> Lambda Preps DNA Purification System</i> | Promega GmbH, Mannheim  |

## 2.11 Verbrauchsmaterialien

| Verbrauchsmaterial                        | 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 und 0,45 µm    | Pall Gelman Laboratory, Dreieich           |
| Cryobank™                                 | Mast Diagnostics, Reinfeld                 |
| Dialysemembran Zellutrans (versch.)       | Carl Roth GmbH, Karlsruhe                  |
| Einmal-Küvette (1,5 ml halbmikro)         | Brand GmbH & Co KG, Wertheim               |
| Omnifix Einmalspritzen (versch.)          | VWR, Melsungen                             |
| Parafilm                                  | Carl Roth GmbH, Karlsruhe                  |
| Pasteurpipetten                           | Hirschmann, Eberstadt                      |
| Petrischalen                              | Greiner Bio-one, Frickehausen              |
| Pipettenspitzen 1000 und 200 µl           | Sarstedt, Nümbrecht                        |
| Pipettenspitzen 20 µl                     | Sorensen Biosciences, Salt Lake City (USA) |
| Pipetten "Serological Pipet" 5, 10, 25 ml | BD Falcon, Heidelberg                      |
| Polypropylen Round Bottom Tubes 14 ml     | BD Falcon, Heidelberg                      |
| Reaktionsgefäß 1,5 und 2 ml               | Eppendorf, Hamburg                         |
| UV/VIS- Präzisionsküvette 0,1cm und 1cm   | Hellma, Mühlheim                           |
| Zentrifugenrörchen 15 und 50 ml           | Corning Inc., Corning (USA)                |

## 2.12 Geräte

| Gerät                                 | Hersteller                                    |
|---------------------------------------|---|
| Agarosegelektrophoresekammern         | 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                |
| Brutschränke                          | Myrton, Heiligenstadt                         |
| CD-Spektrometer J815CD                | Jasco, Tokyo (J)                              |
| ELISA Reader Sunrise                  | Tecan, Maennedorf (CH)                        |
| Fluoreszenz-Spektrometer Fluoromax-3  | Horiba Jobin Yvon, Unterhaching               |
| G-Storm Cycler                        | G-Storm, Essex (GB)                           |
| Horizontalschüttler                   | GFL, Burgwedel                                |
| Hochdruckhomogenisator – Fluidizer    | Microfluics, Newton MA (USA)                  |
| Image Master®VDS mit Software Liscomp | Pharmacia Biotech, Uppsala (S)                |
| Magnetrührer MR 3001                  | Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach |
| Mastercycler Gradient                 | Eppendorf, Hamburg                            |
| Metallblockthermostat Block Heater    | Stuart Scientific, Watford Herts (GB)         |
| Mikroliterpipetten                    | Eppendorf, Hamburg                            |

## 2 Material

---

| Gerät                                  | Hersteller   |
|--|--|
| Multifuge 3 S-R                        | Heraeus Kendro, Hanau  |
| pH-Meter CG 843                        | Schott, Mainz  |
| Reinstwasseranlage                     | SG Wasseraufbereitung und Regenerierstation<br>GmbH, München |
| 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, Uppsala (S)                      |
| Standzentrifuge RC5C                   | Kendro Sorvall, Hanau  |
| Sterilbank Herasafe                    | Heraeus, Nürnberg  |
| Thermomixer comfort                    | Eppendorf, Hamburg   |
| Tischzentrifuge Biofuge Fresco         | Heraeus Kendro, Hanau  |
| Tischzentrifuge Biofuge Pico           | Heraeus Kendro, Hanau  |
| Überkopfschüttler TC7                  | New Brunswick Scientific Inc., Adison (USA)                  |
| Ultra Turrax T18 basic                 | IKA Labortechnik, Staufen                                    |
| Ultraschall Homogenisator              | Bandelin Electronic, Berlin                                  |
| Ultrospec10                            | Amersham Biosciences, Freiburg                               |
| UV/VIS-Spektrometer V550               | Jasco, Tokyo (J)   |
| UV/VIS-Spektrometer V650               | Jasco, Tokyo (J)   |
| Vortex-Genie 2 <sup>®</sup>            | Scientific Industries Inc., Bohemia (USA)                    |
| Zentrifugenbecher für Rotor SS334      | Kendro Sorvall, Hanau  |
| Zentrifugenbecher für Rotor SLA1500    | Kendro Sorvall, Hanau  |
| Zentrifugenbecher für Rotor SLC4000    | Kendro Sorvall, Hanau  |

## 2.13 Software

| Software         | Quelle   |
|------------------|--|
| BLAST            | ( <a href="http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi">http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi</a> )  |
| Chromas          | Version 1.45, McCarthy 1996-1998 ( <a href="http://www.technelysium.com.au">www.technelysium.com.au</a> )  |
| ClustalW2        | ( <a href="http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html">http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html</a> )  |
| DataMax          | Version 2.20 (Instruments SA, Inc.)  |
| DLP-SVM          | ( <a href="http://www.tuat.ac.jp/~domserv/cgi-bin/DLP-SVM.cgi">http://www.tuat.ac.jp/~domserv/cgi-bin/DLP-SVM.cgi</a> )  |
| ExPASy           | Proteomics server ( <a href="http://www.expasy.ch/">http://www.expasy.ch/</a> ) mit tools zur Sequenzübersetzung ( <i>translate</i> ), Proteaseschnittstellenerkennung ( <i>peptide cutter</i> ), Ermittlung von Proteineigenschaften ( <i>protparam</i> ) |
| GOR              | ( <a href="http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_gor4.html">http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_gor4.html</a> )  |
| Grams/32         | Version 4.11 Level II (Galactic Industries Corp.)  |
| NEBcutter2       | ( <a href="http://tools.neb.com/NEBcutter2/index.php">http://tools.neb.com/NEBcutter2/index.php</a> )  |
| Office 2000      | Word, Excel, Power Point, Microsoft ( <a href="http://www.microsoft.de">www.microsoft.de</a> )   |
| Rev Complement   | ( <a href="http://www.bioinformatics.org/sms/rev_comp.html">http://www.bioinformatics.org/sms/rev_comp.html</a> )  |
| Spectra Manager  | Version 2.06.01 (Jasco Corp.)  |
| Swiss PDB Viewer | Version 3.70b ( <a href="http://au.expasy.org/spdbv/">http://au.expasy.org/spdbv/</a> )  |
| UNICORN          | Version 5.11 ( <a href="http://www.gehealthcare.com/unicorn">http://www.gehealthcare.com/unicorn</a> )   |

## 3 Methoden

### 3.1 *Mikrobiologische Methoden*

#### 3.1.1 Isolation lytischer Bakteriophagen

Um lytische Bakteriophagen aus Umweltproben zu gewinnen wird zuerst ein Phagenlysat hergestellt. Hierzu werden die Umweltproben sterilfiltriert (Porengröße: 0,45 µm) und mit demselben Volumen 2-fach LB-Medium versetzt. Nach dem Beimpfen mit potentiellen Wirtskulturen (1% des Gesamtvolumens, exponentielle Phase) erfolgt die schüttelnde Inkubation über Nacht bei 37°C. Nach 20-minütiger Behandlung mit Chloroform und anschließender Zentrifugation (Biofuge Fresco, 10min, 13000 rpm) wird der Überstand erneut sterilfiltriert.

Dieses Lysat dient nun als Ausgangsmaterial für die sich anschließende Vereinzelung und Isolation der Bakteriophagen. Hierzu werden 100 µl einer Wirtskultur mit 200 µl sterilem Lysat und 3 ml LB-Topagar vermischt und auf LB-Agarplatten ausgegossen. Nach Verfestigung des Topagars werden die Platten über Nacht bei 37°C inkubiert.

Da die Wirtszellen durch lytische Bakteriophagen lysiert werden entstehen sog. Plaques im Bakterienrasen. Diese können von unterschiedlicher Trübung und Größe sein. Bei den Plaques können glatte oder fransige Ränder, mit oder ohne Hof auftreten. Die Größe und das Aussehen werden notiert und Plaques unterschiedlicher Morphologie werden mit sterilen Pasteurpipetten ausgestochen und in 200 µl SM-Puffer für eine Stunde bei Raumtemperatur schüttelnd inkubiert. Hierbei diffundieren die Phagen aus dem Agar. Das erhaltene „Phagendiffundat“ wird sterilfiltriert. 100 µl Wirtskultur werden mit 10 µl, 1 µl bzw. 0,1 µl einer 1/500 Verdünnung des Diffundats in 3 ml LB-Topagar auf LB-Platten gegossen. Die Verdünnungsreihe der Phagenlösung ist nötig um Einzelplaques im Bakterienrasen zu erhalten. Nach Inkubation bei 37°C über Nacht werden erneut Plaques gestochen. Um eine Phagenreinkultur zu erhalten wird dieser Vorgang mindestens dreimal wiederholt. Es sollen nur Plaques mit einheitlicher Morphologie erkennbar sein.

### 3.1.2 Bestimmung des Phagentiters

Zur Bestimmung des Bakteriophagentiters werden 100 µl einer Übernachtkultur des Wirtsbakteriums in 3 ml LB-Topagar gemischt und auf LB-Platten ausgegossen. Es werden Verdünnungen des Phagenlysates von  $10^{-1}$  bis  $10^{-8}$  hergestellt. Nach Erstarrung des Topagars werden 5 µl jeder Verdünnung auf den LB-Topagar gegeben. Nach der Trocknung folgt die Inkubation bei 37°C über Nacht. Die Plaques werden in der Verdünnungsstufe ausgezählt, in welcher ihre Anzahl zwischen 10 und 100 liegt. Nun werden unter Berücksichtigung der Verdünnung die *plaque forming units/ml* (pfu/ml) berechnet.

### 3.1.3 Konservierung der Bakteriophagen

Bakteriophagen werden für die Arbeitsbank als sterilfiltriertes Phagenlysat mit einem Titer über  $10^7$  bei 4°C gelagert.

Zur Langzeitlagerung wird ein sterilfiltriertes Phagenlysat mit einem Titer von mindestens  $10^7$  mit dem gleichen Volumen Glycerin (87%) gemischt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung erfolgt bei -80°C.

### 3.1.4 Wirtsspektrum von Bakteriophagen

Für die Erstellung des Wirtsspektrums werden Topagarkulturen relevanter Organismenstämme hergestellt. Sterilfiltrierte Phagenlysate werden in einer Teflon-Matze vorgelegt und mit einem sterilen Stempel auf die Topagarplatte überführt. Der Stempel wird vor jedem Stempelvorgang mit 100% Ethanol abgeflammt und kurz auf einer sterilen Agarplatte abgekühlt. Nachdem die Tropfen (3 bis 5 µl) in den Topagar eindiffundiert sind wird die Platte über Nacht bei 37°C inkubiert. Lytische Bakteriophagen lysieren ihre Wirtszellen, so dass bei denjenigen Bakterienstämmen Plaques zu erkennen sind, welche als Wirt für den getesteten Phagen dienen.

### 3.1.5 Proteinexpression in *Escherichia coli*

Zur Expression von Proteinen werden *Escherichia coli* Zellen verwendet, in welche durch Transformation (3.2.6) ein Plasmid mit der Zielsequenz eingeführt wurde. Die Anzucht erfolgt in LB-Medium mit Antibiotikum, der entsprechenden plasmidkodierten Resistenz. Die Endkonzentration der Antibiotika beträgt 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 wird Antibiotika-haltiges Medium (0,5 l – 2 l) 1:50 mit Übernachtkultur beimpft und bei 30°C bzw. 37°C schüttelnd inkubiert. Die Proteinexpression wird bei einer OD<sub>600</sub> von 0,6 durch Zugabe von 1 mM IPTG induziert. Nach weiterer Inkubation für 3 h bis 4 h folgt die Zellernte durch Zentrifugation (Sorvall, Rotor SLC-4000, 6000rpm, 20min, 4°C). Das Zellpellet wird in 40 ml Zellaufschlusspuffer resuspendiert. Der Zellaufschluss erfolgt im Hochdruckhomogenisator (Microfluidizer®, Microfluidics Corporation, Newton, USA). Lösliche und unlösliche Fraktion werden durch Zentrifugation des Zellaufschlusses (Sorvall, Rotor SS34, 14000rpm, 30min, 4°C) separiert.

#### 3.1.6 Aufnahme einer Wachstumskurve

Eine Wachstumskurve gibt Auskunft über die Wachstumsphase, in der sich ein Bakterium gerade befindet. Meist beginnt die Kurve mit einer lag-Phase. Hier müssen sich die, aus der Übernachtkultur (nährstoffarm) stammenden Zellen erst an die neue Umgebung adaptieren. Während sie mit der Proteinsynthese beginnen ändert sich die Zellzahl kaum. An die lag-Phase schließt sich eine exponentielle Wachstumsphase an, in der sich die Zellen mit maximaler Geschwindigkeit teilen. In dieser Phase kann die Wachstumskonstante ermittelt werden. Sie entspricht, bei halblogarithmischer Auftragung der optischen Dichte in Abhängigkeit von der Zeit, der Steigung im linearen Bereich des Graphen. Mit Hilfe der Wachstumskonstante kann wiederum die Generationszeit mit folgender Gleichung ermittelt werden:

$$\ln N = \ln N_0 + Kt$$

$$\ln 2 = \ln 1 + Kt$$

$$\Rightarrow t \approx \frac{0,69}{K}$$

An die exponentielle schließt sich die stationäre Phase an, in der die Wachstums- und Absterberate einander entsprechen, so dass die Zellzahl gleich bleibt. Werden die Nährstoffvorräte im Medium aufgebraucht ist eine Absterbephase feststellbar.

Zur Aufnahme der Kurve wird eine Übernachtkultur 1:100 in frisches BHI-Medium verdünnt. Staphylokokken werden anschließend schüttelnd bei 37°C inkubiert. Die Messung der OD<sub>600</sub> erfolgt alle 30 bis 40 min im Handphotometer (Ultrospec10,

Amersham Biosciences, Freiburg) gegen Puffer. Die Werte werden halblogarithmisch gegen die Zeit aufgetragen. Aus dem Diagramm können die Wachstumsphasen, die Wachstumskonstante und die Generationszeit bestimmt werden.

#### **3.1.7 Herstellung kompetenter *Escherichia coli* Zellen**

Zur Herstellung kompetenter Zellen (Stämme HMS174(DE3), BL21(DE3), JM109) werden 400 ml SOB-Medium mit 10 mM MgSO<sub>4</sub> und 10 mM MgCl<sub>2</sub> versetzt und mit 2 ml einer frischen Übernachtkultur beimpft. Die Anzucht erfolgt bei 37°C bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,3. Die Zellsuspension wird 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) folgt die Resuspension des Zellpellets in 64 ml eiskaltem Puffer TP1. Nach Inkubation auf Eis für 90 min sowie einem erneuten Zentrifugationsschritt wird das Pellet in 16ml eiskaltem Puffer TP2 aufgenommen. Aliquots á 300 µl werden sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren und anschließend auf -80°C gelagert. Zur Qualitätskontrolle der kompetenten Zellen wird eine Kontroll-Transformation durchgeführt. Hierfür werden 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 erfolgt die Zugabe von 1 ml LB-Medium. Der Ansatz wird 60 min bei 37°C langsam schüttelnd inkubiert. Nun werden 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 1ng DNA) auf LB-Platten mit Antibiotikum (entsprechend der plasmidkodierten Resistenz) ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Zur Auswertung werden die Transformanten gezählt und auf Kolonien / µg DNA normiert. Ein guter Transformationswert liegt bei über 5x10<sup>7</sup> – 1x10<sup>8</sup> Kolonien / µg DNA.

#### **3.1.8 Zellwandpräparation von Staphylokokken**

Zur Herstellung einer Zellwandpräparation wird eine 2 l-Kultur in LB-Medium angesetzt und 20 h bei 37°C angezogen. Die Zellen werden durch Zentrifugation (Rotor SLC-4000, 5000 rpm, 20 min, 4°C) geerntet und das Zellpellet wird in 20 ml Puffer ZPA aufgenommen. Das Volumen wird nach dem Zellaufschluss im Hochdruckhomogenisator auf 50 ml aufgefüllt. Nach erneuter Zentrifugation (Rotor SLC-4000, 4500 rpm, 60 min, 4°C) und Aufnahme des Zellaufschlusspellets in 20ml

ZPA erfolgt die Zugabe von je 200 $\mu$ l DNase (Stammlösung 10mg/ml) und RNase (Stammlösung 10 mg/ml) und die schüttelnde Inkubation bei 37°C für 30h. Es folgt der Trypsin-Verdau durch Zugabe von 200 $\mu$ l Trypsin (Stammlösung 10%) für 6h bei 37°C. Anschließend werden 20 $\mu$ l Proteinase K (Stammlösung 10 mg/ml) zugesetzt und der Ansatz über Nacht bei 37°C inkubiert. Nach zweifachem Waschen mit je 50 ml Puffer ZPA (4500 rpm, 30 min, 4°C) erfolgt die Aufnahme des Pellets in 7 ml ZPA. Die OD<sub>600</sub> wird mit ZPA auf 100 eingestellt und nach 1 h bei 95°C werden die Zellwände bei -20°C gelagert.

## 3.2 Molekularbiologische Methoden

### 3.2.1 Isolierung von DNA aus Bakteriophagen

Die DNA-Isolierung aus Phagen (Titer > 5 x 10<sup>8</sup> pfu/ml) wurde mittels *QIAGEN Lambda Mini Kit* (Qiagen, Hilden) durchgeführt. Hierbei wurden die Phagen durch Polyethylenglykol gefällt. Durch Protease wurde die Phagenhülle aufgelöst und die freiwerdende DNA wurde über eine Silicagel-Säule chromatographisch aufgereinigt. Die Isolierung wurde gemäß der Vorschrift des Herstellers durchgeführt.

### 3.2.2 Unspezifische Amplifikation von DNA

Zur unspezifischen Amplifikation von linearer genomischer DNA wird der *GenomiPhi DNA Amplification Kit* (Amersham Biosciences, Uppsala) verwendet. Dieser enthält die DNA Polymerase des Bakteriophagen Phi29 zur Amplifikation von einzel- oder doppelsträngiger DNA. Das Enzym besitzt eine hohe *strand displacement*-Aktivität, so dass Einzelstränge neu synthetisierter DNA entstehen, ohne dass ein Aufheizen des Ansatzes nötig ist. Die *proofreading*-Aktivität der DNA-Polymerase gewährleistet eine geringe Fehlerquote. Als Primer werden hexamere Oligonukleotide zufälliger Sequenz verwendet. Diese lagern sich an die zu replizierende *template*-DNA an verschiedenen Stellen an (*primer annealing*). Die Polymerase kann nun die freie Hydroxylgruppe am 3'-Ende der Primer für ihre erste Verknüpfungsreaktion und damit als Startpunkt der DNA-Synthese nutzen. Während der Synthese entstehen neue DNA-Einzelstränge, an welche die Primer erneut binden können. Eine exponentielle Zunahme der DNA-Menge ist die Folge. Alle Ansätze erfolgen nach Herstellerprotokoll. Die Reaktion findet über Nacht bei 30°C statt.

### 3.2.3 Polymerasekettenreaktion

Zur DNA-Amplifizierung wird die Polymerasekettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) genutzt. Die PCR beginnt mit einem Denaturierungsschritt, bei dem der Nukleotid-Doppelstrang auf 95°C erhitzt und dadurch aufgeschmolzen wird. Um die Anlagerung (Annealing) kurzer, einzelsträngiger DNA-Fragmente mit freiem 3'-OH-Ende (Oligonukleotide, Primer) an die zu amplifizierende DNA (*template*) zu ermöglichen, wird der PCR-Ansatz auf die, von den Primern zur Anlagerung benötigte Temperatur, abgekühlt. Ausgehend von den Primern wird die *template*-DNA nun, im sog. Elongationsschritt, mit Hilfe der hitzestabilen Taq DNA-Polymerase (aus *Thermus aquaticus*) in 3'-Richtung repliziert. Die drei Schritte Denaturierung, Annealing und Elongation werden zyklisch durchlaufen (Mullis *et al.*, 1986). Der Standardansatz enthält folgende Bestandteile (Tab. 3.1):

**Tab. 3.1** Standard 50 µl-PCR-Ansatz

| Bestandteil            | Volumen / µl |
|------------------------|--------------|
| forward-Primer (10 µM) | 3            |
| reverse-Primer (10 µM) | 3            |
| dNTPs (10 mM)          | 3            |
| 5x Phusion-Tag-Puffer  | 10           |
| Phusion-Tag-Polymerase | 0,25         |
| Matrize                | 2            |
| DMSO                   | 2            |
| H <sub>2</sub> O       | 26,75        |

Falls nicht anders beschrieben, wird folgendes PCR-Programm genutzt (Tab. 3.2):

**Tab. 3.2** Standard PCR-Programm

| Schritt                | Dauer / sec | Temperatur / °C | Zyklen |
|------------------------|-------------|-----------------|--------|
| initiale Denaturierung | 120         | 98              | 1      |
| Denaturierung          | 30          | 98              | 34     |
| Annealing              | 30          | 52              |        |
| Elongation             | 30          | 72              |        |
| finale Elongation      | 300         | 72              | 1      |

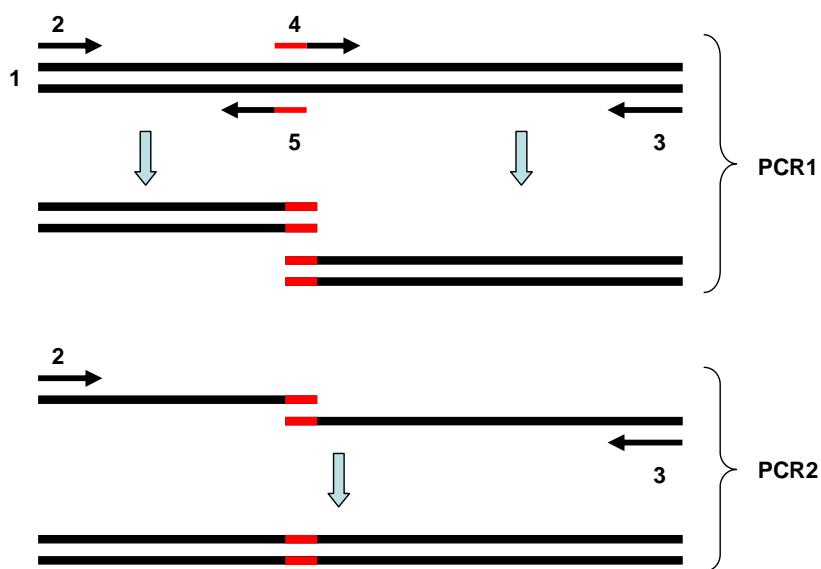
PCR wird in dieser Arbeit zur Amplifizierung von Zielsequenzen aus bakterieller DNA, zur Klonierung plasmidcodierter Sequenzen, zur Einführung von Nukleotidveränderungen per PCR-Mutagenese (3.2.3.2) und zur Klonauswahl per colony-PCR (3.2.3.1) genutzt.

### 3.2.3.1 colony-PCR

Bei der *colony-PCR* handelt es sich um einen Standard-PCR-Ansatz ohne *template*-DNA. Stattdessen werden Kolonien der zu testenden Klone in den PCR-Ansatz überführt. Der initiale Denaturierungsschritt führt zum Zellaufschluss, wodurch die enthaltene bakterielle und Plasmid-DNA frei wird und als *template*-DNA dient. Durch Auswahl von Primern, welche an die plasmidkodierte Promotor- und Terminatorregion annealen, kommt es zur spezifischen Amplifikation des Bereichs zwischen diesen Regionen, in den vorher die Zielsequenz einkloniert wurde. Per Agarose-Gelelektrophorese erfolgt die Klonauswahl nach Vorhandensein und Größe des insertierten DNA-Fragments.

### 3.2.3.2 PCR-Mutagenese

Ein Werkzeug zur Einführung von Mutationen in eine DNA-Sequenz ist die PCR-Mutagenese. Hierbei werden zwei PCR-Reaktionen hintereinander geschaltet. In der ersten PCR werden in zwei getrennten Ansätzen die DNA-Fragmente zwischen 5'-Ende und Mutationsstelle, sowie zwischen Mutationsstelle und 3'-Ende amplifiziert. Beide DNA-Stücke überlappen sich im Bereich der Mutationsstelle. Die Aufreinigung erfolgt über Agarose-Gelelektrophorese mittels eines Gelextraktionskits (Quiagen, Hilden). Die Amplifikate dienen in der zweiten PCR als *template*-DNA. Nach Zugabe der Außenprimer wird nun die gesamte, die eingeführte Mutation tragende Zielsequenz amplifiziert. Abb. 3.1 veranschaulicht die PCR-Mutagenese.



**Abb. 3.1** Schematische Darstellung der Einführung einer Mutation über PCR-Mutagenese. (1) *template*-DNA, (2) Klonierungsprimer forward, (3) Klonierungsprimer reverse, (4) Mutationsprimer forward, (5) Mutationsprimer reverse.

### 3.2.4 Isolierung von Plasmid-DNA

Als Ausgangsmaterial für die DNA-Gewinnung dient eine Übernachtkultur von *Escherichia coli* mit dem Gen kodierenden Plasmid. Die Präparation von Plasmid-DNA erfolgt mit Hilfe des *QIAquick Spin Miniprep Kit* (Qiagen, Hilden) nach Herstellerprotokoll. Dieses basiert auf der alkalischen Lyse und anschließender Aufreinigung der Plasmid-DNA über einen Anionenaustauscher.

### 3.2.5 Verwendung von Enzymen zur Veränderung der DNA

#### 3.2.5.1 Restriktionsverdau

Restriktionsendonukleasen sind Enzyme, die bestimmte Sequenzen in DNA-Fragmenten spezifisch erkennen und die DNA dort spalten. Die Erkennungssequenzen haben eine Länge von vier, sechs oder acht Nukleotiden und sind meist palindromisch aufgebaut. Restriktionsenzyme können 5'- oder 3'-Einzelstrang-überhänge verursachen oder es entsteht ein sog. *blunt end* ohne Einzelstrang-überhang. Verdaute Fragmente mit Einzelstrangüberhängen können mit anderen Fragmenten mit kompatiblen Überhängen ligiert werden. *Blunt* geschnittene Fragmente können beliebig untereinander ligiert werden. Alle Restriktionsansätze werden, falls nicht anders beschrieben, wie folgt angesetzt (Tab. 3.3):

**Tab. 3.3** Standard 40 µl-Restriktionsansatz

| Substanz          | Volumen / µL |
|-------------------|--------------|
| DNA               | 30           |
| Restriktionsenzym | 2            |
| BSA (falls nötig) | 4            |
| 10 x Puffer NEBX  | 4            |

Es werden Puffer und Enzyme der Firma NEB (New England Biolabs GmbH, Frankfurt) verwendet. Die Nummer des Reaktionspuffers, die Notwendigkeit der Zugabe von Rinderserumalbumin (BSA) sowie die Reaktionsbedingungen werden der Homepage von NEB ([www.neb.com](http://www.neb.com)) entnommen.

### **3.2.5.2 *Ligation***

Während der Klonierung werden oft DNA-Fragmente in per Restriktionsverdau geöffnete Vektoren ligiert. Dem Restriktionsansatz des Vektors wird vor der Aufreinigung 1 µl alkalische Phosphatase (CIP) zugegeben. Der Ansatz wird dann eine Stunde bei 37°C inkubiert. Die alkalische Phosphatase dephosphoryliert das 5'-Ende des DNA-Doppelstrangs, so dass eine Ligation des Vektors mit sich selbst verhindert und religierte Vektoren ohne Insert vermieden werden. Die Verbindung der kompatiblen Schnittstellen von PCR-Fragment und Vektor wird durch das Enzym Ligase aus dem Bakteriophagen T4 mittels ATP-Hydrolyse vermittelt. Ein Ligationsansatz enthält 6 µl restriktionsverdautes PCR-Fragment, 2 µl geöffneten Vektor, 1 µl 10 x T4-Ligasepuffer und 1 µl T4 DNA-Ligase. Die Reaktion wird eine Stunde auf Raumtemperatur inkubiert. Die erhaltenen Vektoren mit Insert werden entweder per präparativer Agarose-Gelelektrophorese aufgereinigt (3.2.9) oder direkt in kompetente *Escherichia coli* Zellen transformiert (3.2.6).

### **3.2.6 Transformation von DNA in *Escherichia coli***

Zur Transformation werden 130 µl kompetente Zellen auf Eis aufgetaut, zu 1-10 µl der Plasmid-Lösung gegeben und 30 min auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock (90 sec, 42°C) und weiteren 2 min auf Eis folgt die Zugabe von 800 µl LB-Medium. Nach Inkubation für 30 min bei 37°C und 600 rpm werden die Zellen auf Agarplatten mit Selektivmedium (zur Selektion von Transformanten) ausgebracht und über Nacht bei 37°C inkubiert. Parallel zu jeder Transformation erfolgt immer eine Kontrolltransformation mit H<sub>2</sub>O anstelle von Plasmid-DNA. Durch DNA-Sequenzierung werden die erhaltenen Transformanten überprüft.

### **3.2.7 *Shot-Gun* Klonierung von Zufallssequenzen aus Phagen-DNA**

Um per Homologiesuche erfolgreich DNA-Abschnitte im Phagengenom zu identifizieren, welche eine gewünschte Funktion codieren, ist es nötig, Teile des Phagengenoms anzosequenzieren. Diese Fragmente erhält man entweder durch unspezifische DNA-Amplifikation (3.2.2) mittels *GenomiPhi DNA Amplification Kit* (Amersham Biosciences, Uppsala), oder durch partiellen Verdau von Phagen-DNA mit Restriktionsenzymen (3.2.5.1). Jedoch müssen die hierbei erhaltenen DNA-

Stücke vor der Sequenzierung in einen Vektor überführt werden. Dazu wird der *Perfectly Blunt Cloning Kit* (Novagen, Darmstadt) verwendet. Der Verdau wird per *PCR Purification Kit* (Qiagen, Hilden) aufgereinigt, während der *GenomiPhi*-Ansatz direkt eingesetzt werden kann. 2 µl der DNA werden mit 3 µl H<sub>2</sub>O und 5 µl *Blunt End Conversion Mix* (Novagen, Darmstadt) für 15 min bei 22°C inkubiert. In dem Mix ist das Klenow-Fragment enthalten. Dieses besitzt zwei unterschiedliche Funktionen. 5'-überstehende, einzelsträngige DNA-Sequenzen werden durch die Polymerasefunktion aufgefüllt, während einzelsträngige 3'-Überhänge durch die Exonukleasefunktion abgebaut werden. Das Ergebnis ist ein DNA-Fragment mit glatten Enden (*blunt ends*). Dieser Schritt ist nötig, da die Sequenz bei der Klonierung noch nicht bekannt ist und an den Enden keine spezifischen Restriktionsschnittstellen vorhanden sind. Nach 15 min wird die Reaktion durch Inkubation für 5 min auf 75°C abgestoppt. Anschließend erfolgt die Ligation in den, ebenfalls im Kit enthaltenen, linearisierten pSTBlue-1 Blunt Vektor. Hierfür werden 10 µl des *End Conversion*-Ansatzes mit 1 µl des Vektors und 1 µl T4-DNA-Ligase für 15 min bei 22°C inkubiert. Anschließend erfolgt die Transformation in kompetente Zellen (NovaBlue Singles, Novagen, Darmstadt) nach Herstellerangaben. Die Identifizierung plasmidhaltiger Klone erfolgte auf LB-Agar mit 50 µg/ml Ampicillin, 12,5 µg/ml Tetracyclin, 70 µg/ml 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galactopyranoside (X-Gal) und 80 µM Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG) per Blau-Weiß-Screening (3.2.8). Die Plasmid-DNA aus weißen Kolonien wird mittels *QIAquick Spin Miniprep Kit* (Qiagen, Hilden) isoliert. Die Sequenzierung erfolgte extern bei den Firmen Entelechon GmbH oder Geneart GmbH mit einem Primer, welcher spezifisch an den, vor der Insertionsstelle gelegenen T7-Promotor bindet.

#### 3.2.8 Blau-Weiß-Screening

Bei diesem Verfahren wird die Fähigkeit des Enzyms β-Galactosidase zur Hydrolyse von X-Gal zu Galactose und 5-Brom-4-chlor-3-hydroxyindol genutzt. Letzteres wird durch Luftsauerstoff zu dem blauen Farbstoff 5,5'-Dibrom-4,4'-dichlor-indigo oxidiert. In dem verwendeten Klonierungsvektor pSTBlue (Novagen, Darmstadt) liegt die Insertionsstelle für Fremd-DNA in der, für die β-Galactosidase codierenden Sequenz. Wird ein Insert in den Vektor eingebracht, so kann die β-Galactosidase, nach der

Transformation in kompetente Zellen (NovaBlue Singles, Novagen, Darmstadt) nicht mehr exprimiert werden. Die Transformanten werden auf LB-Agar mit 50 µg/ml Ampicillin, 12,5 µg/ml Tetracyclin, 70 µg/ml 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galactopyranoside (X-Gal) und 80 µM Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG) ausplattiert. Durch Ampicillin wird auf plasmidhaltige Zellen selektiert, da das Resistenzgen vom Vektor kodiert wird. In den kompetenten Zellen ist die Tetracyclinresistenz genomisch codiert. So wird durch Verwendung von Tetracyclin im Agar die Kontamination durch Fremdzellen vermieden. Die Expression der Resistenzfaktoren und der β-Galactosidase wird mittels IPTG induziert. Klone, die einen Vektor mit Fremd-DNA beinhalten erscheinen also weiß. Kolonien von Zellen mit einem Plasmid ohne Insert werden blau.

#### 3.2.9 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese dient zur Analyse von Nukleinsäurefragmenten. DNA-Fragmente werden hierbei auf 1%igen (w/v) Agarosegelen getrennt. DNA ist an den Phosphatresten im „Rückgrat“ negativ geladen und wandert somit im elektrischen Feld zur Anode. Das Masse-Ladungs-Verhältnis ist auch bei größeren Fragmenten nahezu gleich, so dass die Auf trennung aufgrund des Molekularsieeffektes des Agarosegels erzielt wird. Zur Herstellung des Gels wird 1% (w/v) Agarose (pEQLab Biotechnologie GmbH, Erlangen) in TBE-Puffer aufgekocht und auf etwa 60-70°C abgekühlt. In den Gelschlitten (pEQLab Biotechnologie GmbH, Erlangen) wird 1/10000 Gelvolumen Ethidiumbromid (1 mg/ml) vorgelegt. Die Gellösung wird eingefüllt und mit ein bis zwei Kämmen versehen. Es finden Kämme für Geltaschen unterschiedlicher Größe Anwendung: Für die analytische Agarose-Gelelektrophorese reichen kleine Taschen aus während für die präparative größere Geltaschen benötigt werden. Ist das Gel fest wird es in eine mit TBE-Puffer gefüllte Pufferkammer gelegt. Nach Auftrag der mit 6 x *Loading Dye* (Fermentas, Heidelberg) versetzten Proben folgt die Elektrophorese bei einer Spannung von 110 V. Der Fortschritt kann an den Banden der im *Loading Dye* enthaltenen Farbstoffe abgeschätzt werden. Bromphenolblau läuft in einem 1%igen Agarosegel bei etwa 300 bp und Xylen-Cyanol FF bei circa 4000 bp. Ethidiumbromid interkaliert in die DNA und kann mit UV-Licht angeregt werden. Die dadurch stark erhöhte Fluoreszenz des Farbstoffes lässt nukleinsäurehaltige Bereiche des Gels hell erscheinen.

Agarose-Gele werden mit einem Video-Dokumentationssystem (VDS, GE Healthcare, München) dokumentiert. Wird ein präparativer Lauf durchgeführt können die DNA-Fragmente, welche von Interesse sind aus dem Gel ausgeschnitten werden. Die Aufreinigung erfolgt nun mittels des *QIAquick Gel Extraction Kits* (Qiagen, Hilden) nach Herstelleranweisung.

## **3.3 Proteinbiochemische Methoden**

### **3.3.1 Gewinnung unlöslich exprimierter Proteine**

Einige Proteine werden unlöslich in sphärischen Einschluskörperchen (*inclusion bodies*) exprimiert. Die vollständig synthetisierten Proteine liegen hier meist nur partiell gefaltet vor. Zur Isolierung müssen die *inclusion bodies* solubilisiert und das enthaltene Protein komplett denaturiert werden. Schließlich erfolgt in der Rückfaltung die Renaturierung des Proteins, wobei dieses bei korrekter Faltung seine native Struktur annimmt.

#### **3.3.1.1 Isolierung von *inclusion bodies***

Nach Expression des Zielproteins in *E.coli* und Zellaufschluss (3.1.5) wird die unlösliche Fraktion in Zellwaschpuffer (250 ml / 100 g Pellet) mit Hilfe des Ultra-Turrax resuspendiert und anschließend durch Zentrifugation (Sorvall, SLA1500, 12000 rpm, 25 min) erneut pelletiert. Der Überstand wird verworfen. Dieser Waschvorgang wird sukzessive mit je 250 ml IB-Waschpuffer + 2,5% (v/v) TritonX100 und IB-Waschpuffer ohne TritonX100 wiederholt. Schließlich werden die *inclusion bodies* in H<sub>2</sub>O (10 ml / 100 g Zellaufschlusspellet) aufgenommen.

#### **3.3.1.2 Solubilisierung von *inclusion bodies***

Zur Solubilisierung werden *inclusion bodies* 10:1 in 1 M NaOH gegeben. Nach gründlicher Homogenisierung (Vortex-Genie 2<sup>®</sup>, Scientific Industries Inc., Bohemia, USA) erfolgt die Zugabe von neun Volumina Solubilisierungspuffer mit anschließender erneuter Mischung. Der im Solubilisierungspuffer enthaltene Harnstoff zählt zu den chaotropen Reagenzien. Durch Harnstoff wird die Ausbildung nicht-kovalenter Bindungen der Aminosäureseitengruppen und damit eine eventuelle Fehlfaltung des Proteins verhindert. Das Reduktionsmittel DTE verhindert die Oxidation von Sulfhydryl-Gruppen (-SH) zu Disulfidbrücken. Im Solubilisierungsansatz liegt also eine komplett denaturierte Polypeptidkette vor.

#### **3.3.1.3 Rückfaltung denaturierter Proteine**

Um die Tertiärstruktur denaturierter Proteine wieder herzustellen wird, falls nicht anders angegeben, folgender Renaturierungsansatz verwendet.

Denaturiertes Protein wird 1:16 unter Rühren bei 4°C in Rückfaltungspuffer verdünnt. Der Rückfaltungsansatz wird nun über Nacht bei 4°C unter leichtem Rühren inkubiert. Durch die Verdünnung sinkt die Harnstoffkonzentration auf ca. 0,5 M, was hydrophobe Wechselwirkungen und die Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Aminosäureseitengruppen ermöglicht, so dass die Tertiärstruktur des Proteins wiederhergestellt wird. Eventuell auftretende Proteinaggregate werden im Anschluss an die Rückfaltung durch Zentrifugation (Sorvall, Rotor SLC4000, 6000rpm, 30min, 4°C) entfernt.

#### **3.3.2 Proteinreinigung**

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

#### **3.3.2.1 Anionenaustauscherchromatographie**

Zur Abtrennung von DNA aus denaturiertem Protein wird in dieser Arbeit der starke Anionenaustauscher Toyopearl GigaCap Q-650M (Tosoh Biosciences GmbH, Stuttgart) verwendet. Die durch die Phosphatgruppen am Rückgrat, bei neutralem pH-Wert, negativ geladene DNA interagiert mit dem positiv geladenen Säulenliganden (-O-R-N<sup>+</sup>(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>). Der isoelektrische Punkt (pI) der mit dieser Methode aufgereinigten Proteine liegt über 9,0, während der verwendete Auftragspuffer (Solubilisierungspuffer ohne DTE) einen pH-Wert von 8,0 besitzt. Die Seitengruppen einzelner Aminosäuren, vor allem Lys, Asp und Glu sind hier protoniert, wodurch das Protein eine positive Gesamtladung erhält, nicht an die funktionellen Gruppen der stationären Phase bindet und somit in der Durchlauffraktion zu finden ist.

Die DNA-Abtrennung erfolgt bei einer Flussrate von 5 ml/min. Das Säulenvolumen (SV) beträgt 20 ml. Vor dem Auftrag wird die Säule mit drei SV Auftragspuffer equilibriert. Als Auftrag dient 1:1 mit Auftragspuffer verdünntes, solubilisiertes Protein. Die Probenapplikation auf die Säule erfolgt über eine Auftragspumpe. Die proteinhaltigen Fraktionen des Durchlaufs (Fraktionsgröße 2 ml) werden vereinigt.

#### **3.3.2.2 Kationenaustauscherchromatographie**

Zur spezifischen Anreicherung renaturierter Zielproteine findet der starke Kationenaustauscher Toyopearl SP-650M (Tosoh Biosciences GmbH, Stuttgart) Verwendung. Durch das anionische Verhalten der zu reinigenden basischen Proteine bei saurem pH-Wert (SP-Auftragspuffer mit pH 5,0) können die Zielproteine reversibel an den Liganden der stationären Phase (-O-R-O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-SO<sub>3</sub><sup>-</sup>) binden. Vor dem Probenauftrag wird die Säule mit drei SV SP-Auftragspuffer äquilibriert. Die Flussrate wird bei einem SV von 50 ml auf 10 ml/min für Auftrag und Waschen bzw. 5 ml/min während der Elution eingestellt. Der Probenauftrag erfolgt über eine Auftragspumpe. An den Waschvorgang der Säule mit 2 SV SP-Auftragspuffer schließt sich die Elution mit 50% SP-Elutionspuffer an. Der erhöhte Salz- und Arginin gehalt der mobilen Phase bewirkt hierbei eine Verdrängung der gebundenen Proteine vom Liganden. Fraktionen á 2 ml werden gesammelt und die proteinhaltigen Eluate vereinigt.

#### **3.3.2.3 Affinitätschromatographie mittels Heparinsäule**

Heparin ist ein Glycosaminoglycan und ähnelt somit der Struktur von Peptidoglycan. Proteine, welche eine Amidase-Domäne besitzen können über diese mit Heparin interagieren. In dieser Arbeit wird das Säulenmaterial Toyopearl AF-Heparin 650-HC (Tosoh Biosciences GmbH, Stuttgart) verwendet. Zur Reduzierung der Arginin-Konzentration werden die zu reinigenden Proteine nach der Rückfaltung 1:5 in Heparin-Laufpuffer verdünnt. Nach Entfernung von Schwebstoffen durch Zentrifugation (Sorvall, Rotor SLC-4000, 6000 rpm, 20 min, 4°C) erfolgt der Auftrag auf die, mit 3 SV Heparin-Laufpuffer äquilierte Säule. Die Flussrate beträgt während Auftrag und Waschschritt 5 ml/min, bei der Elution 2 ml/min. Nach Waschen der Säule mit 2 SV Heparin-Laufpuffer erfolgt die Elution mit Heparin-Elutionspuffer in 1,5 ml Fraktionen.

#### **3.3.2.4 Affinitätschromatographie mittels Streptavidinsäule**

Bei dieser Methode wird die Affinität eines Affinitätspeptids, des sog. *Strep-tags*, zum Protein Streptactin, einem von der Firma IBA modifizierten Streptavidin, zur Proteinreinigung genutzt. Der *Strep-tag* wird N-terminal an die zu reinigenden Proteine kloniert. Nach Equilibrierung einer Streptactin-Sepharose-Säule mit vier SV Puffer W erfolgt der Auftrag des proteinhaltigen Überstandes aus dem Zellaufschluss. Das Protein wird über den *Strep-tag* an das Streptactin gebunden. Nach Waschen der Säule mit 3-4 SV Puffer W, wird das gebundene Protein mit vier

SV Puffer E von der Säule eluiert. Die Affinität des im Elutionspuffer enthaltenen Desthiobiotins zu Streptactin ist größer als die des *Strep-tags*, so dass dieser aus der Bindung verdrängt wird. Fraktionen zu je 1 ml werden gesammelt und die proteinhaltigen Fraktionen vereinigt.

#### **3.3.2.5 Extraktion von denaturiertem Protein aus einem SDS-PA-Gel**

Zur Gewinnung polyklonaler Antikörper gegen K9 wird eine möglichst reine Fraktion des Proteins benötigt. Durch chromatographische Reinigungsverfahren konnte bis zu dem Zeitpunkt der Antikörpergenerierung kein Protein mit hinreichender Reinheit für die Immunisierung erhalten werden. Da die Gewinnung von Antikörpern auch durch Einsatz denaturierter Proteine möglich ist, konnte eine Methode genutzt werden, bei welcher die Extraktion des Zielproteins aus einem SDS-Polyacrylamidgel per Elektrophorese erfolgt. Hierzu werden K9-haltige *inclusion bodies* solubilisiert. Das solubilisierte Protein wird dann einer SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (3.4.1) unterzogen. Dann wird ein Einzelstreifen des Gels abgetrennt und Coomassie Blue gefärbt. Der gefärbte Streifen dient als Kontrolle und aus dem nicht gefärbten Gel wird auf Höhe der Bande des Zielproteins ein Streifen ausgeschnitten. Dieser wird in einen Dialyseeschlauch überführt und quer in ein elektrisches Feld platziert, wodurch das Protein aus dem Gelstreifen in den Puffer im Dialyseeschlauch gelangt. Hierfür wird eine Agarose-Gelelektrophorese-Anlage (PeqLab Biotechnologie, Erlangen) und der Puffer SDS-Gel-EluPu verwendet. Die Proteinlösung im Dialyseeschlauch kann bei Bedarf noch aufkonzentriert, oder direkt zur Immunisierung verwendet werden. Die Immunisierung erfolgte extern bei der Firma Davids Biotechnologie GmbH.

## **3.4 Analytische Methoden**

### **3.4.1 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese und Coomassie Blue Färbung**

Zur elektrophoretischen Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht wurden meist SDS-Polyacrylamidgele mit einer Acrylamidkonzentration von 12% verwendet. Zur Auftrennung kleiner Proteine, z.B. Einzeldomänen wurde die Acrylamidkonzentration auf 18% erhöht. Das anionische Detergenz Natrium-dodecylsulfat (SDS) bindet an das Protein, was eine negative Nettoladung unabhängig von der Eigenladung des Proteins, zur Folge hat. Bei der Elektrophorese

im Polyacrylamidgel besteht eine lineare Beziehung zwischen der Wanderungsstrecke und dem Logarithmus des Molekulargewichtes. Mit Hilfe von Standards kann das Molekulargewicht der Proteine ermittelt werden. Gele werden zwischen zwei gereinigte, durch 1,5 mm starke Abstandshalter getrennte Glasplatten gegossen. Als Erstes wird das Trenngel (Tab. 3.4) gegossen und zur Glättung mit Isopropanol überschichtet. Nachdem das Trenngel auspolymerisiert ist wird der restliche Gelraum mit Sammelgel (Tab. 3.4) aufgefüllt und ein Kamm mit der gewünschten Anzahl Taschen eingesetzt.

**Tab. 3.4** Ansatz für Trenn- und Sammelgel bei Verwendung von 1,5mm starken Abstandshaltern.

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

Die Proteinprobe wird 5:1 in 5 x SDS-Auftragspuffer verdünnt und 10 min auf 95°C erhitzt und damit denaturiert. Die Elektrophorese erfolgt in SDS-Laufpuffer bei einer konstanten Spannung von 180V für ca. 45 min. Zur Visualisierung der Proteinbanden wird die Methode nach Fairbanks (Fairbanks *et al.*, 1971) verwendet: Das zu färbende Gel wird in Fairbanks-Lösung A in der Mikrowelle aufgekocht und anschließend 10 min geschwenkt. Nachdem das Gel mit H<sub>2</sub>O gewaschen wurde erfolgt die Entfärbung zur Reduktion des Hintergrundes. Hierzu wird das gefärbte Gel in Fairbanks-Lösung D ca. 2 min aufgekocht und anschließend bis zum Erscheinen der Proteinbanden schwenkend entfärbt. Die Dokumentation erfolgt mittels eines Videodokumentationssystems (Image Master<sup>®</sup>VDS, Pharmacia Biotech, Uppsala, S).

#### 3.4.2 Westernblot

Die Proteine werden zunächst über SDS-PAGE (3.4.1) nach der Größe aufgetrennt und anschließend elektrophoretisch auf eine Polyvinylidendifluorid (PVDF) Membran übertragen (geblottet).

Vier Whatmann Papiere (Roth, Karlsruhe) und die PVDF Membran (Hybond-P PVDF Membran, GE Healthcare) werden auf die Größe des zu blottenden Gels

zugeschnitten und in Methanol p.a. eingelegt. Nach ca. 5 min werden die Papiere und die Folie ein- bis dreimal in Wasser gewaschen und dann für mindestens 20 min in Transferpuffer (45 mM Borsäure, 10% (v/v) Methanol, pH 9) gelegt.

Das SDS-Polyacrylamidgel wird spiegelverkehrt auf 2 Whatmanns in die Mitte der Blotting-Kammer gelegt, die PVDF Membran draufgelegt und darauf wieder 2 Whatmann Papiere luftblasenfrei gelegt. Das Ganze wird mit etwa 500 µl Transferpuffer überschichtet und der Deckel aufgeschraubt. Der Blot erfolgt für 3 Stunden bei 294 mA.

Soll eine N-terminale Ansequenzierung der geblotteten Proteinbanden erfolgen wird die PVDF Membran für 10 min in 0.1% (w/v) Coomassie Brilliant Blue R250, 50% (v/v) Methanol gefärbt. Nicht proteinhaltige Bereiche der Membran werden in 50% (v/v) Methanol, 10% (v/v) Essigsäure entfärbt bis klare Proteinbanden sichtbar werden. Die zu sequenzierenden Banden werden ausgeschnitten und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C eingefroren.

Für eine spezifische Detektion von Banden des Zielproteins kommen Antikörper zum Einsatz. Direkt nach dem Blot wird die Membran in PBST mit 0,5% BSA für 45 min blockiert. Der primäre Antikörper gegen das Zielprotein wird in einer geeigneten Verdünnung (je nach Titer) in PBST 60 min mit der Membran inkubiert. Nach zweimaligem Waschen der Membran mit PBST folgt ein weiterer Waschschritt. Dieser erfolgt in dem Puffer, welcher dem, am sekundären Antikörper konjugierten Enzym entspricht. Ist dies eine Peroxidase, so wird mit PBS gewaschen, handelt es sich dagegen um eine alkalische Phosphatase, so erfolgt der Waschschritt in TBST. Im Anschluss wird die Membran mit dem sekundären Antikörper für 1 h inkubiert. Der sekundäre Antikörper ist nach dem Tier zu wählen, aus dem die primären Antikörper gewonnen wurden. Der sekundäre Antikörper, und damit das konjugierte Enzym, bindet bei diesem Schritt an den primären Antikörper, wodurch eine Verstärkung erreicht wird. Die Visualisierung erfolgt bei einer Peroxidase durch Inkubation der Membran mit 4-Chlor-1-naphtol (1 ml / 10 ml) und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0,03%) in PBS-Puffer. Die Zielbanden färben sich dunkel. Die Färbung wird mit Wasser gestoppt. Wurde die alkalische Phosphatase benutzt, so erfolgt die Färbung in AP-Färbelösung bis Banden erscheinen. Gestoppt wird wiederum mit Wasser.

### 3.4.3 Test auf lösliche Expression

Nach der Transformation eines Plasmids, in welches eine Zielsequenz einligiert wurde, erfolgt der Expressionstest. Dazu wird eine 1,5 ml-Kultur in antibiotikahaltigen Medium (abhängig von den plasmidkodierten und genomischen Resistzenzen) bei der gewünschten Expressionstemperatur (meist 37°C) unter Schütteln angezogen. Sobald sich im Gefäß eine leichte Trübung zeigt, die Zellen also anwachsen, wird die Expression durch Zugabe von IPTG mit einer Endkonzentration von 1 mM induziert. Nach weiteren drei Stunden Inkubation wird die Kultur in einer Tischzentrifuge (4°C, 13000 rpm, 10 min, Biofuge Pico, Heraeus Kendro, Hanau) geerntet. Anschließend erfolgt der Aufschluss des, in 150 µl Zellaufschlusspuffer resuspendierten Pellets mittels Ultraschall Homogenisator (Bandelin Electronic, Berlin). Die lösliche und unlösliche Fraktion des Zellaufschlusses werden durch Zentrifugation (4°C, 13000 rpm, 10 min, Biofuge Pico, Heraeus Kendro, Hanau) getrennt. Nachdem das Pellet im, dem Überstand entsprechenden, Volumen resuspendiert wurde, werden je 20 µl der beiden Fraktionen mit 5 µl 5xSDS-Auftragspuffer versetzt und einer SDS-PAGE unterzogen. Durch Vergleich mit Proben einer nicht induzierten Kultur ist die Identifizierung der Expressionsbande des Zielproteins in der löslichen oder unlöslichen Fraktion auf dem Gel möglich.

### 3.4.4 UV-Spektroskopie

Die Protein- bzw. DNA-Konzentration, sowie der Anteil an Proteinaggregaten einer Lösung gehen aus dem Absorptionsspektrum im UV-Bereich hervor. Alle Messungen werden mit dem UV/VIS Spektrometer V550 (Jasco Corporation, Tokyo) in UV-Präzisionsküvetten (1 cm, Hellma, Mühlheim) durchgeführt.

#### 3.4.4.1 Bestimmung der Proteinkonzentration

Proteine absorbieren Licht im ultravioletten Bereich. Diese Absorption wird vor allem durch die aromatischen Aminosäuren Tryptophan ( $\lambda_{\text{max}} = 280 \text{ nm}$ ,  $\epsilon \approx 6000 \text{ l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ) und Tyrosin ( $\lambda_{\text{max}} = 275 \text{ nm}$ ,  $\epsilon \approx 1500 \text{ l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ), aber auch Phenylalanin ( $\lambda_{\text{max}} = 260 \text{ nm}$ ,  $\epsilon \approx 200 \text{ l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ) verursacht. Zur Bestimmung der Protein-Konzentration wird deshalb die Extinktion der Proteinlösung bei einer Wellenlänge von 280 nm ermittelt. Der Extinktionskoeffizient des Proteins lässt sich aus der Aminosäuresequenz mit Hilfe des Programms ProtParam (<http://www.expasy.org>).

org/tools/protparam.html) ermitteln. Die Proteinkonzentration wird nun mit Hilfe des Lambert-Beer'schen Gesetzes errechnet.

Lambert Beer'sches Gesetz:

$$E_{280} = \epsilon_{280} \cdot c \cdot d$$

$E_{280}$  Extinktion bei 280 nm

$\epsilon_{280}$  molarer Extinktionskoeffizient bei 280 nm

c Konzentration / M

d Schichtdicke der Küvette / cm

Zur Bewertung der Proteinlösung wird ein Spektrum der Extinktion zwischen 240nm und 340 nm aufgenommen welches mit dem Pufferspektrum im Programm *Spectra Analysis* (Jasco Corporation, Tokyo, J) korrigiert wird. Neben der Ermittlung der Proteinkonzentration erhält man auch Hinweise auf eventuelle Proteinaggregationen da diese Lichtstreuung und damit eine Absorption bei 320 nm verursachen. Das Absorptionsmaximum von DNA liegt bei 260 nm. Der Quotient aus der Absorption bei 280 nm und der bei 260 nm ist folglich ein Maß für die Verunreinigung der Proteinlösung durch DNA. Optimal sind Werte über 1,8.

#### **3.4.4.2 Konzentrationsbestimmung vor Sequenzierung von DNA**

Die Konzentration von DNA wird photometrisch in einer 200  $\mu$ l Quarzküvette bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt. Eine Absorption von 1,0 entspricht einer Konzentration von 50 ng/ $\mu$ l doppelsträngiger bzw. 37 ng/ $\mu$ l einzelsträngiger DNA. Durch Messung der Absorption bei 280 nm werden Verunreinigungen durch Proteine deutlich. Der Quotient aus den Absorptionen bei 260 nm und 280 nm sollte 1,8 nicht übersteigen. Sonstige Verunreinigungen der Lösung oder der Küvette werden bei 320 nm erfasst, da hier weder Proteine noch DNA eine Absorption hervorrufen. Sequenzierungen werden bei externen Dienstleistungsunternehmen in Auftrag gegeben.

### 3.4.5 Fluoreszenzspektroskopie zur Untersuchung der chemischen Stabilität

Zur Untersuchung der Proteinstabilität wird die chemische Denaturierung mit Harnstoff oder Guanidiniumhydrochlorid (GdnHCl) induziert und per Emissionspektrum am Fluoreszenzspektrometer FluoroMax-3 (Horiba Jobin Yvon, Unterhaching) verfolgt. Als Fluorophore kommen in Proteinen die Aminosäuren Tryptophan, Tyrosin und Phenylalanin vor. Die durch Phenylalanin verursachte Fluoreszenz kann jedoch aufgrund geringer Quantenausbeute und des niedrigen Extinktionskoeffizienten vernachlässigt werden. Als Anregungswellenlänge werden 280 nm bzw. 295 nm gewählt. Da Tyrosine bei 295 nm nicht mehr absorbieren, lassen sich durch Bestrahlung bei 295 nm selektiv Tryptophanreste anregen. Tyrosinfluoreszenz wird kaum detektiert, da bei räumlicher Nähe ein effektiver Energietransfer auf Tryptophan stattfindet. Die von Tyrosin absorbierte Lichtenergie wird also im nativen Protein teilweise auf Tryptophan transferiert und durch Tryptophan emittiert. Der Einfluss von Tyrosin auf die Gesamtfluoreszenz ergibt sich aus dem Vergleich des Emissionsspektrums bei einer Exzitationswellenlänge von 280 nm mit dem bei einer Anregungswellenlänge von 295 nm.

In dieser Arbeit wird die Proteineigenfluoreszenz durch Tryptophan- und Thyrosinreste bei 280 nm ( $\lambda_{\text{ex}}$ ) angeregt, während für die Tryptophanfluoreszenz die Exzitation bei einer Wellenlänge von 295 nm erfolgt. Das Spektrum der Emission wird zwischen 310 nm und 450 nm ( $\lambda_{\text{em}}$ ) detektiert. Die Integrationszeit beträgt 1 sec und die Spaltenbreiten für Anregungs- und Emissionswellenlänge liegen bei 2,5 nm. Die Messergebnisse werden um das Spektrum des Puffers korrigiert. Die Messtemperatur beträgt 25°C.

Für mittels GdnHCl oder Harnstoff induzierte Denaturierungsübergänge werden 25 $\mu$ g/ml Protein (in Heparin-Elutionspuffer) pro Ansatz eingesetzt. Die Proteinproben werden mit Denaturierungsmittel in einer Konzentrationsreihe versetzt. Die Endkonzentration wird in Stufen von 0,3 M zwischen 0 M und 8 M GdnHCl bzw. 0 M und 9 M Harnstoff eingestellt. Zur Einstellung des Gleichgewichts werden die Ansätze drei Tage bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend erfolgt die Messung im Fluoreszenzspektrometer.

### 3.4.6 Circulardichroismus (CD)-Spektroskopie

Der Circulardichroismus ist eine spektroskopische Methode. Sie wird zur Messung der optischen Aktivität asymmetrischer Moleküle in Lösung verwendet (Schmid, 1989). Hierbei werden eine rechts- und eine linkszirkulare Lichtwelle gleicher Intensität zu linear polarisiertem Licht überlagert. Zirkular polarisiertes Licht besteht aus zwei orthogonal linear polarisierten Lichtstrahlen, die  $90^\circ$  phasenverschoben überlagert sind (Woody RW, 1996). Der elektrische Vektor rotiert innerhalb einer Wellenlänge um  $360^\circ$ , so dass die Spitze des Vektors bei rechtszirkular polarisiertem Licht eine rechtsgängige Helix in Lichtrichtung beschreibt. An asymmetrischen optischen Zentren wird links und rechts zirkular polarisiertes Licht unterschiedlich stark absorbiert. Es entsteht elliptisch polarisiertes Licht. Das vom Gerät gelieferte Signal, die Elliptizität  $\Theta$  in Abhängigkeit von der Wellenlänge  $\lambda$ , wird nach der Messung in die molare Elliptizität  $[\Theta]$  umgerechnet:

$$[\Theta] = \frac{\Theta \cdot M}{10 \cdot c \cdot d \cdot 1000}$$

Dabei wird die Schichtdicke  $d$  in cm angegeben, während  $c$  die molare Konzentration und  $M$  das Molekulargewicht darstellt. Da das Gerät Messwerte für die Elliptizität in mGrad liefert, die molare Elliptizität jedoch in der Einheit  $\text{Grad} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{dmol}^{-1}$  angegeben wird, erklären sich die Faktoren im Nenner.

In Proteinen sind  $\alpha$ -Helices und  $\beta$ -Faltblätter chirale und deshalb optisch aktive Strukturen. Im Fern-UV Bereich (170-250 nm) absorbiert vor allem die Peptidbindung. Somit lassen sich aus dem Spektrum Rückschlüsse auf die Sekundärstruktur des Proteins ziehen. Nah-UV-CD-Spektren (250-310 nm) sind auf die Absorption der aromatischen Aminosäuren zurückzuführen. Sie reagieren sehr empfindlich auf Änderungen in der Tertiärstruktur eines Proteins.

Zur Aufnahme der Fern-UV-CD-Spektren wurde im verwendeten Messgerät J-815 (Jasco Corporation, Tokyo, J) die Elliptizität in mGrad in einer 0,1 cm-Küvette bei 30°C und einer Proteinkonzentration zwischen 0,1 mg/ml und 1 mg/ml gemessen. Der bevorzugte Puffer ist 20mM NaPi, pH 7. Fern-UV-Spektren werden zwischen 180 nm und 250 nm für das native Protein und im Bereich von 212 nm bis 250 nm für denaturiertes Protein aufgenommen. Die Bandbreite beträgt 1 nm, die Scangeschwindigkeit 100 nm/min. Alle 0,1 nm wird ein Wert gesammelt. Alle Spektren werden mit den entsprechenden Pufferspektren korrigiert. Je 10 Spektren werden akkumuliert. Zur Auswertung wird die Software *Spectra-Manager* (Jasco

Corporation, Tokyo, J) verwendet, welche auch Referenzspektren zur Abschätzung des Sekundärstrukturgehalts enthält.

#### **3.4.7 Untersuchung der thermischen Stabilität (Aggregationsübergang)**

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 werden mit einer Endkonzentration von 0,1 mg/ml in Puffer T verdünnt. Die Messungen werden am UV/VIS Spektrometer V650 (Jasco Corporation, Tokyo, J) mit thermostatisierbarem Küvettenhalter durchgeführt. Es kommen Küvetten mit Rührkammer zum Einsatz. Die Temperatursteuerung erfolgt mittels des Programms *Temp.-Scan (Melting) Measurement* (Jasco Corporation, Tokyo, J). Die Messung der Extinktion bei 360 nm erfolgt im Temperaturbereich von 20°C bis 95°C bei einer Heizrate von 1°C/min.

#### **3.4.8 Proteaseverdau**

Proteasen sind Enzyme, die Peptide oder Proteine durch Hydrolyse der Peptidbindung spalten können. Getestet werden Thrombin, Plasmin und V8-Protease, die am Einsatzort eines potentiellen Therapeutikums vorkommen können. Thrombin gehört zur Familie der Serinproteasen und ist durch die Spaltung von Fibrinogen zu Fibrin mit der Blutgerinnungskaskade assoziiert. Plasmin gehört ebenfalls zu den Serinproteasen und ist durch die Spaltung von Fibrin an der Auflösung von Gerinseln beteiligt. Die V8 Protease ist eine Serinprotease aus dem *Staphylococcus aureus* Stamm V8.

Zur Proteolyse wird 1 mg/ml Protein mit 50 µg/ml Thrombin, 5 µg/ml V8-Protease bzw. 50 µg/ml Plasmin bei Raumtemperatur oder 30°C inkubiert. Zu verschiedenen Zeitpunkten werden Proben zu je 10 µl entnommen, mit 10 µl 2 x SDS-Auftragspuffer versetzt und sofort 10 min bei 95°C gekocht. Der Proteinabbau wird über SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (3.4.1) visualisiert.

## 3.5 Funktionstestung

### 3.5.1 Zellbindetests

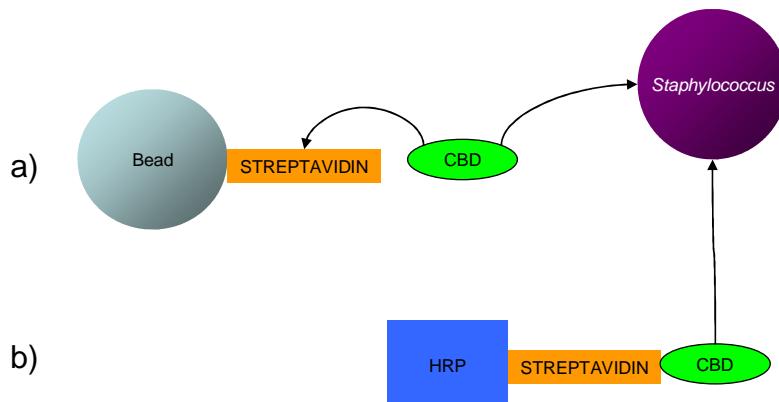
#### 3.5.1.1 Peroxidasetest

Im Peroxidasetest wird die Bindung von Zellwandbindedomänen (*cell wall binding domain*, CBD) aus Endolysinen an Zellen indirekt über eine Enzymreaktion nachgewiesen. Hierzu werden Proteine mit N-terminalem *Strep-tag* verwendet. Platten mit 96 Vertiefungen (*wells*) (2 ml) mit V-förmigem Boden (Fisher Scientific GmbH, Schwerte) werden über Nacht bei Raumtemperatur oder eine Stunde bei 37°C mit 600 µl PBST pro well blockiert. Anschließend werden 200 µl Zellkultur (Übernachtkultur) bzw. Medium als Kontrolle mit je 25 µl Proteinlösung (Konzentration ca. 100 µg/ml) bzw. Puffer als Kontrolle 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. In dieser Zeit können die CBDs an die Zellen binden. Alle Ansätze werden dreifach angesetzt. Es folgt ein Zentrifugationsschritt (Multifuge 3 SR, Heraeus Kendro, 4°C, 3600 rpm, 10 min). Der Überstand wird verworfen. Nach Resuspension der Pellets in 200 µl PBST wird die Zentrifugation wiederholt. Ungebundenes Protein wird über diesen Waschschritt entfernt. Das erhaltene Pellet wird nun in 200 µl Streptactin HRP (Streptactin-horse radish peroxidase-Konjugat 1:5000 in PBST) resuspendiert und 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Peroxidase bindet nun über Streptactin an den *Strep-tag* der, an die Zellen gebundenen, CBDs (Abb. 3.2b). Nach erneuter Zentrifugation und zweimaligem Waschen mit je 200 µl PBST folgt der colorimetrische Nachweis der zellgebundenen Proteine über die Aktivität der an die Proteine gebundenen Peroxidase. Hierzu werden die Pellets in 200 µl ABTS-Reaktionslösung resuspendiert. Die Enzymreaktion verursacht einen Farbumschlag. Nach erneuter Zentrifugation wird der Überstand in eine klare 96 well Platte mit flachem Boden (Nunc GmbH & Co. KG, Langenselbold) überführt. Die Absorptionsmessung erfolgt bei einer Wellenlänge von 600 nm in einem ELISA-Reader (Sunrise™ platereader, Tecan Deutschland GmbH, Crailsheim).

#### 3.5.1.2 Zellbindetest mit magnetischen Beads

Mit Hilfe von magnetischen, mit Streptactin beschichteten Beads können Proteine mit *Strep-tag* gebunden werden (Abb. 3.2a). Dies wird zum Nachweis der Bindung von CBDs an Zellen genutzt. 10 µg CBDs mit N-terminalem *Strep-tag* werden mit 10<sup>4</sup> Zellen (in PBST) in Ansätzen á 500 µl 20 min bei Raumtemperatur inkubiert, um die Bindung der Proteine an die Zellen zu ermöglichen. Nach Zugabe von 200 µl

Magnetbeads (10 mg/ml, MicroCoat Biotechnologie GmbH, Bernried) folgt eine weitere Inkubation für 45 min bei Raumtemperatur im Rollator. Während dieser Zeit binden die Proteine über den *Strep-tag* an die beschichteten Magnetbeads. Mittels Magneten werden die Beads und damit die an sie über CBDs gebundenen Zellen am Boden des Reaktionsgefäßes gesammelt. Der Überstand wird abgenommen. Die Beads werden mit je 1 ml PBST gewaschen. Nach erneuter Magnetseparation wird der Überstand abpipettiert und mit dem vorherigen Überstand vereint. Hierin befinden sich nun die nicht gebundenen Zellen. Die wieder in 1 ml PBST aufgenommenen Beads und der gepoolte Überstand werden 1:10 in PBST verdünnt. 50 µl der Verdünnungsstufen 0 ( $10^3$  Zellen) und -1 ( $10^2$  Zellen) werden auf Caso-Agar ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Zur Auswertung wird die Anzahl der Kolonien aus gebundenen und nicht gebundenen Zellen verglichen.



**Abb. 3.2** Prinzip von a) Beadsbindetest und b) Peroxidasetest. CBD Zellwandbindedomäne, HRP horse radish peroxidase.

### 3.5.2 Test der lytischen Aktivität

#### 3.5.2.1 Aktivitätstest auf Agarplatten

Auf Agarplatten können verschiedene Eigenschaften des Proteins untersucht werden. Dazu gehören die bakterizide und bakteriostatische Wirksamkeit ebenso wie die Fähigkeit der Lyse hitzeinaktivierter Zellen. Auch wird der Plattenlysetest zum *Screening* auf aktive Klone benutzt.

##### Screening

Falls ein Protein löslich exprimiert wird kann ein *Screen* auf Aktivität erfolgen. Hierzu werden die zu testenden Klone auf die Agarplatte mit eingegossenen Zielzellen aufgebracht. Der Agar enthält 1 mM IPTG und 100 µg/ml Ampicillin. Durch das Antibiotikum wird auf plasmidhaltige Klone selektiert, so dass das Plasmid nicht verloren geht. Die Expression des Zielproteins wird durch IPTG induziert. Da während der Koloniebildung von *E.coli* auch Zellen sterben kommt es zur Freisetzung geringer Mengen des plasmidkodierten Proteins. Ist das Protein aktiv werden die Zielzellen lysiert, was einen klaren Lysehof um die Kolonie des betreffenden Klons verursacht.

Umgekehrt kann auch auf Verbesserung der Löslichkeit eines aktiven Proteins gescreent werden, da nur löslich exprimierte Proteine freigesetzt werden, wohingegen in *inclusion bodies* befindliche Proteine ihre Aktivität nicht entfalten können.

##### Lyse hitzeinaktivierter Zellen

Statt lebender Zellen können auch Zellwände eingegossen werden. Proteine, welche hier Lysezonen verursachen sind also nicht auf die Zellteilung angewiesen.

##### Bakteriostatische Wirkung von Proteinen

Zur Visualisierung der bakteriostatischen Aktivität eines Proteins werden 300 µl einer Übernachtkultur in 10 ml LB-Topagar eingegossen. Auf den festen Agar wird Proteinlösung verschiedener Konzentrationen aufgetropft und nach Trocknung erfolgt die Inkubation bei 30°C über Nacht. Aktive Proteine verhindern das Zellwachstum, so dass klare Zonen im Bakterienrasen entstehen.

#### Bakterizide Wirkung von Proteinen

Bakterizid wirkende Proteine bewirken Zelllyse und verursachen damit klare Zonen auf einem Bakterienrasen. Die zu testende Proteinlösung wird in verschiedenen Konzentrationen auf einen Bakterienrasen getropft. Nach Trocknung und Inkubation über Nacht bei 30°C erfolgt die Auswertung.

#### **3.5.2.2 Flüssiglysetest**

##### Zelllysetest

Der Flüssigzelllysetest wird zur schnellen Bestimmung der spezifischen Aktivität von Proteinen genutzt.

Eine Übernachtkultur der zu lysierenden Zellen wird 1:10 in BHI Medium verdünnt und für ca. eine Stunde bei 37°C schüttelnd inkubiert. Die Absorption der Zellkultur wird bei 600 nm Wellenlänge im Photometer (Ultrospec 10, Amersham Biosciences, Freiburg) gemessen (= optische Dichte bei 600 nm = OD<sub>600</sub>). Liegt die OD<sub>600</sub> zwischen 0,7 und 1 befinden sich die Zellen in der exponentiellen Wachstumsphase und können per Zentrifugation (Multifuge 3, Rotor 6441, Heraeus, 4°C, 4500 rpm, 10min) geerntet werden. Die Resuspension des Zellpellets erfolgt je nach Test in Lysepuffer (½ TBS + 2 mM CaCl<sub>2</sub>), Medium oder Serum. Nach Einstellung der OD<sub>600</sub> auf 1 und Inkubation der Zellsuspension für 30 min bei Raumtemperatur erfolgt der Test in 1,5 ml halbmikro Einmal-Küvetten (Brand GmbH + Co KG, Wertheim) im UV/VIS Spektrometer V550 (Jasco Corporation, Tokyo, J) bei 30°C mit dem Programm *Parallel Kinetics Measurement* (Jasco Corporation, Tokyo, J). Nach Zugabe von aktivem Protein werden die Zellen lysiert, was ein Absinken der OD<sub>600</sub> verursacht. Es wird eine Pufferkontrolle mitgeführt. Zur Ermittlung der spezifischen Aktivität wird aus der Lysekinetik die Abnahme der Absorption pro Minute ermittelt und durch die eingesetzte Proteinmenge in mg dividiert.

$$\text{spez. Aktivität} = \frac{|d\text{Abs}_{600}|}{\text{min} \times \text{mg}}$$

Eine OD<sub>600</sub> von 1 entspricht im Falle von *Staphylococcus aureus* etwa einer Zellzahl von 10<sup>9</sup> Zellen/ml. Sinkt die Absorption auf 1% der Anfänglichen, so wurden 99% der Zellen lysiert. Dies bedeutet, dass immer noch 10<sup>7</sup> Zellen vorhanden sein können. Mit dieser Methode lässt sich also die Geschwindigkeit, nicht aber die Vollständigkeit der Zelllyse beobachten.

#### Zellwandlysetest

Der Beschriebene Test kann auch mit Zellwandpräparationen (3.1.8), deren  $OD_{600}$  ebenfalls auf 1 eingestellt wird, durchgeführt werden. Bei Durchführung des Tests in 96-well-Platten mit anschließender Auswertung und im ELISA-Reader (Sunrise™ platereader, Tecan Deutschland GmbH, Crailsheim) wird in dieser Arbeit vom ELISA-Zellwandlysetest gesprochen.

#### **3.5.2.3 Bestimmung der minimalen bakteriziden Konzentration**

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

Alle verwendeten Gefäße, Puffer, Medien, Seren und Proteinlösungen müssen steril sein um Kontaminationen und damit eine Verfälschung des Ergebnisses zu vermeiden. Zur Vorbereitung des Tests werden  $10^9$  cfu/ml in der exponentiellen Wachstumsphase befindliche Zielzellen ( $OD_{600} = 0,8$  bis 1) abzentrifugiert (Multifuge 3, Rotor 6441, Heraeus, 4°C, 4500 rpm, 5 min) und im selben Volumen Lysepuffer, Medium oder Serum mit 10 mg/ml BSA aufgenommen. Die Zellsuspension wird anschließend auf  $10^5$  cfu/ml verdünnt. Unmittelbar vor dem Test wird eine Verdünnungsreihe der Proteine von 500 µg/ml in sechs Schritten á 1:10 bis 0,5 ng/ml angelegt (Verdünnungspuffer: PBS mit 10mg/ml BSA). Neun Teile Zelllösung werden mit einem Teil Proteinlösung versetzt, 60 min stehend bei 30°C inkubiert und anschließend auf LB-Agar ausplattiert. Es werden stets Doppelansätze plattiert und Pufferkontrollen zu jedem Protein mitgeführt. Nach Inkubation bei 37°C über Nacht erfolgt die Auswertung. Die tatsächlich eingesetzte Zellzahl kann aus einer Pufferkontrolle ermittelt werden. Von der ermittelten Anzahl der koloniebildenden Einheiten pro ml (cfu/ml) wird der Logarithmus zur Basis 10 gebildet. Die Reduktion des Logarithmus im Vergleich zum Logarithmus der Kontrolle wird gegen die Proteinkonzentration aufgetragen. Nun kann die Überlebensrate in % und damit die entsprechende Proteinkonzentration (MBC90%, MBC99%, MBC99,9% etc.) ermittelt werden.

#### **3.5.2.4 Bestimmung der minimalen inhibitorischen Konzentration**

Die minimale inhibitorische Konzentration (*minimal inhibitory concentration*, MIC) gibt die Konzentration einer Substanz an, bei der das Wachstum der Zielzellen verhindert wird.

Auch hier kommen nur sterile Gefäße und Lösungen zum Einsatz. Zellen und Protein werden analog zur MBC-Bestimmung (3.5.2.3) vorbereitet. In einer Polystyrolplatte mit 96 Vertiefungen (Nunc GmbH & Co. KG, Langenselbold) werden 180 µl Zelllösung vorgelegt und mit 20 µl Proteinlösung bzw. Puffer versetzt. Nach mindestens 24-stündiger, stehender Inkubation bei 30°C erfolgt die Absorptionsmessung im ELISA-Reader (Sunrise™ platereader, Tecan Deutschland GmbH, Crailsheim) bei einer Wellenlänge von 600 nm. Die MIC bezeichnet die Proteinkonzentration, bei der gerade noch kein Anstieg der OD<sub>600</sub> erkennbar ist.

## 3.6 Bioinformatische Methoden

In dieser Arbeit werden folgende Programme verwendet:

| Programm           | Adresse   | Nutzung  |
|--------------------|---|--|
| BLAST              | <a href="http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi">http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi</a>   | Homologiesuche, Domänen suche  |
| Chromas            | <a href="http://www.technelysium.com.au">www.technelysium.com.au</a>  | Analyse von DNA-Sequenzierungen  |
| ClustalW2          | <a href="http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html">http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html</a>   | Alignment von Aminosäure- oder Nukleotidsequenzen  |
| DLP-SVM            | <a href="http://www.tuat.ac.jp/~domserv/cgi-bin/DLP-SVM.cgi">http://www.tuat.ac.jp/~domserv/cgi-bin/DLP-SVM.cgi</a>                                     | Vorhersage von Linkerbereichen zwischen Proteindomänen                                   |
| GOR                | <a href="http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_gor4.html">http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_gor4.html</a> | Sekundärstrukturvorhersage von Proteinen   |
| NEBcutter          | <a href="http://tools.neb.com/NEBcutter2/index.php">http://tools.neb.com/NEBcutter2/index.php</a>   | Schnittstellen von Restriktionsendonukleasen   |
| Peptide Cutter     | <a href="http://www.expasy.ch/tools/peptidecutter/">http://www.expasy.ch/tools/peptidecutter/</a>   | Auffinden von Protease-Erkennungssequenzen   |
| PDBviewer          | <a href="http://spdbv.vital-it.ch/">http://spdbv.vital-it.ch/</a>   | Tertiärstruktur-Modeling   |
| ProtParam          | <a href="http://www.expasy.org/tools/protparam.html">http://www.expasy.org/tools/protparam.html</a>   | Proteineigenschaften (Sequenzlänge, isoelektrischer Punkt, Extinktionskoeffizient, etc.) |
| Reverse Complement | <a href="http://www.bioinformatics.org/sms/rev_comp.html">http://www.bioinformatics.org/sms/rev_comp.html</a>   | Ermittlung der umgekehrten, komplementären Nukleotidsequenz                              |
| Translate          | <a href="http://www.expasy.org/tools/dna.html">http://www.expasy.org/tools/dna.html</a>   | Aminosäuresequenzermittlung aus Nucleotidsequenz   |

## 4 Ergebnisse und Diskussion

### 4.1 Isolation lytischer Bakteriophagen

Für die Suche nach lytisch aktiven Proteinen wurden zwei Quellen gewählt. Zum einen lytische Bakteriophagen und zum anderen Prophagen, welche im Genom ihres Wirts integriert sind.

Da Bakteriophagen in der Lage sind ihren Wirt zu lysieren, wurden zuerst solche mit lytischer Aktivität gegen den Zielorganismus *Staphylococcus aureus* isoliert (3.1.1). Die Umweltproben hierfür stammten aus den Zuläufen lokaler Kläranlagen (Etterzhausen, Geiselhöring, Hemau, Laaber, Pfatter, Regensburg, Sinzing, Undorf, Wörth). Die Phagen wurden über mindestens drei Runden vereinzelt. Anschließend erfolgte die Bestimmung des Phagentiters (3.1.2). Es konnten zehn Bakteriophagen isoliert werden, welche in Tab. 4.1, unter Angabe des Wirts, der Plaquemorphologie, des erreichten Phagentiters und der Quelle aufgeführt wurden. *Staphylococcus spec.* lysierende Phagen wurden Pitti benannt, konserviert (3.1.3) und in der Phagensammlung archiviert.

**Tab. 4.1** Isolierte lytische Staphylokokken-Phagen mit Wirtsstamm (incl. Nr. in Profos Culture Collection), Plaquemorphologie (Größe, Transparenz, Form des Plaquerandes), Phagentiter und Quelle der Umweltprobe (Ortschaft, der jeweiligen Kläranlage).

| Phage    | Wirt  | Plaque-Typ                 | pfu / ml                         | Quelle                            |
|----------|-------|----------------------------|----------------------------------|-----------------------------------|
| Pitti 17 | S1548 | <i>Staph. haemolyticus</i> | mittel, klar, kleiner weißer Hof | $4 \times 10^8$ Wörth 3           |
| Pitti 18 | S1549 | <i>Staph. haemolyticus</i> | klein, klar, glatt               | $6 \times 10^8$ Wörth 3           |
| Pitti 19 | S1549 | <i>Staph. haemolyticus</i> | klein, klar, glatt               | $3 \times 10^8$ Regensburg 3 b)   |
| Pitti 20 | S1546 | <i>Staph. epidermidis</i>  | klein, leicht trüb, fransig      | $9 \times 10^9$ Regensburg 3 a)   |
| Pitti 21 | S1546 | <i>Staph. epidermidis</i>  | mittel, leicht trüb, fransig     | $2 \times 10^9$ Regensburg 3 b/a) |
| Pitti 22 | S1546 | <i>Staph. epidermidis</i>  | klein, leicht trüb, fransig      | $9 \times 10^9$ Laaber 3a)        |
| Pitti 23 | S459  | <i>Staph. aureus</i>       | mittel, klar, glatt              | $3 \times 10^{11}$ Pfatter 1      |
| Pitti 24 | S1515 | <i>Staph. aureus</i>       | mittel, leicht trüb, mit Hof     | $2 \times 10^7$ Pfatter 1         |
| Pitti 25 | S459  | <i>Staph. aureus</i>       | klein, klar, glatt               | $2 \times 10^{10}$ Regensburg 1   |
| Pitti 26 | S1515 | <i>Staph. aureus</i>       | klein, klar, glatt               | $7 \times 10^{10}$ Regensburg 1   |

Im Anschluss wurde das Wirtsspektrum der isolierten Phagen bestimmt (3.1.4), welches in Tab. 4.2 dargestellt ist. Hierzu fanden sowohl *Staphylococcus aureus* Stämme, als auch koagulase-negative Staphylokokken Verwendung. Außerdem wurden, zur Untersuchung der Spezifität der isolierten Bakteriophagen, andere gram-positive Bakterien, wie Enterokokken und Bazillen, sowie gram-negative Bakterien wie Salmonellen und *Escherichia coli* getestet.

## 4 Ergebnisse und Diskussion

**Tab. 4.2** Wirtsspektrum der isolierten Phagen.

(-) keine Plaques, (+) einige Plaques, (++) viele Plaques, (+++) sehr viele Plaques, (Zahl) Anzahl der Plaques, falls weniger als 10, (ProCC) Profos Culture Collection, (S) Stamm, (P) Pitti

| Spezies                          | ProCC | P 17 | P 18 | P 19 | P 20 | P 21 | P 22 | P 23 | P 24 | P 25 | P 26 |
|----------------------------------|-------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| <i>Staph. haemolyticus</i>       | S27   | +    | +    | +    | +++  | +++  | +++  | -    | -    | +++  | +++  |
| <i>Staph. warneri</i>            | S430  | +++  | +++  | +++  | ++   | -    | ++   | -    | -    | ++   | ++   |
| <i>Staph. aureus</i>             | S456  | -    | -    | -    | -    | -    | -    | ++   | -    | +++  | +++  |
| <i>Staph. aureus</i>             | S457  | -    | -    | -    | -    | -    | -    | +++  | -    | +++  | +++  |
| <i>Staph. aureus</i>             | S458  | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | +++  | +++  |
| <i>Staph. aureus</i>             | S459  | ++   | -    | -    | -    | -    | -    | +++  | 9    | ++   | ++   |
| <i>Staph. aureus</i>             | S460  | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | +    | ++   |
| <i>Staph. aureus</i>             | S461  | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | +++  | +++  |
| <i>Staph. aureus</i>             | S462  | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    |
| <i>Staph. aureus</i>             | S463  | -    | -    | -    | -    | -    | -    | ++   | -    | ++   | ++   |
| <i>Staph. epidermidis</i>        | S1191 | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | ++   | ++   |
| <i>Staph. equorum</i>            | S1192 | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | ++   | ++   |
| <i>Staph. equorum</i>            | S1423 | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    |
| <i>Staph. equorum</i>            | S1426 | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    |
| <i>Staph. sciuri</i>             | S1427 | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    |
| <i>Staph. saprophyticus</i>      | S1429 | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    |
| <i>Staph. sciuri</i>             | S1430 | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    |
| <i>Staph. epidermidis</i>        | S1503 | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    |
| <i>Staph. epidermidis</i>        | S1508 | -    | -    | -    | -    | +    | ++   | +    | ++   | ++   | ++   |
| <i>Staph. haemolyticus</i>       | S1509 | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    |
| <i>Staph. epidermidis</i>        | S1510 | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    |
| <i>Staph. haemolyticus</i>       | S1511 | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    |
| <i>Staph. simulans</i>           | S1512 | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | +++  | +++  |
| <i>Staph. aureus</i>             | S1513 | -    | -    | -    | -    | -    | -    | +++  | ++   | ++   | ++   |
| <i>Staph. aureus</i>             | S1514 | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | ++   | ++   |
| <i>Staph. aureus</i>             | S1515 | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | +    | +++  | +++  |
| <i>Staph. aureus</i>             | S1516 | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | +++  | +++  |
| <i>Staph. aureus</i>             | S1517 | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | +++  | +++  |
| <i>Staph. aureus</i>             | S1518 | +++  | -    | -    | -    | -    | -    | +++  | -    | ++   | ++   |
| <i>Staph. aureus</i>             | S1519 | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | +++  | ++   |
| <i>Staph. aureus</i>             | S1520 | -    | -    | -    | -    | -    | -    | 7    | ++   | +++  | +++  |
| <i>Staph. epidermidis</i>        | S1546 | -    | -    | 2    | +    | ++   | ++   | +    | -    | ++   | ++   |
| <i>Staph. epidermidis</i>        | S1547 | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    |
| <i>Staph. haemolyticus</i>       | S1548 | +++  | ++   | -    | ++   | ++   | +++  | -    | -    | -    | -    |
| <i>Staph. haemolyticus</i>       | S1549 | +++  | ++   | +++  | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    |
| <i>Staph. aureus</i>             | S1550 | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    |
| <i>Staph. aureus</i>             | S1551 | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | ++   | ++   |
| <i>Enterococcus faecalis</i>     | S17   | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    |
| <i>Enterococcus faecium</i>      | S880  | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    |
| <i>Enterococcus faecalis</i>     | S1552 | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    |
| <i>Bacillus subtilis</i>         | S310  | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    |
| <i>Bacillus mycoides</i>         | S328  | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    |
| <i>Bacillus cereus</i>           | S332  | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    |
| <i>Bacillus thuringiensis</i>    | S471  | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    |
| <i>Macrococcus caseolyticus</i>  | S1425 | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    |
| <i>Salmonella Kottbus SZ 423</i> | S479  | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    |
| <i>Escherichia coli</i>          | S5    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    |

Das breiteste Wirtsspektrum zeigten die Phagen Pitti25 und Pitti26. Die isolierten Phagen waren alle spezifisch für Organismen der Gattung *Staphylococcus*.

## 4.2 Screening nach Endolysinen

Aus den isolierten Bakteriophagen wurde die DNA isoliert (3.2.1). Diese wurde anschließend, mittels *GenomiPhi DNA Amplification Kit* (Amersham Biosciences, Uppsala), unspezifisch amplifiziert (3.2.2). Für die sich anschließende Shot-Gun Klonierung (3.2.7) wurden DNA Fragmente direkt aus dem GenomiPhi-Ansatz oder nach Restriktionsverdau mit *TaqI* bzw. *EcoRI* (3.2.5.1) verwendet. Die Fragmente wurden hierbei *blunt end* in den Vektor pST Blue-1 Blunt (Novagen, Darmstadt) ligiert. Es folgte die Transformation in kompetente Zellen (Nova Blue Singles, Novagen, Darmstadt). Die Identifizierung plasmidhaltiger Klone erfolgte auf LB-Agar mit 50µg/ml Ampicillin, 12,5µg/ml Tetracyclin, 70µg/ml 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galactopyranoside (X-Gal) und 80µM Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid (IPTG) per Blau-Weiß-Screening (3.2.8). Positive Klone wurden dann in einer *colony*-PCR (3.2.3.1), zusammen mit den Primern T7-Promotor und U19mer, welche die Insertionsstelle des Vektors flankierten, eingesetzt. Amplifikate mit einer Größe von über 500 Basenpaaren wurden ansequenziert (Entelechon GmbH, Regensburg). Die erhaltenen Sequenzen wurden mit blastx (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez/>) auf Homologien zu bekannten Amidasen, Muramidasen, Endopeptidasen, Transglycolasen bzw. Glucosaminidasen hin untersucht. Homologe Sequenzen wurden per *primer-walk* vollständig sequenziert, mittels spezifischer PCR amplifiziert, in pET21a ligiert und in HMS174(DE3) transformiert.

Im Falle des *Staphylococcus aureus* USA 300 MLST type 8, welcher den Prophagen  $\phi$ SA2usa enthält, wurde in der veröffentlichten Sequenz (Diep *et al.*, 2006) eine Endolysinsequenz identifiziert. Gegen diese wurden Klonierungsprimer erstellt, so dass das Endolysin direkt per PCR aus der bakteriellen DNA gewonnen werden konnte. Die erhaltenen Wildtyp-Proteine wurden in Tab. 4.3, unter Angabe des Phagen, aus welchem sie isoliert wurden und dessen Wirt, aufgelistet. Die Ergebnisse der nachfolgend durchgeführten Expressions- und Flüssiglysetests wurden ebenfalls in Tab. 4.3 aufgeführt. Die gefundenen Homologien mit Angabe der Sequenzidentität auf Aminosäureebene finden sich in Tab. 4.4.

## 4 Ergebnisse und Diskussion

**Tab. 4.3** Im Screening erhaltene Wildtyp-Endolysine mit Wirt, Domänenaufbau, Expression, Lyseaktivität gegen *Staphylococcus*, sowie homologen Sequenzen. ProCC Profos Culture Collection, + niedrige, ++ mittelmäßige, +++ starke Lyse

| Endolysin  | Phage / ProCC         | Wirt / ProCC  | Domänen         | Expression     | Lyseaktivität  |
|------------|-----------------------|---|-----------------|----------------|--|
| Pitti20Ami | Pitti20 / P552        | <i>Staph.epidermidis</i> / S1546                                | Amidase_2-CBD   | gut, unlöslich | <i>Staph.epidermidis</i> + unvollständig   |
| Pitti24Ami | Pitti24 / P548        | <i>Staph.aureus</i> / S1515                                     | CHAP-CBD        | gut, unlöslich | nicht getestet   |
| Pitti26Ami | Pitti26 / P556        | <i>Staph.aureus</i> / S1515                                     | CHAP-Ami_2-SH3b | gut, unlöslich | <i>Staph. aureus</i> +++<br><i>Staph. haemolyticus</i> +<br><i>Staph. epidermidis</i> ++ |
| PlyObpf    | Prophage              | <i>Staph.aureus</i><br>Oberpf. Epidemiestamm<br>Nr.3039 / S2298 | CHAP-Ami_3-SH3b | gut, unlöslich | OD steigt im Lysetest<br>Zellaggregation   |
| Plyusa300  | Prophage<br>PhiSA2usa | <i>Staph.aureus</i> USA 300<br>MLST type 8 / S2297              | CHAP-Ami_3-SH3b | gut, unlöslich | OD steigt im Lysetest<br>Zellaggregation   |

**Tab. 4.4** Homologien der isolierten Endolysine.

| Endolysin  | Homologie + Identität auf Aminosäureebene   |
|------------|---|
| Pitti20Ami | N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase [ <i>Bacillus cereus</i> ATCC 14579] 39% in Amidase-Domäne   |
| Pitti24Ami | amidase [ <i>Staphylococcus</i> phage 44AHJD] 90%<br>amidase [ <i>Staphylococcus aureus</i> phage phiP68] 90%   |
| Pitti26Ami | amidase [ <i>Staphylococcus aureus</i> phage phi 11] 98%<br>endolysin [Bacteriophage phiMR11] 99%<br>amidase [ <i>Staphylococcus aureus</i> phage phiNM2] 97%       |
| PlyObpf    | peptidoglycan hydrolase [ <i>Staphylococcus aureus</i> phage phi 12] 97%<br>amidase (peptidoglycan hydrolase) [ <i>Staphylococcus aureus</i> bacteriophage PVL] 98% |
| Plyusa300  | peptidoglycan hydrolase [ <i>Staphylococcus aureus</i> phage phi 12] 97%<br>amidase (peptidoglycan hydrolase) [ <i>Staphylococcus aureus</i> bacteriophage PVL] 98% |

Die Endolysine exprimierten unlöslich und konnten deshalb nicht ohne weiteres gereinigt werden. Auch durch Verwendung verschiedener Expressionsstämme (BL21 (DE3), JM109, BL21 Codon Plus (DE3) RIL, Origami (DE3), M15) Koexpression von Chaperonen (GroES, GroEL, DnaJ, Dnak) und Expression bei unterschiedlichen Temperaturen (Raumtemperatur, 30°C, 37°C) konnte die Löslichkeit der Proteine nicht signifikant gesteigert werden. Deshalb wurde ein Protokoll zur Solubilisierung von *inclusion bodies* (4.3.1) und zur Rückfaltung (4.3.2) etabliert, wodurch die Renaturierung von aktiven Proteinen aus *inclusion bodies* möglich wurde.

Zur Messung der Zelllyseaktivität wurde ein Test mittels Turbiditätsmessung an Pitti26Ami auf *Staphylococcus aureus* (ProCC S1513) etabliert (4.3.3). Die schnellste Lyse von *Staphylococcus aureus* (auch MRSA) wurde mit Pitti26Ami erreicht.

### **4.3 Etablierung benötigter Verfahren**

Die Prozesse der Solubilisierung und der Rückfaltung wurden an Pitti26Ami und K9, im Rahmen einer Diplomarbeit (Knappe, 2007), optimiert und werden im Folgenden zusammenfassend dargestellt. Da sich die Messung und Auswertung der UV-Spektren zur Bestimmung der Proteinkonzentration als problematisch erwiesen, erfolgte die Evaluation der Solubilisierung und Rückfaltung über den Vergleich der lytischen Aktivitäten im Flüssiglysetest (3.5.2.2). Den Ausgangspunkt für die Optimierung bildete die Solubilisierung mit Puffer S und die anschließende Rückfaltung von Pitti26Ami in Puffer R.

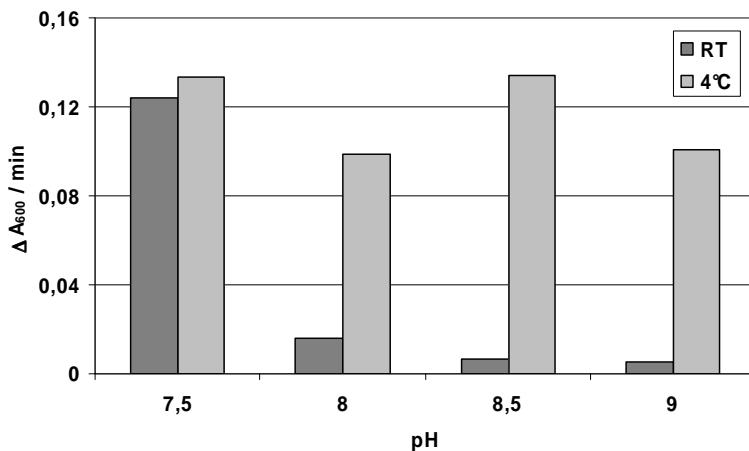
#### **4.3.1 Solubilisierung der *inclusion bodies***

Die rekombinanten Proteine Pitti26Ami und K9 wurden unlöslich in *inclusion bodies* exprimiert. Deshalb musste ein effizienter Solubilisierungsschritt gefunden werden, um möglichst hohe Ausbeuten an denaturiertem Protein zu erhalten. Anfangs wurde die Abhängigkeit der Proteinkonzentration im Solubilisierungspuffer von der GdnHCl-Konzentration untersucht. Durch Erhöhung der GdnHCl-Konzentration im Solubilisierungspuffer S, von 5,4 M auf 6,7 M konnte die Ausbeute an renaturiertem Pitti26Ami von 10% auf ca. 50% gesteigert werden. Da neben der weiteren Erhöhung der Ausbeute, auch eine Kostensenkung für die Produktion im Großmaßstab erzielt werden sollte, wurde ein alternativer Prozess zur Aufarbeitung der *inclusion bodies* gesucht. Aus Patentdaten (McCoy & Frost, 1988) und einem Bericht von Dr. Jörg Schäffner während eines Vortrags auf der *3rd Halle Conference on Recombinant Protein Production* ging hervor, dass sich Proteine, durch den Einsatz von Basen, effektiv aus *inclusion bodies* solubilisieren lassen. Daraufhin wurde die Solubilisierung in 1M NaOH mit anschließender Überführung in einen denaturierenden Puffer mit 8M Harnstoff auf Pitti26Ami angewendet. Im Vergleich mit der Solubilisierung mittels GdnHCl konnte nach anschließender Rückfaltung eine Aktivitätssteigerung um 88% erreicht werden. Diese Methode wurde daraufhin als Standardprotokoll etabliert (3.3.1.2).

### 4.3.2 Rückfaltung von Proteinen aus solubilisierten *inclusion bodies*

Nach erfolgreicher Optimierung des Prozesses zur Gewinnung denaturierter Proteine, erfolgte die Steigerung der Ausbeute an aktiven, renaturierten Proteinen. Da es sich bei Pitti26Ami um eine Zink-Metalloprotease (IUBMB Enzymnomenklatur: EC 3.5.1.28) handelt, wurde dem Rückfaltungspuffer Zink zugegeben. Zur Verhinderung der Bildung fehlerhafter Disulfidbrücken, wurden die Reduktionsmittel Glutathion,  $\beta$ -Mercaptoethanol und Dithioerythrol (DTE) getestet, wobei nur mit DTE eine Aktivität nach der Rückfaltung erhalten wurde. Unter Verwendung von DTE wurde jedoch die Bildung eines weißen Niederschlags festgestellt. Vermutlich kam es zur Reduktion des freien Sauerstoffs durch das Reduktionsmittel und schließlich zur Bildung von Zinkoxid (Knappe, 2007). Um die Zinkionen für das Protein verfügbar zu belassen, wurden die komplexbildenden Substanzen Imidazol, Natriumcitrat und (Ethylendiamintetraessigsäure) EDTA eingesetzt. Imidazol erwies sich als ein zu schwacher Komplexbildner, da der Niederschlag immer noch auftrat. Mit EDTA hingegen konnte nach der Rückfaltung keine Lyseaktivität mehr nachgewiesen werden, was auf eine zu starke Komplexierung der Zinkionen schließen ließ. Durch den Einsatz von Natriumcitrat konnte die Lyseaktivität um ca. 15% gesteigert werden. Nun wurden noch Konzentrationsuntersuchungen durchgeführt, welche mit 0,1 mM Zinksulfat, 10 mM DTE und 20 mM Natriumcitrat die besten Ergebnisse lieferten. Die Aggregatbildung kann, laut Literaturangaben (Charan *et al.*, 2004), während der Rückfaltung durch den Einsatz von L-Arginin verringert werden. Die in der Quelle gefundene lineare Abhängigkeit bis zu einer Arginin-Konzentration von 1 M konnte für Pitti26Ami nicht bestätigt werden. Hier zeigte sich das Aktivitätsmaximum nach Rückfaltung mit 300 mM L-Arginin.

Neben den Pufferbestandteilen wurde auch die Rückfaltung bei verschiedenen pH-Werten auf 4°C und auf Raumtemperatur (RT) untersucht (Abb. 4.1). Hierbei zeigte sich, bei Rückfaltung auf Raumtemperatur, eine starke Abhängigkeit der erhaltenen Aktivität vom pH-Wert. Die, bei 4°C erhaltenen Ausbauten waren pH-Wert-unabhängiger. Die Aktivitäten der, bei pH 7,5 renaturierten Proteine, waren, unabhängig von der Temperatur, etwa gleich hoch. Die Parameter Raumtemperatur und pH 7,5 wurden ins Standardrückfaltungsprotokoll aufgenommen.



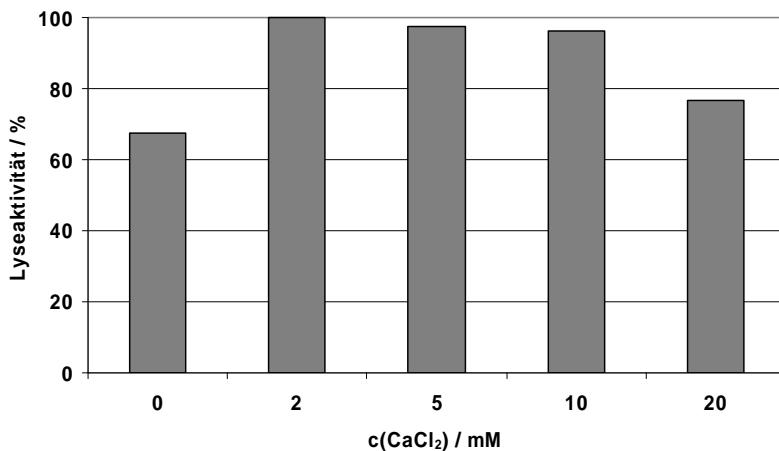
**Abb. 4.1** Absorptionsabnahme pro Minute im Flüssiglysetest gegen *Staphylococcus aureus* als Maß für die lytische Aktivität von Pitti26Ami nach der Rückfaltung bei verschiedenen pH-Werten auf Raumtemperatur (RT) bzw. 4°C.

Zur Kostensenkung wurde nun versucht, die Konzentration der puffernden Substanz Tris-HCl zu reduzieren. Eine 100%ige Aktivität blieb bis zu einer Konzentration von 5 mM Tris-HCl im Rückfaltungspuffer erhalten. Um eine ausreichende Pufferung zu gewährleisten, wurde die Tris-HCl-Konzentration auf 20 mM festgelegt.

Das etablierte Standardprotokoll (3.3.1.3) beinhaltete die Rückfaltung bei Raumtemperatur in RückfaltungspufferT (20 mM Tris-HCl, pH7,5, 300 mM L-Arginin, 20 mM Natriumcitrat, 0,1 mM ZnSO<sub>4</sub>, 10 mM DTE).

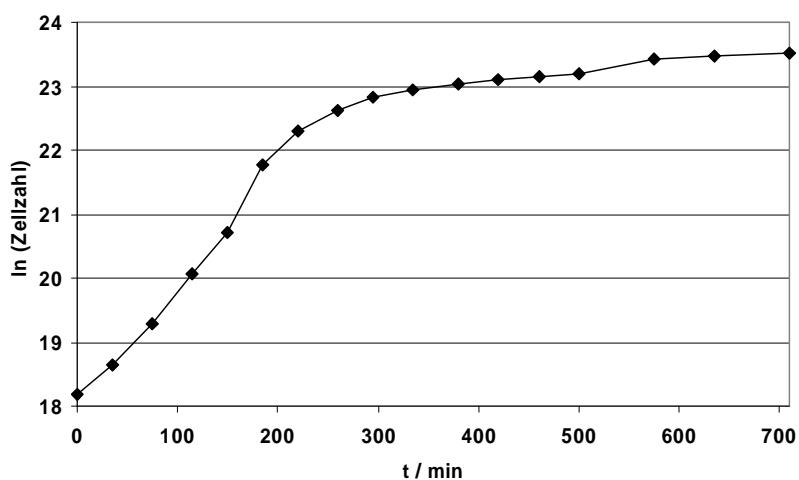
### 4.3.3 Optimierung des Flüssiglysetests an Pitti26Ami

Über Lyseaktivität und -geschwindigkeit eines Kandidatenproteins, in verschiedenen Medien oder Seren, sollte die, durch die Zelllyse verursachte Abnahme der Absorption, bei einer Wellenlänge von 600 nm, Auskunft geben. Die folgenden Tests erfolgten mit Pitti26Ami an *Staphylococcus aureus*. Der Lysetest wurde, im Hinblick auf die eventuelle systemische Anwendung, bei physiologischem pH-Wert von 7,4 durchgeführt. Der verwendete Puffer ½ TBS enthielt 60 mM NaCl, was der Hälfte der NaCl-Konzentration im Blutkreislauf entspricht. Auf diese Weise wurde eine hypotone Umgebung der Zellen geschaffen und damit die Zelllyse erleichtert. In physiologischem Puffer konnte ebenfalls Lyse detektiert werden, wobei die Lysekinetiken langsamer waren. Mit der halbphysiologischen NaCl-Konzentration konnten auch Proteine mit einer schwächeren Aktivität untersucht werden. Nun wurden verschiedene Ionen getestet, wobei nur die Variation der Konzentration an Ca<sup>2+</sup>-Ionen einen signifikanten Einfluss auf die Lysegeschwindigkeit hatte (Abb. 4.2).



**Abb. 4.2** Absorptionsabnahme pro Minute bei der Lyse von *Staphylococcus aureus* mit 100 µl Pitti26Ami-Rückfaltungsansatz bei verschiedenen CaCl<sub>2</sub>-Konzentrationen.

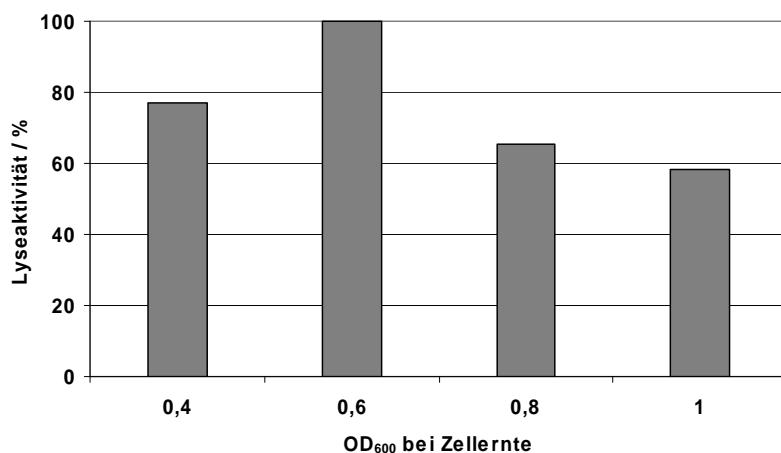
Die schnellste Zelllyse konnte mit 2 mM CaCl<sub>2</sub> erreicht werden. Im Vergleich zur Lyse ohne Calcium wurde eine Erhöhung der Geschwindigkeit um ca. 50% beobachtet (Abb. 4.2). Nun wurde noch die Wachstumsphasenabhängigkeit der Lyse untersucht. Dafür erfolgte die Aufnahme einer Wachstumskurve von *Staphylococcus aureus* (3.1.6). Dazu wurde der Logarithmus der Zellzahl in Abhängigkeit von der Zeit aufgezeichnet (Abb. 4.3).



**Abb. 4.3** Wachstumskurve von *Staphylococcus aureus*.

Die Steigung in der exponentiellen Wachstumsphase wurde zwischen 75min und 185min ermittelt und beträgt  $0,02208192 \text{ min}^{-1}$ . Mit der Formel  $t \approx \frac{0,69}{K}$  konnte eine Generationszeit von 31 min ermittelt werden.

Zur Bestimmung der Abhängigkeit der Lyseaktivität von der Wachstumsphase der zu lysierenden Zellen erfolgte die Ernte der *Staphylococcus aureus* Zellen bei einer optischen Dichte bei 600 nm ( $OD_{600}$ ) von 0,4, 0,6, 0,8 bzw. 1. Die Zellpellets wurden anschließend in  $\frac{1}{2}$  TBS, pH 7,4 mit 2 mM  $CaCl_2$  aufgenommen und die  $OD_{600}$  wurde auf 1 eingestellt. Aus dem sich anschließenden Flüssiglysetest konnte ermittelt werden, dass Zellen in der exponentiellen Wachstumsphase ( $OD_{600} = 0,6$ ) am effektivsten lysiert werden (Abb. 4.4). Unter Verwendung einer Übernachtkultur konnte keine Zelllyseaktivität von Pitti26Ami detektiert werden.



**Abb. 4.4** Lyseaktivität von Pitti26Ami gegen *Staphylococcus aureus* im Flüssiglysetest in Abhängigkeit von der Wachstumsphase der Zellen.

Die effektivste Lyse konnte während der exponentiellen Phase beobachtet werden. Hier liegt die höchste Zellteilungsrate vor. Als eine Erklärung dieses Phänomens ließe sich die bessere Zugänglichkeit der Endolysin-Bindestellen an der Zellwand während der Zellteilung anführen. Wahrscheinlich ist jedoch die Dicke der Zellwand am Septum nach der Zellteilung noch reduziert, so dass weniger Peptidoglycan hydrolysiert werden muss, um eine Lyse der Zellen zu erreichen. Außerdem wird die Zellwand während der Teilung auch von der cytosolischen Seite her durch Autolysine geschwächt.

Aufgrund dieser Ergebnisse wurde der Flüssiglysetest standardisiert, falls nicht anders beschrieben, in  $\frac{1}{2}$  TBS, pH 7,4 + 2 mM  $CaCl_2$  (= Lysepuffer) mit Zellen aus der exponentiellen Wachstumsphase durchgeführt (vgl. 3.5.2.2).

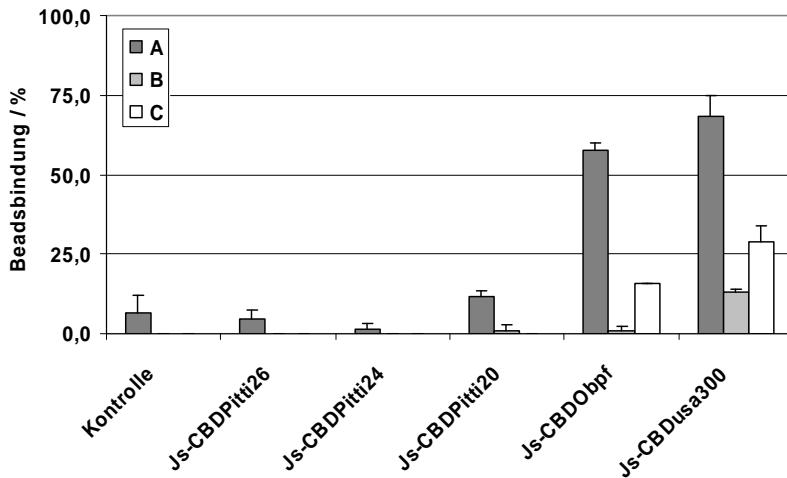
## 4.4 Charakterisierung einzelner Domänen

Zur weiteren Untersuchung wurden die Einzeldomänen der in 4.2 gefundenen Endolysine per BLAST-Analyse (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) identifiziert. Die Linkerregionen zwischen den einzelnen Proteindomänen wurden *in silico* mit dem Programm DLP (*domain linker prediction*) ermittelt (<http://www.tuat.ac.jp/~domserv/cgi-bin/DLP-SVM.cgi>). Nun konnten spezifische Klonierungsprimer erstellt werden, welche sich in den Linkerregionen anlagern können. Alle Proteine wurden über die Restriktionsschnittstellen *BamHI* und *Sall* in die Vektoren pET21a bzw. pET21d kloniert. Die CBDs exprimierten, zumindest zum Teil (ca. 60%), löslich und konnten über einen N-terminalen Js-Protein-Tag per Affinitätschromatographie mittels einer Streptavidinsäule (3.3.2.4) gereinigt werden. Der *in vivo* biotinylierte Js-Tag war neben der Reinigung auch für Bindeversuche notwendig. Amidase-Domänen mit N-terminalem NS-His-Proteintag konnten löslich exprimiert werden. CHAP-Domänen, sowie Kombinationen mit ihnen hingegen wurden unlöslich in *inclusion bodies* exprimiert und mussten solubilisiert und rückgefalten werden. Die unlösliche Expression der Endolysine wurde damit auf die CHAP-Domäne zurückgeführt.

### 4.4.1 Zellwandbindedomäne CBD

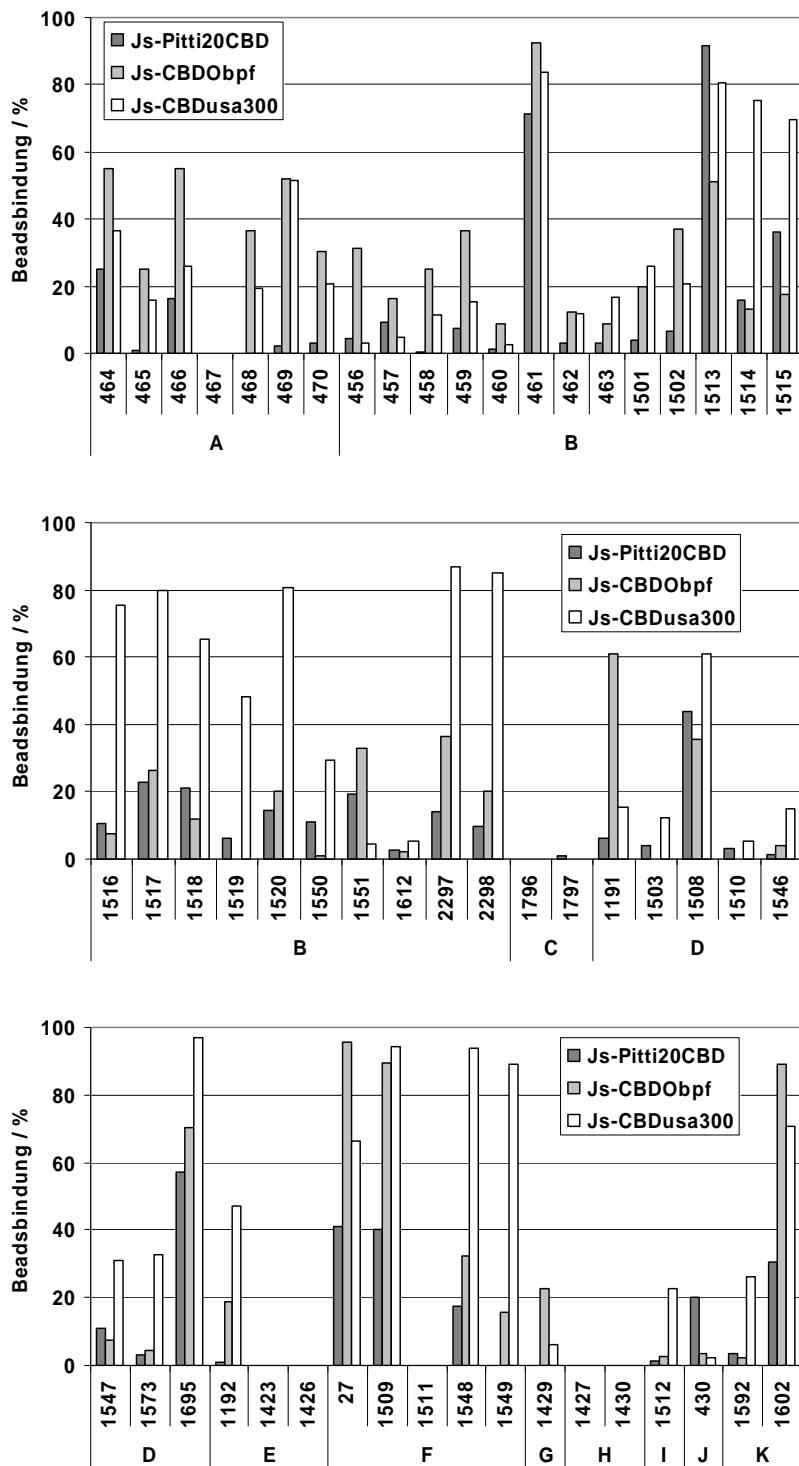
#### 4.4.1.1 Bindung an Staphylokokkenzellen

Für einen ersten Bindetest mit magnetischen Beads wurde je ein Vertreter der medizinisch relevanten Arten *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* und *Staphylococcus haemolyticus* ausgewählt (Abb. 4.5). Der Test wurde in Doppelansätzen, wie in Abschnitt 3.5.1.2 beschrieben, durchgeführt. Hierbei wurden  $10^4$  cfu/ml des jeweiligen Stammes mit Magnetbeads der Firma MicroCoat (MicroCoat Biotechnologie GmbH, Bernried) in einer Konzentration von 200 µg/ml inkubiert. Die zu testenden Zellwandbindedomänen, mit N-terminalem Js-Protein-Tag, wurden in einer Konzentration von 10 µg/ml eingesetzt.



**Abb. 4.5** Beadsbindetest von CBDs mit N-terminalem Js-Protein-Tag an drei *Staphylococcus* Arten. Angegeben ist der prozentuale Anteil gebundener Zellen an den insgesamt im Test eingesetzten Zellen. Es wurden  $10^4$  cfu/ml in PBST, pH 8 eingesetzt. Die Konzentration der Microcoat Magnetbeads betrug 200  $\mu$ g/ml, die der getesteten Proteine 10  $\mu$ g/ml. (A) *Staphylococcus aureus*, (B) *Staphylococcus epidermidis*, (C) *Staphylococcus haemolyticus*. Als Kontrolle wurde je ein Ansatz ohne Protein mitgeführt.

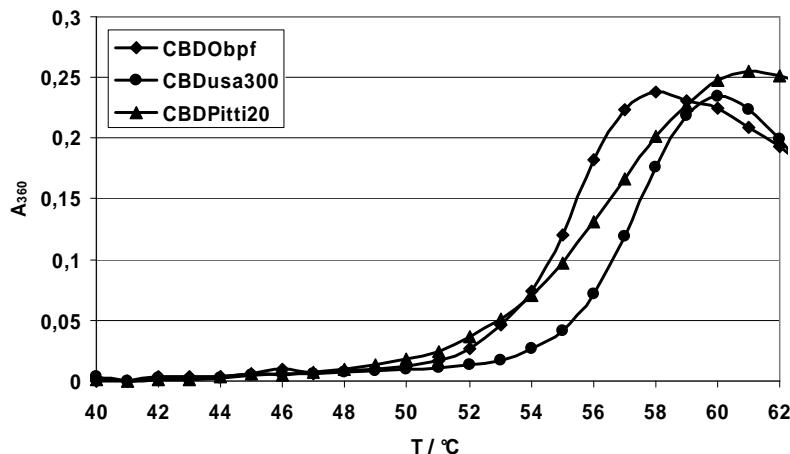
*Staphylococcus aureus* zeigte eine geringfügige unspezifische Bindung an die Magnetbeads. Zieht man diese unspezifische Bindung in Betracht, so konnten mit den CBDs aus Pitti24Ami und Pitti26Ami keine *Staphylococcus aureus* Zellen an die Beads gebunden werden. Die höchsten Bindungsraten wurden mit Js-CBDusa300 erreicht, gefolgt von Js-CBDObpf. Eine sehr schwache Bindung wurde auch bei Pitti20Ami beobachtet. Deshalb wurden nur für die Zellwandbindedomänen aus Pitti20Ami, PlyObpf und Plyusa300 die Spektren der gebundenen Stämme im Beadstest ermittelt (Abb. 4.6). Dieser Versuch sollte Auskunft über die Stärke und die Spezifität der Bindung der einzelnen CBDs geben. Aus der Testreihe ging hervor, dass die CBD aus Plyusa300 am stärksten an *Staphylococcus aureus* bindet.



**Abb. 4.6** Beadsbindetest von CBDs mit N-terminalem Js-Protein-Tag an verschiedenen *Staphylococcus* Stämmen. Nummern entsprechen der Stammnummer in der ProCC Culture Collection (ProCC). Angegeben ist der prozentuale Anteil gebundener Zellen an den insgesamt im Test eingesetzten Zellen. Es wurden  $10^4$  cfu/ml in PBST, pH 8 eingesetzt. Die Konzentration der Microcoat Magnetbeads betrug 200  $\mu$ g/ml, die der getesteten Proteine 10  $\mu$ g/ml. (A) Methicillin-resistenter *Staphylococcus aureus* (MRSA), (B) *Staphylococcus aureus*, (C) *Staphylococcus carnosus*, (D) *Staphylococcus epidermidis*, (E) *Staphylococcus equorum*, (F) *Staphylococcus haemolyticus*, (G) *Staphylococcus saprophyticus*, (H) *Staphylococcus sciuri*, (I) *Staphylococcus simulans*, (J) *Staphylococcus warneri*, (K) *Staphylococcus xylosus*.

#### 4.4.1.2 Thermische Stabilität

Neben dem Bindespektrum wurden Untersuchungen zur thermischen Stabilität der CBDs angestellt. Hierfür wurde die Aggregation der Proteine bei steigender Temperatur beobachtet (3.4.7). Abb. 4.7 zeigt den Aggregationsübergang der Zellwandbindedomänen aus Pitti20Ami, PlyObpf und Plyusa300.



**Abb. 4.7** Zunahme der Lichtstreuung durch Aggregatbildung der Proteine bei steigender Temperatur. Gemessen wurde die Absorption bei 360nm. Die Heizrate betrug 1°C/min.

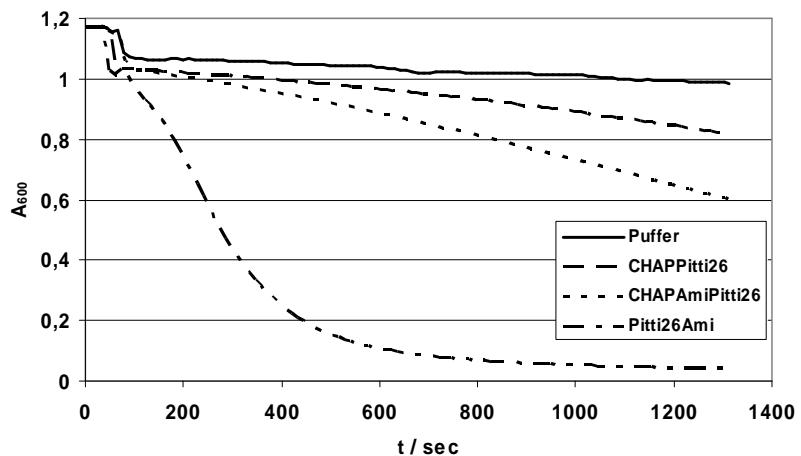
Der Startpunkt der Aggregation unterscheidet sich zwischen den getesteten CBDs nur geringfügig und liegt für Js-CBDPitti20 und Js-CBDObpf zwischen 51°C und 52°C. Js-CBDusa300 beginnt erst bei einer ca. 2°C höheren Temperatur mit der Aggregatbildung, was sowohl durch eine geringfügig höhere Stabilität als auch durch eine höhere Löslichkeit (und damit verminderter Aggregation) des Proteins verursacht werden könnte.

#### 4.4.2 Enzymatisch aktive Domänen EADs

##### 4.4.2.1 Lytische Aktivität

Pitti26Ami zeigte als einziges isoliertes Wildtyp-Endolysin eine lytische Aktivität gegen *Staphylococcus aureus* (Tab. 4.3). Deshalb wurden die EADs aus diesem Protein hinsichtlich ihrer lytischen Aktivität untersucht. Die Zelllyse in Lysepuffer wurde mittels Flüssiglysetest (3.5.2.2) beobachtet (Abb. 4.8). Dabei konnte jedoch weder bei der Kombination aus Amidase und CBD, noch bei der Amidase selbst eine OD<sub>600</sub>-Abnahme und damit eine Zelllyse beobachtet werden. Die CHAP-Domäne zeigte eine sehr langsame Zelllyse. Diese erhöhte sich bei Fusionierung von CHAP

und Amidase. Jedoch konnte erst mit dem Volllängenprotein Pitti26Ami eine deutliche Steigerung der Lysegeschwindigkeit gezeigt werden. Dies ist auf die Erhöhung der Substrataffinität durch die, im Endolysin enthaltene CBD zurückzuführen.



**Abb. 4.8** Flüssiglysetest in Lysepuffer gegen *Staphylococcus aureus* in Puffer unter Verwendung von 50 µg Protein.

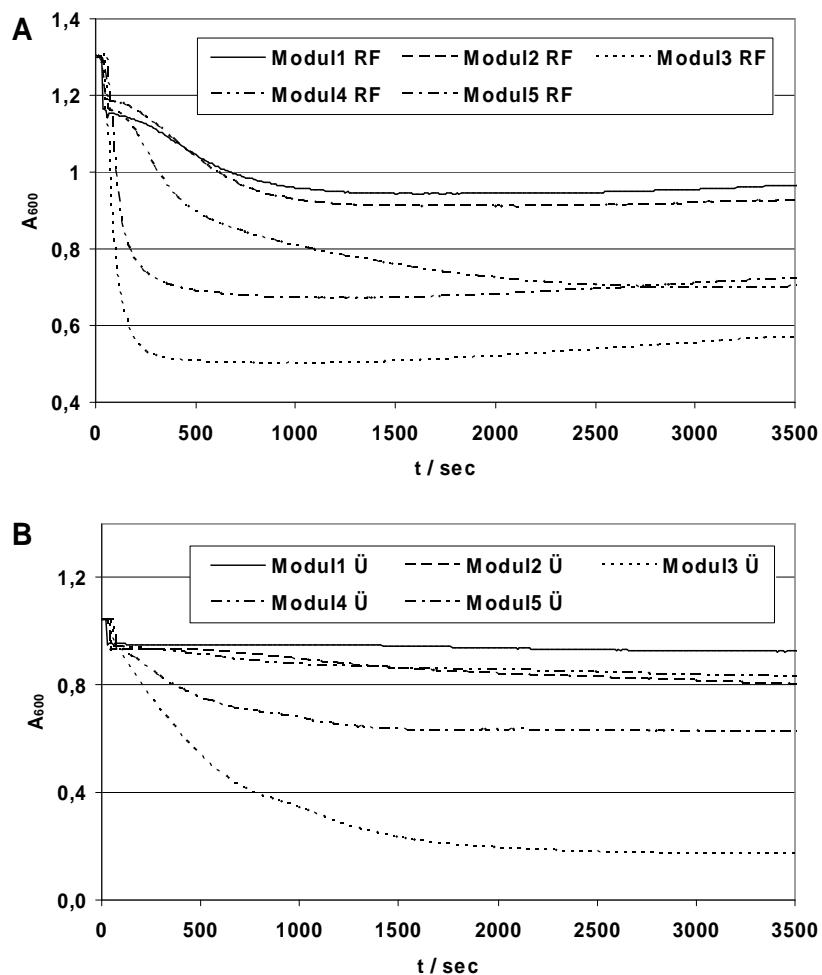
## 4.5 Verbesserung der Eigenschaften durch Domänenkombination

### 4.5.1 Modulshuffling

Bei Pitti26Ami, dem Protein mit der besten Aktivität im Lysetest, traten einige Probleme auf: So war eine niedrige Löslichkeit durch viele hydrophobe Aminosäuren (49,6%) und Aromaten (12,7%) festzustellen, was zu Problemen bei der Reinigung und einer niedrigen Rückfaltungsausbeute führte. Außerdem wurde bei Tests zur Stabilität gegen die, am Einsatzort eines potentiellen Therapeutikums vorhandenen Proteasen Thrombin und Plasmin (Blutgerinnungskaskade) und der im *Staphylococcus aureus* Stamm V8 vorkommenden Endopeptidase Glu-C (V8 Protease), ein Abbau von Pitti26Ami festgestellt. Durch den modularen Aufbau der Endolysine sollte die Kombination von Domänen unterschiedlicher Wildtypproteine zur Verbesserung der Eigenschaften genutzt werden. Als Domänenspender fanden die Eigenisolate Pitti20Ami, Pitti26Ami, PlyObpf und Plyusa300 Verwendung. Zur Fusionierung wurden, über Primer, *SacI*- bzw. *Sall*-Restriktionsschnittstellen in die Linkerregionen eingeführt. Zur Herstellung der gewünschten Kombinationen konnten die entsprechenden Amplifikate mit den Restriktionsenzymen verdaut (3.2.5.1) und ligiert (3.2.5.2) werden. Die Module wurden nun über die Schnittstellen *Ncol/BamHI* in pET14b kloniert und in HMS174(DE3) transformiert (3.2.6). Nach der Expression im 0,5 l -Maßstab (3.1.5) folgte die *inclusion body* Reinigung (3.3.1.1), Solubilisierung (3.3.1.2) und Rückfaltung (3.3.1.3). Anschließend wurde die Lyseaktivität der Überstände nach dem Zellaufschluss und der rückgefalteten Proteine gegen *Staphylococcus aureus* im Flüssiglysetest (3.5.2.2) in Lysepuffer ermittelt. Tab. 4.5 zeigt die klonierten Domänenkombinationen, welche als „Module“ bezeichnet wurden. Die Flüssiglysetests sind in Abb. 4.9 gezeigt.

**Tab. 4.5** Durch Domänenkombination klonierte Module.

| Name    | Domänen                            |
|---------|------------------------------------|
| Modul 1 | CHAPpitti26-AmidaseCBDplyOpf       |
| Modul 2 | CHAPpitti26-pitti20Ami (Volllänge) |
| Modul 3 | CHAPAmidasepitti26-CBDplyusa300    |
| Modul 4 | CHAPplyOpf-AmidaseCBDpitti26       |
| Modul 5 | CHAPAmidasepitti26-CBDpitti20      |



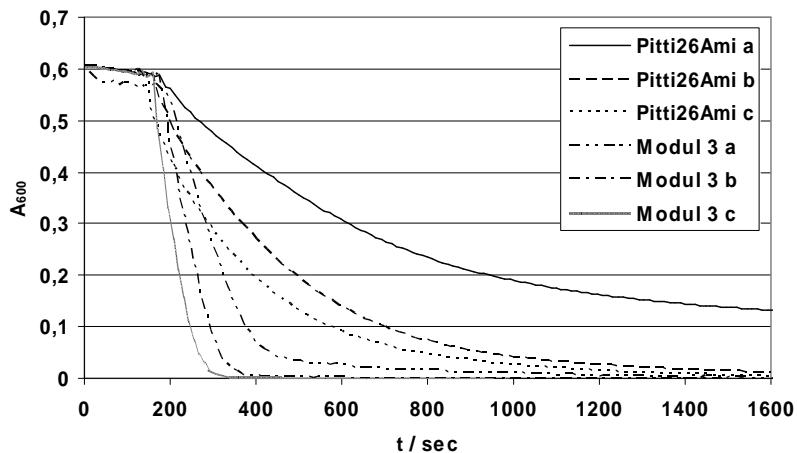
**Abb. 4.9** Absorptionsabnahme bei 600 nm im Flüssiglysetest gegen *Staphylococcus aureus* in Lysepuffer. Einsatz von (A) 100 µl Rückfaltungsansatz bzw. (B) 100 µl Überstand nach Zellaufschluss. Das Gesamtvolumen pro Ansatz betrug 1 ml. RF Rückfaltungsansatz, Ü Überstand nach dem Zellaufschluss.

Die Rückfaltungsansätze der Module 3, 4 und 5 zeigten die schnellste Lyse. Modul 3 scheint eine höhere Löslichkeit als die anderen Module aufzuweisen, da hier die schnellste und vollständigste Zellyse, auch im Expressionsüberstand beobachtet wurde. Modul 3 stellte sich also als das Konstrukt mit der besten Aktivität in beiden Fraktionen heraus. Deshalb wurde Modul 3 als Kandidatenprotein für einen antimikrobiellen Wirkstoff gegen *Staphylococcus aureus* ausgewählt und näher untersucht.

### 4.5.2 Untersuchungen an Modul 3

#### 4.5.2.1 Lyseaktivität

Um das Potential von Modul 3 zur Zelllyse mit dem von Pitti26Ami zu vergleichen, wurde ein Flüssiglysetest (3.5.2.2) gegen *Staphylococcus aureus* mit verschiedenen Proteinkonzentrationen in Lysepuffer durchgeführt (Abb. 4.10).

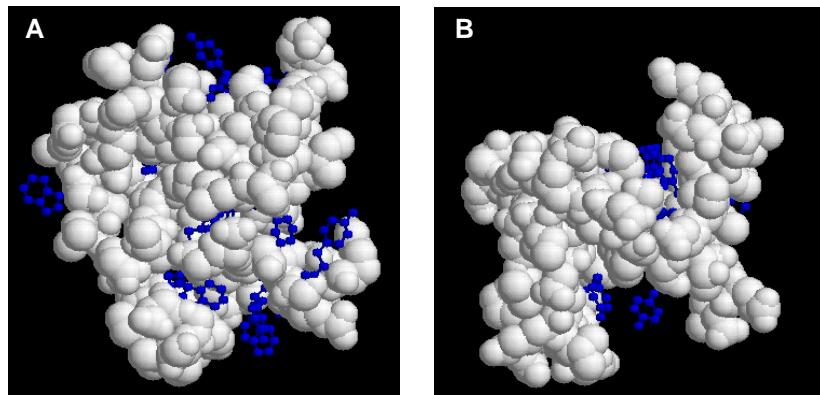


**Abb. 4.10** Absorptionsabnahme bei 600 nm im Flüssiglysetest gegen *Staphylococcus aureus* in Lysepuffer. Vergleich der Lyseaktivität von Pitti26Ami und Modul 3. Es wurden jeweils (a) 2 µg/ml, (b) 5 µg/ml und (c) 10 µg/ml Protein eingesetzt.

Hierbei wurde die deutlich gesteigerte Aktivität von Modul 3 im Vergleich zu Pitti26Ami deutlich. Beispielsweise konnte mit 2 µg/ml Modul 3 eine schnellere Lyse der *Staphylococcus aureus* Zellen erreicht werden, als mit 10 µg/ml Pitti26Ami (Abb. 4.10).

#### 4.5.2.2 Löslichkeit

Modul 3 unterscheidet sich vom Wildtyp-Endolysin nur durch die Zellbindedomäne. Für die beiden CBDs wurden Strukturmodelle mit markierten, oberflächenexponierten aromatischen Aminosäuren, an der Struktur der CBD von ALE-1 (PDB: 1r77) mit dem Programm 3D-JIGSAW erstellt (Abb. 4.11). Außerdem wurden die Proteineigenschaften mittels ProtParam (<http://www.expasy.org/tools/protparam.html>) ermittelt (Tab. 4.6).

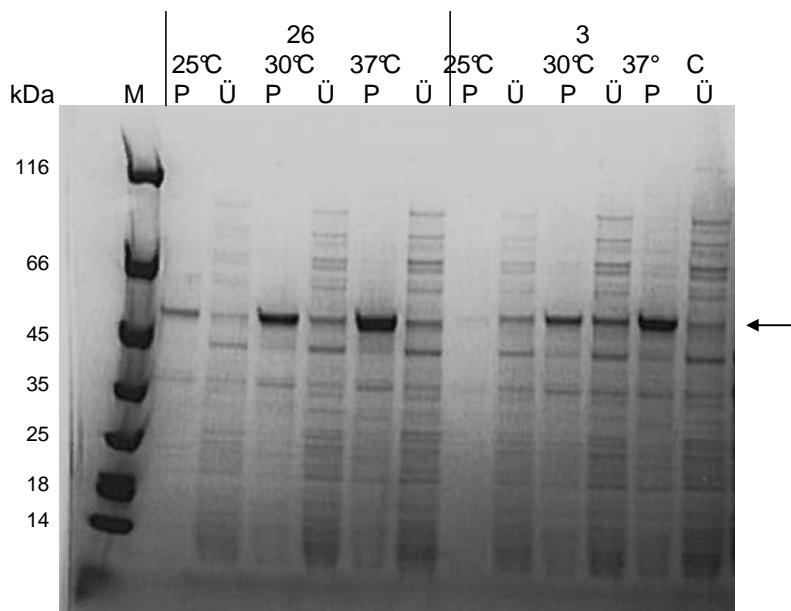


**Abb. 4.11** Modelle der Zellbindedomänen von (A) Pitti26Ami und (B) Plyusa300 im Vergleich. Die oberflächenexponierten, aromatischen Aminosäuren sind blau dargestellt.

**Tab. 4.6** Ausgewählte Proteineigenschaften der CBDs aus Pitti26Ami und Plyusa300.

|                           | <b>CBDpitti26</b> | <b>CBDusa300</b> |
|---------------------------|-------------------|------------------|
| Aminosäuren               | 98                | 101              |
| Molekulargewicht          | 11352,7           | 11091,3          |
| Theoretischer pl          | 6,54              | 9,48             |
| Abs 0,1% (=1 g/l)         | 3,604             | 1,705            |
| hydrophobe AS (FLPIMVAWG) | 49,0%             | 44,6%            |
| Aromaten(FYW)             | 17,4%             | 11,9%            |

An den Modellen ist gut zu erkennen, dass im Falle der CBDpitti26 mehr aromatische Aminosäuren oberflächenexponiert vorliegen als bei der CBDusa300. Dies spiegelt sich auch im Extinktionskoeffizienten der beiden Domänen wieder (Tab. 4.6). Zur Untersuchung der Löslichkeit erfolgte die Anzucht der Klone *Escherichia coli* HMS174(DE3)-pET14b-Pitti26Ami und *Escherichia coli* HMS174(DE3)-pet14b-Modul 3 im 1 ml - Maßstab bei 25°C, 30°C und 37°C. Nach Induktion mit 1 mM IPTG und weiterer Inkubation für 3 h auf der jeweiligen Temperatur wurden die Zellen durch Zentrifugation (Tischzentrifuge, 13000rpm, 4°C) geerntet. Es folgte der in 3.4.3 beschriebene Löslichkeitstest. Die Proben wurden anschließend per SDS-PAGE (3.4.1) analysiert. Die Löslichkeit des Vollängenproteins konnte durch die Verwendung der CBDusa300 etwas gesteigert werden: So wurde Modul 3 beispielsweise bei 25°C zu über 95% löslich exprimiert, während Pitti26Ami bei dieser Expressionstemperatur nur zu maximal 15% löslich vorlag (Abb. 4.12). Bei 37°C hingegen, wurden beide Proteine unlöslich in *inclusion bodies* exprimiert.



**Abb. 4.12** Vergleich der Löslichkeit von (26) Pitti26Ami und (3) Modul 3. Die Höhe der Expressionsbanden wurde durch einen Pfeil gekennzeichnet. Weiterhin wurden die Expressionstemperaturen angegeben. (M) Protein-Größenstandard, (P) Pellet nach Zellaufschluss, (Ü) Überstand nach Zellaufschluss.

Die höhere Löslichkeit und bessere Lyseaktivität von Modul 3 konnte auch in einem etablierten Plattenlysetest (3.5.2.1 / Screening) gezeigt werden. Hierbei wurden hitzeinaktivierte *Staphylococcus* Zellen in LB-Topagar mit Ampicillin und Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid (IPTG) eingegossen. Auf diese „Lyseplatten“ konnten dann *Escherichia coli* Zellen aufgebracht werden. Da auf dem Plasmid eine Ampicillin-Resistenz codiert war, wurde durch das Antibiotikum auf plasmidhaltige Klone selektiert. Die Freisetzung von löslich exprimiertem Protein erfolgte durch Absterben der *Escherichia coli* Zellen in der stationären Wachstumsphase. Die Lyseplatten wurden nach über Nacht-Inkubation bei 37°C ausgewertet. Freigesetzte, aktive Proteine verursachten einen klaren Lysehof um die entsprechenden Klone. Tab. 4.7 zeigt das Ergebnis dieses Tests.

**Tab. 4.7** Inclusivity Testung Pitti26Ami & Modul 3 mittels Plattenlysetest. – kein, + kleiner, ++ mittlerer und +++ großer Lysehof

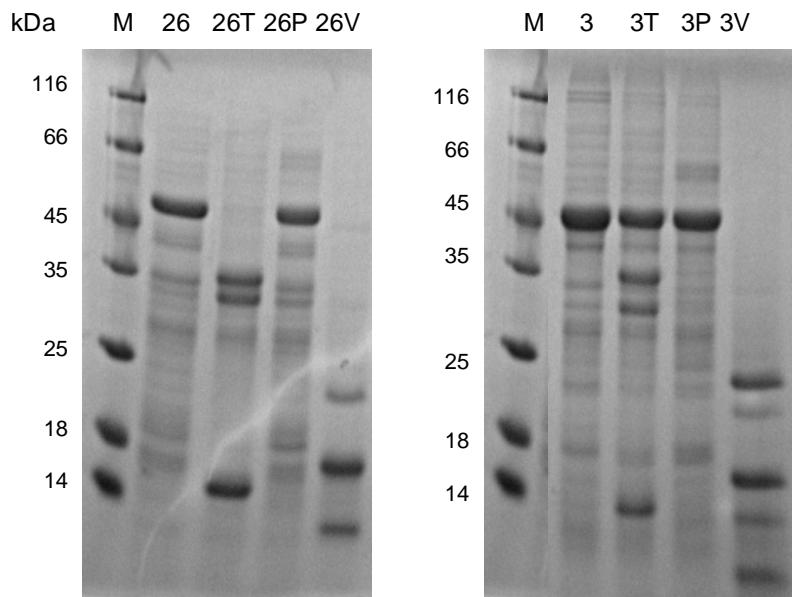
| ProCC-Nr. | <i>Staphylococcus</i> ... | Pitti26 | Modul 3 |
|-----------|---------------------------|---------|---------|
| S462      | <i>S. aureus</i>          | +++     | +++     |
| S460      | <i>S. aureus</i>          | ++      | +++     |
| S1516     | <i>S. aureus</i>          | +++     | +++     |
| S459      | <i>S. aureus</i>          | +++     | +++     |
| S457      | <i>S. aureus</i>          | +++     | +++     |
| S456      | <i>S. aureus</i>          | +++     | +++     |
| S1519     | <i>S. aureus</i>          | +++     | +++     |
| S463      | <i>S. aureus</i>          | +++     | +++     |
| S1551     | <i>S. aureus</i>          | ++      | +++     |
| S1517     | <i>S. aureus</i>          | +++     | +++     |
| S458      | <i>S. aureus</i>          | +++     | +++     |
| S1550     | <i>S. aureus</i>          | ++      | ++      |
| S467      | <i>S. aureus</i> MRSA     | +       | +++     |
| S469      | <i>S. aureus</i> MRSA     | +++     | +++     |
| S468      | <i>S. aureus</i> MRSA     | +++     | +++     |
| S1573     | <i>S. epidermidis</i>     | -       | +++     |
| S1508     | <i>S. epidermidis</i>     | +++     | +++     |
| S1510     | <i>S. epidermidis</i>     | +++     | +++     |
| S1546     | <i>S. epidermidis</i>     | +       | +++     |
| S27       | <i>S. haemolyticus</i>    | +       | +++     |
| S1548     | <i>S. haemolyticus</i>    | +       | +++     |
| S1509     | <i>S. haemolyticus</i>    | -       | +++     |
| S1549     | <i>S. haemolyticus</i>    | +       | +++     |
| S1429     | <i>S. saprophyticus</i>   | -       | +++     |
| S1512     | <i>S. simulans</i>        | ++      | +++     |

Modul 3 zeigte ein breiteres Lysespektrum als das Wildtyp-Endolysin Pitti26Ami. Beide Proteine besitzen eine identische EAD. Trotzdem konnten durch Modul 3 einige Stämme lysiert werden, welche durch Pitti26Ami nicht sichtbar beeinflusst wurden. Dies lässt sich mit der unterschiedlichen Substratspezifität oder -affinität der CBDs begründen. Weiterhin wurden mit Modul 3 auf vielen Stämmen größere Lysehöfe beobachtet, als bei der Verwendung von Pitti26Ami. Als Begründung kann eine effektivere Substratbindung durch CBDusa300, eine höhere Löslichkeit des Gesamtproteins Modul 3 oder eine bessere Diffusion von Modul 3 im Agar angeführt werden.

### 4.5.2.3 Proteasestabilität

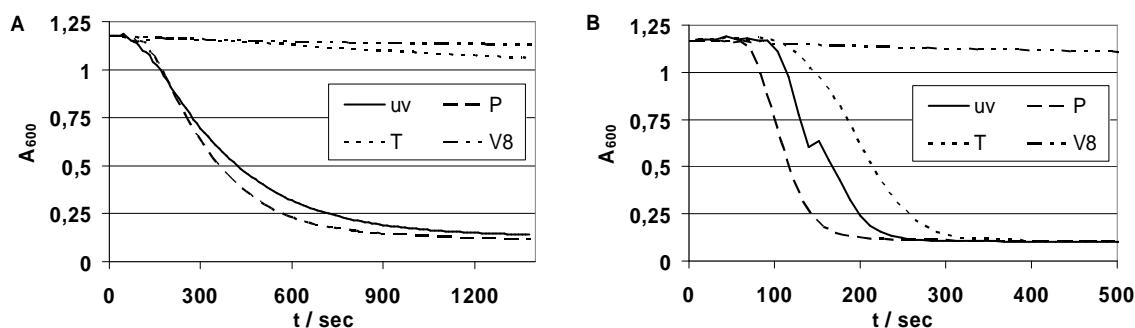
Obwohl bei Modul 3 keine Veränderung der CHAP-Ami\_2 Domänen im Vergleich zu Pitti26Ami vorgenommen wurde, konnte in Modul 3 nur ein schwacher Proteaseverdau mit Thrombin (3.4.8) festgestellt werden. Der Ansatz enthielt hierbei 1 mg/ml des zu verdauenden Proteins, sowie 50 µg/ml Plasmin oder Thrombin, bzw. 5 µg/ml V8-Protease. Der Verdau erfolgte bei RT über Nacht. Die Erkennungssequenz für Thrombin liegt in der Linkerregion zwischen CHAP und Ami\_2 Domäne

und ist in Pitti26Ami zugänglich, da es zum Abbau kam. Der deutlich schlechtere Abbau von Modul 3 durch Thrombin weist auf eine sterische Abschirmung der Erkennungssequenz durch die neu angefügte CBD hin (Abb. 4.13).



**Abb. 4.13** Proteaseverdau von (26) Pitti26Ami und (3) Modul 3 mit (T) Thrombin, (P) Plasmin und (V) V8-Protease. M Protein-Größenstandard. Der Verdau erfolgte über Nacht bei Raumtemperatur.

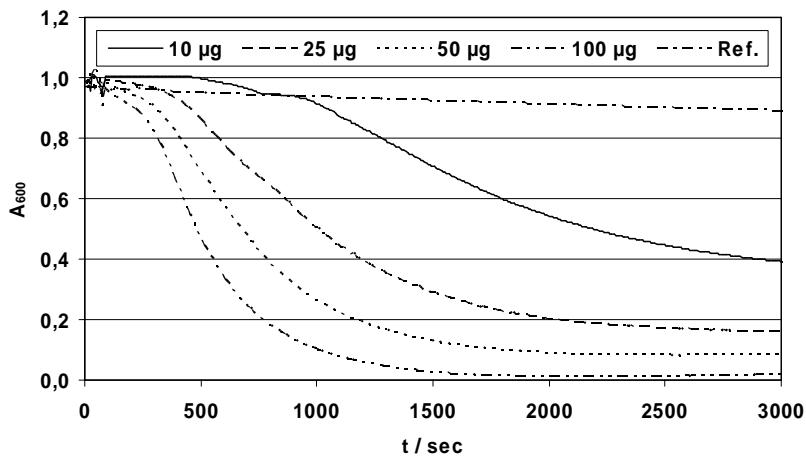
Im Flüssiglysetest (3.5.2.2) wurden 10 $\mu$ l der Verdau-Ansätze auf Aktivität gegen 990 $\mu$ l Zellsuspension von *Staphylococcus aureus* untersucht (Abb. 4.14). Während Pitti26Ami durch Thrombinverdau die komplette Aktivität verlor, konnte im Falle von Modul 3, auch nach Thrombinverdau, lytische Aktivität festgestellt werden. Beide Proteine zeigen Resistenz gegenüber Plasminverdau und sind V8-Protease-sensitiv.



**Abb. 4.14** Lyseaktivität gegen *Staphylococcus aureus* nach Proteaseverdau von (A) Pitti26Ami und (B) Modul3 durch (P) Plasmin, (T) Thrombin und (V8) V8-Protease. Zum Vergleich wurden die Lysekinetiken der (uv) unverdauten Proteine aufgezeichnet.

### 4.5.2.4 Aktivität und Stabilität in Blut

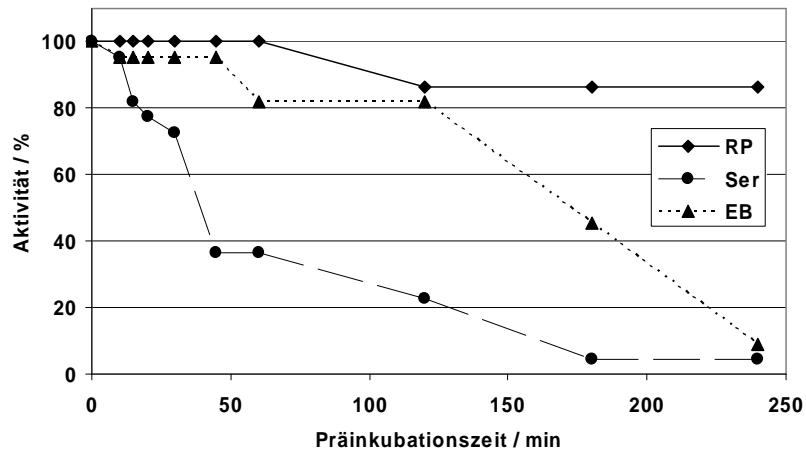
Da Modul 3 in Tierversuchen und möglicherweise in der Humantherapie eingesetzt werden sollte, wurden Aktivitäts- und Stabilitätstests in Serum und Blut durchgeführt. *Staphylococcus aureus* Zellen aus der exponentiellen Wachstumsphase wurden in humanem Serum resuspendiert und im Flüssiglysetest (3.5.2.2) mit verschiedenen Konzentrationen an Modul 3 eingesetzt (Abb. 4.15).



**Abb. 4.15** Flüssiglysetest mit Modul 3 gegen *Staphylococcus aureus* in humanem Serum. Proteinmengen in µg. (Ref) = Referenz ohne Protein.

Modul 3 zeigte lytische Aktivität gegen *Staphylococcus aureus* in humanem Serum. Im Vergleich zur Lyse in osmolytisch optimiertem Lysepuffer wurde für eine effiziente Lyse etwa die 10-fache Proteinmenge benötigt. Die Lysekinetiken waren langsamer als in Puffer. Das Protein wird also durch Serum gehemmt oder blockiert. Bei einer Proteinkonzentration von unter 100 µg/ml konnte nur eine unvollständige Lyse beobachtet werden. Möglicherweise verbleibt das Enzym nach der Hydrolyse am Spaltungsprodukt und steht nicht für weitere Lysevorgänge zur Verfügung. Allerdings müsste dieser Effekt auch in Puffer zu beobachten sein, was nicht der Fall ist. Wahrscheinlicher ist eine kompetitive Hemmung der EADs von Modul 3 durch Serenbestandteile.

Zur Testung der Stabilität von Modul 3 in Blut erfolgte die Inkubation des Proteins in EDTA-Blut bei 37°C. Zu unterschiedlichen Zeitpunkten wurde eine Blutprobe abzentrifugiert und der Serumüberstand in den Flüssiglysetest unter Standardbedingungen eingesetzt (Abb. 4.16).

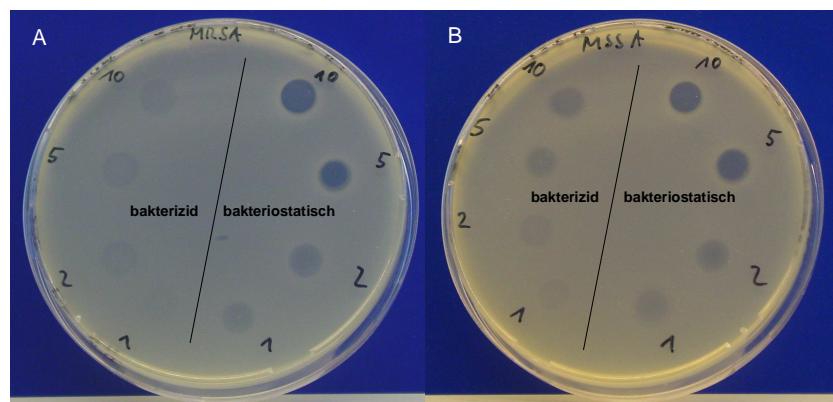


**Abb. 4.16** Aktivität von Modul 3 im Flüssiglysetest gegen *Staphylococcus aureus* nach Inkubation des Proteins bei 37°C in (RP) RückfaltungspufferT, (Ser) humanem Serum und (EB) EDTA-Blut. Eingesetzte Proteinmenge: 20µg/ml.

In EDTA-Blut blieb das Protein über zwei Stunden stabil. Anschließend trat, im Gegensatz zur Inkubation in RückfaltungspufferT, ein starker Aktivitätsverlust ein. Bei Inkubation von Modul 3 in humanem Serum nahm die Lyseaktivität schneller ab. So waren nach ca. 50 Minuten nur noch etwa 40% der Ausgangsaktivität detektierbar.

### 4.5.2.5 Lyse von MRSA

Zur Sicherstellung der Übertragbarkeit der Ergebnisse aus Zelllysetests mit Methicillin sensitiven *Staphylococcus aureus* Stämmen (MSSA) auf Methicillin resistente *Staphylococcus aureus* (MRSA), wurde die bakterizide und bakteriostatische Aktivität von Modul 3 im Plattenlysetest (3.5.2.1) verglichen (Abb. 4.17).



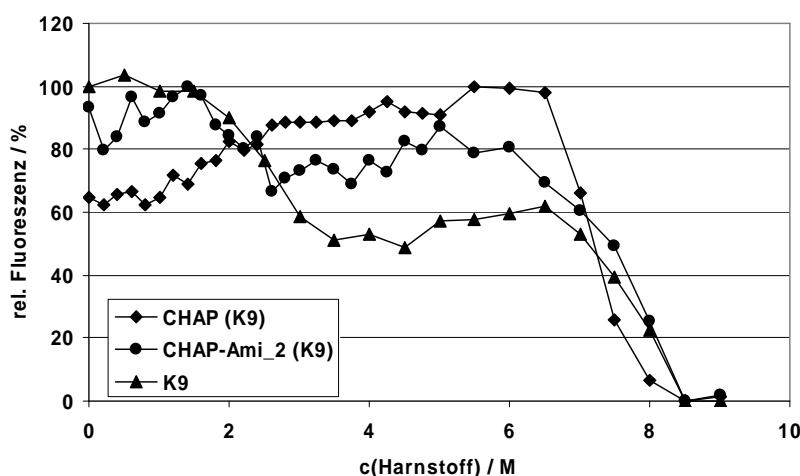
**Abb. 4.17** Plattenlysetest mit Modul 3 gegen (A) Methicillin resistenten *Staphylococcus aureus* und (B) Methicillin sensitiven *Staphylococcus aureus*. Es wurden 5µl Proteinlösung direkt nach Verfestigung des Staphylokokkenhaltigen Topagars (bakteriostatisch) bzw. nach Ausbildung des Bakterienrasens (bakterizid) aufgetragen. Zahlen geben die Proteinmenge in µg an. Es wurden je 300µl Übernachtkultur in 10ml Topagar eingegossen. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 30°C.

Ab einer Proteinmenge von 5 µg kann eine komplette Wachstumsinhibition beider Stämme festgestellt werden. Die Größe und Trübung der Zelllysezonen auf beiden Platten sind vergleichbar. Somit sind die Ergebnisse, welche in Lysetests gegen MSSA erhalten werden auf MRSA übertragbar.

Modul 3 zeichnete sich gegenüber dem Wildtyp-Endolysin Pitti26Ami durch eine erhöhte Lyseaktivität, Löslichkeit und Stabilität aus. Weiterhin konnte mit Modul 3 erstmals die Lyse von *Staphylococcus aureus* in humanem Serum erreicht werden. Modul 3 wurde aufgrund dieser Verbesserungen als Leitstruktur gewählt und in K9 (Kandidat 9) umbenannt.

### 4.5.2.6 Chemische Denaturierung von K9-Domänen

Zur Identifizierung der instabilsten Domäne von K9, wurde die Denaturierung der CHAP-Domäne, des Konstruktes CHAP-Ami\_2 und des Vollängenproteins K9 mit steigender Harnstoffkonzentration per Fluoreszenzmessung verfolgt (3.4.5). Die Messung erfolgte in 25 mM Tris, pH 7,5, 10 mM Citrat, 10 mM CaCl<sub>2</sub>, 300 mM Arginin mit einer Proteinkonzentration von 25 µg/ml. In Abb. 4.18 ist die Veränderung der Intensität des emittierten Lichtes bei 323 nm nach Exzitation mit Licht der Wellenlänge 280 nm dargestellt. K9 zeigt einen zweiphasigen Übergang, wobei der erste Übergang bei ca. 2,5 M Harnstoff, der zweite bei etwa 7-7,5 M Harnstoff beobachtet werden kann. Die CHAP-Domäne denaturiert erst bei ca. 7 M Harnstoff, die Kombination aus CHAP und Ami\_2 zeigt ebenfalls die Übergänge bei 2,5 M und 7-7,5 M Harnstoff.



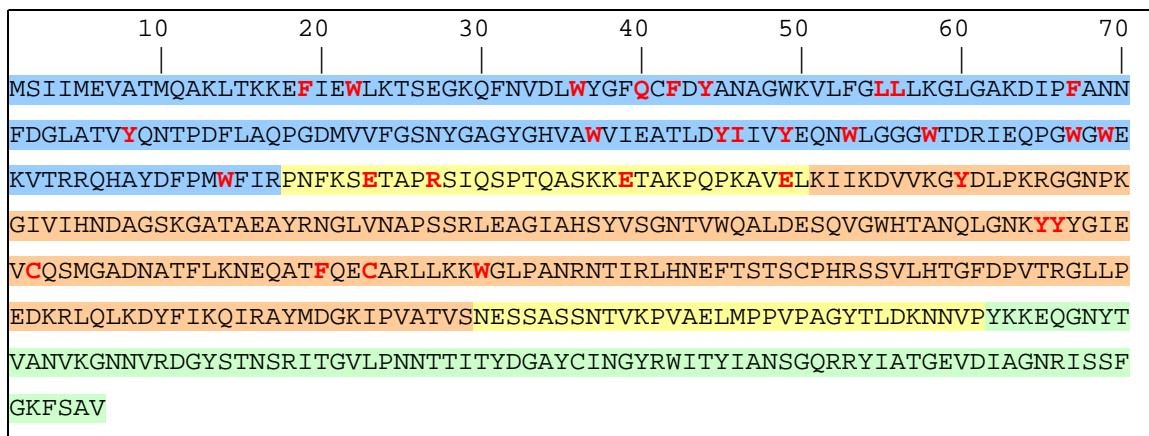
**Abb. 4.18** Harnstoffübergang der CHAP-Domäne, des Konstruktes CHAP-Ami\_2 und des Vollängenproteins K9 in 25 mM Tris, pH 7,5, 10 mM Citrat, 10 mM CaCl<sub>2</sub>, 300 mM Arginin. Die Proben wurden mit Licht der Wellenlänge 280nm angeregt, das emittierte Licht wurde bei 323nm detektiert und normiert.

Die CHAP-Domäne ist also die stabilste Domäne. Der erste Übergang kann entweder durch die Ami\_2 Domäne oder durch die Kombination der Domänen verursacht werden. Die größere Abnahme der Fluoreszenz im ersten Übergang des Volllängenproteins weist auf eine Denaturierung der CBD in diesem Bereich hin.

### **4.6 Stabilisierung und Aktivitätssteigerung durch Einzelmutationen**

#### **4.6.1 Auswahl der Mutationsstellen in der Sequenz von K9**

Das Kandidatenprotein K9 sollte durch Punktmutationen auf gesteigerte Lyseaktivität, höhere Löslichkeit und verbesserte Proteasesstabilität hin optimiert werden. Dabei standen die Entfernung von Proteaseschnittstellen, oberflächenexponierten Aromaten und anderer möglicherweise störender Aminosäuren zur Verbesserung der Rückfaltungseffizienz im Vordergrund. Im Falle der CHAP-Domäne dienten Sequenzalignments als Grundlage zur Wahl der Mutationsstellen. Die Amidase\_2 wurde auf der Basis eines Modells (*Bacillus anthracis*-Prophagenendolysin PlyL) optimiert. Trotz der Homologie von nur ~20% konnte im Modell die „active site“ der Amidase erkannt werden, welche durch die Mutationen nicht beeinflusst werden sollte. Die im Linkerbereich zwischen CHAP- und Amidasedomäne, mittels des PeptidCutters (<http://www.expasy.ch/tools/peptidecutter/>) vorhergesagten Proteaseschnittstellen für Thrombin und V8-Protease konnten experimentell, durch N-terminale Ansequenzierung der Abbaubanden (Prof. Dr. Deutzmann, Universität Regensburg), bestätigt werden. Die Zellwandbindedomäne blieb von der Mutation ausgeschlossen, da es sich bei der vorliegenden CBD aus Plyusa300 um die CBD mit den bisher besten Eigenschaften handelte.



**Abb. 4.19** Aminosäuresequenz von K9 mit Punktmutationen (rot). Die einzelnen Domänen sind farbig hinterlegt: blau = CHAP, braun = Amidase 2, grün = CBD, gelb = Linker

Aus der CHAP-Domäne sollten hydrophobe Aminosäuren (L55, L56, I116) vor allem aber oberflächenexponierte Aromaten (F19, W22, W36, F42, Y44, F67, Y78, W107, Y115, Y119, W123, W128, W137, W139, W154) ausgetauscht werden. Die Mutationen in der Amidasedomäne hatten ebenfalls die Entfernung aromatischer Aminosäuren an der Oberfläche (Y200, Y275, Y276, F300, W310) zum Ziel. Zusätzlich sollten hier zwei potentiell nicht strukturrelevante Cysteine (C282, C303) ausgetauscht werden. Eine Stabilisierung des Proteins gegen Abbau durch Thrombin und V8-Protease sollte durch Ersatz der entsprechenden Erkennungssequenzen in der Linkerregion (Thrombin: R167, V8: E163, E179, E189) erreicht werden (Abb. 4.19).

An den zu mutierenden Stellen wurden entweder strukturhomologe Aminosäuren, oder die Aminosäure Alanin eingeführt. Bei Homologie zu konservierten Bereichen anderer Proteine gleicher Funktion wurde deren Aminosäure eingesetzt. Die Punktmutationen wurden erst als Einzelmutationen per PCR-Mutagenese (3.2.3.2) in K9 eingeführt. Die Selektion erfolgte anhand der Lyseaktivität. Anschließend wurden Mehrfachmutanten innerhalb der einzelnen Domänen hergestellt. Schließlich wurden die daraus ausgewählten, mutierten Domänen kombiniert.

Nachdem die besten Einzel-Mutationen (Tab. 4.8) kombiniert und auf Aktivität vorselektioniert wurden, standen noch sechs Mehrfachmutanten zur Auswahl (Tab. 4.9). Pitti26Ami, K9 und Modul 5 (CHAPAmidasepitti26-CBDpitti20) wurden zum Vergleich in den Tests mitgeführt.

## 4 Ergebnisse und Diskussion

---

**Tab. 4.8** Auflistung der, in K9 eingeführten Mutationen mit der dadurch erzielten Wirkung.

| Mutation | Auswirkung  |
|----------|---|
| L55H     | Entfernung einer unpolaren Aminosäure in der CHAP-Domäne      |
| L56T     | Entfernung einer unpolaren Aminosäure in der CHAP-Domäne      |
| E163A    | Entfernung einer V8-Protease Erkennungssequenz aus dem Linker |
| E163Q    | Entfernung einer V8-Protease Erkennungssequenz aus dem Linker |
| R167A    | Entfernung einer Thrombin Erkennungssequenz aus dem Linker    |
| E179A    | Entfernung einer V8-Protease Erkennungssequenz aus dem Linker |
| E189Q    | Entfernung einer V8-Protease Erkennungssequenz aus dem Linker |
| Y200H    | Entfernung einer aromatischen Aminosäure aus der Amidase      |

**Tab. 4.9** Mehrfachmutanten mit Angabe der Mutationsstellen und deren Lage in K9.

| Nr. | Mutierte Domäne         | Mutationsstelle                                  |
|-----|-------------------------|--|
| M1  | CHAP                    | L55H - L56T                                      |
| M2  | Linker                  | E163A - R167A                                    |
| M3  | Linker + Amidase        | E163A - R167A -Y200H                             |
| M4  | Linker + Amidase        | E163Q - R167A - E179A - E189Q -Y200H             |
| M5  | CHAP + Linker + Amidase | L55H-L56T- E163Q-R167A -Y200H                    |
| M6  | CHAP + Linker + Amidase | L55H-L56T - E163Q - R167A - E179A - E189Q -Y200H |

## 4.6.2 Charakterisierung der K9 Varianten

### 4.6.2.1 Anzucht, Solubilisierung und Rückfaltung

Zur Charakterisierung wurden die Mutanten im 4l Maßstab im Schüttelkolben bei 37°C angezogen (3.1.5). Nach Isolierung der *inclusion bodies* (3.3.1.1), Solubilisierung (3.3.1.2) und Rückfaltung (3.3.1.3) wurden die Proben mittels Centricon und mit 0,005% Tween80 auf 4-6 mg/ml aufkonzentriert. Die Rückfaltungsausbeuten sind in folgender Tabelle (Tab. 4.10) aufgeführt:

**Tab. 4.10** Rückfaltungsausbeute einzelner Proteine.

| Name       | Zellpellet / g | Zellaufschluss-pellet / g | Protein in <i>inclusion bodies</i> / mg | Protein nach Rückfaltung / mg | Rückfaltungsausbeute / % |
|------------|----------------|---------------------------|---|-------------------------------|--------------------------|
| M1         | 7,0            | 2,7                       | 194                                     | 110                           | 57                       |
| M2         | 7,0            | 3,8                       | 234                                     | 126                           | 54                       |
| M3         | 7,0            | 2,8                       | 216                                     | 129                           | 60                       |
| M4         | 7,0            | 1,7                       | 93                                      | 116                           | -                        |
| M5         | 5,4            | 2,4                       | 173                                     | 114                           | 66                       |
| M6         | 6,5            | 2,9                       | 264                                     | 150                           | 57                       |
| Pitti26Ami | 7,1            | 2,7                       | 219                                     | 102                           | 46                       |
| K9         | 7,7            | 2,7                       | 201                                     | 91                            | 45                       |
| Modul 5    | 6,2            | 2,4                       | 258                                     | 116                           | 45                       |

Die Varianten M1 und M2, welche nur in jeweils einer Domäne mutiert wurden, zeigen im Vergleich zu K9 eine verbesserte Rückfaltungsausbeute. Diese konnte durch Kombination der Mutationen aus M1 und M2 in M5 noch gesteigert werden (Tab. 4.10).

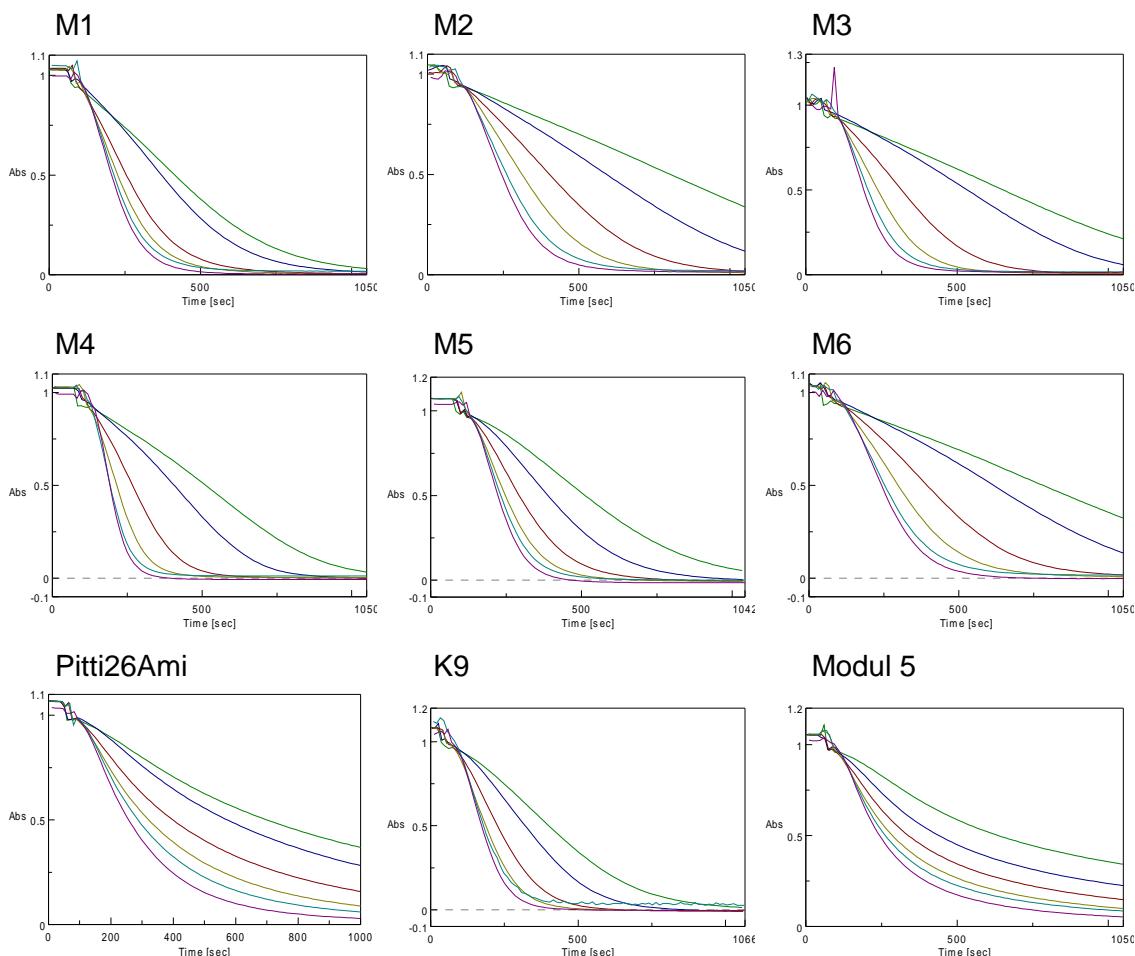
### 4.6.2.2 Lyseaktivität

Die Reinheit der aufkonzentrierten Proteine wurde per SDS-PAGE (3.4.1) abgeschätzt. Alle Proteine wurden dann in einem Flüssiglysetest (3.5.2.2) auf ihre lytische Aktivität hin untersucht. Hierzu wurden jeweils 50 µg/ml, 25 µg/ml, 12,5 µg/ml, 6,25 µg/ml, 3,13 µg/ml und 1,6 µg/ml Protein gegen *Staphylococcus aureus*-Zellen in Lysepuffer eingesetzt (Tab. 4.11, Abb. 4.20).

## 4 Ergebnisse und Diskussion

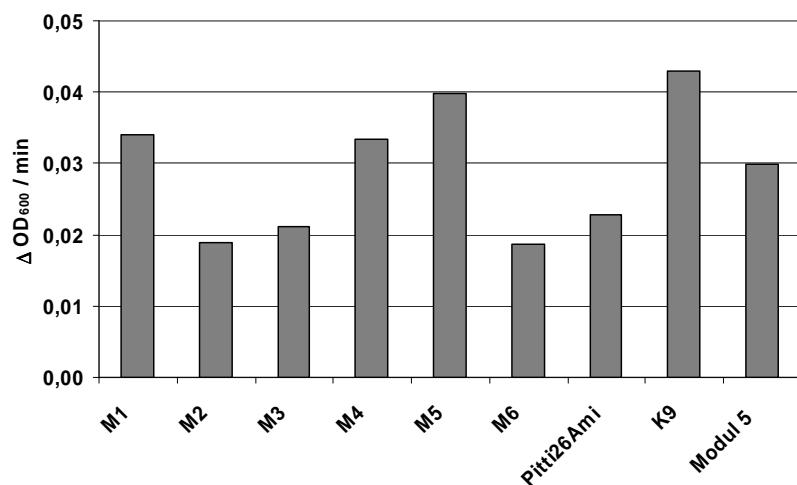
**Tab. 4.11** Reinheit und Lyseaktivität gegen *Staphylococcus aureus*. Die dritte Spalte gibt die Proteinkonzentration an, welche benötigt wird, um innerhalb von 17,5 min eine Absorptionsabnahme auf einen Wert von unter 0,01 zu erzielen.

| Name       | Reinheit nach Aufkonzentrierung / % | c[Protein] / $\mu\text{g/ml}$ , für $A_{600} < 0,01$ (in 17,5 min) |
|------------|-------------------------------------|--|
| M1         | 80                                  | 1,60   |
| M2         | 90                                  | 6,25   |
| M3         | 80                                  | 6,25   |
| M4         | 90                                  | 3,13   |
| M5         | 85                                  | 3,13   |
| M6         | 85                                  | 6,25   |
| Pitti26Ami | 90                                  | 50,00  |
| K9         | 70                                  | 1,60   |
| Modul 5    | 70                                  | 50,00  |



**Abb. 4.20** Flüssiglysetest gegen *Staphylococcus aureus* in Lysepuffer. Eingesetzte Proteinmengen: grün = 1,6  $\mu\text{g/ml}$ , blau = 3,13  $\mu\text{g/ml}$ , violett = 6,25  $\mu\text{g/ml}$ , grau = 12,5  $\mu\text{g/ml}$ , cyan = 25  $\mu\text{g/ml}$ , pink = 50  $\mu\text{g/ml}$ .

Die höchste Lyseaktivität zeigten das Konstrukt K9 sowie die Mutanten M1, M4 und M5 (Abb. 4.21). Bei Pitti26Ami und Modul 5 war ein veränderter Verlauf der Lysekinetik zu verzeichnen, da eine Abnahme der Lysegeschwindigkeit schon vor dem Erreichen der Nulllinie eintrat.



**Abb. 4.21** Vergleich der spezifischen Aktivität im Flüssiglysetest gegen *Staphylococcus aureus* in Lysepuffer. Es wurde der Mittelwert der mit 50, 25, 12.5, 6.25, 3.13 und 1.6 µg/ml Protein erreichten Lyseaktivität aufgetragen.

### 4.6.2.3 Lysespektrum

Neben der Lyseaktivität gegen den ausgewählten *Staphylococcus aureus* Stamm wurde auch das Lysespektrum der mutierten Proteine aufgenommen. Hierzu wurden die zu testenden Staphylokokken in Agarplatten eingegossen (vgl. 3.5.2.1 / Screening). Es wurden 5 µg Protein zur Inhibition des Zellwachstums eingesetzt. Die Proteinmenge wurde so gering gewählt, um Unterschiede zwischen den getesteten Proteinen aufzuzeigen. Die Ergebnisse sind in Tabelle Tab. 4.12 zusammengefasst.

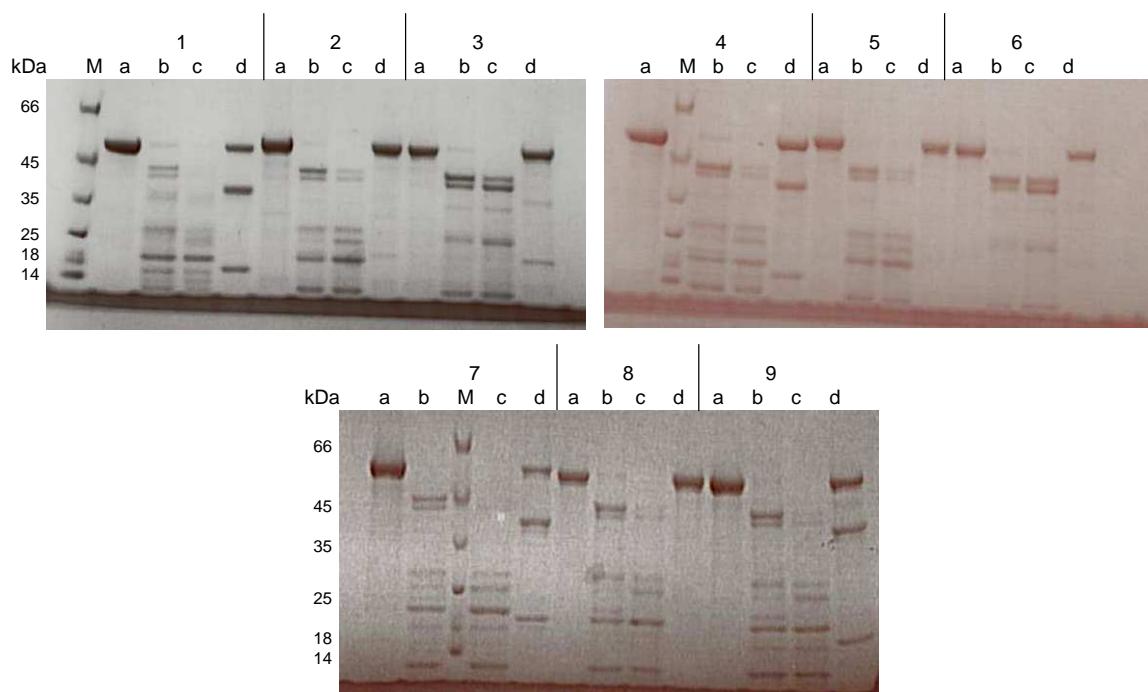
**Tab. 4.12** Inhibitorischer Test auf Agarplatten mit je 5 µg Protein. Für MRSA-Stämme wurden 10 µg Protein verwendet.

|                                  | M1   | M2   | M3   | M4   | M5   | M6   | Pitti26Ami | K9   | Modul5 |
|----------------------------------|------|------|------|------|------|------|------------|------|--------|
| <b>Positive (Staph. sp)</b>      | 58   | 59   | 55   | 56   | 60   | 60   | 41         | 58   | 29     |
| <b>Negative (Staph. sp)</b>      | 9    | 8    | 12   | 11   | 7    | 7    | 26         | 9    | 38     |
| <b>Sensitivität / % (n = 67)</b> | 86,6 | 86,6 | 82,1 | 83,6 | 89,6 | 89,6 | 61,2       | 86,6 | 43,3   |
| <hr/>                            |      |      |      |      |      |      |            |      |        |
| <b>positive (Staph. aureus)</b>  | 30   | 30   | 30   | 30   | 30   | 30   | 21         | 30   | 30     |
| <b>negative (Staph. aureus)</b>  | 2    | 2    | 2    | 2    | 2    | 2    | 11         | 2    | 2      |
| <b>Sensitivität / % (n = 32)</b> | 93,8 | 93,8 | 93,8 | 93,8 | 93,8 | 93,8 | 65,6       | 93,8 | 93,8   |
| <hr/>                            |      |      |      |      |      |      |            |      |        |
| <b>positive (MRSA)</b>           | 12   | 12   | 12   | 12   | 12   | 12   | 7          | 12   | 5      |
| <b>negative (MRSA)</b>           | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 5          | 0    | 7      |
| <b>Sensitivität / % (n = 12)</b> | 100  | 100  | 100  | 100  | 100  | 100  | 58,3       | 100  | 38,5   |

Das breiteste Lysespektrum, auch gegen Staphylokokken, welche nicht zur Art *Staphylococcus aureus* gehören, zeigten die Varianten M5 und M6.

### 4.6.2.4 Proteasesstabilität

Um den Einfluss der eingeführten Mutationen auf den Abbau der Proteine durch Proteasen zu untersuchen, wurde ein Probeverdau mit V8-Protease und Thrombin (3.4.8) bei Raumtemperatur durchgeführt. Die zu testenden Proteine lagen in einer Konzentration von 1 mg/ml vor, während die Enzyme mit einer Konzentration von 50 µg/ml (Thrombin) bzw. 5 µg/ml (V8-Protease) eingesetzt wurden (Abb. 4.22).

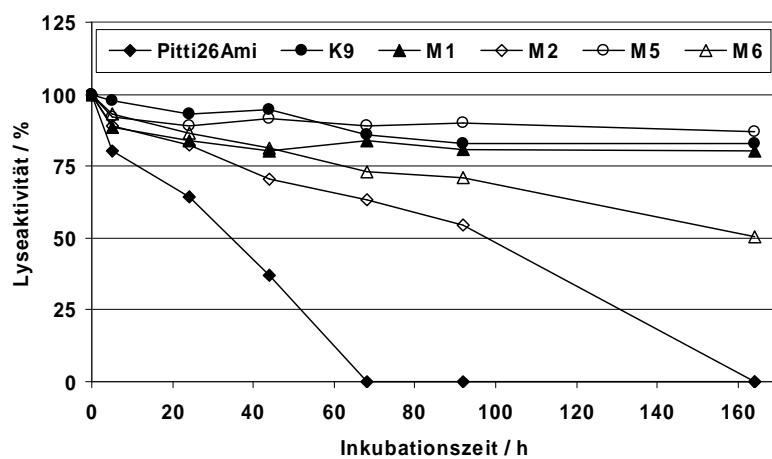


**Abb. 4.22** SDS-PAGE nach Verdau mit V8-Protease bzw. Thrombin. (1) Pitti26Ami, (2) M3, (3) M4, (4) Modul5, (5) M5, (6) M6, (7) M1, (8) M2, (9) K9, (a) unverdaut, (b) V8-Verdau 15min, (c) V8-Verdau 60min, (d) Thrombin-Verdau über Nacht, (M) Protein-Größenstandard.

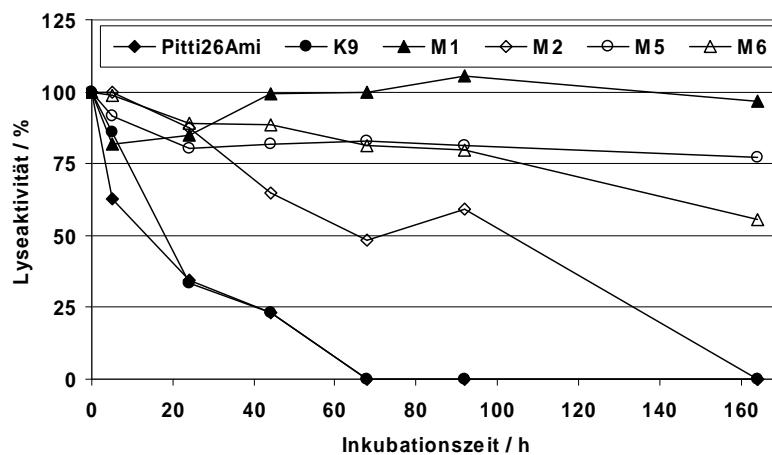
Die mutierten Proteine M2, M3, M5 und M6 erwiesen sich als stabil gegenüber Abbau durch Thrombin. Die Bandenmuster bei 15min und 60min V8-Proteaseverdau ähnelten sich, was darauf schließen ließ, dass hier weniger Erkennungssequenzen für den Angriff des Enzyms zugänglich waren als bei den anderen Proteinen, da diese vollständiger degradiert wurden. Eine vollständige Stabilisierung gegen den Abbau durch die V8-Protease wurde mit den getesteten Mutationen nicht erreicht.

#### 4.6.2.5 Lagerstabilität

Zur Evaluierung ihrer Stabilität wurden die Kandidatenproteine bei 25°C in Rückfaltungspuffer in einer Konzentration von 500 µg/ml auf Raumtemperatur gelagert. Zu unterschiedlichen Zeitpunkten erfolgte die Probennahme. Anschließend wurde im ELISA-Zellwandlysetest (3.5.2.2) gegen *Staphylococcus aureus* die lytische Aktivität vermessen. Die Proteine wurden mit Probenverdünnungspuffer mit bzw. ohne 1 mM DTE verdünnt.



**Abb. 4.23** Lyseaktivität gegen *Staphylococcus aureus* nach Lagerung bei 25°C in Rückfaltungspuffer. Die Proteine wurden vor dem Test in Probenverdünnungspuffer mit 1 mM DTE verdünnt. Die Proteinkonzentration im Test lag bei 2,5 µg/ml.



**Abb. 4.24** Lyseaktivität gegen *Staphylococcus aureus* nach Lagerung bei 25°C in Rückfaltungspuffer. Die Proteine wurden vor dem Test in Probenverdünnungspuffer ohne DTE verdünnt. Die Proteinkonzentration im Test lag bei 2,5 µg/ml.

In Abb. 4.23 erkennt man eine deutliche Zunahme der Stabilität durch Austausch der CBD gegenüber Pitti26Ami. K9 weist eine gute Lagerstabilität auf. Bei der Mutante M2, in der die Thrombinschnittstelle entfernt wurde, ist ein deutlicher Stabilitätsverlust

erkennbar. Eine Verbesserung wurde durch Austausch eines Tyrosins in der Amidasedomäne durch ein Histidin (Y200H) in den Varianten M5 und M6 erreicht. Die stabilsten Varianten sind K9, sowie die Mutanten M1 und M5. In Abb. 4.24 wurde die Verdünnung der Proteine ohne Reduktionsmittel durchgeführt. Hieraus erkennt man, dass K9 stark oxidationsanfällig ist. Unter oxidierenden Bedingungen zeigt die Mutante M1 die höchste Stabilität, gefolgt von M5.

### **4.6.2.6 Schlussfolgerungen aus der Charakterisierung der mutierten Proteine**

Die beste Aktivität und das breiteste Lysespektrum zeigten die Mutanten, welche die Austausche L55H und L56T in der CHAP-Domäne trugen (M1, M5, M6). Da ein potentieller Wirkstoff keinesfalls eine Thrombinschnittstelle enthalten durfte, kamen nur die Varianten mit der Mutation R167A in Frage (M2, M3, M4, M5, M6). Die Mutante mit der höchsten Lagerstabilität und der geringsten Oxidationsanfälligkeit war M5. Außerdem wurde mit Variante M5 die höchste Rückfaltungsausbeute erzielt. Von allen getesteten Kandidaten zeigte M5 die besten Eigenschaften, wurde deshalb als verbessertes Molekül ausgewählt und in K10 umbenannt.

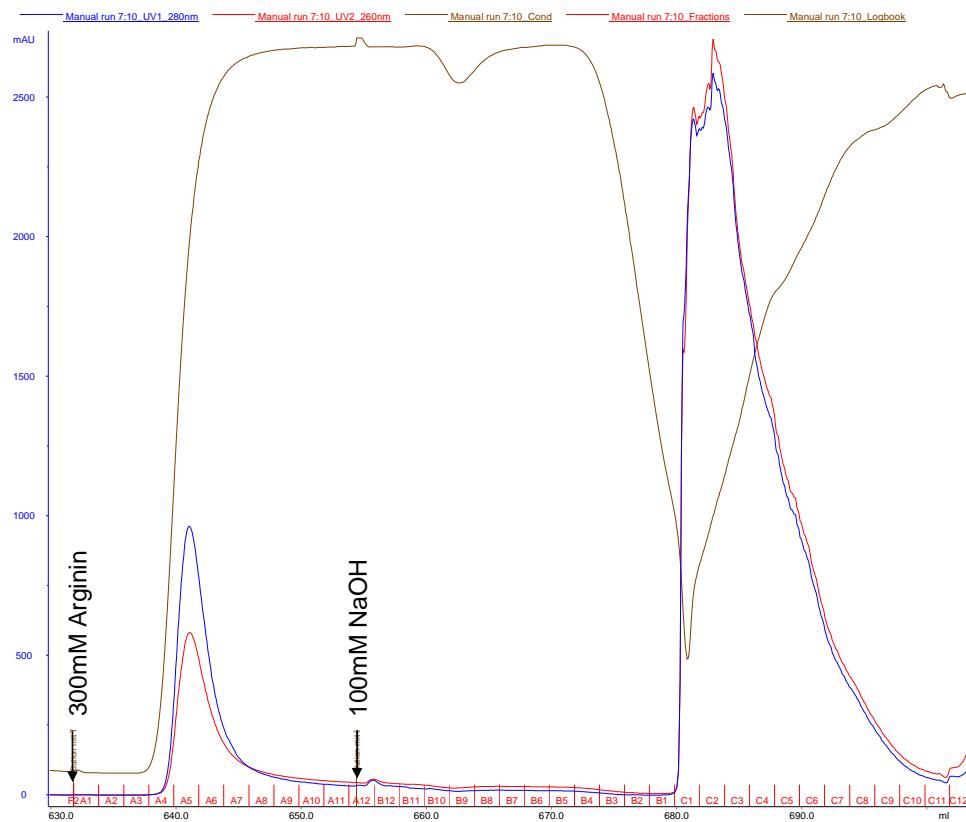
## **4.7 Affinitätschromatographie mit Heparin**

Das Protein K10 wurde, wie alle anderen Volllängenproteine auch, unlöslich in *inclusion bodies* exprimiert. Nach der Isolierung (3.3.1.1) und Solubilisierung (3.3.1.2) der *inclusion bodies*, sowie der DNA-Abreicherung mittels eines starken Anionenaustauschers (3.3.2.1), erfolgte die Renaturierung (3.3.1.3) des Proteins. Nach der Rückfaltung wurde eine Möglichkeit zur weiteren Reinigung des Zielproteins gesucht. Hierfür erschien die Affinitätschromatographie mit einer Heparinsäule ein geeignetes Verfahren zu sein. Die Struktur des Glycosaminoglycans Heparin ähnelt der von Peptidoglycan.

N-Acetylmuramoyl-L-Alanin-Amidase Domänen, hydrolysieren die Amidbindung zwischen N-Acetylmuraminsäure und L-Alanin (Abb. 1.6). Durch die strukturelle Ähnlichkeit des Substrates Peptidoglycan mit dem verwendeten Säulenmaterial Heparin kommt es zur spezifischen Interaktion der Amidase-Domäne mit dem Heparin. Das Verfahren wurde am Beispiel von K10 getestet. Zur Senkung des Arginingehalts wurden die Rückfaltungsansätze 1:5 in Heparin-Auftragspuffer verdünnt. Beim anschließenden Säulenlauf konnten nur ca. 30% des Proteins mit

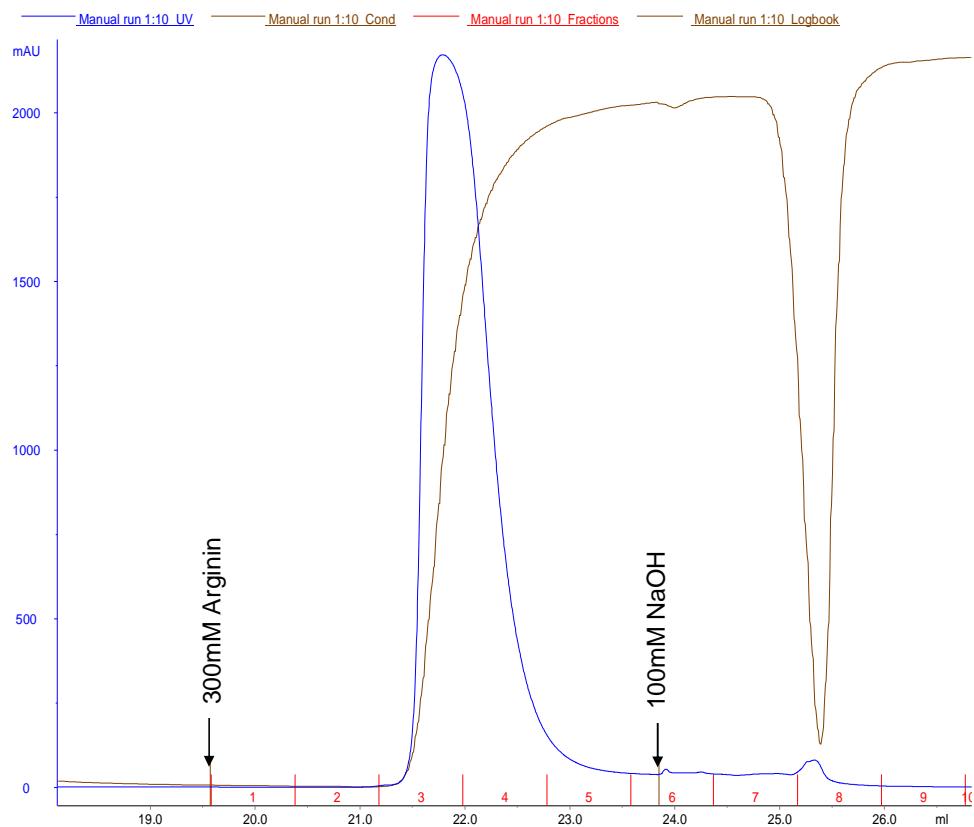
## 4 Ergebnisse und Diskussion

300 mM Arginin eluiert werden. Das restliche Protein wurde vermutlich in Form von Aggregaten zusammen mit den Kontaminationen auf der Säule gebunden und konnte nur durch 0,1 M NaOH eluiert werden (Abb. 4.25).



**Abb. 4.25** Chromatogramm eines Heparin-Säulenlaufes (Säulenvolumen 15 ml) von K10. Die Absorption bei 260 nm ist in rot, die Absorption bei 280 nm in blau dargestellt. Die Elution erfolgte mit Heparin-Elutionspuffer (300 mM Arginin) und anschließend mit 0,1M NaOH (100 mM NaOH). Der Verlauf der Leitfähigkeit ist der braune Linie zu entnehmen. Der Übersichtlichkeit halber wurde nur der Bereich der Elution im Chromatogramm dargestellt.

Vermutlich handelte es sich um zwei Spezies, die schon während der Rückfaltung entstanden. Während die aktive Form spezifisch an die Heparinsäule bindet und eluiert werden konnte, wurde die inaktive Form unspezifisch gebunden. Zur Überprüfung dieser Hypothese wurde eine Rechromatographie des, mit Arginin eluierten Proteins über die Heparinsäule durchgeführt. Hierbei konnte kein signifikanter NaOH-Peak mehr festgestellt werden (Abb. 4.26).



**Abb. 4.26** Chromatogramm eines Heparin-Säulenlaufes (Säulenvolumen 5 ml) von K10, welches bereits einmal über die Heparin-Säule gereinigt wurde. Die Absorption bei 280 nm ist in blau dargestellt. Der Verlauf der Leitfähigkeit ist der braunen Linie zu entnehmen. Die Elution erfolgte mit Heparin-Elutionspuffer (300 mM Arginin) und anschließend mit 0,1M NaOH (100 mM NaOH). Der Übersichtlichkeit halber wurde nur der Bereich der Elution im Chromatogramm dargestellt.

Es konnte also davon ausgegangen werden, dass nur noch aktives Protein in der Lösung vorhanden war. Der Chromatographieschritt erbrachte einen Reinigungs- effekt, der sich in einer Erhöhung der spezifischen Aktivität um den Faktor 2 bis 4 äußerte. Nach der Rechromatographie konnte diese Aktivitätssteigerung nicht beobachtet werden. Des Weiteren war es möglich, das Heparin-Eluat bis zu einer Konzentration von 10 mg/ml aufzukonzentrieren, ohne dass Aggregatbildung beobachtet wurde. Vorher konnten Konzentrationen von maximal 3 mg/ml erreicht werden.

Es konnte also die Isolation einer aktiveren und weniger aggregationsanfälligen Spezies durch die Verwendung der Affinitätschromatographie mit Heparin erreicht werden.

## **4.8 Reinigungsschema für Endolysine**

Alle Volllängenproteine dieser Arbeit wurden unlöslich in *inclusion bodies* exprimiert. Das etablierte Reinigungsschema konnte für alle Proteine angewandt werden. Die Expression erfolgte in *Escherichia coli* Zellen des Stammes HMS174(DE3). Nach der Zellernte durch Zentrifugation (Sorvall, Rotor SLC-4000, 6000rpm, 20min, 4°C) erfolgte der Zellaufschluss im Hochdruckhomogenisator (Microfluidizer®, Microfluidics Corporation, Newton, USA). In einer frühen Phase der Arbeit wurden die Schritte zur Reinigung (3.3.1.1) und Solubilisierung (3.3.1.2) der *inclusion bodies* optimiert (4.3.1). Zur DNA-Abreicherung wurde das denaturierte Protein anschließend über einen starken Anionenaustauscher (Toyopearl GigaCap Q-650M, Tosoh Biosciences GmbH, Stuttgart), geschickt (3.3.2.1). Die DNA interagierte hierbei mit dem Säulenmaterial und das Protein verblieb in der Durchlauffraktion. Nach der Renaturierung (Methode: 3.3.1.3, Optimierung: 4.3.2) ergaben sich zwei Möglichkeiten: Enthielt das zu reinigende Protein eine Amidase-Domäne, erfolgte die weitere Reinigung per Affinitätschromatographie mit Hilfe einer Heparinsäule (Toyopearl AF-Heparin 650-HC, Tosoh Biosciences GmbH, Stuttgart) (3.3.2.3). Proteine ohne Amidase konnten mit dieser Methode nicht aufgereinigt werden. Für diese wurde ein Reinigungsschritt unter Verwendung des starken Kationenaustauschers SP (Toyopearl SP-650M, Tosoh Biosciences GmbH, Stuttgart) etabliert (3.3.2.2). Die einzelnen Schritte wurden in einem Reinigungsschema (Abb. 4.27) zusammengestellt.

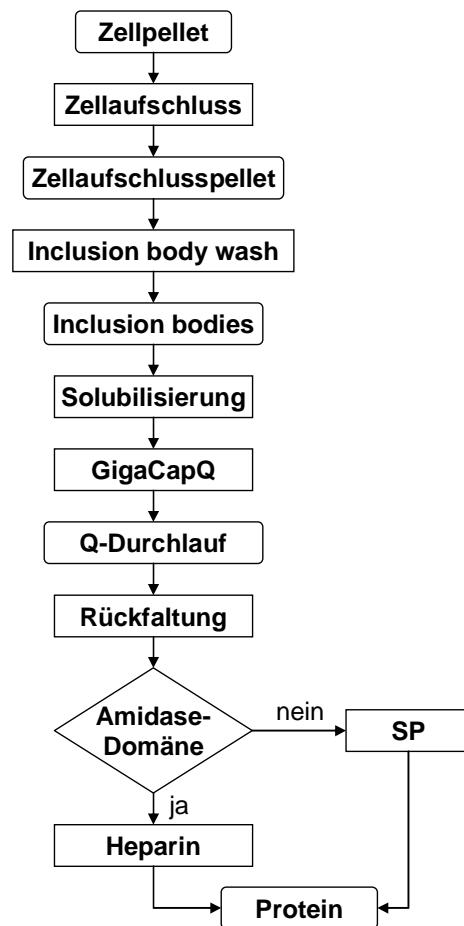


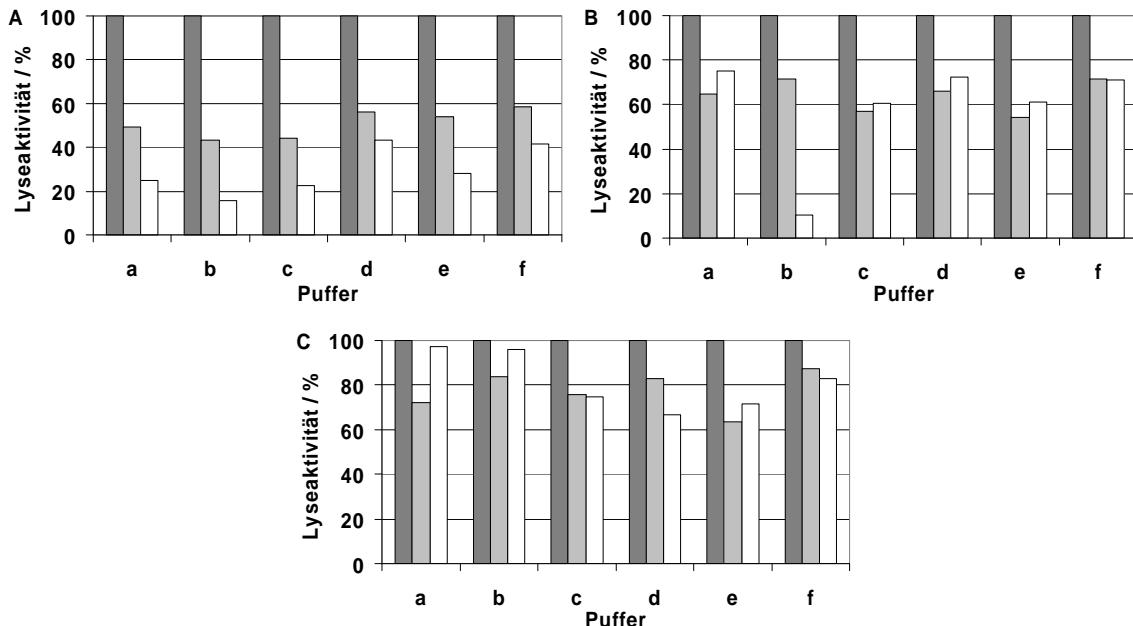
Abb. 4.27 Reinigungsschema für Volllängenproteine.

## 4.9 Eigenschaften von K10

K10, ein, durch rationales Design per Domänenkombination und Einzelmutationen, in seiner Lyseaktivität und Stabilität verbessertes Endolysin, besteht aus drei Domänen. Diese sind eine N-terminale CHAP-Domäne, eine zentrale Amidase\_2-Domäne und eine SH3b-Domäne (bakterielle src-Homologie 3) am C-Terminus. Eine Reinigung aus *inclusion bodies*, über Solubilisierung (3.3.1.2), Anionenaustauscher-chromatographie (3.3.2.1) im denaturierten Zustand, Rückfaltung (3.3.1.3) und Affinitätschromatographie per Heparin-Säule (3.3.2.3) konnte etabliert werden. Das Protein wurde gegen Thrombinverdau stabilisiert (Abb. 4.22). Die Lyseaktivität gegen *Staphylococcus aureus* in Puffer konnte im Flüssiglysetest nachgewiesen werden (Tab. 4.11). K10 zeigte im inhibitorischen Plattenlysetest ein ausreichendes Lysespektrum (Tab. 4.12). Vor allem die lytische Aktivität gegen die getesteten MRSA-Stämme prädestinierte das Molekül für den Einsatz als Therapeutikum. Zur weiteren Spezifikation der Eigenschaften wurden Versuche zur thermischen und chemischen Stabilität, sowie zur Lyse in Mucin angestellt. Ferner wurde die minimale bakterizide Konzentration von K10 gegen *Staphylococcus aureus* zur Abschätzung der benötigten Proteinmenge ermittelt.

#### 4.9.1 Lagerstabilität

Um die Lagerstabilität zu untersuchen, wurde K10 in verschiedenen Puffern (TrisHCl-, Phosphat- und Citratpuffer) bei Raumtemperatur, 4°C bzw. -80°C gelagert. Nach 20 bzw. 44 Tagen wurden Proben entnommen und hinsichtlich ihrer Aktivität im Flüssiglysetest untersucht.

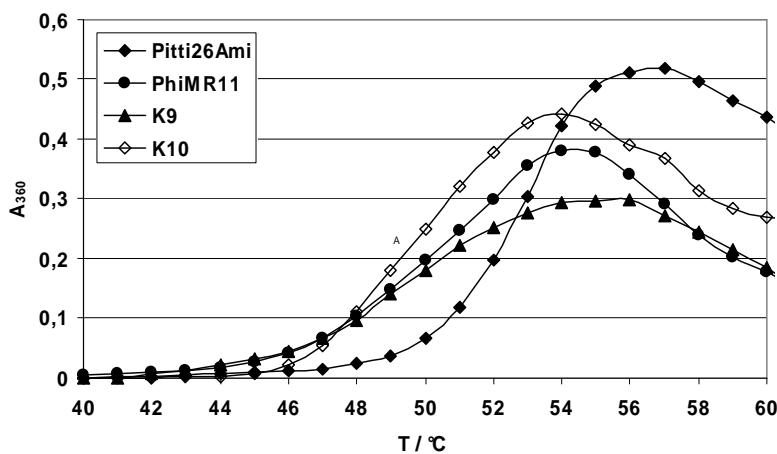


**Abb. 4.28** Lyseaktivität im Flüssiglysetest gegen *Staphylococcus aureus* von K10 nach Lagerung bei (A) Raumtemperatur, (B) 4°C und (C) -80°C. Die Proben wurden zu den Zeitpunkten 0 (dunkelgraue Balken), 20 d (hellgraue Balken bzw. 44 d (weiße Balken) vermessen. Das Protein wurde in den Puffern (a) 25 mM Tris pH 7,5; (b) PBS pH 7,4; (c) 25 mM Napi, pH 7,5; (d) 25 mM Napi, pH 6,0; (e) 10 mM Citrat/ 10 mM Tris pH 7,5; (f) 10 mM Citrat/ 10 mM Tris pH 6,0 gelagert.

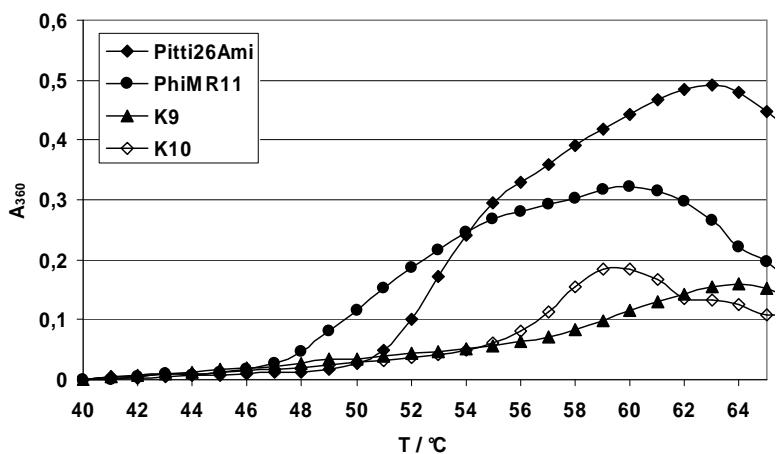
Wurde die Probe in Puffern mit pH 7,5 (Abb. 4.28, A, Puffer a, b, c) auf Raumtemperatur gelagert, so sank die Aktivität bereits nach 20 Tagen auf unter 50%. Erfolgte die Lagerung hingegen bei pH 6,0 (Abb. 4.28, A, Puffer d, e, f) blieb das Protein etwas aktiver. Bei Lagerung auf 4°C war dieser Unterschied nicht zu beobachten (Abb. 4.28, B). Proben in saurem Puffer sind empfindlicher gegenüber Einfrieren und Auftauen, was sich in der niedrigeren Aktivität bei Lagerung auf -80°C äußerte (Abb. 4.28, C).

#### 4.9.2 Thermische Stabilität

Im Aggregationsübergang (3.4.7) wurde eine, durch den CBD-Austausch verursachte, Destabilisierung von K10 im Vergleich zu Pitti26Ami beobachtet (Abb. 4.29). Allerdings konnten Konstrukte mit der CBD aus Plyusa300 durch Zugabe von 50mM Arginin stabilisiert werden (Abb. 4.30). So stieg die Aggregationstemperatur bei K9 und K10 um ca. 9°C. Dieser Effekt konnte bei Pitti26Ami und PhiMR11 nicht beobachtet werden.



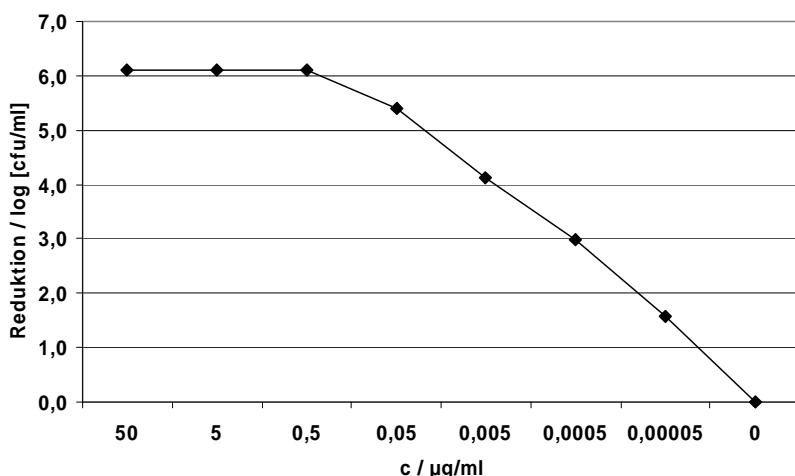
**Abb. 4.29** Zunahme der Lichtstreuung durch Aggregatbildung der Proteine bei steigender Temperatur. Gemessen wurde die Absorption bei 360 nm. Die Proteine wurden in Puffer ohne Arginin, mit einer Konzentration von 0,1 mg/ml eingesetzt.



**Abb. 4.30** Zunahme der Lichtstreuung durch Aggregatbildung der Proteine bei steigender Temperatur. Gemessen wurde die Absorption bei 360 nm. Die Proteine wurden in Puffer mit 50 mM Arginin, in einer Konzentration von 0,1 mg/ml eingesetzt.

#### 4.9.3 Bakterizide Aktivität und Lyse in Mucin

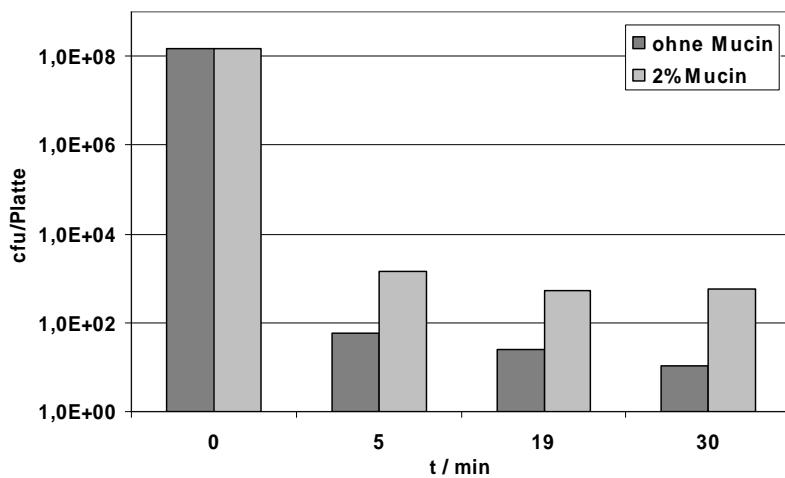
In 4.6.2.2 wurde für K10 eine ausreichende Lyseaktivität festgestellt. Zur Untersuchung der bakteriziden Aktivität von K10 wurde eine MBC-Messung (3.5.2.3) gegen *Staphylococcus aureus* durchgeführt (Abb. 4.31).



**Abb. 4.31** Minimale Bakterizide Konzentration (MBC) von K10 gegen *Staphylococcus aureus* in 20 mM Tris pH 7,5, 60 mM NaCl 2 mM CaCl<sub>2</sub> 10 mg/ml BSA. Die Ordinate zeigt den Logarithmus der Reduktion der Zellzahl, während auf der Abszisse die eingesetzte Proteinkonzentration aufgetragen wurde.

Die MBC liegt für K10 bei 0,5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . Mit dieser Proteinkonzentration ist eine vollständige Reduktion der eingesetzten Zellzahl möglich.

Mucine (von lateinisch „mucus“ = Schleim) sind Glykoproteine in der Schleimhaut (Mucosa). Staphylokokken besiedeln den Nasenvorhof und zum Teil auch die Nasenhöhle. Zur Dekolonisierung von MRSA-Trägern muss ein potentieller Wirkstoff also auch in Mucinen wirksam sein. *Staphylococcus aureus* wurde in BHI auf OD 0,8 inkubiert. 2 x 5 ml wurden abzentrifugiert und die Pellets in je 5 ml sterilfiltrierten  $\frac{1}{2}$  TBS und  $\frac{1}{2}$  TBS mit 2% Mucin aufgenommen. Zu je 500  $\mu\text{l}$  Zellen wurden 0,01 mg/ml K10 gegeben. Nach Zeiten zwischen 5 und 30 Minuten wurden je 100  $\mu\text{l}$  unverdünnt und in einer  $10^4$  Verdünnung auf MSA Agar ausplattiert. Nach Inkubation der Platten über Nacht bei 37°C, erfolgte die Bestimmung der Kolonienzahl (Abb. 4.32).



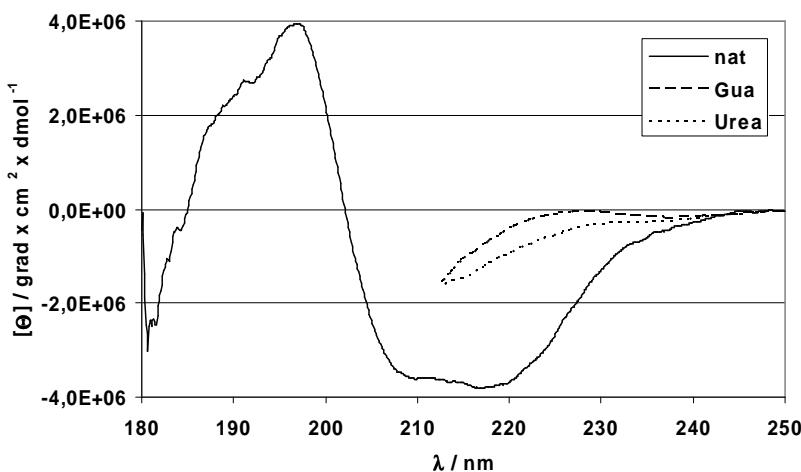
**Abb. 4.32** *Staphylococcus aureus* Koloniezahl nach verschiedenen Zeiten der Lyse durch K10 in  $\frac{1}{2}$  TBS bzw. in  $\frac{1}{2}$  TBS mit 2% Mucin.

Zum Zeitpunkt 0 betrug die Anzahl der Zellen pro Platte  $1,43 \times 10^8$ . Bereits nach 5 min konnte eine Reduktion der Zellzahl in Puffer auf 59 Zellen beobachtet werden. Mit 2% Mucin im Puffer waren zu diesem Zeitpunkt noch 1400 Zellen übrig. Nach 30 min betrug das Verhältnis 11 zu 550. Die Wirksamkeit von K10 gegen Staphylokokken wird also in Mucin gehemmt.

#### 4.9.4 CD-Spektroskopie

Von K10 wurde ein CD-Spektrum (3.4.6) am CD-Spektrometer J-815 (Jasco Corporation, Tokyo) aufgenommen, anhand dessen der Anteil einzelner Sekundärstrukturelemente untersucht werden sollte. Andererseits wurde vermutet, dass bei Denaturierung des Proteins mit 8 M Harnstoff keine komplette Auffaltung des Proteins stattfindet, sondern eine Reststruktur erhalten bleibt. Zu dieser Annahme kam es aus folgendem Grund: In Punkt 4.7 wurde festgestellt, dass das Eluat der Heparinsäule die komplette Aktivität enthält. Da bei der Rechromatographie alles Protein von der Säule eluiert werden konnte, wurde die Abtrennung einer inaktiven Faltungsspezies erreicht. Nach Denaturierung des K10-Heparin-Eluats mit 8M Harnstoff und anschließender Renaturierung wurde die vollständige Aktivität erhalten. Erfolgte die Denaturierung jedoch mit 6 M GdnHCl konnten, nach der Renaturierung nur 30% der Ausgangsaktivität detektiert werden. Also wurde vermutet, dass das Protein mit 8 M Harnstoff nicht vollständig entfalten werden kann. Bei der Denaturierung mit 6 M GdnHCl wurde jedoch eine komplette Entfaltung erreicht und bei der sich anschließenden Renaturierung konnte wieder die inaktive

Faltungsspezies entstehen. Die erhaltene Aktivität von 30% entspricht dem Prozentsatz des Heparinluats an der aufgetragenen Proteinmenge. Zur Untersuchung dieser Vermutung, wurde K10 mit 8M Harnstoff und als Vergleich mit 6M GdnHCl denaturiert. Die Spektren wurden untereinander und mit dem nativen Spektrum verglichen (Abb. 4.33).



**Abb. 4.33** Fern-UV-Spektrum von K10 (1mg/ml in 20mM NaPi, pH 7) nativ (nat) und denaturiert mit 6M GdnHCl (Gua) bzw. 8M Harnstoff (Urea). Datenpunkte wurden alle 0,1nm gemessen, die Scangeschwindigkeit betrug 100 nm/min. Es wurden je 10 pufferkorrigierte Einzelspektren akkumuliert. Die molare Elliptizität wurde gegen die Wellenlänge aufgetragen.

Zur Abschätzung des Sekundärstrukturgehalts wurde das native Spektrum mit Referenzspektren verglichen (YHELIX.jwr, YBETA.jwr, YTURN.jwr, YRANDOM.jwr von Yang JT in *SpectraManager*, Jasco Corporation, Tokyo). Es ergaben sich die, in Tab. 4.13 dargestellten Anteile.

**Tab. 4.13** Anteil der Sekundärstrukturelemente in K10 anhand des Vergleiches des CD-Spektrums mit Referenzspektren.

| Strukturelement      | rel. Anteil / % |
|----------------------|-----------------|
| α-Helix              | 21,8            |
| β-Faltblatt          | 46,2            |
| Turn                 | 11,2            |
| Ungeordnete Struktur | 20,8            |

Die Spektren des denaturierten Proteins unterscheiden sich voneinander. Bei 222nm liefern α-helikale Peptide ein Minimum ( $n \rightarrow \pi^*$  Übergang) (Lottspeich & Zorbas; 1998; Schellman & Oriel, 1962). Das native Spektrum besitzt bei dieser Wellenlänge eine molare Elliptizität von  $-33,46 \times 10^5 \text{ grad} \times \text{cm}^2 \times \text{dmol}^{-1}$ . Das mit GdnHCl denaturierte Protein liefert einen Wert von  $-2,13 \times 10^5 \text{ grad} \times \text{cm}^2 \times \text{dmol}^{-1}$ . Für das mit Harnstoff denaturierte Protein wurde ein Wert von  $-7,47 \times 10^5 \text{ grad} \times \text{cm}^2 \times \text{dmol}^{-1}$  ermittelt. Die molare Elliptizität des, mit Harnstoff behandelten K10 liegt zwischen der des komplett

gefalteten und des komplett denaturierten Proteins. Es ist also zusammen mit den Ergebnissen aus der Rechromatographie und den Aktivitäten nach Denaturierung und Renaturierung von einer nicht kompletten Entfaltung von K10 durch 8M Harnstoff auszugehen.

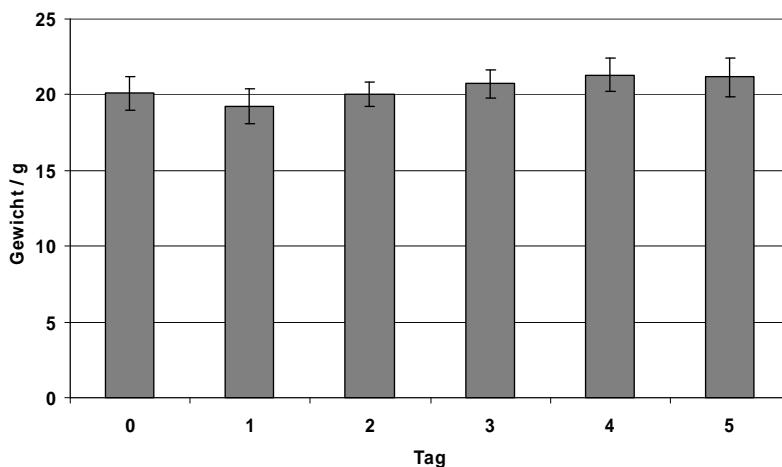
### **4.10 Untersuchungen an K10 in vivo**

Das Protein K10 wurde, aufgrund seiner Eigenschaften, als Kandidatenmolekül für ein antimikrobiell wirksames Therapeutikum ausgewählt. Deshalb wurden erste Vorversuche in Tiermodellen durchgeführt. Hierbei konnten sowohl Daten zur Toxizität, Neutralisation des Proteins durch Antikörper, Immunogenität, Pharmakokinetik, als auch zur Wirksamkeit von K10 gewonnen werden.

#### **4.10.1 Toxizität**

K10 wurde sowohl auf Cytotoxizität, als auch auf Toxizität in Mäusen hin untersucht. Die Versuche zur Cytotoxizität wurden durch die Firma Lophius (Lophius Biosciences GmbH, Regensburg) durchgeführt. Hier erfolgte die Inkubation von murinen Fibroblastenzellen (L929) für 24 h mit 20 µg/ml K10. Anschließend wurden die Zellen auf ihre Morphologie und das Zellwachstum (per Hemalaun-Färbung) und ihre Mitoseaktivität (FDA/PI – Färbung) untersucht. Ferner wurde der Einfluss von K10 auf die Zellproliferation von murinen Milzzellen mittels eines <sup>3</sup>H-Thymidin-Inkorporationsversuchs getestet. Hierbei konnte die DNA-Synthese als Marker der Zellproliferation verfolgt werden. Keine der getesteten Merkmale wurde durch K10 beeinflusst, so dass nicht von einer cytotoxischen Wirkung des Proteins auszugehen ist.

Zur Untersuchung der Toxizität von hoch dosiertem K10 bei der systemischen Anwendung erfolgte die dreifache i.v. Injektion von je 100 mg/kg des Proteins in 10 Tiere (CFW1 Mäuse, 4-6 Wochen alt, 18-20 g, weiblich) nach 1 h, 6 h und 22 h bei der Firma Bayer Healthcare. Das hierfür verwendete Protein lag in 20 mM Tris-HCl, pH 7,5, 10 mM CaCl<sub>2</sub>, 10 mM Citrat, 300 mM Arginin vor. Über einen Zeitraum von fünf Tagen wurden täglich Letalität und Gewicht der Tiere (Abb. 4.34) bestimmt. Bei Verabreichung toxischer Substanzen kann das Gewicht der Tiere signifikant sinken. Außerdem erfolgte die Kontrolle der Mäuse auf eventuelle Krankheitszeichen.

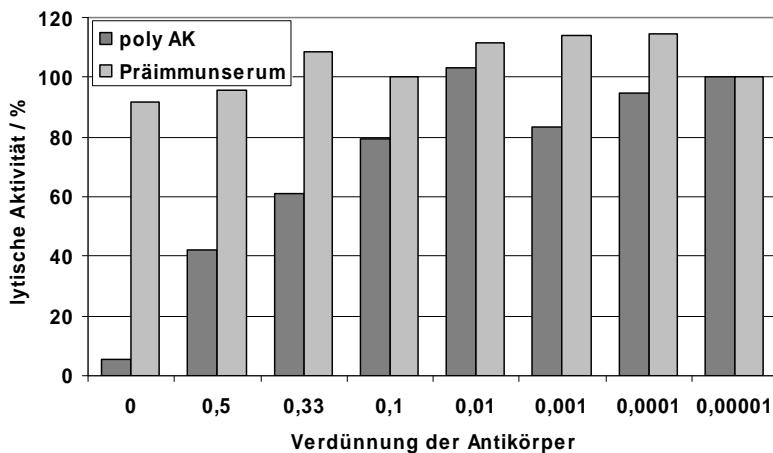


**Abb. 4.34** Gewichte der Mäuse nach dreimaliger (nach 1 h, 6 h, 22 h) i.v. Injektion von 100 mg/kg K10. Fehlerbalken geben die Standardabweichung an. Es wurden 10 Tiere getestet.

Der Versuch ergab eine Überlebensrate von 100%. Alle Tiere blieben ohne Befund. Das Gewicht der Tiere blieb weitestgehend konstant. K10 ist, ebenso wie in den Zellkulturversuchen, nicht toxisch.

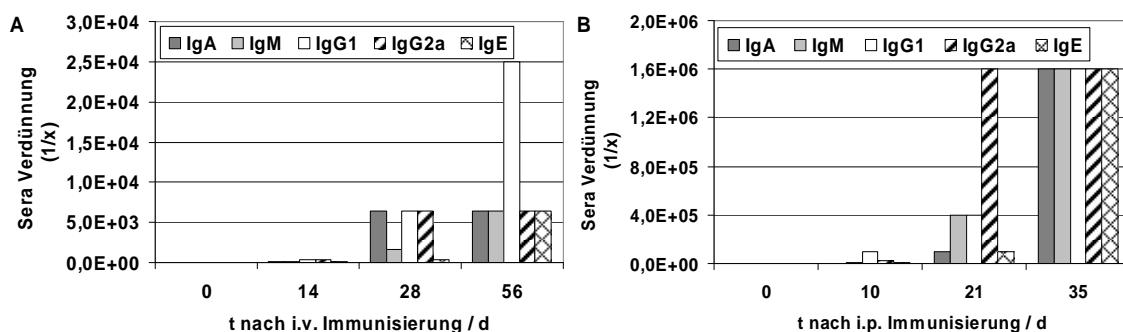
### 4.10.2 Neutralisation von K10 durch Anti-K9 Antikörper

Zur Generierung polyklonalen Antikörpers gegen K9 wurde analog 3.3.2.5 vorgegangen. Das aus dem Gel extrahierte, denaturierte Protein wurde zur Firma Davids Biotechnologie GmbH gegeben. Hier wurden zwei Kaninchen subkutan immunisiert. Nach dem dritten Boost wurden polyklonale Antikörper gewonnen und über Affinitätschromatographie mittels Protein A gereinigt. Um die Neutralisation der Aktivität von K10 durch diese Antikörper zu untersuchen, wurden 100 µg/ml K10 zusammen mit verschiedenen Verdünnungen der polyklonalen Antikörper eine Stunde bei 30°C inkubiert und anschließend im ELISA-Zellwandlysetest (3.5.2.2) eingesetzt (Abb. 4.35). Als Kontrolle wurde Präimmunserum anstatt der Antikörper verwendet.



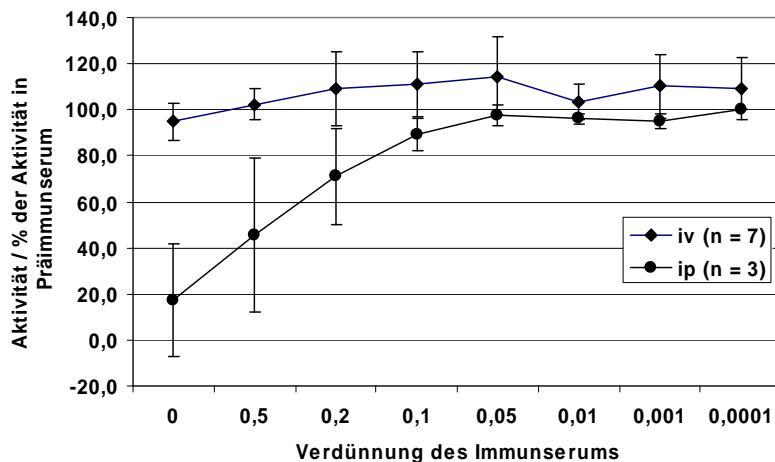
**Abb. 4.35** Hemmung der Aktivität von K10 nach Inkubation mit polyclonalen Antikörpern. ELISA-Zellwandlysetest mit 5 $\mu$ g/ml K10. poly AK – polyclonale Antikörper.

Es konnte eine Hemmung der Enzymaktivität durch i.p. generierte Antikörper festgestellt werden. Diese ist konzentrationsabhängig bis ca. 1:10-verdünntem Serum. Mit dem Wissen um die Inhibition wurden nun Untersuchungen zur Immunogenität von K10 in Mäusen durchgeführt. Alle Arbeiten mit den Tieren wurden durch Angestellte des Tierstalls der Universität Regensburg durchgeführt. Die Immunisierung erfolgte hier intravenös (i.v.) mit 15mg/kg K10, bzw. intraperitoneal (i.p.) mit Adjuvant in einer Emulsion aus Wasser und Öl in einer Konzentration von ebenfalls 15 mg/kg K10. Bei dem verwendeten Protein handelte es sich um renaturiertes K10, welches zu den Zeitpunkten 0 h, 24 h und 48 h intravenös bzw. 0 d, 14 d und 28 d intraperitoneal appliziert wurde. Anti K10 Sera wurden nach 4 Wochen (i.v.) bzw. 5 Wochen (i.p.) gewonnen. Die Entwicklung der Antikörpertiter ist in Abb. 4.36 dargestellt.



**Abb. 4.36** Entwicklung der Antikörpertiter in Mäusen nach (A) i.v. Immunisierung und (B) i.p. Immunisierung.

Nach Inkubation von K10 (0,1 mg/ml) für eine Stunde bei 30°C in verschiedenen Verdünnungen der Seren (Verdünnungspuffer 1), wurde, zur Messung der Neutralisation die Aktivität im ELISA-Zellwandlysetest (3.5.2.2) bestimmt (Abb. 4.37).

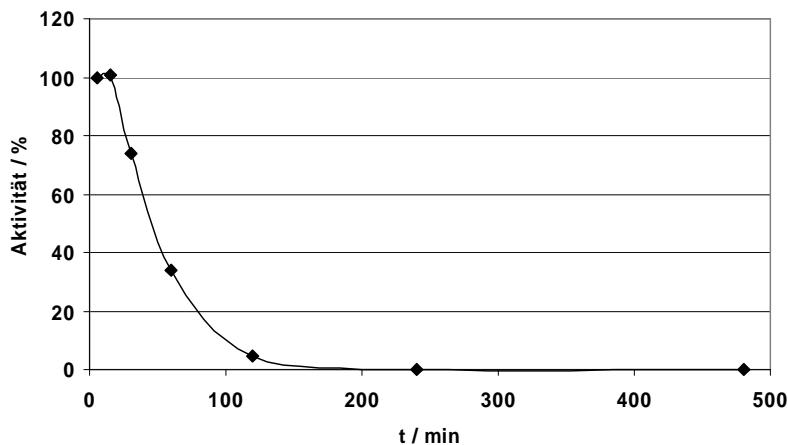


**Abb. 4.37** Aktivität von K10 gegen *Staphylococcus aureus* im ELISA Zellwandlysetest. Das Protein (0,1 mg/ml) wurde vor der Testung 60 min bei 30°C in verschiedenen Verdünnungen der Anti K10 Sera inkubiert. Die gemessenen Aktivitäten wurden auf die jeweils im Präimmunserum gemessenen Aktivitäten normiert. Seren aus 7 intravenös und 3 intraperitoneal immunisierten Mäusen wurden verwendet. Dargestellt sind die Mittelwerte unter Angabe der Standardabweichung.

Anti K10 Sera aus i.v. immunisierten Mäusen zeigten keine Tendenz zur Neutralisation von K10. Die Aktivität des Proteins wurde durch alle drei Sera aus i.p. immunisierten Tieren gehemmt, wobei große Unterschiede in der Stärke der Inhibition zwischen den einzelnen Sera bestanden, was in der großen Standardabweichung zum Ausdruck kommt (Abb. 4.37). Die Hemmung resultiert aus dem 60-fach höheren Antikörpertiter nach i.p.-Immunisierung im Vergleich zum Titer im Serum i.v.-immunisierter Tiere (Abb. 4.36).

### 4.10.3 Pharmakokinetik

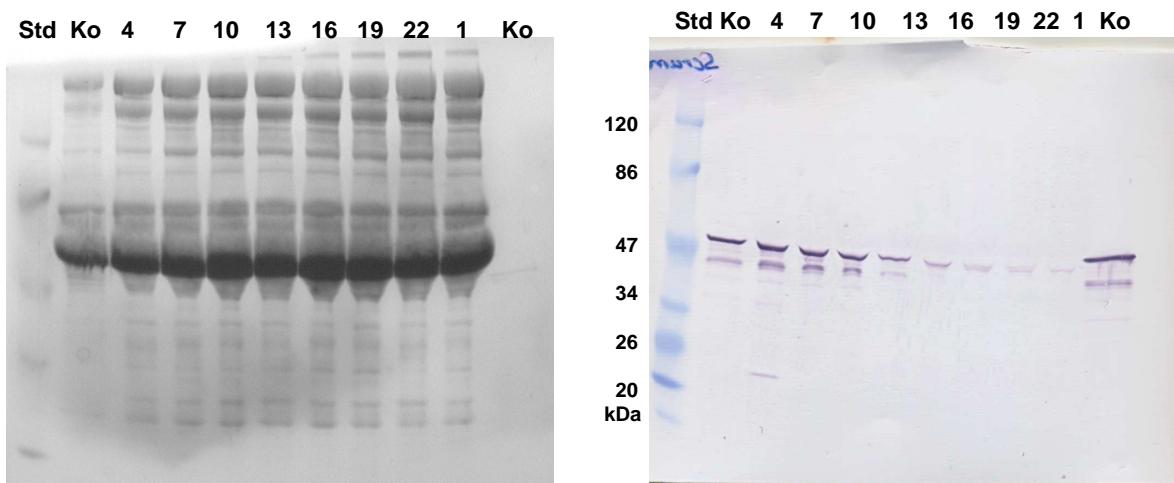
In diesem Versuch sollte die Halbwertszeit von K10 in Ratten (sprague dawley (CD) rats) ermittelt werden. Hierzu erfolgte die Injektion von 12 mg/kg Körpergewicht K10 (in 20 mM Tris; pH 7,5; 300 mM L-Arginin; 10 mM Na-Citrat; 10 mM CaCl<sub>2</sub>). Nach 5, 15, 30, 60, 120, 240 bzw. 480 min erfolgte die Isolation von Blutserum und die anschließende Präparation des Serums. Je 20 µl der Sera wurden anschließend im ELISA-Zellwandlysetest auf Aktivität gegen *Staphylococcus aureus* – Zellwände (200µl) untersucht (Abb. 4.38).



**Abb. 4.38** K10 – Restaktivität in Rattenserum nach i.v.-Applikation gegen *Staphylococcus aureus* – Zellwandpräparation im ELISA-Zellwandlysetest.

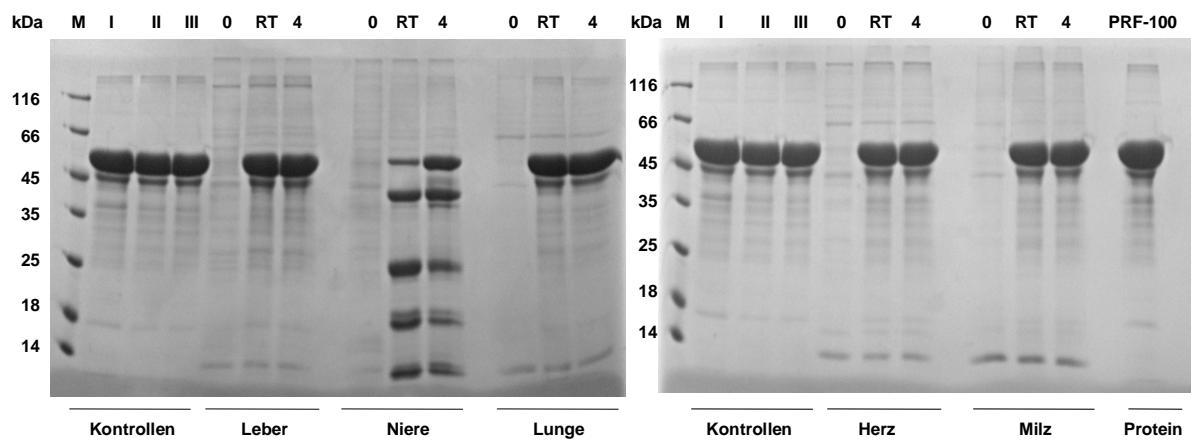
Die in 20 µl Serum detektierte Aktivität sank mit zunehmender Verweildauer in der Ratte. Nach 120 min konnten nur noch 4,5% der Ausgangsaktivität gemessen werden. Nach 240 min war keine Lyseaktivität mehr feststellbar. Für K10 konnte eine Halbwertszeit von etwa 50 min bestimmt werden.

Zum Nachweis von K10 wurden die gewonnenen Sera einem Westernblot (3.4.2) unterzogen (Abb. 4.39). Dafür wurden 20µl Proben in einer SDS-PAGE (3.4.1) eingesetzt und anschließend auf eine PVDF-Membran geblottet (Hybond, Amersham Biosciences, Uppsala, Schweden). Als primärer Antikörper diente eine 1:100000 verdünnte Lösung eines polyklonalen Antikörperserums (Poly-A1). Als zweiter Antikörper wurde *Alkaline Phosphatase conjugated AffiniPure Goat Anti-Rabbit IgG* (Jackson ImmunoResearch Europe Ltd., Suffolk, UK) (0,6 mg/ml, 1:5000 verdünnt in PBST mit 1% BSA) verwendet. Die Westernblot Analyse der Serumproben zeigt ein zur Aktivitätsmessung korrelierendes Verhalten. So ist nach 2 h (Tier 16 in Abb. 4.39) nahezu kein Protein mittels eines polyklonalen Antikörper-Serums gegen K10 nachweisbar.



**Abb. 4.39** SDS-PAGE und Westernblot von Rattenserum zu verschiedenen Zeitpunkten nach i.v. Injektion von 12 mg/kg K10. 20 µl des jeweiligen Serums wurden aufgetragen. Die Größen der im Standard (Std) enthaltenen Banden sind in kDa angegeben. Die Kontrolle (Ko) neben dem Standard beinhaltet frisch in Serum verdünntes K10, während die zweite Kontrolle (Ko) auf der rechten Gelseite K10 in PBS enthält. Die Proben wurden zu den Zeitpunkten (4) 5 min, (7) 15 min, (10) 30 min, (13) 60 min, (16) 120 min, (19) 240 min, (22) 480 min und (1) 0 min genommen.

In Westernblot-Analysen homogenisierter Organe der Tiere fielen Abbaubanden von K10 in der Niere auf. Zur Untersuchung des Abbaus von K10 in einzelnen Organen *in vitro*, wurde ein Verdau des Proteins in Organextrakten aus Ratten durchgeführt. Hierfür erfolgte die Homogenisierung von Organproben im 20-fachen Volumen PBS-Puffer auf Eis. Anschließend wurden 40 µl K10 (1 mg/ml) in 20 mM Tris pH 8,0-Puffer mit 10 µl Organhomogenisat versetzt und bei Raumtemperatur bzw. 4°C über Nacht inkubiert. Die erhaltenen Proben wurden anschließend mittels SDS-Page und Coomassie-Färbung analysiert (Abb. 4.40).

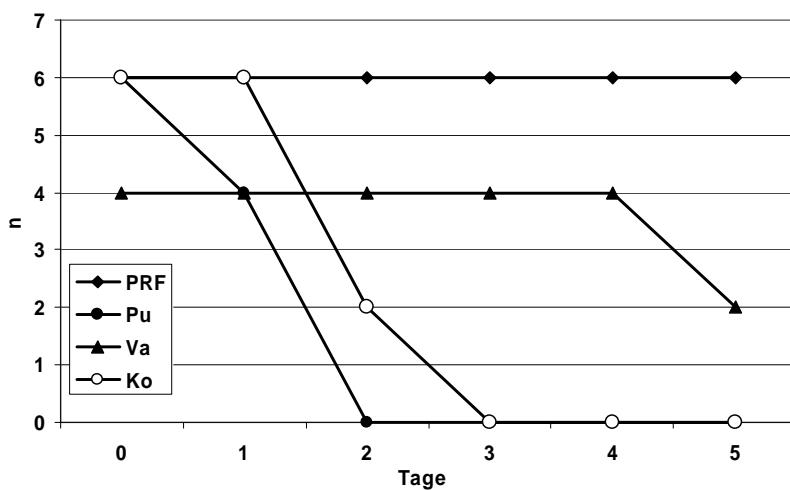


**Abb. 4.40** SDS-PAGE der Verdauansätze von K10 in Organextrakten. Die entsprechenden Organe sind unter den Gelen vermerkt. 40 µl K10 wurden in 20 mM Tris, pH 8 für 18 h mit 10 µl Organhomogenisat bei (RT) Raumtemperatur bzw. (4) 4°C inkubiert. Als Kontrolle (0) wurde die jeweilige resuspendierte Gewebeprobe, 1/20 in Puffer verdünnt aufgetragen. Als weitere Kontrollen wurden 40 µl (I) frisches, sowie für 18 h (II) bei Raumtemperatur bzw. (III) bei 4°C gelagertes Protein aufgetragen.

Ein Abbau von K10 konnte nur bei Inkubation des Proteins mit Nierenextrakt festgestellt werden.

### 4.10.4 Wirksamkeit von K10 im Tiermodell

Die Überlebensrate bei Therapie mit K10 wurde in einem Tiermodell der Firma Bayer Healthcare geprüft. Hierzu erfolgte die i.v. Infektion von vier bis sechs Wochen alten CFW1 Mäusen mit 0,2 ml einer Zellsuspension mit  $8 \times 10^8$  cfu/ml *Staphylococcus aureus* 133 (Bayer Healthcare, Leverkusen). Die i.v. Therapie erfolgte 1 h, 6 h und 22 h nach der Infektion mit 5 mg/kg K10 oder 200 µl Puffer. Eine Vergleichsgruppe wurde 1 h und 6 h nach der Infektion mit 1,25 mg/kg Vancomycin i.v. therapiert. Kontrolltiere erhielten keine Therapie. Abb. 4.41 zeigt die Überlebensrate der verschiedenen Gruppen.



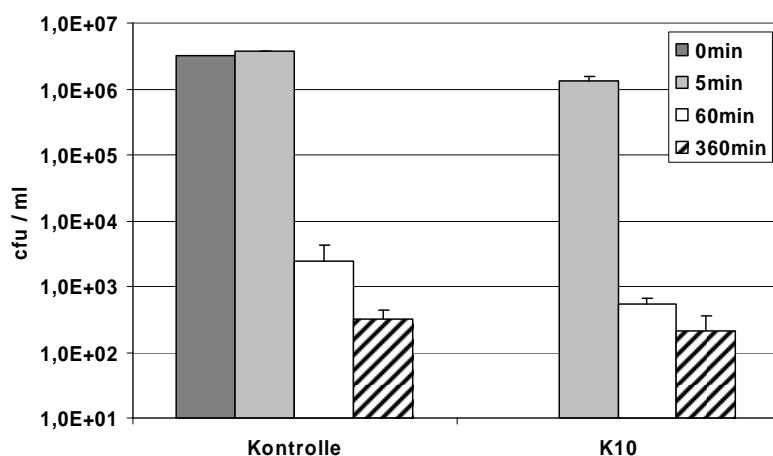
**Abb. 4.41** Überlebensrate nach i.v. Infektion mit 0,2 ml  $8 \times 10^8$  cfu/ml *Staphylococcus aureus* 133 und dreifacher i.v. Therapie mit 5 mg/kg (PRF) K10 oder (Pu) Puffer [20 mM Tris, pH 7,5, 10 mM CaCl<sub>2</sub>, 10 mM Citrat, 300 mM Arginin] 1 h, 6 h und 22 h nach der Infektion bzw. zweifacher i.v. Therapie mit 1,25 mg/kg (Va) Vancomycin 1 h und 6 h nach der Infektion. Die Kontrolltiere erhielten keine Therapie nach der Infektion. (n) = Anzahl der Versuchstiere.

Die Überlebensrate der Puffer-therapierten Mäuse sank nach zwei Tagen auf Null, während die der nicht therapierten Tiere erst nach drei Tagen den Nullwert erreichte. Die 50%ige Mortalität in der Vancomycin-Gruppe konnte durch Verdopplung der Konzentration des Antibiotikums beseitigt werden. Mit 5 mg/kg K10 konnte eine Überlebensrate von 100% erreicht werden.

In diesem sehr „weichen“ Tiermodell konnte also eine erfolgreiche Therapie einer systemischen Infektion durch K10 gezeigt werden. Deshalb erfolgte im Anschluss der Einsatz von K10 in einem „härteren“ Tiermodell.

Hierzu wurden die Tiere (ebenfalls CFW1) i.p. mit 200 µl einer,  $8 \times 10^8$  cfu/ml *Staphylococcus aureus* 133 (Bayer Healthcare, Leverkusen) und 5% Mucin enthaltenden, Zellsuspension infiziert. Die Therapie erfolgte 0,5 h, 6 h und 22 h nach der Infektion, i.v. mit 100 mg/kg, 25 mg/kg, 5 mg/kg bzw. 1 mg/kg K10. Die meisten Tiere starben innerhalb von 24 h. Nach 2 Tagen sank die Überlebensrate auf 0.

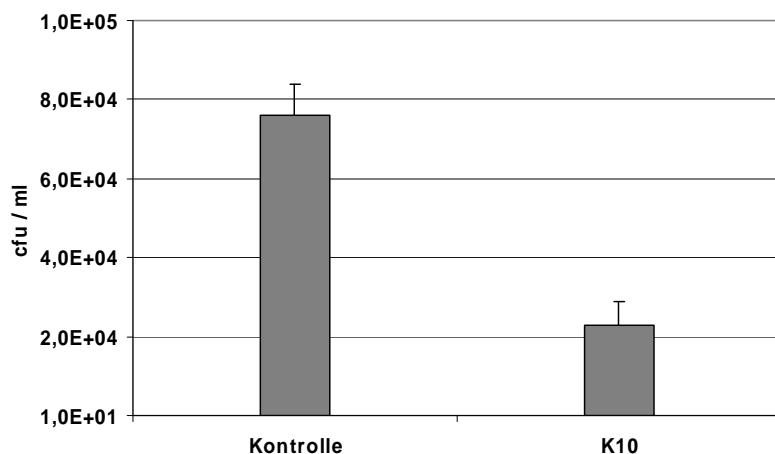
Zur weiteren Charakterisierung der bakteriziden Wirkung von K10 sollte in Ratten eine Reduktion der Zellzahl, in mit dem Protein behandelten Tieren im Vergleich zu unbehandelten Tieren, nach einer Staphylokokkeninfektion untersucht werden. Die Tiere erhielten jeweils 1 ml einer  $3,24 \times 10^6$  cfu/ml *Staphylococcus aureus* in PBS enthaltenden Zellsuspension. Die Therapie erfolgte direkt im Anschluss mit 16 mg/ml K10 bzw. Proteinpuffer. Nach 5 min, 60 min bzw. 360 min wurden die Tiere narkotisiert und getötet. Das anschließend hergestellte Heparinblut wurde mit Proteinase K versetzt (1/10; auf 1 mg/ml) und kurz bei RT inkubiert, bevor die Ausplattierung des Blutes und verschiedener Verdünnungsstufen (in  $\frac{1}{2}$  TBS-BSA) auf LB-Agar folgte (Doppelbestimmung je Tier und Verdünnung) (Abb. 4.42).



**Abb. 4.42** Zellzahl in Rattenblut zu verschiedenen Zeiten nach i.v. Infektion mit  $6,5 \times 10^7$  cfu *Staphylococcus aureus*. K10: den Tieren wurden 1min nach der Infektion 16 mg/kg Protein i.v. injiziert.

Die eingesetzte Zellzahl wurde nach 5 min im Blut wiedergefunden. Es konnte bei den Kontrolltieren eine Reduktion der Zellzahl um den Faktor  $10^3$  nach 60 min bzw.  $10^4$  nach 360 min festgestellt werden. Die Therapie mit K10 erbrachte nur eine Reduktion der Zellzahl um den Faktor 3 gegenüber den Kontrollen.

Zur Untersuchung der Zellzahl im Herzgewebe wurden die Herzen 6 h nach der Infektion präpariert und homogenisiert (1 g / 10 ml PBS). Anschließend wurde auch hier die Zellzahl durch Ausplattieren ermittelt (Abb. 4.43).



**Abb. 4.43** Zellzahl im Herzgewebe zu verschiedenen Zeiten nach i.v. Infektion mit  $6,5 \times 10^7$  cfu *Staphylococcus aureus*. K10: den Tieren wurden 1min nach der Infektion 16 mg/kg Protein i.v. injiziert.

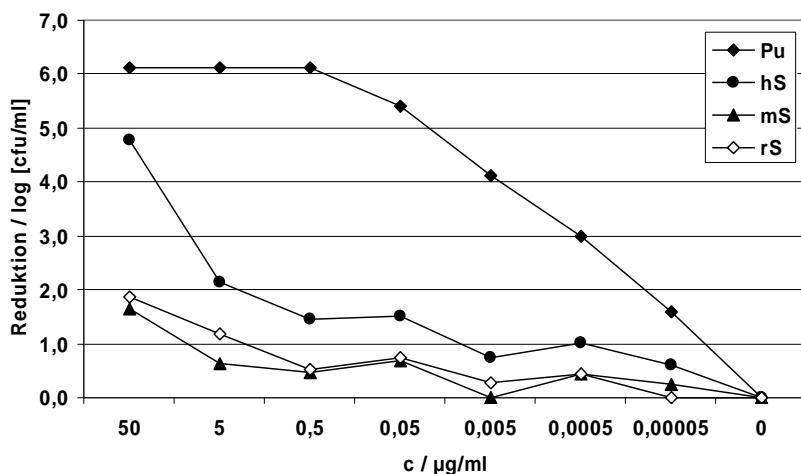
Nach 6h befanden sich im Herzgewebe unbehandelter Tiere  $7 \times 10^4$  cfu/g, während im Blut lediglich  $3 \times 10^2$  cfu/ml festgestellt wurden (vgl. Abb. 4.42). Die Behandlung mit K10 erbrachte auch hier lediglich eine Reduktion der Zellzahl um den Faktor 3.

Die Reduktion der Zellzahl um den Faktor 3 war für ein Überleben der Tiere im „weichen“ Modell ausreichend, während die Zellzahlverminderung für die i.p.-Infektion mit anschließender i.v.-Therapie zu gering war, um das Überleben zu gewährleisten.

Für K10 konnte weder in Zellkultur noch im Säuger eine toxische Wirkung nachgewiesen werden. Durch polyklonale Antikörper konnte die Aktivität des Proteins *in vitro* neutralisiert werden. Bei *in vivo* Untersuchungen in Mäusen konnte eine Neutralisation durch Immunserum i.p. immunisierter Tiere festgestellt werden. Serum i.v. immunisierter Tiere zeigte keine Tendenz zur Neutralisation von K10. Pharmakokinetische Untersuchungen in Ratten ergaben eine Halbwertszeit des Proteins von etwa 50 min. Diese konnte per Westernblot Analyse des Serums bestätigt werden. Ein Abbau des Wirkstoffs in Organen erfolgte nur in der Niere. Schließlich konnte eine Reduktion der Zellzahl im Blut und im Herzgewebe von Ratten, um den Faktor 3, festgestellt werden. Dies reichte in einem Tiermodell für eine Überlebensrate von 100% aus. In einem „härteren“ Modell konnte die Wirkung jedoch nicht bestätigt werden. Die zu geringe Wirksamkeit von K10 erforderte das Design neuer Moleküle mit erhöhter Aktivität.

#### 4.11 MBC-Vergleich in verschiedenen Sera

Für K10 konnte lytische Aktivität in Puffer und humanem Serum nachgewiesen werden. Zur Aufklärung der geringen *in vivo* Wirksamkeit wurde der Einfluss unterschiedlicher Sera auf die Vollständigkeit der Zellyse mittels MBC-Messung untersucht (Abb. 4.44).



**Abb. 4.44** Minimale Bakterizide Konzentration (MBC) von K10 gegen *Staphylococcus aureus* in (Pu) 20 mM Tris pH 7,5, 60 mM NaCl 2 mM CaCl<sub>2</sub> 10 mg/ml BSA; (hS) humanem Serum; (mS) Mausserum; rS (Rattenserum). Die Ordinate zeigt den Logarithmus der Reduktion der Zellzahl, während auf der Abszisse die eingesetzte Proteinkonzentration aufgetragen wurde.

Die MBC für K10 in Puffer liegt bei 0,5  $\mu\text{g/ml}$ . In humanem Serum reichen 50  $\mu\text{g/ml}$  nicht zur vollständigen Abtötung der Bakterien aus. Die stärkste Hemmung wurde jedoch in Ratten- bzw. Mäuseserum beobachtet. Der Einsatz von K10 sollte zwar als humanes Therapeutikum erfolgen, jedoch müsste das Protein für Tiermodelle auch in Rattenserum funktionieren. Die starke Hemmung der Aktivität in Sera von Ratten und Mäusen erklärt die geringe Wirksamkeit von K10.

## **4.12 Design neuer Moleküle zur Minimierung der Aktivitätshemmung**

In 4.10 wurde eine unzureichende Wirksamkeit des Proteins bei systemischer Anwendung gezeigt. Eine Ursache dafür wurde mit der Inhibition der Zellyseaktivität in Serum identifiziert (Abb. 4.11). Als Ursache der Hemmung des Enzyms in Serum kommt eine Inhibierung entweder des Bindepinzipis oder der aktiven Domäne in Frage.

### **4.12.1 Einführung einer neuen Zellwandbindedomäne**

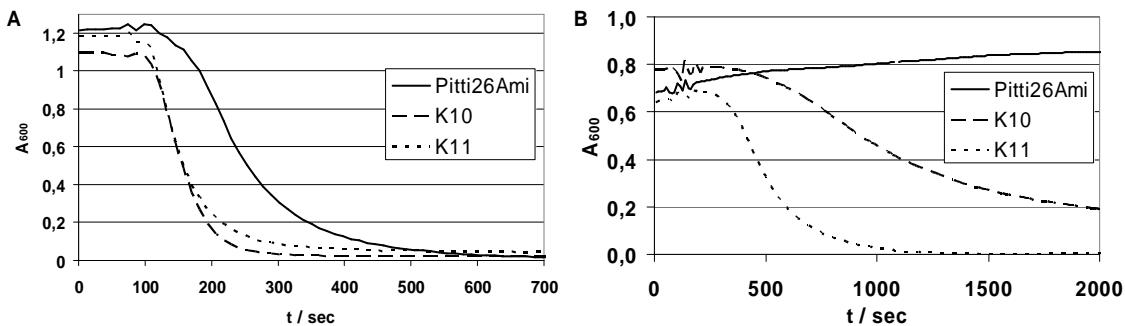
In einem ersten Ansatz wurde versucht eine andere CBD zu finden, welche die Aktivität des Proteins, unabhängig vom Medium, gewährleistet. Aus anderen Arbeiten (Profos intern) ging hervor, dass das Bacteriocin Lysostaphin eine sehr geringe unspezifische Bindung zeigt. Falls die Inhibition der Aktivität von K10 von der CBD verursacht wird, sollte durch die neue CBD eine Minderung der unspezifischen Bindung von Bestandteilen des Serums bzw. des Mucins erreicht werden können.

#### **4.12.1.1 Klonierung**

Die C-terminale Fusionierung der CBD aus Lysostaphin (CBDLS) (Baba & Schneewind, 1996) an die Amidase\_2-Domäne aus K10 erfolgte mittels Einführung einer Restriktionsschnittstelle. Die CBDLS wurde mit den Primern lyso-f und lyso-r amplifiziert und mit den Restriktionsenzymen *SacI* und *BamHI* verdaut. Der Vektor pET14b, der K10 enthielt wurde demselben Restriktionsverdau unterzogen, so dass die CBDusa300 ausgeschnitten wurde. Durch präparative Agarose-Gelelektrophorese konnte der geöffnete, CHAP-Ami\_2 aus K10 enthaltende Vektor von dem ausgeschnittenen Fragment getrennt werden. Nach Ligation mit der CBDLS erfolgte die Transformation in HMS174(DE3) kompetente Zellen. Die Klonierung wurde durch Sequenzierung überprüft. Das Genprodukt CHAP-Ami\_2K10-CBDLS wurde in K11 umbenannt.

#### **4.12.1.2 Lyseaktivität**

Das Protein K11 wurde nun im Flüssiglysetest (3.5.2.2) gegen *Staphylococcus aureus* auf seine Aktivität in Lysepuffer und in humanem Serum getestet (Abb. 4.45). Zum Vergleich wurden die Proteine Pitti26Ami und K10 mitgeführt.

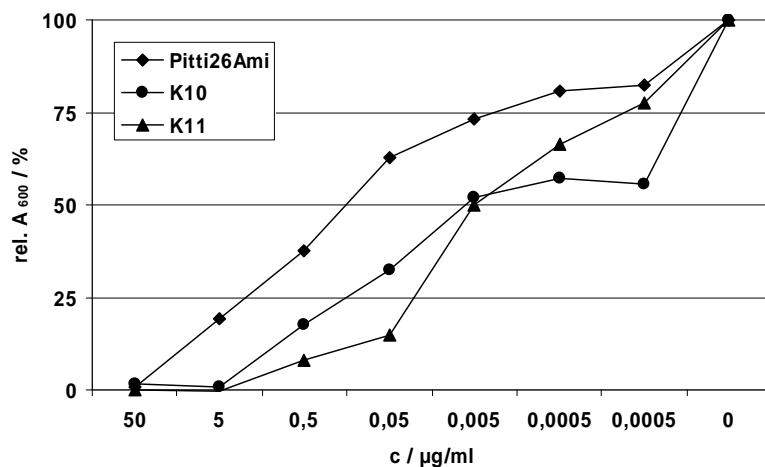


**Abb. 4.45** Flüssiglysetests gegen *Staphylococcus aureus* mit 10 µg/ml Protein in (A) Lysepuffer und (B) humanem Serum.

In Puffer wurde mit der eingesetzten Proteinmenge von 10 µg/ml mit allen drei Proteinen eine etwa gleich schnelle Zelllyse erreicht. Das Wildtyp-Endolysin Pitti26Ami zeigte in Serum keine Lyseaktivität. K10, welches die CBD aus Plyusa300 beinhaltet, lysisierte *Staphylococcus aureus* Zellen in Serum. Die Lysegeschwindigkeit in humanem Serum konnte, durch den erneuten CBD-Austausch zu K11 weiter gesteigert werden. Das Potential zur Zelllyse in Serum ist also stark von der CBD abhängig.

### 4.12.1.3 Minimale inhibitorische Konzentration

Nachdem eine Steigerung der Lysegeschwindigkeit im Flüssiglysetest nachgewiesen werden konnte, wurde das jeweilige Potential von Pitti26Ami, K10 und K11 zur Inhibition des Zellwachstums von *Staphylococcus aureus* in Peptonwasser, mittels MIC-Test (3.5.2.4) untersucht (Abb. 4.46).

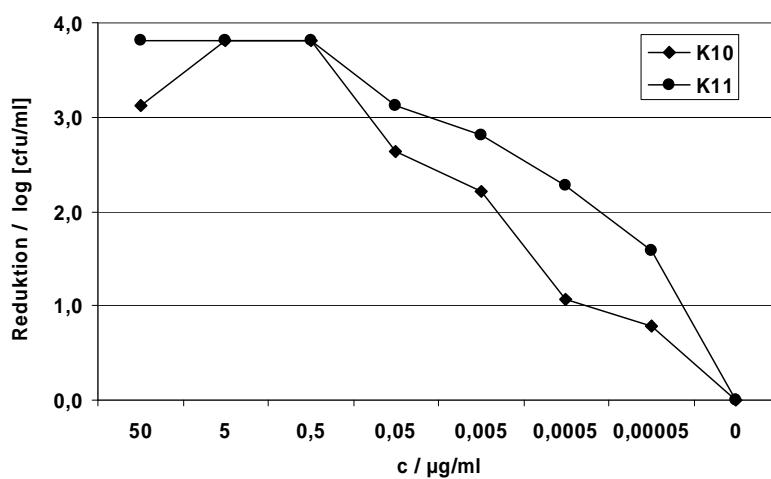


**Abb. 4.46** Bestimmung der minimalen inhibitorischen Konzentration (MIC) gegen *Staphylococcus aureus* nach 28h Inkubation in Peptonwasser bei 30°C.

Hierbei zeigte sich, dass die MIC von K10 (5 µg/ml) auf etwa 10% des Wertes von Pitti26Ami (50 µg/ml) gesenkt werden konnte. Der erneute CBD-Austausch gegen die CBDLS erbrachte keine Steigerung der minimalen inhibitorischen Konzentration.

### 4.12.1.4 **Minimale bakterizide Konzentration**

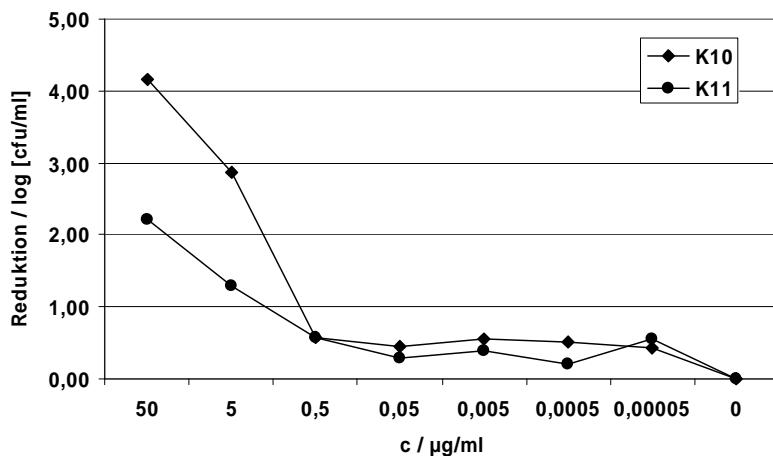
Ein potentieller Wirkstoff muss nicht nur in der Lage sein, das Wachstum der Zielorganismen zu hemmen, sondern er muss sie auch effizient abtöten können. Darum wurde die bakterizide Wirkung der beiden Kandidatenproteine K10 und K11 über die Bestimmung der MBC (3.5.2.3) ermittelt (Abb. 4.47). Es wurden  $6,5 \times 10^3$  cfu/ml eingesetzt.



**Abb. 4.47** Bestimmung der minimalen bakteriziden Konzentration gegen *Staphylococcus aureus* DSMZ11823 in Puffer.

Die geringere Reduktion bei der höchsten Konzentration von K10 ist auf eine Kontamination des Ansatzes zurückzuführen. Beide Proteine sind in der Lage mit 0,5 µg/ml die Zellzahl um 3,8 log[cfu/ml] zu reduzieren, d.h. es konnten keine Zellen mehr nachgewiesen werden. Die Lyse ist damit vollständig. Die MBC liegt für beide Proteine gegen den getesteten Stamm in Puffer bei 0,5 µg/ml.

Im Anschluss wurde eine MBC-Messung in humanem Serum vorgenommen (Abb. 4.48). Es wurden  $1,45 \times 10^4$  cfu/ml *Staphylococcus aureus* eingesetzt.

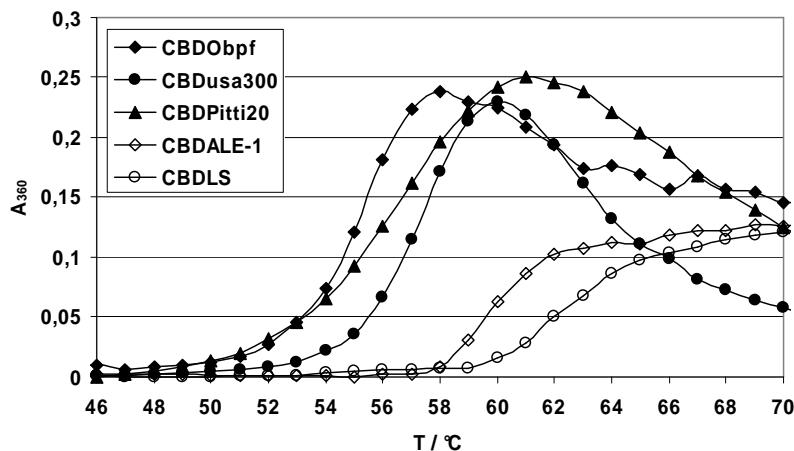


**Abb. 4.48** Bestimmung der minimalen bakteriziden Konzentration gegen *Staphylococcus aureus* in humanem Serum.

Mit 50  $\mu\text{g/ml}$  K10 konnten alle Staphylokokkenzellen abgetötet werden. In 4.12.1.2 konnte eine schnellere Lyse von *Staphylococcus aureus* in Serum durch K11 im Vergleich zu K10 festgestellt werden. Aus der MBC-Messung geht jedoch hervor, dass wesentlich mehr K11 benötigt wird, um eine vollständige Lyse zu erzielen. Die Aktivität von K11 wird in Serum stärker inhibiert, als die von K10.

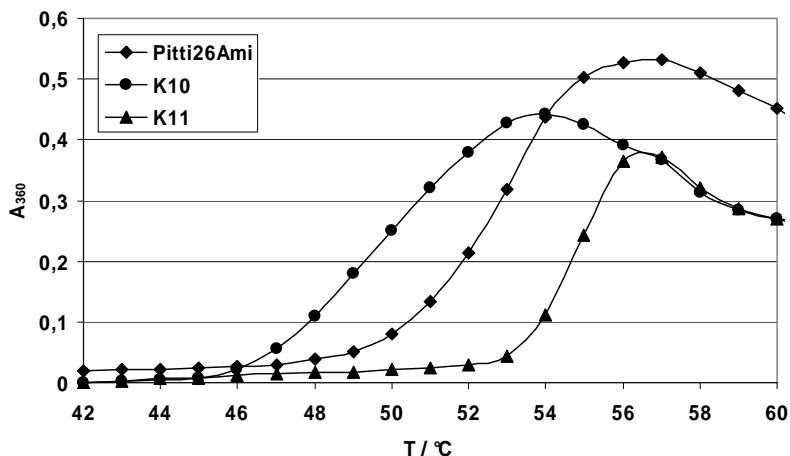
#### 4.12.1.5 **Stabilität**

In einer früheren Phase wurden, zur Charakterisierung einiger CBDs, deren Aggregationsübergänge aufgenommen (Abb. 4.49). Als Kandidaten wurden die CBDs aus den selbstgewonnenen Endolysinen Plyusa300, PlyObpf und Pitti20Ami, sowie die bereits veröffentlichten Zellwandbindedomänen aus Lysostaphin (LS) (Baba & Schneewind, 1996) und dem dazu homologen ALE-1 (Sugai *et al.*, 1997) gewählt. Alle CBDs wurden mit N-terminalem Js-Protein-Tag kloniert und über eine Streptavidinsäule gereinigt (3.3.2.4).



**Abb. 4.49** Zunahme der Lichtstreuung durch Aggregatbildung der Proteine bei steigender Temperatur. Gemessen wurde die Absorption bei 360 nm. Getestet wurden CBDs mit N-terminalem Js-Protein-Tag.

Die CBDs der drei Eigenisolate zeigten eine geringere Stabilität, während CBDALE-1 und CBDLS erst bei einer höheren Temperatur (ca. 4°C bis 6°C) zu aggregieren begannen. K11 wurde ebenfalls auf thermische Stabilität hin untersucht. Hierzu wurde ein Aggregationsübergang in Puffer ohne Arginin durchgeführt (Abb. 4.50).

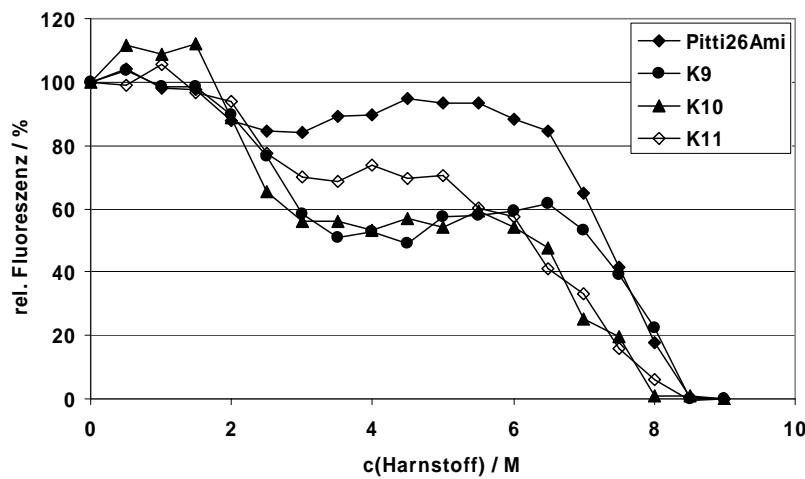


**Abb. 4.50** Zunahme der Lichtstreuung durch Aggregatbildung der Proteine bei steigender Temperatur. Gemessen wurde die Absorption bei 360 nm.

Die um ca. 6°C höhere thermische Stabilität der CBD LS im Vergleich zur CBDusa300 konnte auf das Gesamtprotein übertragen werden. K11 aggregiert sogar bei einer, um etwa 3°C höheren Temperatur als das Wildtyp-Endolysin Pitti26Ami.

Im Anschluss an die Aggregationsmessungen wurde die chemische Stabilität per Harnstoffübergang (3.4.5) der Proteine Pitti26Ami, K9, K10 und K11 verglichen (Abb. 4.51). Alle Konstrukte zeigen, im Gegensatz zum Wildtyp-Protein, einen zweiphasigen Übergang. Pitti26Ami denaturiert zwischen 7,5 und 8 M Harnstoff. Der

erste Übergang liegt bei K9, K10 und K11 zwischen 2 und 2,5 M Harnstoff. Der zweite Übergang von K10 und K11 befindet sich bei ca. 7 M, während K9 erst bei 7,5-8 M Harnstoff komplett denaturiert.



**Abb. 4.51** Harnstoffübergang des Wildtypproteins Pitti26Ami und der Konstrukte K9, K10 und K11 in 25 mM Tris, pH 7,5, 10 mM Citrat, 10 mM CaCl<sub>2</sub>, 300 mM Arginin. Die exzitatorische Wellenlänge betrug 280nm. Das emittierte Licht wurde bei 323nm detektiert und normiert.

Durch Austausch der CBD konnte die thermische Stabilität um ca. 6°C gesteigert werden. Außerdem konnte die Lysegeschwindigkeit in humanem Serum gegenüber K10 erhöht werden. Die MBC-Werte von K11 liegen jedoch im Bereich von K10. Hier konnte keine signifikante Verbesserung erzielt werden. Die bakterizide Wirkung von K11 ist in humanem Serum sogar geringer, als die von K10. Die Inhibition der Enzymaktivität in Serum ist also nur zum Teil auf die CBD zurückzuführen. Deshalb wurde versucht, die Hemmung in Serum durch die Verwendung einer anderen EAD zu minimieren.

### 4.12.2 Verwendung anderer EADs

Da die Hauptaktivität der beiden enzymatisch aktiven Domänen, wie in 4.4.2 gezeigt, in der CHAP-Domäne liegt, bot sich diese Domäne für einen Austausch gegen eine andere, in Serum weniger gehemmte CHAP-Domäne an. Bei der Analyse des veröffentlichten Genoms von *Staphylococcus aureus* USA 300, Stamm FPR3757 (Diep *et al.*, 2006) konnten 11 Kandidaten identifiziert werden. Nach Erstellung spezifischer Klonierungsprimer für diese Sequenzen, erfolgte die Amplifikation mittels PCR (3.2.3) aus der bakteriellen DNA. Nach der Ligation (3.2.5.2) über *Ncol/BamHI* in den Vektor pET14b, anschließender Transformation (3.2.6) in kompetente

*Escherichia coli* Zellen des Stammes HMS174(DE3) erfolgte die Expression im 1L-Maßstab. Einige Konstrukte wiesen eine zu schwache Expression auf. Die gut exprimierten Konstrukte wurden im Plattenlysetest (3.5.2.1) gegen *Staphylococcus aureus* getestet. Da bei verschiedenen Endolysinen die Hauptaktivität in der CHAP-Domäne lokalisiert ist (Yokoi *et al.*, 2005; Donovan *et al.*, 2006a; Donovan *et al.*, 2006b) wurden anschließend zwei CHAP-Domänen (CHAPusa7 und CHAPusa9) einzeln kloniert, exprimiert und im Flüssiglysetest (10 µg/ml Protein, Lysepuffer) gegen *Staphylococcus aureus* untersucht (Tab. 4.14). Die CHAP-Domäne aus K10 (CHAP10) wurde zum Vergleich mitgetestet. Die spezifische Lyseaktivität von CHAPusa7 war etwa sechsmal höher, als die von CHAP10. Die Domäne CHAPusa9 hingegen zeigte eine sehr schwache Aktivität. Eine Zellwandbindedomäne ist nicht essentiell für die Zelllyse, erhöht jedoch die Aktivität (Donovan *et al.*, 2006b). Zur Steigerung der Substrataffinität wurde nun C-terminal an die getesteten CHAP-Domänen jeweils die CBDLS fusioniert. Die erhaltenen Konstrukte wurden anschließend ebenfalls im Flüssiglysetest untersucht (Tab. 4.14). Bei CHAPusa9-CBDLS konnte keine lytische Aktivität festgestellt werden. Im Falle von CHAPusa7-CBDLS konnte durch die Zellbindedomäne eine zehnfache Steigerung der Spezifischen Lyseaktivität gegenüber der CHAPusa7-Domäne allein erreicht werden. Dies entsprach dem Dreifachen der Aktivität von CHAP10-CBDLS.

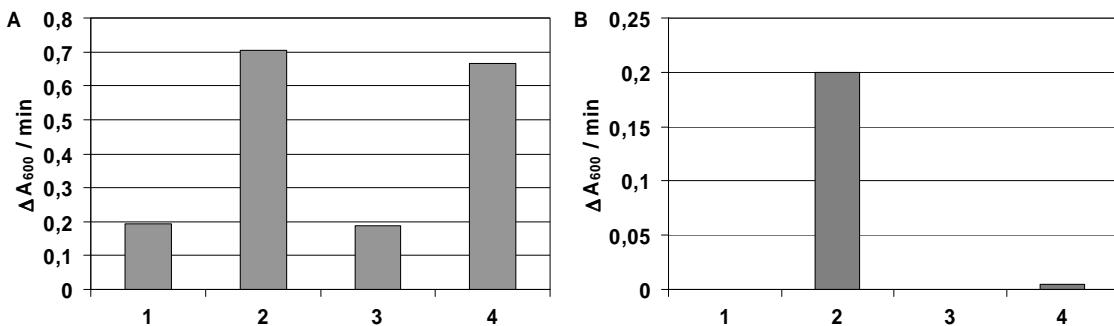
**Tab. 4.14** Spezifische Aktivität einzelner CHAP-Domänen und der Konstrukte mit CBDLS gegen *Staphylococcus aureus* aus dem Flüssiglysetest. 10 µg/ml Protein, Lyse in ½ TBS.

| Protein  | dAbs/min  / mg | Protein        | dAbs/min  / mg |
|----------|----------------|----------------|----------------|
| CHAP10   | 2,8            | CHAP10-CBDLS   | 57,2           |
| CHAPusa7 | 17,8           | CHAPusa7-CBDLS | 185            |
| CHAPusa9 | 0,5            | CHAPusa9-CBDLS | 0              |

Das Konstrukt CHAPusa7-CBDLS schien ein viel versprechendes Kandidatenprotein zu sein und wurde in K12 umbenannt.

Ein weiterer Ansatz war die Verwendung der EAD aus Fab25. Fab25 ist ein Endolysin aus einem lytischen *Enterococcus faecalis*-Phagen, welches im Rahmen einer Doktorarbeit bei der Profos AG isoliert wurde (Dissertation Bretfeld, noch unveröffentlicht). Für die EAD aus Fab25, eine Amidase\_2, wurde im ELISA-Zellwandlysetest (3.5.2.2) eine lytische Aktivität gegen Staphylokokken-Zellwände festgestellt. Außerdem war das Protein in der Lage *Enterococcus faecalis* und *Enterococcus faecium* in Puffer zu lysieren. Die Intention für die Verwendung dieser

Domäne war die eventuelle Kreation eines Endolysins, welches gattungsübergreifend, sowohl gegen Staphylokokken als auch gegen Enterokokken aktiv ist. Es wurden also weitere Konstrukte aus N-terminaler CHAP, zentraler Amidase und C-terminal gelegener CBD implementiert. Alle Konstrukte wurden in pET14b ligiert und in kompetente *Escherichia coli* HMS174(DE3) transformiert. Da alle getesteten Konstrukte unlöslich exprimiert wurden, folgte die Solubilisierung (3.3.1.2) und Rückfaltung (3.3.1.3). Zur schnellen, prinzipiellen Kontrolle der Funktionalität wurden 100 µl des Rückfaltungsansatzes direkt in den Flüssiglysetest eingesetzt (Abb. 4.52).



**Abb. 4.52** Flüssiglysetest neuer Konstrukte gegen *Staphylococcus aureus* in (A) Lysepuffer bzw. (B) BHI-Medium. Es wurden 100 µl des Rückfaltungsansatzes eingesetzt. (1) CHAPusa4-AmidaseK10-CBDLS, (2) CHAPusa7-AmidaseK10-CBDLS, (3) CHAPusa4-EADFab25-CBDLS, (4) CHAP10-EADFab25-CBDLS.

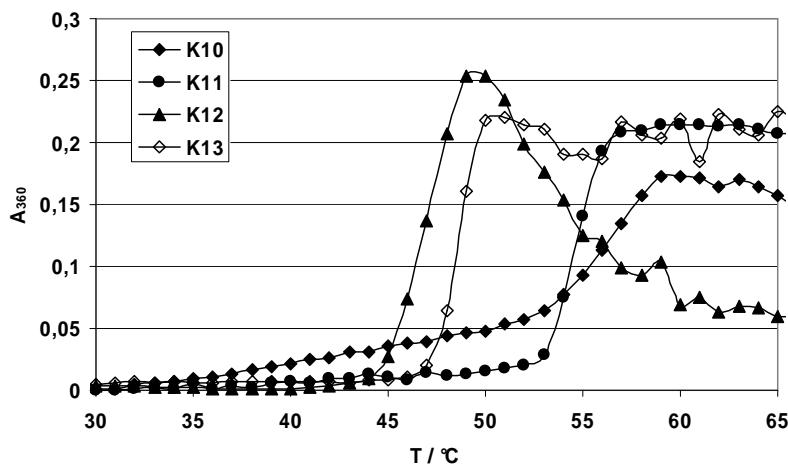
In Puffer lysierten alle vier Proteine die Zellen, wobei die Konstrukte mit der CHAPusa4 im Vergleich zu den Konstrukten mit CHAPusa7 bzw. CHAP10 erwartungsgemäß eine geringere Aktivität aufwiesen. In BHI-Medium konnte nur bei dem Konstrukt, welches die CHAPusa7-Domäne enthielt, eine lytische Aktivität festgestellt werden. Aufgrund dieser Tatsache könnte das Konstrukt CHAPusa7-AmidaseK10-CBDLS ebenfalls ein guter Kandidat für eine antimikrobielle Anwendung sein. Es wurde für weiterführende Untersuchungen in K13 umbenannt.

#### 4.13 Charakterisierung der Kandidatenproteine

Die Proteinstabilität und Aktivität stellten die Entscheidungskriterien für die Auswahl eines Therapeutikums dar, weshalb die Kandidatenproteine K10, K11, K12 und K13 auf diese Eigenschaften hin vergleichend untersucht wurden.

##### 4.13.1 Thermische Stabilität

Zur Evaluation der thermischen Stabilität der Kandidatenproteine K10, K11, K12 und K13 wurde ein Aggregationsübergang (3.4.7) gemessen (Abb. 4.53). Die Proteine wurden auf eine Konzentration von 1 mg/ml in 20 mM Hepes, pH 6,0, 20 mM Natriumcitrat und 500 mM L-Arginin verdünnt. Die Heizrate betrug 1°C/min und die Absorption wurde im UV-/Vis-Photometer (V650, Jasco Corporation, Tokyo) bei 360nm verfolgt.

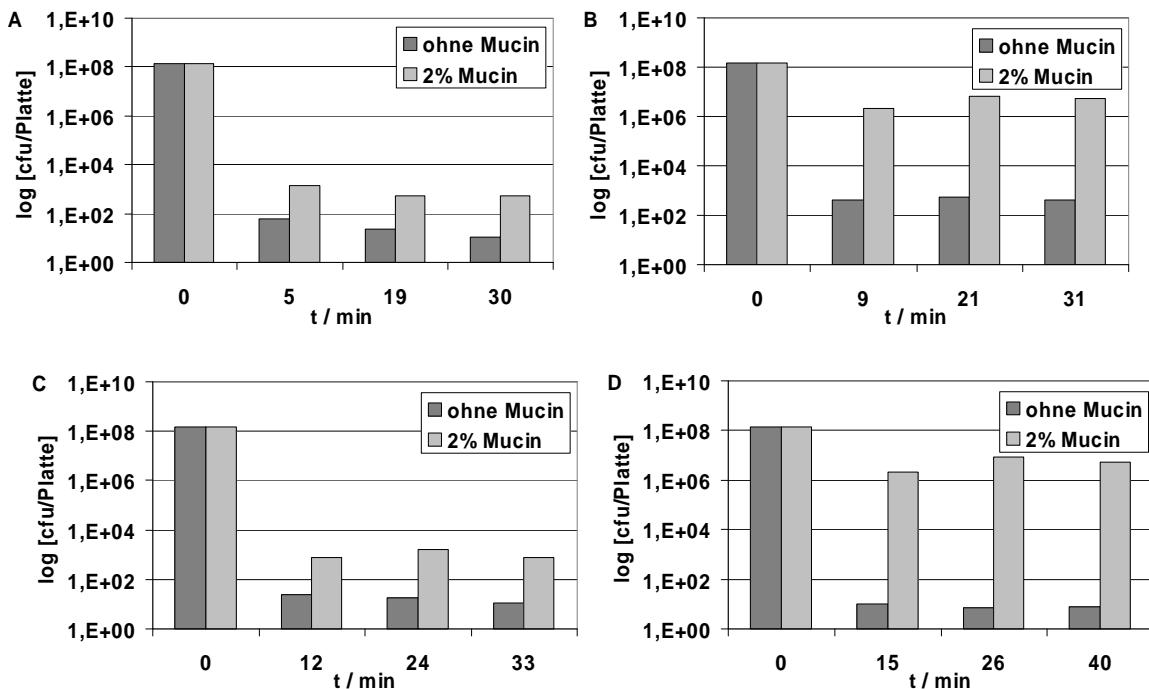


**Abb. 4.53** Zunahme der Lichtstreuung durch Aggregatbildung der Proteine bei steigender Temperatur. Gemessen wurde die Absorption bei 360 nm. Getestet wurden die Proteine K10, K11, K12 und K13.

Die Aggregation von K10 und K11 begann bei ca. 53°C, wobei der stabilisierende Effekt von Arginin auf K10 (4.9.2) nicht außer Acht gelassen werden sollte. Ohne Arginin aggregierte K10 bei ca. 46°C (vgl. Abb. 4.29). Der Austausch der CHAP-Domäne in den Varianten K12 und K13 destabilisierte das Protein im Vergleich zu K11. Der Beginn der Aggregation lag für K12 bei etwa 45°C und für K13 bei 47°C.

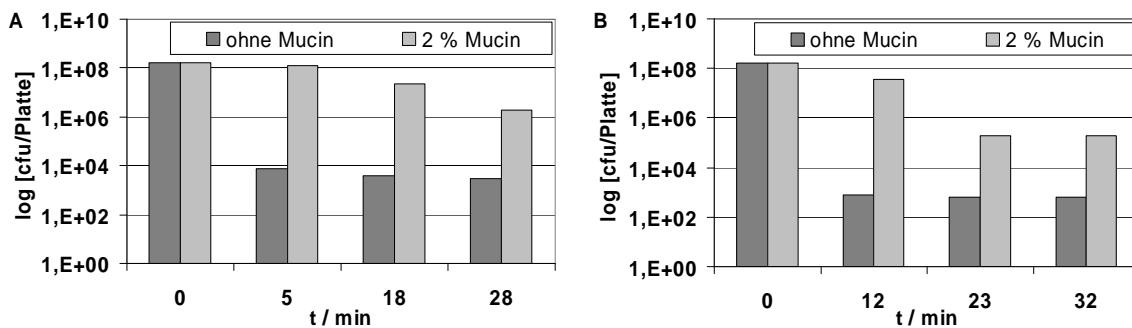
#### 4.13.2 Lyseaktivität

Die Kandidatenproteine wurden auf ihre Lyseaktivität in Mucin untersucht. Dazu wurde *Staphylococcus aureus* in BHI bis zu einer  $OD_{600}$  von 0,8 angezogen. Nach Zentrifugation von 2 x 5 ml erfolgte die Resuspension der Pellets in je 5 ml sterilfiltriertem  $\frac{1}{2}$  TBS bzw.  $\frac{1}{2}$  TBS mit 2% Mucin. Zu je 500  $\mu$ l Zellen wurden 0,01 mg/ml PRF100, PRF101, PRF102 oder PRF103 gegeben. Nach einer Lysezeit zwischen 5 und 30 Minuten wurden je 100  $\mu$ l unverdünnt oder in einer  $10^4$  Verdünnung auf MSA-Agar ausplattiert. Nach Inkubation der Platten über Nacht bei 37°C, erfolgte die Bestimmung der Kolonienzahl (Abb . 4.54).



**Abb. 4.54** *Staphylococcus aureus* Koloniezahl nach verschiedenen Zeiten der Lyse durch (A) K10, (B) K11, (C) K12 oder (D) K13 in  $\frac{1}{2}$  TBS bzw. in  $\frac{1}{2}$  TBS mit 2% Mucin. Es wurden Zellen der spätexponentiellen Wachstumsphase verwendet.

K11 besitzt die schwächste Lyseaktivität, da selbst nach 31 min, ohne Mucin noch 400 cfu/Platte gezählt wurden, während bei Lyse durch die anderen Proteine nach etwa 30 min nur ca. 10 Kolonien vorhanden waren. Die Proteine K11 und K13 werden sehr stark durch Mucin gehemmt. Die Inhibition von K10 und K12 durch Mucin ist etwa gleich stark. Daher wurde der Test mit diesen Proteinen wiederholt, wobei durch Verwendung von *Staphylococcus aureus* Zellen der stationären Wachstumsphase (Ernte bei  $OD_{600} = 4,2$ ) stringenter Bedingungen geschaffen wurden (Abb. 4.55).

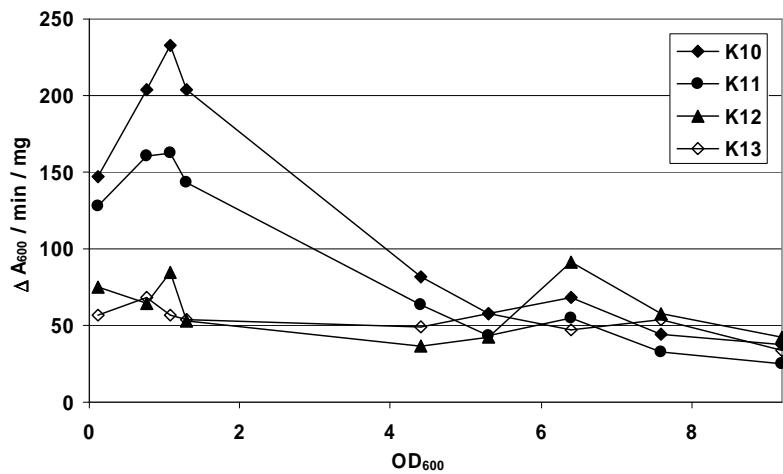


**Abb. 4.55** *Staphylococcus aureus* Koloniezahl nach verschiedenen Zeiten der Lyse durch (A) K10 und (B) K12 in  $\frac{1}{2}$  TBS bzw. in  $\frac{1}{2}$  TBS mit 2% Mucin. Es wurden Zellen der stationären Wachstumsphase verwendet.

Während die Zellzahl mit K10 in Mucin auf ca.  $2 \times 10^5$  gesenkt werden konnte, wurde durch K12 eine Reduktion auf etwa  $2 \times 10^4$  erreicht. In diesem Versuch zeigte sich die, im Vergleich zu K10, etwas geringere Hemmung von K12 durch Mucin.

### 4.13.3 Wachstumsphasenabhängigkeit der Lyse

Zur Untersuchung der Abhängigkeit der Lyseaktivität von der Wachstumsphase der zu lysierenden Zellen, wurden *Staphylococcus aureus* Zellen in BHI-Medium angezogen und bei verschiedenen OD<sub>600</sub> Werten durch Zentrifugation geerntet. Anschließend erfolgte die Resuspension in  $\frac{1}{2}$  TBS, wobei der OD<sub>600</sub> Wert auf 1 eingestellt wurde. Nun erfolgte die Bestimmung der spezifischen Aktivität per Flüssiglysetest (3.5.2.2) mit den Proteinen K10, K11, K12 und K13 (Abb. 4.56).



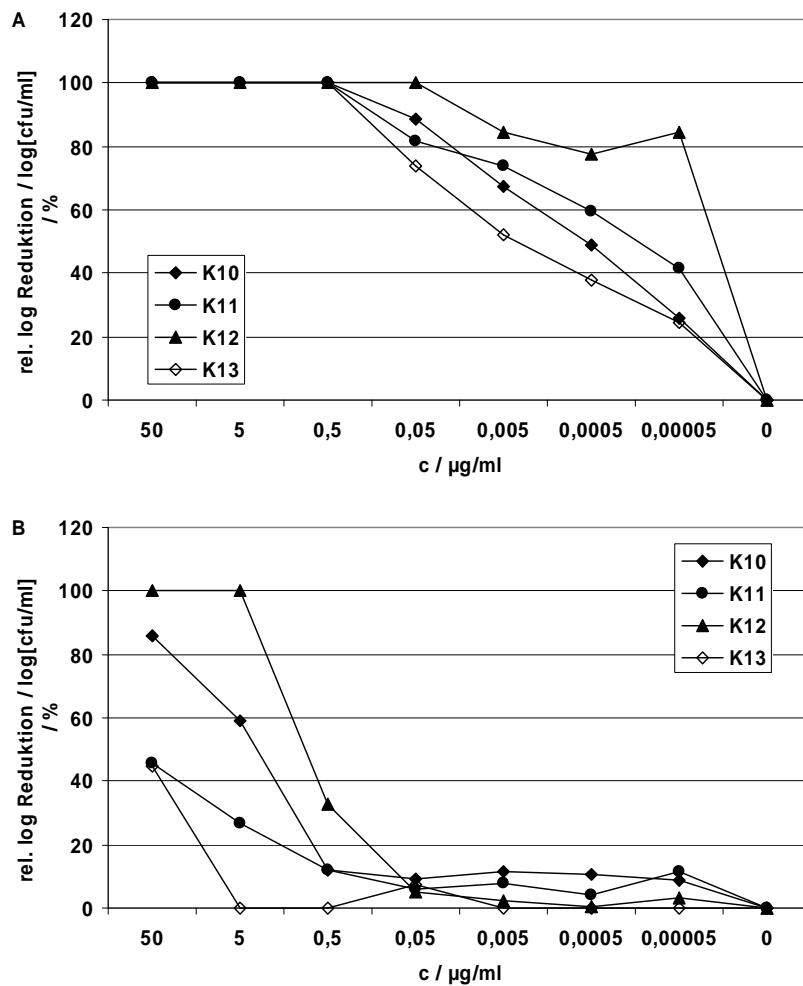
**Abb. 4.56** Im Flüssiglysetest gegen *Staphylococcus aureus* ermittelte spezifische Aktivitäten in Abhängigkeit von der Wachstumsphase der zu lysierenden Zellen.

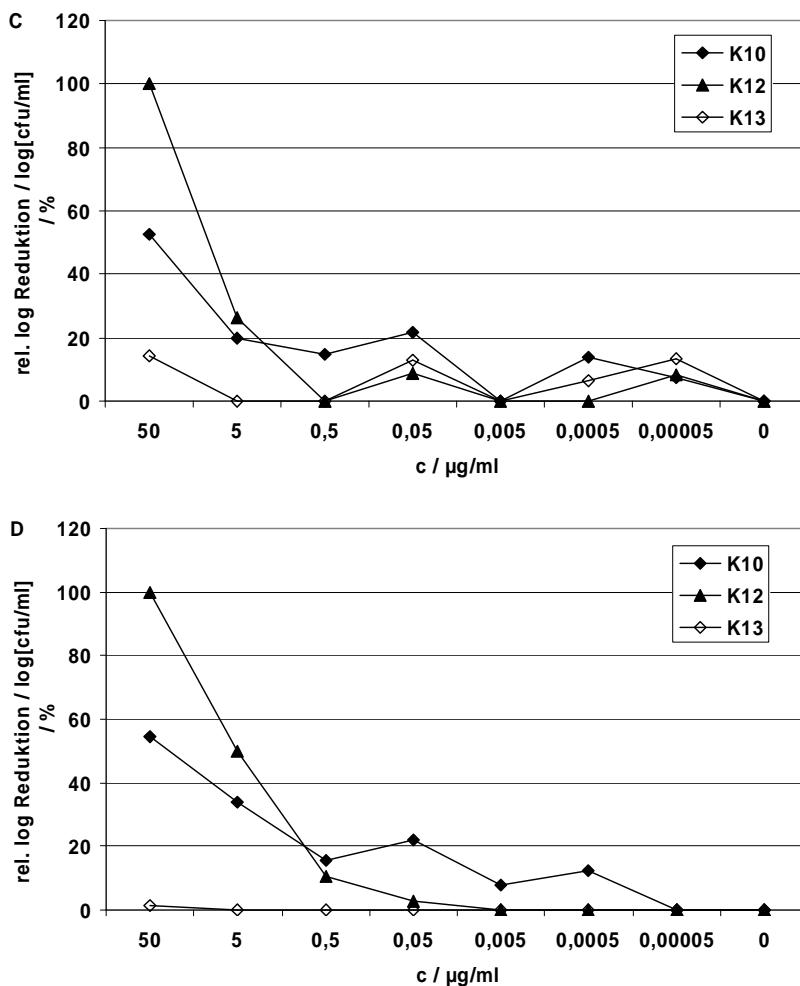
Mit K10 und K11 konnten in der exponentiellen Wachstumsphase (OD<sub>600</sub> zwischen 0,5 und 2,5) die höchsten Lyseaktivitäten erzielt werden. In der stationären Phase (OD<sub>600</sub> > 4) zeigten beide Proteine eine starke Abnahme der spezifischen Aktivität.

Mit Austausch der CHAP-Domäne in den Proteinen K12 und K13 wurde die spezifische Aktivität in Lysepuffer verringert, eine starke Abhängigkeit von der Wachstumsphase konnte hier jedoch nicht festgestellt werden.

### 4.13.4 Minimale bakterizide Konzentration

Zur Validierung der bakteriziden Aktivität wurden MBC-Messungen (3.5.2.3) in Puffer (½ TBS), humanem, Mäuse- und Rattenserum durchgeführt (Abb. 4.57).





**Abb. 4.57** Bestimmung der minimalen bakteriziden Konzentration gegen *Staphylococcus aureus* in (A)  $\frac{1}{2}$  TBS, (B) humanem Serum, (C) Mäuseserum und (D) Rattenserum. Die Reduktion der Zellzahl wurde logarithmiert und auf den höchsten erreichten Wert normiert.

K12 erwies sich sowohl in Puffer, als auch in allen Sera als das Protein mit der größten bakteriziden Aktivität. Mit  $0,05 \mu\text{g/ml}$  K12 konnte in Puffer eine vollständige Reduktion der Zellzahl erreicht werden, während bei allen anderen getesteten Proteinen  $0,5 \mu\text{g/ml}$  für eine vollständige Zelllyse benötigt wurden. In humanem Serum konnte die Zellzahl ausschließlich mit K12 vollständig reduziert werden. In Serum aus Ratten und Mäusen wurde mit K12 die deutlich höchste Lyseaktivität erreicht. Da kein Plateau ersichtlich ist, müsste die MBC mit höheren Protein-Konzentrationen weitergeführt werden, um die Vollständigkeit der Zellzahlreduktion sicher zu belegen. K11 und K13 werden in humanem Serum stark gehemmt. K13 zeigte in Rattenserum keine Aktivität mehr. Als Kandidaten für ein antibakterielles Therapeutikum bleiben nur K10 und K12 übrig, wobei K12 das Enzym ist, welches am wenigsten gehemmt wird.

## 5 Zusammenfassende Diskussion

### 5.1 Gewinnung unlöslich exprimierter Proteine

Unlöslich in *inclusion bodies* exprimierende Proteine müssen aus den Einschlussskörperchen solubilisiert und anschließend rückgefaltet werden (Singh & Panda, 2005). Die Renaturierung läuft in der Regel in langsamem und schnellen Phasen ab. Geht man von der Hierarchie der Proteinstruktur aus, sollten sich zuerst Interaktionen über kurze Strecken bilden (Sekundärstruktur), gefolgt von Wechselwirkungen zwischen entfernt voneinander lokalisierten Bereichen (Tertiärstruktur). Zur Ausbildung der Tertiärstruktur sind hoch spezifische Kontaktflächen erforderlich. Darum wird davon ausgegangen, dass dies eine späte Phase der Strukturbildung ist (Jaenicke, 1987). Zur Bewertung der korrekten Faltung eines renaturierten Proteins dienen Experimente zur Funktionalität (katalytische Aktivität und Binde-eigenschaften). Weiterhin kann die Konformation mit spektroskopischen Methoden untersucht werden. Beide Ansätze wurden in dieser Arbeit genutzt. Zum einen wurde die Optimierung des Rückfaltungsprozesses von Pitti26Ami durch Messung der lytischen Aktivität evaluiert (4.3.2). Zum anderen konnte im Falle von K10, durch die unterschiedlichen Bindeeigenschaften der beiden Faltungsspezies an die Heparinsäule eine Abtrennung der nicht korrekt gefalteten, da nicht aktiven Spezies erreicht werden (4.7). Dies wurde sowohl durch Rechromatographie (4.7), als auch durch den, bei renaturiertem Protein festgestellten, Aktivitätsunterschied zwischen vollständiger Denaturierung mit 6M GdnHCl und unvollständiger Denaturierung mit 8M Harnstoff bestätigt (4.9.4). Der Unterschied der Vollständigkeit der Denaturierung konnte per CD-Spektroskopie verfolgt werden (4.9.4). Die korrekte Faltung der Bindedomäne zeigt sich auch an der erzielten spezifischen Aktivität des rückgefalteten Proteins. Diese liegt im Beispiel von K12 bei etwa dem 10-fachen Wert der Aktivität der CHAPusa7 Domäne allein (Tab. 4.14). Die Erhöhung der Substratspezifität kann nur durch eine korrekt gefaltete CBD vermittelt werden.

Ist eine Rückfaltungsprozedur etabliert, bringt die Reinigung von K10 aus Einschlussskörperchen einige Vorteile im Vergleich zur Reinigung löslicher Proteine: Dies sind vor allem eine hohe Ausbeute an Zielprotein und ein Vorreinigungsschritt durch Abtrennung der Proteine im *inclusion body* von der löslichen Fraktion des Zellaufschlusses. Die höhere Ausbeute ergibt sich schon während der Expression in *Escherichia coli*. Bei der Expression löslicher Proteine muss die Anzucht der Zellen

oft bei niedriger Temperatur erfolgen, um eine korrekte Faltung in der Zelle zu gewährleisten. Zur Vermeidung von Proteinaggregaten und um das Protein in Lösung zu halten, kann häufig nur eine begrenzte Expressionszeit genutzt werden. Dies ist die Limitierung der Proteinausbeute. Die Proteinexpression in *inclusion bodies* kann bei 37°C über mehrere Generationszeiten erfolgen. Der kritische Schritt ist hier die Ausbeute korrekt gefalteten Proteins im Renaturierungsprozess. So konnten nach der Rückfaltung nur 30% aktives K10 erhalten werden (4.7). Da dieser Prozess der limitierende Schritt in der Proteinherstellung ist, hat eine Optimierung der Renaturierung in diesem Falle einen bedeutenden Einfluss auf die Ausbeute und damit auf die Effizienz des Herstellungsprozesses.

### 5.2 Identifizierung lytischer Proteine

Am Anfang der Arbeit konnten zehn lytische Bakteriophagen isoliert werden (4.1). Durch Homologiesuche wurden drei Endolysine identifiziert und anschließend isoliert (4.2). Da jeder lytische Phage ein Enzym benötigt, welches die Freisetzung des Phagen aus der Wirtszelle (und damit die Plaquebildung) verursacht, stellen die isolierten Phagen eine Quelle für weitere lytische Proteine dar. Mit der Suche nach homologen Regionen konnten ausschließlich Enzyme mit bereits bekannten Aktivitätsdomänen erkannt werden. Da Endolysine im Phagengenom meist nahe der Integrase, einem Enzym zur Integration des Phagengenoms in das Wirtsgenom, codiert sind stellt die Expression von *Open Reading Frames* (ORFs) dieser Region einen anderen Ansatz zur Identifizierung lytischer Proteine dar. Hierbei sollten gerade ORFs exprimiert werden, die keine Homologie zu bekannten EADs aufweisen. Ein weiterer Ansatz für die Identifizierung von Proteinen mit neuen Aktivitätsdomänen ist die Entwicklung eines aktivitätsbasierten *Screening*-Verfahrens in Kombination mit einer Expressionsbank (Phagen- oder Metagenom).

Weitere Proteine, welche Bindungen im Peptidoglycan hydrolysieren, sind Autolysine, Bacteriocine oder lytische Tailfiberproteine. Zum Beispiel wurde im Staphylokokkenphagen Phi12 ein Tailfiberprotein mit einer M23 Peptidase-Domäne und einer Lysozym-ähnlichen Domäne am C-Terminus identifiziert (gi|29028657|ref|NP\_803346.1|). Tailfiberproteine sind aufgrund ihrer Lage ständig Umwelteinflüssen ausgesetzt. Deshalb kann für sie eine hohe Stabilität erwartet werden.

Pitti26Ami ist ein Endolysin, welches aus dem *Staphylococcus aureus*-Phagen Pitti26 isoliert und gereinigt werden konnte. Das Protein besteht aus zwei lytisch aktiven (CHAP, Ami\_2) und einer C-terminalen Zellwandbindedomäne (SH3b). Nach Etablierung von Verfahren zur Aufreinigung des Enzyms aus *inclusion bodies* (4.3) wurde eine spezifische lytische Aktivität von  $40\Delta A_{600}/(\text{min}\cdot\text{mg})$  gegen *Staphylococcus aureus* im Flüssiglysetest in Lysepuffer nachgewiesen. In humanem Serum konnte jedoch keine lytische Aktivität detektiert werden. Deshalb wurde eine Optimierung des Proteins durchgeführt.

### **5.3 Proteinoptimierung durch Modulshuffling und Einzelmutationen**

Endolysine sind modular organisiert. Der durch diesen Aufbau ermöglichte Austausch von Domänen wird als Prinzip der Evolution diskutiert. Funktionelle chimäre Proteine erlauben Bakteriophagen und ihren Wirtsbakterien die Adaptation an Umweltveränderungen (Díaz *et al.*, 1991). Experimentell wurde die Generierung neuer Proteine aus Teilen vorhandener Proteine bestätigt, da einzelne Module austauschbar sind und funktionell bleiben (Díaz *et al.*, 1990). Ein Domänenaustrausch ist auch zwischen Proteinen, welche keine Sequenzhomologie aufweisen, möglich (Díaz *et al.*, 1991). Das natürliche Vorkommen chimärer Proteine intergenerischen Ursprungs wurde am Beispiel von Pal, einem Peptidoglycan abbauenden Enzym aus dem *Streptococcus pneumoniae*-Phagen Dp-1, gezeigt. Die N-terminale Domäne ähnelt einer Murein-Hydrolase des *Lactococcus lactis* Phagen BK5-T, während der C-Terminus Homologie zur Cholinbindedomäne lytischer Enzyme aus Streptokokken aufweist (López *et al.*, 2000). Der modulare Aufbau von Endolysinen ermöglicht die Verbesserung durch Austausch kompletter Domänen. So bietet sich die Möglichkeit der Stabilisierung eines Proteins durch Austausch labiler Einzeldomänen durch stabilere Einheiten gleicher Funktion. Beispielsweise konnten, durch Austausch der N-terminalen Domäne zwischen den Lysozymen der Bakteriophagen T7 und K11, chimäre Proteine erhalten werden, welche erhöhte thermische Stabilität im Vergleich zu den Ausgangsproteinen aufweisen (Alcantara *et al.*, 2007). Bei einer Variante (K11T7-Lysozym) konnte eine, gegenüber den Wildtypproteinen um etwa 45% gesteigerte Amidase-Aktivität detektiert werden. Die Fusionierung verschiedener Domänen bietet außerdem die Möglichkeit ein Protein zu entwickeln, welches die

Eigenschaften beider Domänen in einem Molekül vereint (García *et al.*, 1990; Croux *et al.*, 1993). Dies wurde anhand der Fusion von B30-Endolysin mit Lysostaphin gezeigt. B30-Endolysin lysiert Streptokokken, Lysostaphin *Staphylococcus aureus*. Das Fusionsprotein aus N-terminal lokalisiertem B30 und Lysostaphin am C-Terminus vereint die Lysespektren beider Ausgangsproteine (Donovan *et al.*, 2006a). Weiterhin ist es möglich, die Wirtsspezifität eines Endolysins durch Austausch der Bindedomäne an das gewünschte Zielbakterium zu adaptieren (Díaz *et al.*, 1990). Die Aktivitätshemmung durch, am Einsatzort vorhandener Störfaktoren, kann mittels Einsatz anderer EADs vermindert oder eliminiert werden. Schließlich besteht die Möglichkeit der Kombination mehrerer EADs mit unterschiedlichen Angriffspunkten am Peptidoglycan (Sanz *et al.*, 1995). Auf diese Weise wird eine effektivere Zellyse erreicht und die Wahrscheinlichkeit von Resistenzbildung minimiert. Durch gezielte Entfernung potentieller Proteaseschnittstellen in exponierten Positionen (z.B. in der Linkerregion) wird eine Stabilisierung des Proteins gegen Proteolyse erreicht. Des Weiteren führt der Austausch oberflächenexponierter hydrophober Aminosäuren zu einer verringerten Aggregationsneigung und gesteigerten Löslichkeit des Proteins. In der vorliegenden Arbeit wurde das Wildtypprotein Pitti26Ami isoliert. Bei der Charakterisierung zeigte sich eine starke Hemmung der Zellyseaktivität in diversen Medien und Sera. Durch Austausch der CBD mit der CBDusa300 konnte eine gesteigerte Aktivität, ein breiteres Lysespektrum und eine erhöhte Löslichkeit erreicht werden (Abb. 4.10). K9 zeigte, im Gegensatz zum Wildtypprotein Pitti26Ami, auch in humanem Serum Zellyseaktivität (Abb. 4.15). Die Rückfaltungsausbeute blieb konstant. Allerdings brachte die Steigerung der Aktivität einen Verlust thermischer Stabilität mit sich (Abb. 4.29). Ohne den stabilisierenden Effekt von Arginin setzt die Aggregation von K9 bereits bei 46°C ein, während das Wildtyp-Endolysin erst bei 50°C zu aggregieren beginnt. Zur weiteren Optimierung wurden hydrophobe und aromatische Aminosäuren in den EADs, sowie Erkennungssequenzen für Proteasen aus der Linkerregion durch Punktmutation entfernt (4.6.1). Das resultierende Kandidatenprotein K10 erwies sich als resistent gegen Thrombinabbau (Abb. 4.22) und zeigte eine Lagerstabilität, welche mit der von K9 vergleichbar ist. Allerdings ist K10 wesentlich weniger oxidationsanfällig. Die Thermostabilität von K9 und K10 ist vergleichbar (Abb. 4.29). Da die niedrige Thermostabilität mit der CBDusa300 eingeführt wurde, erfolgte das Screening nach einer stabileren CBD. CBDLS erwies sich als die thermostabilste Zellwandbindedomäne (Abb. 4.49). Durch Austausch der

CBD in K10 konnte die thermische Stabilität des Gesamtproteins um etwa 6°C erhöht werden und liegt damit noch über der von Pitti26Ami (Abb. 4.50). Gleichzeitig zeigte K11 eine schnellere Lyse von *Staphylococcus aureus* in humanem Serum als K10 (Abb. 4.45). Die schnelle Lyse im Flüssiglysetest erwies sich jedoch bei der MBC-Bestimmung in humanem Serum als unvollständig (Abb. 4.48). Somit wurde das Design neuer Proteine notwendig. Zur Verminderung der Aktivitätshemmung in Serum wurde nach neuen EADs gesucht. Im Genom eines Prophagen des Stammes *Staphylococcus aureus* USA 300 wurde eine CHAP-Domäne identifiziert (CHAPusa7). Das Kandidatenprotein K12 entstand aus der Fusionierung der CHAP-Domäne mit der CBDLS. Durch Ersatz der CHAP-Domäne in K11 mit der CHAPusa7 entstand das Konstrukt K13. Die Proteine K10 bis K13 wurden per MBC-Messung in Puffer, humanem, Mäuse- und Rattenserum auf bakterizide Aktivität gegen *Staphylococcus aureus* untersucht (Abb. 4.57). Hierbei stellte sich heraus, dass selbst unter Einsatz der höchsten getesteten Konzentration (50µg/ml) von K11 und K13 keine vollständige Reduktion der Zellzahl in Serum möglich ist. Nur mit K12 konnte die Zellzahl in allen Sera ausreichend reduziert werden. Die, im Vergleich zu K10, etwas verminderte Hemmung der lytischen Aktivität von K12 in Mucin, prädestiniert K12 als Kandidat für eine topische Anwendung. K11 und K13 werden in Mucin stark inhibiert.

Die Idee, ein Arsenal an Domänen anzulegen und diese nach Bedarf zusammenzusetzen ist prinzipiell realisierbar. Für die Auswahl geeigneter Domänen zur Fusionierung, sollten die funktionellen Einheiten bestmöglich hinsichtlich Aktivität, Stabilität und Bindungseigenschaften charakterisiert werden. Die Länge der Linkerbereiche ist einerseits aufgrund möglicher sterischer Behinderungen andererseits wegen eventueller Interaktion der fusionierten Domänen von zentraler Bedeutung. Linkerbereiche sollten möglichst wenige Erkennungssequenzen für Proteasen enthalten.

### 5.4 *In vivo Untersuchungen am Kandidatenprotein K10*

Das potentielle Therapeutikum K10 wurde auf Toxizität in Zellkultur und in der Maus getestet (4.10.1). Hierbei konnte keine toxische Wirkung des Proteins festgestellt werden. Anschließend wurde eine Inhibition der lytischen Aktivität durch Immunserum aus subkutan immunisierten Kaninchen nachgewiesen (Abb. 4.35).

Nachfolgend konnte eine Hemmung des Enzyms durch Immunserum i.p., immunisierter Mäuse, nicht jedoch durch das i.v. immunisierter Mäuse festgestellt werden (Abb. 4.37). K10 stimuliert also in der humoralen Immunantwort die Bildung von Antikörpern, welche die Proteinaktivität neutralisieren. Bei i.v.-Applikation des Enzyms bleibt der Antikörpertiter jedoch so niedrig, dass keine Neutralisierung stattfindet. Ein systemischer Einsatz mit intravenöser Verabreichung des Wirkstoffs ist also prinzipiell möglich, da weder eine Toxizität festgestellt wurde noch eine Neutralisation durch Antikörper zu erwarten ist. In Versuchen zur Pharmakokinetik konnte eine Halbwertszeit von ca. 50 min per Aktivitätsmessung und Western Blot Analyse ermittelt werden (4.10.3). Diese ist akzeptabel, da beispielsweise für das Phagenlysin Cpl-1 nur eine Halbwertszeit von 20min in der Ratte ermittelt wurde (Entenza *et al.*, 2005).

Bei der Untersuchung der Wirksamkeit von systemisch appliziertem K10 wurde eine starke Reduktion der Zellzahl in der Kontrolle festgestellt (Abb. 4.42). Offensichtlich heften sich *Staphylococcus aureus* Zellen an Endothelzellen, wandern in sie ein oder breiten sich ins umliegende Gewebe aus. Die im Herzgewebe festgestellte Zellzahl von  $7 \times 10^4$  cfu/g verdeutlicht die effektive Penetration des Gewebes durch *Staphylococcus aureus*. Die Vielzahl der in (1.1.3) beschriebenen Bindepoteine und Pathogenitätsfaktoren erleichtert dem Bakterium die rasche Entfernung aus dem Blutstrom. Der mit K10 erzielte Effekt ist ungewöhnlich niedrig. Im Blut sowie im Herzgewebe konnte eine Reduktion der Zellzahl um den Faktor Drei gegenüber den unbehandelten Tieren festgestellt werden. Entweder sind die im Blutstrom verbliebenen Staphylokokkenzellen für das Protein nicht erkennbar, die Aktivität des Proteins wird im Blut gehemmt oder das Enzym selbst kann nicht verbreitet werden, da beispielsweise eine Bindung an Endothelzellen auftritt. Letzteres kann ausgeschlossen werden, da K10 im Gewebe aller Organe (Herz, Leber, Lunge, Niere, Milz) therapiert Tiere per Western Blot Analyse wieder gefunden wurde. Zwar wurde die Aktivitätshemmung von K10 in Ratten- oder Mäuseserum in (4.11) nachgewiesen, jedoch sollte die relativ hohe Dosis des Wirkstoffes (16mg/kg) für eine deutlich effektivere Zellzahlreduktion ausreichen. Die Maskierung der Zellen, z. B. hinter einem Fibrinwall (1.1.3) ist ein weiteres Kriterium, welches eine systemische Anwendung erschwert.

Der systemische Einsatz von Endolysinen als Möglichkeit zur Bekämpfung von Infektionen mit gram-positiven Erregern, wie *Streptococcus pyogenes* (Nelson *et al.*,

2001), *Streptococcus pneumoniae* (Loeffler *et al.*, 2001; Jado *et al.*, 2003) und *Bacillus anthracis* (Schuch *et al.*, 2002) wurde bereits experimentell bestätigt. Die Bekämpfung einer systemischen *Staphylococcus aureus*-Infektion und die nasale Dekolonisierung mit einem lytischen Phagenprotein wurden erst einmal beschrieben (Rashel *et al.*, 2007). Hier konnte mit dem Endolysin MV-L aus dem Phagen PhiMR11 eine Reduktion der Zellzahl in der Nase von Mäusen auf 61 cfu/Nase gegenüber 1818 cfu/Nase in der Pufferkontrolle erreicht werden. Der systemische Einsatz wurde ebenfalls an Mäusen getestet. Die Infektion erfolgte i.p. mit  $5 \times 10^9$  cfu/Maus. Nach 30 min wurden nur noch  $6 \times 10^4$  cfu/ml im Blut der infizierten Mäuse gefunden. Dies bestätigt ebenfalls die in Abb. 4.42 gezeigte Abnahme der Zellzahl im nicht therapierten Tier. Durch i.p. Therapie mit dem Protein MV-L wurde dann eine Reduktion der Zellzahl um den Faktor 7,5 auf  $8 \times 10^3$  cfu/ml erreicht. Dies entspricht dem 2,5-fachen Wert des in 4.10.4 mit K10 erreichten Faktors. Ein direkter Vergleich ist allerdings nicht möglich, da in dem publizierten Experiment Infektion und Therapie i.p. erfolgten, während in dieser Arbeit eine i.p. Infektion i.v. therapiert wurde. Der mögliche Einsatz des Bacteriocins Lysostaphin als Creme zur Nasendekolonisierung (Kokai-Kun *et al.*, 2003; Walsh S *et al.*, 2004) und als systemisches Therapeutikum (Schuhardt & Schindler, 1964; Harrison & Zygmunt 1967; Climo *et al.*, 1998; Kokai-Kun *et al.*, 2007) wurde im Tiermodell getestet. Allerdings wurde das Auftreten Lysostaphin-unempfindlicher *Staphylococcus aureus* beobachtet (Strandén *et al.*, 1997). Die Lysostaphinresistenz tritt aufgrund eines mutierten femA-Gens auf. Das Genprodukt FemA katalysiert die Anlagerung des zweiten und dritten Glycins der Pentaglycinbrücke des Peptidglycans von *Staphylococcus aureus* (Strandén *et al.*, 1997). Durch die Mutation kommt es nur zur Ausbildung von Monoglycinbrücken (Climo *et al.*, 2001). Die Angriffstelle von Lysostaphin liegt zwischen dem dritten und vierten Glycin (Schneewind *et al.*, 1995). Diese sind in Stämmen mit einer Monoglycinbrücke nicht vorhanden, so dass diese Stämme resistent gegen Lysostaphin sind (Kusuma *et al.*, 2007). Die Methicillin-Resistenz geht in Lysostaphin-resistenten Staphylokokken verloren, und der erfolgreiche Einsatz von  $\beta$ -Lactamantibiotika ist möglich (Strandén *et al.*, 1997). Durch Kombination der bakteriziden Wirksamkeit von Lysostaphin mit einer weiteren EAD (z.B. CHAPusa7) könnte die Resistenzbildung vermieden werden.

Eine Verwendung von Endolysinen als topisches Therapeutikum oder Mittel zur Dekolonisierung von Erregerträgern erscheint unproblematischer als der systemische

## 5 Zusammenfassende Diskussion

---

Einsatz. Ein entscheidendes Kriterium eines Wirkstoffes zur Wunddesinfektion ist die Resistenz gegenüber Proteaseverdau durch Thrombin. Diese wurde durch Entfernung der Thrombin-Erkennungssequenz in der Linkerregion zwischen der CHAP- und der Amidase\_2-Domäne in K10 erreicht. Die zur Dekolonisierung benötigte Funktionalität in Mucin wurde für die Kandidatenproteine K10 und K12 nachgewiesen (Abb. 4.54 und Abb. 4.55).

K12 stellte sich in dieser Arbeit als der vielversprechendste Kandidat für ein topisches Therapeutikum bzw. zur Dekolonisierung von Erregerträgern verwendbares Protein heraus. Es sind jedoch weitere *in vivo* Untersuchungen nötig.

## 6 Zusammenfassung

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Herstellung eines neuen, gereinigten funktionellen Bakteriophagenproteins zur systemischen und topischen Anwendung gegen Infektionen mit *Staphylococcus aureus*.

Nach der Isolation lytischer Bakteriophagen gegen *Staphylococcus aureus* aus Umweltproben wurde das Wirtsspektrum der Phagen untersucht. Aus dem Genom der isolierten Phagen mit einem geeigneten Wirtsspektrum wurden durch Homologiesuche potentielle Endolysinsequenzen identifiziert. Die Endolysine wurden rekombinant in *Escherichia coli* exprimiert. Anschließend erfolgte die Untersuchung der Lyseaktivität, der Löslichkeit, der Stabilität und der Spezifität der Proteine. Da alle isolierten Proteine unlöslich in *inclusion bodies* exprimiert werden, wurden Methoden zur Solubilisierung, Rückfaltung und Funktionstestung etabliert und optimiert. Das isolierte Wildtyp-Endolysin Pitti26Ami zeigte in Puffer lytische Aktivität gegen *Staphylococcus aureus*. In humanem Serum konnte keine Lyseaktivität detektiert werden. Zur Minimierung der Aktivitätshemmung in Serum wurde ein gezielter intermolekularer Austausch einzelner Domänen verschiedener Kandidatenproteine genutzt. Durch Austausch der CBD von Pitti26Ami gegen die aus Plyusa300, eines Prophagen-Endolysins aus *Staphylococcus aureus* USA 300 MLST type 8, wurde das Kandidatenprotein K9 erzeugt. Mit diesem Enzym konnte Zelllyseaktivität auch in humanem Serum festgestellt werden. Nach Entfernung von oberflächenexponierten Aromaten, hydrophoben Aminosäuren und Protease-Erkennungssequenzen entstand das Kandidatenprotein K10. Dieses Protein wurde *in vitro* hinsichtlich Stabilität und Lyseaktivität charakterisiert. Die Aktivitätssteigerung in K9 und K10 wurde auf Kosten einer, um 6°C gesunkenen Thermostabilität erreicht. Die CBD erwies sich dabei als die instabilste Domäne. Weiterhin konnte nachgewiesen werden, dass der Großteil der hydrolytischen Aktivität in der CHAP-Domäne lokalisiert ist. In den nachfolgenden *in vivo* Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass K10 weder in Zellkultur, noch im Säuger toxisch wirkt. Durch polyklonale Antikörper konnte die Aktivität des Proteins *in vitro* neutralisiert werden. Bei *in vivo* Untersuchungen in Mäusen konnte eine Neutralisation durch Immunserum i.p. immunisierter Tiere festgestellt werden. Serum i.v. immunisierter Tiere zeigte keine Tendenz zur Neutralisation von K10. Pharmakokinetische Untersuchungen in Ratten und Western Blot Analysen ergaben eine Halbwertszeit des Proteins von 50 min. Ein

Abbau des Wirkstoffs in Organen erfolgte nur in der Niere. Schließlich konnte eine Reduktion der Zellzahl im Blut und im Herzgewebe von Ratten, um den Faktor 3, festgestellt werden. Dies reichte in einem Tiermodell für eine Überlebensrate von 100% aus. In einem „härteren“ Modell konnte die Wirkung jedoch nicht bestätigt werden. Aus Lysetests in verschiedenen Sera ging hervor, dass die hydrolytische Aktivität von K10 in Ratten- und Mäuseserum, im Gegensatz zum Einsatz in humanem Serum sehr stark gehemmt wird. Durch Einsatz der CBD aus dem Bacteriocin Lysostaphin konnte eine Stabilisierung des Proteins um 6°C gegenüber K10 erreicht werden. Die schnellere Zelllyse in Serum erwies sich jedoch als unvollständig, weshalb nach einer anderen EAD gesucht wurde. Durch Fusionierung einer N-terminalen CHAP-Domäne aus einem Prophagen des Stammes *Staphylococcus aureus* USA 300 MLST type 8 mit der CBD von Lysostaphin am C-Terminus wurde das Protein K12 erzeugt. Dieses zeigte eine Thermostabilität, welche mit der von K10 vergleichbar ist. K12 erwies sich als das Protein mit der höchsten bakteriziden Aktivität in Ratten-, Maus-, und humanem Serum. Die zusätzliche Insertion einer zentralen Amidase zwischen die beiden Domänen von K12 hatte keine Verbesserung der Eigenschaften zur Folge. K12 kristallisierte sich als vielversprechendster Kandidat für eine systemische Anwendung heraus, allerdings ist die Bestätigung der *in vitro* Ergebnisse durch *in vivo* Untersuchungen nötig.

Da, neben der systemischen Anwendung des Enzyms auch der Einsatz zur Dekolonisierung, bzw. als topisch einsetzbares Therapeutikum geplant war, wurden Zelllysetests in Mucin durchgeführt. Hierbei zeigten die Kandidaten K10 und K12 Zelllyseaktivität von *Staphylococcus aureus* Zellen der exponentiellen Wachstumsphase. Mit K12 war, im Gegensatz zu K10 auch die effektive Lyse stationärer Zellen in Mucin möglich. K12 erwies sich als das Protein, mit der effektivsten Lyseaktivität stationärer Zellen. Aus diesen Versuchen ging K12 als bestgeeignetster Kandidat hervor.

Bei der Entwicklung eines antibakteriellen Therapeutikums müssen diverse Faktoren, wie Funktionalität in der Anwendungsumgebung, Stabilität des Proteins, Selektivität, Toxizität und Immunogenität beachtet werden. Prinzipiell wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass Phagenproteine nach einer gezielten Optimierung als antibakterielle Therapeutika zur selektiven Bekämpfung gram-positiver Erreger, wie z.B. *Staphylococcus aureus*, einsetzbar sind.

## 7 Literaturverzeichnis

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

**Akiyama H, Ueda M, Kanzaki H, Tada J, Arata J. (1997)** Biofilm formation of *Staphylococcus aureus* strains isolated from impetigo and furuncle: role of fibrinogen and fibrin. *J Dermatol Sci* **16**(1):2-10.

**Alcantara EH, Kim DH, Do AI, Lee SS. (2007)** Bi-functional Activities of Chimeric Lysozymes Constructed by Domain Swapping between Bacteriophage T7 and K11 Lysozymes. *J Biochem Mol Biol* **40**(4):539-46.

**Araki Y, Ito E. (1989)** Linkage units in cell walls of Gram-positive bacteria. *Crit Rev Microbiol* **17**:121-135.

**Baba T, Schneewind O. (1996)** Target cell specificity of a bacteriocin molecule: a C-terminal signal directs lysostaphin to the cell wall of *Staphylococcus aureus*. *EMBO J* **15**(18):4789-97.

**Barber M. (1961)** Methicillin-resistant staphylococci. *J Clin Path* **14**:385.

**Bodén MK, Flock JI (1992)** Evidence for three fibrinogen-binding proteins with unique properties from *Staphylococcus aureus* strain Newman. *Microb Pathog* **12**(4):289-98.

**Boles BR, Horswill AR. (2008)** *agr*-Mediated Dispersal of *Staphylococcus aureus* Biofilms. *PloS Pathog* **4**(4):e1000052.

**Borysowski J, Weber-Dabrowska B, Górska A. (2006)** Bacteriophage endolysins as a novel class of antibacterial agents. *Exp Biol Med (Maywood)* **231**(4):366-77.

**Boyle-Vavra S, Daum R. (2007)** Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: the role of Panton-Valentine leukocidin. *Lab Invest* **87**(1):3-9.

**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.

**Braff MH, Jones AL, Skerrett SJ, Rubens CE. (2007)** *Staphylococcus aureus* exploits cathelicidin antimicrobial peptides produced during early pneumonia to promote staphylokinase-dependent fibrinolysis. *J Infect Dis* **195**(9):1365-72.

**Brnáková Z, Farkasovska J, Godány A. (2005)** The use of bacteriophages in eliminating polyresistant strains of *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus agalactiae*. *Folia Microbiol* **50**(3):187-94.

**Centers for Disease Control and Prevention (CDC). (2002)** *Staphylococcus aureus* resistant to vancomycin-United States, MMWR Morb Mortal Wkly Rep. 2002 **51**(26):565-7.

**Charan R, Reddy K, Hauke L, Rudolph R, Lange C. (2004)** L-Arginine increases the solubility of unfolded species of hen egg white lysozyme. *Protein Sci* **14**:929-935.

**Chibani-Chennoufi S, Bruttin A, Dillmann ML, Brüssow H. (2004)** Phage-host interaction: an ecological perspective. *J Bacteriol* **186**(12):3677-86.

**Climo MW, Patron RL, Goldstein BP, Archer GL. (1998)** Lysostaphin treatment of experimental methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* aortic valve endocarditis. *Antimic Agents Chemother* **42**:1355-1360.

**Climo M, Ehlert K, Archer G. (2001)** Mechanism and suppression of lysostaphin resistance in oxacillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimic Agents Chemother* **45**:1431-1437.

**Collen D, Lijnen HR. (1994)** Staphylokinase, a fibrin-specific plasminogen activator with therapeutic potential? *Blood* **84**(3):680-6.

**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.

**d'Herelle F. (1917)** Sur un microbe invisible antagoniste des bacilles dysentériques. *C R Acad Sci (Paris)* **165**:373-5.

**d'Herelle F. (1926)** The Bacteriophage and its Behavior. *Baltimore: The Williams & Wilkins Company*.

**Davison MM, Derow MA, Walker BS. (1949)** Staphylococcal Hyaluronidase. *J Bacteriol* **58**(6):717-22.

**De Las Rivas B, García JL, López R, García P. (2002)** Purification and Polar Localization of Pneumococcal LytB, a Putative Endo- $\beta$ -N-Acetylglucosaminidase: the Chain-Dispersing Murein Hydrolase. *J Bacteriol* **184**(18):4988-5000.

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

**Díaz E, López R, Garcia JL. (1991)** Chimeric Pneumococcal cell wall Lytic Enzymes Reveal Important Physiological and Evolutionary Traits. *J Biol Chem* **266**(9):5464-71.

**Diep BA, Gill SR, Chang RF, Phan TH, Chen JH, Davidson MG, Lin F, Lin J, Carleton HA, Mongodin EF, Sensabaugh GF, Perdreau-Remington F. (2006)** Complete genome sequence of USA300, an epidemic clone of community-acquired meticillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Lancet* **367**(9512):731-9.

**Donovan DM, Foster-Frey J, Dong S, Rousseau GM, Moineau S, Pritchard DG. (2006a)** 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 DM, Lardeo M, Foster-Frey J. (2006b)** Lysis of staphylococcal mastitis pathogens by bacteriophage phi11 endolysin. *FEMS Microbiol Lett* **265**(1):133-9.

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

**Dubrac S, Boneca IG, Poupel O, Msadeki T. (2007)** New Insights into the WalK/WalR (YycG/YycF) Essential Signal Transduction Pathway Reveal a Major Role in Controlling Cell Wall Metabolism and Biofilm Formation in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* **189**(22):8257-69.

**Entenza JM, Loeffler JM, Grandgirard D, Fischetti VA, Moreillon P. (2005)** Therapeutic Effects of Bacteriophage Cpl-1 Lysin against *Streptococcus pneumoniae* Endocarditis in Rats. *Antimic Agents Chemother* **49**(11):4789-4792.

**European Antimicrobial Resistance Surveillance System EARSS**  
<http://www.rivm.nl/earss/> database/

**Fairbanks G, Streck TL, Wallach DFH. (1971)** Electrophoretic analysis of major polypeptides of human erythrocyte membrane. *Bioch* **10**:2606-13.

**Fischer W. (1988)** Physiology of lipoteichoic acids in bacteria. *Adv Microb Physiol* **29**:233-302.

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

**Flock JI, Fröman G, Jönsson K, Guss B, Signäs C, Nilsson B, Raucci G, Höök M, Wadström T, Lindberg M. (1987)** Cloning and expression of the gene for a fibronectin-binding protein from *Staphylococcus aureus*. *EMBO J* **6**(8):2351-7.

**Foster SJ. (1995)** Molecular Characterization and functional analysis of the major autolysin of *Staphylococcus aureus* 8325/4. *J Bacteriol* **177**(19):5723-5.

**Fuda C, Suvorov M, Vakulenko SB, Mobashery S. (2004)** The basis for resistance to beta-lactam antibiotics by penicillin-binding protein 2a of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* **279**(39):40802-6.

**Furukawa S, Kuchma SL, O'Toole GA. (2006)** Keeping their options open: acute versus persistent infections. *J Bacteriol* **188**:1211-7.

**García E, García JL, Arraras A, Sanchez-Puelles JM, Lopez R. (1988)** Molecular evolution of lytic enzymes of *Streptococcus pneumoniae* and its bacteriophages. *Proc Natl Acad Sci USA* **85**:914-8.

**García P, García JL, García E, Sanchez-Puelles JM, Lopez R. (1990)** Modular organization of the lytic enzymes of *Streptococcus pneumoniae* and its bacteriophages. *Gene* **86**:81-88.

**Geier MR, Trigg ME, Merril CR. (1973)** The fate of bacteriophage lambda in non-immune germ-free mice. *Nature* **246**:221-223.

**Gilbert I. (1931)** Dissociation in an encapsulated *staphylococcus*. *J Bacteriol* **21**:157-160.

**Gill JJ, Hollyer T, Sabour PM. (2007)** Bacteriophages and phage-derived products as antibacterial therapeutics. *Exp Opin Ther Pat* **17**(11):1341-1350.

**Gordon RJ, Lowy FD. (2008)** Pathogenesis of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* infection. *Clin Infect Dis* **46**(5):350-359.

**Gratia, A. (1925)** Sur un remarquable exemple d'antagonisme entre deux souches de colibacille. *Compt Rend Soc Biol* **93**:1040-1042.

**Hagens S, Habel A, von Ahsen C, von Gabain A, Bläsi U. (2004)** Therapy of experimental *Pseudomonas* infections with a nonreplicating genetically modified phage. *Antimicrob Agents Chemother* **48**:3817-3822.

**Haggar A, Hussain M, Lönnies H, Herrmann M, Norrby-Teglund A, Flock JI. (2003)** Extracellular adherence protein from *Staphylococcus aureus* enhances internalization into eukaryotic cells. *Infect Immun* **71**(5):2310-7.

**Hahn H, Falke D, Kaufmann SHE, Ullmann U. (2005)** *Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie*-5. vollständig aktualisierte Auflage. Springer Medizin-Verlag.

**Hanaki H, Labischinski H, Inaba Y, Kondo N, Murakami H, Hiramatsu K. (1998)** Increase in glutamine-non-amidated muropeptides in the peptidoglycan of vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* strain Mu50. *J Antimicrob Chemother* **42**:315-20.

**Hanlon GW. (2007)** Bacteriophages: an appraisal of their role in the treatment of bacterial infections. *Int J Antimicrob Agents* **30**(2):118-28.

**Harrison EF, Zygmunt WA. (1967)** Lysostaphin in experimental renal infections. *J Bacteriol* **93**(2):520-524.

**Hermoso JA, García JL, García P. (2007)** Taking aim on bacterial pathogens: from phage therapy to enzybiotics. *Curr Opin Microbiol* **10**(5):1-12.

**Hiramatsu K, Aritaka N, Hanaki H, Kawasaki S, Hosoda Y, Hori S, Fukuchi Y, Kobayashi I. (1997)** Dissemination in Japanese hospitals of strains of *Staphylococcus aureus* heterogeneously resistant to vancomycin. *Lancet* **350**(9092):1670-1673.

**Holt JG, Krieg NR, Sneath PHA, Staley JT, Williams ST. (2000)** *Bergey's Manual of determinative Bacteriology* – 9<sup>th</sup> ed.

**Jado I, López R, García E, Fenoll A, Casal J, García P. (2003)** Phage lytic enzymes as therapy for antibiotic-resistant *Streptococcus pneumoniae* infection in a murine sepsis model. *J Antimicrob Chemother* **52**:967-973.

**Jaenicke R. (1987)** Folding and association of proteins. *Prog Biophys Mol Biol* **49**(2-3):117-237.

**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.

**Kaneko J, Kamio Y. (2004)** Bacterial two-component and hetero-heptameric pore-forming cytolytic toxins: structures, pore-forming mechanism, and organization of the genes. *Biosci Biotechnol Biochem* **68**(5):981-1003.

**Karakawa WW, Vann WF. (1982)** Capsular polysaccharides of *Staphylococcus aureus*. *Semin Infect Dis* **4**:285–293.

**Karakawa WW, Sutton A, Schneerson R, Karpas A, Vann WF. (1988)** Capsular antibodies induce type-specific phagocytosis of capsulated *Staphylococcus aureus* by human polymorphonuclear leukocytes. *Infect Immun* **56**:1090–1095.

**Knappe C. (2007)** *Inclusion body* Expression, Reinigung und Rückfaltung eines antimikrobiell wirkenden Bakteriophagenproteins. Etablierung eines optimierten, skalierbaren Prozesses für die Produktion. *Diplomarbeit*.

**Kokai-Kun JF, Walsh SM, Chanturiya T, Mond JJ. (2003)** Lysostaphin cream eradicates *Staphylococcus aureus* nasal colonization in a cotton rat model. *Antimicrob Agents Chemother* **47**(5):1589-97.

**Kokai-Kun JF, Chanturiya T, Mond JJ. (2007)** Lysostaphin as a treatment for systemic *Staphylococcus aureus* infection in a mouse model. *J Antimicrob Chemother* **60**(5):1051-9.

**Kola A, Kirschner P, Gohrbandt B, Chaberny IF, Mattner F, Strüber M, Gastmeier P, Suerbaum S. (2007)** An infection with linezolid-resistant *S.aureus* in a patient with left ventricular assist system. *Scand J Infect Dis* **39**(5):463-5.

**Kronvall G, Jönsson K. (1999)** Receptins: a novel term for an expanding spectrum of natural and engineered microbial proteins with binding properties for mammalian proteins. *J Mol Recognit* **12**(1):38-44.

**Kropinski AM. (2006)** Phage therapy – Everything old is new again. *Can J Infect Dis Med Microbiol* **17**(5):297-306.

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

**Kusuma C, Jadanova A, Chanturiya T, Kokai-Kun JF. (2007)** Lysostaphin-resistant variants of *Staphylococcus aureus* demonstrate reduced fitness *in vitro* and *in vivo*. *Antimicrob Agents Chemother* **51**(2):475-482.

**Linde H, Lehn N. (2005)** Methicillin-resistenter *Staphylococcus aureus* (MRSA) – Diagnostik. *Dtsch Med Wochenschr* **130**(11):582-5.

**Llewelyn M, Sriskandan S, Peakman M, Ambrozak DR, Douek DC, Kwok WW, Cohen J, Altmann DM. (2004)** HLA class II polymorphisms determine responses to bacterial superantigens. *J Immunol* **172**(3):1719-26.

**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.

**López R, García JL, García E, Ronda C, García P. (1992)** Structural analysis and biological significance of the cell wall lytic enzymes of *Streptococcus pneumoniae* and its bacteriophage. *FEMS Microbiol Lett* **79**:439-447.

**López R, García E, García P, García JL. (1997)** The pneumococcal cell wall degrading enzymes: a modular design to create new lysins?. *Microb Drug Resist* **3**:199-211.

**López R, González MP, García E, García JL, García P. (2000)** Biological roles of two new murein hydrolases of *Streptococcus pneumoniae* representing examples of module shuffling. *Res Microbiol* **151**:437-443.

**López R, García E. (2004)** Recent trends on the molecular biology of pneumococcal capsules, lytic enzymes, and bacteriophage. *FEMS Microbiol Rev* **28**(5):553-580.

**Lottspeich F, Zorbas H. (1998)** Bioanalytik. Spektrum Akad Verl.

**Lu JZ, Fujiwara T, Komatsuzawa H, Sugai M, Sakon J. (2006)** Cell wall-targeting domain of glycylglycine endopeptidase distinguishes among peptidoglycan cross-bridges. *J Biol Chem* **281**(1):549-58.

**Malchiodi EL, Eisenstein E, Fields BA, Ohlendorf DH, Schlievert PM, Karjalainen K, Mariuzza RA. (1995)** Superantigen binding to a T cell receptor beta chain of known three-dimensional structure. *J Exp Med* **182**(6):1833-45.

**Matsuzaki S, Rashel M, Uchiyama J, Sakurai S, Ujihara T, Kuroda M, Ikeuchi M, Tani T, Fujieda M, Wakiguchi H, Imai S. (2005)** Bacteriophage therapy: A revitalized therapy against bacterial infectious diseases. *J Infect Chemother* **11**:211-9.

**McCoy KM, Frost RA. (1988)** Method for solubilization and naturation of somatotropin. *Patent number: 5064943, C07K 312; C07K 1506.*

**Mullis KB, Falcoona F, Scharf SJ, Raiki RK, Horn GT, Ehrlich HA. (1986)** Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: The Polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Symp Quant. Biol* **51**:263-273.

**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-alanyl-glycine endopeptidase activity. *J Biol Chem* **274**:15847-15856.

**Nelson D, Loomis L, Fischetti V. (2001)** Prevention and elimination of upper respiratory colonization of mice by group A Streptococci by using a bacteriophage lytic enzyme. *Proc Natl Acad Sci USA* **98**:4107-12.

**Neuhaus FC, Baddiley J. (2003)** A continuum of anionic charge: structures and functions of D-alanyl-teichoic acids in Gram-positive bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* **67**:686-723.

**Ní Eidhin D, Perkins S, Francois P, Vaudaux P, Höök M, Foster TJ. (1998)** Clumping factor B (ClfB), a new surface-located fibrinogen-binding adhesin of *Staphylococcus aureus*. *Mol Microbiol* **30**(2):245-57.

**Nilsson IM, Patti JM, Bremell T, Hook M, Tarkowski A. (1998)** Vaccination with a recombinant fragment of collagen adhesin provides protection against *Staphylococcus aureus*-mediated septic death. *J Clin Invest* **101**:2640-9.

**Noble MC, Virani Z, Cree RGA. (1992)** Co-transfer of vancomycin and other resistance genes from *Enterococcus faecalis* NCTC 12201 to *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiol Lett* **93**:195-8.

**O'Brien LM, Walsh EJ, Massey RC, Peacock SJ, Foster TJ. (2002)** *Staphylococcus aureus* clumping factor B (ClfB) promotes adherence to human type I cytokeratin 10: implications for nasal colonization. *Cell Microbiol* **4**(11):759-70.

**O'Flaherty S, Coffey A, Meaney W, Fitzgerald GF, Ross RP. (2005)** The recombinant phage lysin LysK has a broad spectrum of lytic activity against clinically relevant staphylococci, including methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* **187**:7161-7164.

**O'Riordan K, Lee JC. (2004)** *Staphylococcus aureus* Capsular Polysaccharides. *Clin Microbiol Rev* **17**(1):218-34.

**Oshida T, Sugai M, Komatsuzawa H, Hong Y-M, Suginaka H, Tomasz A. (1995)** A *Staphylococcus aureus* autolysin that has an N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase domain and an endo-beta-N-acetylglucosaminidase domain: cloning, sequence analysis, and characterization. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**(1):285-289.

**Palma M, Haggar A, Flock JI. (1999)** Adherence of *Staphylococcus aureus* is enhanced by an endogenous secreted protein with broad binding activity. *J Bacteriol* **181**(9):2840-5.

**Palmqvist N, Foster T, Tarkowski A, Josefsson E. (2002)** Protein A is a virulence factor in *Staphylococcus aureus* arthritis and septic death. *Microb Pathog* **33**(5):239-49.

**Park PW, Rosenblom J, Abrams WR, Rosenblom J, Mecham RP. (1996)** Molecular cloning and expression of the gene for elastin-binding protein (ebpS) in *Staphylococcus aureus*. *J Biol Chem* **271**(26):15803-9.

**Parsek MR, Singh PK. (2003)** Bacterial biofilms: an emerging link to disease pathogenesis. *Annu Rev Microbiol* **57**:677-701.

**Patti JM, Jonsson H, Guss B, Switalski LM, Wiberg K, Lindberg M, Höök M. (1992)** Molecular characterization and expression of a gene encoding a *Staphylococcus aureus* collagen adhesin. *J Biol Chem* **267**(7):4766-72. Erratum in: *J Biol Chem* **269**(15):11672.

**Paulsson M, Liang OD, Ascencio F, Wadström T. (1992)** Vitronectin-binding surface proteins of *Staphylococcus aureus*. *Zentralbl Bakteriol* **277**(1):54-64.

**Pohlmann-Dietze P, Ulrich M, Kiser KB, Doring G, Lee JC, Fournier JM, Botzenhart K, Wolz C. (2000)** Adherence of *Staphylococcus aureus* to endothelial cells: influence of the capsular polysaccharide, the global regulator agr, and the bacterial growth phase. *Infect Immun* **68**:4865-4871.

**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.

**Riley MA, Wertz JE. (2002)** BACTERIOCINS: Evolution, Ecology and Application. *Annu Rev Microbiol* **56**:117–37

**Rohwer F, Edwards R. (2002)** The Phage Proteomic Tree: a genome-based taxonomy for phage. *J Bacteriol* **184**(16):4529-35.

**Sanz JM, García P, García JL. (1995)** Construction of a multifunctional pneumococcal murein hydrolase by modul assambly. *Eur J Biochem* **235**:601-605.

**Sass P, Bierbaum G. (2007)** Lytic activity of recombinant bacteriophage phi11 and phi12 endolysins on whole cells and biofilms of *Staphylococcus aureus*. *Appl Environ Microbiol* **73**(1):347-52.

**Schellman JA, Oriel P. (1961)** Origin of the Cotton effect of helical polypeptides. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* **21**:95-118.

**Schleifer KH, Kandler O. (1972)** Peptidoglycan types of bacterial cell walls and their taxonomic implications. *Bacteriol Rev* **36**(4):407-477.

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

**Schneewind OA, Fowler A, Faull KF. (1995)** Structure of the cell wall anchor of surface proteins of *Staphylococcus aureus*. *Science* **268**:103-106.

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

**Schuhardt VT, Schindler CA. (1964)** Lysostaphin therapy in mice infected with *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* **88**:815-816.

**Singh SM, Panda AK. (2005)** Solubilization and Refolding of Bacterial Inclusion Body Proteins. *J Biosci Bioengin* **99**(4):303-310.

**Smith TJ, Blackman SA, Foster SJ. (2000)** Autolysins of *Bacillus subtilis*: multiple enzymes with multiple functions. *Microbiol* **146**:249-262.

**Sompolinsky D, Samra Z, Karakawa WW, Vann WF, Schneerson R, Malik Z. (1985)** Encapsulation and capsular types in isolates of *Staphylococcus aureus* from different sources and relationship to phage types. *J Clin Microbiol* **22**:828–834.

**Spink WW, Ferris V. (1945)** Quantitative action of penicillin inhibitor from penicillin-resistant strains of staphylococci. *Science* **102**(2644):221-223.

**Strandén A, Ehlert K, Labischinski H, Berger-Bachi B. (1997)** Cell wall monoglycine cross-bridges and methicillin hypersusceptibility in a femAB null mutant of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* **179**(1):9-16.

**Sugai M, Fujiwara T, Akiyama T, Ohara M, Komatsuzawa H, Inoue S, Suginaka H. (1997)** Purification and molecular characterization of glycylglycine endopeptidase produced by *Staphylococcus capitis* EPK1. *J Bacteriol* **179**(4):1193-202.

**Takác M, Bläsi U. (2005)** Phage P68 virion-associated protein 17 displays activity against clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* **49**(7):2934-40.

**Thakker MJ, Park JS, Carey V, Lee JC. (1998)** *Staphylococcus aureus* serotype 5 capsular polysaccharide is antiphagocytic and enhances bacterial virulence in a murine bacteremia model. *Infect Immun* **66**:5183-5189.

**Tsiodras, S., Gold, H. S., Sakoulas, G., Eliopoulos, G. M., Wennersten, C., Venkataraman, L. (2001)** Linezolid resistance in a clinical isolate of *Staphylococcus aureus*. *Lancet* **358**:207–8.

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

**Vernachio J, Bayer AS, Le T, Chai YL, Prater B, Schneider A. (2003)** Anti-clumping factor A immunoglobulin reduces the duration of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteremia in an experimental model of infective endocarditis. *Antimicrob Agents Chemother* **47**:3400-6.

**Vollmer W, Blanot D, de Pero MA. (2008)** Peptidoglycan structure and architecture. *FEMS Microbiol Rev* **32**(2):149-67.

**Walsh S, Kokai-Kun J, Shah A, Mond J. (2004)** Extended nasal residence time of Lysostaphin and an anti-staphylococcal monoclonal antibody by delivery in semisolid or polymeric carriers. *Pharm Res* **21**(10):1770-1775.

**Walsh EJ, O'Brien LM, Liang X, Hook M, Foster TJ. (2004)** Clumping factor B, a fibrinogen-binding MSCRAMM (microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules) adhesin of *Staphylococcus aureus*, also binds to the tail region of type I cytokeratin 10. *J Biol Chem* **279**(49):50691-9.

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

**Wang I-N, Smith DL, 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.

**Weidenmaier C, Peschel A. (2008)** Teichoic acids and related cell-wall glycopolymers in Gram-positive physiology and host interactions. *Nat Rev Microbiol* **6**(4):276-87.

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

**Wilkinson BJ, Holmes KM. (1979)** *Staphylococcus aureus* Cell Surface: Capsule as a Barrier to Bacteriophage Adsorption. *Infect Immun* **23**(2):549-52.

**Woody RW. (1996)** Theory of Circular Dichroism of Proteins. in Circular Dichroism and the Conformational Analysis of Biomolecules. edited by Fasman GD. *Plenum Press*.

**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.

**Yokoi KJ, Kawahigashi N, Uchida M, Sugahara K, Shinohara M, Kawasaki K, Nakamura S, Taketo A, Kodaira K. (2005)** The two-component cell lysis genes holW<sub>MY</sub> and lysW<sub>MY</sub> of the *Staphylococcus warneri* M phage varphiW<sub>MY</sub>: cloning, sequencing, expression, and mutational analysis in *Escherichia coli*. *Gene* **351**:97-108.

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

**Young R, Bläsi U. (1995)** Holins: form and function in bacteriophage lysis. *FEMS Microbiol Rev* **16**:1231-41.

## 8 Abkürzungsverzeichnis

|                    |  |
|--------------------|--|
| Abs <sub>xxx</sub> | Absorption bei xxx nm Wellenlänge                      |
| ABTS               | 2,2Azino-bis(3-ethyl)benzthiazoline 6-sulfonic acid    |
| ATCC               | American Type Culture Collection                       |
| BSA                | bovines Serumalbumin                                   |
| bidest.            | doppelt destilliert                                    |
| bzw.               | beziehungsweise  |
| CBD                | cellwall binding domain                                |
| CD                 | Circulardichroismus                                    |
| cfu                | colony forming units                                   |
| DSMZ               | Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen |
| EAD                | enzymatisch aktive Domäne                              |
| EDTA               | Ethyldiamintetraessigsäure                             |
| GdnHCl             | Guanidinhydrochlorid                                   |
| Hepes              | 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure  |
| IPTG               | Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid             |
| l                  | Liter  |
| LS                 | Lysostaphin  |
| MBC                | <i>minimal bactericidal concentration</i>              |
| MES                | 2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure                       |
| MIC                | <i>minimal inhibitory concentration</i>                |
| min                | Minute   |
| ml                 | Milliliter   |
| $\mu$ l            | Mikroliter   |
| MOPS               | 3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure                     |

## 8 Abkürzungsverzeichnis

---

|                   |  |
|-------------------|--|
| nm                | Nanometer  |
| OD <sub>600</sub> | optische Dichte bei einer Wellenlänge von 600nm          |
| p.a.              | <i>pro analysi</i> (zur Analyse)                         |
| PBST              | phosphate buffered saline with tween                     |
| ProCC             | Profos Culture Collection                                |
| SDS               | sodiumdodecylsulfate                                     |
| sec               | Sekunde  |
| Tris-HCl          | 2-Amino-2-(hydroxymethyl)-propan-1,3-diol - hydrochlorid |
| 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. Wurde ein Aminosäureaustausch vorgenommen, so wurde hinter der Zahl noch die neu eingesetzte Aminosäure angegeben.

## 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. Reinhard Sternen.

Besonders bedanken möchte ich mich bei Dr. Holger Grallert für sein stetes Interesse an meiner Arbeit, ständige Diskussionsbereitschaft, viele Ideen und die große fachliche Unterstützung. Für fachliches Interesse danke ich auch Dr. Stefan Miller.

Erst die finanzielle Unterstützung durch das BMBF ermöglichte die Durchführung dieser Arbeit. Hierfür herzlichen Dank.

Meinen Kolleginnen und Kollegen möchte ich meinen Dank für das herzliche Arbeitsklima, für die gute Zusammenarbeit und gegenseitige Unterstützung aussprechen. Sabine Diller, Anja Philipp, Karola Hilmer, Daniela Eder und Fredy Piper danke ich für Unterstützung bei breit angelegten Bindestudien und Lysetests. Christoph Knappe gilt mein Dank für seine Bemühungen in der Rückfaltung und Proteinreingung, die vielen Kollegen zu Gute kam. 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, sowie ihre Sicht der Dinge bedanken. Sibylle Frick danke ich für die Fermentation meiner Klone zur Sicherstellung des Nachschubs.

Bei Falko Bretfeld bedanke ich mich für angeregte, auch wissenschaftliche Diskussionen und die Erleichterung stressigerer Abschnitte durch das Teilen derselben. Ironie, eine Spur Zynismus und eine durch und durch optimistische Grundeinstellung haben manchen Frust egalisiert. Für viele Gespräche, Anregungen, die Gestaltung diverser Mittagspausen und mancher Freizeit möchte ich mich vor allem bei Michael Euringer, Sarah Feldkirchner, Dr. Sonja Leopoldseder, Michaela Pötzl und Anna Scherzinger bedanken.

## 9 Danksagung

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